

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL ALKALİ YANIK MODELİNDE AMNİON ZARI İMPLANTASYONU VE KOLLAJEN  
CROSSLİNKİNG İŞLEMİNİN İNFLAMASYON, NEOVASKÜLARİZASYON VE ÜLSERASYON  
MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Sevgi SUBAŞI

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2016

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL ALKALİ YANIK MODELİNDE AMNİON ZARI İMPLANTASYONU VE KOLLAJEN  
CROSSLİNKİNG İŞLEMİNİN İNFLAMASYON, NEOVASKÜLARİZASYON VE ÜLSERASYON  
MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Sevgi SUBAŞI

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özgül ALTINTAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Etik Kurul Onayı 11.06.2015 karar tarihli KOÜ/HADYEK 6/6- 2015

## ÖNSÖZ

Kliniğimiz ve üniversitemiz kurucularından öğrencilik ve uzmanlık eğitimim sürecinde tanımaktan ve onunla çalışmaktan şeref duyduğum değerli hocam Prof.Dr. Yusuf Çağlar'a teşekkür ederim. Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Prof.Dr. Nursen Yüksel'e sabır ,ilgi ve sevgisinden , eğitim sürecimde olan tüm desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Öğrencilik yıllarımdan beri tanıdığım uzmanlık eğitimimle birlikte hayranlığımın kat kat arttığı ,eğitim ve tez sürecimin hiçbir aşamasında beni yalnız bırakmayan yakınlığı, sevgisi ve ilgisiyle ailemden biri gibi gördüğüm , hasta yaklaşımı ve hekimlik kimliğiyle her zaman örnek aldığım çok kıymetli hocam Prof.Dr. Özgül Altıntaş'a çok teşekkür ederim.

Cerrahi deneyimi, disiplini ve işine duyduğu saygıyla etrafındaki herkeste olduğu gibi bende de hayranlık uyandıran, onunla çalışma fırsatını yakalamaktan onur duyduğum değerli hocam Prof.Dr.Levent Karabaş'a teşekkür ederim.

Güleryüzü ve samimiyetiyle tüm eğitim sürecimde örnek aldığım, cerrahi eğitimimde desteğiyle beni her zaman cesaretlendiren , ihtiyacımız olduğunda hep yanımızda olan sevgili hocam Doç.Dr. Berna Özkan'a teşekkür ederim.

Tecrübe ve birikimleriyle bize yol gösteren, desteğini hep hissettiren sevgili hocam Yrd.Doç.Dr.Dilara Pirhan'a teşekkür ederim.

Tez sürecinde bana desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Prof.Dr.Melda Yardımoğlu, Prof.Dr. Yusufhan Yazır ve Prof.Dr.Murat Kasap'a teşekkür ederim.

Bu klinikte geçirdiğim iyi ,kötü her anda yanımda olan, desteklerini hep hissettiren canım arkadaşlarıma teşekkür ederim. Sıcakkanlılıklarıyla burayı kendi evimiz gibi hissetmemizde katkısı büyük olan tüm personel, hemşire ve sekreter arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde en büyük katkıları olan sevgili annem ve babama , bana hep inanan sevgili kardeşlerime , bu yolculuktaki arkadaşlarım sevgili dedem ve merhum babaanneme ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Öğrencilik ve asistanlık yıllarımın en yakın şahidi ve en büyük destekçisi , hayattaki en sağlam dayanağım biricik eşime sonsuz teşekkür ederim .

<b>İÇİNDEKİLER</b>	
<b>İÇ KAPAK SAYFASI</b>	<b>2</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>3</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>4</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b>	<b>5</b>
<b>TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>6</b>
<b>1. AMAÇ VE KAPSAM</b>	<b>9</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>11</b>
<b>3.AMNİON ZARI</b>	<b>20</b>
<b>4.KOLLAJEN CROSSLİNKİNG</b>	<b>26</b>
<b>5.PROTEOMİKS ANALİZİ</b>	<b>34</b>
<b>6.MATERYAL METOD</b>	<b>38</b>
<b>7.HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME</b>	<b>43</b>
<b>8. MALDİ TOF/TOF ANALİZİ</b>	<b>46</b>
<b>9. MUAYENE BULGULARI</b>	<b>49</b>
<b>10.HİSTOLOJİK BULGULAR</b>	<b>57</b>
<b>11.MALDİ TOF/TOF ANALİZİ BULGULARI</b>	<b>62</b>
<b>12. TARTIŞMA KLİNİK VE HİSTOLOJİK BULGULAR</b>	<b>79</b>
<b>13. TARTIŞMA MALDİ-TOF/TOF ANALİZİ</b>	<b>82</b>
<b>14. SONUÇ</b>	<b>88</b>
<b>15.ÖZET</b>	<b>89</b>
<b>16. ABSTRACT</b>	<b>91</b>
<b>17. KAYNAKLAR</b>	<b>93</b>

## **Simgeler ve Kısaltmalar Dizini**

ALDH: Aldehid dehidrogenaz

AZT: Amnion zarı transplantasyonu

CaOH<sub>2</sub>: Kalsiyum hidroksit, Cao: Çimentı

CXL : Kollajen crosslinking

DEHYUAM: Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi

DETAB: Deneysel tıbbi araştırma birimi

ESI-MS : Elektrospray Ionizasyon Mass Spektrometri

GADPH: Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz

HPLC : yüksek performans likit kromatografisi

H&E : Hematoksilen-Eozin

KOH: Potasyum hidroksit

LASİK: Lazer insitu keratomilesius

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight

MgOH<sub>2</sub>: Magnezyum hidroksit

MMP: Matrixmetalloproteinaz

MT: Masson Trichrome

NaOH: Sodyum hidroksit,

NH<sub>4</sub>OH: Amonyum hidroksit

ND-PAGE: non denatüre edici page

PSGAG: Polisülfat glikozaminoglikan

PRK: Fotorefraktif keratektomi

PSDMALDIMS : Post Source Decay

ROS: Reaktif oksijen substratı

SELDI-TOF : Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

SDS- PAGE : denatüre edici page

SKK: Santral korneal kalınlık

TKT: Transketolaz, UV : Ultraviyole

## Şekiller Dizini

<u>Şekil Numarası ve Başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: İnlay onlay teknik	25
Şekil 2: Işık duyarlılaştırıcı riboflavin ve UV-A reaksiyonu	28
Şekil 3: CXL işleminin uygulanması	42
Şekil 4 : Amnion zarı implantasyonu	42
Şekil 5 : (A) Protein özütlerindeki protein konsantrasyonu ölçümleri için kullanılan standart eğri . (B) Protein konsantrasyonlarının kalitesi için kullanılan protein özütlerinin SDS-PAGE	46
Şekil 6:CXL grubunda OCT görüntülerinin SKK ölçümünde kullanımı	49
Şekil 7:Amnion grubunda OCT görüntülerinin ülserasyon derinliğinde kullanım	51
Şekil 8: Kontrol,CXL,Amnion,CXL+Amnion ve gruplarında sırasıyla 1.,2.,3.,4.vizit epitel hasarı ölçümleri	52
Şekil 9: Kontrol,CXL,Amnion,CXL+Amnion ve gruplarında sırasıyla 1.,2.,3.,4.vizit opasite değerlendirilmesi	54
Şekil 10: Kontrol,CXL,Amnion,CXL+Amnion ve gruplarında sırasıyla 1.,2.,3.,4.vizit vaskülarizasyon değerlendirilmesi	56
Şekil 11: H&E ile boyanmış kontrol grubu tavşanlara ait kornea kesitleri görülmektedir. Sağlam (A,) Kontrol (B), Amnion (C), CXL (D), CXL+Amnion(E)	58
Şekil 12: (A) Masson Tricrom boyamada epitelyal hiperplazi,splitting inflamuar hücreler dikkat çekmektedir.(B) H&E boyamada keratosit kaybı olan alanlar görülmektedir.	59
Şekil 13:Masson Tricrom boyamada sağlam(A),Kontrol(B), Amnion(C), CXL(D) ve CXL+Amnion(E) grubunda stromanın görünümü 40X	60
Şekil 14: Kornea'da kontrol grubunda TUNEL-(+) boyanan hücreler.Apoptotik hüce (ok). (B) Korneada CXL grubunda CD68 pozitif boyanan hücreler	61
Şekil 15: (A) Çalışma gruplarını yansıtan proteinlerin 2D jel görüntüleri.	64
Şekil 16 : Regüle spotlar ve 3D görüntüleri, oklar regüle imajları işaret etmektedir.	67

---

	<b>Sayfa</b>
Şekil 17: Alkali yanık kontrol grubu ile sağlam arası IPA sonuçları	69
Şekil 18: Amnion ile kontrol arası IPA sonuçları	72
Şekil 19: CXL ile kontrol arası IPA sonuçları	73
Şekil 20 : Amnion+CXL ile kontrol arası IPA sonuçları	74
Şekil 21: Amnion+CXL ile Amnion arası IPA sonuçları	75
Şekil 22 : Amnion+CXL ile CXL arası IPA sonuçları	76
Şekil 23 : Proteinlerin gruplar arasındaki değişimi	77
Şekil 24 : IPA sonucunda ulaşılan standart metabolik yollar	77



## **Tablolar ve Denklemler Dizini**

<b><u>Tablolar ve Denklemler Dizini Numarası ve Başlığı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1: Roper Hall Sınıflaması(Oküler yüzey yanık ciddiyeti sınıflaması)	16
Tablo 2: Oküler yüzey yanıklarında yeni sınıflama	16
Tablo 3: Amnion zarının gözdeki kullanım alanları	23
Tablo 4: Model sonrası ilk ölçümler	49
Tablo 5: 1., 2., 3.,4. Vizitlerde alınan SKK ölçümleri	50
Tablo 6:Herbir grubun kendi içinde tekrarlayan ölçümlerde SKK değerlerinin karşılaştırılması	50
Tablo 7: Herbir grubun son vizitteki ülserasyon skorlaması	51
Tablo 8: Epitelyal iyileşmenin değerlendirilmesi	53
Tablo 9: Korneal hasarın (opasitenin) değerlendirilmesi	55
Tablo 10: Vaskülarizasyonun değerlendirilmesi	55
Tablo 11: Hitolojik değerlendirme sonuçları	59
Tablo 12: TUNEL(Epitel), TUNEL (stroma), CD68 skorlarının gruplar arası karşılaştırılması	61
Tablo 13: Protein spotlarının MALDO-TOF/ TOF analizleri ve yakalanan peptid sekansları ve Mascot skorları	66
Tablo 14: Kontrol grubunun sağlama göre protein değişimi	69
Tablo 15: Amnion grubunun kontrole göre protein değişimi	72
Tablo 16: CXL grubunun kontrol grubuna göre protein değişimi	73
Tablo 17: CXL+Amnion grubunun kontrole göre değişimi	74
Tablo 18: CXL+Amnion grubunun amnion grubuna göre değişimi	75
Tablo 19: CXL+Amnion grubunun CXL grubuna göre değişimi	76



## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Korneal alkali yanık, avasküler şeffaf kornea dokusuyla temas eden alkali bir ajanın şeffaf dokunun geri dönüşümsüz opasifikasyon veya perforasyonu sonucu ağır görme kayıplarına sebep olan bir tablodur. Bu tablo sıklıkla iş kazaları şeklinde görülmekte ve özellikle çalışma yaş grubundaki genç erkek popülasyonu etkilemektedir. Genç yaşta ciddi görsel kayba sebebiyet vererek manevi kayıplara sebep olmaktadır. Ayrıca uzun tedavi süreci gerektirmesi nedeniyle kalıcı iş gücü kaybıyla beraber yüksek maddi kayıplara neden olmaktadır.

Kornea ve konjonktivanın alkali madde ile teması sonucu kalıcı epiteliyal hasar, gözyaşı eksikliği, oküler yangı, proteolitik enzimlerin salgılanması, antioksidan eksikliği, hipoestezi, kollajen sentezinin sekteye uğraması gibi pek çok durum gelişir. Bu tablonun ortak etkisiyle alkali hasardan sonraki süreç steril stromal ülserasyon şeklinde seyretmektedir. Tüm bu ülserasyon, neovaskülarizasyon ve inflamasyon süreçlerinin sonucunda korneal dokuda incelme, opasifikasyon ve neovaskülarizasyon oluşur. Görme keskinliğinde azalma veya incelmenin ilerleyerek perforasyon oluşturmasıyla organ kaybına doğru giden bir süreç izlenir.

Tedavide ilk adım; alkali ajanın mümkün olduğunca hızla uzaklaştırılması, ardından aşırı inflamasyonu baskılayıcı ve doku iyileşmesini destekleyici tıbbi tedavidir. Tıbbi tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda, cerrahi yöntemlere (tarsorafi, tōropatik kontakt lensler, konjonktiva örtmesi, amnion zar transplantasyonu, limbal kök hücre transplantasyonu ,lameller keratoplasti,penetran keratoplasti, keratoprotez) başvurulur.

Amniyon zarı transplantasyonu (AZT) oftalmolojide ilk olarak DeRotth tarafından 1940'da kullanılmıştır. DeRotth(1) bu ilk deneysel çalışmada, semblefarona ikincil konjonktiva epitel defektlerinin tedavisinde kısmi başarı saptamıştır(2). Bugüne kadar AZT; dirençli kornea epitel defektleri, nörotrofik kornea ülseri (3), glokom cerrahisinden sonra sızdıran filtran bleb(4), pterjium cerrahisi(5), konjonktiva yüzey tamiri(6), büllöz keratopati(7), kimyasal /termal yanıklar(8,9,10), ayrıca limbal kök hücre nakli ile birlikte ya da tek başına göz yüzeyi tamiri(11,12), oküler skatrisyel pemfigoid ve Stevens - Johnson sendromu tedavisi için kullanılmıştır.

Korneal stromadaki kollajen liflerin arasındaki çapraz bağları güçlendirdiği gösterilen(13) kollajen crosslinking (CXL) işleminin korneal ektazilerde etkili ve güvenli bir tedavi yöntemi olduğu gösterilmiştir(14,15). CXL işleminin korneal incelmeye sürecini durdurduğu (16) ve domuz kornealarında enzimatik erimeye karşı olan direnci arttırdığı gösterilmiştir(17).

Çalışmamızda alkali yanık sonrasında oluşan epitelyal hasar , korneal kollajenazlara bağlı stromal erime ve inflamasyonun tetiklediği neovaskularizasyon süreçleri üzerine etkili olabilecek yeni bir teknik olarak kollajen crosslinking işleminin etkinliğinin kontrol ve erken amnion zarı implantasyonu tekniğiyle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, alkali yanığın hücre içi mekanizmalarını protein analizi ile tanımlamak ve uyguladığımız tedavilerin bu mekanizmalara etkisini aydınlatmak amacıyla proteomik analiz yapılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. KORNEAL KİMYASAL YARALANMALAR**

Gözün dış tabakalarına olan kimyasal travma hafif bir iritasyondan oküler yüzey epitelinin bütünüyle yıkımına ,korneal opaklaşmaya, görme kaybına hatta gözün kaybına kadar değişen şiddette bir tabloya sebep olan, sık karşılaşılan bir problemdir.

Kimyasal yaralanmaları evde çamaşır suyu, kozmetikler, deterjanlar gibi evsel alkali ajanlarla, gübre ve böcek öldürücüler gibi tarım yaralanmaları şeklinde, kostik maddeler ve çözücülere bağlı endüstriyel kimyasal yanıklar şeklinde görmektediriz.Kimyasal hasarın şiddeti kimyasal ajanın pH 'sı , miktarı,temas süresi ve doğal toksisitesine bağlı olduğu için mümkün olduğunca çabuk temas eden ajanın tanımlanması gereklidir.

#### **2.1.1. Asit yanıkları**

Asitler temas ettikleri dokudaki proteinlerin denatürasyon ve çökmesine yol açarlar. Asidik solüsyonlar dokuların tamponlama kapasiteleri ve çökelen proteinlerin oluşturduğu bariyer nedeniyle alkalilere göre daha hafif doku hasarı yapma eğilimindedirler. Asitler korneal matrikse hasar verecek proteazların üretiminde ikincil düzenlemeye bağlı olarak şiddetli enflamasyonu tetikleselerde korneadaki proteoglikan temel maddesinin kaybına doğrudan neden olmazlar.

#### **2.1.2. Alkali yanıklar**

Kuvvetli alkaliler dokuların pH'sını yükseltir ve hücre zarındaki yağ asitlerini sabunlaştırarak hücre yıkımına sebep olur.Yüzey epiteli bir kere hasar gördüğünde alkali solüsyonlar korneal stromaya doğru kolayca işleyerek stromal matriksteki kollajen liflerini ve proteoglikan temel maddesini hızla tahrip eder,oluşan tablo likefaksiyon nekrozudur. Kuvvetli alkali maddeler ayrıca ön kamaraya da 5-15dk içerisinde sızarak yoğun enflamasyon ve ciddi doku hasarına sebep olabilir.

##### **2.1.2.1. Patofizyolojik süreç:**

Yaralanmadan itibaren gelişecek patolojik süreç temas sonrası doku pH'sının ani değişimi ile başlar.(18-19) Temas edilen ajanın pH'sını da içeren diğer kimyasal özellikleri doku

hasarının tipini belirler. Bunun yanında gidişatı belirleyen diğer faktörler : ısı, konsantrasyon, temas hızı, ozmolaritesi, redoks potansiyeli, oküler dokularla spesifik reaktivitesidir. (20) Örneğin aynı kimyasal ajanın sıcak haliyle teması soğuk haliden daha fazla hasar vericidir.

Kimyasal kazadan sonra gözde şekillenen hasarın şiddeti; temasın olduğu bölgeye, etkiye süresine, etkileyen kimyasal ajana ve penetrasyonun derecesine bağlıdır . Alkaliler artı yüklü bir katyon ve hidroksil gruplarının birleşiminden oluşur. Hidroksil molekülü (OH), hücre membranlarının yağ asitli bölümlerinde sabunlaşma yaparak hücre yıkımı ve hücre ölümüne neden olur (21,22,23,24).

Katyonlar alkalinin penetrasyonunda etkilidir. Önce epitel hasarlanır ve sonra alkali ajan hızlıca derin dokulara penetre olur proteoglikan tabaka ve kollajen matrix hasarlanır sonra katyonlar 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 (21,22,23,24). Ajan trabekuluma ulaşarak dışa akımı bozar ve zamanla skarlaşmaya ve iris ,silier cisim ve lenste güçlü bir inflamasyona sebep olur. Hücre membranlarında oluşan bu lizis prostoglandin, lökotrien ve interlökin gibi inflamatuvar mediatörlerin salınımıyla acil inflamatuvar bir yanıt oluşturur.(18-25)

Alkali yanığına neden olan en sık kimyasal maddeler; genellikle amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), magnezyum hidroksit (MgOH<sub>2</sub>) ve kalsiyum hidroksittir (CaOH<sub>2</sub>) , kireç,çimento(CaO) , amonyum, aerosoldur.

Penetrasyonun derecesine bağlı olarak, kornea ve konjunktiva epitelyumu, bazal membran , stroma keratositleri, stromadaki sinir uçları, endotelium, lens epitelyumu, konjunktiva, episklera, iris, ve korpus siliare'nin vasküler epitelyumları hasara uğrayabilir (21,22,23,24).

Bulbar konjunktivanın nekrozu sonucu, lökositlerin bölgeye infiltre olması, oküler yüzey yangısının sürmesine neden olur. Limbusta vasküler dokuların hasar görmesinden kaynaklanan işemik nekroz ve buna bağlı olarak vasküler kollajenaz inhibitörlerinin azalması, kornea ülseri ve perforasyon oluşumunda etkilidir (21,23). Alkali hasarın goblet hücre popülasyonu üzerine etkisi belirsizdir. Bazı çalışmalarda goblet hücre popülasyonunda

azalma gözlenmişken, bazılarında goblet hücre popülasyonunda beklenmedik şekilde artma saptanmıştır (24).

Semptomlar ; kızarıklık, gözkapaklarında şişme ödem, ağrı, yanma, yabancı cisim hissi, yaşarma, iritis, derin ağrı, ışığa hassasiyet , aşırı yaşarma şeklindedir. Görsel prognoz genellikle oküler yüzey hasarının genişliği ,deri yanığının varlığı ile derecesi ve gözkapağı fonksiyonuna etkisi tarafından belirlenir. En kötü görsel prognoz ileri limbal epitelyal hasar ve göz içi kimyasal penetrasyonda görülür.

Limbus limbal epitelyal kök hücrelerini içerir ve bu nedenle bu bölgeye olan hasar kornea epitelinin normal çoğalmasının bozulmasına yol açar .Korneal yüzey epitelinin doğru farklılaşma derecesine sahip olmayan hücreler ile kaplanması,korneanın konjonktivalizasyonuna neden olur, bu durum vaskülarizasyon ,korneada goblet hücre bulunması ,zayıf epitelyal bağlantılar ile tekrarlayan erozyonlar ve orjinal travmanın şiddetine göre enflamasyon ile sonuçlanır.

#### **2.1.2.2. Klinik süreç :**

Temasin olduğu andan itibaren acil dönem başlar. İlk yedi gün akut fazı oluşturur. Bu sırada doku kendini komtamine ajandan temizler ve epitelyal tabakasını oluşturmaya çalışır bu sırada anlamlı bir inflamatuvar süreç devam etmektedir. Erken onarım fazı 8. günden başlayıp 20. güne kadar devam eder. Bu süreçte kronik inflamatuvar dönem gelişir, stromal onarım ve skarlaşma aşamaları gerçekleşir. Bu dönemde sebat eden epitelyal defekt stromal ülserasyon oluşumuna zemin hazırlar.(26-27) Bu dönemde oluşan iyi bir epitelyal rejenerasyon polimorfonükleer lökositlerden ve hasarlanmış epitelden salınan kollajenaz, matrix metalloproteinaz ve proteaz gibi sindirim enzimlerine karşı korneayı stromal erimeden korur.(28-29)

Hasardan 3 hafta sonra geç onarım fazı başlar . Bu evre iyi bir görme ile sonuçlanan iyileşmenin tamamlandığı veya görme fonksiyonu korunmuş komplikasyonlarla karakterizedir. Lökosit ve makrofaj invazyonuna sebep yeni antijen olarak davranan hasarlanmış oküler doku yıkım ürünleri kronik ağır inflamatuvar bir reaksiyonu tetikler .(25)

Alkali hasardan sonra, genellikle stromada ülser şekillenmektedir. Kalıcı epiteliyal defektler, gözyaşı eksikliği, oküler yangı, proteolitik enzimlerin salgılanması, antioksidan eksikliği, hipoestezi, kollajen sentezinin sekteye uğraması gibi pek çok faktör, stromal ülser oluşumunda etkilidir.

Proteolitik bir enzim olan kollajenazların bu hususta büyük rol oynadığı bilinmektedir. Epitel, fibroblastlar ve PMN'lökositler, kollajenaz sentezleyebilir. Alkali yanık sonrası ülserli kornealarda kollajenaz aktivitesi saptanmıştır.Yanıktan sonra 8 saat içinde gözlenmeye başlayan kollajenaz, 14-21.günler arasında maksimum düzeyde aktivite gösterir (24).

Kimyasal kazaların medikal sağaltımında, 4 temel amaç vardır ( 23, 24). Bunlar; kimyasal ajanın uzaklaştırılması, reepitelizasyonun sağlanması, keratositler aracılığıyla kollajen dokunun yeniden oluşturulmasını sağlayarak, yıkımlayıcı matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin baskılanması ve yangının kontrolüdür. MMP'lar korneanın kendi hücreleri tarafından salgılanabileceği gibi, alkali hasar sonrası korneaya yerleşen yangı hücreleri (makrofajlar ve PMN lökositler) tarafından da üretilebilir. MMP'ların etkisi; askorbat, sitrat, tetrasiklinler, sentetik peptitler, Na-EDTA, asetilsistein gibi pekçok ilaç tarafından değişik oranlarda inhibe edilir (24).

## **2.2. OKÜLER YÜZEYİN KİMYASAL HASARDAN ETKİLENİMİ**

ABD'de acil göz travmalarının %7-10'u korneal yanıktır. Türkiye 'de ise prevalansı tam belli değildir. %84 kimyasal, %16 termal yanık görülür, yüz yanıklarında %15-20 göz yanığı görülürken alkali yanık sıklığı asitlerin yaklaşık 4 katıdır. Kimyasal yanıkların %80'i iş kazası şeklinde oluşur bu yüzden de erkeklerde daha sıktır ve ortalama görülme yaşı 36'dır. Oluşan yanığın ciddiyeti bazı skorlamalarla belirlenmiştir.(Tablo 1 ve 2)

### **2.2.1. Hasar miktarı :**

- Kimyasalın ; karakterine,ph'sına ,konsantrasyonuna, miktarına, maruziyet süresine
- Etkilenen oküler alanın büyüklüğüne
- Termal yanık benzeri eşlik eden unsurların varlığına
- Epitelyal hasarın ve limbal iskeminin derinliği ve derecesine

- Konjonktiva invazyonuna
- Limbal kök hücre kaybına bağlıdır.

**Travmanın seyrini etkileyen üç önemli durum söz konusudur.**

- **1) Yanık alanının genişliği:**

Değerlendirmede kullanılacak en iyi yöntem floresein ile boyamadır. Kornea ve konjonktiva boyanması ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Konjonktivadaki boyanma kök hücre kaybının derecesini gösteren bir özellik olabilir. Geçmeyen rahatsızlık hissi,yüzeysel erozyonun ve ilintili belirtilerin devamı varlığında fornikslerde artık madde aranmalıdır.

- **2) Dokuya geçiş miktarı:**

Amonyak saniyeler içinde,sodyum hidroksit 3-5dk da dokuya penetre olur.Trabeküler ağda ödem ve kısalma sonucu göziçi basıncı artar.Geçiş artarsa irisde nekroz ,lensde bulanıklık,silier cisim yanar ve göziçi basıncı düşer(prefitizis-fitizis).Ön kamara asiditesi >11.5 ise dönüşümsüz hasar oluşacaktır.

- **3) Kök hücre kaybı oranı:**

Epitel kaybı anatomik olarak üç lokalizasyonda olabilir.

1. Limbus hariç kornea iyileşme tamamlanır.
2. Limbus bölgesi konjonktivalizasyon
3. Tüm konjonktiva skar,semblefaron ,ağır göz kuruluğu

TABLO 1: Roper-Hall sınıflaması ( Oküler yüzey yanık ciddiyeti sınıflaması)

	Korneal bulgular	Konjonktival bulgular	Prognoz
EVRE 1	Korneal epitelyal hasar	Limal iskemi yok	İyi
EVRE 2	Korneal haze İris detayları görünüyor	<1/3 limbal iskemi	İyi
EVRE 3	Total epitelyal kayıp Stromal haze iris detayları görülüyor	1/3- 1/2 limbal iskemi	sınırlı
EVRE 4	Kornea opak, İris ve pupil görülmüyor	>1/2 limbal iskemi	kötü

Tablo 2 :Oküler yüzey yanıklarında yeni sınıflama (Br J Ophthalmol 2001;85:1379–1383)

Evre	Prognoz	Limbus	Konjonktiva	Analog tablo
1	Çok iyi	0	0	0/0/%
2	İyi	≤3 SK	≤%30	0.1-3/1-29.9%
3	İyi	3-6 SK	%30-50	3.1-6/31-50%
4	Belirsiz	6-9 SK	> %50-75	6.1-9/51-75%
5	Kötü	9-12 SK	%75-100	9.1-11.9/75.1 99.9%
6	Çok kötü	12 SK	%100	12/100%



## 2.3. KİMYASAL YANIKLARA YAKLAŞIM

Oküler kimyasal yanıkların yönetimi üç aşamalıdır. Maruziyet zamanına göre; acil tedavi (ilk temas anında yapılacaklar), akut tedavi ( ilk 1-2 haftalık süreçte yapılacaklar) ve kronik tedavi ( 3 hafta ve sonrası için yapılacaklar) şeklinde planlanır.

### 2.3.1. ACİL TEDAVİ

Kimyasal yaralanmalarda tedavi yaralanmanın olduğu andan itibaren başlamalıdır. Kimyasal ajanla temas sonrası yaralanmanın şiddetine veya maruz kalınan ajanın kimyasal yapısına bakılmaksızın yapılacak ilk işlem ajanın mümkün olduğunca hızlı bir şekilde gözden uzaklaştırılması olmalıdır.

Yaralanmaya sebep olan ajana karşı devam eden maruziyetin en aza indirilmesi için gerekli adımların atılması haricinde kimyasal yaralanmaların yönetiminde en uygun yöntemle ilgili genel bir fikir birliği mevcut değildir. İnsanlar üzerinde birkaç klinik çalışma yürütülmüş olup, mevcut önerilerin çoğu hayvan modellerindeki akut alkali yanık örneklerine dayanmaktadır.

Kimyasal yaralanmaların yönetiminde en önemli adım oküler yüzeyin su veya dengeli tuz solüsyonu ile hemen ve bolca yıkanmasıdır. Eğer bu sıvılara ulaşılamazsa başka bir toksik ve kirli olmayan solüsyon örneğin karbonatlı içecekler tedavinin başlanmasına geç kalmamak için kullanılabilir.

Eğer mümkünse yıkama kimyasal hasarın olduğu yerde başlamalı ve bir oftalmolog hastayı değerlendirene kadar devam etmelidir. Göz kapağı bir retraktör veya kapak spekulumu yardımı ile hareketsiz hale getirilmeli ve topikal anestezi damlatılmalıdır. Yıkama işlemi ,intravenöz damar seti ,irige edici spekulum veya IV sete bağlı özel bir skleral kontak lens olan Morgan medi-FLOW Lens kullanılarak da yapılabilir.

Konjonktival kesenin pH'sı normale gelene kadar yıkama işlemine devam edilmelidir. Konjonktival pH üriner pH sribi kullanılarak kontrol edilebilir. Eğer bu mümkün değilse pH'nın normale döndüğüne kanaat getirene kadar yıkamaya uzun süre devam edip fazladan tedavi uygulamak daha iyidir.

Toksik kimyasal salınımına devam edebileceklerinden dolayı eğer varsa kimyasal parçacıkların pamuk uçlu aplikatör ve forcepsler yardımı ile oküler yüzeyden uzaklaştırılması gerekir.Üst göz kapağının çevrilerek üst fornikte artık kalıp kalmadığının araştırılması yapılmalıdır. Göz kimyasal ajandan arındırıldıktan sonra canlılığını kaybetmiş kornea ve konjonktiva epiteli cerrahi spanç veya dakron pamuklu çubuğu ile debride edilir.

Silier spazmı çözüp ağrıyı azaltmak, damar permeabilitesini ve enflamasyonu azaltmak amacıyla sikloplejik ajanlar kullanılabilir.( Atropin %1 ,skopolamin %0.25 günde 2 defa veya homatropin %5 günde 3 defa )

Göz içi basıncı kontrolü mutlaka yapılmalıdır. Topikal ajanların yan etkilerinden kaçınabilmek amacıyla oral veya IV tedaviler tercih edilebilir.( mannitol %20 1-2g/kg 1-2 saat içinde IV ,Asetazolamid 5-10mg/kg IV 6-8 saat arayla )

### **2.3.2. AKUT TEDAVİ**

#### **2.3.2.1. Antimikrobiyal tedavi:**

Alkali yanık steril bir ülserasyon tablosu oluşturur ancak açık kornea epiteli ve erimeye başlayan stromal yüzey nedeniyle sekonder enfeksiyon riski her zaman mevcuttur. Bu sebeple tedavi antimikrobiyal ajanları içermelidir.(Polimiksin /basitrasin merhem günde 4 kez veya dördüncü kuşak florokinolonlar günde 4 kez kullanılır.)

#### **2.3.2.2. Topikal nemlendirme:**

Epitel toksisitesini arttırmamak için koruyucu madde içermeyen göz yaşları 2saat arayla veya yine koruyucu madde içermeyen merhemler kullanılabilir.

#### **2.3.2.3. Anti enflamatuar tedavi:**

Enflamasyonu baskılamak amacıyla antiinflamatuvar tedavi gereklidir. Bu amaçla potansi yüksek olan topikal steroidler kullanılır. Prednizolon asetat %1 inflamasyonun şiddetine göre günde 4 defa ile saat başı arasında kullanılır. İnflamasyonun çok aktif olduğu ilk 7-10 gün kullanılır, yara iyileşmesinin ön plana çıktığı 10 gün sonrasında steroidlerin yara iyileşmesini geciktirici etkisi olması nedeniyle hızla azaltıp kesilir ve 1 hafta sonrasında daha düşük dozda uzun süre kullanılmak üzere tekrar başlanır.

#### **2.3.2.4. Matrix metalloproteinaz inhibitörleri:**

MMP'lar korneanın kendi hücreleri tarafından salgılanabileceği gibi, alkali hasar sonrası korneaya yerleşen yangı hücreleri (makrofajlar ve PMN lökositler) tarafından da üretilebilir. Bu enzimler stromalizin, jelatinaz ve kollajenazdır.

MMP'ların etkisi; askorbat(500-1000mg günde 2 kez) ,%10 sodyum sitrat(günde 4 defa), tetrasiklinler(doksisiklin 50-100mg günde 2kez), sentetik peptitler, Na-EDTA, asetilsistein gibi pekçok ilaç tarafından değişik oranlarda inhibe edilir (30).

Tetrasiklinler, bakteriyel protein sentezini inhibe ederek etki gösteren geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Son yıllarda bazı araştırmacılar, tetrasiklinlerin, antibakteriyel etkileriyle ilişkili olmaksızın, antikollajenazik özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (30). Kollajenaz ve diğer metalloproteinazlar,+2 yüklü metal iyonlarına (Ca, Zn, Mg) bağlandıktan sonra aktif hale geçerek, kollajen doku üzerinde yıkımlayıcı etki gösterirler. Tetrasiklinlerin, kalsiyum köprüsü aracılığı ile kollajenaza bağlanması, enzim inhibitör kompleksi oluşumuna yolaçar. Bu etki, doksisiklinde daha belirgindir. Tetrasiklinler, PMN aktivitesini de inhibe ederler (30, 31).

Polisülfat glikozaminoglikan (PSGAG), sığır trakea kıkırdağından elde edilir (32). Bu bileşim lizozom, hiyaluronidaz ve proteazlar (plazmin ve plazminojen) gibi katabolik enzim miktarlarını azaltmaktadır. PSGAG'lar, prostaglandin E2 sentezini ve toksik süperoksidaz radikallerini de azaltarak, yangı giderici etkiye katılabilmektedir. Bunlar sinoviyal membranlarda ve eklem kıkırdaklarında kollajen proteoglikanları ve hiyaluronik asit sentezini uyarırlar (32, 33). EDTA, invitro birçok divalent ve trivalent metallerin etkili bağlayıcısıdır. EDTA, kurşun gibi pek çok ağır metalleri bağlayabildiği gibi kalsiyum ve benzeri divalent katyonları da etkili biçimde bağlar (34) Crispin (35) ise EDTA'nın. alkali hasarlarından ya da Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonlarından sonra ortaya çıkan kollajenaz enziminin inhibisyonunda kullanılabileceğini vurgulamıştır.

#### **2.3.2.5. Göz içi basıncının kontrolü:**

Alkali maddenin penetrasyon derecesine göre göz içi basıncının seyri değişir. Karbonik anhidraz inhibitörü,topikal toksisiteyi önler. Kornea epiteli normal olarak iyileşiyorsa topikal antiglokomatöz de kullanılabilir.

### 2.3.2.6. Kalıcı epitelyal defektlerin yönetimi:

Terapatik bandaj kontakt lensler,geçici lateral tarsorafi, punktal tıkaçlar,geniş ve kalıcı defektler için amniotik zar grefti kullanılır.

### 2.3.3. KRONİK TEDAVİ :

#### Geç Dönem Tedavi Prensipleri:

1)Geç dönem oküler yüzey yenilenmesi

2)Geç dönem stroma yıkımı ve yenilenmesi

3)Geç dönemde inflamatuvar cevap

Topikal nemlendirme; koruyucu içermeyen göz yaşları ile yapılır. Anti enflamatuvar tedavi; ideal olan kortikosteroid kullanımı kesilmiş veya azaltılmış olmalıdır. Anti mikrobiyal tedavi ; kullanımına günde dört kez olarak yüzey epiteli iyileşinceye kadar devam edilmelidir.Göz içi basıncı kontrolü ; aynı prensipler çerçevesinde takip ve tedaviye devam edilmelidir. Matrix metalloproteinaz inhibitörleri; yüzey epiteli iyileşinceye kadar epiteli destekleyen, stromal erimeyi azaltan bu ajanlara devam edilmelidir. Cerrahi tedavi; tenon fasyasının ilerletilmesi, enflamasyon kontrol edildiğinde limbal kök hücre transplantasyonu, skleral nekroza yönelik rotasyonel tarsokonjktival greft.

## 3. AMNİON ZARI

İnsan amniyon zarı, fetal zarlardan köken alır. Amniyon zarı plasentanın en iç katmanıdır. Histolojik olarak 0,02mm ile 0,5mm kalınlığında başlıca üç tabakadan oluşur. Bunlar tek katlı kübik epitel, bazal membran ve stromadır. Makroskopik olarak zarın iki farklı yüzü vardır; biri pürüzsüz, parlak, saydam ve yapışkan olmayan epitel yüzü, diğeri mat ve yapışkan olan stromal yüzüdür. Üçgen sünger yardımıyla epitel ve stroma tarafı belirlenebilir. Sünger zara dokundurulduğunda yapıştığı taraf stroma diğeri ise epitelidir.

Amniyon zarının epitelinin amniyon sıvısı ile temas eden yüzeyinde çok sayıda mikrovilli bulunur, bu mikrovilliler hem yüzey alanını genişletirler, hem de amniyon sıvısına besin, mineral ve düzenleyici proteinlerin dengeli bir şekilde geçişini sağlarlar. Epitel hücreleri çok

sayıda hormon ve inflamasyon mediyatörü salgılayarak fetusun normal gelişimine önemli katkıda bulunur.

Stroma tabakası kendi içinde başlıca üç tabakadan oluşur. Bunlar yoğun bağ tabakası, fibroblast ve sünger tabakalarıdır. Yoğun bağ tabakası sıkı retiküler liflerden meydana gelir ve amniyon zarının en güçlü destek tabakasıdır. Fibroblast tabakası amniyon zarının en kalın tabakasıdır, yoğun fibroblast ağı içerir. Sünger tabaka zarın en dış tabakasıdır. İnsan vücudunda en kalın bazal membran amniyon zarında bulunur. Bu durum klinikte – 80° de zarın dondurulup saklanmasına ve böylece epitel hücrelerinin uzun süre düzenli bir şekilde korunmasına ve canlı kalmasına olanak sağlar.

Amniyon zarının bazal membranı üzerinde yapılan çalışmalarda histokimyasal olarak konjonktivaya benzediği gösterilmiştir(36). Stroma ise damarsız, düşük hücre yoğunluklu matriksten oluşmuştur. Tip 3 ve tip 5 kollajenin yanı sıra, kornea epiteli bazal membrana benzer şekilde tip 4 ve tip 7 kollajen, fibronektin, laminin1 ve 5, fibroblast ve diğer büyüme faktörlerini de içerir(37-38).

İnsan amniyon zarının immünojenik olmadığı düşünülmektedir. Antikor veya hücre sel bağışıklık cevabının oluştuğu gözlenmemiştir. Dolayısıyla, AZT için sistemik immunsupresyon yapılması gerekmemektedir. Amniyon yüzey epitel hücrelerinde HLA A,B,C,DR veya β2-mikroglobulin görülmez(39-40.)

### **3.1.Amniyon Zarının Etkileri:**

#### **3.1.1. Epitelizasyon üzerine etkisi:**

Amniyon zarının göz yüzeyi tamirindeki etkinliğini açıklayabilecek çeşitli etki mekanizmaları vardır. Amniyon zarının bazal membranındaki kollajen tipIV, konjonktivadaki ile aynıdır(37) ve lamininler özellikle kornea epitel ve kök hücre adezyonunu kolaylaştırmada etkindir(36). Bazal membran epitel hücrelerinin migrasyonunu kolaylaştırır, bazal epitel hücrelerinin adezyonunu kuvvetlendirir, epitel ayrışmasını destekler ve epitel apoptozunu önler(41).Bu özellikleri onu oküler yüzeyin epitelyal problemlerinde önemli hale getirmektedir.

### 3.1.2. Antifibrotik ve antiinflamatuvar etkileri :

Vücuttaki pek çok doku gibi, amniyon zarında da çeşitli mitojenik faktörler mevcuttur. Bütün bu veriler amniyon zarının, kültürdeki insan konjonktiva (42,43) ve kornea (44,45) epitel hücrelerinin normal epitel fenotipinin nasıl koruduğunu açıklayabilir. Amniyon zarı stromasında büyüme faktörleri (46), antianjiyojenik ve antiinflamasyon proteinleri (43), ve çeşitli proteazların inhibitörleri vardır(47) ve limbus epitel hücrelerinde inflamasyonu arttıran IL-1  $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  ekspresyonu baskılanır(48).

Antiinflamatuvar etki, hasarlı oküler yüzeyden salınan proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarının azalmasıyla olur. Bunlar: interleukin (IL)1a, IL-2, IL-8, interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\beta$ , basic fibroblast growth factor and platelet derived growth factor dır.(48). Kimyasal mediatörlerle oluşturulan anti inflamatuvar etkinin yanında Shimmura ve arkadaşlarının çalışmalarında gösterdikleri amniyon zarının inflamatuvar hücreleri oküler yüzeyden toplayıp apoptozisini sağlayarak oluşturulan antiinflamatuvar etkide bulunmaktadır.(49)

Fetal hyaluronik asit amniyon zarının stromal matriksinin önemli bir bileşenidir. Bu TGF  $\beta$ 1-2 ve 3 izoformlarının ekspresyonunu ve TGF reseptör 2 ekspresyonunu azaltır. Böylece korneal, limbal ve konjonktival fibroblastların proliferasyonu inhibe olur. Bu da fibroblastların miyofibroblastlara diferansiyasyonunu inhibe eder.

AZT'nin akut ve kronik inflamasyonu azalttığı hayvan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir(50,51 ). Amniyon stromasında, bulunan inflamasyonu baskılayan mediyatörler TGF- $\beta$  sinyalini ve kültürdeki insan kornea ve limbal fibroblastların (50) ve pterjium fibroblastlarının (51) ayrımlaşmasını baskılar. İstenmeyen keratosit apoptozunu azaltır(52) ve sentezlenen hücre dışı matriksi azaltır(53). Dolayısıyla, AZT'nin inflamasyonu baskılayıcı etkisinin yanı sıra doğrudan nedbeleşmeyi önleyici etkisi de mevcuttur(54).

Yukarıdaki üç etki ile, amniyon zarı in vitro koşullarda konjonktiva (51) ve kornea (55) epiteli progenitor hücrelerinin kültürü için ideal substrattır. İnsanlarda da AZT, kısmi kök hücre yetmezliği olan gözlerde epitel kök hücrelerinin yaşam döngüsünü ve klonojenitesini artırır ve kornea yüzeyini tekrar oluşturabileceği düşünülür . Bu nedenle, insanlarda

amniyon zarı ile ex vivo genişletilen limbal epitel progenitor hücreleri, tam ve kısmi limbal kök hücre yetmezliği olan kornea yüzeylerinin tamirinde kullanımı denenmektedir.

Amniyon zarı, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin düzeylerini ayarlar; ayrıca ağrıyı azaltma, fibrozisi baskılama, antibakteriyel ve yara koruyucu etkileri de gösterilmiştir(56-57). Amniyon zarının limbal kök hücrelerinin çoğalmasını artırıp artırmadığı henüz açık değildir.

### 3.1.3. Antianjiojenik etki:

Thrombospondin -1, endostatin ve metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP-1, 2, 3 and 4) gibi bir çok önemli antianjiojenik faktörün üretimini sağlar. Yeni damar proliferasyonuna engel olan antiinflamatuvar etkilerde antianjiojenik mekanizmaların bir parçasıdır.(58)

Amniyon zarı, yara üzerini kaplayarak steril bir ortam yaratılmasına ve ameliyat sonrası enfeksiyon riskinin azaltılmasına katkıda bulunur. Ayrıca, amniyon zarının konjonktiva yapışmasını önleyici etkisi vardır.

### 3.1. OFTALMOLOJİDE AMNİYON ZARI`NIN KULLANILDIĞI YERLER

Oftalmolojide amnion zarı ilk defa De Rotth tarafından konjonktiva defektlerinin kapatılması ve simblefaron onarımında kullanılmıştır.Tablo 3

Tablo 3: Amnion zarının kullanım alanları

KONJONKTİVA TAMİRİ	KORNEA YÜZEY TAMİRİ
Pterijum cerrahisi	Dirençli epitel bozuklukları
Kimyasal yanıklar	İyileşmeyen kornea ülseri
Periokuler yüzey neoplazileri	Kısmi limbal kök hücre yetmezliği
Bleb sızıntısı	Tam limbal kök hücre yetmezliği
Filtran cerrahi	Büllöz keratopati
Semblefaron serbestleştirilmesi	Sklera erimesi
Soket tamiri	
Konjonktiva şalazisi	
Entropiyon düzeltilmesi	
Skatrizan konjonktivit	

### 3.2. AMNİYON ZARININ KULLANIMI

Amniyon zarı göz bankalarından dondurulmuş olarak hazır temin edilebilir ya da taze olarak kullanılabilir. Donmuş amniyon zarı HIV, Hepatit B,C ve Sifiliz açısından seronegatif gebelerden elektif sezeryan sırasında steril şartlarda alınır ve laminar akım altında, penisilin 50 µg/ml; streptomisin 50 µg/ml; neomisin 100 µg/ml; amfoterisin B 2,5 µg/ml içeren fosfat tamponlu steril fizyolojik tuzlu su solusyonu ile kan pıhtılarından temizlenir. Amniyon, koryonun geri kalan kısmından künt diseksiyon ile ayrılır ve bir nitröselülöz kağıt üzerine, epitel-bazal membran yüzeyi kağıt yüzeyine gelmeyecek şekilde yayılır. Nitröselülöz kağıt ve üzerine yapışan amniyon zarı, 3x4 cm boyutlarında kesilir ve transplantasyon yapılana kadar -80°C`de hacim olarak 1:1 oranında Dulbecco-modifiye Eagle solusyonu ve gliserol içeren şişelerde muhafaza edilir. Ameliyat öncesi amniyon zarı oda ısısında bekletilerek, 24 saat içinde kullanılabilir.

Taze amniyon zarı Hepatit B, C, sifiliz ve HIV açısından seronegatif olan gebelerden elektif sezeryan sırasında steril şartlarda alınır ve künt diseksiyonla koryon dokusundan ayırdıktan sonra 50 µg/ml gentamisin içeren steril fizyolojik tuzlu su solüsyonu ile yıkanmak suretiyle hazırlanır, 30 dakika aynı solüsyon içinde bekletildikten sonra kullanılır(54,56,59).

Amniyon zarının en önemli etkilerinden biri de ortamdaki inflamasyonu baskılamasıdır, bu da canlı epitel hücrelerinin ürettikleri inflamasyonu baskılayan mediyatörler sayesinde olmaktadır. Epitel hücrelerinin canlılığı hakkında bilgi veren çeşitli testler mevcuttur: Hücre zarının bütünlüğünü gösteren akridin orange ve propidyum iodid boyaları ve mitokondriyal aktiviteyi gösteren tetrazolium redüktaz enzimi. Daha önce yapılan çalışmalarda dondurulmuş ve taze amniyon zarındaki canlı epitel hücreleri yoğunlukları arasında herhangi bir fark bulunmamış(60).

Taze amniyon zarının kullanımındaki en önemli sakınca, bulaşıcı( Hepatit B, C, sifiliz ve HIV) hastalıkların geçişidir, fakat günümüzde gebelerin daha düzenli takip edilmesi ve bu hastalıklar açısından gebeliğin erken dönemlerinde testler yapılması ve düzenli takip edilen bu gebelerin plasentasının kullanılması, riski azaltmıştır. Kolay elde edilmesi ve hazırlanması, göz bankalarına uzak olan merkezlerin bu şekilde amniyon zarını kullanabilmesi, bozulmuş amniyon zarı kullanma ihtimalinin dondurulmuş olana göre daha düşük olması ise



üstünlükleri arasında sayılabilir.Tedavi edici etkinliği açısından bakıldığında, taze ve dondurulmuş amniyon zarı arasında herhangi bir fark bulunmamıştır(60). Biz de çalışmamızda taze amniyon zarı kullandık.

### 3.2.1. Amnion Zarı implantasyonunda Cerrahi Teknik:

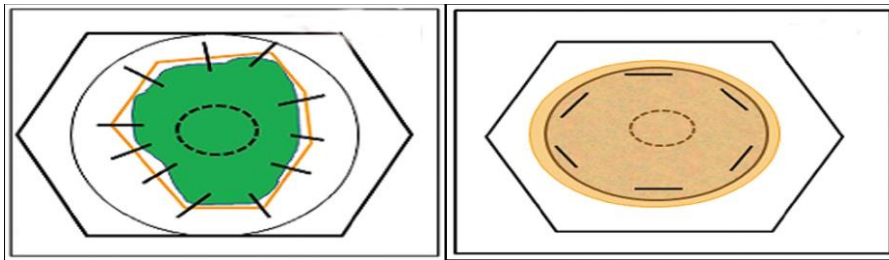
Amniotik membranın oküler yüzeye transplantasyonunda 3 teknik kullanılabilir:

1) Greft veya inlay teknik: Bu teknikte amniyon zarı epitelyal hücre büyümesini sağlayacak bir substrat olarak kullanılmaktadır.Epitelyal kısım yukarıda olacak şekilde epitelyal veya stromal yaranın büyüklüğü kadar bir membran korneaya 10/0 naylon ,konjonktivaya veya skleraya 9/0 veya 10/0 vicryl suturelerle suture edilir. Korneal yüzeye denk gelen amniyon zarının basement membranı epitelyal progenitor hücrelerin kolonizasyonunu sağlar ve apoptozunu önler.(61) bu teknikte tek katlı veya çok katlı transplantasyon uygulanabilir.

2) Patch veya overlay teknik: bu teknikte amniyon zarı oküler yüzeyde hasardan daha büyük bir alanı örtecek şekilde konjonktiva veya episkleraya 10/0 naylon veya 9/0 vicryl ile suture edilir. Frajil epitelyumu kapak hareketlerinin mikrotravmalarından koruyan koruyucu bir bandaj kontaktens mekanizmasıyla görev yapmaktadır bu durumda epitelyal yüz veya stromal yüz yukarı gelebilir.(Resim 1)

3) Kombine inlay ve overlay teknik(sandviç tekniği): Bu teknikte iki veya daha fazla kat amniyon zarı kullanılır. Altta kalan küçük tabaka greft üstteki büyük tabaka patch gibi görev görür. Bu sandviç tekniği olarak bilinir.

Çok katlı amniyon zarı implantasyonunun nontravmatik mikroperforasyonlar ve desmatosellerin tedavisinde başarı oranları 72.7% ile 82.3% arası olduğu persistan epitelyum defektlerinde %64-%91 arasında olduğu bildirilmiştir.(62,63,64).



Şekil 1: inlay ve onlay teknik

#### 4. KOLLAJEN CROSSLINKİNG (CXL)

CXL tedavi, solid bir kaynaktan gelen Ultraviyole-A (UV-A) ve ışığa duyarlılaştırıcı riboflavinin (Vitamin B2) kombine etkisi ile korneada, stromal kollajen liflerde fotopolimerizasyon oluşturan bir tedavi yöntemidir. Fotopolimerizasyon, korneanın sertliğini ve keratektaziye karşı direncini arttırmaktadır. CXL tedavi ile korneada adeta “donma etkisi” ortaya çıkmaktadır. Tedavinin amacı, keratektazisi olan hastalarda hastalığın ilerlemesini durdurmak ve keratoplastiden kaçınmaktır.(65)

##### 4.1. Tarihçe ;

Tarihsel olarak moleküller arası çapraz bağlantı, çok faydalı bir uygulama olarak kabul edilmiştir. Örneğin, formaldehidin doku fiksasyon etkisi, lizin, arjinin, tirozin, asparajin, histidin, glutamin ve serin gibi aminoasitlerle çapraz bağlanma yeteneğine dayanır.(66) Yine yapay kalp kapakları, gluteraldehit kullanılarak sertleştirilmektedir.

İlk kez 1968’de Christopher Foote, biyolojik sistemlerde ışık duyarlılaştırıcı oksidasyonun mekanizmalarını yayınlamıştır.(67) 1988’de Fujimori, üçüncü bir mekanizma ile Ozon (O3) ve ya UV ışık ile fotooksidasyon neticesinde tip 1 kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların meydana geldiğini göstermiştir.(68)

1997’de Spörl ve ark. domuz kornealarında yeni çapraz bağlanmaları gösterdikleri çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır.(69) Domuz kornealarında epitel kaldırıldıktan sonra sırasıyla, 254 nanometre (nm) dalga boyunda UV ışık, riboflavin ve UVA ışık (365 nm), riboflavin ve mavi ışık (436 nm), güneş ışığı, gluteraldehit (% 0.1, 10 dakika) ve Karnovsky solüsyonu (% 0.1, 10 dk) uygulanmış. Karnovsky solüsyonu, paraformaldehit, sodyum hidroksit ve gluteraldehitten oluşan bir fiksatifdir. Çalışmada, her gruba 10 göz dahil edilmiş ve kontrollerle karşılaştırılmış. Riboflavin ve UVA (365 nm), gluteraldehit ve Karnovsky solüsyonu kullanılan gruplarda, kontrollere göre korneal sertliğin arttığı gösterilmiştir. Bir sonraki aşamada, riboflavin-UVA (365 nm) ve gluteraldehit (% 0.075) potansiyel adaylar olarak tavşanlarda in vivo olarak test edilmiş. Sonuçta, riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonunun insan çalışmaları için umut vaat ettiği gösterilmiştir.(70) Riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonu ile insanlar üzerindeki pilot çalışmalar, 1998’de Dresden’de başlamış ve ilk sonuçlar 2003’de yayınlanmıştır.(65)

#### 4.2. Kollajen çapraz bağlanmanın biyokimyası ;

Kollajenin birincil görevi genel olarak destek dokusu olarak bulunmaktır. Kollajen monomerleri, güçlü intermoleküler çapraz bağlantılarla bir araya gelirler. Kollajen lifler arasındaki çapraz bağlanmalar, doku olgunlaşma sürecinin doğal bir parçasıdır. Kollajen fibriller salgılandıkları zaman, her iki ucunda kısa segmentlere sahip kollajen zincirler (telopeptidler) halindedirler. Bu aşamada üçlü helikal konformasyon henüz oluşmamıştır. Zincir sonlanma bölgelerindeki hidroksilizin rezidüleri çapraz bağlanma oluşumuna katılırlar. Çapraz bağlanmalar, kollajen telopeptitlerindeki lizin veya hidroksilizin aminoasitlerinin, lizil oksidaz enzimi ile  $\epsilon$ -amino gruplarının oksidatif deaminasyonu neticesinde meydana gelir. Doğal süreçte kollajen telopeptitleri arasında gerçekleşen bu çapraz bağlanmalar, kollajen fibrillerin üçlü helikal konfigürasyonunu oluşturur.

İkinci bir çapraz bağlanma yolu yaşlanma sürecinde oluşur. (daha büyük ölçüde diabetes mellitusta) Bu durum glikasyon olarak adlandırılır ve enzimatik olmayan bir reaksiyondur. Monosakkaridlerin bu reaksiyona uzun süre maruziyeti, protein moleküllerin şeker ve amino grupları arasında spontan oluşan bağların azalması ile sonuçlanır. Bu daha sonra daha kararlı ama reaktif Amadori ürünlerine (örneğin, HbA1c gibi) dönüşür. Sürecin devamında, diğer protein moleküllerinin amino grupları ile glukoz derive moleküller (pentozidin gibi) arasında ilave yavaş reaksiyonlar ile moleküller arası çapraz bağlanmalar meydana gelir. Bu glukoz derive moleküller glikasyon son ürünleri olarak adlandırılırlar.(71) Bu durum, 1912'de Maillard ve ya sarı kahverengi renk değişimi nedeniyle esmerleşme reaksiyonu olarak tanımlanmıştır.(72)

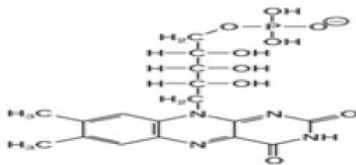
Aynı yaş grubundaki diyabetik kornealar ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, pentozidin (kollajenin arjinin ve lizin rezidüleri arasında çapraz bağlantılar oluşturan glikasyon son ürünüdür) düzeylerinin diyabetik kornealarda daha yüksek olduğu bulunmuştur.(73) Yaşlanma ile birlikte korneal sertlikteki artış, gerinim-gerilme testleri ile gösterilmiştir.(74) Yüksek ve düşük açılı X-ray kırınım paternleri ile yaş ile birlikte kollajen molekülü kesit alanının, 3.04 nm<sup>2</sup>'den 3.46 nm<sup>2</sup>'e ulaştığı gösterilmiştir. Bu durum yaş ile ilişkili korneal glikasyon artışına atfedilmiştir.(75) Tip 2 diyabetli hastalarda, diyabetin keratokonusun gelişimi ve progresyonu üzerine koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bunun

olası nedeni, moleküller arasında artmış çapraz bağlantılar nedeniyle meydana gelen korneal sertleşmedir.(76,77)

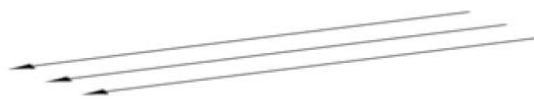
Kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların oluşumundaki üçüncü mekanizma ise oksidasyondur. Bu mekanizma, daha önce anlatılan enzimatik ve glikasyon yolu ile oluşturulan çapraz bağlanmalardan farklıdır. Bu çapraz bağlanmalar, oksidasyon sonucu (O<sub>3</sub> aracılı) veya fotooksidasyon (UV aracılı) sonucu meydana gelebilir.(67) Fotopolimerizasyon, endüstride UV ışınları gibi radyant enerji ile polimerlerin üretiminde kullanılmaktadır. Multifonksiyonel monomerlerin fotopolimerizasyonu, çok sayıda çapraz bağlantı içeren sert materyallerin üretimini sağlamaktadır. Bu yöntem endüstride, epoksi kaplamalar, optik lensler, optik fiber kaplamalar ve diş materyallerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Monomerler, UV ışık kaynağı ve ışık duyarlaştırıcı varlığında, çapraz bağlantılar ile polimerlere dönüşmektedir.

CXL tedavisi, endüstride kullanılan UV aracılı fotooksidasyonun biyolojik sistemlere uyarlanmış şeklidir. Riboflavin ve UVA etkileşime girdiklerinde korneal stromada ROS oluşumuna neden olurlar. ROS, intrahelikal, interhelikal ve intermikrofibriller seviyede kollajen zincirlerinin aminoasitleri arasında oksidatif deaminasyon ve hidrojen bağ formasyonu oluşturur. (Şekil 2)

**1. Kombine riboflavin UVA uygulaması**

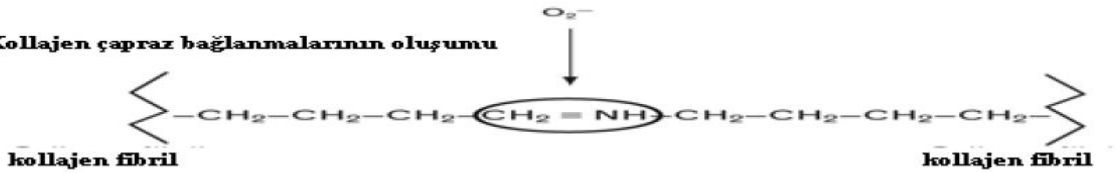


**Ultraviyole ışınları**



**2. Oksijen radikallerinin üretimi**

**3. Kollajen çapraz bağlanmalarının oluşumu**



**Şekil 2 :** Işık duyarlaştırıcı riboflavin ve UVA reaksiyonu, ROS oluşumu ile sonuçlanır . ROS, çeşitli moleküllerle ileri tepkimeye girerek, kollajen fibrillerin amino grupları arasında yeni çapraz kovalent bağların oluşmasını sağlar. (Tip II fotokimyasal reaksiyon)

CXL tedavide kullanılan riboflavin, UVA'nın göz içine sınırlı penetrasyonuna yardım eder. (370 nm dalga boyundaki UVA'nın %95'ini absorbe eder) Böylece, endotel ve göz içi yapıların hasarına karşı koruma sağlanır. Aynı mekanizmayla riboflavin, lensin ve retinanın doğal yapısında bulunarak UVA'nın hasar verici etkisinden korumaktadır.

Güvenlidir, kolayca elde edilebilir. Korneanın ve lensin şeffaflığını değiştirmez. Gıda endüstrisinde renklendirici olarak kullanılır. Non-toksiktir ve suda çözünebilir. Stromal penetransı oldukça iyi bir moleküldür. CXL tedavide, % 0.1 derişimde riboflavin solüsyonu (10 ml % 20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) kullanılır. Dextran T500, operasyon esnasında korneanın şişmesini engelleyerek kontrollü bir ortam oluşturur, ayrıca UVA'nın maksimum penetransını sağlayarak çapraz bağlanan kollajen hacmini arttırmaktadır.

#### **4.3. Teknik ;**

Teknik, kliniğimizde de mevcut olan, 365 nm dalga boyunda UVA ışığı üreten, "UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)" LED UVA ışık kaynağı üzerinden anlatılacaktır. Bu cihaz, geniş (11.5 mm), orta (9.5 mm) ve küçük (7.5 mm) olmak üzere 3 farklı büyüklükte homojen UVA spotu sağlamaktadır. Işık enerjisi, uygulama öncesinde özel UV dedektörü ile kalibre edilir. Uygun UVA enerji aralığı,  $3.0 \pm 0.3$  mW/cm<sup>2</sup> düzeyindedir.

Topikal anestezi sonrası (proxymetacaine % 0.5) ultrasonik pakimetre ile korneal kalınlık birkaç noktadan ölçülür. Tüm noktalarda korneal kalınlık 400 µm'nin üzerinde olmalıdır. Korneal epitel, santralde 7-8 mm çapında ucu kör bir spatül veya % 20'lik alkol solüsyonu ile kaldırılır.(78) Bir başka yöntem ise, yoğun topikal anestetik uygulaması ile intakt olan epitelde gevşeme sağlamak ve ardından riboflavin solüsyonu uygulamaktır.(79) (C3-R) Ancak bu yöntem tartışmalıdır. Epitelin kaldırılmasının ardından, % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (10 ml %20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) kornea üzerine damlatılır.

Riboflavin uygulamasına, yarıklı lamba muayenesinde kobalt filtresi ile ön kamarada sarı flare tespit edildiğinde son verilir. Zaten bu durum, riboflavin uygulamasından ortalama 5 dk sonra ortaya çıkmaktadır.(80) Bu aşamada korneal kalınlık tekrar ölçülür, tüm noktalarda kalınlık 400 µm'nin üzerinde olmalıdır. Aksi takdirde, hipotonik % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (Medio-Cross hypotonic, Peschke Meditrade GmbH, Switzerland) her 10 saniye (sn)'de bir, 2

damla damlatılarak stromanın şişmesi ve korneal kalınlığın 400 µm'nin üzerine çıkması sağlanır. Bu uygulamayla genellikle 3 dk'da kornea kalınlığı 350 µm'den 400 µm'ye ulaşmaktadır. Bu aşamadan sonra UV-X ışık kaynağı, kornea yüzeyine 5 cm mesafede homojen UVA spotu oluşturacak şekilde yerleştirilir. Cihazın spot büyüklüğü, potansiyel limbal tosisiteye neden olmayacak şekilde ayarlanır. (Genellikle orta spot çapı tercih edilir) UVA ışığı, 3 mW/cm<sup>2</sup> dozunda (5.4 Joul/cm<sup>2</sup>), 30 dk boyunca uygulanır. Bu arada her 5 dk'da bir riboflavin solüsyonu damlatılmaya devam edilir. Bu protokolün varyasyonları, preoperatif pilokarpin (% 1) damlatılması, 9 mm'lik çapta epitelin kaldırılması ve uygulama sonrası korneal bulanıklığın önlenmesi amacıyla tedaviye steroidli damlaların ilave edilmesidir. (Siena protokolu)(81) Tekniğin bir başka modifikasyonu ise, santral 9 mm'lik çapta epitelin kaldırılması ve her 3 dk'da bir damla olmak üzere 30 dk boyunca riboflavin solusyonunun damlatılmasıdır.(80)Cihaz, 30 dk boyunca devam eden uygulamanın ardından otomatik olarak işleme son verir. Tedavi, reepitelizasyonun kalitesini bozmayacak, oksijen geçirgenliği iyi seviyede olan yumuşak kontakt lens uygulaması ile sonlandırılır.

Postoperatif yönetim Fotorefraktif Keratektomi (PRK)'ya benzer, ağrı kontrolü ve korneal epitelin iyileşmesini teşvik etmek en önemli noktalardır. Ağrı, ilk 24-48 saatte daha fazladır ve kademeli olarak azalır. Ağrısız geçen 5-7 gün sonunda kontakt lens çıkarılır. Topikal antibiyotik, enfeksiyon profilaksisi amacıyla verilir. Bunun için, 4. kuşak kinolonlar kullanılabilir. Ön kamara penetransı düşük steroidlerin (fluorometholone gibi) kullanımı opsiyoneldir.

### **Tedavi Endikasyonları**

CXL tedavi şu durumlarda endikedir;

- Korneada ilerleyici dikleşmeye neden olan keratokonus ve diğer ektazilerin tedavisinde
- Laser-Assisted in Situ Keratomileusis (LASİK) sonrası gelişen, iyatrojenik keratektazinin tedavisinde(82,83), İntrakorneal ring etkinliğini arttırmak amacıyla(82)
- Korneal melting ve yüzeysel korneal ülserlerde incelmeyi durdurma amacıyla(84)
- Büllöz keratopatide ağrı kontrolü amacıyla, enfeksiyöz keratitler(85,86)

## 4.4. Sonuçlar

### 4.4.1. Biyomekanik Etki ;

İnsan ve domuz korneaları üzerinde yapılan in vitro alışmalar, CXL tedavi sonrası korneal sertliğin önemli miktarda arttığını göstermektedir. Bir çalışmada, tedavi uygulanan domuz kornealarında, gerilim (mukavemet) artışı % 71.9, insan kornealarında % 328.9 olarak gerçekleşmiştir. Korneal sertliği ifade eden Young modülü (Elastiklik modülü) ise, domuz kornealarında 1.8, insan kornealarında ise 4.5 olarak bulunmuştur.(87) Sonraki çalışmalarda, sertleştirici etkinin uygulama derinliğine bağımlı olduğu ve esas olarak n stromada gerçekleştiği gösterilmiştir.(88) Tavşan kornealarında, tedavi etkinliğinin en yüksek olduğu n stromada, kollajen fibril çaplarının % 12.2 (3.96 nm) oranında arttığı gösterilmiştir.(89) Yapılan termomekanik testlerde, n stromada hidrotermal büzülme etkisinin 75°C de, arka stromada ise 70°C de gerçekleştiği gözlenmiştir.(90)

Tedavi uygulanan domuz kornealarında, pepsin, tripsin ve kollajenaz sindirim direncinin, kontrol gözlere göre daha fazla olduğu, tedavi etkisinin maksimum olduğu n stromada, sindirimin en son gerçekleştiği gözlenmiştir.(91) Tedavi uygulanan kornealarda, jel elektroforezi ile molekül ağırlığı en az 1000 kiloDalton (kDa) olan yoğun polimer bantlar saptanmıştır. Bu bantların, merkaptoetanol, pepsin ve ısıya dirençli olduğu bulunmuştur.(92) Bu durum, kollajen lifler arasındaki çapraz bağlantılarla oluşan yüksek molekül ağırlıklı kollajen polimerlerin bir kanıtıdır.

### 4.4.2. Etkinlik;

Wollensak ve ark. 15 ilerleyici keratokonuslu hastanın 16 gözünde yaptıkları ilk insan çalışması sonuçlarını, Ocak 2003'te yayınlamışlardır.(93) Aynı yılın Mayıs ayında bir başka çalışma sonucu daha yayınlanmıştır. Bu çalışmada, 24 hastanın 22 gözü, tedavi sonrası 3 ay ile 4 senelik periyotta (ortalama 23.2 ay) takip edilmiş ve tedavi gören tüm hastalarda bu dönem içerisinde hastalıktaki ilerlemenin durduğu bildirilmiştir. 16 gözde (% 70) maksimum keratometri (K) değerinde 2.01 D ve refraktif hatada 1.14 D azalma saptanmış, 5 hastada K değerı değişmemiş ve 1 hastada hafif bir kötüleşme grlmştr. Görme keskinliği, 15 hastada (% 65) hafifçe artmıştır.(94)

Literatürde yayınlanmış klinik çalışmalarda, farklı etkinlik sonuçları bildirilmiştir. Bu çalışmaların yöntemlerine bakıldığında, çalışmaya dahil etme-dışlama kriterleri, tedavi parametreleri, sonuçların ölçümü ve analizleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Tüm çalışmalarda, farklı derecelerde görme keskinliği artışı, farklı derecelerde K değerlerinde azalma ve farklı takip süreleri bildirilmiştir. Çalışmalarda hiçbir ciddi komplikasyon ile karşılaşmamıştır. CXL tedavi, Amerikan Gıda ve İlaç idaresi (The Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmıştır.

#### **4.4.3. Güvenlik ;**

Wollensak ve ark. yaptıkları pilot çalışmada, CXL tedavi sonrası kornea ve lens şeffaflığında, endotel hücre sayısında ve göziçi basıncında (GİB) bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir. Mazotta ve ark.'nın 44 hasta ve 3 yıl takipli çalışmalarında, in vivo konfokal mikromorfolojik analiz sonuçlarına göre, epitelial rejenerasyonun 4 günde tamamlandığı ve limbal toksisitenin gelişmediği gösterilmiştir.(95) Tedavi ile birlikte yok olan ön midstromal ve subepitelial sinir lifleri, postoperatif birinci aydan itibaren, subepitelial pleksustan rejenerasyon olmakta, iki ve üçüncü ay itibariyle yeniden eski yapısına dönmektedir. Bu süreç 6 ayda tam olarak tamamlanmakta ve korneal duyarlılık yeniden kazanılmaktadır. Postoperatif keratosit kaybı (apoptozu) 340 µm derinliğe kadar gerçekleşmektedir. İnsanlarda konfokal inceleme ile postoperatif 2. ve 3. aylar arasında keratosit repopülasyonun kademeli olarak başladığı ve 6. ayda tamamlandığı gözlenmiştir.(96) Endotel hasarı riski nedeniyle, 400 µm'dan ince kornealarda CXL tedavi önerilmemektedir.1 İnsan korneasında, kızılötesi termal kamera ile CXL tedavi esnasındaki ısı değişimi ölçülmüş ve ısının stabil olarak termal hasar eşliğinin altında kaldığı gösterilmiştir.(97)

#### **4.4.4. Komplikasyonlar ;**

CXL tedavide literatürde çeşitli postoperatif komplikasyonlar bildirilmiştir. Bir hastada yavaş gerileyen diffüz subepitelial opasifikasyon(98), tedavi sonrası tüm hastalarda gelişen ve tam iyileşmesi postoperatif 12. aya kadar uzayabilen değişen derecelerde stromal bulanıklık(99), bakteriyel keratit(100), Acanthamoeba keratiti(101), Herpetik keratit öyküsü bulunmayan bir hastada tedavi sonrası 5. günde jeografik ülser ve iritis75, post LASİK ektazi nedeniyle CXL tedavi uygulanan bir hastada evre 3 diffüz lameller keratit bildirilmiştir.(102)



#### 4.4.5. Tedavinin bilinmeyenleri ve hedefler ;

Kısa takip süreli çalışmalarda korneal sertlik artışı GİB ölçümlerini etkilememiştir. CXL tedavi korneada erken yaşlanmaya neden olmakta, yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Çünkü, zaten yaşlanma ile birlikte kollajen lifler arasında çapraz bağlanmalar meydana gelmektedir. Daha da kötüsü bazı vakalarda geç dönemde gelişebilecek diyabet nedeniyle non-enzimatik glikasyon da olaya dahil olacak ve tedavi etkisi daha da artacaktır. Yeterli takip süresi, stabil etki süresi gibi sorulara cevap verecek kadar uzun takip süreli çalışma henüz bulunmamaktadır. Tasarım ve yöntem kaygıları hala devam etmektedir.

UVA görünür ışığın emisyon spektrumu içinde kalmaktadır. Polimerizasyon, bir UVA ışık kaynağı kullanılmaksızın (UVA'nın zararlı etkileri en aza indirilerek) görünür ışık uygun çözümler kullanılarak gerçekleştirilebilir.(103) Fruktoz gibi şekerler, çapraz bağlanmaları (fruktuasyon) teşvik için umut vaat etmektedirler. Bu şekerlerin insan dokularında sorbitol yolağında rolleri bulunmaktadır.(104) Bu ajanlar, riboflavin-UVA yöntemi sınırlamalarının üstesinden gelebilirler.(105)

## 5. PROTEOMİKS ANALİZİ

Genomun tüm protein komplementlerini (proteom) çalışan bilim dalı Proteomiks olarak adlandırılmaktadır. Proteomiks ve proteom terimleri Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1990'larda türetilmiştir. Bu kelimeler tüm bir organizmadaki tüm genlerin kolleksiyonlarını ifade eden genomiks ve genom kelimelerinin yansımalarıdır. Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır.(106) Hücrede gerçekleşen posttranslasyonel modifikasyonlar normal ve patolojik dokulardaki farklılıkları belirler ve proteinde görülen post-modifikasyonların tümünün bilgisini protein kodlayan bölgelerdeki genomik bilgi tek başına veremez. Bu nedenlerle, genomik çalışmalar her zaman nihai protein ekspresyonu hakkında doğru bilgiler sağlayamaz iken yapılan proteom çalışmaları, genomik analizlerle belirlenemeyecek şekilde pek çok farklı yoldan gerçekleşen hastalık patolojisini ve fenotipini ortaya koyabilmektedir.

Klinik proteomiks temel amaçları şu şekilde özetlenebilecek ümit verici, yeni bir analitik disiplindir: hastalıkların erken tanısı, risklerin veya tedavi yanıtlarının izlenebilmesi için biyobelirteçlerin keşfi; klinik sonuçları düzeltebilecek yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için protein hedeflerinin tespit edilebilmesi.

### 5.1. Biyobelirteçler

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür.(107)Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesi hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesini sağlamaktadır. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır. Biyobelirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metodlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde biyobelirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir biyobelirteçle

ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir.(108) Proteinlerin tanısal araç olarak potansiyelinin bilinmesi ve proteomiks teknolojilerdeki ilerlemeler biyobelirteç araştırmalarına ilginin artmasına neden olmuştur.

## 5.2. Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji

Proteomiks ile proteom ve onun komponentlerinin karakterizasyonu işi pratikte yapılabilmektedir. Proteom analizi için ilk adım örnek hazırlığı yapılmalıdır. Tüm hücre ve doku özütlerinde proteinlerin analizleri amacıyla örnek hazırlanmasındaki ana problem; bunların farklı moleküler kütle, yük, izoelektrik nokta ve çözünürlüğe sahip olmalarıdır.(109) Ayrıca bu aşamada örnek karmaşıklığının azaltılması da önemlidir. Proteom analizinde ikinci adım analitik protein ayırma teknolojisidir. Analitik protein ayırma teknolojisinde önce kompleks protein karışımlarını belli proteinlere ya da protein alt gruplarına ayırarak basitleştirir. Daha sonra örnekler arasında karşılaştırma yapılarak protein düzeylerindeki farklılıklar belirlenir. Proteinlerin ayırma araştırmacıya analizi için spesifik proteinleri hedeflemesini sağlar. Protein ayırmanın yapılabilmesi için iki tip metodoloji mevcuttur. Bunlardan ilki sıvı fazda ayırma yapıldığı metoddur.(109-110) İkinci metod ise proteomikste altın standart olup sıklıkla tercih edilen 2D (iki boyutlu) jel elektroforez metodudur. Bununla birlikte diğer protein ayırma teknikleri 1D jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi 1. SDS- PAGE ( denatüre edici page) ve 2.ND-PAGE( non denatüre edici page), HPLC (yüksek performans likit kromatografisi), kapiler elektroforez, izoelektrik odaklama ve kromatografik yöntemlerdir.(109-110) Ayrıştırılmış örneklerin analizi, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-ToF), ESI-MS (Elektrospray Ionizasyon Mass Spektrometri), PSDMALDIMS (Post Source Decay) ve SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) yöntemleri ile yapılır. Kütle spektrumu ve kromatogram verileri alınan örnekler için veri tabanında tarama yapılmakta ve belirli olasılıklarla protein eşleştirmeleri elde edilmektedir. MALDI-TOF ile protein bilgisine ulaşıp proteinin adı konulduktan sonra, ESI-MS için kullanılan Q-TOF ile amino asit dizilimlerine ulaşılarak proteinlerin primer amino asit dizileri aydınlatılabilmektedir. Veri tabanları üzerinden kimliği belirlenmiş olan proteinler değerlendirilerek farklı tedavi dozlarına yanıt,

tedavi edilen ve edilmeyen bireylerdeki protein haritaları veya farklı hastalıkları taşıyan vakalar ile kontrol grupları arasında fark doğrudan ve en güvenilir şekilde ortaya koyulmaktadır.(109-110)

### **5.3.MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi**

Kütle spektrometre aletleri iyonlaştırılmış maddeleri gaz fazında analiz ederler. Bu nedenle bir kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle/yük oranını belirleyebilen bir kütle analiz cihazı ve bir detektörden oluşur. Proteinlerin ve biyolojik moleküllerin gaz fazına taşınılabilmesi ESI (elektron-spray iyonizasyon) veya MALDI (matriks assisted laser desorption/ionization) teknikleri ile yapılır. MALDI tekniğinde analizi yapılacak maddeler katı bir kristal matriks ortamından lazerle iyonize edilir. Matriksin olmadığı ortamda biyomolekül parçalanacağı için matriksin kullanılması şarttır. İyonlaştırılmış biyomoleküller elektrik alan içerisinde hızlandırılarak bir tüp içerisine aktarılır. İyonların bu tüp içerisindeki hızları her bir iyonun kütle ve yükü ile doğru orantılıdır. Böylece her bir iyonun tüpten çıkış anı sahip olduğu kütle/yük sinyal oranına bağlı olarak değişir.

MALDI-TOF metodu kullanılarak proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin karakterizasyonu ve tanımı mümkündür. Bu metod oldukça duyarlı olup moleküler ağırlıkları 400 ile 350,000 Da arasındaki polipeptidlerin 10-15 - 10-18 mol seviyesinde tanımlanmasını sağlar. 3.7 Elde edilen kütle/yük değerlerinin analizi MALDI-TOF analizinden elde edilen kütle/yük değerleri Swiss-Prot data bankasında Prospector adı verilen ve ücretsiz ulaşılabilen bir programda araştırılabilir (<http://prospector.ucsf.edu/>). Bu programın amacı araştırılan proteinin kütle/yük değerlerini bugüne kadar bilinen tüm kütle/yük değerleri ile karşılaştırmak, veri tabanındaki değerlerle eşleşip eşleşmediğini araştırmak ve hangi proteine ait olduğunu tespit etmeye çalışmaktır. Protein prospektor içerisinde birkaç farklı programı kullanmak mümkündür.

(Kaynak: Swiss-Prot data bankası, <http://prospector.ucsf.edu/>)

Bu bağlamda kullanabileceğimiz ikinci bir program da Peptident adı altında sunulan ve Expsy veri bankası tarafından ücretsiz olarak kullanıma açılan veri (<http://ca.expsy.org/tools/peptident.html>). Oldukça kolay kullanılabilen bir kullanıcı-

ortamına (interface) sahip olan bu program elde edilen kütle/yük değerlerini direk olarak veri bankası içerisinde araştırır.

Kısacası proteomiks analizinde kullanılan genel strateji; (1) Ekstraksiyon, solübilizasyon, ön-fraksiyonlama, DNA'nın uzaklaştırılması, yaygın bulunan proteinlerin uzaklaştırılması gibi teknikleri içeren örnek hazırlığı. (2) Protein ve/veya Peptitlerin tanımlanması (identifikasyonu) ve elektroforeze dayalı tekniklerin kullanımı.

#### **5.4. Karşılaştırmalı Proteomiks Çalışmalarının Amacı:**

Klinik proteomiks çalışmalarında temel amaç, farklı hastalıklara ait özgün biyobelirteçlerin ortaya konması ve bunun tanı testi olarak kullanılmasıdır. Biyokimyasal mekanizmaların 60 karmaşıklığı nedeni ile, bir çok hastalıkta tek bir biyolojik belirteç ile sonuca ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hastalık progresyonu sırasında ortaya çıkan moleküllerin çalışılmasında, çoklu belirteç panellerinin veya proteomiks panellerinin çalışılması giderek önem kazanmaktadır.(111-112)

Normal biyolojik süreçlerin ve hastalıkların altında yatan mekanizmaların tanımlanması, vücut sıvılarında, hücrelerde veya doku biyopsilerinde diyagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanması, hastalık progresyonunun izlenmesi ve sınıflandırılması, yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi, vücut sıvı örneklerinin veya doku biyopsilerinin orijinlerinin belirlenmesi, sıvı, hücre veya dokularda protein fenotiplerinin ve post-translasyonel modların belirlenmesi, immüno globulin klonlarının araştırılması genetik otoimmün, enfeksiyonel veya neoplastik hastalıklar olarak tanımlanabilir.

## 6. GEREÇ YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneklere alkali yanık modeli uygulanması, amnion zarı transplantasyonu, kollajen crosslinking işlemi, sakrifikasyon ve alınan korneal dokuların hazırlanması işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler, görüntüleme işlemleri ve immünohistokimyasal boyama işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, örneklerin bir kısmından protein analizi ve MALDI TOF/TOF analizi Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırma Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

### 6.1. Denekler :

Çalışmamızda toplam 32 adet, sağlıklı Avustralya-Yeni Zelanda Irkı (1500-2000 gr) albino erkek tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHYUAM) temin edilerek, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) kendileri için özel üretilmiş olan tavşan kafeslerinde, tek ya da ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, ısı (21±2°C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması flöresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00-18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

### 6.2. Model Oluşturulması:

Denekler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) 20 günlük karantina sürelerinin ardından hepsi sağlıklı olarak çalışmaya başlandı. İlk gün tüm deneklere alkali yanık modeli oluşturuldu. Model sonrası her grupta 8 denek olacak şekilde denekler 4 gruba ayrıldı.

1N NaOH ve 8mm çaplı daire şeklinde Watman filtre kağıtları kullanıldı. Filtre kağıtları 60 sn boyunca 1N NaOH içerisinde bekletildi, ardından bu filtre kağıtları 1.1 ml Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.4 ml Xylazine Hydrochloride'in (Alfazyne % 2; , 5 mg/kg) intramüsküler (İM) uygulanması ile genel anestezi sağlanmış

ardından Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0.5; Alcon) ile topikal anestezi uygulanarak , kapak spekulumu takılan deneklerin sağ santral kornealarına uygulandı ve 60 sn beklendi. Sonrasında alkali ajan hemen uzaklaştırılarak 2 dakika boyunca %0.09 NaCl ile (yaklaşık 500cc) oküler yüzey yıkandı ve nekroze olan dokular uzaklaştırıldı. (113-114-115-116)

### 6.3. Çalışmanın Dizayını:

İlk gün model oluşturulmasının ardından gruplar belirlenmeden tüm deneklerin ön segment kornea fotoğrafları (software version 3.13.1; TOPCON Slit Lamp Microscopy 703963 Tokyo,Japan) ön segment kornea fotoğrafı ile çekilmiş ve ön segment Optik koherans tomografileri (software versiyon 6.0.11.0 ; Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany) ile çekilmiştir. Optik koherans tomografi kesitlerinden mikrometrik olarak yanık büyüklükleri ölçülmüş ve gruplar homojen olarak her grupta 8 er denek bulunacak şekilde oluşturulmuştur. Çalışmaya alınan tüm deneklerin yanık dereceleri Roper Hall sınıflamasına göre 4. derece (total epitel defekti ve pupilla ve iris görünümünü engelleyen opak kornea) olduğu gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak belirlenen iki deneğin yanık büyüklükleri ve dereceleri çalışma standartlarına uymayan dereceler olduğu için denekler hesaplamalara katılmamıştır. İstatistiksel hesaplamalara katılmayan bu deneklere çalışma standartları aynı şekilde uygulanmıştır. Deneklerin doku örneklerinin deneyin gidişatını etkilemeyeceği proteomiks laboratuvarınca belirtilmesi üzerine MALDI analizine katılmış muayene ve histolojik değerlendirmelerde hesaplamalara katılmamıştır.

Tüm gruplara medikal tedavi aynı şekilde uygulanmıştır. Medikal tedavi olarak enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla yanık oluşumundan itibaren deney sonlanıncaya kadar moksifloksasin %0.5 (vigamox) topikal olarak günde 3 kez ; akut dönemdeki şiddetli enflamasyonu baskılamak amacıyla rutin tedavide yeri olan güçlü bir steroid topikal preparatı olan prednisolone asetat %1.5 ( pred forte) ilk 14 gün günde 3 kez olarak uygulanmış ve kesilmiştir.

1. GRUP: Sağlam ( Hiçbir müdahalede bulunulmamış sağlıklı deneklerden oluşur.)
2. GRUP : Alkali yanık kontrol grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp 21 gün sadece medikal tedavi verilen grup)

3. GRUP: Amnion implantasyon Grubu ( yanık ardından 1-4 saat içinde 2 kat amnion zarı implantasyonu yapıldı ve 7. gün amnion zarı hala duran deneklerden amnion zarı çıkarıldı+21 gün medikal tedavi uygulandı. )

4. GRUP : Crosslinking Grubu ( yanık ardından 1-4 saat içerisinde CXL uygulandı+21 gün medikal tedavi uygulandı.)

5. GRUP: Crosslinking+ Amnion İmplantasyon Grubu (yanık ardından 1-4 saat içerisinde CXL uygulandı + ardından 1-4 saat içinde 2 kat amnion zarı implantasyonu yapıldı ve 7. gün amnion zarı hala duran deneklerden amnion zarı çıkarıldı +21 gün medikal tedavi uygulandı.)

Amnion zarlari 3-7 gün arasında ortalama 4 gün oküler yüzeyde kalmıştır. Tüm gruplarda 21. günde deney sonlandırılarak korneaları limbus hizasından alınmıştır.

#### **6.4. Muayene dizaynı ve deneyin sonlandırılması aşamaları:**

Her muayene öncesi deneklere genel anestezi uygulanmıştır. 1.1 ml Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.4 ml Xylazine Hydrochloride'in (Alfazyne % 2; , 5 mg/kg) intramüsküler (İM) uygulanması ile genel anestezi sağlanarak ön segment fotoğrafları ve OCT leri tekrar alınmıştır. (3 . gruptan bir denek postop birinci gün muayene öncesi verilen genel anestezi sonrası ex oldu, 4. gruptan bir denek ise postop 1. gün kafesinde hasta olarak bulundu ve sakrifiye edildi.)

Muayeneler model oluşturulmasının ardından ilk gün : 1. ziyaret, 7. gün: 2. ziyaret , 14. gün :3. ziyaret ve 18. gün: 4. ziyaret olarak gerçekleştirilmiştir. Muayene sırasında oluşacak mikrotravmaların iyileşmesine ve floressein gibi uygulanan ajanların uzaklaşmasına fırsat vermek için son muayeneler sakrifikasyon işleminden 3 gün önce yani 18. gün yapılmıştır.

Optik koherans tomografide her ziyaret sırasında santral korneal kalınlık ölçülmüştür. Ön segment fotoğrafları opasite muayenesinde vaskülarizasyon takibinde ve floressein boyalı mavi ışık altındaki fotoğraflar ise epitel hasarı tamiri seyrinin izlenmesinde kullanılmıştır. Vaskülarizasyon, opasite ve epitel defekti büyüklükleri alınan fotoğraflarla MATLAB 7.7.0(R2008b) programı ile belirlenmiş ve değerlendirilen parametlerin tüm kornea dokusuna oranları şeklinde bu program ile hesaplanmıştır.



Matrix metalloproteinazların tekrar aktifleştığı ve enzimatik erimenin en fazla olduğu 21. gün sakrifikasyon günü olarak belirlenmiş (117) ve denekler 0,4ml Xylazine Hydrochloride (Alfazyne % 2; , 5 mg/kg) + 3,0ml Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg ; Pfizer, 35 mg/kg) ardından eter ile sakrifiye edilip kornealar limbus sınırından kornea makasıyla alınmıştır. Limbus hizasından skleradan ayrılan korneal doku örnekleri santralden iki parçaya ayrılarak bir kısmı nötral tamponlanmış formaline konularak fikse edilip histoloji laboratuvarına gönderilmiş, diğer yarısı ise PBS solüsyonuna konularak -80 derecede azot gazı ile dondurulmuş ve proteomiks çalışılması için ayrılmıştır.

### **6.5. Crosslinking uygulaması ;**

CXL ve CXL+Amnion grubundaki deneklere alkali yanık modeli uygulanmasının ve muayenenin ardından 1-4 saat içerisinde 1.1 ml mg/ Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg ; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.5 ml Xylazine Hydrochloride (Alfazyne % 2; , 5 mg/kg) intramüsküler (İM) uygulanması ile tekrar genel anestezi sağlandı. Çalışma gözlerine, Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0.5; Alcon) ile topikal anestezi sonrası, kapak spekulumu takıldı . Biz çalışmada epitelin kaldırılması veya bağlarının güçsüzleştirilmesi için bir aşama uygulamadık çünkü alkali yanık modeli sonrası korneal epitel zaten zarar görüp dükülmüştü. Ortalama epitel kalktıktan sonraki korneal kalınlıklarımız ise  $632 \pm 37$  mikron idi.

CXL işlemi şu şekilde yapıldı; % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (10 ml % 20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) 30 dakika boyunca her 3 dk da bir damlatılarak kornea yüzeyinde bekletildi. UVA uygulama öncesi, cihazın spot enerjisi kalibre edildi. Kornea yüzeyine 5 cm mesafeden 3 mw/cm<sup>2</sup> dozunda (5.4 Joul/cm<sup>2</sup>) UVA ışığı 30 dk boyunca uygulandı. Bu esnada, her 3 dk da bir % 0.1'lik riboflavin solüsyonu damlatıldı. (Şekil 3 )

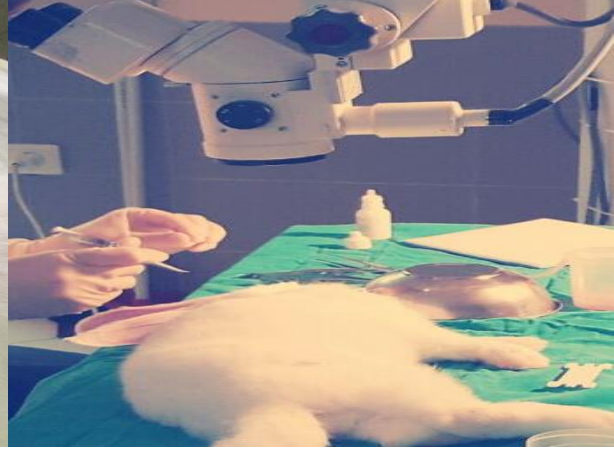
#### **6.5.1. Crosslinking cihazının özellikleri ;**

Kliniğimizde mevcut olan UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)" ile crosslinking işlemi uygulanmıştır. Cihazın özellikleri:

- 365 nm dalga boyunda, 7-9-11 mm çaplı homojen UVA spotu üretebilmektedir .
- 3 mW/cm<sup>2</sup>'lik spot enerjisi sağlayabilmektedir. Çalışma mesafesi 50 mm'dir , 32x5x5 cm ebatlarındadır ve ağırlığı 6.5 kg'dir.



Şekil 3 : CXL işleminin uygulanması



Şekil 4: Amnion zarı implantasyonu

### 6.6. Amnion Zarı İmplantasyonu:

Hepatit B, C, sifiliz ve HIV açısından seronegatif gebelerden elektif sezeryan sırasında steril şartlarda alındı. Plasentada künt diseksiyonla koryon dokusundan ayırdıktan sonra pıhtıları 50 µg/ml gentamisin içeren steril fizyolojik tuzlu su solüsyonu %0.09 NaCl ile temizlenip gliserol içeren optisol kornea saklama solüsyonuna alındı . Alınan amnion zarı + 4 derecede gliserol solüsyonunda muhafaza edildi ve 24 saat içerisinde kullanıldı.

Limbustan yaklaşık 1mm mesafede konjonktivaya 10/0 naylon sütürlerle bağ doku kısmı kornea epiteline doğru olacak şekilde 2 kat separe olarak suture edildi. Amnion zarının korneal yüzeyde stabilitesini sağlamak için üzerinde balafilcon terapötik kontak lens takıldı.(Şekil 4)

## 7. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

### 7.1. Doku takibi:

Hayvanlardan alınan kornea'lar ışık mikroskopi takibi uygulamak üzere fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonuna konularak 24 saat fikse edildi ve ardından yükselen dereceli etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) tutularak dehydrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dakika süreyle tutuldu ve toluol içinde 15 dakika süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56°C'deki etüvde ilk olarak yumuşak daha sonar sert sıvı paraffin içinde 45'er dakika bekletilen parçalar paraffin bloklara gömüldü. Bu bloklardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

Morfolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin(H&E) ve Masson Trichrome(MT) boyamaları, apoptotic hücrelerin varlığını saptamak için TUNEL işaretlemesi ve inflamasyon belirteci olan CD68 immün boyaması yapıldı.

### 7.2. Hematoksilen-Eozin ve Masson Trichrome Boyaması

H&E boyama: Parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün toluol (30 dakika) yardımı ile kesitler üzerindeki paraffin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100, 96, 90, 70) geçirildi ve saf suya alındı. Ardından Mayer Hematoksilen'de 5 dakika bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyanın giderilmesi için iki kere saf sudan geçirilen kesitler mavileştirme solüsyonunda 10-15 saniye bekletildi ve tekrar saf suya alındı. Daha sonra %100 etanolden hızlıca geçirilen kesitler sitoplazmik boyanma için Eozin Y solüsyonunda 2-3 dk tutuldu ve hızlıca %100 etanole alındı. 3 kez %100 etanol serisinden geçen kesitler toluende ikişer kez 15'er dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

Parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün toluol (30 dakika) yardımı ile kesitler üzerindeki paraffin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100, 96, 90, 70'lük) geçirildi ve saf suya alındı. Kesitler, daha önceden benmaride 56-64°C'ye getirilen ısıtılmış Bouin sıvısında 60 dk bekletildi. Daha sonar doku tamamen temizlenene kadar çeşme suyunda yıkandı. Saf sudan geçirilen kesitler, Weigert A ve Weigert B hematoksileninden eşit hacimde alınarak hazırlanmış karışımda 5 dakika bekletildi. Çeşme

suyunda 2 dakika yıkanan kesitler saf sudan geçirilerek Asit fuksin solüsyonunda 15 dakika tutuldu ve ardından saf sudan geçirildi. Daha sonra Fosfotungstikasit solüsyonunda kollajen liflerdeki kırmızı renk giderilene kadar 10-15 dakika bekletilen kesitler yıkama olmadan Anilin mavisi solüsyonuna alındı ve bu solüsyonda 5 dakika bekletildi. Saf su ile yıkamanın ardından %1'lik asetik asit solüsyonunda 3-5 dakika bekletilen kesitler hızlıca iki kez %95 alkolden geçirilerek toluenle şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

H&E boyamalarından epitelyal dejenerasyon değerlendirildi. 0: kayıp yok ,1: minimum splitting, 2: hafif erozyon, 3: orta ülserasyon, 4: ciddi ülserasyon olarak skorlandı. Hemoraji değerlendirildi 1: subepitelyal kanama , 2: subepitelyal kanama + üst stromal kanama, 3: subepitelyal kanama + parsiyel stromal kanama, 4: subepitelyal kanama + total stromal kanama olarak sınıflandırıldı.(118) Korneal ödem değerlendirmesi klinik muayene skorlamaları modifiye edilerek uygulandı. 1: ödem yok, 2: hafif ödem, 3: ciddi ödem olarak tanımlandı. (119)

### **7.3. TUNEL İmmün İşaretleme**

Parafin bloklardan alınan 4 µm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından toluolde 3x10 dakika bekletilerek parafinden iyice arındırıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirilip 5 dk PBS (fosfat tamponlu salin)'de yıkandı. Daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dakika oda ısısında proteinaz K solüsyonu uygulandı ve distile su ile yıkanan (2x2 dk) kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanol ile hazırlanan %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 5 dakika karanlıkta bekletildi. PBS (2x5 dk) ile çalkalandıktan sonra lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çevrelenerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 10 dakika oda ısısında dengeleme tampon uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de terminal deoksinükleotidiltransferaz enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. PBS'de yıkanan (3x1 dk) kesitlere oda ısısında 30 dakika anti-digoksinin-peroksidaz konjügatı uygulandı ve yıkama sonrasında 7 dakika DAB(diaminobenzidin) kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapılmasının ardından kesitler kapatma medyumu ile kapatıldı. Tüm preparatlar ışık mikroskopunda (Leica DM 1000) incelendi ve fotomikrograflar Leica DMC 2900 (Leica CH-9435 Heerburgg, Germany) ile

çekildi. TUNEL pozitif hücreler 400X büyütme altında epitel ve stromada ayrı ayrı ortalama 5 alanda sayıldı.(120)

#### **7.4. CD68 İmmünboyaması**

Parafin bloklardan alınan 4 µm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından toluolde 3x10 dakika bekletilerek parafinden iyice arındırıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirilerek akarsuya alındı. Daha sonra antijen iyileştirme amacıyla mikrodalgada (600W) sitrat buffer içerisinde 3-5 dk bekletildi. PBS-Tx (2x5 dk) 'ten geçirilen kesitler hidrofobik kalemle çevrelenerek havuz oluşturuldu ve non-spesifik boyanmayı önlemek için bloklama serumuyla (Histostatin plus kit broad spectrum, Invitrogen, CA, USA) 15 dk muamele edildi. Daha sonra kesitler primer polyclonal anti-CD68 antikoruna (abcam, ab955) ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. PBS'te (3x5 dk) yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloke etmek için % 0,3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 15 dk bekletildi. Ardından kesitlere biyotinli sekonder antikor (Histostatin plus kit broad spectrum, Invitrogen, CA, USA) 60 dk uygulandı. PBS'te (3x5 dk) yıkanan kesitlere peroksidaz işaretli streptavidin (Histostatin plus kit broad spectrum, Invitrogen, CA, USA) ile 15 dk muamele edildi. Peroksidaz aktivitesi DAB (DAB kit 88-2014, Invitrogen, CA, USA) ile görüntülendi. Mayer hematoksilin ile zıt boyama yapılmasının ardından kesitler kapatma medyumunu ile kapatıldı.

Tüm preparatlar ışık mikroskopunda (Leica DM 1000) incelendi ve fotomikrograflar Leica DMC 2900 (Leica CH-9435 Heerburgg, Germany) ile çekildi. Değerlendirmeler CD68 pozitif boyanan hücrelerin sayımı şeklinde yapıldı. 0: < % 5 pozitif hücre , 1: %6-15 pozitif hücre, 2: %16-50 pozitif hücre, 3: %51-80 pozitif hücre ve 4: > %81 pozitif hücre olarak değerlendirildi.(121)

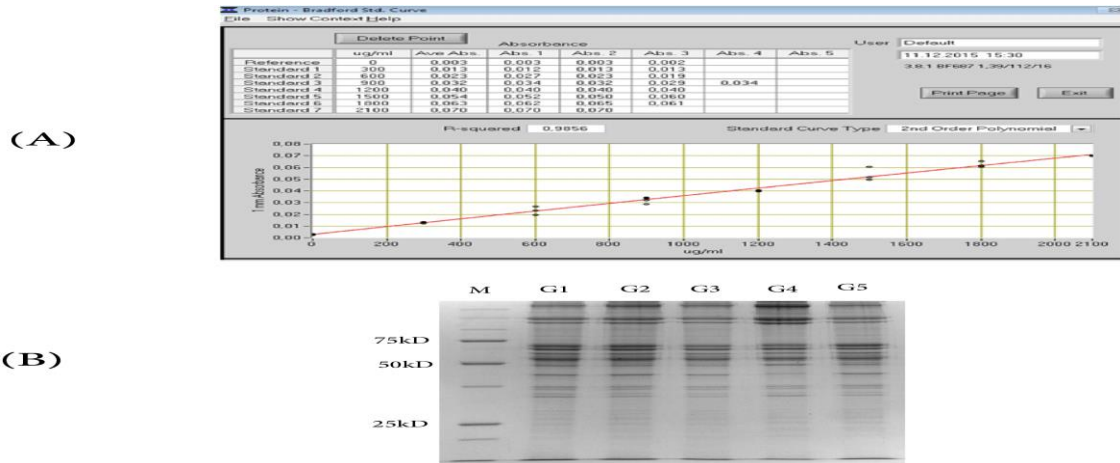
## 8. PROTEOMİK DEĞERLENDİRMESİ

### 8.1. Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması

Saklandıkları  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan örnekler buz içerisinde tutularak (örneklerin ısınmasını engellemek amacı ile) çözülmüşlerdir. Çözülen kornea örnekleri büyüklüklerine göre 2 ya da 3 parçaya ayrılarak %1 TBP ve %1 amfolit içeren 2D rehidrasyon tamponu içerisine alınmıştır. Örnekler üzerine protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitör karışımı (Roch, ABD) eklenmiş ve protein eldesi için kornea 0.2mm'lik çelik boncuklar yardımı ile Bullet Blender (Eppendorf, ABD) adı verilen bir cihaz yardımı ile  $+4\text{C}$  de parçalandı. Örnekler içerisinde herhangi bir koloidal kalıntı bırakmamak için  $4^{\circ}\text{C}$ 'de  $30000\text{xg}$ 'de 30 dk santrifüj edilerek temiz tüplere alındı. Daha sonra çalışılmak üzere snap-frozen yapılarak  $-80\text{C}$  ye kaldırıldı.

### 8.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein konsantrasyonları hazırlanan standartlar ve gerekli örnek dilüsyonları kullanılarak Bradford Protein Konsantrasyon ölçüm Metodu ile yapılmıştır. (NanoDrop1000, Thermo Scientific). Ölçüm sırasında kullanılan protein standardı Şekil 5'de verilmiştir. Yapılan ölçümün ne derece doğru yapıldığını kontrol etmek için her bir protein havusundan 10 mikrogram protein alınarak SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur (Şekil 5-B).



Şekil 5: (A) Protein özütlerindeki protein konsantrasyonu ölçümleri için kullanılan standart eğri . (B) Protein konsantrasyonlarının kalitesini onaylamak için kullanılan protein özütlerinin SDS-PAGE analizi

### 8.3. Protein örneklerinin odaklanmaları ve 2D jel elektroforezleri

Protein örneklerinin odaklanması deneyleri DEKART protein araştırmaları ve proteom laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Protein örnekleri ilk aşamada IPG stripler tarafından emilebilmek için striplerle birlikte rehidrasyona tabi tutulmuşlardır. İzoelektrik odaklamada 240 µg protein örneği kullanılarak 11cm'lik, IPG stripler ( pH 3-10NL, BioRad, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Protein örnekleri 2D rehidrasyon tamponu (son miktar 7cm'lik stripler için 125µl,) ile karıştırılıp içerisine stripin pH'sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklenmiştir. Bu aşamadan sonra protein örnekleri fokuslama trayleri içerisine konulmuş PROTEAN IEF (BioRad) cihazı içerisinde pasif rehidrasyona tabi tutulmuştur (20°C). Pasif rehidrasyon sırasında 1. saat sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerilerine 1ml mineral yağı ilave edilmiş ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edilmiştir.

Rehidrasyon işleminden sonra IPG striplerin izoelektrik odaklamasına geçilmiştir. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kâğıdı ve su yardımı ile temizlenmiş ardından temiz bir fokuslama trayi içerisine konularak üzerlerine yeni mineral yağ eklenmiştir. Trayler daha sonra yine PROTEAN IEF (BioRad, ABD) içerisine konularak adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C' de fokuslanmıştır (7cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı Rapid, S3: 4000volt/ IPG strip Lineer. 11cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı Rapid, S3: 8000volt/ IPG strip Lineer). Fokuslama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde ayırma tabi tutulmuşlardır.

Fokuslama sonrasında stripler tampon I (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk lık sürelerle yıkanmışlardır. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan SDS poliakrilamid jellere (12% veya değişik konsantrasyonlarda) yerleştirilerek elektroforez (35mA 30 dk, 48mA 5 saat, 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta (2D) ayırma tabii tutulmuşlardır (Laemmli, 1970). İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılacak jeller için jelden jele farklılıkları ortadan kaldırmak amacıyla DODECA (BioRad, ABD) oklu örnek jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemleri kullanılmıştır.

Elektroforez sonrasında jeller %40 metanol, %10 asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edilerek ardından colloidal Coomassie mavisi G250 boyası içerisinde gece boyu boyanmışlardır. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad, ABD) ile yapıldıktan sonra jellerin analizleri PDQuest Advanced programı ile yapılmış istatistikî olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

#### **8.4. MALDI TOF-TOF analizi**

Jellerden elde edilen protein spotları DEKART protein araştırmaları ve proteom laboratuvarında trypsin ile kesilmiş daha sonra elde edilen peptitler Zip-tip ile temizlenerek MALDI-TOF-TOF (ABSciex, ABD) cihazında okunmuşlardır. MALDI-TOF-TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içerisinde ayırdırdıktan sonra kütle/yük oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre isimlendirmeye yardımcı olur. Cihazdan elde edilen verilerin Mascot data bankasında hangi proteine ait oldukları belirlendi.)

([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS).)

#### **8.5. IPA ( ingenuity pathway analysis)**

IPA, proteomiks araştırmaları gibi bir çok deneysel araştırmada da başvuru olan web tabanlı bir yazılımdır . Belirlenen protein spotlarının spot intensitelerinin birbirine oranları kullanılarak araştırma yapılır. Spot intensite oranlarına göre metabolik yollar değerlendirilip araştırılan tıbbi durumun hangi hücre içi yolları etkilediği şeklinde bir analiz yapar.

(<http://www.ingenuity.com/products/ipa>)



## 9 .BULGULAR

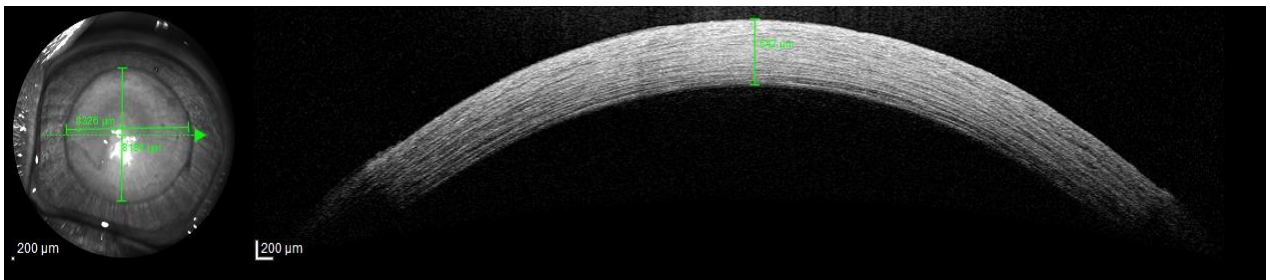
### 9.1. Muayene Bulguları :

Alkali yanık oluşturulmasının ardından ilk gün tüm grupların ortalama yara büyüklüklerinin (horizontal ve vertikal uzunluklarının ortalaması ) ve korneal kalınlıklarının arasında fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ( $p>0.05$ ). Normalde ortalama 350 mikron olan sağlam tavşan korneasının alkali yanık sonrası ortalama santral korneal kalınlığı  $627 \pm 59$  mikron( $\mu$ ) olarak bulunmuştur. Ortalama yara büyüklükleri  $8.2 \pm 0.1$  milimetre(mm) olarak tespit edilmiştir.Grupların yara büyüklükleri ve santral korneal kalınlıklarının başlangıç ölçümleri Tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo 4: Model sonrası ilk ölçümler

	Ortalama yara büyüklüğü (mm)	Santral korneal kalınlık ( $\mu$ )
<b>Kontrol</b>	$8.2 \pm 0.2$	$626 \pm 22$
<b>Amnion</b>	$8.1 \pm 0.2$	$637 \pm 47$
<b>CXL</b>	$8.2 \pm 0.1$	$596 \pm 95$
<b>CXL+ Amnion</b>	$8.2 \pm 0.0$	$648 \pm 30$
<b>p değeri</b>	0.440	0.515

Tekrarlanan ölçümlerde grupların SKK değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir değişim saptanmadı. SKK ortalama değerlerine bakıldığında anlamlı değişim olmamakla birlikte tüm ölçümlerde medikal tedavi dışında CXL veya amnion zarı gibi herhangi bir ek tedavi uygulanan gruplarda kontrollerden fazlaydı.(Tablo 5) Grupların OCT ile SKK ölçüm örnekleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Her bir grubun tekrarlayan vizitlerde değişen santral korneal kalınlık değerleri Tablo 6' da gösterilmiştir.



Şekil 6 : CXL grubu korneal OCT görüntülerinin SKK ölçümünde kullanımı

Tablo 5: 1. ,2.,3., ve 4. ziyaret SKK ölçümleri ( $\mu$ )

	1.vizit	2.vizit	3.vizit	4.vizit
Kontrol	619 (609-652)	663 $\pm$ 45	674 (629-677)	766 (602-806)
Amnion	639 (593-675)	764 $\pm$ 106	873 (689-923)	860 (813-911)
CXL	637 (580-652)	723 $\pm$ 119	802 (554-902)	872 (769-914)
CXL + Amnion	650 (625-662)	756 $\pm$ 101	836 (606-939)	963 (642-970)
p value	0.515	0.288	0.136	0.183

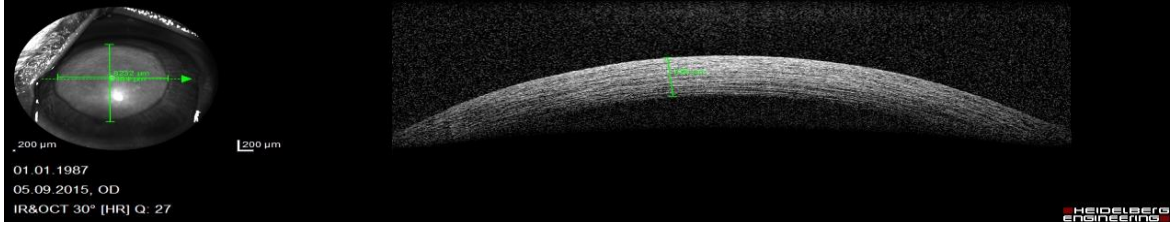
Tablo 6: Her bir grubun kendi içinde tekrarlayan ölçümlerde SKK değerlerinin karşılaştırılması

	1.vizit	2.vizit	3.vizit	4.vizit	p değeri
Kontrol	619 (609-652)	654 (624-705)	674 (629-677)	766 (602-806)	0.102
Amnion	637 $\pm$ 47	764 $\pm$ 106	829 $\pm$ 119	862 $\pm$ 79	<b>P&lt;0.001</b>
CXL	637 (580-652)	703 (617-834)	802 (554-902)	872 (769-914)	<b>0.018</b>
CXL+Amnion	650 (625-662)	793 (647-833)	836 (606-939)	963 (642-970)	0.277

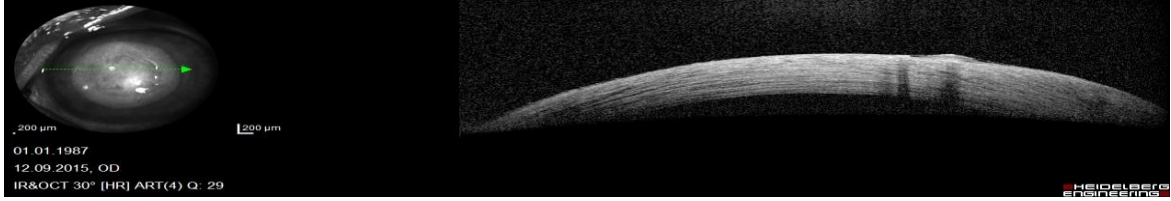
Muayene sırasında korneal ülserasyon değerlendirildi ve sınıflandı.(123 )Süperfisyal ülserasyonda ülser korneanın anterior 1/3 ünde sınırlıydı, orta derece ülserasyonda ülser korneanın orta 1/3ünde sınırlıydı, derin ülserasyonda ülser korneanın posterior 1/3üne uzanmıştı.Ülserasyon ön segment OCT bulgularıyla değerlendirildi.(Şekil 7) Bu sınıflamaya göre gruplarda gelişen ülserasyonun dağılımı Tablo 7 'da göstermiştir. CXL grubunda takip edilen ziyaretlerde ülserasyon gelişmediği görüldü.

Epitelyal iyileşme floressein boyanma sonrası kobalt mavisi ışıkla yapılan biyomikroskopik muayene görüntülerinin MATLAB programıyla defektin tüm kornea çapına oranı olarak değerlendirildi (Tablo 8 ) (Şekil 8)

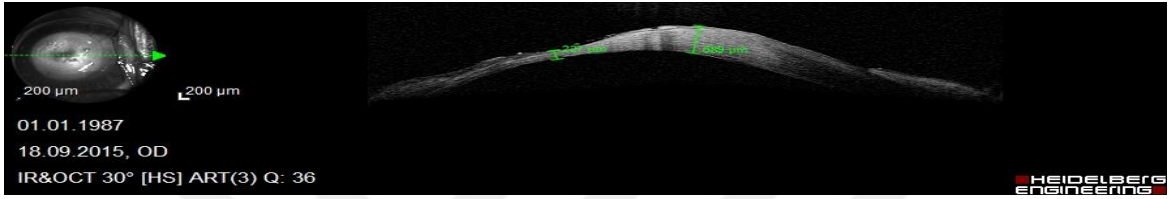
1.vizit



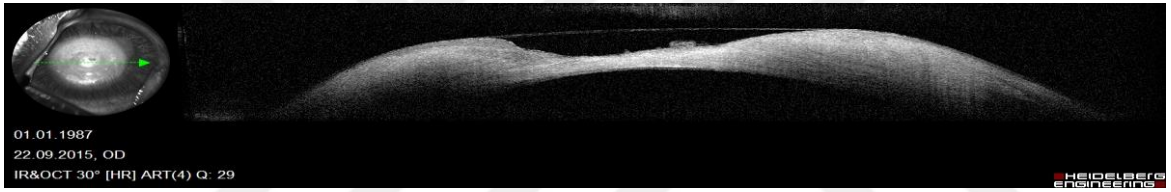
2.vizit



3.vizit



4.vizit

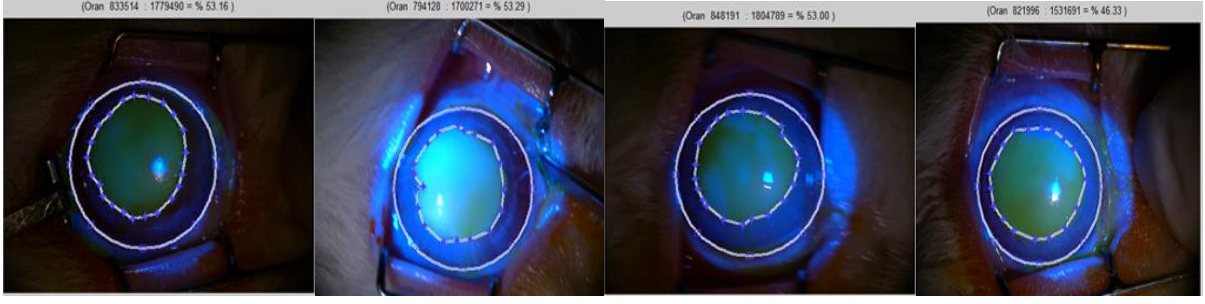


Şekil 7: Amnion grubunda 15. Deneğin 1.,2.,3. ve 4. vizit gelişen ülserasyonun değerlendirildiği OCT görüntüleri(14. Günde ülserasyonun en aktif olduğu 18.günde biraz daha iyileşme gösterdiği görülmektedir.)

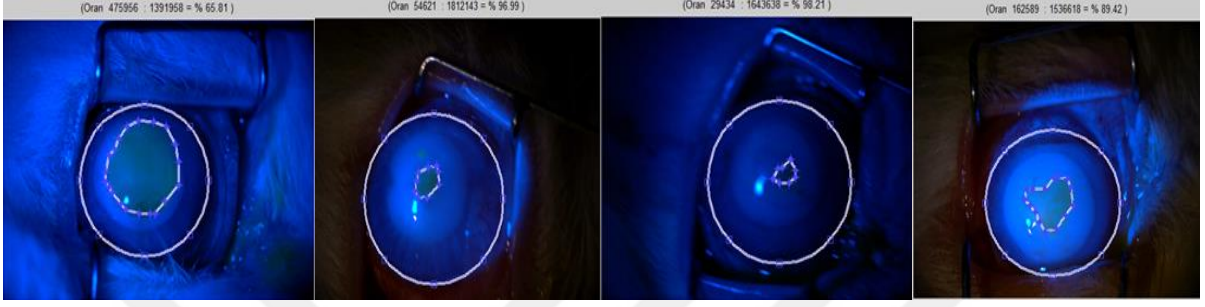
Tablo 7: Her bir grubun son vizitteki ülserasyon skorları

	Amnion (n:7)	CXL+Amnion(n:7)	CXL (n:8)	Kontrol (n:6)
Ülserasyon yok	5 (%71.4)	4 (%57.1)	8 (%100)	3 (%50)
Süperfisyal ülser	1 (%14.3)	2 (%28.6)	0	1 (%16.7)
Orta ülser	0	0	0	1 (%16.7)
Derin ülser	1 (%14.3)	1 (%14.3)	0	1 (%16.7)
Desmatosel	0	0	0	0

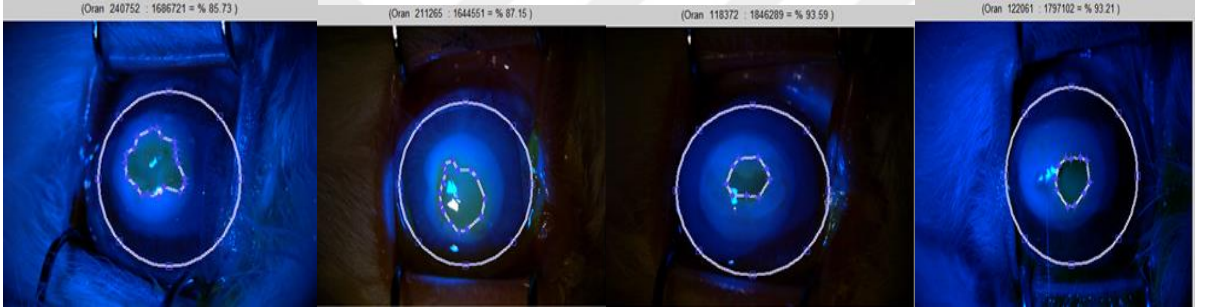
1.vizit



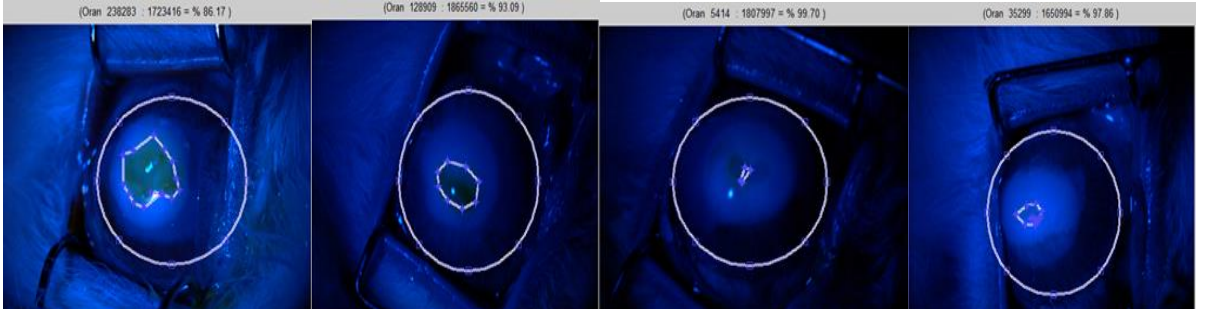
2. vizit



3. vizit



4. vizit



Şekil 8: Kontrol, Amnion, CXL, CXL+Amnion, grubularında sırayla 1.,2.,3.,4. vizit epitelyum hasar büyüklüğünün takibi

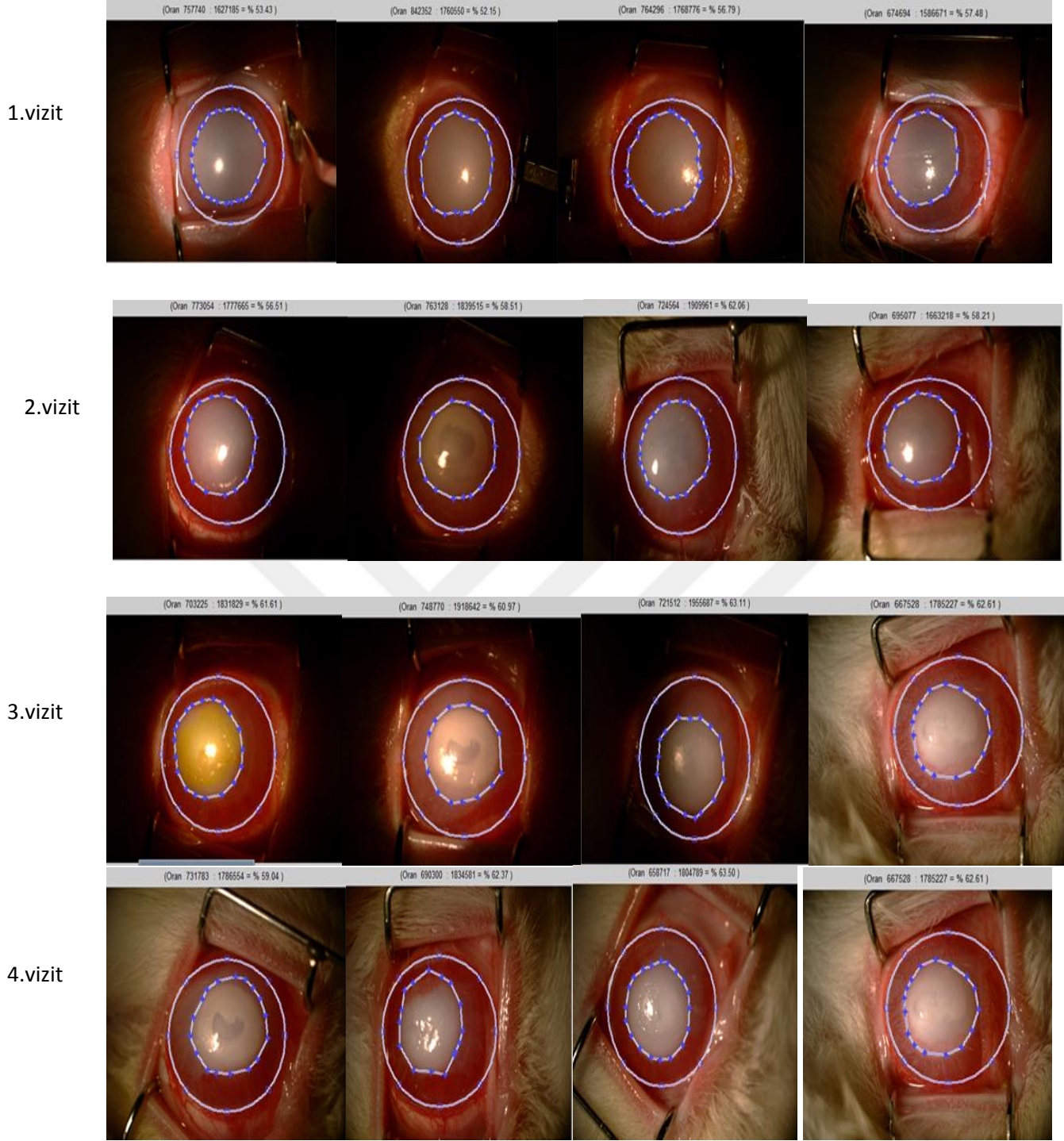
İlk hafta epitelyal rejenerasyon hızları karşılaştırıldığında anlamlı farkı yaratan CXL grubuyla kontrol grubu arasındaki ( $p=0.014$ ) ve CXL+Amnion grubu ile Kontrol grubu arasındaki ( $p=0.012$ ) anlamlı değişimdi. İki grubunda ortak özelliği tedavide CXL nin bulunmuş olmasıydı. İkinci haftaki ölçümlerde anlamlı farklılığı yaratan CXL+Amnion grubu ile Kontrol grubu arasındaki ( $p=0.010$ ) ve Amnion ve Kontrol grubu arasındaki ( $p= 0.042$ ) anlamlı değişimdi. Burdaki farkı yaratanın ise her iki grupta da kullanılan amnion zarı olduğu düşünöldü. Üçüncü hafta yapılan ölçümlerde ise farklılık sadece CXL ve kontrol grubu arasındaki farktan kaynaklanıyordu ( $p=0.012$ ). Grupların kendi içlerinde zamanla epitel hasarı iyileşme miktarları karşılaştırıldığında tüm grupların 2. ve 3. haftaki ölçümlerde başlangıç defekte göre farklılık yarattığı görölmektedir.

Tablo 8: Epitelyal iyileşmenin değerlendirilmesi (%)

	1.vizit	2.vizit	3.vizit	4.vizit
Kontrol	46.2(43.7-48.4)	34.9(17.4-38.0)	19.1(14.3-25.7)	15.5(9.1-28.0)
Amnion	45.5(44.7-46.7)	14.3(3.0-18.5)	4.3(0.8-10.8)	4.0(0.6-5.2)
CXL	46.7(42.2-47.0)	5.6(1.9-11.5)	4.7(1.8-14.8)	1.8(0.0-3.8)
CXL+Amnion	46.5(45.2-51.9)	6.4(4.0-10.5)	3.2(1.5-4.7)	3.4(0.0-4.3)
p değeri	0.656	<b>0.007</b>	<b>0.009</b>	<b>0.013</b>

Opasite değerlendirmesi de epitelyal hasar değerlendirmesi gibi ön segment fotoğraflarının MATLAB programıyla opasitenin tüm korneaya oranları şeklinde belirlendi.(Tablo 9,Şekil 9)

Grupların kendi içlerindeki tekrarlayan ölçümlerin karşıştırmalarında tüm gruplarda opasitenin tekrarlayan ölçümlerde anlamlı olarak azaldığı bulundu.Bu farklılık tedavi uygulanan tüm gruplarda 3. ve 4. Ölçümler ile başlangıç değeri arasında anlamlı bulundu. ( $p=0.000$ ) Sadece kontrol grubunda opasitedeki anlamlı azalma 4. Ölçüm ile başlangıç değeri arasında ortaya çıktı. ( $p=0.012$ )(Tablo 9)



Şekil 9: Kontrol, Amnion , CXL, CXL+Amnion grubundan korneal opasitenin 1.,2.,3., ve 4.vizit değerlendirilmesi

Tablo 9: Korneal hasarın (opasitenin) değerlendirilmesi (%)

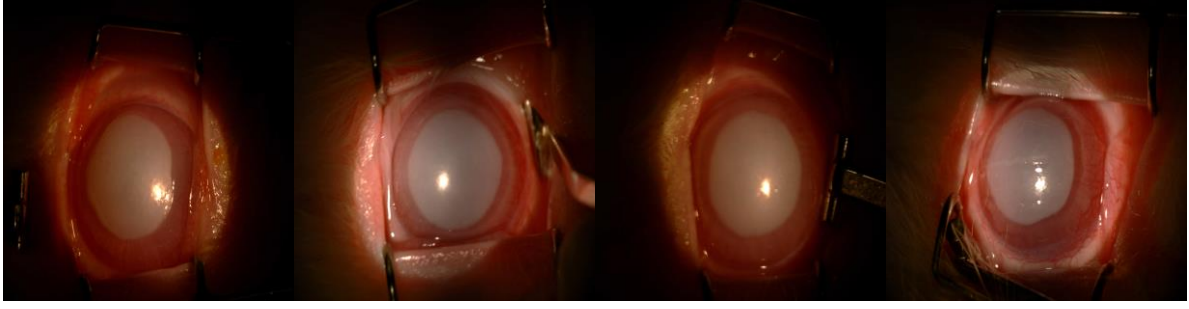
	1.vizit	2.vizit	3.vizit	4.vizit
Kontrol	43.7(43.0-44.1)	43.6(40.3-46.5)	38.2(37.7-41.3)	37.7(31.8-41.2)
Amnion	45.2(42.9-46.5)	39.1(37.6-42.8)	36.5(32.3-39.3)	35.3(33.4-36.5)
CXL	46.3(41.4-47.8)	41.3(36.1-43.5)	36.1(33.7-42.2)	37.7(31.8-41.2)
CXL+Amnion	45.5(42.5-50.1)	43.1(41.7-44.2)	41.5(37.3-43.7)	37.9(36.1-42.2)
p değeri	0.383	0.137	0.156	0.303

Vaskülarizasyon da opasite ve epitelyal hasar gibi ön segment fotoğraflarının MATLAB programıyla total korneaya oranlanması şeklinde hesaplandı. (Şekil 10)7.gün vizitinde vaskülarizasyonun gruplar arasındaki farkını yaratan CXL ve Amnion grubu arasında ( $p=0.005$ )ve CXL+Amnion ve CXL grubu ( $p=0.019$ ) arasındaki değişimdi. 14. Gündeki farkı yaratan ise CXL grubu ile CXL+Amnion grubu arasındaki farklılığı.( $p=0.007$ ) (Tablo 10) Vaskülarizasyon yüzdelerine bakıldığında amnion implantasyonu yapılan gruplarda vaskülarizasyonun 2.ve 3. vizitte kontrol grubundan bile fazla olduğu görülmüştür. Son vizitte gruplar arasındaki vaskülarizasyon oranları açısından istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.( $p=0.053$ ) Vaskülarizasyonun en az olduğu grup ise CXL grubuydu. (Şekil 10)

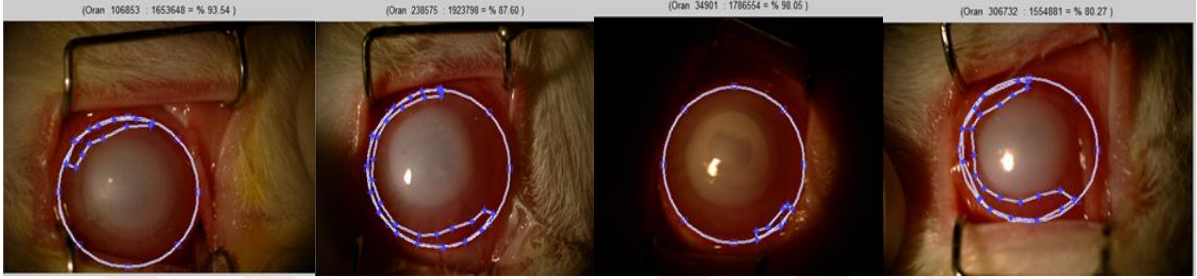
Tablo 10: Vaskülarizasyonun değerlendirilmesi (%)

	2.vizit	3.vizit	4.vizit
Kontrol	4.6(2.9-7.5)	21.4(9.9-24.5)	22.8(16.4-28.5)
Amnion	7.3(4.3-9.5)	22.6(5.5-32.2)	34.4(17.7-62.7)
CXL	2.2(0.4-3.1)	6.8(1.9-13.5)	16.1(8.3-21.2)
CXL+Amnion	5.7(5.3-19.7)	30.5(18.2-44.7)	35.1(31.9-59.9)
p değeri	<b>0.004</b>	<b>0.013</b>	0.053

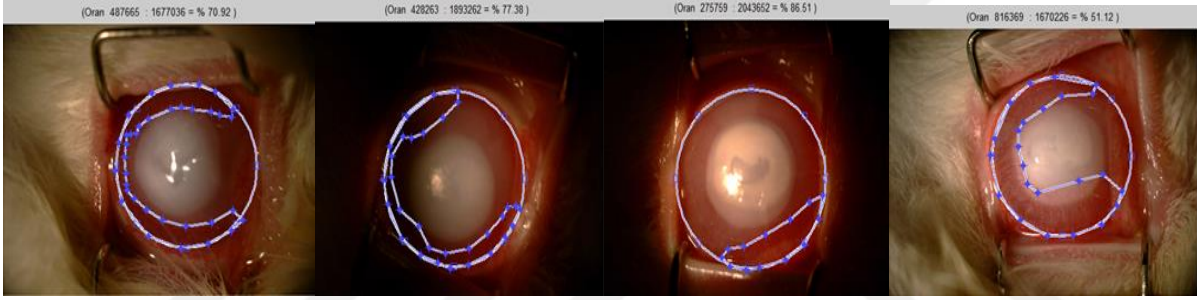
1.vizit



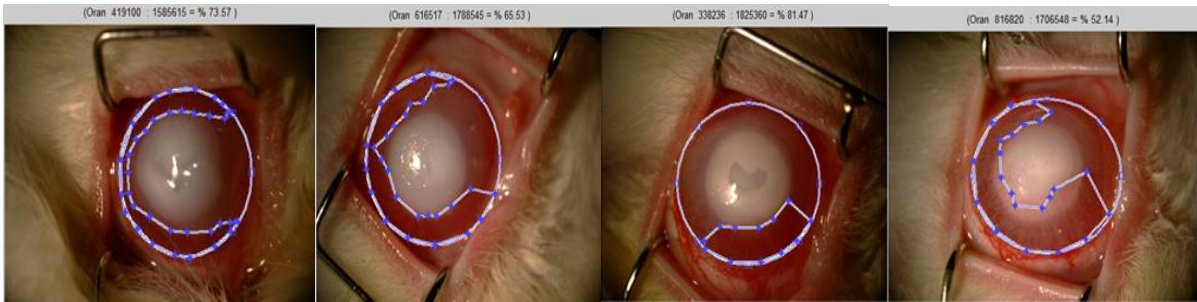
2. vizit



3. vizit



4.vizit



Şekil 10: : Kontrol, Amnion , CXL, CXL+Amnion grubunda korneal vaskülarizasyonun 1.,2.,3., ve 4.vizit değerlendirilmesi



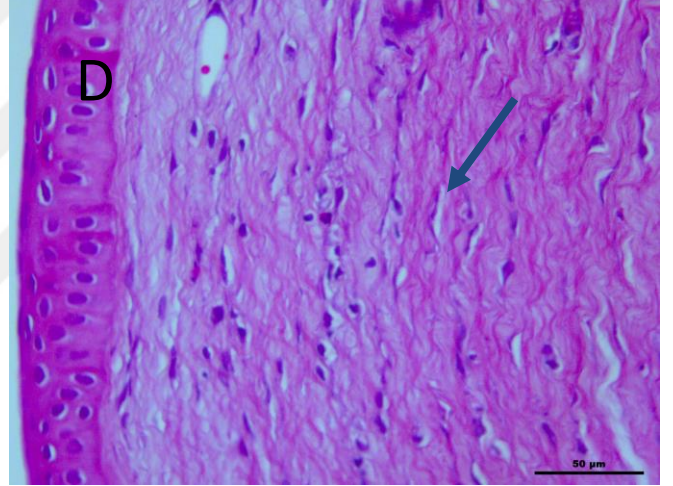
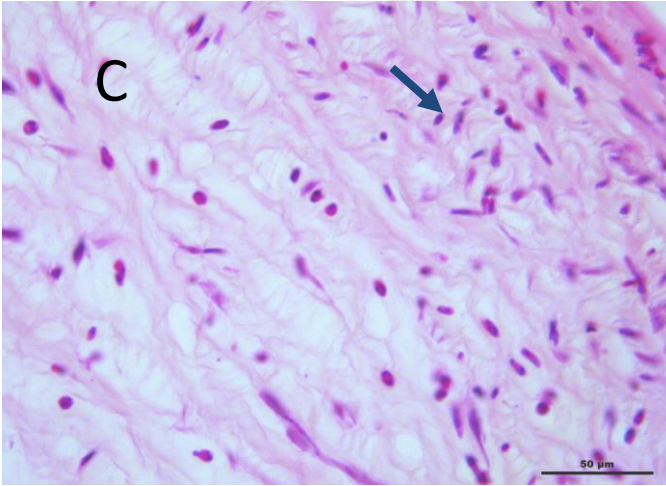
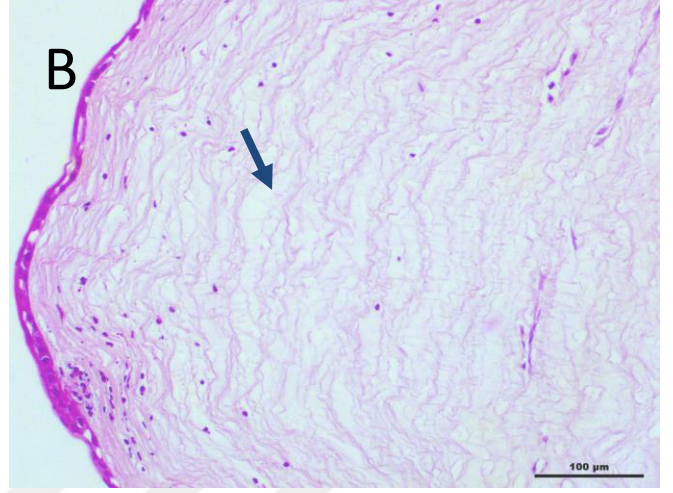
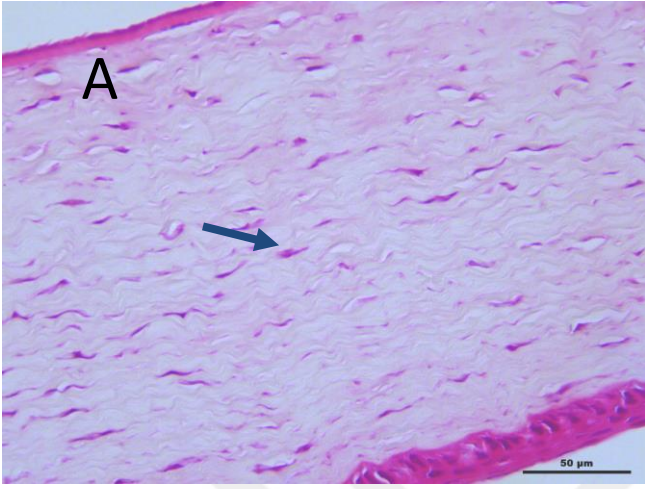
## 10. HİSTOLOJİK BULGULAR

Sağlıklı grupta epitel ve stroma normal görünümdeydi. Alkali yanık gruplarında H&E kesitlerinde epitel dejenerasyonu, yer yer tam epitelyal kayıp, sağlam epitel alanlarında epitelin çok katlı yapısında bozulma, yer yer epitelyal hiperplazi gelişmişti ve varolan epitel stromadan ayrılma (splitting) göstermekteydi. Yoğun PMNL hakimiyetinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttu , stromada yoğun ödem , kollajen lif düzeninde bozulma, lifler arası mesafede artış ve vaskülarize alanlar oluşmuştu, yer yer bazı korneal katlarda hemorajiler mevcuttu .

H&E bulgularına göre amnion implantasyonu grubunda epitelyal sağlam alanlar daha çoktu. Fakat epitel stroma bağlantıları kopuktu ve epitelyal splitting yoğun olarak mevcuttu. Lökositik infiltrasyon kontrol grubundan az olmakla birlikte mevcuttu. CXL grubunda da epitelyal sağlam alanlar çoğunlukta idi. Splitting amnion grubundan daha az olmakla birlikte devam etmekteydi, lökositik infiltrasyon kontrol ve amnion grubuna göre daha azdı. Keratositler ve kollajen lifler arası bağlantıların daha güçlü ve düzenli olduğu dikkat çekmekteydi. Kollajen liflerin aralarındaki köprüler yer yer sağlamdı. CXL+Amnion zarı implantasyonu yapılan grubun stromal bütünlük açısından CXL grubuna ek bir üstünlüğü saptanmadı. Epitelyal değişimler CXL grubuna benzerdi, inflamasyon CXL grubuna göre biraz daha fazlaydı. Amnion grubununa daha yakın benzerlikteydi.(Şekil 11,12)

Stromal ödem ve hemoraji skorlama sonuçları açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Muayene bulgularımızda da stromal kalınlık ve vaskülarizasyon açısından son vizitte gruplar arasında fark saptanmadı. Bu bulgular histolojik incelemelerle desteklenmiştir. Epitelyal iyileşme skorlamasında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttur.(p=0.040) Farkı oluşturan CXL grubu ve kontrol grubu arası değişim (p=0.010) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte kontrol grubunda skorların en yüksek olduğu tedavi gruplarında skorların epitelyal iyileşmeyi destekler yönde iyileştiği görülmüştür. Bu bulgular klinik muayene bulgularımızla ölçüşmektedir.(Tablo 11)

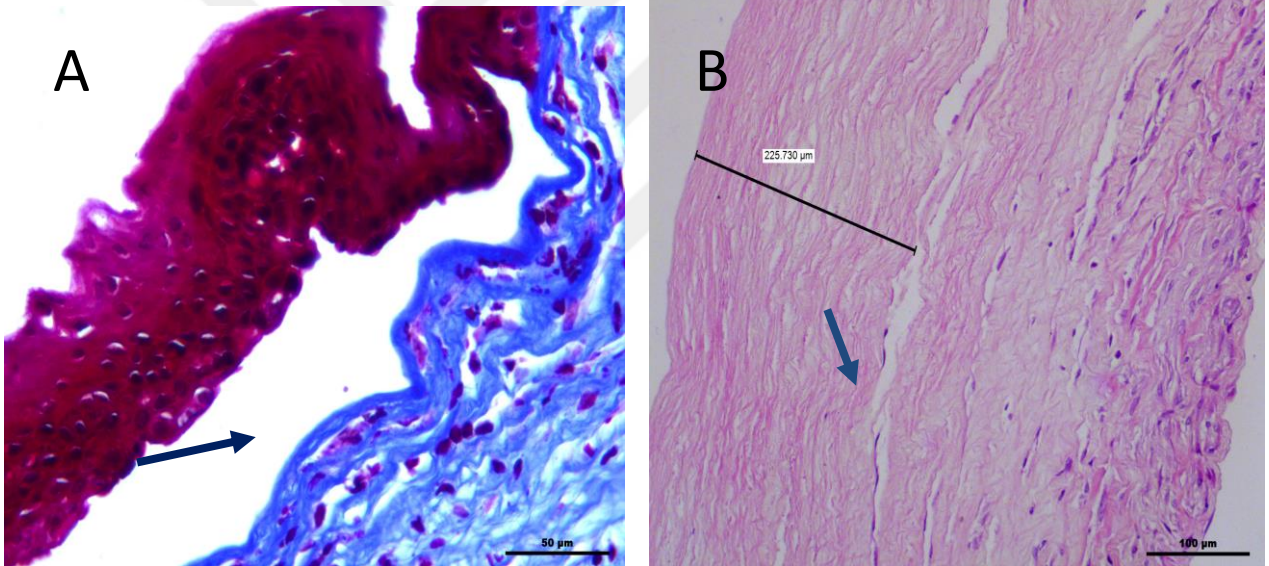
Şekil 11: H&E ile boyanmış kesitler. Sağlam, keratosit(ok)(A), Kontrol, kollajen liflerin bozulmuş dizilimi ve vakuoller(ok)(B), Amnion , PMNL hakimiyeti(ok)(C), CXL, kollajenler arası daha düzenli bir dizilim(ok)(D), CXL+Amnion, kollajenler arası artan köprüler(ok)(E) 40X



Tablo 11: Histolojik değerlendirme sonuçları

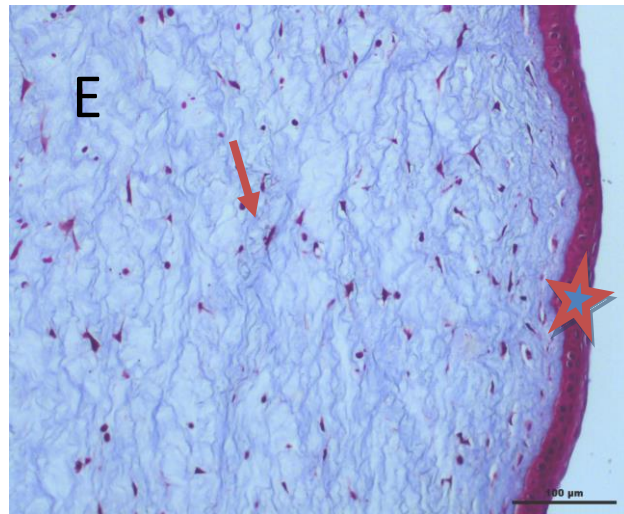
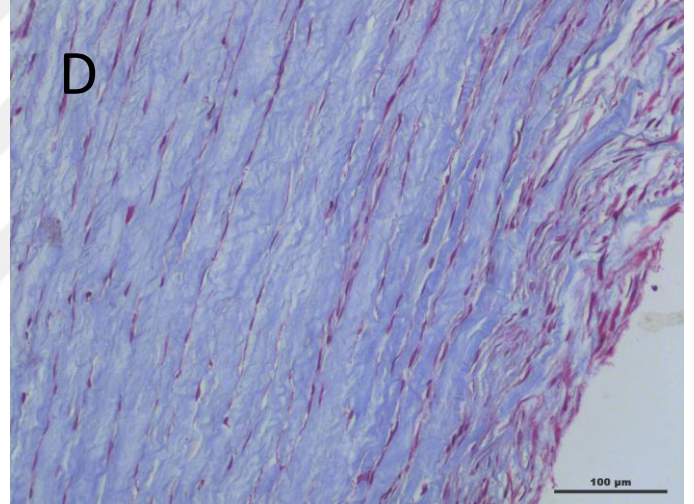
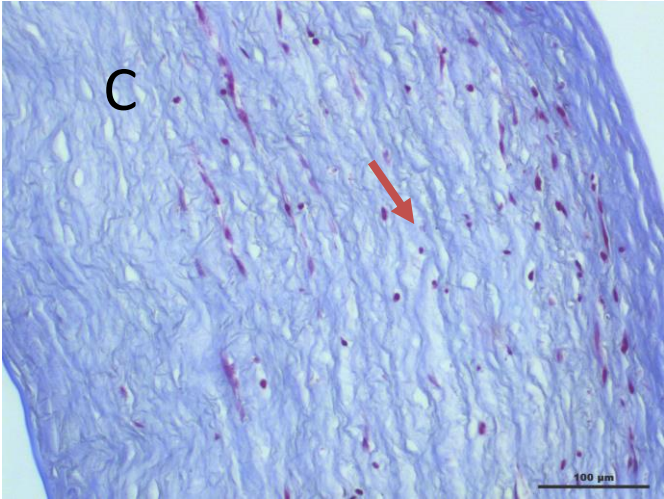
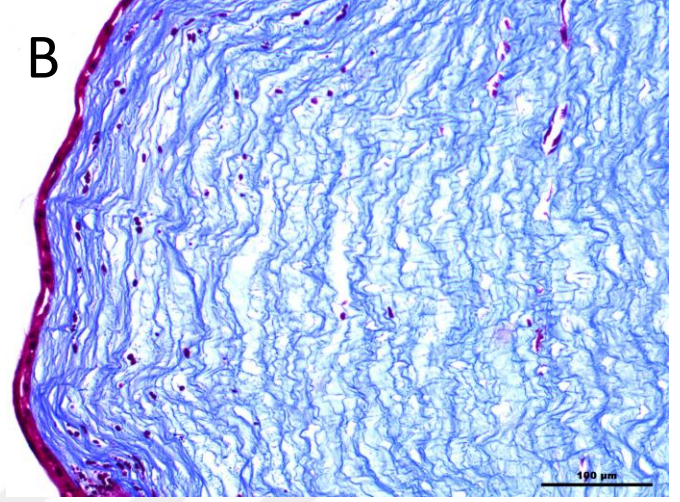
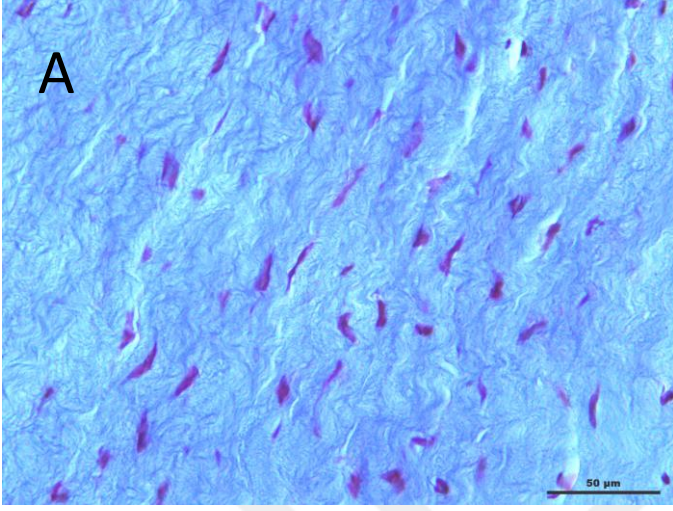
	Epitelyal iyileşme	Stromal ödem	Hemoraji
Kontrol	4.0(3.5-4.0)	2.0(2.0-3.00)	1.50(1.00-3.00)
Amnion	3.0(3.0-4.0)	3.00(2.0-3.0)	1.50(1.00-3.00)
CXL	2.0(1.5-2.0)	2.00(2.00-2.0)	1.00(0.00-1.50)
CXL+Amnion	1.5(1.0-4.0)	2.0(1.75-3.0)	1.50(0.75-2.25)
p değeri	0.040	0.293	0.188

Şekil 12: (A) Masson Tricrom boyamada epitelyal hiperplazi ve splitting (ok) ve inflamatuvar hücreler dikkat çekmektedir.(B) H&E boyamada keratosit kaybı olan alanlar görülmektedir.



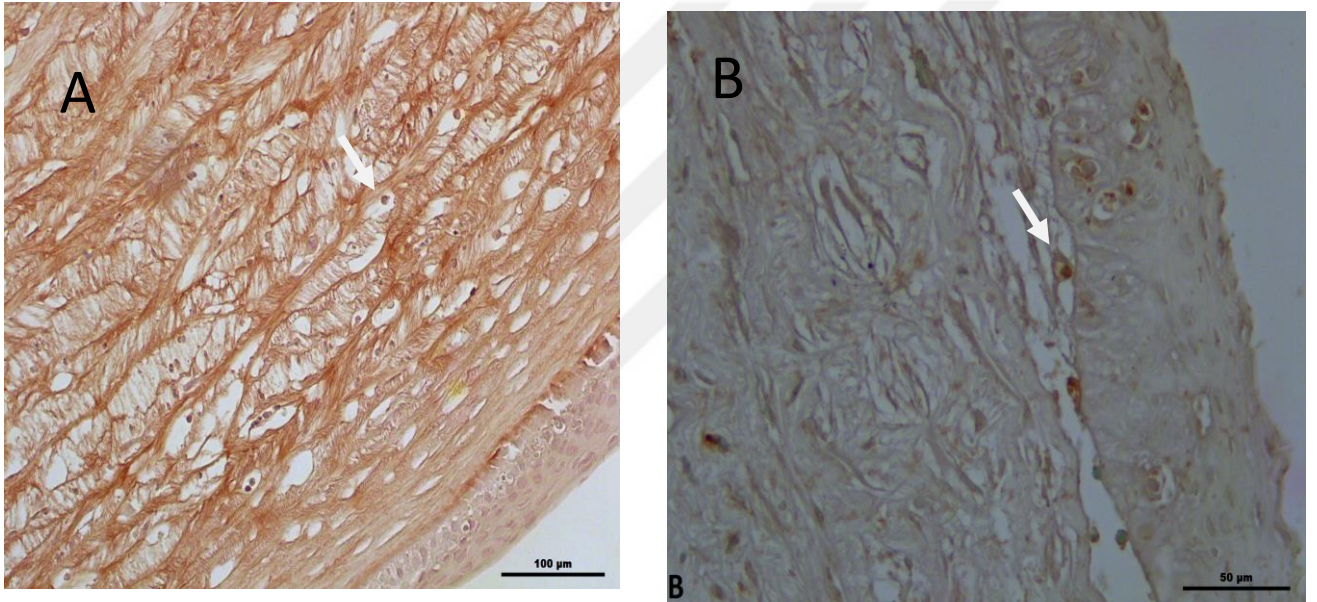
Masson Tricrom bir bağ doku boyasıdır ve stromal katların daha iyi görüntülenebilmesi için uygulanmıştır. Yanık gruplarında kollajenin düzenli diziliminin bozulduğu , aralarındaki interfibriller bağlarda kopmalar olduğu ve vakuolizasyonların arttığı görüldü. Alkali yanık kontrol grubunda stromal bulgular: yoğun ödem, kollajen diziliminde bozukluk, epitelyal hiperplazi ve splitting , lökosit infiltrasyonu şeklindedir. Masson Tricrom boyalı preparatlar incelendiğinde yanık uygulanan gruplardaki yoğun stromal ödem, kollajenlerin ayrık yapısı, aralarındaki köprülerin oldukça azalmış olduğu, stromal vakuolizasyonun şiddetlendiği , özellikle ön stromal katlarda keratosit kaybı olduğu dikkat çekmekteydi.(Şekil 12,13)(120)

Şekil 13: M&T boyamada sağlam(A), Kontrol(B), Amnion, tam oluşmamış kollajen dizilimi(ok) (C), CXL(D) ve CXL+Amnion, PMNL(ok), yeni oluşan sağlam çok katlı epitel(yıldız)(E) 40X



Stromal apoptozun göstergesi olan TUNEL pozitif hücre sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu( $p= 0.020$ ), farkı yaratan ise CXL grubu ile kontrol grubu arasındaki değişimlerdi ( $p= 0.044$ ). İnflamasyon göstergesi olan makrofaj markeri CD68 immünohistokimyasal incelemesinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu ( $p= 0.001$ ). Gruplar arasındaki istatistiksel farkı oluşturan CXL grubu ile kontrol grubu arasında ( $p= 0.001$ ) ve CXL+Amnion ile kontrol grubu arasındaki farktı ( $p=0.039$ ). Sağlam kornealarda apoptotik hücre sayısı ve CD68 düzeylerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir.(Tablo12).(Şekil 14)

Şekil 14: Kornea’da kontrol grubunda TUNEL(+) boyanan hücreler.Apoptotik hücre (ok). (B) Korneada CXL grubunda CD68 pozitif boyanan hücreler okla gösterilmiştir. 40X.



Tablo 12: TUNEL(Epitel), TUNEL (stroma), CD68 skorlarının gruplar arası karşılaştırılması

	TUNEL(Epitel)	TUNEL(stroma)	CD68
Kontrol	0.20 (0.00-2.50)	5.85 (4.90-8.73)	4.00 (3.00-4.00)
Amnion	0.14 (0.00-1.9)	3.66 (2.07-7.00)	3.00 (2.00-3.00)
CXL	0.00 (0.00-0.50)	0.80 (0.66-3.66)	2.00 (1.75-2.00)
CXL+Amnion	0.40 (0.00-0.95)	1.60 (0.96-3.12)	2.00 (2.00-3.00)
P value	0.799	0.020	0.001
SAĞLAM	0.08 (0.00-0.35)	0.08 (0.00-0.21)	0.000(0.00-0.025)

## 11. MALDİ / TOF-TOF BULGULARI

### 11.1 Örneklerin Protein İçerikleri

Bireysel varyasyonların elimine edilmesi amacıyla CXL, CXL+Amnion , Kontrol ,Sağlam ve Amnion çalışma gruplarının her birinden eşit konsantrasyonda örnek alınarak karıştırılmış ve sırasıyla G1, G2, G3, G4 ve G5 protein havuzları oluşturulmuştur. (G1: Crosslinking grubu, G2: Crosslinking+Amnion grubu , G3: Kontrol grubu, G4:sağlam ,G5: Amnion). Bu havuzlardan iki boyutlu jel elektroforezi yapabilmek için örneklerin konsantre edilmesi ve temizlenmesi gerekmekte idi. Çünkü ön denemelerimiz bizlere örneklerin tuz konsantrasyonlarının fazla olduğunu ve odaklamaya uygun olmadıklarını gösterdi. Sonuç olarak örnekler 2D clean up kit (Biorad,ABD) ticari kiti yardımı ile aseton çöktürmesine tabi tutularak temizlendiler.

### 11.2 İki Boyutlu Jellerin Analizi

Oluşturulan protein havuzları 2D jellerde ayırma tabi tutulduktan sonra colloidal Coomassie mavisi G250 ile boyanmış ve yüksek çözünürlüklü bir kameraya sahip VersaDoc. MP400 görüntüleme sistemi ile görüntülenmişlerdir. Elde edilen görüntülerin analizi ise PD-Quest advance yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. (Şekil 15)

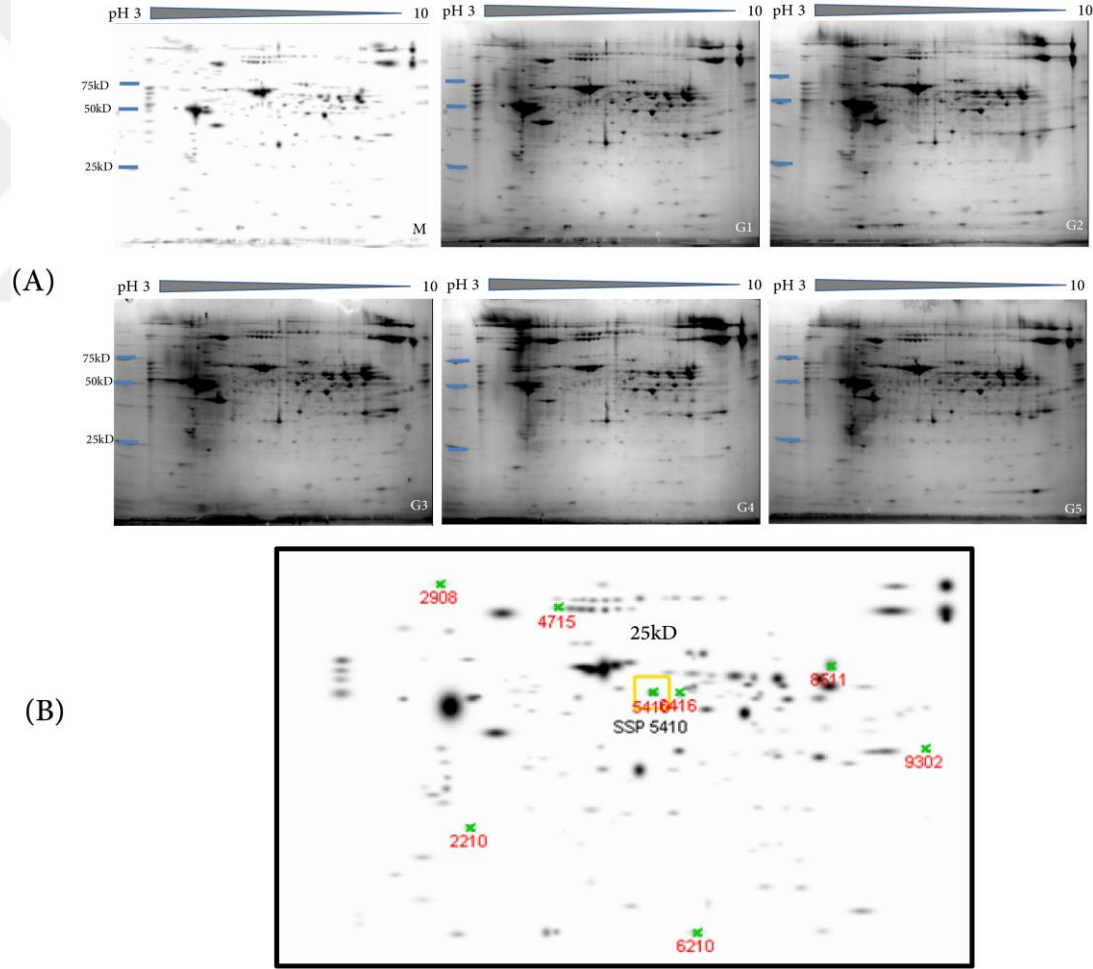
Jeller üzerinde ortalama  $400 \pm 20$  adet protein spotu eşleştirilmiştir. Bu spotlardan bazıları jeller üzerinde yüksek miktarda bulunuyor iken bazılarının düşük miktarda bulunan spotlar olduğu gözlenmiştir. Jellerde serum içeriğinden gelen albümin ve korneada yapısal olarak bulunan kollajen gözlemlenmiştir. Jellerin analizi için kullanılan pH aralığı ile protein dağılımı arasındaki ilişki incelendiğinde proteinlerin özellikle pH 5-8 aralığında homojen olmayan bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Genelde proteinlerin pI değerlerinin 5-8 aralığında olduğu düşünülürse böyle bir dağılımın görülmesi gayet normaldir.

Oluşturulan protein havuzlarında 2D jeller açısından bakıldığında karşımıza çıkan en büyük sorunun miktarı çok olan ve serumdan göz sıvısına geçtiğini düşündüğümüz proteinlerin miktarı daha az olan proteinlerin tanımlanmasını engellemesidir. Miktarı düşük ancak biyomarker olarak önemi büyük olan bu az miktardaki proteinleri açığa çıkarmak için birtakım metotlar mevcuttur. Örneğin blue jel adı verilen materyal albumini bağlayan bir

materyaldir ve örnekleri bu materyal ile muamele etmek mümkündür. Ancak yaptığımız ön denemelerde bu tip bir uygulamanın az miktarda bulunan proteinleri de uzaklaştırdığını göstermiştir. Dolayısı ile örnekler oldukları gibi iki boyutlu jel elektroforezine tabi tutuldu.

Jeller hakkında söylenmesi gerekli olan başka bir nokta da birçok proteinin 60000 Da'nun altında olan bölgede yoğunlaştığı gerçeğidir. Bu orta ve küçük büyüklükteki proteinlerin serum kökenli olma ihtimallerini artırmaktadır, çünkü bu proteinler rahatlıkla serumdaki göz içerisine penetre olabilmektedirler. Son olarak da jellerin analizi kısmında belirtmemiz gerekli olan nokta aslında jel profillerinin genel olarak birbirlerine çok benzediği gerçeğidir.

Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki benzeşme oranı yazılım tarafından %90'nın üzerinde yüksek bir confidence oranı ile verilmiştir. Bu durum aslında yapılan analizin ne derece güvenilir olduğunun da bir bakıma göstergesidir. Eğer jeller arasında aşırı derecede farklılık gözlenecek olsa idi böyle bir sonuç deneysel varyasyonun aşırı derecede deney sonuçlarını etkilediğini gösterecekti. DEKART protein araştırmaları laboratuvarında yapılan çalışmalarda deneysel varyasyonu minimuma indirgeyebilmek için kullanılan pre-cast jeller ve dodeca sistemleri çalışmamızda güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil 15 : (A) Çalışma gruplarını yansıtan proteinlerin 2D jel görüntüleri. Master jel; G1: CXL, G2:CXL+Amnion, G3: Kontrol, G4: Sağlam, G5: Amnion. (B) Master jel görüntülerindeki regüle spotların pozisyonu ve ilgili SSP numaraları



### 11.3 Proteinlerin Tanımlanması

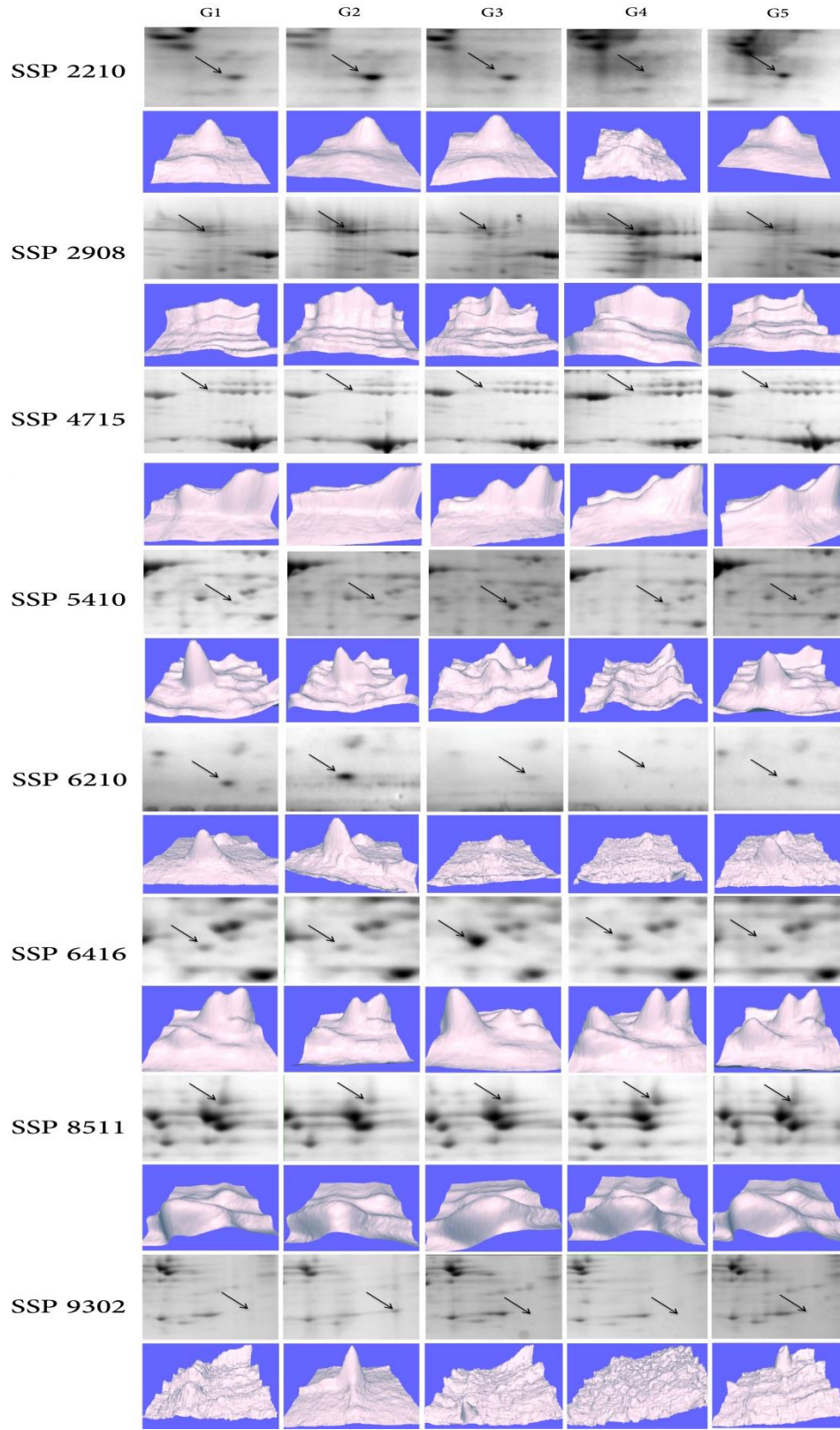
Jeller üzerinde regülasyon farklılıkları görülen protein spotları robotik bir sistem aracılığı ile jellerden kesilerek çıkartıldı ve jel içi triptik kesime tabi tutuldu. İki gün süren bu kesim işlemi sonrasında jellerden elde edilen peptitler uçlarında hidrofilik yüzeylerin bulunduğu iğne uçlu kolonlardan geçirilerek (Zip-Tipler) tutuldu ve matriks çözeltisi ile karıştırılarak MALDI-TOF/TOF cihazında tanımlandı. Protein tanımlanmasının kolaylaştırılması amacıyla başlangıç miktarlarını yüksek tutmak için farklı jellerde görülen aynı protein spotları kesilerek birleştirilmiştir. Toplamda 8 adet spot tanımlanan çalışmamızda bu spotlara ait MALDI-TOF/TOF verileri Tablo-13'de özetlenmiştir.

Tanımlanan bu protein spotları içerisinde bir kısmı Keratin olarak belirlendi. Keratin genellikle biyolojik örneklerde bir kontaminan protein olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir hücre iskelet proteini olan keratin dışarıdan kirpikler, saç kökleri, kıl kökleri ve hatta havadaki tozdan örneğe bulaşabileceği gibi biyolojik materyalin kendisinde de yüksek miktarda bulunabilir. Bizim çalışmamızda aldığımız göz sıvısının yüksek miktarda keratin içerdiği ancak bu keratinin çevresel mi olduğu yoksa sıvının içsel yapısında mı bulunduğu bilinmemektedir.

Proteinler arasındaki regülasyon farklılıklarının görülebilmesi için jellerin daha yakından analiz edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla PDQuest advance yazılımının 3D analiz opsiyonu kullanılmıştır. Tanımlanan her bir protein için yapılan 3D analizleri Şekil-16'de gösterilmektedir. Bazı protein spotlarının hangi grupta net bir şekilde arttığı/azaldığını bu analiz sonucunda çok daha net bir şekilde görmek mümkündür. Örneklerin iki boyutlu jel elektroforezleri her gruptan 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Tablo13 de tanımlanan proteinlere ait peptid sekansları ve Mascot skorları verilmiştir.

Tablo 13: Protein spotlarının MALDO-TOF/ TOF analizleri ve tanımlanan proteinlere ait peptid sekansları ile Mascot skorları verilmiştir .

ID	AC no	SSP	Protein	Mascot skorları
A3	Q99LH9	2210	SH3 domain-binding protein 151 VFVAEQGVMA DKNRLDPTWQ EMLNHATCKV <b>NEAEEER</b> LRG EREHQQR <b>VTRL</b>	36
A4	Q6AY75	2908	PHF finger protein 23(plant homeodomain finger protein 23)	40
A5	Q02788	4715	Collagen alpha-2(VI) 101 YLDQVALSWR <b>YGGLHFS</b> DQV <b>EVFSP</b> PGSDR ASFTKSLQGI RSFRRGTFDD 201 <b>RLFAVAPNRN LNEQGLR</b> DIA NSPHELYRNN YATMRPDSTE IDQDTINRII 651 <b>NFVINVVNRL</b> GAIADPKSE TGTRVGVVQY SHEGTFAIR LDDERVNSLS	232
A7	P04104	5410	Keratin, tip II sitoskeletal 1 251 DSLKSDQSRM DSELKNMQDL VEEYR <b>TKYED EINKR</b> TNAEN EFVTIKKDVD	102
A6	Q6B345	6210	Protein S100-A11 1 MPTETER <b>CIE SLIAV</b> FQKYS GK <b>DGNSCHLS KTEFLS</b> FMT ELAAFTKNQ <b>K</b> 51 <b>DPGVLD</b> RMK KLDLNSDQQL DFQEFLNLIG GLAIACHESF LQTSQKRI	182
A1	Q3TTY5	6416	Keratin, tip II sitoskeletal 2 251 QAYIGMLKKQ VDRLSAERTS QESELNNMQD LVEDFKK <b>YE DEINKR</b> TSAE 401 VTAVKHGDSL KEIKMEISEL NRTIQLRQGE ISHV <b>KKQCKG VQDSIADAEQ</b> 451 <b>RGEHAIKDAR GK</b> L <b>TDLEAL QQCR</b> EDLARL LRDYQELMNT <b>KL</b> SLD <b>VEIAT</b>	90
A8	P40142	8511	Transketolaz 601 LL <b>KMFGIDKD AIVQAVK</b> GLV TKG	62
A2	P17244	9302	Gliseraldehide-3-fosfat dehidrogenaz 51 HGKFKGTVKA ENGLVINGK <b>AITIFQERDP ANIK</b> WGDAGA EYVVESTGVF 201 AQNIIPASTG AAKAVGKVIP ELNG <b>KL</b> T <b>GMA FRVPTPNVSV VDL</b> TCRLEKP 301 LNDNFV <b>KLIS WYDNEFGYSN R</b> VVDLMAYMA SKE	116



Şekil 16 : Regüle spotlar ve 3D görüntüleri, oklar regüle spotları işaret etmektedir.

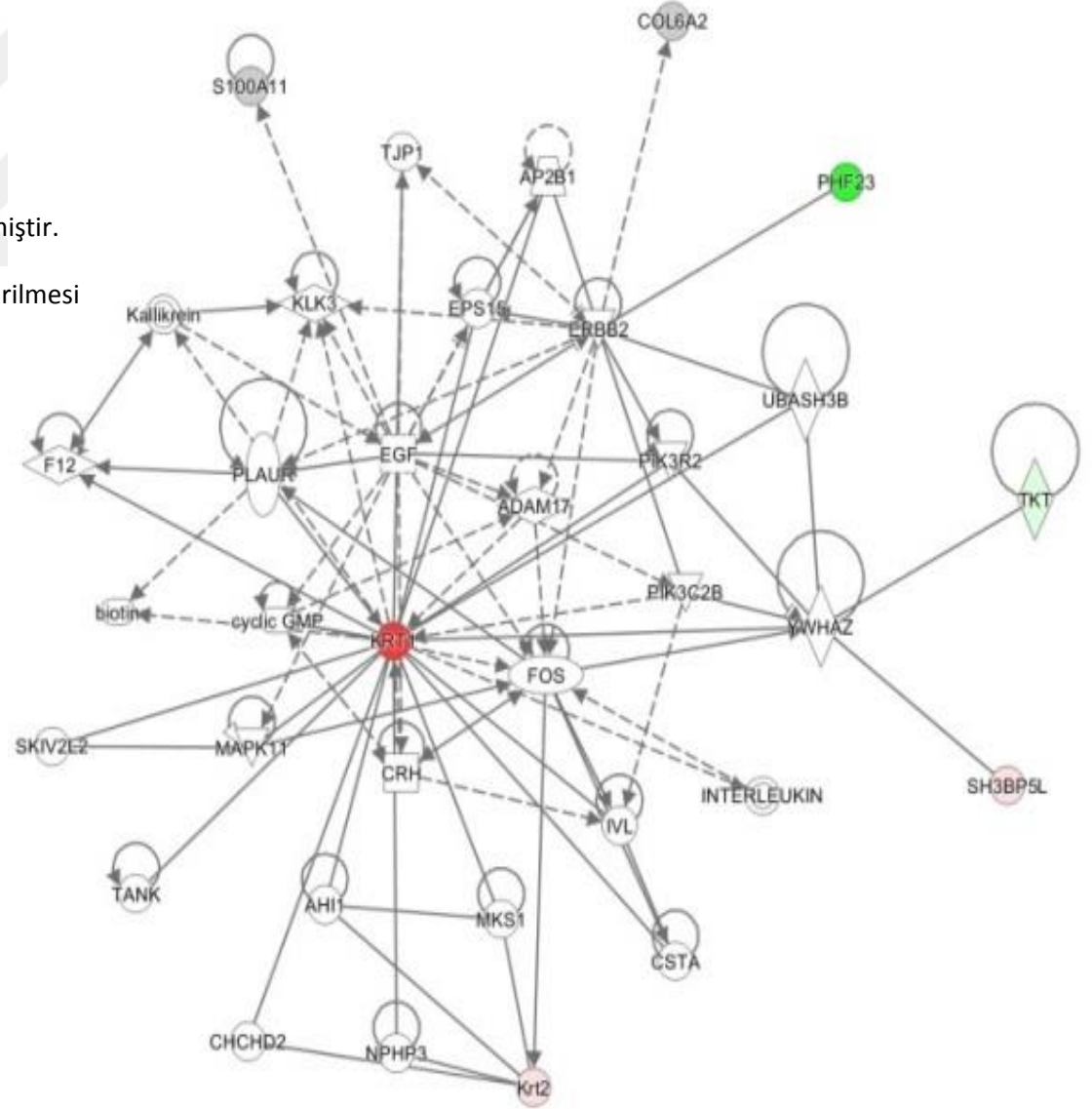
#### 11.4 Grupların İkili Karşılaştırmaları :

Kontrol grubuyla sağlam kornealar karşılaştırıldığında

proteinler arasındaki regülasyon değişimleri Tablo 14 'te gösterilmiştir.

Tablo14 : Alkali yanık (Kontrol) grubunun sağlama göre değerlendirilmesi

SSP	protein	G4/G3	G3/G4	
2210	SH3	0,09	11	up
2908	PHF	125,7	0,01	down
4715	Kollajen 6	0,5	2	up
5410	Keratin2,1	0	673	up
6210	S100-A11	0,2	5	UP
6416	Keratin2,2	0,2	5	up
8511	Transketolaz	3	0,2	down
9302	GA3PD	5	0,2	down



Şekil 17:Alkali yanık kontrol ile sağlam arası IPA sonuçları

Yapılan yolak analizinde yanık grubu ile sağlam grup karşılaştırıldığında regülasyon oranı en yüksek bulunan proteinin keratin tip 2 sitoskeletal 1 olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum alkali yanığın kornea epitel dokusunda ciddi hasar meydana getirdiğini göstermektedir. Buna ilaveten yapılan IPA yolak analizi, keratin yolağını regülasyonu değişen diğer proteinlerle de (GADPH hariç) ilişkilendirmiştir. Bu ilişki analizi alkali hasarın hücre içi hangi yolakları etkilediği hakkında bilgi vermektedir. Analizdeki diğer dikkat çeken protein ise yanık grubunda yüksek down regülasyonu görülen PHF finger proteindir. (Şekil 17)

Amnion zarı implantasyon grubuyla sağlam grup karşılaştırıldığında da keratin tip2 sitoskeletal 1 düzeylerinde kontrolden az bir upregülasyon ve PHF düzeylerinde kontrolden az bir down regülasyon mevcuttu. Fakat kontrol grubu karşılaştırılmasında elde edilen regülasyon oranları ile IPA analizi yapıldığında keratin tip2 sitoskeletal 2 nin metabolik yolakların merkezine konulduğu ve düzeylerinde down regülasyon görüldüğü gözlemlenmiştir.. Alkali maruziyetinin verdiği hasarın keratin tip2 sitoskeletal 1 miktarını arttırdığı ve PHF finger protein düzeylerini azalttığı düşünülürse amnion implantasyonu PHF deki bu azalmayı yavaşlatarak sağlama yaklaştırmış böylece yanık grubunda artan keratin düzeylerini de degradasyonu arttırarak azaltmıştır. PHF hücre içi ubikütinasyonu düzenleyen ve dolayısıyla protein degradasyonuna doğrudan etki eden bir proteindir. Bu sebeple keratin tip 2 sitoskeletal2 miktarının azalarak normale yaklaşması PHF nin overekspresye olmasıyla ilişkilendirilebilir. Bunu test etmenin en ideal yolu PHF overekspresye edilen hücre hatlarında keratin miktarındaki değişimin incelenmesidir.(Tablo15 ,Şekil 18)

Bu bulgular ışığında amnionun epitelyal keratin miktarını normale yaklaştırdığı ve iyileşme sürecine katkıda bulunduğu söylenebilir. Aynı zamanda amnion grubunda yanık grubundaki transketolaz ve GAPDH düzeylerindeki azalmanın kaybolduğu ve sağlam ile aralarında TKT veGADPH açısından fark olmadığı görülmüştür.

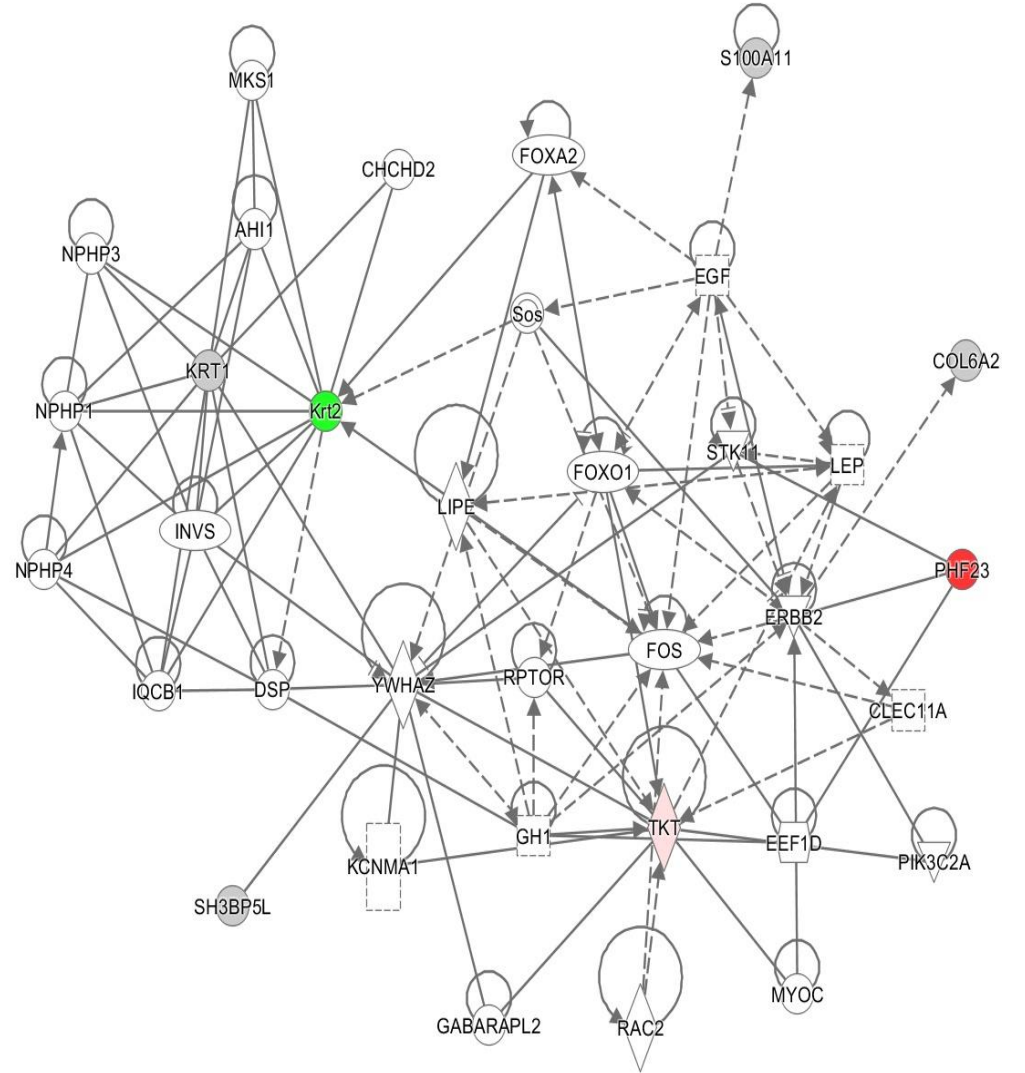
CXL grubundaki bulgular amnion grubuyla benzerlik göstermektedir. Farklı olarak keratin tip 2 sitoskeletal 2 düzeylerindeki düşüş iki kat daha fazladır. Transketolaz ve GAPDH düzeyleri amniondan daha fazla artarak normale ulaşmıştır.PHF düzeyleri amniondan az olmakla birlikte kontrol grubuna göre 13 kat up regülasyon göstermiştir.(Tablo 16, Şekil 19) CXL+Amnion grubundaki bulgular diğer gruplarla benzerken PHF protein düzeyleri sağlama en yakın bu grupta saptanmıştır.S100 protein düzeyleri en çok bu grupta upregüle

görülmektedir. Bu gruptaki en belirgin değişim GADPH düzeylerindeki belirgin up regülyasyondur.(Tablo 17, Şekil 20) Oysaki CXL+Amnion grubunu CXL grubuyla veya Amnion grubuyla karşılaştırırsak keratin metabolizmasındaki belirleyici rol ortadan kalkmakta ve kollajen ilişkili metabolik yollar sistemdeki değişimin merkezine oturmaktadır(Tablo 19-18) (Şekil 21-22) Saptanan proteinlerin gruplara göre sıklıkları Şekil 23 de gösterilmiştir. Tüm gruplardaki regülyasyon oranları bir bütün olarak incelendiğinde IPA pentoz fosfat yolağının alkali hasarından en çok etkilenen yolak olduğunu göstermiştir. (Şekil 24)



Tablo 15: Amnion grubunun kontrole ve sağlama göre değişimi

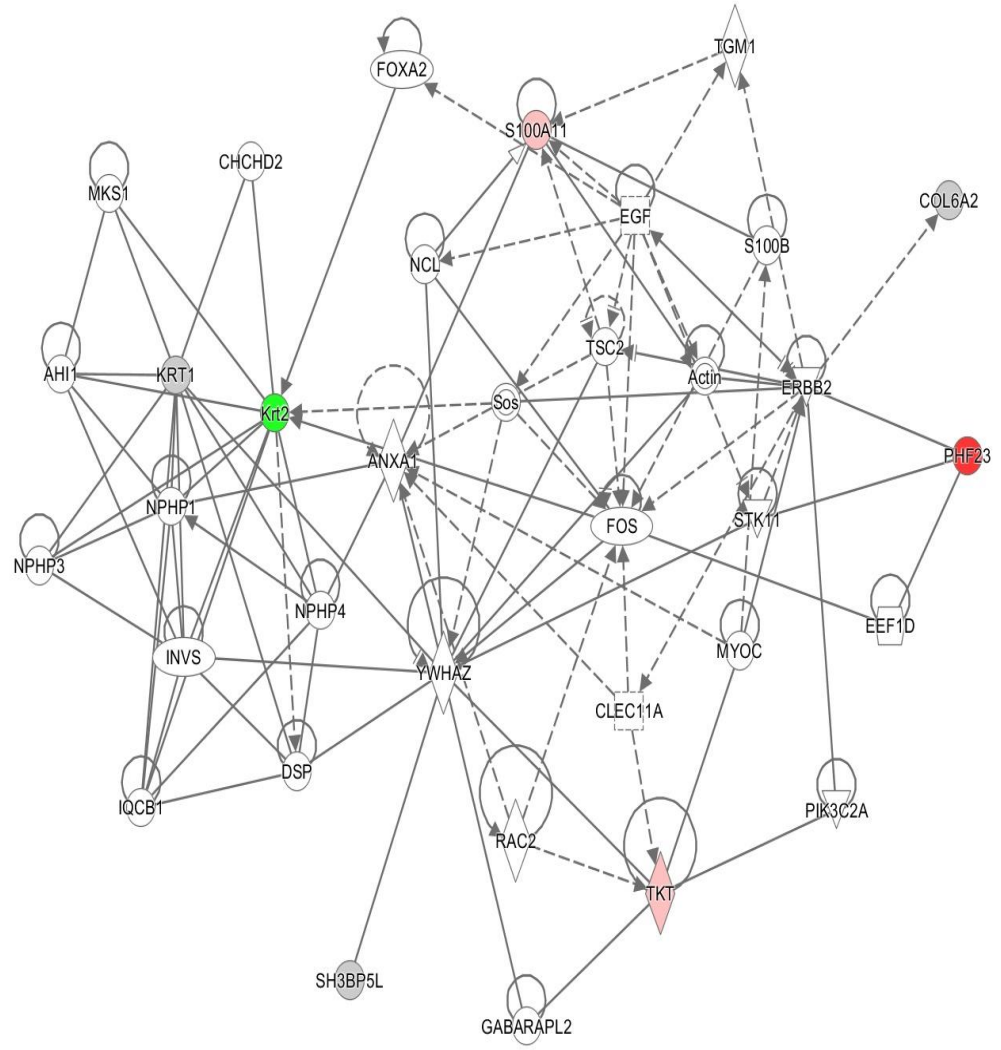
SSP	protein	G3/G5	G5/G3	G5/G4	G4/G5
2210	SH3	0,8	1,2	13up	0,0
2908	PHF	0,06	29up	0,2	4,2down
4715	Kollajen 6	0,7	1,2	2,4up	0,4
5410	Keratin2,1	1,2	0,7	524up	0,0
6210	S100-A11	1,0	0,9	5up	0,2
6416	Keratin2,2	123down	0,0	0,0	26down
8511	Transketolaz	0,3	3up	0,7	1,2
9302	GA3PD	0,5	1,7	0,3	2,7down



şekil 18: Amnion ile kontrol arası IPA sonuçları

Tablo 16: CXL grubunun kontrole göre değişimi

SSP	Protein	G1/G3	G3/G1	G1/G4	G4/G1
2210	SH3	0,7	1,3	8up	0,1
2908	PHF	13up	0,0	0,1	9,5
4715	Kollajen 6	1,1	0,8	2,1up	0,4
5410	Keratin2,1	1,4	0,7	948up	0,0
6210	S100-A11	3,3up	0,2	17up	0,0
6416	Keratin2,2	0,0	205down	0,0	43
8511	Transketolaz	4up	0,2	1,1	0,8
9302	GA3PD	5up	0,2	1,0	0,9

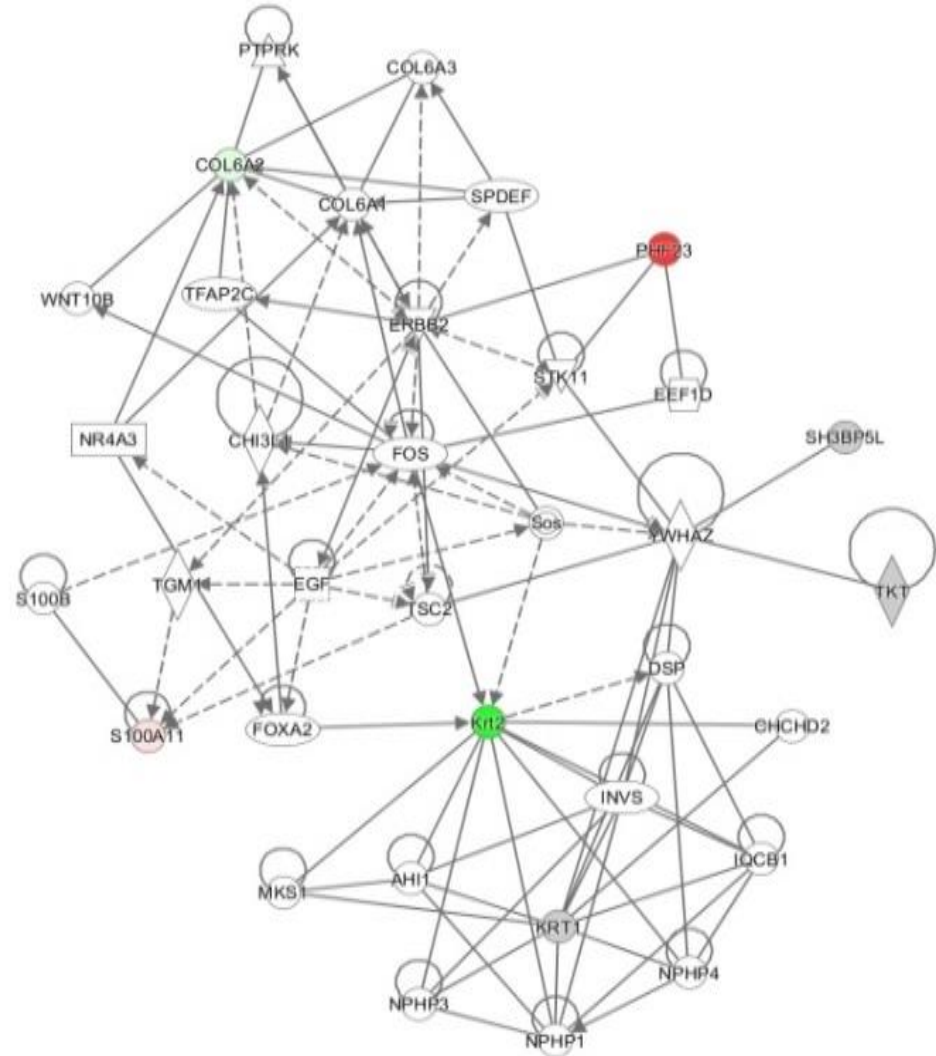


şekil 19 : CXL ile kontrol arası IPA sonuçları



Tablo 17: CXL+Amnion grubunun kontrol grubuna ve sağlam gruba göre değişimi

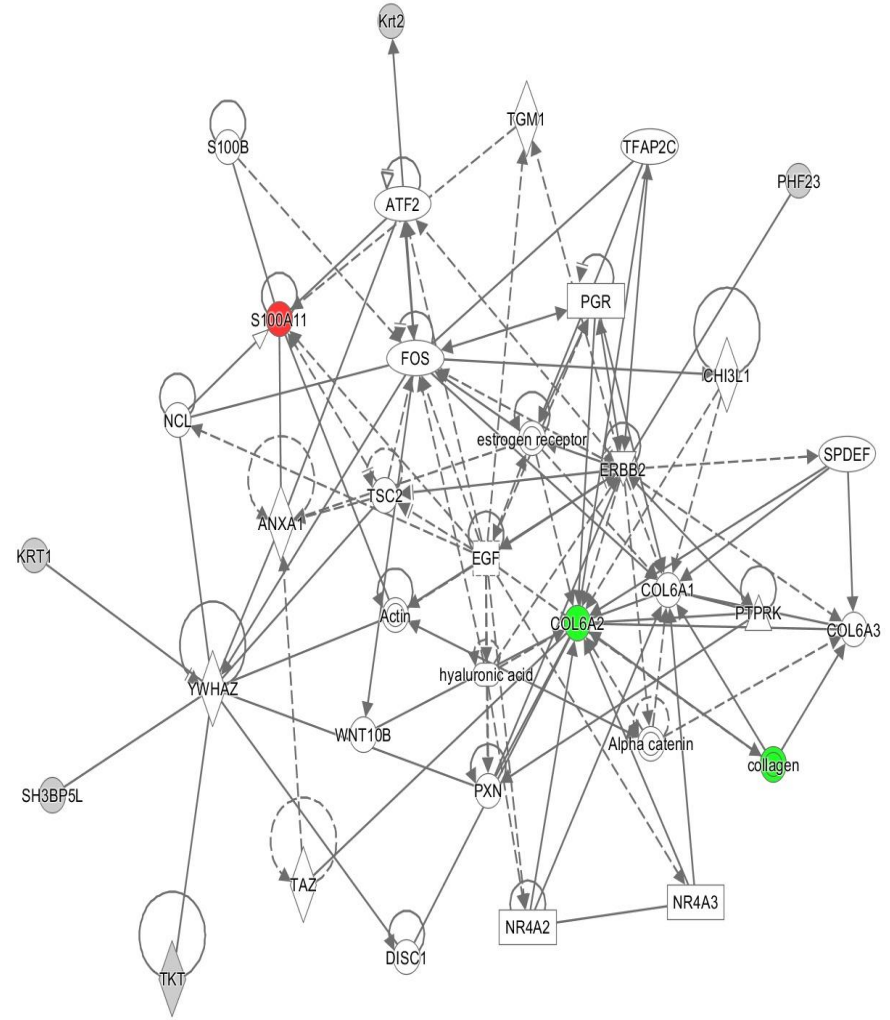
SSP	protein	G2/G3	G3/G2	G2/G4	G4/G2
2210	SH3	1,8	0,5	20up	0,04
2908	PHF	58	0,0	0,4	2,1down
4715	Kollajen 6	0,1	5,6	0,3	3 down
5410	Keratin2,1	1,4	0,6	971up	0,00
6210	S100-A11	5,6	0,1	28up	0,03
6416	Keratin2,2	0,0	89down	0,05	19down
8511	Transketolaz	1,6	0,6	0,4	2down
9302	GA3PD	733up	0,0	156up	0,006



Şekil 20: Amnion+ CXL ile kontrol arası IPA sonuçları

Tablo 18: CXL+Amnion grubunun amnion grubuna göre değişimi

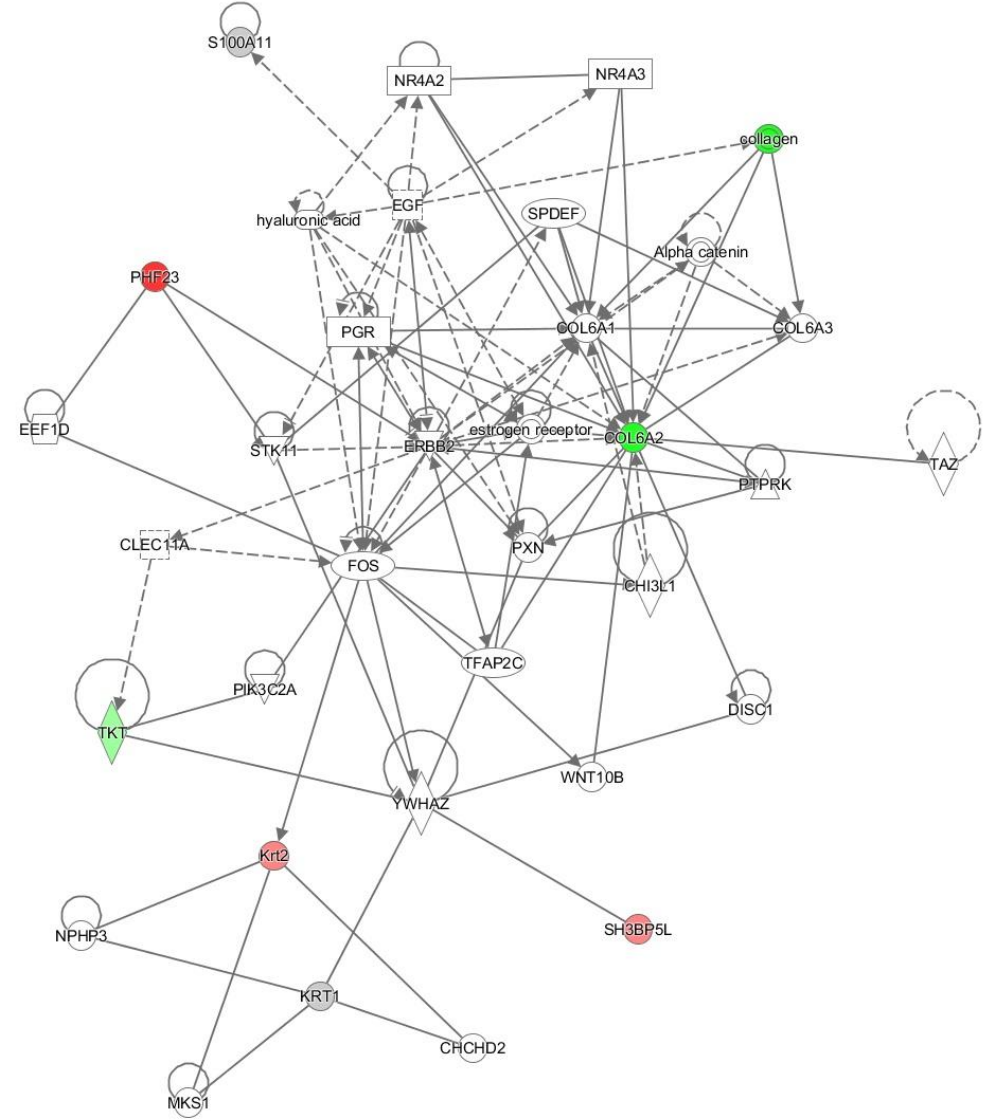
SSP	Protein	G2/G5	G5/G2	G2vsG5
2210	SH3	1,5	0,6	
2908	PHF	1,9	0,5	
4715	Kollajen 6	0,1	7,1	down
5410	Keratin2,1	1,8	0,5	
6210	S100-A11	6	0,1	up
6416	Keratin2,2	1,3	0,7	
8511	Transketolaz	0,6	1,6	
9302	GA3PD	426	0,00	up



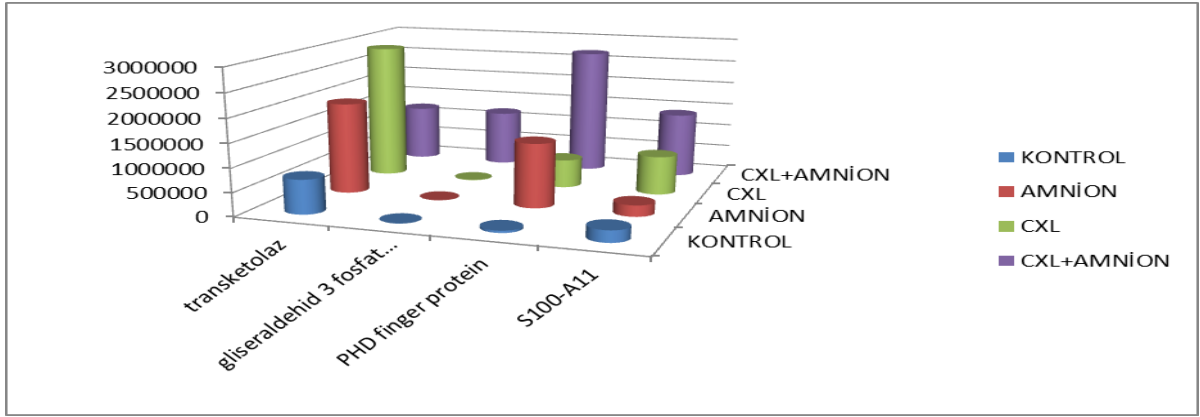
şekil 21: CXL+Amnion ile Amnion arası IPA sonuçları

Tablo 19 : CXL+Amnionun CXI grubuna göre değişimi

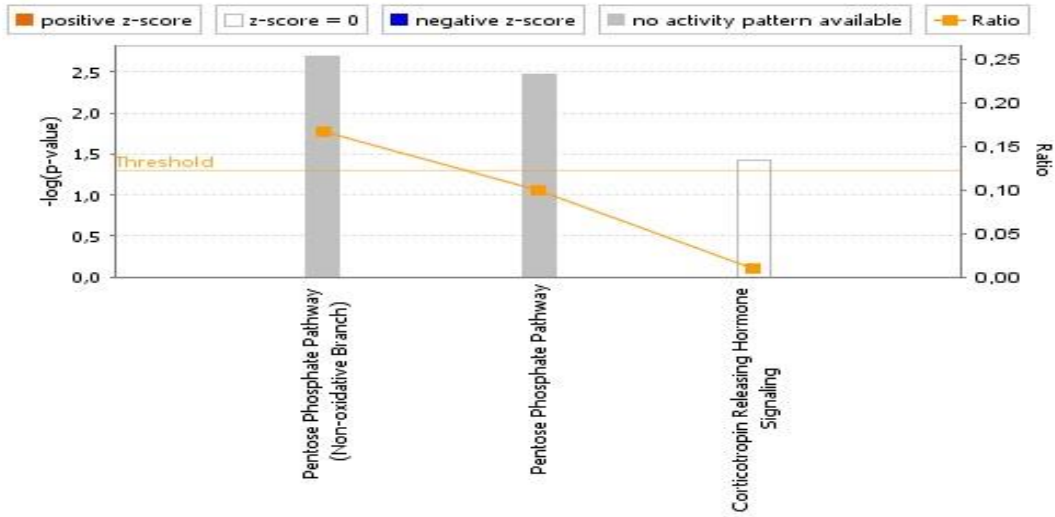
SSP	protein	G1/G2	G2/G1	G2vsG1
2210	SH3	0,3	2,5	up
2908	PHF	0,2	4,4	up
4715	Kollajen 6	6,4	0,1	down
5410	Keratin2,1	0,9	1,0	
6210	S100-A11	0,5	1,6	
6416	Keratin2,2	0,4	3	up
8511	Transketolaz	2,3	0,4	down
9302	GA3PD	0,00	153	up



şekil 22: Amnion+ CXL ile CXL arası IPA sonuçları



Şekil 23: Saptanan proteinlerin gruplara göre dağılımı



Şekil 24 : IPA sonucunda ulaşılan standart metabolik yollar

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama +/- standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25. persantil - 75. persantil), kategorik değişkenler ise frekans (yüzdeler) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Kruskal Wallis Testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey ve Dunn testleri kullanıldı. Tekrarlayan ölçümler arasındaki

farklılıklar normal dağılım gösteren değişkenler için Repeated Measure Anova ile, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Friedman iki yönlü varyans analizi ile incelendi.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi.

## **12 .TARTIŞMA KLİNİK VE HİSTOLOJİK BULGULAR**

Amnion zarı implantasyonunun alkali yanık sonrası akut dönemde epitelyal rejenerasyonu sağladığı(124-125), inflamasyonu azalttığı(126-127) ve buna sekonder neovaskülarizasyonu azalttığı, stromal incelmeyi engellediğini (125) gösteren bir çok çalışma vardır .( 128-129-130) Çalışmamızda da amnion zarı implantasyonu epitelyal rejenerasyonu kontrol grubuna kıyasla belirgin arttırmıştır fakat crosslinking grubundaki etki amniona görede fazla bulunmuştur. Birlikte uygulanan grupta da ek bir kazanca sebep olmamıştır. Histolojik epitelyal rejenerasyon skorlama sonuçlarına ve klinik muayene sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmış ve farkı oluşturanın CXL grubuyla kontrol grubu arasındaki değişim olduğu görülmüştür.

CXL tedavisinin inflamasyon ve matrix metalloproteinaz aktivitesini düşürdüğünü gösteren makaleler mevcuttur.(131-132) Biz de çalışmamızda CXL grubunda ülserasyonun gelişmemesi sonucu, CXL tedavisinin inflamasyonu ve matris metalloproteinaz aktivitesi üzerindeki etkisiyle gerçekleşmiş olabileceğini düşündük .Amnion ve CXL+ Amnion grubunda farklı vizitlerde değişen derecelerde ülserasyon geliştiği görüldü. Amnion implantasyonunun akut alkali yanıkta ileri evre (evre 4) yanığı olan hastalarda faydasız olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur.(133-134) Amnion zarının faydalı olması için ne zaman ve ne derecede uygulanması gerektiğini belirten bir çalışma da amnion zarı implantasyonunu akut evrede uygulamak yerine yanık ve cerrahi arasında bir süre bırakılması önerilmiştir. Bu hem cerraha elektif şartlarda daha iyi bir konjonktival cerrahi fırsatı tanıyacak hem de inflamasyonun kontrol altına alınmasına fırsat verecektir denilmektedir.(135) Bizde çalışmamızda multilayer(2 kat) onlay teknikle taze amnion zarı implantasyonu yöntemini akut evrede uyguladık. Çalışmamızın sonuçlarına göre amnion zarı implantasyonu yapılan gruplarda neovaskülarizasyonun kontrollere göre 2. ve 3. Vizitlerde fazla olduğunu ve sadece CXL yapılan grupla arasında istatistiksel anlamlı bir fark olduğu görüldü. Akut dönemde inflamasyon çok aktifken ve dokuda temizlenemeyen alkali ajanların penetrasyonu devam ederken amnion implantasyonu yapılmasının ve sütürasyonla da tetiklenecek ikinci

bir travmanın oluşturulmasının enflamasyonun şiddetini arttırarak aşırı neovaskülarizasyonu tetiklediği düşünöldü. Bu mekanizma kuru göz hastalarında kontak lens kullanımının inflamatuvar hücreleri potansiyalize edip inflamasyonu şiddetlendirmesi ve kuruluşu tetiklemeyle benzer mekanizmalardır. Daha önce yapılan çalışmalarda sütünasyonun inflamasyonu tetiklediği sütünsüz fibrin glue gibi diğer tekniklerle yapılan karşılaştırmalarda gösterilmiştir.(136-137-138) İnflamasyon, amnion grubunda şiddetlenip neovaskülarizasyonu tetiklemiş ve amniona ek olarak CXL uygulanan grupta CXL amnionun bu istenmeyen etkilerini azaltır bir etki göstermiştir. Bu bulgular çerçevesinde inflamasyonunda bir göstergesi olan vaskülarizasyonun CXL grubunda azalması CXL nin inflamasyonu azaltıcı etkisini göstermektedir.(132) Bulgularımız CXL 'nin inflamasyonu baskıladığı buna sekonder neovaskülarizasyonu azalttığı yönündedir. Bulgularımız CD68 pozitif hücrelerinin CXL grubunda anlamlı olarak düşük bulunmasıyla desteklenmektedir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde CXL nin erken dönemde epitelizasyonu hızlandırmasının, matrix metalloproteinaz aktivitesinin maksimuma çıktığı 3. haftalarda epitel sağlamlığının devam etmesine katkı sağladığı ve ülserasyon tablosunda da göröldüğü gibi ülserasyon mekanizmalarının iki ayağını durdurarak (1: defektif reepitelizasyon 2: inflamasyon) (123) ülserasyonu da azalttığı şeklinde yorumlanmıştır.

Muayene bulgularına göre vaskülarizasyonun 7. gün vizitinde başlamış olduğu, bu dönemde diğerlerinden fazla vaskülarizasyonu ilerlemiş olan deneklerde takip eden günler içerisinde korneal incelme (melting) olduğu görölmüştür. Artmış vaskülarizasyon oluşacak meltingin habercisi olmuştur. İlk hafta içinde epitel defekti küçölen deneklerde sonraki haftalarda vaskülarizasyonun ve ülserasyonun daha az olduğu görölmüştür.

Her bir grubun kendi içinde zamanla değişen SKK ölçümleri OCT ile değerlendirildiğinde yaralanma sonrası tüm tekrarlayan muayenelerde kalınlık artışı söz konusuydu. Bu değişim alkali yanık patofizyolojisi gereği zarar gören epitel sonrası alkali maddenin stromal glikozaminoglikanlara ulaşip onların hidrasyonuna sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Grupların kendi içlerindeki değişimlerine bakıldığında ilk SKK değerleriyle diğer tüm ölçümler arasında anlamlı bir farkla artış gösteren grup amnion grubuydu. CXL grubunda da sadece ilk SKK ile 3. haftaki SKK değerleri arasında anlamlı fark mevcuttu. Diğer gruplarda kendi içlerindeki artış istatistiksel anlamlı bir fark göstermiyordu. Amnion grubunun tüm

ölçümlerde korneal kalınlığı anlamlı olarak arttırması Kim ve arkadaşlarının çalışmalarıyla da uyumludur.(126)

Marcello ve arkadaşları çalışmalarında CXL ve kontrol grupları arasında opasite açısından 30. gün farklılık olduğunu bulmuşlar ve onlarda ilk 15 günlük değerlendirmelerinde anlamlı fark saptamamışlardır. (139) Bizim çalışmamızda opasite açısından fark bulunmamıştır. Bu bulgular bize tedavinin opasite üzerindeki etkisini daha çok 3.haftadan sonra göstermeye başlamış olabileceğini düşündürmektedir.

CXL LASIK sonrası gelişen ektazilerde (140), LASIK öncesi rutin profllaktik olarak (141), korneal ektazilerde (142)ve büllöz korneal ödemde(143) kullanımına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Çapraz bağlanmış korneaların daha sert(144-145), kollejen liflerin çaplarının daha geniş (146-147)ve doku geçirgenliğinin daha düşük (148)olduğu gösterilmiştir. CXL'nin korneal stromanın enzimatik erimeye olan direncini arttırdığı gösterilmiştir.(149-150) Alkali yanık sonrası inceleme ve inflamasyonu azalttığı da deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.(151-152) CXL'nin fibriller arası ve içi bağlar üzerindeki etkisi nedeniyle korneal sıvı geçişini ve stromal şişmeyi azaltıp dehidratasyonu sağladığı gösterilmiş ve büllöz korneal ödemde kullanımı önerilmiştir.(153-154-155-156). Endotelial yetmezliğe bağlı gelişen büllöz korneal ödem tablosunda azalmış stromal emme basıncı ve bundan dolayı azalmış transendotelial sıvı geçişine bağlı korneal kalınlıkta azalma olabileceği vurgulanmıştır.(157)Çalışmamızda reepitelizasyonu en erken sağlayan CXL grubu olmuştur. Ülserasyon en az bu grupta görülmüş ve inflamasyon ve ona sekonder gelişen neovaskülarizasyon yine en az CXL grubunda saptanmıştır.

Stromal hücre (keratosit) apoptozu göstergesi olan TUNEL pozitifliği, CXL grubunda anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Alkali yanığın keratosit apoptozunu artırdığı gösterilmiştir.(118)CXL tedavisinin oksijen radikalleri aracılığıyla keratosit apoptozunu arttırdığı yönünde yayınlar (158,159,160) vardır. CXL nin hücre canlılığına ve apoptoza etkisine bakılan bir çalışmada ise CXL 'nin apoptoza etkisi olmadığı da gösterilmiştir.(161) Bizim çalışmamızda yanık sonrası uygulanan tedavi grupları arasında stromal hücrelerdeki apoptozun CXL grubunda en az olduğu görülmüştür. Bu bulgu stromal erimenin CXL grubunda en az bulunmasıyla örtüşmektedir.

### 13. TARTIŞMA MALDİ TOF/TOF ANALİZİ

Epitel dokusu; epidermiste , korneada olduğu gibi örttükleri organizmalar ile dış çevre arasında bariyer etkisi görür. Keratinler epitel dokularının ana yapısal proteinleridir.(162) Tüm insan hücrelerinin sitoplazmaları 10nm intermediate ara flamanları içerirler. Epitelyal hücrelerde bu sitoskeleton çok çeşitli keratin varyasyonlarından oluşur. Arada oluşan bu sitoskeletal yapının temel görevlerinden biri travmalara karşı epitelyal bariyere iskelet etkisiyle koruyuculuk etmektir. Bilinen 26 tip 1(asidik) 28 tip 2(nötral ya da bazik) toplam 54 tanımlanmış memeli polipeptid keratini bulunmaktadır.(163) Mutasyonlar nedeniyle epitelin iskeletini oluşturan sitoskeletal dokuda zayıflama olursa epitel frajilitesi oluşmaktadır. Keratin bozukluklarında oral anogenital, mukozal lezyonlar , korneal lezyonlar tanımlanmıştır. Örneğin ; Meesman korneal distrofinde K3 mutasyonu gösterilmiştir , bu bir epitelyal distrofidir ve mikrokistik korneal epitelyal lezyonlarla karakterizedir. Farelerle yapılan bir çalışmada kulak, taban ve kuyruk derisinde bulunan bir tip 2 polipeptidi olan K2 nin eksikliğinin artmış frajilite, yükselmiş transepitelyal su kaybı ve lokal inflamasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir.(164) Keloid skarlarında artmış, psöriazis ve hiperkeratoziste azalmış K2 ekspresyonu gösterilmiştir.(165) Keraokonus ve normal kornealar üzerinde yapılan proteomiks analizinde , keratin type I sitoskeletal 14, tubulin beta chain, keratin tip I sitoskeletal 16 and protein S100-A4 epitelyal proteinlerinde artış saptanırken ; transketolaz ve piruvat kinazda ise azalma olduğu tespit edilmiştir. (166) Konjonktiva şalazis hastalarının göz yaşı örneklerinde protein analizinin MALDİ TOF yöntemiyle yapıldığı bir çalışmada 24 adet spot proteininin anlamlı olarak yükselmiş olduğu gösterilmiştir ( S100 ailesi,guanozin trifosfat -binding protein 2 ,l-laktat dehidrogenaz , yağ asidi binding protein , keratin tip I sitoskeletal 10 , glutatyon S-transferaz P , peroksiredoksin-1, peroksiredoksin-5 , gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz ). Çıkan proteinlerden bazıları inflamasyon ve oksidatif stres biyomarkerleridir: (S100A4, S100A8, and peroxiredoxin-5,) (167)

Alkali hasarın korneal epitelyal tabakayı yok etmesi sonrası oluşan yeni epitelyal hücreler aralarındaki epitelyal bağlantıları sağlamak amacıyla keratin tip 2 sitoskeletal 1 düzeylerini upregülasyona uğratmışlardır. Keratin tip 2 sitoskeletal 1 düzeylerinin en fazla artış gösterdiği grup sırasıyla Amnion+CXL , CXL, Kontrol ve Amnion grubudur. Keratin tip 2 sitoskeletal 2 düzeyleri ise bunun aksine tedavi gruplarında en yüksek olarak sırasıyla CXL,Amnion,CXL+Amnion gruplarıda down regüle olmuştur. Bu azalmanın PHF



düzeylerindeki kontrol grubundaki downregülasyonun tedaviyle gittikçe azalmasına ve buna sekonder artan PHF düzeylerinin protein degradasyonuna neden olarak keratin tip 2 sitoskeletal 2 düzeylerini azaltmasına bağlamaktayız. Bu sebeple keratin tip 2 sitoskeletal 2 miktarının azalarak normale yaklaşması PHF' nin overekspresse olmasıyla ilişkilendirilebilir. Bunu test etmenin en ideal yolu PHF overekspresse edilen hücre hatlarında keratin miktarındaki değişimin incelenmesi olmalıdır.

PHF finger protein otofajinin negatif düzenleyicisi olarak çalışır. Übikütinasyonu düzenler beslenme yetersizliği veya bakteriyel enfeksiyona yanıtta bir übikütin ligazı olan ve otofajiyi sağlayan E3 ün indirgenmesini sağlar . Otofajiyi engeller ve bunu übikütin üretimini arttırarak yapar geçmiş çalışmalarda da übikütinin transketolaz düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. (168)

Çalışmamızda alkali yanık uygulanıp kontrol alınan grupla sağlam kornealar alkali yanık etkisini saptamak için karşılaştırıldığında PHF finger protein düzeyleri alkali yanık grubunda azalmış olarak bulunmuştur. Tedavi gruplarının kontrolle karşılaştırmalarına göre ise PHF finger protein düzeyleri sırasıyla en yüksek CXL+Amnion grubu, Amnio grubu ve CXL grubunda saptanmıştır. PHF finger protein düzeylerinin yükselmesi ubiquitin aracılığıyla transketolaz düzeylerinin de yükselmesine katkı sağladığı ve korneal antioksidan mekanizmalara etki ettiği söylenebilir.

Korneal hücrelerin oksidatif mekanizması ve glikozu kullanım şekilleri birkaç farklı yoldan gerçekleşmektedir. Korneal epitel glikozunun büyük kısmını stromadan alır ve glikoz 6 fosfata dönüştürür ve bununda %85 i glikolitik yolda pirüvata çevrilir. Prüvatin büyük çoğunluğu laktik aside metabolize olurken bir kısmı da ATP üretim amacıyla sitrik asit siklusuna girer. Epitel tarafından glikozun geri kalan kısmı da pentoz fosfat yolunda serbest radikallerin kontrolü için önemli bir kaynak olan NADPH üretimi için kullanılır. Bu glutatyon ve askorbik asit gibi indirgeyici ajanların oluşmasını sağlayan ana metabolik yoldur. Pentoz fosfat yolağında görevli NADPH üretimine katkı sağlayarak antioksidan yolların işlemlerini sağlayan etkisi gösterilmiş önemli enzimlerden biri ise transketolazdır. UV ışınlarını emen, oksidatif radikaller oluşturan korneayı oksidatif hasara karşı korur. Korneanın ışıkla maruziyeti sonrası başlayan matürasyon süresinde yükseldiği ve korneada yoğun bulunan bir enzim olduğu gösterilmiştir.( 169)

Keratosit metabolizması stromal içerikler için gerekli enerjiyi üretmekle görevlidir. Bu hücreler yüksek metabolik aktiviteye sahip değildir ve yüksek stromal laktat üretimi gerçekleşir ve endotele sıvı transportuna katkıda bulunur. Endotel ATP az bağımlı enerji mekanizmasını sürdürmek için yüksek enerji üretimine sahiptir ve epitelden 5 kat daha fazla aktiftir. Endoteldeki majör metabolik yolak anaerobik glikolizdir ve bu da sitrik sit siklusu ve pentoz fosfat yoluyla olur. Kornea epitel hücreleri yüksek konsantrasyonda metabolik enzim biriktirirler. Bunların %30-40'ını aldehid dehidrogenaz oluşturur bu hem metabolik hem yapısal rol oynar. Diğer tanımlanmış enzimler, kristalin proteinler enolaz, glutatyon s transferaz ve peptidil prolin cis-trans-isomerazdır. İnsan ve fare korneasında 65–68-kDa suda çözünen kimliği belirsiz bir protein tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda bunun transketolaz olduğu bulunmuştur.(170)

Transketolaz, korneal epitelde ekspresse olan bir kristalin proteindir, nonoksidatif pentoz fosfat yolunda bir enzim olarak görev alır. Pentoz fosfat yolu, pentoz ve NADPH formunda indirgeyiciler üretir. Transketolaz ketol gruplarını aldehid alıcı molekülüne transfer eder, optimal enzimatik aktivite için Mg ve tiamin pirofosfat gerekmektedir. (171) Tiamin durumunu belirlemede kullanılır. TKT nin kimyasal, fiziksel ve kinetik özelliklerindeki değişimler Wernike-Korsakof Sendromu, Alzheimer hastalığı, fibromiyalji, ileri malnütrisyon ve alkolizm gibi birçok hastalıkta vurgulanmıştır.

Çalışmalarda korneal matürasyon sürecinde göz kapaklarının açık kaldığı ışığa maruziyetin olduğu sürenin artmasının transketolaz gen ekspresyonunun up regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.(172) Şeffaf korneal dokularda sklera veya skarlı şeffaf olmayan kornea dokularıyla karşılaştırıldığında suda çözünür iki protein olan transketolaz(TKT) ve aldehid dehidrogenaz1(ALDH1) düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir, bu sonuçlarla transketolazın korneal transparansta etkili bir kristalin protein olduğu vurgulanmıştır. Normal tavşan korneasındaki ALDH1 ve TKT düzeylerinin yüksek olduğu bununda keratosit sitoplazmasında homojenlikle birlikte refraktif indeksi minimize ederek korneal transparansı sağladığı düşünülmüştür. Bunun şeffaf lens kristalinleriyle aynı mekanizma ile transparans oluşturduğu bildirilmiştir.(173,174,175) Şişmeyle birlikte oluşan korneal opasifikasyon keratinositlerden ışık saçılmasıyla ilişkili bulunmuştur. Yükselmiş interfibriller kollajenler, kollajen lameller ve kerotositler arası boşluklar ve formasyon değişimi bu

saçılmanın sebebidir.(176) Yara iyileşmesi sürecinde göç eden keratositler ve miyofibroblastlar nedeniyle olan artmış ışığı geri yansıma kornea normal hidrasyon ve kalınlığını kazandığında bile persiste etmektedir. (177) . Çünkü göç eden keratositlerin ALDH1 ve TKT düzeylerinin normale ulaşması zaman alır. (173) Bir çalışmada korneal opasiteden sorumlu olan transketolazın korneal yaralanma sonrası azaldığı ve korneanın oksidatif strese daha açık hale gelmesi nedeniyle ubiquitin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Transketolaz düzeylerinin ubiquitin ile düzenlendiği düşünülmektedir.(178) Transketolaz korneal epitelde lokalizasyonu ve yüksek aktivitesi gösterilmiş bir proteindir. Pentoz fosfat yolunda görev alıp antioksidan mekanizmalarda görevli NADPH üretimine katkı sağladığı korneal enerji metabolizmasında, antioksidan mekanizmadaki görevi sayesinde korneal transparansa büyük etkisi olduğu gösterilmiştir.(167)

Çalışmamızda yapılan IPA analizi Pentoz fosfat yolağını işaret etmektedir. Bu hücre içi indirgenme gücünün kaynağı olan NADPH üretimi amaçlı aktive edilen bir yoldur. Bu yolak sayesinde üretilen NADPH anabolik reaksiyonlarda kullanılarak yeni moleküller sentezlenmesine neden olmaktadır. Alkali yanığın korneada oluşturduğu hasarın tamiri için yeni yapıtaşlarının anabolik reaksiyonlar aracılığı ile sentezlenmesi gerekmekte dolayısıyla pentoz fosfat yolağının regülasyonu ortaya çıkmaktadır. Alkali yanık modeli uygulanmış korneaların sağlam kornealarla karşılaştırılmasında transketolaz düzeylerinin alkali yanık sonrası azaldığı tedavi grupları karşılaştırıldığında ise en çok CXL grubunda artış gösterdiği, daha sonra amnion grununda yüksek olduğu ve ikisinin birlikte kullanıldığı grupta ise kontrolden yüksek olsa da tek tek uygulanmalarına nazaran düzeylerin azaldığı gösterilmiştir. CXL tedavisinin korneal transketolaz düzeylerini arttırarak pentoz fosfat yolağının sekteye uğramış aktivitesini tekrar sağlaması korneanın oksidatif strese karşı direncini arttıracak ve korneal transparansın tekrar oluşmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Daha önceki çalışmalarda da CXL nin alkali yanık sonrası 30. gün korneal opasite düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir.(152)

Doku ve organların ekstrasellüler matrixlerindeki kollajen fibriller tarafından oluşturulan üç boyutlu yapılar interfibriller matrix komponentleriyle birlikte olan moleküler etkileşimlere bağlıdır. İnterfibriler makromoleküller fibril yüzeylerine bağlanır ve fibrillerin yapısal organizasyonuna spesifite kazandırır. Bu interfibriler komponentin ana bileşenlerinden biri de kollajen 6 dir. Bunlar kollajenler arası uygun boşlukları sağlayarak korneal transparansı

sağlarlar. Normal korneal stromal gelişim ve yara iyileşmesi sürecinde ilk 2 hafta içinde bu proteini kodlayan mRNA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir.(179)

Çalışmamızda alkali yanık uygulanan kontrol grubunda sağlam kornelara göre kollajenler arasındaki düzenli dizilimin bozulmasından ötürü korneal transparans bozulmuştur. Bunlara da artan anormal interfibriler yapılarında sebep olduğunu buna bağlı olarak kollajen 6 düzeylerinin arttığını düşünmekteyiz. Tedavi gruplarında kollajen alfa 6 düzeyleri amnion ve CXL grubunda up regüle iken birlikte uygulandıkları CXL+Amnion grubunda tüm gruplara göre down regüle oldukları görülmüştür.

Protein S100 Ca ile aktifleşen bir sinyal proteindir ve diğer proteinleri hücre migrasyonu,proliferasyon ve diferansiyasyon, stres cevabı, yara iyileşmesi, inflamasyon,gecikmiş immünite , gibi biyolojik fonksiyonları düzenlemek üzere aktifler.(180-181) Ailenin 13 üyesi, kromozom 1q21 üzerinde bulunan epidermal farklılaşma kompleksi olarak kümelendir. Bu bölge özel bir ilgi konusudur çünkü bu bölgeden kodlanan genler involucrin, filagrin, repetin , trichohyalin gibi epidermal keratinositlerde ayrıca da oküler yüzey üzerinde eksprese olurlar. (182-183-184)

S100 proteinlerinin membran remodeling sürecini kolaylaştırdığı ve S100A11 ve membran lipitleriyle etkileşerek membranın farklı segmentlerine katıldığı veya membran yüzeyine kıvrıldığı bilinmektedir . Ayrıca S100A11 kornifiye kılıfın çapraz bağlı bir komponentidir ve bu yapı membranla ilişkili komponentleri birleştirir.(185-186) İnflamatuvar ve noninflamatuvar bazı durumlarda oküler yüzeyde bu proteinlerin bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin S100 A2 ,A4 keratokonuslu epitellerde S100 A4,A6,A8,A9,A13 ün ise korneal neovaskülarizasyon modellerinde artmış olduğu gösterilmiştir. (187-188) Pterjiumlu ve normal korneaların karşılaştırıldığı bir çalışmada S100A4, S100A6, S100A8, S100A9 ve S100A11 arasında fark bulunmamıştır.(189) Oluşturulan neovaskülarizasyon modelinde nötrofil ve makrofajların sağladığı S100A8 ve A9' un anlamlı olarak yüksek bulunduğu gösterilmiştir. (190-191) Rejenere olan kornealarda S100 beta ve A4 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. (192-193)

Çalışmamızda alkali yanık modelinin oluşmasıyla S100A11 düzeylerinin arttığı sağlam grupla karşılaştırılarak gösterilmiş. Membran remodelingine katkı sağlayan bu proteinlerin yanık oluşumunu takiben epitelyal ve stromal iyileşmeyi sağlamak amacıyla arttığı düşünülmüştür. CXL grubunda S100 A11 düzeylerinde up regülasyon olduğu bunun

CXL+Amnion grubunda da gözlemlendiği görülmüştür. Amnion grubunda kontrole kıyasla bu artışa ek katkı sağlamadığı görülmüştür .

GAPDH glikolizin ilk basamağını katalizleyen anahtar bir enzimdir. Hücre iskeletinin organizasyonunu modüle eder. Membran ilişkisini kolaylaştırır. Membran füzyonunda görevli olduğu ve epitelyal hücrelerin kollajene olan adherensini sağladığı bilinmektedir. Ayrıca transkripsiyon, RNA taşımacılığı, DNA replikasyonu ve apoptoz dahil nükleer etkinliklerde yer almaktadır. GAPDH ın membran füzyonu aşamalarında görev aldığı gösterilmiştir.(194) Klimatik keratopatilerde GAPDH düzeylerinin arttığı proteomiks çalışmalarında gösterilmiştir.(195)

Çalışmamızda alkali yanık oluşturulan kontrol grubunda sağlam kornealara göre yanık kornealarda GAPDH düzeylerinin downregüle olduğu amnion grubunda tekrar sağlama benzer düzeye geldiği, CXL grubunda ise daha belirgin bir upregülasyon olduğu, CXL+Amnion grubunda ise tüm gruplara nazaran çok yüksek oranda bir upregülasyon olduğu görülmüştür. Bu tablo histolojik olarak gösterilmiş CXL+Amnion grubundaki düzenli dizilimin ve epitelin stromaya sağlam füzyonunun olduğu bulgularını desteklemektedir.

## 14. SONUÇLAR

Çalışmamız verileri, CXL tedavisinin akut alkali yanık tedavisinde epitelyal rejenerasyonun sağlanması, stromal erimenin azaltılıp perforasyonun engellenmesi ve inflamasyonun azaltılarak vaskülarizasyonun kontrol altında tutulmasında etkili olduğunu göstermektedir. Akut dönemde amnion tedavisine alternatif bir tedavi olabileceği düşünülmektedir

Amnion implantasyonunun inflamasyonu şiddetlendirmesinin ; alkali ajanla temastan çok kısa bir süre sonra uygulanmış olmasına ve sütürasyonun oluşturduğu ek travmaya bağlı tetiklenme olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Amnion zarı implantasyonunun akut dönemde uygulanmayıp ilk 7 günlük süreçteki akut inflamasyonun baskılanmasından sonra uygulanmasının daha doğru olacağını , böylece kombine tedaviden alınacak yanıtların daha da iyi olacağını düşünmekteyiz. Bu kombinasyonun etkisini gösterebilecek ileri çalışmalara ihtiyaç olmakla birlikte bulgular faydalı olabileceğini desteklemektedir.

Çalışmamızın MALDI/TOF-TOF analizi sonuçlarına ve IPA analizine göre, alkali kornea hasarında korneal pentoz fosfat yolağında bozulma olduğu gösterilmiştir. MALDI/TOF-TOF analizleri sonucuna göre alkali yanık kontrol grubunda düzeyleri azalan PHF ,Transketolaz ve GAPDH proteinleri ve düzeyleri artan SH3 domain,S100A11 ve keratin tip 2 sitoskeletal 1 ve kollajen 6 proteinlerinin tedavilerle regülasyon oranlarının değiştiği görüldü. Amnion implantasyonunun en belirgin bulgusu PHF ve transketolaz düzeylerindeki yükselme ve keratin tip2 sitoskeletal 2 düzeylerindeki azalmaydı. CXL grubunda ise en önemli değişim PHF ve Transkeolazdaki amniona benzer yükselmeye birlikte amniondan farklı olarak GAPDH , S100 A11 düzeylerindeki artışı. CXL+Amnion grubunda tedavilerin ayrı ayrı toplamlarına yakın bulgular mevcuttu. PHF düzeyinde 53 katlık bir upregülasyon dikkat çekiciydi. GAPDH , S100 A11 ve transketolaz düzeylerinde artış mevcutu. Bu kombine tedavinin optimum şartlarda uygulanmasının sonuçlar üzerine daha iyi etki edebileceği kanaatindeyiz.

## 15. ÖZET

### DENEYSEL ALKALİ YANIK MODELİNDE AMNİON ZARI İMPLANTASYONU VE KOLLAJEN CROSSLİNKİNG İŞLEMİNİN İNFLAMASYON, NEOVASKÜLARİZASYON VE ÜLSERASYON MEKANİZMALARINI ÜZERİNE ETKİSİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

**Amaç ve Kapsam:** Alkali yanık tedavisinde stromal erime, inflamasyon ve neovaskülarizasyonu engellemek amacıyla akut dönemde uygulanabilecek yeni bir tedavi önerisi olarak CXL tedavisinin etkisinin amnion zarı implantasyonu ile klinik ve histolojik olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda , alkali yanığın hücre içi mekanizalarını protein analizi ile tanımlamak ve uyguladığımız tedavilerin bu mekanizmalara etkisini aydınlatmak amacıyla proteomiks analizi yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem :** 32 adet Avustralya-Yeni Zelanda Irkı erkek tavşanın sağ göz santral kornealarına 1N NaOH emdirilmiş 8mm çaplı Watman filtre kağıtları uygulanarak alkali yanık modeli oluşturuldu. Model ardından denekler Kontrol grubu, Amnion implantasyon grubu ,Crosslinking grubu ve Amnion +Crosslinking grubu olarak sekizerli dört gruba ayrıldı. Tüm deneklerin 7. gün,14.gün ve 18. gün epitelyal iyileşme , opasifikasyon , ülserasyon ve neovaskülarizasyon değerlendirilmesi amacıyla ön segment optik koherans tomografi ve ön segment kornea fotoğrafları çekildi. 21. Gün denekler sakrifiye edilerek korneaları limbus sınırından alındı. Santralden iki parçaya bölünerek yarısı histolojik ve immünohistokimyasal amaçla incelenmek üzere histoloji laboratuvarına ve diğer yarısı proteomiks yapılması amacıyla proteomiks laboratuvarına verildi.

**Bulgular:** Epitelyal iyileşme açısından tedavi gruplarında son vizitte en iyi sonuç CXL grubunda alınmıştır.(p=0.013) Stromal ödem ve neovaskülarizasyon açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir.(p= 0.183,0.053)Opasite açısından da gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir. (p=0.303) Ülserasyon değerlendirmesinde CXL grubunda hiçbir denekte ülserasyon saptanmamıştır. İnflamasyon açısından makrofaj markeri olan CD68 immünohistokimyasal değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık olduğu görülmüştür. (p= 0.001). Gruplar arasındaki istatistiksel farkı oluşturan CXL grubu ile kontrol grubu arasında (p= 0.001) ve CXL+Amnion ile kontrol grubu arasındaki farktır.(p=0.039) Stromal apoptozun göstergesi olan TUNEL pozitif

hücre sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttur( $p= 0.020$ ).Farkı yaratan ise CXL grubu ile kontrol grubu arasındaki değişimlerdir ( $p= 0.044$ ).

Yapılan MALDI /TOF-TOF analizi sonuçlarına ve IPA analizine göre alkali kornea hasarında korneal pentoz fosfat yolağında bozulma olduğu gösterilmiştir. Yanık sonrası keratin tip 2 sitoskeletal 1 düzeylerinde ciddi bir up regülasyon ve PHF finger protein düzeylerinde ciddi bir down regülasyon görülmüştür. Amnion implantasyonunun en belirgin bulgusu PHF ve transketolaz düzeylerindeki yükselme ve keratin tip2 sitoskeletal 2 düzeylerindeki azalma olduğu görülmüştür. CXL grubunda en önemli değişim ise PHF ve Transketolaz düzeylerindeki amniona benzer yükselmeye birlikte amniondan farklı olarak GAPDH , S100 A11 düzeylerindeki artıştır. CXL+Amnion grubunda tedavilerin ayrı ayrı toplamlarına yakın bulgular mevcuttur. PHF düzeyinde 53 katlık bir upregülasyon dikkat çekicidir. GAPDH , S100 A11 ve transketolaz düzeylerinde de artış mevcuttur.

**Sonuç:** CXL tedavisi alkali yanık tedavisinde akut dönemde kullanımı reepitelizasyon, inflamasyonun azaltılması ve ülserasyonun engellenmesi açısından umut vadetmektedir. Amnion zarı implantasyonu tedavisinin ise akut dönem yerine inflamasyon baskılandıktan sonra uygulanmasının daha efektif etkili olacağı düşünülmüştür. Amnion implantasyonunun optimum zamanlaması konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 16.ABSTRACT

### **THE COMPARISON OF AMNIOTIC MEMBRAN IMPLANTATION AND COLLAGEN CROSSLINKING TREATMENT'S EFFECT ON INFLAMMATION, NEOVASCULARIZATION AND ULCERATION MECHANISMS WITH EXPERIMENTAL MODEL OF ALKALI BURN**

**PURPOSE:** We aimed to show the effect of CXL treatment on inflammation, neovascularization and ulceration mechanisms related the acute alkali burn and to comparison with amniotic membran implantation. And also we aimed to show the effect of alkali burn and treatments on intracellular mechanisms .

**METHOD :** The right corneas of twenty two New Zealand rabbits were burned using a 8mm Wathman filter paper with 1N solution of NaOH and the animals were then divided into four groups: Control group submitted to clinical treatment alone, an amnion implantation group that was treated 1 h after injury with amniotic membran implantation , a crosslinking group that was treated 1 h after injury with CXL and an amnion implantation +CXL group that was treated 1 h after injury with CXL and amniotic membran implantation respectively. All groups were followed by the same clinical treatment as administered to the controls. Clinical parameters were evaluated post-injury at 1, 7, 14, and 18 days by two independent observers. Following this evaluation, the corneas were excised in 21. days and examined histologically and proteomic analyses.

**RESULTS:** The best results in terms of epithelial healing were in the CXL group.( $p=0.013$ ). There were no statistically significant differences in stromal edema, opacity and neovascularization, respectively ( $p=0.183,0.303,0.053$ ). In evaluation of ulceration in the CXL group there was no ulcerated cornea. In the evaluation of inflammation, a macrophage marker (CD68) were used and were found to be statistically significant differences. ( $P = 0.001$ ). Difference between CXL group and the control group ( $p = 0.001$ ) and the difference between the CXL + Amniotic with the control group ( $p = 0.039$ ) were responsible from statistical difference between groups.Terms of the number of stromal TUNEL-positive cells which are indicators of apoptosis has a statistically significant difference ( $p = 0.020$ ), Difference between CXL group and the control group ( $p=0.044$ ) was responsible from statistically difference

MALDI-TOF/TOF and IPA analyses had shown degradation in corneal pentose phosphate pathway. Up regulation of keratin type 2 cytoskeletal 1 and down regulation of PHF finger protein were realized after injury. The most obvious contribution of amnion implantation was increase of the levels of transketolase and PHF finger protein and decrease of the levels of keratin type2 cytoskeletal 2 when it was compared with control group. The most significant change in the CXL group were increase of the levels of transketolase and PHF finger protein like amnion implantation group and decrease of the levels of GAPDH , S100 A11 unlike amnion implantation grup when it was compared with control group. Amnion+ CXL group had the highest increase in the level of PHF and this group had increased levels of GAPDH , S100 11 and transketolase when it was compared with control group.

**CONCLUSION:** CXL treatment seems useful for reepithelialization, reducing inflammation and preventing ulceration in acute alkali burn treatment. The implantation of amniotic membrane treatment is thought to be more effective implementation after supressing of acute inflammation. There is need for further studies on the optimal timing of the implantation of amniotic membrane.

## **17. KAYNAKLAR**

- 1.** De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes .Arch Ophtalmol 1940;23:522-525.
- 2.** Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for presistent epithelial defects with ulceration. Am J Ophtalmol.1997;123:303-312
- 3.** Kruse FE, Rohrschneider K,Volcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. Ophtalmology 1999;106:1504-1511.
- 4.** Budenz DL; Barton K, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. Am j Ophtalmol. 2000; 130: 580-588.
- 5.** Prabhasawat P,Barton K,BurkettG, et al. Comparison of conjunctival autografts ,amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision.Ophtalmology 1997;104:947-985 46
- 6.** Tseng SCG, prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. Am J Ophtalmol 1997;124:765 -774.
- 7.** Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat p, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. Arch Ophtalmol .1999;117:1291-1297.
- 8.** Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. Ophtalmology 1997;104:2068-2076.
- 9.** Meller D,Pİres RT, Mack RJS, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical and thermal burns. Ophtalmolgy 2000;107:980-990.
- 10.** Ucakhan OO, Koklu G;Fırat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injures .Cornea 2002;21:169-172.

- 11.** Tseng SCG, Pabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal autografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:431-441.
- 12.** Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Eng J Med*. 2000;343:86-93
- 13.** McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, Kidder GW, Lundquist RR, Bradshaw HE, et al. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):129-38.
- 14.** Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 2007;26(4):385-9.
- 15.** Kolli S, Aslanides IM. Safety and efficacy of collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Expert Opin Drug Saf*. 2010;9(6):949-57.
- 16.** Schnitzler E, Spörl E, Seiler T. Irradiation of cornea with ultraviolet light and riboflavin administration as a new treatment for erosive corneal processes, preliminary results in four patients. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2000;217(3):190-3.
- 17.** Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. 2004;29(1):35-40
- 18.** M. D. Wagoner, "Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy," *Survey of Ophthalmology*, vol. 41, no. 4, pp. 275–313, 1997.
- 19.** R. R. Pfister, "The effects of chemical injury on the ocular surface," *Ophthalmology*, vol. 90, no. 6, pp. 601–609, 1983.
- 20.** N. F. Schrage, S. Langefeld, J. Zschocke, R. Kuckelkorn, C. Redbrake, and M. Reim, "Eye burns: an emergency and continuing problem," *Burns*, vol. 26, no. 8, pp. 689–699, 2000.

- 21.** Arffa, R. C. (1997): Grayson's Diseases of the Cornea. 4. cd. Mosby. St. Louis. 690-707.
- 22.** Christmas, R., (1991): Management of chemical burns of the canine cornea. *Can. Vet. J.* 32: 608– 612.
- 23.** Kaufman, H. E., Barron, B. A., Mcdonalt, M. B. (1998): *The Cornea*. 2.ed. Butterworth-Heine - mann, Boston, 642- 671.
- 24.** Micheal, D. W. (1997): Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and the- rapy. *Survey of Ophthalmology*, 41: 275-307.
- 25.** R. R. Pfister, J. L. Haddox, and C. I. Sommers, "Alkali-degraded cornea generates a low molecular weight chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 34, no. 7, pp. 2297–2304, 1993
- 26.** P. Singh, M. Tyagi, Y. Kumar et al., "Ocular chemical injuries and their management," *Oman Journal of Ophthalmology*, vol. 6, no. 2, pp. 83–86, 2013.
- 27.** J. P. McCulley, "Chemical injuries," in *The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice*, G. Smolin and R. Thoft, Eds., Little Brown and Company, Boston, Mass, USA, 1987.
- 28.** J. A. Seedor, H. D. Perry, T. F. McNamara, L. M. Golub, D. F. Buxton, and D. S. Guthrie, "Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits," *Archives of Ophthalmology*, vol. 105, no. 2, pp. 268–271, 1987.
- 29.** S. I. Brown, S. Akiya, and C. A. Weller, "Prevention of the ulcers of the alkali-burned cornea. Preliminary studies with collagenase inhibitors," *Archives of Ophthalmology*, vol. 82, no. 1, pp. 95–97, 1969.

- 30.** Micheal, D. W. (1997): Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology*, 41: 275-307.
- 31.** Seedor, J. A., Perry hd., McNamara, T. F., Golup, L. M., Buxton, D. F., Guthrie, D. S. (1987): Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits. *Arch. Ophthalmol.* 105: 268-271.
- 32.** Miller, W. W. (1996): Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs. *Veterinary Medicine*. 91: 916-922.
- 33.** Redding, W. R., Booth, L. C, Pool, R. R. (1999): The effects of polysulphated glycosaminoglycan on the healing of collagenase induced tendinitis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 12: 48-55.
- 34.** Barragry, T. M. (1994): *Veterinary Drug Therapy*. Lea and Febiger. Philadelphia, 195-219.
- 35.** Crispin, S. M. (1993): The pre-ocular tear film and conditions of the conjunctiva and cornea. In: Peterson SM, Crispin SM. *Manual of small animal ophthalmology*. In: BSAVA. Kingsley House. 137-171.
- 36.** Meller D, Tseng SCG. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.1999; 40: 878886.
- 37.** Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion *Prog Clin Biol Res* .1989;296:459-463.
- 38.** Sato H, Shimazaki J, Shinozaki N. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1998;39:S428
- 39.** Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation in to volunteers. *Lancet* 1982; 2:1003-1005.
- 40.** Adinolfi M, Akle CA, McColl I. Expression of HLA antigens, beta2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982;295:325-327.

- 41.** Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*.1996; 93:3500-3513.
- 42.** Cho B-J, Djalilian AR, Obritsch WF, Matteson DM, Chan CC, Hollan EJ. Conjunctival epithelial cells cultured on human amniotic membrane fail to transdifferentiate into corneal epithelial-type cells. *Cornea*,1999; 18: 216-224
- 43.** Kurpakus MA, Daneshvar C, Davenport J, Kim A. Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr Eye Res*.1999;19 :106-114.
- 44.** Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea*.2000; 19: 65-71
- 45.** Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 2506-2513.
- 46.** Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research* 2000 ;20: 173-177
- 47.** Na BK, Hwang JH, Kim JC, Shin EJ, Kim JS, Jeong JM, Song CY. Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. *Trophoblast Res*. 1999; 13:459-466.
- 48.** Solomon A, Rosenblatt M, Monroy DC, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin -1 $\beta$  in the corneal epithelial cells cultured on the amniotic membrane matrix. *Br J Ophthalmol* .2001; 85: 444-449.
- 49.** Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20: 408-413 [PMID:)]

- 50.** Tseng SCG, Li D-Q, Ma X. Suppression of transforming Growth Factor isoform, TGF- $\beta$  receptor II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.*1999;179 :325-335.
- 51.** Lee S-B, LiD-Q,Tan DTH, Meller D, Tseng SCG, Suppression of TGF- $\beta$ signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000; 20: 325-334.
- 52.** Park WC, Tseng SCG. Modulation of acute inflammation and keratocyt death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophtalmol Viis Sci*,2000; 41: 2906-2914.
- 53.** Woo H-M, Kim MS, Kweon O-K, Kim D-Y, Nam T-C, Kim JH. Effect of amniotic membrane wound healing and stromal remodeling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea *Br J Ophtalmol* 2001; 85: 345-349.
- 54.** Griss O,del Campo Z, Wolley –Dod C et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorder. *Cornea* 2002; 21: 22-27.
- 55.** Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 2001; 131: 324-331
- 56.** Willoughby CE, Batterbury M,Kaye SB, et al. Collagen corneal shields. *Survey Ophtalmol.*2004;47:51-77
- 57.** Subrahmanyam M. Amniotic membrane as a cover for microskin grafts. *Br J Plast Surg.*1995; 48 477-478.
- 58.** Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19: 348-352
- 59.** Dorigo MT, De Natale R,Miglioli PA, Collagen shields delivery of netilmicin. a study of ocular pharmacokinetics. *Chemotherapy.*1995; 41: 1-4
- 60.** Philips J Adds et all. *Br J. Ophtalmol*:2001;85;905-907



- 61.** Grueterich M, Tseng SC. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 783-790
- 62.** Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303-312
- 63.** Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, Sadeq N, Romero TR, Samson CM, Nguyen QD, Harper SL, Primack JD, Azar DT, Grueterich M, Dohlman CH, Baltatzis S, Foster CS. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 659-663
- 64.** Solomon A, Meller D, Prabhasawat P, John T, Espana EM, Steuhl KP, Tseng SC. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology* 2002; 109: 694-703
- 65.** Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. May 2003;135(5):620-627.
- 66.** Sompuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol*. Feb 2004;121(2):190- 199.
- 67.** Foote CS. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*. Nov 29 1968;162(857):963-970.
- 68.** Fujimori E. Cross-linking of collagen CNBr peptides by ozone or UV light. *FEBS Lett*. Aug 1 1988;235(1-2):98-102.
- 69.** Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. Jan 1998;66(1):97-103.

- 70.** Sporn E, Schreiber J, Hellmund K, Seiler T, Knuschke P. [Studies on the stabilization of the cornea in rabbits]. *Ophthalmologie*. Mar 2000;97(3):203-206.
- 71.** Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. Jun 2006;29(6):1420-1432.
- 72.** John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond)*. 1993;7 (Pt 2):230-237.
- 73.** Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 25 1995;214(3):793-797.
- 74.** Elsheikh A, Wang D, Brown M, Rama P, Campanelli M, Pye D. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr Eye Res*. Jan 2007;32(1):11-19.
- 75.** Malik NS, Moss SJ, Ahmed N, Furth AJ, Wall RS, Meek KM. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochim Biophys Acta*. Mar 20 1992;1138(3):222-228.
- 76.** Seiler T, Huhle S, Spoerl E, Kunath H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Oct 2000;238(10):822-825.
- 77.** Kuo IC, Broman A, Pirouzmanesh A, Melia M. Is there an association between diabetes and keratoconus? *Ophthalmology*. Feb 2006;113(2):184-190.
- 78.** Abad JC. Corneal Collagen Cross-linking Induced by UVA and Riboflavin (CXL). *Techniques in Ophthalmology*. 2008(6):8-12.
- 79.** Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. Jan 2007;33(1):75-80.
- 80.** Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. May 2007;26(4):385-389.

- 81.** Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg.* May 2006;32(5):837-845.
- 82.** Kymionis GD, Diakonis VF, Kalyvianaki M, et al. One-year follow-up of corneal confocal microscopy after corneal cross-linking in patients with post laser in situ keratosmilesia ectasia and keratoconus. *Am J Ophthalmol.* May 2009;147(5):774-778, 778 e771.
- 83.** Hafezi F, Kanellopoulos J, Wiltfang R, Seiler T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* Dec 2007;33(12):2035-2040.
- 84.** Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea.* Jun 2008;27(5):590-594.
- 85.** Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol.* Aug 2008;86(5):549-551.
- 86.** Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):114-117.
- 87.** Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg.* Sep 2003;29(9):1780-1785.
- 88.** Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg.* Feb 2006;32(2):279- 283.
- 89.** Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea.* Jul 2004;23(5):503-507.

- 90.** Spoerl E, Wollensak G, Dittert DD, Seiler T. Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea. *Ophthalmologica*. Mar-Apr 2004;218(2):136-140.
- 91.** Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. Jul 2004;29(1):35-40
- 92.** Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea*. Apr 2008;27(3):353-356.
- 93.** Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. [Treatment of keratoconus by collagen cross linking]. *Ophthalmologe*. Jan 2003;100(1):44-49.
- 94.** Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. May 2003;135(5):620-627.
- 95.** Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol*. Oct 2008;146(4):527-533.
- 96.** Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea*. May 2007;26(4):390-397.
- 97.** Mencucci R, Mazzotta C, Rossi F, et al. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking: in vivo thermographic analysis of the corneal surface. *J Cataract Refract Surg*. Jun 2007;33(6):1005-1008.
- 98.** Herrmann CI, Hammer T, Duncker GI. [Hazeformation (corneal scarring) after cross-linking therapy in keratoconus]. *Ophthalmologe*. May 2008;105(5):485- 487.
- 99.** Raiskup F, Hoyer A, Spoerl E. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA- induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg*. Sep 2009;25(9):S824-828.

- 100.** Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J Cataract Refract Surg.* Mar 2009;35(3):588- 589.
- 101.** Rama P, Di Matteo F, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A. Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use. *J Cataract Refract Surg.* Apr 2009;35(4):788-791.
- 102.** Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonis VF, Portaliou DM, Pallikaris AI, Yoo SH. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post- laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg.* Dec 2007;33(12):2135-2137.
- 103.** Koziol J, Knobloch E. The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin. *Biochim Biophys Acta.* May 25 1965;102(1):289-300.
- 104.** Fujimori E. Cross-linking and fluorescence changes of collagen by glycation and oxidation. *Biochim Biophys Acta.* Oct 5 1989;998(2):105-110.
- 105.** Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br J Ophthalmol.* Aug 2010;94(8):965-970.
- 106.** Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:82-7.
- 107.** Etzion i R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L: The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 243-252
- 108.** Rifai N, Gillette MA, Carr SA: Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 971-983
- 109.** Marko-Varga G. Proteomics principles and Challenges. *Pure Appl Chem* 2004; 76:829-
- 110.** Moore CA, Khoury MJ, Bradley LA. From genetics to genomics using gene-based medicine to prevent disease and promote health in children. *Semin Perinatol* 2005; 29:135

- 111.** Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; 19:242-7. 109.
- 112.** Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol* 1972; 26:3-27.
- 113.** Standard Models of Corneal Injury Using Alkali-Immersed Filter Discs . L. David Ormerod, Mark B. Abelson, and Kenneth R. Kenyon *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 30, No. 10, October 1989
- 114.** Inhibitory effect of polysulfated heparin endostatin on alkali burn induced corneal neovascularization in rabbit. Zhao-Na Li,Zhong-Fang Yuan, Guo-Ying Mu, Ming Hu,Li-Jun Cao, Ya-Li Zhang,Lei Liu, Ming-Xu Ge. *Int J Ophthalmology* Vol.8. No.2 Apr.18, 2015
- 115.** Treatment of Alkali-Injured Rabbit Corneas With a Synthetic Inhibitor of Matrix Metalloproteinases G. 5. Schulrz,\* 5. Srrelow.j- G. A. Srean.f N. Chegini,\* M. D. Granr,:): R. E. Golordy,\$ | | D. Grobelny,\$ J. J. Rowsey,1l K. SronecipheO! V. Parmleyji ond P. T.Khowf. *Invest. Ophthalmol.* Vol.33.No.12,Nov. 1992.
- 116.** A Modified Rat Model for Corneal Alkali BurnEmrullah Beyazyıldız, Ferda Alpaslan Pınarlı, Özlem Beyazyıldız, Ümit Beden, Tuncay Delibaşı. *Niche*, 2012; 1: 31-3 • doi : 10.5152/niche.2012.07
- 117.** Micheal, D. W. (1997): Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and the- rapy. *Survey of Ophthalmology*, 41: 275-307.
- 118.** Effect of Topically Applied Azithromycin on Corneal Epithelial and Endothelial Apoptosis in a Rat Model of Corneal Alkali Burn. Arian S<sup>1</sup>, Karaca T, Ertekin YH, Comez AT, Ersan I, Demirtas S, Elmas S, Tufan HA, Turkon H. *Cornea*. 2016 Jan 6.
- 119.** Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced modelDursun A, Arici MK, Dursun F, Ozec AV, Toker MI, Erdogan H, Topalkara A.*Int J Ophthalmol.* 2012;5(4):448-451

- 120.** A histological study of rabbit corneas after transepithelial corneal crosslinking using partial epithelial photoablation or ethanol treatment, *Int J Ophthalmol.* Vol.7 no.6 dec.18
- 121.** The effect of a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 3-bromo 7-nitroindazole on spatial learning and memory in rats Semil Selcen Gocmez a,\*, Yusufhan Yazir , Deniz Sahin,Sabriye Karadenizli , Tijen Utkan *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 131 (2015) 19–25
- 122.** Inhibition of Alkali-Induced Corneal Ulceration and Perforation by a Thiol Peptide Frank PV Burns,\* Robert D. Gray,t and Christopher A. Paterson *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 31, No. 1, January 1990
- 123.** Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair M. Elizabeth Fini · Jeffery R. Cook · Royce Mohan *Arch Dermatol Res* (1998) 290 (Suppl) :S12–S23
- 124.** Detection of corneal epithelial defect through amniotic membrane patch by fluorescein. Kobayashi A<sup>1</sup>, Ijiri S, Sugiyama K, Di Pascuale MA, Tseng SC *Cornea*. 2005 Apr;24(3):359-60.
- 125.** Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye Daniel Meller, Mikk Pauklin, Henning Thomasen, Henrike Westekemper, Klaus-Peter Steuhl *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(14): 243–8
- 126.** Amniotic Membrane Patching Promotes Healing and Inhibits Proteinase Activity on Wound Healing Following Acute Corneal Alkali Burn Kim JS<sup>1</sup>, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY *Exp Eye Res*. 2000 Mar;70(3):329-37.
- 127.** Effects of amniotic membrane suspension in the rat alkali burn model Jin A Choi,1 Jun-Sub Choi,2 Choun-Ki Joo2 *Molecular Vision* 2011; 17:404-412

- 128.** Clinical study of the effect of amnion membrane transplantation on diminishing corneal neovascularization induced by alkali burn. Yin L<sup>1</sup>, Pi Y. *Int J Ophthalmol.* 2011;4(1):110-1.
- 129.** A clinical study of amniotic membrane transplantation for severe eye burns at the acute stage]. Zhou SY<sup>1</sup>, Chen JQ, Liu ZG, Huang T, Chen LS *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2004 Feb;40(2):97-100.
- 130.** Effect of amnion membrane transplantation on corneal neovascularization in 10 patients with alkali burn. Yin L<sup>1</sup>, Pi YL *Int J Ophthalmol.* 2011;4(1):110-1.
- 131.** Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion Eberhard Spoerl<sup>1</sup>, Gregor Wollensak<sup>1</sup> and Theo Seiler *Current Eye Research* 2004, Vol. 29, No. 1, pp. 35–40
- 132.** Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in ten cats. Famose F *Vet Ophthalmol.* 2015 Mar;18(2):95-104
- 133.** Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns Tamhane A<sup>1</sup>, Vajpayee RB, Biswas NR, Pandey RM, Sharma N, Titiyal JS, Tandon R. *Ophthalmology.* 2005 Nov;112(11):1963-9. Epub 2005 Sep 29
- 134.** Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns Annie Joseph, Harminder S Dua, Anthony J King *Br J Ophthalmol* 2001;85:1065–1069
- 135.** Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns. Panda A, Nainiwal SK, Sudan R. *Br J Ophthalmol.* 2002 Jul;86(7):831.
- 136.** Novel implantable composite biomaterial by fibrin glue and amniotic membrane for ocular surface reconstruction Mingming Cai, Jie Zhang,, Lili Guan, Min Zhao *J Mater Sci: Mater Med* (2015) 26:149



- 137.** An experimental study on the fate of the amniotic membrane after amniotic membrane transplantation for acute alkaline burn of rat cornea. Chen Y<sup>1</sup>, Yan XM, Wu HR, Rong B. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2012 Jan;48(1):27-32
- 138.** Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera Hanada K<sup>1</sup>, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K *Am J Ophthalmol*. 2001 Mar;131(3):324-31
- 139.** Induction of corneal collagen cross-linking in experimental corneal alkali burns in rabbits Marcello Colombo-Barboza<sup>1,2,3</sup>, Guilherme Colombo-Barboza<sup>1,2</sup>, Sergio Felberg<sup>2</sup>, Paulo Elias Corrêa Dantas<sup>2</sup>, Elcio Hideo Sato . *Arq Bras Oftalmol*. 2014;77(5):310-4
- 140.** Kanellopoulos AJ. Post-LASIK ectasia. *Ophthalmology*. 2007;114:1230.
- 141.** Kanellopoulos AJ, Pamel GJ. Review of current indications for combined very high fluence collagen cross-linking and laser in situ keratomileusis surgery. *Indian J Ophthalmol*. 2013;61:430–432.
- 142.** Kanellopoulos AJ. Collagen cross-linking in early keratoconus with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket: initial clinical results. *J Refract Surg*. 2009;25:1034–1037.
- 143.** Kanellopoulos AJ, Asimellis G. Anterior-segment optical coherence tomography investigation of corneal deturgescence and epithelial remodeling after DSAEK. *Cornea*. 2014;33:340–348.
- 144.** Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, et al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:279–283.
- 145.** Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998;66:97–103
- 146.** Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, et al. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004; 23:503–507.

- 147.** Mencucci R, Marini M, Paladini I, et al. Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38:49–56.
- 148.** Stewart J, Schultz D, Lee O, et al. Collagen cross-links reduce corneal permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1606–1612.
- 149.** Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004;29:35–40.
- 150.** Arafat S, Robert M, Shukla A, et al. UV crosslinking of donor corneas confers resistance to keratolysis. *Cornea* 2014;33:955–959.
- 151.** Gao X, Zhao X, Li W, et al. Experimental study on the treatment of rabbit corneal melting after alkali burn with collagen cross-linking. *Int J Ophthalmol* 2012;5:147–150.
- 152.** Induction of corneal collagen cross-linking in experimental corneal alkali burns in rabbits Marcello Colombo-Barboza<sup>1,2,3</sup>, Guilherme Colombo-Barboza<sup>1,2</sup>, Sergio Felberg<sup>2</sup>, Paulo Elias Corrêa Dantas<sup>2</sup>, Elcio Hideo Sato<sup>4</sup> *Arq Bras Oftalmol.* 2014;77(5):310-4
- 153.** G. Wollensak, H. Aurich, D.-T. Pham, and C. Wirbelauer, “Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A,” *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, vol. 33, no. 3, pp. 516–521, 2007
- 154.** Ghanem R, Santhiago M, Berti T, Thomaz S, Netto M (2010) Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 36: 273–276.
- 155.** Gharaee H, Ansari-Astaneh M, Armanfar F (2011) The effects of riboflavin/Ultraviolet-A corneal cross-linking on the signs and symptoms of Bullous keratopathy. *Middle East African Journal of Ophthalmology* 18: 58–60.

- 156.** Bottos K, Hofling-Lima A, Barbosa M, Barbosa J, Dreyfuss J, et al. (2010) Effect of collagen cross-linking in stromal fibril organization in edematous human corneas. *Cornea* 29: 789–793.
- 157.** Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation Niels Ehlers and Jesper Hjortdal *Acta Ophthalmol.* 2008; 86: 549–551
- 158.** Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. 2004;23(1):43-49
- 159.** Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment . 2004;18(7):718-722
- 160.** Xuefei Song, Tanja Stachon, Jiong Wang, Achim Langenbacher, Berthold Seitz, and Nóra Szentmáry. Viability, Apoptosis, Proliferation, Activation, and Cytokine Secretion of Human Keratoconus Keratocytes after Cross-Linking *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 254237, 11 pages
- 161.** Tanja Stachon, Jiong Wang, Xuefei Song, Achim Langenbacher , Berthold Seitz , Nóra Szentmáry Impact of crosslinking/riboflavin-UVA-photodynamic inactivation on viability, apoptosis and activation of human keratocytes in vitro *The Journal of Biomedical Research*, 2015, 29(4):321-325
- 162.** Lane, E.B. (1993) Keratins. In Royce, P.M. and Steinmann, B. (eds), *Connective Tissue and its Heritable Disorders. Molecular, Genetic and Medical Aspects.* Wiley-Liss Inc, New York, pp. 237–247.
- 163.** W.H. Irwin McLean and C.B. Tara Moore. Keratin disorders: from gene to therapy .*Human Molecular Genetics*, 2011, Vol. 20, Review Issue 2 R189–R197
- 164.** Fischer H, Langbein L, Reichelt J, Praetzel-Wunder S, Buchberger M, Ghannadan M, Tschachler E, Eckhart L. Loss of keratin K2 expression causes aberrant aggregation of K10, hyperkeratosis, and inflammation. *J Invest Dermatol.* 2014 Oct;134(10):2579-88

- 165.** Balvinder K. Bloor, Nicholas Tidman, Irene M. Leigh, Edward Odell, Bilal Dogan, Uwe Wollina, Lucy Ghali, Ahmad Waseem. Expression of Keratin K2e in Cutaneous and Oral Lesions : Association with Keratinocyte Activation, Proliferation, and Keratinization
- 166.** R. Joseph, O.P. Srivastava, R.R. Pfister. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas
- 167.** Acera A, Suárez T, Rodríguez-Agirretxe I, Vecino E, Durán JA. Changes in tear protein profile in patients with conjunctivochalasis Cornea. 2011 Jan;30(1):42-9.
- 168.** Zhenda Wang, Jia Hu, Ge Li, Liuqing Qu, Qihua He, Yaxin Lou, Quansheng Song, Dalong Ma & Yingyu Chen. PHF23 (plant homeodomain finger protein 23) negatively regulates cell autophagy by promoting ubiquitination and degradation of E3 ligase LRSAM1 Autophagy 10:12, 2158--2170; December 2014
- 169.** Christina M. Sax†§, Csaba Salamon†, W. Todd Kays†, Jing Guo, Fushin X. Yu, R. Andrew Cuthbertson†, and Joram Piatigorsky Transketolase Is a Major Protein in the Mouse Cornea Vol. 271, No. 52, Issue of December 27, pp. 33568–33574, 1996 the journal of biological chemistry
- 170.** Cuthbertson, R. A., Tomarev, S. I., and Piatigorsky, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4004–4008
- 171.** Wood, T. (1985) *The Pentose Phosphate Pathway*, Academic Press/Harcourt Brace Jovanovich, New York
- 172.** Sax CM, Kays WT, Salamon C, Chervenak MM, Xu YS, Piatigorsky J. Transketolase gene expression in the cornea is influenced by environmental factors and developmentally controlled events. *Cornea*. 2000 Nov;19(6):833-41.
- 173.** James V. Jester, Torben Moller-Pedersen, Jiying Huang, Christina M. Sax, Wm Todd Kays, H. Dwight Cavanagh, W. Matthew Petroll and Joram Piatigorsky. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins' *Journal of Cell Science* 112, 613-622 (1999)

- 174.** Delaye M, Tardieu A .Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature*. 1983 Mar 31-Apr 6;302(5907):415-7.
- 175.** . Bettelheim FA, Ali S. Light scattering of normal human lens. III. Relationship between forward and back scatter of whole excised lenses *Exp Eye Res*. 1985 Jul;41(1):1-9.
- 176.** Goldman JN, Kuwabara T.Histopathology of corneal edema. *Int Ophthalmol Clin*. 1968 Fall;8(3):561-79.
- 177.** Møller-Pedersen T<sup>1</sup>, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Cornea. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. 1998 Nov;17(6):627-39.
- 178.** *Brian M. Stramer, Jeffery R. Cook, M. Elizabeth Fini, Allen Taylor, and Martin Obin* Induction of the Ubiquitin–Proteasome Pathway during the Keratocyte Transition to the Repair Fibroblast Phenotype *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, July 2001, Vol. 42, No. 8
- 179.** *Yosuf El-Shabrawi, Claire L Kublin, and Charles Cintron* mRNA Levels of *α1(V)* Collagen, *α1(XII)* Collagen, and *β8ig* in Rabbit Cornea during normal Development and Healing *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, January 1998, Vol. 39, No. 1
- 180.** Tu CL, Chang W, Bikle DD. The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2001; 276:41079-85.
- 181.** Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002; 7:d1356-68.

- 182.** Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19:739-44.
- 183.** Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 1996; 106:989-92.
- 184.** Tong L, Corrales RM, Chen Z, Villarreal AL, De Paiva CS, Beuerman R, Li DQ, Pflugfelder SC. Expression and regulation of cornified envelope proteins in human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1938-46.
- 185.** Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* 2004; 123:23-33.
- 186.** Robinson NA, Lopic S, Welter JF, Eckert RL. S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 1997; 272:12035-46.
- 187.** Nielsen K, Vorum H, Fagerholm P, Birkenkamp-Demtröder K, Honoré B, Ehlers N, Orntoft TF. Proteome profiling of corneal epithelium and identification of marker proteins for keratoconus, a pilot study. *Exp Eye Res* 2006; 82:201-9. [PMID: 16083875].
- 188.** Li C, Zhang F, Wang Y. S100A proteins in the pathogenesis of experimental corneal neovascularisation. *Mol Vis* 2010; 16:2225-35. [PMID: 21139687].
- 189.** Andri K, Riau, Tina T. Wong, Roger W. Beuerman, Louis Tong, Calcium-binding S100 protein expression in pterygium *Molecular Vision* 2009; 15:335-342 <

- 190.** Changyou Li, Feng Zhang, Yiqiang Wang. S100A proteins in the pathogenesis of experimental corneal neovascularization *Molecular Vision* 2010; 16:2225-2235
- 191.** Louis Tong, MBBS, FRCS(Oph), PhD<sup>+</sup> Wanwen Lan, BSc, Rayne R. Lim, BSc, Shyam S. Chaurasia, MSc, PhD, James V. Jester, PhD, S100A Proteins as Molecular Targets in the Ocular Surface Inflammatory Diseases
- 192.** Krasnov MM, Ziangirova GG, Malaeva LV, Bocharov VE, Olinevich VB. Effects of protein S-100 beta on the course of corneal healing in rabbits.. *Vestn Oftalmol.* 1994 Oct-Dec;110(4):29-32.
- 193.** Ryan DG, Taliana L, Sun L, Wei ZG, Masur SK, Lavker RM. Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Oct;44(10):4255-62
- 194.** Hessler RJ, Blackwood RA, Brock TG, Francis JW, Harsh DM, Smolen JE. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a Ca<sup>2+</sup>-dependent fusogen in human neutrophil cytosol. *J Leukoc Biol.* 1998;63:331–336.
- 195.** Khalid F Tabbara, Hind M Alkatan. Climatic droplet keratopathy Copheland and Afshari's Principles and Practice of Cornea

