



TC.

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KORNEA
NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
SİKLOSPORİN-A'NIN TEDAVİDEKİ ROLÜ**

Dr. Harun YÜKSEL

GÖZ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat TUNÇ

DÜZCE-2009



TC.

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KORNEA
NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
SİKLOSPORİN-A'NIN TEDAVİDEKİ ROLÜ**

Dr. Harun YÜKSEL

GÖZ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat TUNÇ

Yardımcı Araştırmacılar

Yrd. Doç. Dr. Ümran YILDIRIM

Patoloji Anabilim Dalı

DÜZCE-2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktararak eğitimime katkıda bulunan ve bana sadece iyi bir oftalmoloji eğitimi vermekle kalmayıp çeşitli sorumluluklar vererek, titiz ve düzenli çalışma ile sorunların üstesinden gelmeyi öğreten değerli hocalarım, başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Murat Kaya'ya, bu tezin hazırlanmasında büyük desteği olan tez hocam Prof. Dr. Murat Tunç'a ve hocam Prof. Dr. Gülderen Aktan'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamızda histopatolojik incelemeleri yapan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ümran Yıldırım'a, istatistik analizlerinde yardımcı olan Turizm Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi İbrahim Kılıç'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Anatomi	7
2.1.1. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası	7
2.1.2. Epitel ve Bazal Membran	7
2.1.3. Bowman Tabakası	8
2.1.4. Stroma Tabakası	8
2.1.5. Descement Membranı	9
2.1.6. Endotel Tabakası	9
2.1.7. Limbus	10
2.1.8. Limbal Kök Hücreleri	10
2.1.9. Korneanın İnervasyonu	10
2.2. Kornea Embriyolojisi	11
2.3. Kornea Fizyolojisi	11
2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi	11
2.3.2. Epitel fizyolojisi	12
2.3.3. Endotel Fizyolojisi	12
2.4. Kornea Yara İyileşmesi	13
2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi	13
2.4.2. Kornea Epitel İyileşmesine Etkili Faktörler	15
2.4.3. Stromal Yara İyileşmesi	16
2.4.4. Endotel Yara İyileşmesi	18
2.5. Kornea Avasküleritesi ve Vaskülarizasyonu	18
2.5.1. Epidemiyoloji	19
2.5.2. Risk Faktörleri	19
2.5.3. Kornea Neovaskülarizasyonda Suçlanan Anjiogenik Moleküller	21
2.5.4. Antijjiogenik Moleküller	24
2.5.5. Tedavi	25

2.5.6. Siklosporin A'nın moleküler yapısı ve etki mekanizması	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Deney Hayvanları	30
3.1.1. Anestezi	30
3.1.2. Gruplar	30
3.1.3. Korneaya Elektrokoterizasyon Yapılması	31
3.1.4. Siklosporinin Hazırlanması ve Subkonjonktival Enjeksiyonu	32
3.1.5. Muayene ve Entükleasyon	33
3.1.6. Histopatolojik İnceleme	33
3.1.7. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. Korneal Muayene Bulguları	35
4.2. Histopatolojik Bulgular	39
4.3. Grupların Karşılaştırma Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ	54
7. TÜRKÇE ÖZET	54
7.1. AMAÇ	54
7.2. Yöntem	55
7.3. Bulgular	56
7.4. Sonuç	56
8. SUMMARY	57
8.1. Background and Aim	57
8.2. Methods	57
8.3. Results	58
8.4. Conclusion	58
9. KAYNAKLAR	59
10. RESİMLEMELER LİSTESİ	71
11. ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGE ve KISALTMALAR

cAMP

COX

EGF

EPC

FGF

HGF

IL

KGF

MMP

NO

PDGF

PEDF

TGF

TNF

VEGF

VEGFR

Siklik AMP

Sikloksijenaz

Epidermal Büyüme Faktörü

Endotelyal Progenitör Hücreler

Fibroblast Büyüme Faktörünün

Hepatosit Büyüme Faktörü

İnterlökin

Keratinosit Büyüme Faktörü

Matriks Metallo Proteinaz

Nitrik Oksit

Platelet Kökenlibüyüme Faktörü

Pigment Epitel Kökenli Faktörü

Transforming Growth Factor

Tümör Nekrotizan Faktör

Vasküler Endotelyal Büyüme
Faktörü

Vasküler Endotelyal Büyüme
Faktörü Reseptörü

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kornea, şeffaf ve avasküler yapıda sklera ile devamlılık gösteren gözün ilk kırıcı ortamıdır. Kornea neovaskülarizasyonu, korneanın şeffaflığının azalmasına ve görme kaybına neden olan yeni damarların oluşumudur.

Kornea neovaskülarizasyonlarının etiyolojisinde kronik hipoksiye ya da inflamasyona yol açan pek çok hastalık vardır. Kornea neovaskülarizasyonlarının en sık nedeni uzun süreli kontak lens kullanımı iken, diğer nedenler arasında enfeksiyon, travma, immünolojik hastalıklar, üveit, glökom ve fitizis bulbi yer almaktadır.

Çalışmamızda termal koterizasyon ile deneysel kornea neovaskülarizasyonu oluşturulmuş ve siklosporin-A'nın subkonjonktival yolla verilmesinin kornea neovaskülarizasyonu gelişmesine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma ile kornea neovaskülarizasyonlarında subkonjonktival siklosporin tedavisinin etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anatomi

Korneanın, vertikal çapı erişkin insanda yaklaşık 10,6 mm, horizontal çapı da 11,5 mm'dir. Santral kornea kalınlığı 530 mikron, periferde ise 650 mikrondur. Korneanın ön eğrilik çapı (konveks) 7,8 mm, arka eğrilik çapı (konkav) 6,8 mm kadardır. Kornea kurvatürü yeni doğanlarda ve çocuklarda erişkine oranla daha büyük olup, doğum sonrası ilk aylarda düzleşme gerçekleşir. Düzleşme her alanda simetrik değildir; nazalde ve üstte, temporale ve alta oranla daha fazladır. Korneanın kırıcılık gücü yaklaşık 43,0 diyoptri olup, gözün kırıcılığı en fazla olan ortamıdır. 6 yaş civarında kornea gelişimi tamamlanır. Kornea önden arkaya sırayla epitel, Bowman tabakası, stroma, Descement membranı ve endotel olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır.

2.1.1. Kornea Gözyaşı Film Tabakası

Kornea yüzeyi üç tabakadan oluşan gözyaşı filmi ile kaplıdır: Önden arkaya doğru bu tabakalar şunlardır;

1. Hidrofobik ön lipit tabaka: Meibomian, Zeis (sebase yapıda) ve Moll (ter bezi yapısında) bezlerince salgılanır.
2. Hidrofilik aköz tabaka: Ana lakrimal bez ve aksesuar lakrimal bezler (Krause, Wolfring ve Manz bezleri) tarafından salgılanır.
3. Musin tabaka: Başlıca goblet hücrelerince ve Manz bezlerince salgılanır.

2.1.2. Epitel ve Bazal Membran

Kornea epiteli yüzey ektoderminden köken alan çok katlı non-keratinize yapıdadır. Kalınlığı santralde 50 µm, periferde 80 µm'a kadar ulaşabilen düzenli dizilim gösteren aşağıdan yukarıya doğru farklılaşan epitel hücrelerinden oluşur. Üç tabakadan oluşmaktadır; bazal hücre (1 kat), kanat (Wing) hücreleri (bazal hücrelerin üstünde 2–3 kat) ve yüzeyel yassı

hücreler (5–6 kat) tabakalarıdır. Santralde 5–6, periferde 8–10 hücre katı vardır. Bazal hücre tabakası tek katlı silindirik hücrelerden oluşur, bu hücreler altındaki bazal membrana hemidesmozomlarla tutunmuştur.¹

Epitelde bir bazal hücrenin yüzeyden dökülmesi yaklaşık 7–10 günde gerçekleşir. Yaşla birlikte epitelde herhangi bir değişiklik gözlenmez. Bazal silindirik epitel üzerinde 2–3 kat poligonal suprabazal hücrelere rastlanır. Yanlara doğru kanatsız uzantıları olan bu hücrelere “Wing hücreleri” denmektedir. Yüzeğe yaklaştıkça hücreler inceliyor yassılaşıyor uzantılarını kaybederler. Gözyaşıyla temasta olan apikal yüz, mikrovilli ve mikropikalar nedeniyle oldukça düzensizdir. Bu düzensizlik gözyaşı film tabakasıyla giderilir ve düzgün bir oküler yüzey elde edilmiş olur.

Epitel hücreleri birbirlerine çok sayıda desmozomlarla sıkıca tutunmuşlardır. Yüzeyel hücreler ‘tight junction’ ve ‘zonula okludens’ler sayesinde yüksek dirençli (12–16 kohms/cm²) yarı geçirgen bir membran gibi davranırlar. Yüzey epiteli ile kanat hücreleri arasında makula okludensler gözlenir.²

Epitel tabakası içinde periferik kısımlarında histiyositler, makrofajlar, lenfositler, melanositler ve immünolojik özelliği olan langerhans hücreleri bulunabilmektedir. Bazal membran tip IV kollajen, laminin, heparin, proteoglikanlar, az miktarda fibronektin (Fn) ve fibrilin içeren rejenerasyon olamayan bir tabakadır.

2.1.3. Bowman Tabakası

Bu tabaka hücre içermeyen Tip I yapıda elastik ve kollajen fibrillerden oluşmuştur ve 8–10 µm kalınlığındadır. Bu tabakada epitele uzanan myelinizasyon sinir lifleri için kanallar vardır. Hasarlandığında rejenerasyon olamaz, skar dokusu ile iyileşir. Epitel ile stroma arasında önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Bowman tabakasının yapısı ve kalınlığı yaşam boyu değişmez ancak perifer kısımlarında bazofilik lökositler ve kalsifik depozitler görülebilir.³

2.1.4. Stroma Tabakası

Kornea kalınlığının %90’ını oluşturur, 500 µm kalınlığa sahiptir ve %76 oranında su içermektedir. Kuru ağırlığın %80’i kollajen fibrillerden, %15’i matriksten, %5’i hücresel elementlerden oluşmaktadır.

Keratositler kollajen ve ekstraselüler matriks yapımından sorumlu kontraktıl özelliği olmayan nöral krest kaynaklı hücrelerdir. Bunlar yassı hücreler olup, uzantıları ile birbirleriyle ilişki içerisindedirler ve kollajen lameller arasında bulunurlar. Stromal hasar sırasında yara bölgesine göç ederek kontraktıl özelliği olan miyofibroblastlara dönüşürler. Keratositler büyük oranda Tip I, az miktarda Tip III ve Tip V kollajen üretirler ve skar gelişimine katkıda bulunurlar. Kollajen lifler lameller yapılar oluşturacak biçimde düzenli bir şekilde uzanırlar. Lameller içindeki kollajen lifler aynı çapta olup, çapları 300 µm'dur. Kollajen lifler stromanın ön 1/3'ünde oblik, arka 2/3'ünde ise paralel lameller oluştururlar, lameller içindeki kollajen lifler birbirlerine paralel olarak tüm kornea boyunca uzanırlar. Komşuluk gösteren lameller ise birbirlerine dik yerleşimlidir. Stromanın yapısında lökositler, plazma hücreleri ve makrofajlar da bulunabilmektedir.³

Ara madde glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıdadır, %60 oranda keratan sülfat ve %40 oranda kondroitin sülfattan oluşmaktadır. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını sağlar. Yeni doğan ve çocuklarda stroma erişkinden daha fazla keratosit içerir, periferik korneal stromada yaşla birlikte kolesterol ve fosfolipid birikimi gerçekleşebilir (arcus senilis).

2.1.5. Descemet Membranı

Endotel bazal membranı olarak görev yapan bu tabaka gerçek membran yapıdadır, tip IV kollajen içerir. Doğumda 3–4 µm kalınlıktadır, erişkinde 10–12 µm kalınlığa ulaşır. İntrauterin gelişen ön çizgili zon ve yaşam boyu endotel tarafından desteklenen arka çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Travma sırasında bu membran, stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve endotel tarafından tekrar salgılanarak yenilenebilmektedir.

2.1.6. Endotel Tabakası

Nöroektodermal kökenlidir, az sayıda mikrovili içeren hegzagonal hücrelerden oluşan tek katlı bir tabakadır, tipik olarak daha genç hücrelerde büyük bir nükleusa ve çok sayıda mitokondriye rastlanır. Bu organeller aktif transportta ve stromanın su oranında önemli rol oynarlar. Endotel hücre sayısı yaşla birlikte azalır, mitoz nadiren rastlanır ölen hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur.⁴ Fonksiyonlarını yitirmeleri durumunda, stromal

hidrasyon artarak, ödem, kalınlık artışı ve opasifikasyon gelişmektedir. Doğumda 5000 hücre/mm² iken erişkinde bu sayı 2500 hücre/mm² civarında olup, 500 hücre/mm² altına indiğinde korneal fonksiyonlar bozulmaya başlar.

Komşu endotel hücreleri birbirlerine makula okludenslerle bağlanmışlardır. Stres altında veya stabil olmayan kornea endotel hücrelerinde büyüme ve şekil değişikliği olan polimegatizm gözlenmektedir.

2.1.7. Limbus

Kornea ile sklera arasındaki geçiş zonedir. Limbustaki anatomik yapılar konjonktiva, tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dışı akım aparatıdır. Limbus epiteli kornea epiteli ile konjonktiva epiteli arasındaki 10–12 katlı geçiş zonedir. Bu epitel tabakasında melanositler, Langerhans hücreleri ve altındaki limbal stromada damar ağı mevcuttur. Goblet hücrelerine rastlanmaz.

Limbal stroma, üzerindeki epitelle birlikte radial fibrovasküler yükselti biçiminde düzenlenmiştir, bu yapıya ‘Vogt’un limbal palisad’ları (Vogt çitleri) adı verilir. Korneada bu çitlere çepeçevre rastlanır, özellikle alt ve üst limbusta daha belirgindir. Bazal hücre yoğunluğu bu çit bölgelerinde en fazladır.

2.1.8. Limbal Kök Hücreleri

Korneal epitelyal kök hücreleri limbusta bulunurlar. Yaşam boyu bazal hücrelerin üretilmesinde kaynak oldukları sanılmaktadır. Limbusta bulunmaları bir takım avantajlar sağlar, kornea şeffaf olması gerektiğinden ötürü korneadaki bazal hücreler pigment içermezler ve solar radyasyona hassastırlar oysa limbustaki bazal hücreler pigmentlidir bu sayede solar radyasyondan korunurlar. Altındaki stromaya kornea epitelinin stromasına tutunmasına kıyasla çok daha güçlü tutunur ve kolayca sıyrılmazlar.⁵

2.1.9. Korneanın İnervasyonu

Korneanın duyuşal innervasyonu trigeminal sinirin oftalmik dalıyla gerçekleşir. Sinir lifleri limbusta myelinli iken korneada myelinlerini kaybederler. Sinir lifleri ön stromada

Bowman tabakası altında yoğunlaşmalar ve epitele dallar gönderirler. Bu sinir liflerinin aksonları uzun silier sinir aracılığıyla önce silier gangliona sonra da semilunar gangliona ulaşır. Descement membranı ve endotel tabakasının innervasyonu yoktur.⁶

2.2. Kornea Embriyolojisi

Kornea epitel ve endoteli yüzey ektoderminden gelişir. Stroma ise mesoderminden gelişir. Kornea ve ön kamara 6. hafta sonunda gelişmeye başlar. Altıncı haftaya kadar yüzey epiteli ile lens ön yüzü arasındaki boşluk iyi organize olmamış mezokimal doku ile doludur. Altıncı hafta sonunda mezoderm içinde dar bir şerit halinde beliren boşluk genişlemeye başlar ve mezodermi, korneal stromayı oluşturacak olan ön tabaka ve iris stromasını oluşturacak olan arka tabaka olmak üzere ikiye ayırır. Aradaki boşluk ise ön kamarayı oluşturacaktır. Stroma 6. haftanın sonunda oluşmaya başlar ve dördüncü ayda epitel altında yoğunlaşarak Bowman tabakasını oluşturur. Endotel, ön kamara belirdikten hemen sonra şekillenmeye başlar. Korneoskleral açıdan itibaren iç yüzey boyunca gelişen nöroektodermal kökenli hücreler, arka yüzeyi örten yassı endotel hücrelerine dönüşürler. Onüçüncü haftada yassılaştırmış endotel hücrelerinden Descement membranı salgırlar. Descement membranı kalınlığı giderek artar ve embriyo 60–70 mm iken histolojik kesitlerde tanınır hale gelir.⁷

2.3. Kornea Fizyolojisi

2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi

Gözyaşının salınım miktarı ve kalitesi kornea fonksiyonları için çok önemlidir. Normal salınım 0,9–2,2 µl/dakika kadardır.

Gözyaşı üç tabaka halinde bulunur. En üstte lipit tabaka bulunur. Meibomian ve Zeis (sebase bez yapısında) ve Moll (ter bezi yapısında) bezlerince salınan Lipit tabaka; kolesterol esterleri, fosfolipidler, trigliseritler, serbest yağ asitleri ve serbest sterollerden oluşur. Hidrofobik lipit tabaka buharlaşmayı azaltır, kayganlaştırıcı özellik taşır, gözyaşı meniskusunun kapak dışına taşımını önler.

Hidrofilik aköz tabaka ana lakrimal bez ve aksesuar lakrimal bezler (Krause, Wolfring ve Manz bezleri) tarafından salgılanır ve lipit tabakanın altında yerleşir. Aköz tabakanın %98'ini su oluşturur, %2'si ise solid kısımdır. İçerdiği Na ve HCO₃ miktarı serum ile aynı, K⁺

ve Cl⁻ ise daha yüksektir. Glikoz içeriği çok düşüktür buna karşılık yüksek miktarda protein içerir (7 mg/mL). Yaşla birlikte protein konsantrasyonu azalır. Salgısal IgA, IgG ve IgE gibi immunglobulinler ile beraber içeriğindeki lizozimler ile lizis etkisi yaratan laktoferrin sayesinde B. subtilis, S. aureus ve epidermidis, P. aeruginosa gibi mikroorganizmalar için bakteriyostatik etki gösterir. Aköz tabaka avasküler korneanın özellikle epitel tabakasının oksijen ve besin gereksiniminden sorumludur.

Goblet hücrelerince ve Manz bezlerince salgılanan musin tabaka ise yüzey gerilimini düşürerek aköz tabakanın kornea ve konjonktiva üzerinde uniform yayılmasını sağlayan en iç tabakadır.⁸

2.3.2. Epitel fizyolojisi

Gözün ana refraktif komponenti olan kornea yaklaşık +43 diyoptrilik bir kırma gücüne sahiptir ve 365–2500 nm dalga boyundaki elektromanyetik radyasyonu geçirici özelliktedir. Kornea epitelinin iki önemli görevi vardır. Birincisi normal görme fonksiyonunun devam edebilmesi için gözyaşı ile birlikte düzgün bir yüzey oluşturmak, ikincisi ise sıkı bağlantılar (tight junctions) ile koruyucu bir bariyer oluşturarak stromaya sıvı ve patojen mikroorganizmaların girişini engellemektir.⁹

Epitel hücreleri aralarında bulunan sıkı bağlantılar nedeniyle iyon geçirgenliğine en fazla direnç gösteren hücrelerdir. Bu özellikleriyle, stromanın su dengesine katkıda bulunurlar. Kornea epitel hücreleri lipit geçirgen özelliktedir.

Kornea epitel hücreleri metabolik olarak en aktif hücrelerdir. Epitel tabakasına oksijen, gözyaşı yoluyla difüzyonla sağlanırken, göz kapalı durumda iken limbal ve tarsal konjonktiva damarlarının da katkısı vardır.¹⁰ Aminoasit ve vitamin desteği, aköz humörden sağlanır. Epitel hücrelerinde, glikoz ve glikojen başlıca enerji kaynağını oluştururlar. Glikoz çoğunlukla aköz humörden elde edilmekle beraber, %10 veya daha azı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilir. Glikojen depolama özelliğine sahip olan epitel hücreleri, hipoksi ve travma gibi durumlarda bu kaynağı kullanabilmektedirler.

2.3.3. Endotel Fizyolojisi

Endotel hücreleri hem aktif bir pompa gibi çalışıp, hem de mekanik bir bariyer teşkil ederek, korneanın şeffaf ve saydam kalmasını sağlarlar. Aköz humörden sağlanan glikoz ve

oksijen endotel hücrelerinin ana enerji kaynağıdır. Aktiviteleri için anaerobik, daha az olarak da aerobik yolları kullanırlar. Kornea endoteli dehidratasyon görevini yaptığı sürece, stromanın su içeriği %78 ve kalınlığı 550 µm civarında kalarak saydamlığını ve normal fonksiyonlarını sürdürür. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bariyer görevi görürler. Endotel tabakası metabolik aktivitesini stromadan aköz humöre su pompalamak üzere gerçekleştirir.

Net su akımı için Na^+ , K^+ ve H^+ iyon konsantrasyon gradientinin gerçekleşmesi gereklidir. Endotel hücre yüzeyindeki iyon pompaları ile gerekli gradient sağlanır. Endotel hücrelerin dış kenarlarına lokalize olan sodyum-potasyum-adenozintrifosfataz pompa sistemi enerji harcayarak sodyumun hücre dışına çıkmasını sağlar, bunu suyun hücreyi terk etmesi izler. Böylece kornea stromasından ön kamaraya doğru devamlı sıvı geçişi olurken, korneanın şeffaflığı korunur. Korneadan ön kamaraya geçen sıvının geri dönmesi, endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (tight junction ve gap junction) ile önlenmektedir.¹¹

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

2.4. Kornea Yara İyileşmesi

Korneada meydana gelen hasarın büyüklüğüne ve etiyolojisine göre farklı şekillerde yara iyileşmesi gözlenmektedir. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstraselüler matris proteinleri etkileşim içerisindeyler.

2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi

Epitelyal yara iyileşmesi kornea yara iyileşmesinde ilk basamaktır. Epitel iyileşmesi birbirini takip eden üç fazda gerçekleşir. Bu üç faz öncesinde hücrelerin metabolizmalarını değiştirdikleri bir çeşit hazırlık evresi olan latent faz vardır.¹²

Latent faz (lag fazı) yaralanma sonrası ilk saatlerdir ardından şu üç evre gerçekleşir.

1. Yüzeyel hücrelerin migrasyonu açık alanın örtülmesi
2. Proliferasyon ve tabakalaşma

3. Kalıcı hücre adezyon fazı

Latent faz, yaralanmanın ardından hücre migrasyonuna kadar olan ilk birkaç saatlik evredir. Bu evrede büyük bir hücrel reorganizasyon ve protein sentezi gerçekleştirilir. Hücrel iskelet proteinleri olan vinkulin, aktin, talin ve integrin, hücre yüzey reseptörleri (hyalüronan reseptörü olan CD 44 gibi) ve yüzey glikoproteinleri, glikolipitleri sentezlenir.¹³

Glikoprotein yapıda olan integrin $\alpha\beta4$ ekstraselüler proteinler ile hücre iskeleti yapılarını birbirine bağlayan bir integral membran proteinidir. Normalde hücrelerin basal yüzeyinde bulunur ve basal membrandaki laminine bağlanarak hücreleri basal membrana tutturur. Yaralanma sonrasında lag fazında integrinler hücrenin bütün yüzeyine yayılırlar. Komşu ekstraselüler matrikse adezyon sağlayacak olan adezyon molekülü olarak görev yaparlar. Ayrıca bu yüzey glikoproteinlerinin ekstraselüler matriks ile hücre iskeleti arasında sinyal iletiminde rolü olduğu düşünülmektedir.¹⁴

Ayrıca integrinlerin fibriler kollajen ile birleşmesi sonucu hücrelerde matriks metallo proteinaz (MMP) ekspresyonu tetiklenir. MMP-1 fibriler kollajeni $\alpha1$ ve $\alpha2$ zincirlerine ayırarak adezivitesini azaltır ve migrasyon için kolaylık sağlar.¹⁵

Bir hücre yüzey reseptörü olan CD44 molekülü de migrasyonun aktif olduğu dönemde en fazla miktarda üretilip proliferatif evre başlayınca üretimi azalır.¹⁶

Yara iyileşmesinin erken döneminde üretilen fibrin geçici bir matriks gibi görev yapar, hücre adezyonu ve migrasyonunu kolaylaştırır. Bazı deneysel çalışmalarda bu fibrin ağının gerekliliği gösterilmiştir.¹⁷

Ayrıca gözyaşından kaynaklanan bir glikoprotein olan fibronektin yaralama sonrasında çıplak kornea yüzeyini örterek komşu epitel hücre adezyonu ve göçü için gerekli ekstraselüler matriks görevini görür.

Normalde epitel bazal hücreleri mitoz bölünmeyle her yedi günde bir yenilenir. Fakat yaralanma durumunda bu süre kısalmır. Yaralanmadan yaklaşık 5 saat sonra hücreler 60 ila 80 $\mu\text{m/saat}$ hız ile göçe başlarlar ve defekt kapanana kadar göç devam eder.¹⁸ Migrasyon, intrastoplazmik aktin-myozin kontraksiyonu ile gerçekleşir. Bazal tabakada hücreler, filopodia ve lamellopodia gibi uzantılarla motilite kazanarak bazal lamina üzerinden defektif alana göç ederler defekt tamamen kapanıncaya kadar motilite sürer. Bütün açık alan tek veya iki kat hücre ile örtüldükten sonra proliferasyon ve tabakalaşma fazı başlar.

Epitel iyileşmesi sırasında inflamatuvar hücre kemotaksisi de gözlenir. Zedelenmeden 3 saat sonra rejenera olan epitel uçlarında polimorfonükleer lökositler görülmeye başlar ve 36

saat kadar kalırlar, bunlar bazı enzimlerin salınımına ve kemotaksise neden olurlar. Sonraki 12–24 saat içerisinde lenfositlerin ve makrofaj hücrelerinin göçü başlamaktadır.

Büyük defektlerde onarıma konjonktiva epitel de katılabilir. Abrazyonu kornea epitel 1–4 gün içinde örterken, konjonktiva epiteliyle iyileşme 1–2 hafta veya daha uzun zaman gerektirir. Kornea epitel hasarı yüzeysel epitelde sınırlı olabileceği gibi, Bowman tabakasına da ulaşabilir. Bazal membran hasarının olduğu durumlarda epitel iyileşmesi 4–6 haftalık sürede olmaktadır.

Kornea epitel iyileşmesinde limbal kök hücreleri de önemli rol oynarlar. Bunlar en yüksek mitoz hızına sahip hücrelerdir. Epitel iyileşmesi sırasında bazal hücrelerle limbal kök hücreler arasında denge bulunmaktadır. Santral epitel defekti sonrasında, periferdeki hücreler santrale doğru göç ederek, kornea epitelinin devamlılığını sağlarlar. Bu göç eden hücreler, daha sonra da yüzeyden dökülürler. Thoft tarafından bu denge $X+Y=Z$ formülü ile tariflenmiştir (X =bazal epitel hücre çoğalımı ve santrale göçü, Y = limbal hücre çoğalımı, Z =yüzey epitel hücre kaybını sembolize etmektedir).¹⁹ Limbal hücreler hasara uğradığında, periferden santrale olan göç gerçekleşmektedir. Ancak, normal limbal iyileşme tamamlanmadan santraldeki lezyon kapanmamaktadır. Bu da kornea epitel iyileşmesinde limbal kök hücrelerinin öncelikli rolüne işaret eder.²⁰

2.4.2. Kornea Epitel İyileşmesine Etkili Faktörler

Kornea epitel iyileşmesinde birçok faktör etkilidir. Bunlardan önemlileri büyüme faktörleri ve sitokinler bunların başında gelmektedir.

Büyüme Faktörleri

Epidermal büyüme faktörü (EGF) gözyaşında ve birçok vücut sıvısında bulunur ve gözde ana kaynağı lakrimal bezdir. İn vivo ve invitro ortamda korneal epitel proliferasyonunu artırır.^{21–22}

Keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) kornea stromasındaki fibroblastlar tarafından üretilip kornea epitelinin proliferasyonunu parakrin etkiyle artırırlar.²³

Transforming growth factor- β (TGF- β) gözyaşında ve kornea epitelinde bulunur. Birçok fonksiyonu vardır ve yara iyileşmesini düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir.

TGF- β 1 TGF- β 2 ve TGF- β 3 isoformları vardır. TGF- β 1 ve β 2, KGF, HGF ve EGF ile uyarılan korneal epitelyal hücre çoğalmasını inhibe eder.²⁴

İnflamatuvar Sitokinler

Kornea epitel hasarı ile çeşitli sitokinler dokuda artmaya başlar bunlardan bazıları İnterlökin-1 (IL-1) ve İnterlökin-6 (IL-6) dır. Bu ikisinin miktarı oluşan hasar miktarı ile pozitif korelasyon gösterir. IL-1 ve IL-6 düzeylerinin artması yara iyileşme kaskadındaki olayları başlatır. IL-6 integrin üretimini arttırarak hücre migrasyonunu stimüle eder.²⁵ IL-1 invitro olarak EGF ile sinerjistik olarak çalışarak yara iyileşmesini hızlandırır. IL-1 ayrıca korneal fibroblastlarda KGF ve HGF ekspresyonunu arttırarak epitelyal hücre çoğalmasını arttırır.²⁶⁻²⁷

IL-1 in zararlı etkileri de vardır. MMP enzimlerini indükleyerek korneal stromal meltinge neden olabilir. Hasarlanmış kornea epitelinden salınan IL-1 keratosit apoptozunu uyarır. IL-1, IL-6 üretimini arttırarak lenfosit diferansiasyonunu indükler. IL-1 kornea epiteli ve stromal hücrelerde güçlü bir kemotaktik ve anjiogenik molekül olan IL-8 üretimini arttırır.²⁸ Bu şekilde hasarlanmış korneadan IL-1, IL-6, İnterlökin 8 (IL-8) ekspresyonu stromal melting, hücre infiltrasyonu ve neovaskülarizasyona neden olabilir.

Sonuçta bu sitokinler yara iyileşmesine katkıda bulunurlar fakat aşırı miktarda üretimleri sözü edilen ilave sekonder hasarlara neden olabilir.²⁹

Gözyaşındaki Sitokinler

Oküler yüzey hücreleri inflamatuvar sitokinleri travma veya enfeksiyon olmadan normal şartlar altında da üretirler. IL-1, IL-6, IL-8 bunlardan bazılarıdır ve gözyaşında varlıkları gösterilmiştir.³⁰ Bu da bu sitokinlerin oküler yüzey hücrelerinin homeostasisinde önemli olabileceklerini düşündürmektedir.

2.4.3. Stromal Yara İyileşmesi

Epitel iyileşmesine benzemekle beraber, daha uzun sürer ve kollajen skar dokusu gelişimi ile sonuçlanır. Yara gerginliğine olan direnç stromal iyileşmeyle ilişkilidir.

Hasar sonrasında ilk iki saat içerisinde polimorf nüveli lökositler yara dokusuna ulaşırlar fagositoz yaparlar ve 72 saat sonra geri çekilmeye başlarlar. Mononükleer hücreler ise 12–24 saat içerisinde yara yerine gelir ve fagositoza yardım ederler. Hasar gören epitel tabakanın alt tarafındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. Hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla, iyileşme kaskadı başlamaktadır. Stromal keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedirler.

Hasarlanan epitelde salınan IL-1 stromal iyileşmede önemli rol oynar. Keratositlerden Fas ligand, HGF, KGF, Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve diğer sitokin ve kemokinlerin salınımını uyarır.³¹

Bu sitokinlere verilen cevaplar ile stromal yara iyileşmesinde önemli olan birçok olay tetiklenir. Bunlar keratosit apoptozu ve nekrozu, rezidü keratositlerin aktivasyonu, keratosit proliferasyonu ve miyofibroblast gelişimi ve inflamatuvar hücre göçüdür. Keratosit apoptozu epitel travmasından 4 saat sonra en yüksek düzeydedir ve 1 hafta kadar sürebilir.^{32–33} Keratositlerle birlikte inflamatuvar hücrelerde de apoptoz gözülür. Rezidüel aktive keratositlerin proliferasyonu ve migrasyonu epitel travmasından 12–24 saat sonra başlar. TGF β keratositlerin miyofibroblast dönüşümünü aktive eder.³⁴ Kontraktil özellikte olan miyofibroblastlar travmadan sonra 1–2 hafta kadar subepitelyal stromada bulunabilirler. Bu hücreler keratositlere göre daha fazla miktarda HCG, KGF, kollajen, glikozaminoglikan kollajenaz, jelatinaz ve metalloproteinaz üretirler bu da stromanın yeniden şekillenmesine katkıda bulunur.³⁵ Ekstrasellüler matriks, yara kontraksiyonundan sorumludur ve esas olarak bir skar proteini olan tip III kollajen üretilmektedir. Kollajen sentezi yeterli seviyeye ulaştıktan sonra gerek doku tarafından, gerekse inflamatuvar hücrelerce üretilen kollajenaz enzimleri ile dengede tutulmaktadır. Skarın yeniden şekillenmesi sonrasında tip III kollajen, stromanın normal yapısında olan tip I kollajenin yerine geçer. İlk hafta içerisinde stromada hyaluronik asit üretimi gözülür ve zamanla yerini glikozaminoglikanlardan kondroitin sülfat ve keratan sülfata bırakır. Glikozaminoglikanların yara iyileşmesindeki rolü hücre büyümesi ve hücre hareketi için gerekli olan hidrate ortamı oluşturmaktır.

Ayrıca keratosit hücrelerinden keratosit büyüme faktörü, HGF gibi büyüme faktörleri de salınmaktadır.

Hasar sonrası ikinci haftada kontraktil faz başlar. Kas hücrelerindeki benzer şekilde, miyofibroblastlarda da aktin ve myozin kontraktil ünite oluşur.³⁶

Yukarıda belirtilenler dışında birçok faktör de, stromal yara iyileşmesinde görev almaktadır. Forbol esterlerinin stimüle ettiği kollajenaz stromelisin ve jelatinaz A

salınmaktadır. PDGF, matriks metalloproteinazların (MMP-1 ve 9) salınımını ve fibronektin varlığında korneadaki fibroblastların migrasyonunu arttırmaktadır.³⁷ EGF, insülin benzeri büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörünün (FGF) keratosit hücrelerinin migrasyonunu artırdıkları da çalışmalarla gösterilmiştir. Stromal dokunun iyileşmesi haftalarca sürebilmektedir. Sütüre edilen, epitelden yoksun korneal insizyonlarda gerginliğe dirençte %66 oranında azalma gözlenir. Yara yerinde aşırı epitel birikimi ve direnç göstermesi plak oluşumuna yol açarak yara iyileşmesini geciktirir.³⁸

2.4.4. Endotel Yara İyileşmesi

Kornea endotel hasarı sonrasında, sıvı transport mekanizması bozularak kornea ödemi oluşmaktadır.³⁹ Ölü endotel hücrelerinin yerlerini doldurmak için, komşu endotel hücreleri genişlemekte ve hasar yerine göç etmektedirler. İyileşmenin ilk fazında, yara yerine yakın olan hücreler, 100 µ/gün hızla hareketleri ile göç ederler, kalınlıkları azalır ve genişlerler. Hücreler, göçleri sırasında birbirleriyle temaslarını sürdürmektedirler.⁴⁰

Kornea endotel iyileşmesinde birçok faktör görev almaktadır. Endotel hücrelerinde endotel büyüme faktörü ve platelet derived büyüme faktörü reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. İnsan hücre kültüründe, endotel büyüme faktörünün otokrin etkilerle, endotel hücrelerin dansite artısında ve migrasyonunda etkili olduğu görülmüştür. Platelet derived büyüme faktörü, endotel hücrelerinde DNA sentezini artırırken, endotel yara kapanma süresini kısalmaktadır.⁴¹

2.5. Kornea Avasküleritesi ve Vaskülarizasyonu

Yeni damar oluşumunda (neovaskülarizasyon) üç mekanizma söz konusudur.

1. Vaskülogenezis: Embriyogenez döneminde kemik iliği kaynaklı anjioblastlardan yeni damar oluşumu çoğunlukla embriyogenez aşamasında görülmektedir.⁴²
2. Progenitör vasküler endotelial hücrelerin toplanması ile yeni damar gelişimi. Progenitör vasküler endotelial hücreler periferik matür endotel hücrelerinin öncülleridirler endotelin yenilenmesinde görev yaparlar.⁴³
3. Anjiogenezis: mevcut damarlardan yeni damar gelişimi.⁴⁴⁻⁴⁶

Anjiogenezis tümör gelişimi retina ve kornea neovaskülarizasyonunda söz konusu olan mekanizmadır

Daha önce kanser, anjiogenez araştırmalarında da gösterildiği gibi korneada da anjiogenik faktörler (FGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü [VEGF] gibi) ile antianjiogenik faktörler (anjiostatin, endostatin veya pigment epitel derive faktör [PEDF]) arasında bir denge bulunmaktadır.⁴⁷

Oftalmik arterden çıkan siliyer arterlerin dallanmaları ile limbus bölgesinde perikorneal pleksus oluşur. Kornea neovaskülarizasyonu da perikorneal pleksuste var olan kapiller ve venüllerden başlamaktadır.⁴⁸

Kornea neovaskülarizasyonu klinikte 3 ayrı antite şekilde görülebilir:

1. Descement membranı üzerinde derin stromal neovaskülarizasyon: genellikle herpetik interstisyel keratitte görülür.
2. Stromal neovaskülarizasyon (stromal keratitlerin çoğunda): yapılan birçok çalışmada vaskülarizasyonun stromanın ön ve orta üçte birini tuttuğu gösterilmiştir.
3. Vasküler pannus: oküler yüzey hastalıklardan kaynaklanan periferik yüzeysel korneadaki vaskülarizasyondur.⁴⁹

2.5.1. Epidemiyoloji

Amerika'da yapılan bir çalışmada şu veriler elde edilmiştir. Bir sene içinde 1,4 milyon hastada kornea neovaskülarizasyonu gelişmektedir: toplumun %4'ünde kornea neovaskülarizasyonu bulunmakta ve kornea nakli için elde edilen kornea örneklerinin %20'si histopatolojik olarak vaskülarizasyon göstermektedir.⁵⁰

2.5.2. Risk Faktörleri

Kornea neovaskülarizasyonu yapabilen birçok inflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif ve travmatik bozukluklar vardır (Tablo–1). Kornea skarı, ödemi, yağ birikimleri ve inflamasyonu bu durumun neden olduğu majör oküler komplikasyonlardır. Bu durum sadece görme düzeyini azaltmakla kalmamakta, penetran keratoplastinin sonuçlarını da kötü etkilemektedir. Kornea nakli sonrasında histopatolojik kesitlerde alıcı kornealarda görülen vaskülarizasyonlu olguların %30'u greft reddi ile sonuçlanmaktadır.⁵¹

Tablo–1. Korneal Neovaskularizasyona Neden Olan Hastalıklar

Korneal Neovaskularizasyon nedenleri	Kaynaklar
Kontakt lens kullanma	52
Travma	53
Enfeksiyonlar	54
Lokal immün hastalıklar (atopik keratokonjonktivite)	55
Sistemik immün hastalıklar	56
Dejeneratif hastalıklar	57
İnterstisyel keratitler	58
Stromal ülserasyonlar	59
Limbal hücre yetmezliğine neden olan hastalıklar	60
Kimyasal yanıklar	61
Aniridi	62
Konjenital	63

Korneanın ve konjonktivanın immünolojik ve enfeksiyöz hastalıkları nedeniyle kornea neovaskularizasyonuna neden olan anjiogenik moleküller üretilmektedir. Atopik keratokonjonktivite gibi inflamatuvar hastalıklar nedeniyle uzun süre takip edilen hastaların %60'ında kornea neovaskularizasyonu gelişmektedir.⁵⁵

Enfeksiyöz hastalıklar arasında özellikle Herpes simpleks ve Herpes zoster keratitler primer hastalıkları teşkil eder. Sadece hastanın reaksiyonuna bağlı olmayıp interstisyel, nekrotizan veya tekrarlayan keratit sonrasında da gelişebilen bir komplikasyondur. Korneal neovaskularizasyon genellikle inflamatuvar hastalıklardan kaynaklansa da, dejeneratif hastalıklar (Pterjium ve Terrien marjinal dejenerasyonu) ve konjenital hastalıklar da (Aniridi) neovaskularizasyon oluşturabilmektedir.^{62,63} Bütün enfeksiyöz keratitler kornea neovaskularizasyonuna neden olabilir ancak akantomoeba keratiti en şiddetli formunda bile neovaskularizasyona neden olmamaktadır.⁶⁴ Bu da korneada ki kompleks anjiogenez ve anti anjiogenez dengesini göstermektedir. Anjiogenezin moleküler tabanını anlayabilmek için in vivo ve in vitro birçok çalışma yürütülmektedir. Normal durumda korneal avasküleritenin sağlanması için anjiogenik faktörler ile antianjiogenik faktörler arasında bir denge mevcuttur. Kornea neovaskularizasyon patogenezinde bu dengenin bozulması söz konusudur.

2.5.3. Korneal Neovaskularizasyonda Suçlanan Anjiogenik Moleküller

Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler dengesinde anjiogenik faktörler ağırlık gösterdiği zaman anjiogenez oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; neovaskularizasyon için sadece anjiogenik faktörlerin yükselmesi değil aynı zamanda antianjiogenik faktörlerin azalması da gerekmektedir.⁶⁵

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

VEGF inflame ve vaskularize olmuş insan korneaları ve hayvan modellerinde yükseldiği pek çok çalışmada gösterilmiştir.^{66,67} VEGF ekspresyonunun embriyonik, fizyolojik ve patolojik kan damarı gelişimi ile korele olduğu gösterilmiştir.⁶⁸

VEGF Üretimi ve Regülasyonu

VEGF perisitler, fibroblastlar, keratositler, T hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, astrositler ve düz kas hücreleri tarafından üretilmektedir. VEGF üretimi lokal ve sistemik birçok faktör tarafından düzenlenir bunlar; siklik AMP (cAMP), steroid hormonlar, protein kinaz C agonistleri, polipeptit büyüme faktörleri, sitokinler, oksijen, serbest radikaller, glikoz, kobalt ve demirdir.⁶⁹⁻⁷⁰

VEGF ekspresyonunun majör stimülatörü hipoksi ve hipoglisemidir. Hipoksi VEGF mRNA transkripsiyonuna neden olmaktadır, bu mekanizma hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 isimli molekülün VEGF geninin promoter bölgesi üzerindeki reseptörüne bağlanması ile açıklanmaktadır. VEGF üretimini arttıran diğer faktörler; fibroblast büyüme faktör 4, PDGF, tümör nekrozis faktör (TNF), TGF, KGF, IL-1 ve IL-6'dır. IL-10 ve IL-13 ise VEGF salınımını inhibe eder. VEGF düzeyi yükselmesine neden olan bir diğer molekül nitrik oksit (NO). NO, VEGF'in vazodilatasyon ve damar sızması fonksiyonunu artırır.⁷¹

VEGF İzofomları

Aminoasit dizilisine göre 5 VEGF mRNA izoformu bilinmektedir; bunlar VEGF–115, 121, 165, 189 ve 206'dır. VEGF–121 ve 165 etkin bir şekilde hücre dışına salınırken, VEGF 189 ve 206 çok az miktarda hücre dışına salgılanır. Özellikle VEGF–121 ve 165 izoformları vasküler endotel hücreleri için mitojeniktir.⁷²

VEGF Reseptörleri

Tirozin-kinaz ailesine ait üç çeşit VEGF reseptörü (VEGFR) bulunmaktadır. VEGFR–1, VEGFR–2 ve VEGFR–3. VEGFR–3 lenf damarlarında VEGFR–1 ve VEGFR–2 ise kan damarı endotel hücrelerinde bulunmaktadır.

Vasküler endotel hücrelerinde VEGFR–1 ve VEGFR–2 den bağımsız olarak düşük kitleye sahip farklı reseptörlerde vardır. Bu reseptörlere sadece VEGF–165 izoformu yüksek afinite gösterir. Neurofilin–1 ve neurofilin–2 olarak adlandırılan bu reseptörlerin özellikle yüksek oranlarda prostat ve meme kanserlerinde bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır.⁷³ Bu reseptörler hücre migrasyonundan sorumludur.

VEGFR–1 ve VEGFR–2'in Aktivasyonları ve Biyolojik Etkileri

VEGFR–1 ve 2'nin VEGF ile aktivasyonu hücre migrasyonunu tetikler. Ancak sadece VEGFR–2 hücre proliferasyondan sorumludur.⁷⁴ VEGF reseptörlerin aktivasyonu anjiogenezin ilk adımı olduğu düşünülen proteaz üretimine neden olup kan damarların basal membranının parçalanmasından sorumludur. Ek olarak VEGF proteolitik faaliyeti, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyon ve kapiller tüp formasyonu gibi çok basamaklı anjiogenezi tetiklemektedir. Kornea anjiogenezinde VEGF gereksinimi anti VEGF antikolarıyla ile neovaskülarizasyonun inhibisyonu ile gösterilmiştir.⁷⁵

Fibroblast Büyüme Faktörü

Bir diğer anjiogenik molekül FGF' dür, FGF ailesine ait bir moleküldür. Bunlar hücre diferansiyasyonu, anjiogenez, mitoz ve yara iyileşmesi sırasında vücudun her dokusunda eksprese olur. Fibroblast büyüme faktörünün 4 ayrı reseptörü tanımlanmıştır. Reseptör 1

normal kornea epitelinde bulunur. Reseptör 2 travma sonrasında artmaktadır.⁷⁶ FGF normal korneanın Bowman ve Descemet membranına ve neovaskularizasyon bulunan korneada vasküler basal membrana bağlanmaktadır.⁷⁷

Matriks Metalloproteinazlar

MMP' lar çinko bağlayan proteolitik enzim grubudur, ekstrasellüler matriks yeniden şekillenmesi ve anjiogenezde rol oynamaktadır. 24 değişik MMP tipi bulunmuş, 7 tanesinin korneada varlığı gösterilebilmiştir. Bunlar; kollajenaz I ve III (MMP-1 ve 13), jelatinaz A ve B (MMP-2 ve 9), stromelisin (MMP-3), matrilisin (MMP-7), ve membran tipi MMP (MMP-14).⁷⁸⁻⁸² Bu faktörlerin kornea anjiogenezinde arttığı gösterilmişse de anjiogenez regülasyonunda tam rolü bilinmemektedir çünkü aynı molekül hem anjiogenik hem de antianjiogenik faktör olarak davranmaktadır.

MMP'lerin bu iki yönlü etkisi şöyle açıklanmaya çalışılmaktadır; ekstrasellüler matriksi parçalayarak endotel hücre invazyonunu kolaylaştırarak anjiogenik etki gösterirler öte yandan anjiogenik özellikleri bulunmayan prekürsörleri parçalayarak antianjiogenik fragmanlar oluşturup antianjiogenik madde üretirler.⁸³⁻⁸⁷

İnterlökin-8

IL-8 anjiogenik ve lökosit kemotaksis aktivasyonuna sahip çok fonksiyonlu bir sitokindir. IL-8 kornea inflamasyonu, anjiogenez ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. IL-8 direkt olarak vasküler endotel hücrelerin kemotaksis ve proliferasyonunu gerçekleştirirerek neovaskularizasyonu tetikler.⁸⁸

TGF α , TGF β

TGF α , makrofajlar tarafından üretilen epidermal büyüme faktör ile yapısal benzerliğe sahip olup anjiogenezisi uyarma potansiyeli olan bir büyüme faktörüdür. TGF β ise anjiogeneziste dolaylı yoldan etkilidir. TGF β makrofajların sayıca artmasını, fibroblast aktivasyonunu, dolayısıyla kollajen sentezini sağlamaktadır. Anjiogenezisin geç döneminde makrofaj aracılıklı olarak endotel hücre göçünde ve tüp formasyonunda etkilidirler.⁸⁹

PDGF

Plateletlerden izole edilen bir faktördür. Kemotaksisi ve endotel hücrelerde proliferasyonu sağlamaktadır. Korneada esas hedef hücresi miyofibroblastlardır.⁹⁰

2.5.4. Antiangiogenik Moleküller

Kornea neovaskularizasyonu sırasında, angiogenik faktörlerin yükselmesi ile birlikte anti angiogenik faktörlerin de azalması gerekmektedir. Birçok anti angiogenik molekülün korneada varlığı gösterilmiştir. Bu faktörler ya büyük moleküllerin proteolitik yıkımından ortaya çıkar ya da direkt olarak aktif formunda bulunur.

Anjiostatin

Anjiostatin, plasminojenin MMP lar tarafından parçalanmasıyla açığa çıkan bir moleküldür. Anjiostatin ve anjiostatin benzeri fragmanlar, temel fibroblast büyüme faktörü veya angiogeninin meydana getirdiği kornea neovaskularizasyonu inhibe eder.

Anjiostatin ATP sentetaza bağlanarak vasküler endotelial hücre çoğalmasını ve migrasyonunu inhibe eder ayrıca bu hücrelerde apoptozu indükler.⁹¹

Endostatin

Endostatin Kollajen tip XVIII in (heparan sülfat proteoglikan) proteazlar tarafından (MMP, katepsin L ve elastaz) proteolitik yıkımı sonucu oluşan bir diğer anti angiogenik faktördür. Kollajen tip XVIII, nonfibriler kollajen olup vasküler ve epitelial bazal membranlarda bulunur, gözde ise kollajen tip XVIII retinada (iç limitan membran ve pigment epiteli), lens kapsülü ve korneada bulunur.

Farelerde yapılan in vivo çalışmalarda endostatinin, fibroblast büyüme faktörü-2 ve vasküler endotelial büyüme faktörünün neden olduğu vasküler endotelial hücre göçünü ve proliferasyonunu inhibe edip, tümör progresyonunu azalttığı gösterilmiştir.⁹² Korneada endostatin implantasyonunun, temel fibroblast büyüme faktörünün neden olduğu neovaskularizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Endostatin VEGF'in damar endotelindeki reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder.⁹³

Basal membranda bulunan kollajenden üretilen başka antianjiogenik moleküller de vardır. Kollajen tip IV ten üretilen, kanstatin ve tumstatin molekülleri de antianjiogenik etki gösterirler. Restin Kollajen tip XV (kondroitin sülfat) oluşan diğer bir antianjiogenik moleküldür.^{83-87, 94}

PEDF

PEDF, güçlü anti anjiogenik ve nörotrofik bir faktördür. İlk defa retinoblastom hücrelerinde ve daha sonra retina pigment epitelinde, iris ve korneada bulunmuştur. Pigment epitel kökenli faktöre karşı geliştirilen antikorlar farelerde kornea stromasına implante edildiği zaman, kornea neovaskülarizasyonun oluştuğu izlenmiştir. Rekombinant pigment epitel kökenli faktör, temel fibroblast büyüme faktörüne bağlı kornea neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir.⁹⁵

2.5.5. Tedavi

Korneal neovaskülarizasyonlar görme kaybına neden olan ciddi patolojilerdir. Etiyolojileri tespit edilip tedavisi gereklidir. Mevcut damarların da ortadan kaldırılıp görme kaybının önüne geçilmelidir.

Medikal Tedavi

Steroidler, korneal damarların aktif süpresyonunda hala ilk tedaviyi teşkil etmektedir.^{96,97} Steroidler inflamatuvar hücre kemotaksisini inhibe ederler ve pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezinin inhibe ederler ayrıca vasküler hücre proliferasyonu ve göçünü de inhibe etmektedirler.⁹⁸

Prostaglandinler, kornea yara iyileşmesi ve anjiogenez sırasında üretilmektedir. Deneysel olarak geliştirilen kornea neovaskülarizasyonlarında, fosfolipaz A2 inhibitörü olan steroidler ve sikloksijenaz (COX) inhibitörü olan nonsteroidal anti inflamatuvar ajanlar ile prostaglandin sentezi inhibisyonu sağlanarak kornea neovaskülarizasyonunda belirgin ölçüde azalma sağlanmıştır.⁹⁹

Nonsteroid anti inflamatuvar ajanlar daha çok oküler yüzey hastalıklarında kullanılmaktadır. İndometazin, kornea neovaskülarizasyonu belirgin ölçüde azaltmaktadır.

Yapılan araştırmalarda kornea neovaskularizasyonunda anti anjiogenik özelliği olan başka ajanlarda gösterilmiştir. Bunlardan bazıları; topikal IL-1 reseptör antagonisti¹⁰⁰, oktreotid (uzun etkili somatostatin analogu)¹⁰¹, siklosporin-A¹⁰², FK 506¹⁰³, plazminojen fragmanı¹⁰⁴, spiranolakton¹⁰⁵, talidomid¹⁰⁶, amilorid¹⁰⁷, curcumin¹⁰⁸ ve platelet aktive edici faktör antagonistidir.¹⁰⁹

Cerrahi tedavi

Oküler yüzey restorasyonu

Konjonktival limbal transplantasyon veya amniyon zarı transplantasyonu ile oküler yüzeyin restorasyonudur. Kornea ülseri, neovaskularizasyonu ve konjonktival metaplazisine neden olan ciddi oküler yüzey hasarlarının tedavisinde otogreft limbal transplantasyonu ile başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu teknik başarılı bir şekilde kornea neovaskularizasyonlarında kullanılmıştır. Çift mekanizma ile çalıştığı düşünölmektedir: Kök hücre kaybını azaltmayı takiben anjiogenik stimulusu ortadan kaldırmak ve vasküler endotel hücreleri direkt inhibe etmek.¹¹⁰

Amnion zarı transplantasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda amnion zarı transplantasyonun antianjiogenik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Amnion zarında trombospondin I ve kollajen XVIII gibi anti anjiogenik moleküller bulunmaktadır ve bu moleküller neovaskularizasyonun gerilemesinde rol oynamaktadır.¹¹¹

İnce İğne Diatermi

İnce iğne diatermi tekniği (10-0 monofilaman sütün iğnesi kullanarak) ve unipolar diatermi ünitesidir.¹¹² Bir çalışmada bu teknik 14 hastaya uygulanmış ve kornea neovaskularizasyonlarının %50-100 kapanmasını ve orta düzeyde görme düzelmesini sağladığı gösterilmiştir. 24 aylık takip süresi sonunda hiçbir olguda yan etki izlenmemiştir.

Laser Fotokoagölasyon ve Fotodinamik Tedavi

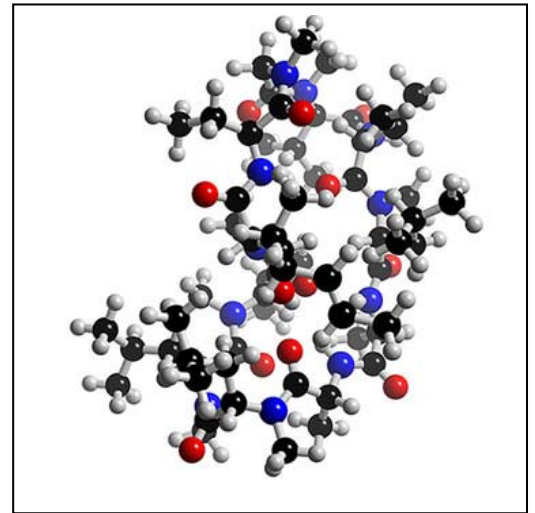
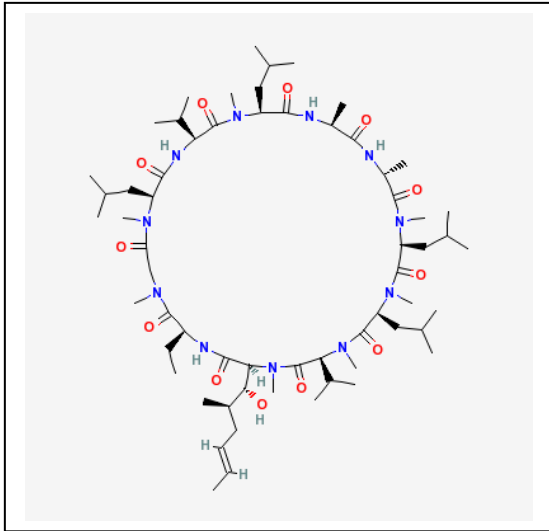
Oluşmuş kornea neovaskularizasyonunun tedavisinde 577 nm sarı lazer fotokoagölasyon kullanılmıştır. Bu tekniğin hayvan modelinde güvenli olduğu gösterilmiř¹¹³ ve daha sonra

insanlarda medikal tedaviye dirençli ciddi kornea neovaskülarizasyonu olan olgularda keratoplasti öncesi ve sonrası denenmiştir. Fakat damarlanmalarda bir miktar gerileme sağlasa da, bu tekniğin yaygın kornea neovaskülarizasyonlarında faydalı olmadığı gösterilmiştir.^{114,115}

Fotodinamik tedavi korneal vaskülarizasyonların tedavisinde kullanımı denenilen başka bir metottur. Fotosensitizer ilaç, intravenöz yolla verilir ve yeni damarlarda birikir, ilacın selektif lazer ile uyarılmasıyla yeni oluşan damarların tıkanması sağlanır. Bu teknik koroidal neovaskülarizasyonların tedavisinde sık kullanılmakta ancak kornea neovaskülarizasyonların tedavisinde henüz hayvan deneyi aşamasındadır. Histolojik çalışmalarda, tedavi edilen kornealarda neovasküler tromboz ve vasküler endotel hücre zedelenmesi izlenmiştir.^{116, 117}

2.5.6. Siklosporin–A'nın Moleküler Yapısı ve Etki Mekanizması

Tolypocladium İnflatum Gams adlı mantardan elde edilen, 11 amino asitli, siklik bir polipeptiddir. Kimyasal formülü C₆₂-H₁₁₁₁-N₁₁-O₁₂'dir (Şekil–1). Yardımcı T lenfositlerin CD4⁺ alt tipini selektif bir şekilde inhibe eder, çoğalmasını ve farklılaşmasını engeller.¹¹⁸



Şekil–1. Siklosporin–A'nın Moleküler Yapısı ve Üç Boyutlu Görünümü.

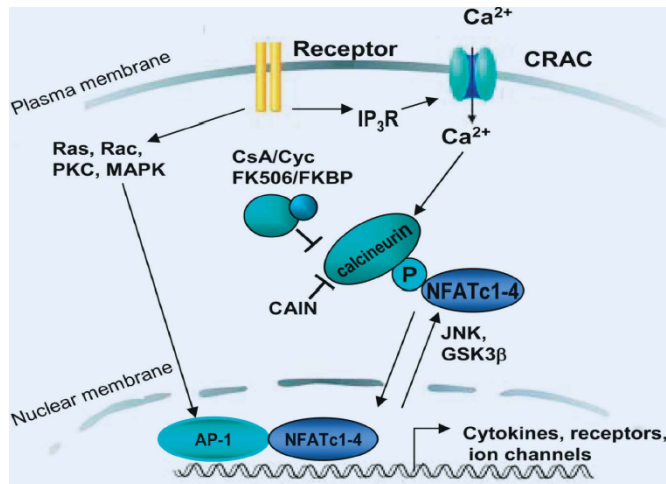
Siklosporin–A'nın immünosupresif etkisinin üç önemli özelliği vardır:

1. Supressör lenfositlerin (CD8⁺) fonksiyonunu bozmaz,
2. Benzer diğer immünosupresiflerin aksine miyelosüpresyon yapmaz,
3. Doğal öldürücü lenfositleri (NK) inhibe etmez.

Makrofajlar ve nötrofiller üzerindeki inhibitör etkinliği yoktur. İntraselüler bir protein grubu olan siklofilin ile immunofilin denilen bir kompleks oluşturur. Daha sonra aşağıda anlatılacak bir dizi reaksiyon sonrası T lenfosit aktivasyonu ve sitokin üretimi için gerekli olan transkripsiyon genlerini ve dolayısı ile protein sentezini etkiler. IL-2, IL-2 reseptörü, IL-3, IL-4, Tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF α) ve gama interferon gibi immün sistemin birçok düzenleyici proteininin yapımını azaltır. Geç oluşan duyarlılık reaksiyonlarını güçlü bir şekilde inhibe eder. B lenfositlerinin antikor üretimini azaltır.¹¹⁹ Siklosporin-A'nın etkisi geri dönüşümlüdür, tedavi kesildiği zaman hücre fonksiyonları geri döner.

Siklosporin-A'nın önce, sitoplazmik bir reseptör olan siklofiline bağlanması gerekir. Siklofilinler, "peptidil prolin sis-trans izomeras" etkinliği gösteren ve hücre çoğalmasına katkıda bulunan, prolinli proteinlerin uygun bir üçüncül yapı kazanmalarını sağlayan enzimlerdir. Siklofilin ile birleşip siklosporin-siklofilin kompleksi oluşturan siklosporin-A, kalsinörin (protein fosfataz 2B) adlı fosfatı inhibe eder. Kalsinörin hücre içinde artan Ca ile aktive olan bir defosfataz enzimi olup aktive T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) adlı ve inaktif durumda sitoplazmada bulunan faktörden fosfat gruplarını kopararak onu aktifleştirir. Aktive NFAT etki yeri olan hücre çekirdeğine girer, çekirdekte IL-2 geninin körükleyici bölgesine bağlanarak gen transkripsiyonunu ve böylece IL-2 üretimini artırır (şekil-2). Bu nedenle siklosporinin kalsinörini inhibe etmesi, NFAT aracılı IL-2 üretimini engelleyerek T lenfositlerinde etkinlik artması ve proliferasyonu önler.¹²⁰

NFAT molekülü endotel hücrelerinde de vardır ve VEGF'in endotel hücrelerinde NFAT'yı artırdığı gösterilmiştir.¹²¹ Ayrıca siklosporin A'nın invivo ve invitro ortamda VEGF aracılıklı anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir.¹²²



Şekil-2. Siklosporin-A'nın Etki Mekanizması.¹²⁰

Çeşitli Siklosporin–A analoglarının ve metabolitlerinin multidrug rezistan tümörlerde rolü olduğu düşünülen bir hücre membran transport proteini olan P-glikoproteini inhibe ettiği gösterilmiştir.¹²³ P-Glikoprotein birçok kemoterapötik ilacı hücre dışına taşıyarak hücre içi konsantrasyonunu azaltan ve multidrug rezistan tümörlerde ekspresyonu artan bir hücre membran proteinidir.

Siklosporin–A mide barsak kanalından kısmen absorbe edilir. Plazmada lipoproteinlere bağlanmış olarak taşınır, reseptör–aracılı endositozla düşük dansiteli lipoprotein reseptörü taşıyan hücrelere girebilir. Karaciğerde metabolize edilmek suretiyle elimine edilir. Metabolitleri büyük ölçüde safra ile atılır. Terminal yarılanma ömrü sağlıklı insanlarda 6 saat iken karaciğer hastalarında 20 saate kadar uzayabilir.¹¹⁸

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan etik kurul onayı alındı. Çalışmaya 200–250 g arasında ağırlığı bulunan 6 aylık 24 adet albino wistar rat alındı. Çalışma süresinde hayvanlar uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde aynı laboratuvarında tutuldu. Her hayvanın yalnızca sağ gözü kullanıldı.

3.1.1. Anestezi

Deneklere genel anestezi, Ketamin Hidroklorid (Ketalar flakon) 25 mg/kg dozda intraperitoneyal enjeksiyonu ile yapıldı. Topikal anestezi için %0,5'lik Proparokain Hidroklorid (HCl) (Alcaine) uygulandı.

3.1.2. Gruplar

Her hayvanın yalnızca sağ gözü kullanılarak deneysel kornea neovaskularizasyonu oluşturmak için her hayvana aynı işlem ile genel anestezi altında elektrokoterizasyon uygulandı. Deneklerin bir kısmına elektrokoterizasyon sonrası subkonjonktival siklosporin enjeksiyonu yapıldı. Bir kısmı ise tedavisiz bırakılarak kontrol grubu oluşturuldu.

Denekler aldıkları tedaviye göre 4 gruba ayrıldı. Deneye her grupta 6 denek ile başlandı. Grup 2 ve grup 4 ten birer adet denek deneyin 3. haftasında kafesinde ölü bulunması nedeniyle çalışma dışında bırakıldı.

Grup 1: 0,5 mg/0,01 cc subkonjonktival siklosporin (n=6)

Grup 2: 0,25 mg/0,01 cc subkonjonktival siklosporin (n=5)

Grup 3: 0,125 mg/0,01 cc subkonjonktival siklosporin (n=6)

Grup 4 (kontrol grubu): Tedavisiz bırakıldı. (n=5)

3.1.3. Korneaya Elektrokoterizasyon Yapılması

Kornea neovaskularizasyonu oluşturmak için Bhatt ve ark.'nın transskleral diyatermi ile koryoretinal skar oluşturmakta etkili olduğunu gösterdikleri bir tür modifiye diyatermi elektrodu ile korneaya elektrokoterizasyon yapıldı.¹²⁴ Bildirilen diğer korneal vaskularizasyon metodları şunlardır; korneada alkali yanık oluşturulması, VEGF veya FGF içeren mini hapların kornea stroması içinde oluşturulan bir cebe gömülmesi, mekanik limbal travma oluşturulması.¹²⁵

Elektrokoterizasyon için kullanılan cihaz; 'Bovie Change A-Tip' (AARON MEDICAL Florida USA) Resim-1'de gösterilmiştir. Ratların sağ gözlerinin kornealarına sırasıyla saat 12-3-6-9 hizasında periferik korneada, limbusa 1 mm uzaklıkta elektrokoter dokundurulduktan sonra koterin düğmesine basılıp 5 saniye süreyle koterizasyon yapıldı (Resim-2). Ardışık iki koterizasyon arasında koter ucunun soğuması için 10 saniye beklenildi.

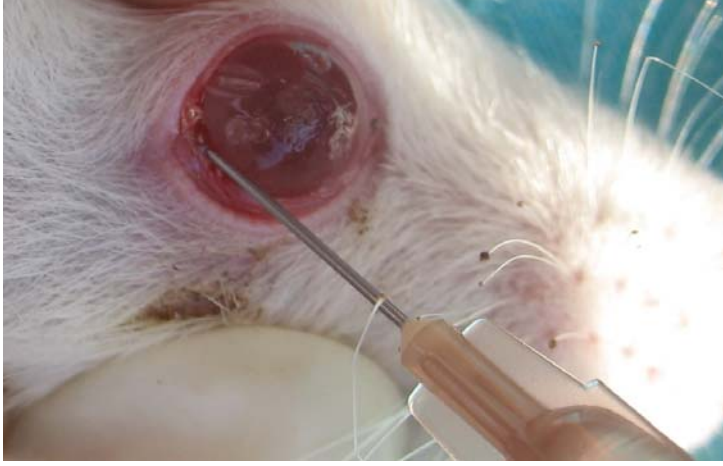


Resim-1. Bovie Change A-Tip Koter (AARON MEDICAL Florida USA).



Resim-2. Elektrokoterizasyon. Periferik korneada, limbusa 1 mm uzaklıkta elektrokoterizasyon yapılması

Dört noktada koterizasyon tamamlandıktan sonra temporal bulber konjonktiva altına Grup 1, 2 ve 3'te belirtilen aşağıda belirtilen dozlarda siklosporin 0,01 cc volüm içinde enjekte edildi (Resim-3). İşlem sonunda kornea yüzeyi 10 mL izotonik solüsyonla yıkandı ve topikal Ofloksasin (Okacin) damla damlatıldı.



Resim-3. Temporal Bulber Konjonktiva Altına Siklosporin A Enjeksiyonu

3.1.4. Siklosporinin Hazırlanması ve Subkonjonktival Enjeksiyonu

Subkonjonktival ilaçlar 50 mg/mL Sandimmun IV ampulden hazırlandı. İlacın bu ticari formunda prospektüs bilgisi olarak serum fizyolojik veya %5 glikoz solüsyonu ile dilüsyonla IV infüzyon şeklinde kullanım önerilmekteydi, bu yüzden Grup 2 ve Grup 3 te ilaç dozları hazırlanırken dilüsyon için serum fizyolojik kullanıldı.

İlaçlar şu şekilde hazırlandı;

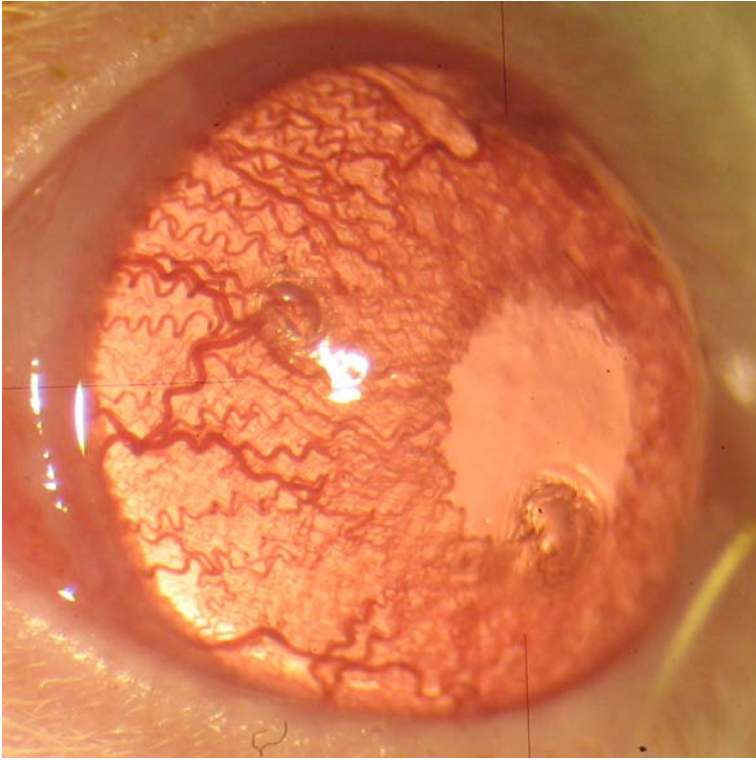
Grup 1 için 50mg/mL'lik sandimmun ampulden 0,01 cc alınarak 0,5 mg/0,01cc'lik siklosporin-A elde edildi.

Grup 2 için 50mg/mL'lik 1 mL sandimmun ampul 1 mL serum fizyolojik ile karıştırıldı ve bu karışımdan 0,01 cc alınarak 0,25 mg/0,01 cc'lik siklosporin-A elde edildi.

Grup 3 için 50mg/mL'lik 1mL sandimmun ampul 3 mL serum fizyolojik ile karıştırıldı ve bu karışımdan 0,01 cc alınarak 0,125 mg/0,01 cc'lik siklosporin-A elde edildi.

3.1.5. Muayene ve Enükleasyon

6 haftalık takip süresinden sonra deneklere aynı şekilde anestezi yapıldı ve ameliyat mikroskobu altında kornealar muayene edildi (Resim-4). Vaskülarizasyonun korneanın ne kadarını tuttuğu (360 derece üzerinden derece olarak) ve ana kan damarı sayısı tespit edildi. Muayene ardından deneklere enükleasyon yapıldı göz küreleri %10'luk formaldehit solüsyonuna koyuldu. Denekler enükleasyonun ardından intraperitoniyal 1cc Xylazine (Rompun) verilerek solunum arresti ile sakrifiye edildi.

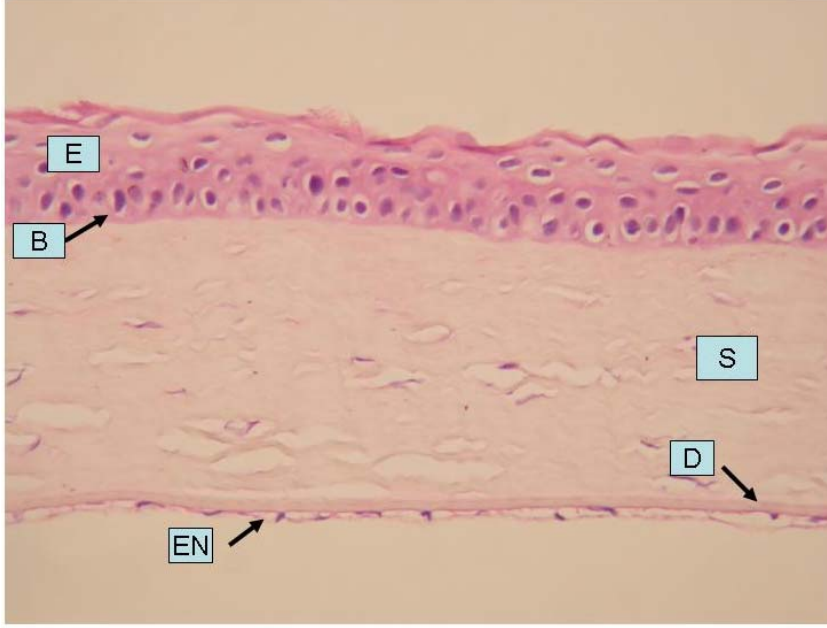


Resim-4. Ameliyat Mikroskobu Altında Korneaların Muayenesi

3.1.6. Histopatolojik İnceleme

Göz küreleri fiksasyon için 1 gün %10'luk formaldehit içinde bekletildi. Daha sonra artan alkol derecelerinden geçirilerek dehidrate edildi. Kornealar limbustan 1 mm uzakta

sklara dahil edilecek şekilde eksize edildi. Her kornea, merkezinden geçen ve limbustan limbusa uzanan bir kesi ile ikiye bölünerek bu kesit yüzeyleri altta kalacak şekilde yan dik olarak parafin bloklar haline getirildi. Her kornea yarımından birbirine eşit uzaklıklarla üç kesit alınarak her bir kornea toplam 6 kesit yüzeyinde incelendi. Her kesit yüzeyinde 40x10 luk büyütmede inceleme ile damar sayımı yapıldı (Resim-5).



Resim-5. Histopatolojik İncelemede Normal Kornea Kesiti. Bu kesit Grup 1'e ait bir ratın korneasından skar ve vaskülarizasyonun olmadığı bir bölgeden geçen, normal kornea tabakalarını göstermek için alınan bir kesittir. Epitel (E), Bowman membranı (B), Stroma (S), Descemet Membran (D), Endotel (EN) ile gösterilmiştir.

3.1.7. İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel analiz için denek sayısı 30'un altında olduğu ve dağılım düzenli olmadığı için nonparametrik testler kullanıldı. Kruskal-Wallis testi ile gruplar arasında fark olup olmadığına bakıldı. Gruplar arasında fark tespit edildi ($p=0,001$). İkili grup karşılaştırmaları için Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi olarak $p<0,05$ kullanıldı. Bütün istatistik analizleri SPSS istatistiksel analiz programı (SPSS 13 for Windows) üzerinde yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Korneal Muayene Bulguları

Tablo-1. Grup 1 Korneal Muayene Bulguları.

Denek adı	Vaskülarizasyon alanı (360 derece üzerinden)	Ana dal sayısı
Grup 1-1	30 derece vaskülarizasyon	10 adet ana dal
Grup 1-2	30 derece vaskülarizasyon	8 adet ana dal
Grup 1-3	30 derece vaskülarizasyon	15 adet ana dal
Grup 1-4	20 derece vaskülarizasyon	5 adet ana dal
Grup 1-5	100 derece vaskülarizasyon	25 adet ana dal
Grup 1-6	90 derece vaskülarizasyon	40 adet ana dal

Tablo–2. Grup 2 Korneal Muayene Bulguları.

Denek adı	Vaskülarizasyon alanı (360 derece üzerinden)	Ana dal sayısı
Grup 2–1	210 derece vaskülarizasyon	22 adet ana dal
Grup 2–2	180 derece vaskülarizasyon	20 adet ana dal
Grup 2–3	150 derece vaskülarizasyon	26 adet ana dal
Grup 2–4,	100 derece vaskülarizasyon	16 adet ana dal
Grup 2–5	30 derece vaskülarizasyon	5 adet ana dal

Tablo-3. Grup 3 Korneal Muayene Bulguları

Denek adı	Vaskülarizasyon alanı (360 derece üzerinden)	Ana dal sayısı
Grup 3-1	30 derece vaskülarizasyon	7 adet ana dal
Grup 3-2	90 derece vaskülarizasyon	23 adet ana dal
Grup 3-3	110 derece vaskülarizasyon	20 adet ana dal
Grup 3-4	150 derece vaskülarizasyon	36 adet ana dal
Grup 3-5	120 derece vaskülarizasyon	42 adet ana dal
Grup 3-6	90 derece vaskülarizasyon	32 adet ana dal

Tablo-4. Grup 4 (Kontrol Grubu) Korneal Muayene Bulguları.

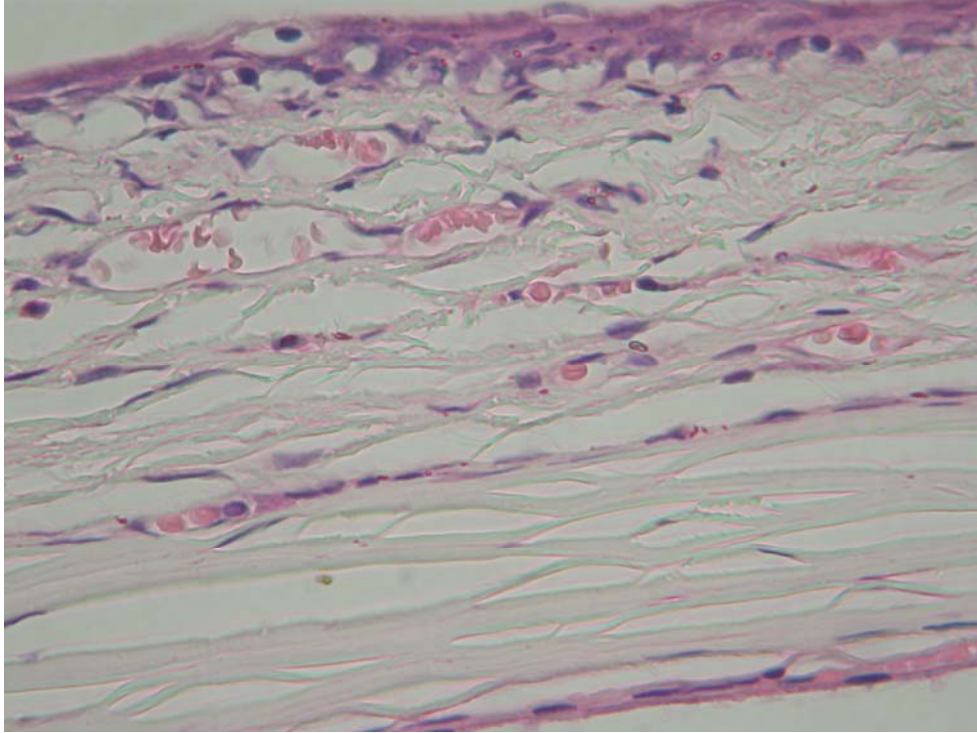
Denek adı	Vaskülarizasyon alanı (360 derece üzerinden)	Ana dal sayısı
Grup 4-1	300 derece vaskülarizasyon	90 adet ana dal
Grup 4-2	360 derece vaskülarizasyon	110 adet ana dal
Grup 4-3	250 derece vaskülarizasyon	80 adet ana dal
Grup 4-4	200 derece vaskülarizasyon	70 adet ana dal
Grup 4-5	110 derece vaskülarizasyon	65 adet ana dal

İstatistiksel analiz yapılırken vaskülarizasyon derecesi yüzdeye çevrilerek vaskülarize alan yüzdesi üzerinden hesaplamalar yapıldı.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Tablo-5. Grup 1 Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı.

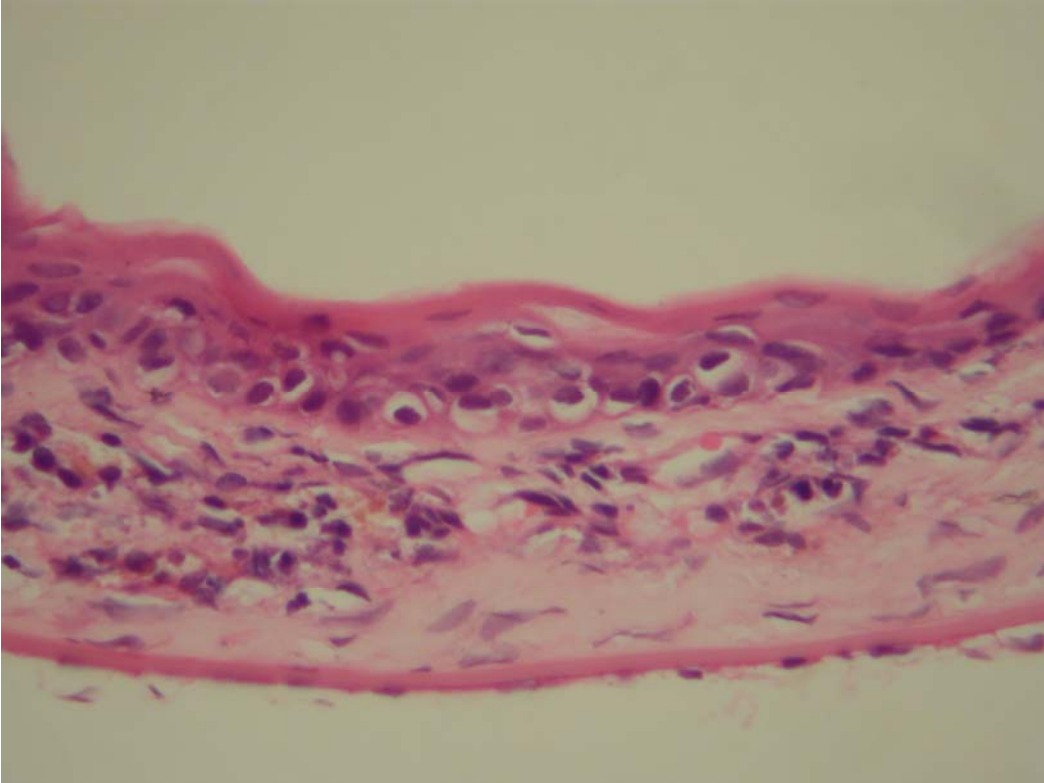
Denek adı	Toplam Damar Sayısı
Grup 1-1	4
Grup 1-2	3
Grup 1-3	12
Grup 1-4	2
Grup 1-5	45
Grup 1-6	34



Resim-6. Grup 1'e Ait Bir Ratın Kornea Kesiti. İçinde eritrositlerin izlendiği vasküler yapılar görülmektedir.

Tablo-6. Grup 2 Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı

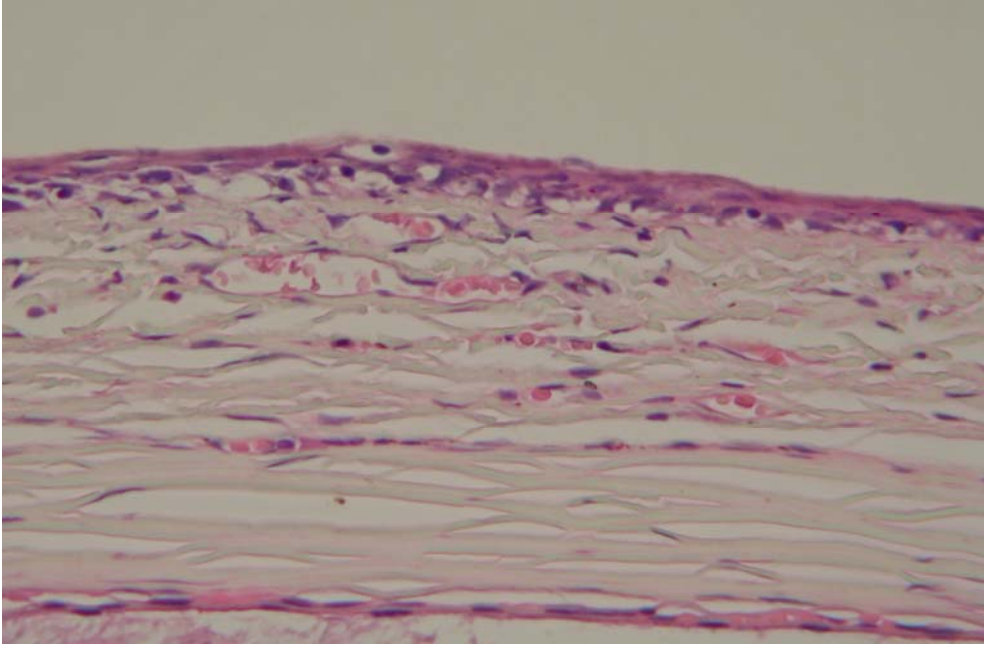
Denek adı	Toplam damar sayısı
Grup 2-1	73
Grup 2-2	53
Grup 2-3	78
Grup 2-4	81
Grup 2-5	16



Resim-7. Grup 2'ye Ait Bir Ratın Kornea Kesiti. Lümenlerinde eritrositlerin izlendiği vasküler yapılar ve artmış sayıda nötrofil lökositler görülmektedir.

Tablo-7. Grup 3 Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı.

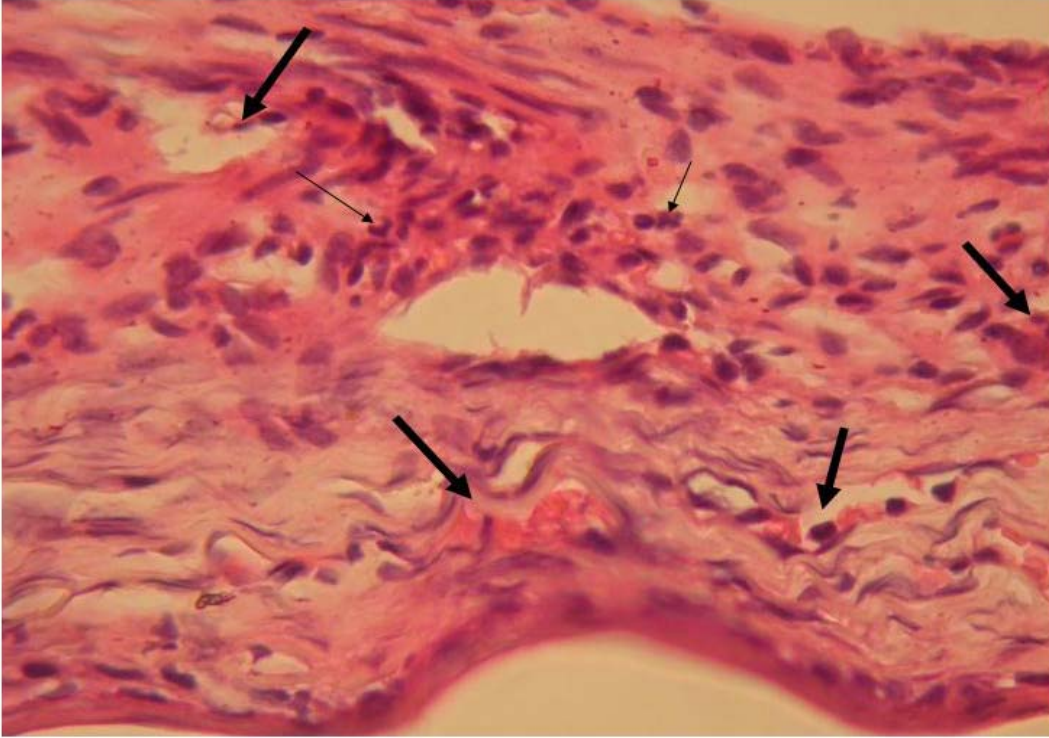
Denek adı	Toplam damar sayısı
Grup 3-1	18
Grup 3-2	38
Grup 3-3	46
Grup 3-4	64
Grup 3-5	80
Grup 3-6	57



Resim-8. Grup 3'e Ait Bir Ratın Kornea Kesiti. Grup 1 ve 2 ile benzer yoğunlukta vasküler yapılar ve inflamatuvar hücreler.

Tablo–8. Grup 4 (Kontrol Grubu) Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı

Denek adı	Toplam Damar sayısı
Grup 4–1	145
Grup 4–2	118
Grup 4–3	332
Grup 4–4	351
Grup 4–5	132



Resim–9. Grup 4'e (Kontrol Grubu) Ait Bir Ratın Kornea Kesiti. Çalışma gruplarıyla karşılaştırıldığında vaskülarite (kalın ok) ve inflamasyon göstergesi olan polimorf nüveli lökositlerde (ince ok) belirgin artış.

4.3. Grupların Karşılaştırma Sonuçları

İkili grup karşılaştırmalarının sonuçlarından elde edilen veriler aşağıda tablolar halinde gösterilmiştir.

Tablo–9. Grup 1 ve Grup 2'nin Karşılaştırma Sonuçları.

	Grup 1	Grup 2	p değeri
Korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı	Ortalama: 17,16 Standart deviasyon: 13,19 Ortanca: 12 Minimum: 5 Maksimum: 40	Ortalama: 17,80 Standart deviasyon: 8,01 Ortanca: 20 Minimum: 5 Maksimum: 26	0,662
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	Ortalama: 16,66 Standart deviasyon: 18,37 Ortanca: 8 Minimum: 2 Maksimum: 45	Ortalama: 60,20 Standart deviasyon: 27,01 Ortanca: 73 Minimum: 16 Maksimum: 81	0,017
Korneal muayenede vaskülarize alan yüzdesi	Ortalama: 13,88 Standart deviasyon: 9,78 Ortanca: 8,33 Minimum: 5,56 Maksimum: 27,78	Ortalama: 37,22 Standart deviasyon: 19,70 Ortanca: 41,66 Minimum: 8,33 Maksimum: 58,33	0,052

Bonferoni düzeltilmiş Mann–Whitney U testine göre verilerin hiçbirisinde iki grup arasında anlamlı fark yoktur.

Tablo–10. Grup 1 ve Grup 3'ün Karşılaştırma Sonuçları.

	Grup 1	Grup 3	P değeri
Korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı	Ortalama: 17,16 Standart deviasyon: 13,19 Ortanca: 12 Minimum: 5 Maksimum: 40	Ortalama: 26,66 Standart deviasyon: 12,61 Ortanca: 27,50 Minimum: 7 Maksimum: 42	0,310
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	Ortalama: 16,66 Standart deviasyon: 18,37 Ortanca: 8 Minimum: 2 Maksimum: 45	Ortalama: 50,50 Standart deviasyon: 21,57 Ortanca: 51,50 Minimum: 18 Maksimum: 80	0,015
Korneal muayenede vaskülarize alan yüzdesi	Ortalama: 13,88 Standart deviasyon: 9,78 Ortanca: 8,33 Minimum: 5,56 Maksimum: 27,78	Ortalama: 27,31 Standart deviasyon: 11,16 Ortanca: 27,77 Minimum: 8,33 Maksimum: 41,67	0,065

Bonferoni düzeltmeli Mann–Whitney U testine göre verilerin hiçbirisinde iki grup arasında anlamlı fark yoktur.

Tablo–11. Grup 1 Ve Grup 4’ün Karşılaştırma Sonuçları.

	Grup 1	Grup 4	p değeri
Korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı	Ortalama: 17,16 Standart deviasyon: 13,19 Ortanca: 12 Minimum: 5 Maksimum: 40	Ortalama: 83,00 Standart deviasyon: 17,88 Ortanca: 80,00 Minimum: 65 Maksimum: 111,00	0,004
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	Ortalama: 16,66 Standart deviasyon: 18,37 Ortanca: 8 Minimum: 2 Maksimum: 45	Ortalama: 215,60 Standart deviasyon: 115,52 Ortanca: 145,00 Minimum: 118,00 Maksimum: 351,00	0,004
Korneal muayenede vaskülarize alan yüzdesi	Ortalama: 13,88 Standart deviasyon: 9,78 Ortanca: 8,33 Minimum: 5,56 Maksimum: 27,78	Ortalama: 67,77 Standart deviasyon: 26,54 Ortanca: 69,44 Minimum: 30,56 Maksimum: 100,00	0,004

Bonferoni düzeltmeli Mann–Whitney U testine göre verilerin üçünde de iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark vardır. Grup 1’deki korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı, vaskülarizasyon yüzdesi ve histopatolojik incelemede toplam damar sayısı Grup 4 yani kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur.

Tablo–12. Grup 2 ve Grup 3'ün Karşılaştırma Sonuçları

	Grup 2	Grup 3	P değeri
Korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı	Ortalama: 17,80 Standart deviasyon: 8,01 Ortanca: 20 Minimum: 5 Maksimum: 26	Ortalama: 26,66 Standart deviasyon: 12,61 Ortanca: 27,50 Minimum: 7 Maksimum: 42	0,270
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	Ortalama: 60,20 Standart deviasyon: 27,01 Ortanca: 73 Minimum: 16 Maksimum: 81	Ortalama: 50,50 Standart deviasyon: 21,57 Ortanca: 51,50 Minimum: 18 Maksimum: 80	0,465
Korneal muayenede vaskülarizasyon yüzdesi	Ortalama: 37,22 Standart deviasyon: 19,70 Ortanca: 41,66 Minimum: 8,33 Maksimum: 58,33	Ortalama: 27,31 Standart deviasyon: 11,16 Ortanca: 27,77 Minimum: 8,33 Maksimum: 41,67	0,270

Bonferoni düzeltmeli Mann–Whitney U testine göre verilerin hiçbirisinde iki grup arasında arasında anlamlı fark yoktur.

Tablo–13. Grup 2 ve Grup 4'ün Karşılaştırma Sonuçları

	Grup 2	Grup 4	P değeri
Korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı	Ortalama: 17,80 Standart deviasyon: 8,01 Ortanca: 20 Minimum: 5 Maksimum: 26	Ortalama: 83,00 Standart deviasyon: 17,88 Ortanca: 80,00 Minimum: 65 Maksimum: 111,00	0,008
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	Ortalama: 60,20 Standart deviasyon: 27,01 Ortanca: 73 Minimum: 16 Maksimum: 81	Ortalama: 215,60 Standart deviasyon: 115,52 Ortanca: 145,00 Minimum: 118,00 Maksimum: 351,00	0,008
Korneal muayenede vaskülarizasyon yüzdesi	Ortalama: 37,22 Standart deviasyon: 19,70 Ortanca: 41,66 Minimum: 8,33 Maksimum: 58,33	Ortalama: 67,77 Standart deviasyon: 26,54 Ortanca: 69,44 Minimum: 30,56 Maksimum: 100,00	0,095

Bonferoni düzeltmeli Mann–Whitney U testine göre Grup 2'deki korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı ve histopatolojik incelemede toplam damar sayısı kontrol grubuna (Grup 4) göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur. Fakat vaskülarizasyon yüzdesi karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel anlamlı farka rastlanmamıştır.

Tablo–14. Grup 3 ve Grup 4'ün Karşılaştırma Sonuçları

	Grup3	Grup4	P değeri
Korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı	Ortalama: 26,66 Standart deviasyon: 12,61 Ortanca: 27,50 Minimum: 7 Maksimum: 42	Ortalama: 83,00 Standart deviasyon: 17,88 Ortanca: 80,00 Minimum: 65 Maksimum: 111,00	0,004
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	Ortalama: 50,50 Standart deviasyon: 21,57 Ortanca: 51,50 Minimum: 18 Maksimum: 80	Ortalama: 215,60 Standart deviasyon: 115,52 Ortanca: 145,00 Minimum: 118,00 Maksimum: 351,00	0,004
Korneal muayenede vaskülarizasyon yüzdesi	Ortalama: 27,31 Standart deviasyon: 11,16 Ortanca: 27,77 Minimum: 8,33 Maksimum: 41,67	Ortalama: 67,77 Standart deviasyon: 26,54 Ortanca: 69,44 Minimum: 30,56 Maksimum: 100,00	0,017

Bonferoni düzeltmeli Mann–Whitney U testine göre Grup 3'deki korneal muayenede vaskülarizasyonlarda ki ana dal sayısı ve histopatolojik incelemede toplam damar sayısı kontrol grubuna (Grup 4) göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur. Fakat vaskülarizasyon yüzdesi karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel anlamlı farka rastlanmamıştır.

Sonuç olarak ikili grup karşıştırmalarında siklosporin tedavisi alan grupların hepsinde histopatolojik incelemede toplam damar sayısı, ameliyat mikroskobu altında yapılan damar sayımında bulunan ana dal sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük saptandı. Fakat vaskülarize alan yüzdesi sadece Grup 1 ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında farklı saptandı. Grup 1 deki vaskülarize alan yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel anlamlı düzeyde düşük bulundu. Farklı siklosporin dozları alan gruplar arasında sözü edilen üç parametrenin hiç birinde istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Kornea neovaskularizasyonları görme kaybına neden olan ve hatta ciddi vakalarda keratoplastinin başarısını düşüren patolojilerdir. Kornea neovaskularizasyonu çeşitli mekanizmalarla görmeyi azaltır ve tedavi ihtiyacı doğurur. Bu mekanizmalar şöyle sıralanabilir.¹²⁵

1. Damarlar içinde dolaşan kan hücrelerinin neden olduğu opasite
2. Damar duvarlarının neden olduğu yapısal bozukluk nedeniyle gelişen yüksek sıralı vizüel aberasyonlar
3. Kan damarları arasındaki stromal kollajendeki düzenli dizilimin bozulması
4. Damarlardan sızan sıvı ve lipit depolanması sonucu opasite oluşması
5. Yüzeysel pannus var ise oküler yüzey bozulması nedeniyle görme bozulur.

Oluşmuş neovaskularizasyonların tedavisi ile birlikte, enfeksiyöz keratitlerin tedavisi, iatrojenik kornea neovaskularizasyonunda sütün veya kontakt lensin çıkarılması, meibomian bezi disfonksiyonunda lubrikasyon ve göz kapağın hijyeni, atopik dermatitlerde allerjenden uzak durmak ve oküler skatrisyel pemfigoidde sistemik immünosupresan tedavi gibi altta yatan nedenlere yönelik tedaviler ve kornea neovaskularizasyonuna neden olan spesifik hastalıkların tedavi edilmesi gerektiği unutulmamalıdır.

Mevcut damarların ortadan kaldırılması için en yaygın kullanılan tedavi yöntemi topikal steroidlerdir. Topikal steroid tedavisi etkin olmakla birlikte birçok yan etkisi bulunmakta ve uzun süreli kullanımı mümkün olmamaktadır. Topikal steroid tedavisinin en önemli yan etkileri glokom, katarakt gelişimi ve enfeksiyon riskidir. Özellikle steroid duyarlı kişilerde glokom gelişme riski oldukça yüksektir.

Steroidler kabul gören yaygın tedavi olmalarına karşın anjiogenezi direkt olarak inhibe etmezler.¹²⁶ İnflamasyon tarafından tetiklenmeyen neovaskularizasyonlarda örnek olarak tümörlerde ve civciv embriyosunda koryoallantoik membran gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda anjiogeneze etkilerin olmadığı veya çok az etkisi bulunduğu gösterilmiştir.¹²⁷⁻¹²⁸ İnflamasyon ve neovaskularizasyon birbiriyle ilişkili fakat ayrı süreçlerdir. Korneal inflamasyon her zaman neovaskularizasyonla beraber değildir, örneğin akantomoeba keratitinin en şiddetli formunda bile korneal vaskularizasyon görülmez.⁶⁴ Ayrıca korneal inflamasyon

olmadan da neovaskularizasyonun olduğu klinik durumlar (oküler yüzey tümörleri gibi) vardır.

Korneal vaskularizasyonların tedavisinde kullanımı denenen bir diğer ilaç grubu VEGF antikorlarıdır. Bu grup ilaçlar içinde olan bevakizumap ile yapılan çeşitli çalışmalar vardır. Bevakizumap yaşa bağlı makula dejenerasyonunda koroidal neovaskularizasyonların tedavisinde ve proliferatif diabetik retinopatide retinal neovaskularizasyonların tedavisinde intravitreal enjeksiyon yoluyla uygulanan bir VEGF antikoruğur. Manzano ve ark. çalışmasında kimyasal yanıkla oluşturulan deneysel korneal neovaskularizasyonda 4 mg/mL topikal Bevacizumab ile tedavi ettikleri grupta kontrol grubuna göre vaskularizasyonda %40 azalma bildirmişlerdir.¹²⁹ Bock ve ark. aşırı korneal neovaskularizasyonları bulunan ve konvansiyonel tedavilerden fayda görmeyen 5 hastayı günde 2 kez 4 mg/mL topikal Bevacizumab ile tedavi etmiş 3,6 ay sonunda ortalama %48 damarlanma alanında azalma saptamışlardır.¹³⁰

Siklosporin–A'nın lokal uygulamasında ciddi komplikasyonlara rastlanmamaktadır. Siklosporinin keratokonjktivitis sikka ve korneal graft reddi için kullanılan ticari damla formu mevcut olmakla birlikte perioküler veya intravitreal enjeksiyon için herhangi bir ticari formu bulunmamaktadır.

Biz çalışmamızda 0,125 mg, 0,25 mg ve 0,5 mg'lık subkonjktival siklosporin enjeksiyonlarının her birinin deneysel korneal neovaskularizasyon gelişiminde oluşan yeni damar sayısını hem histopatolojik incelemede hem de ameliyat mikroskobu altındaki muayenelerde ki sayımında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalttığımızı tespit ettik. Farklı konsantrasyonlarda ki uygulamaların arasında istatistiksel anlamlı fark saptamadık. İlave olarak grup 1'de yani 0,5 mg subkonjktival siklosporin–A enjeksiyonu yapılan grupta ameliyat mikroskobu altında muayenede tespit edilen neovasküler alanın bütün kornea yüzeyine oranıyla tespit edilen neovaküler alan yüzdesinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Grup 2 ve Grup 3'te neovasküler alan yüzdesi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Grup 2 ve Grup 3'te yani 0,25 mg ve 0,125 mg subkonjktival siklosporin A enjeksiyonu yapılan ratlarda neovasküler alan yüzdesinin değişmemesi fakat damar sayılarının azalması göstermektedir ki bu ratlarda damarlanma yoğunluğu azalmıştır.

Siklosporin–A'nın neovaskularizasyonu azalttığına yönelik literatürde birçok çalışma mevcuttur. Siklosporin–A'nın endotelial progenitör hücrelerde (EPC) proliferasyonu inhibe ettiği, apoptozisi arttırdığı saptanmıştır. Yang ve ark. çalışmasında periferik kandan izole

edilen EPC kültürlerinde siklosporin-A'nın EPC'lerin proliferasyonunu doza bağımlı olarak azalttığını göstermişlerdir.¹³¹ Ayrıca bu çalışmada siklosporin-A'nın EPC'lerin apoptozisini arttırdığı da gösterilmiştir. Yine bu çalışmada EPC'lerde NO sentetaz enziminin ve NO üretiminin siklosporin-A tarafından azaltıldığı da gösterilmiştir. NO sentetaz veya NO üretiminin anjiogeneze katkıda bulunduğu, VEGF düzeyini ve EPC proliferasyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.¹³²⁻¹³³ Bu nedenle Yang ve ark. çalışmalarında siklosporin-A'nın EPC lerdeki proliferasyonu önleme ve apoptozisi artırıcı etkisinin NO sentetaz inhibisyonu üzerinden gerçekleştiğini öngörmüşlerdir.

Siklosporin-A'nın antianjiogenik mekanizması üzerine bir diğer çalışma da Hernandez ve ark. çalışmasıdır. Çalışmada siklooksijenaz 2 enziminin siklosporin-A'nın anjiogenezi inhibe etmesine aracılık ettiği üzerinde durulmaktadır.¹²² Siklooksijenaz enzimlerini bloke eden non-steroid anti inflamatuvar ilaçların anjiogenezi inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.^{134,135} Hernandez ve ark. çalışmalarında siklosporin-A'nın, umbilikal venden elde edilen endotelial hücrelerin invitro ortamda VEGF aracılıklı endotelial hücre migrasyonu ve anjiogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir. VEGF'in endotelial hücrelerde siklooksijenaz enziminin üretimini NFAT aktivasyonu ile artırdığı yine bu çalışmada gösterilmiş ve siklosporin-A'nın antianjiogenik etkisinde bu molekülün de rolü olabileceğine dikkat çekilmiştir. Ayrıca Hernandez ve ark. nın çalışmalarında vurgulanması gereken bir diğer önemli bulgu da şudur; farelerde siklosporin-A'nın VEGF ile uyarılan deneysel korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği fakat FGF ile uyarılan deneysel korneal neovaskülarizasyonu inhibe etmediğidir. Bu bulgu göstermektedir ki siklosporin-A'nın antianjiogenik özelliği VEGF ile tetiklenen mekanizmalar üzerinden çalışmaktadır. Daha önce bahsedilen Yang ve ark. nın çalışması da bunu desteklemektedir, çünkü bu çalışmada EPC'lerde NO sentetaz enziminin ve NO üretiminin siklosporin tarafından azaltıldığı gösterilmiştir ve NO VEGF üretimini artıran bir moleküldür.

VEGF üretiminde rolü olan bir diğer molekül cAMP'dir. Cho ve ark. sinoviyal sıvı fibroblastlarında siklosporin-A'nın hücre içi cAMP düzeyini artırarak VEGF üretimini azalttığını göstermişlerdir.¹³⁶

Siklosporin-A'nın antianjiogenik etkisine aracılık edebilecek diğer bir molekül ise P-glikoproteindir. P-Glikoprotein birçok kemoterapötik ilacı hücre dışına taşıyarak hücre içi konsantrasyonunu azaltan ve multidrug rezistan tümörlerde ekspresyonu artan bir hücre membran proteindir.¹²³ P-glikoprotein ekspresyonunun inhibisyonu ile beyinde endotelial anjiogenez ve hücre migrasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir.¹³⁷ Çeşitli Siklosporin-A

analoglarının ve metabolitlerinin P-glikoproteini inhibe ettiği gösterilmiştir.^{123,138} Bu nedenle siklosporin-A veya metabolitleri P-glikoprotein inhibisyonu ile antianjiyogenik etki gösteriyor olabilirler.

Siklosporin-A'nın korneal neovaskülarizasyonda etkili olduğunu gösteren ve etki mekanizmasını araştıran yukarıda sözü edilen moleküler çalışmaların yanında pek çok deneysel ve klinik çalışmada da siklosporin-A'nın korneal neovaskülarizasyonların tedavisinde etkilili olduğu gösterilmiştir. Rehany ve Waisman yaptıkları çalışmada alkali yanık sonucu yaygın korneal neovaskülarizasyon oluşturdıkları tavşan kornealarında penetran keratoplasti sonrası korneal greft ömrünün sistemik siklosporin-A kullanımı ile uzadığını göstermişlerdir.¹³⁹ Zhao ve Jin'nin yaptığı çalışmada konvansiyonel tedaviye yanıt alınamayan 16 korneal allogreft rejeksiyonu hastasını topikal %0,5'lik siklosporin-A damlası ile tedavi etmişler ve 9 hastada tam kür, 6 hastada ise belirgin düzelme saptamışlardır.¹⁴⁰ Tunç ve Erbilin'nin bildirdiği konjonktival ve korneal skuamöz hücreli karsinomlu iki olguda cerrahi eksizyon sonrasında korneal sınırdaki tümör pozitif bulunmuş ve bu olguların %0,05'lik siklosporin-A ve %0,01 lik mitomisin-C damlalarının kombine kullanımı ile 18 aylık takipte rekürrensini önlediği ve yaygın limbal vaskülarizasyonun kaybolduğu gösterilmiştir.¹⁴¹ Xie ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada yüksek riskli korneal greft rejeksiyonunda allograft ömrünün ön kamaraya yerleştirilen bir siklosporin-A polimeri ile uzatıldığını göstermişlerdir.¹⁴² Hill'in çalışmasında yüksek riskli keratoplasti hastalarında (en az üç kadranda en az 16 adet stromal vaskülarizasyon bulunan alıcılar) sistemik siklosporin-A kullanan hastalarda rejeksiyon oranının kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuşlardır. Bu çalışmada kontrol grubunda %62 rejeksiyon olurken sistemik siklosporin-A'nın 6 ay kullanımı ile bu oran %31'e, 1 yıl kullanım ile de %7 oranına inmektedir. Sistemik siklosporin-A kullanımının korneal greft reddinin önlenmesinde etkili olduğunu gösteren bu çalışmaların yanında ilginç olarak siklosporin-A'nın topikal olarak kullanımı ile korneal greft reddinin önlenmesi konusunda son zamanlarda yapılan pek çok klinik çalışmada, standart tedavi olan steroid tedavisine topikal siklosporin-A eklenmesinin ilave bir katkı sağlamadığı gösterilmiştir. Örneğin Ünal ve Yücel'in 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında yüksek riskli korneal greftlerin ömründe, deksametazonun tek başına kullanımıyla topikal %0,05'lik siklosporin ile kombine edilmeleri arasında fark tespit edilmemiştir.¹⁴³ Yine 2008 yılında yapılan başka bir çalışmada Poon ve ark. prednizolon asetatın topikal %0,05'lik siklosporin-A ile kombine edilmesi ile tek başına kullanımını karşılaştırmışlar ve korneal greft reddinin önlenmesinde topikal siklosporin-A'nın ilave bir katkı sağlamadığını bildirmişlerdir.¹⁴⁴ Bu iki

çalışmada da siklosporin-A'nın mevcut topikal damla formu yani %0,05'lik siklosporin-A kullanılmış ve daha yüksek konsantrasyonlar denenmemiştir. Siklosporin-A'nın sistemik olarak etkili olup topikal olarak etkili olmama nedenlerinden birisi damla formu ile korneal vaskülarizasyon veya greft reddini önleyecek yeterli konsantrasyona ulaşamama olabilir. Bu yüzden damla formundan daha yüksek dozlara ulaşmayı sağlayacak bizim çalışmamızda da etkinliği gösterilen subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonları veya uzun süreli etki için bazı çalışmalarda etkinliği gösterilen episkleral siklosporin içeren implantlar hem yeterli konsantrasyonu elde edecek doza ulaşmak hem de sistemik yan etkilerden kaçınmak için alternatif bir uygulama yöntemi olabilir.¹⁴⁵

Sonuç olarak bu deneysel ve klinik çalışmalar göstermektedir ki; siklosporin-A korneal neovaskülarizasyon tedavisinde ve korneal greft reddinin önlenmesinde etkili bir ilaçtır. Çalışmamızla korneal neovaskülarizasyon gelişiminin subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu ile kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir. Siklosporin-A'nın antianjiogenik etkisinin literatürde yer almış sözünü ettiğimiz diğer çalışmalara istinaden VEGF düzeyinin azalması aracılığı ve (veya) P-glikoprotein inhibisyonu ile geliştiğini düşünmekteyiz. Siklosporin-A'nın antianjiogenik etki mekanizmasını ortaya çıkarabilmek için daha ileri düzeyde moleküler tabanlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda termal koterizasyon ile deneysel kornea neovaskülarizasyonu oluşturulmuş ve siklosporin-A'nın subkonjonktival yolla verilmesinin korneal neovaskülarizasyon gelişmesine etkisi araştırılmıştır.

0,125 mg, 0,25 mg ve 0,5 mg'lik subkonjonktival siklosporin enjeksiyonlarının her birinin deneysel korneal neovaskülarizasyon gelişiminde oluşan yeni damar sayısının hem histopatolojik incelemede hem de ameliyat mikroskobu altındaki muayenelerde ki sayımında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalttığını tespit ettik. Ayrıca 0,5mg'lik subkonjonktival siklosporin enjeksiyonunun damar sayısı ile birlikte neovasküler alan yüzdesini de azalttığını tespit ettik.

7. TÜRKÇE ÖZET

7.1. AMAÇ

Korneal neovaskülarizasyon, korneanın şeffaflığının azalmasına ve görme kaybına neden olan yeni damarların oluşumudur. Çalışmamızda termal koterizasyon ile deneysel kornea neovaskülarizasyonu oluşturulmuş ve siklosporin A'nın subkonjonktival yolla verilmesinin korneal neovaskülarizasyon gelişmesine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma ile korneal neovaskülarizasyonlarda subkonjonktival siklosporin tedavisinin etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır

7.2. Yöntem

Çalışmaya 24 adet wistar ratın sağ gözleri alındı. Denekler aldıkları tedaviye göre 4 gruba ayrıldı.

Grup 1: 0,5 mg/0,01 cc subkonjonktival siklosporin-A (n=6)

Grup 2: 0.25 mg/0,01 cc subkonjonktival siklosporin-A (n=5)

Grup 3: 0.125 mg/0,01 cc subkonjonktival siklosporin-A (n=6)

Grup 4 (kontrol grubu): Tedavisiz bırakıldı (n=5).

Korneaya limbustan 1 mm uzaklığa saat 3, 6, 9 ve 12 de termal koterizasyon tamamlandıktan sonra temporal bulber konjonktiva altına Grup 1, 2 ve 3'te belirtilen dozlarda siklosporin 0,01 cc volüm içinde enjekte edildi. 6 haftalık takip süresinden sonra ameliyat mikroskopu altında kornealar muayene edildi. Neovasküler alanın oranı, ana dal sayısı ve skar sayısı tespit edildi. Muayene ardından deneklere enükleasyon yapıldı. Parafin blok ve hematoksilin-eosin boyama ile histopatolojik inceleme yapılarak kornea kesitlerinde damar sayımı yapıldı.

7.3. Bulgular

Çalışmamızda 0,125 mg, 0,25 mg ve 0,5 mg'lik subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonlarının her birinin deneysel korneal neovaskularizasyon gelişiminde oluşan yeni damar sayısının hem histopatolojik incelemede hem de ameliyat mikroskobu altındaki muayenelerde ki sayımında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalttığını gösterdik. Farklı konsantrasyonlarda ki uygulamaların arasında istatistiksel anlamlı fark saptamadık. İlave olarak grup 1 de yani 0,5 mg enjeksiyon yapılan grupta ameliyat mikroskobu altında muayenede tespit edilen neovasküler alanın bütün kornea yüzeyine oranıyla tespit edilen neovasküler alan yüzdesinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur

7.4. Sonuç

Subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu deneysel kornea neovaskularizasyonunun tedavisinde etkili bir yöntemdir.

Anahtar kelimeler: Korneal neovaskularizasyon, siklosporin-A, termal koterizasyon.

8. SUMMARY

8.1. Background and Aim

Corneal neovascularization is the presence of new vessels in cornea which causes the loose of transparency of cornea and finally low vision. In this study we generated experimental corneal neovascularization by using thermal cauterization and investigated the effect of subconjunctival cyclosporine A to new vessel generation. We aimed to investigate the effect of subconjunctival cyclosporine-A treatment on corneal neovascularization in this study.

8.2. Methods

Right eyes of 24 wistar rats were included to study. They divided into 4 groups according to the treatment regime.

Group 1: 0, 5 mg/0,01 cc subconjunctival cyclosporine–A (n=6).

Group 2: 0.25 mg/0,01 cc subconjunctival cyclosporine–A (n=5).

Group 3: 0.125 mg/0,01 cc subconjunctival cyclosporine–A (n=6).

Group 4 (control group): no treatment (n=5).

Thermal cauterizations were applied to corneas 1 mm away from limbus at hour 3, 6, 9, 12. Subconjunctival cyclosporine–A injections were applied to temporal bulber conjunctivas according to the treatment regime in group 1, 2 and 3.

6 weeks later we examined the rats under operation microscope. Ratio of the neovascular region, number of major blood vessels and scars were determinated. After the examination of each cornea enucleation was performed. Histopathologic examinations were made with paraffin block and hematoxilen-eosin painting. Blood vessels were counted in the histopathologic cornea sections.

8.3. Results

In our study, we showed that in experimental corneal neovascularization, each concentration of subconjunctival cyclosporine-A (0,125 mg, 0,25 mg and 0,5 mg) reduce the number of blood vessels in cornea in histopathologic examination and in the examination under the operation microscope according to control group. We did not found difference among different treatment regimes. Also we showed that 0,5 mg subconjunctival cyclosporine–A injections (Group 1) reduces the neovascular region ratio according to control group.

8.4. Conclusion

Subconjunctival cyclosporine–A injection is an effective treatment in experimental corneal neovascularization.

Key words: Corneal neovascularization, cyclosporine-A, thermal cauterization.

9. KAYNAKLAR

1. Kenyon KR. Anatomy and pathology of the ocular surface. *Int Ophthalmol Clin* 1979;19:3–35
2. Gipson IK, Joyce NC, Zieske JD. The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva, and adnexa. Foster CS, Azar DT, Dohlman CH, eds. *The Cornea Scientific Foundations & Clinical Practice*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005;1-35.
3. Newell FW. Anatomy of the cornea. *Ophthalmology, Principles and Concepts* 1992; 13:8-13.
4. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edlerhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985;4:671-677.
5. Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Costarelis G, Sun TT. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelium: Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:1864-75
6. Muller LJ, Pels L. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:476-488,
7. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998;86:178-207
8. İrkeç MK. Gözyaşı tabakasının yapısı, biyokimyası, immünolojisi ve kontakt lensler. *Oftalmoloji* 1994;1:18-20.
9. Luo Lu, Peter S. Reinach, Winston W.Y. Kao. Corneal Epithelial Wound Healing *Exp Biol Med Vol.* 2001;226(7):653–664.
10. Efron N, Carney LG Oxygen levels beneath the closed eye elid. *Invesy Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:93-100.
11. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endotehelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:69-94.
12. Ahmadi AJ, Jakoiec FA. Corneal wound healing. Cytokines and extracellular matirx protiens. 2002;42:13-22.

13. Zeiske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27:1-7.
14. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways. The road taken. *Science* 1995;268:233-329
15. Messent AJ, Tuckwell DS, Knaupre V, Humphries MJ, Murphy G, Gavrilovic J. Effects of collagenase cleavage of type I collagen on $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. *J Cell Sci* 1998;111:1127-1135
16. Vinay B Agrawal, MD; Ray J F Tsai, MD. Corneal Epithelial Wound Healing. *Indian J Ophthalmol* 2003;51:5-15
17. Kao WW, Kao CW, Kaufman AH, Kombrinck KW, Converse RL, Good WV, Bugge TH, Degen JL. Healing of corneal epithelial defects in plasminogen and fibrinogen deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:502-8,
18. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:897-900
19. Thoft RA, Friend J. The X,Y,Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442-43.
20. Duha HS. Gomes AP. Corneal epithelial wound healing. *British J Ophthalmol* 78;401-408,1994.
21. Watanabe H, Ohasi Y, Kinoshita S, Manabe R and Ohshiden K. Distribution of epidermal growth factor in rat ocular and periocular tissues. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:228-32,
22. Wilson SE, Lloyd SA, Kennedy RH. Epidermal growth factor messenger RNA production in human lacrimal gland. *Cornea* 1991;10:519-24.
23. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor2, and the cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;35:2544-2561.
24. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-b1 and b2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 1997;65:391-396.
25. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992;153:1-5

26. Li DQ, Tseng SCG. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/ scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997;172:361-372.
27. Malecaze F, Simorre V, Chollet P, Tack JL, Muraine M, LeGuelbec D, et al. Interleukin-6 in tear fluid after photo refractive keratectomy and its effects on keratocytes in culture. *Cornea* 1997;16:580-587
28. Neilson BW, Mukaida N, Matsushima K, Kasahara T. Macrophages as producers of chemotactic proinflammatory cytokines. *Immunol Ser* 1994;60:131-140.
29. Sotozono C. Second injury in the corneal. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 2000;19-3:155-159
30. Nakamura Y, Sotozono C, and Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 1998;17:673-676.
31. Kim WJ, Mohan RR, Wilson SE. Effect of PDGF, IL-1 α , and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1364-1372.
32. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996;62:325-327.
33. Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:276-283.
34. Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res* 2003;77:581-592.
35. Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem* 2003;278:45629-45637.
36. Jester JV, Petrol WM. Corneal stromal wound healing in refractive surgery. The role of myofibroblasts. *Prog Retina Eye Res* 1999; 18:311-356.
37. Wong TTL, Sethi C. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Survey of Ophthalmology* 2002;47:239-256.
38. Kaufman HE, Barron AB, McDonald MB, Waltman SR. Corneal trauma. *The Cornea* 1991;22:599-642

39. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:69-94
40. Matsuda M. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:443-449.
41. Iguchi I, Kamiyama K, Enhancing effect of platelet-derived growth factor on migration of corneal endothelial cells. *Cornea* 1995; 14:365-371,
42. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.
43. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:171-178.
44. Cohen MM. Jr. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas and vascular malformations. *Am J Med Genet* 2002;108:265-274
45. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, Goren MB, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea* 1995;14:604-609.
46. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
47. Chan CK, Pham LN, Zhou J, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. Differential expression of pro and anti angiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Lab Invest* 2005;85:721-733.
48. Burger PC, Chandler DB. Experimental corneal neovascularization; biomicroscopic, angiographic and morphologic correlation. *Cornea* 1985;4:35-41.
49. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:242-249.
50. Lee P, Wang CC. Ocular neovascularization; an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998;48:245-269,
51. Völker HJ. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aus N Z J Ophthalmol* 1987;15:11-18.
52. Liesegang TJ. Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J* 2002;28:12-27.
53. Hamill MB. Corneal and scleral trauma. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;15:185-194.

54. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79-3:214-21.
55. Power WJ, Tugal-Tutkun I, Foster CS. Long-term follow-up of patients with atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1998;105:637-642.
56. Koch AE, Volin MV, Woods JM, et al. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 2001;44:31-40.
57. Austin P, Brown SI. Inflammatory Terrien's marginal corneal disease. *Am J Ophthalmol* 1981;92:189-192.
58. Centifanto-Fitzgerald YM, Yamaguchi T, Kaufman HE, Tognon M, Roizman B. Ocular disease pattern induced by herpes simplex virus is genetically determined by a specific region of viral DNA. *J Exp Med* 1982;155:475-489.
59. Feder RS, Krachmer JH. Conjunctival resection for the treatment of the rheumatoid corneal ulceration. *Ophthalmology* 1984;91:111-115.
60. Nishiwaki-Dantas MC, Dantas PE, Reggi JR. Ipsilateral limbal translocation for treatment of partial limbal deficiency secondary to ocular alkali burn. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1031-1033.
61. Chen J, Xu J. Early corneal limbal autograft transplantation after alkali burns. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 1997;33:233-235.
62. Nishida K, Kinoshita S, Ohashi Y, Kuwayama Y, Yamamoto S. Ocular surface abnormalities in aniridia. *Am J Ophthalmol* 1995;120:368-375.
63. Tijmes NT, Zaal MJ, De Jong PT, Völker-Dieben HJ. Two families with dyshidrotic ectodermal dysplasia associated with ingrowth of corneal vessels, limbal hair growth, and Bitot-like conjunctival anomalies. *Ophthalmic Genet* 1997;18:185-192.
64. Kremer I, Cohen EJ, Eagle RC Jr, Udell I, Laibson PR. Histopathologic evaluation of stromal inflammation in acanthamoeba keratitis. *CLAO J* 20;45-48,1994
65. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat med* 1995;1:27-31,
66. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:18-22.

67. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2000;70:419-428.
68. Breier G. Angiogenesis in embryonic development—a review. *Placenta* 2000;21 Suppl A:S11-15.
69. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 1996;271:3877-3883.
70. Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6952-6957.
71. Levy A. P, Levy N. S. Transcriptional regulation of rat endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1995;270:13333-13340.
72. Neufeld G. Cohen T. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13:9-22.
73. Kolodin A. Levengood D. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997;90:753-762.
74. Zengin N, Okudan S. Oküler neovaskülerizasyon; Büyüme faktörlerinin rolü. *Oftalmoloji* 1993;2:385-388.
75. Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B et al. Identification of peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF) mediated angiogenesis. *EMBO J* 2000;19:1525-1533.
76. Hayashi N, Nakayasu K. Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factor through corneal neovascularization. In vivo and in vitro. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1996;100:587-591.
77. Adamis AP, Meklir B, Joyce NC. In situ injury-induced release of basic-fibroblast growth factor from corneal epithelial cells. *Am J Pathol* 1991;139:961-967.
78. Lu PC, Ye H, Maeda M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:20-27.
79. Azar DT, Hahn TW, Jain S, Yeh YC, Stetler-Stevensen WG. Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea* 1996;15:18-24.

80. Maeda M, Vanlandingham BD, Ye H, Lu PC, Azar DT. Immunoconfocal localization of gelatinase B expressed by migrating intrastromal epithelial cells after deep annular excimer keratectomy. *Curr Eye Res* 1998;17:836-843.
81. Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:913-921.
82. Ye HQ, Maeda M, Yu FS, Azar DT. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2894-2899.
83. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, Fukai N, Azar DT. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2517-2524.
84. Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R. Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct antitumor properties. *J Biol Chem* 2000;275:23745-23750.
85. Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S, Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 2001;276:15240-15248.
86. Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbanda S, Reimer C, Manfredi M, Dickerson WM, Kalluri R. Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:31959-31968.
87. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001;86:346-355
88. Rober M, Steven L. Interleukin-8; a corneal factor that induced neovascularization. *Am J Pathology* 1992;141:1279-1284.
89. Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratits. *J Virol*. 2001;75:9828-9835.
90. Jampol LM, Ebroon DA. Periferal proliferative retinopathies, an update on angiogenesis, etiologies and management. *Sur ophthalmol* 1994;38:519-525.
91. Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage

- of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6367-6372.
92. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285.
 93. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 2002;277:27872-27879
 94. Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. A novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000;275:1209-1215
 95. Dawson DW, Volpert OV, Gilis P et al. Pigment epithelium derived factor a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245-248,
 96. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983;101:640-643.
 97. Boneham GC, Collin HB. Steroid inhibition of limbal blood and lymphatic vascular cell growth. *Curr Eye Res* 1995;14:1-10.
 98. Harvey PT, Cherry PM: Indomethacin v. dexamethasone in the suppression of corneal neovascularization. *Can J Ophthalmol* 1983;18:293-295.
 99. Haynes WL, Hirakata A, Proia AD. Inhibition of corneal neovascularization in the rat by SK&F 86002, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism. *Exp Eye Res* 1992;55:189-191.
 100. Dana MR, Zhu SN, Yamada J: Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea* 1998;17:403-409.
 101. Demir T, Celiker UO, Kükner A, Mogulkoç R, Celebi S, Celiker H.. Effect of octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 1999;77:386-390.
 102. Benelli U, Ross JR, Nardi M, Klintworth GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery: inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:274-282.
 103. Benelli U, Lepri A, Del Tacca M, Nardi M. FK-506 delays corneal graft rejection in a model of corneal xenotransplantation. *J Ocul Pharmacol Ther* 1996;12:425-31.
 104. Kim JH, Kim JC, Shin SH, Chang SI, Lee HS, Chung SI. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1–3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF, and VEGF. *Exp Mol Med* 1999;31:203-209.

105. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B, D'Amato RJ. New activity of spironolactone: inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation* 1996;94:2566-2571.
106. Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997;64:971-978.
107. Sood AK, Gupta B, Chugh P. Topical amiloride accelerates healing and delays neovascularization in mechanically produced corneal ulcers in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999;21:491-497.
108. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998;4:376-383.
109. Cohen RA, Gebhardt BM, Bazan NG: A platelet-activating factor antagonist reduces corneal allograft inflammation and neovascularization. *Curr Eye Res* 1994;13:139-144.
110. Ma DH, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK. Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:1822-1828.
111. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995;9:32-46.
112. Pillai CT, Dua HS, Hossain P: Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2148-2153.
113. Nirankari VS, Dandona L. Laser photocoagulation of experimental corneal stromal vascularization efficacy and histopathology. *Ophthalmology* 1993; 100:111-118.
114. Baer JC, Foster CS. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1986;93:1304-1309.
115. Baer JC, Foster CS. Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser. *Ophthalmology* 1992;99:173-179.
116. Primbs GB, Casey R, Wamser K, Snyder WJ, Crean DH. Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998;29:832-838.
117. Gohto Y, Obana A, Kanai M, Nagata S, Nakajima S, Miki T. Treatment parameters for selective occlusion of experimental corneal neovascularization by photodynamic therapy using a water soluble photosensitizer, ATX-S10(Na). *Exp Eye Res* 2001;72:13-22.
118. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10.baskı, Hacettepe Taş Kitabevi, 2002:420-422

119. Strestikova P, Otava B, Filipec M. Different mechanisms in inhibition of rat macrophage nitric oxide synthase expression by FK 506 and CsA *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2001; 23(1):67-74.
120. Kaminska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants –facts and hypotheses. Invited Review *J Cell. Mol. Med*. 2004;Vol 8 No 1:45-48
121. Armesilla AL, Lorenzo E, Arco PG, Martinez S, Alfranca A, Redondo JM. Vascular Endothelial Growth Factor Activates Nuclear Factor of Activated T Cells in Human Endothelial Cells: a Role for Tissue Factor Gene Expression *Molecular And Cellular Biology*,. 1999;Mar19(3):2032–2043
122. Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM. Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor–mediated Angiogenesis by Cyclosporin A: Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2 *J. Exp. Med*. 2001;193(5):607-620.
123. Demeule M, Wenger RM, Béliveau R. Molecular interactions of cyclosporin A with P-glycoprotein. Photolabeling with cyclosporin derivatives. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6647-6652.
124. Bhatt N, Peyman GA, Karaçorlu M. Scleral damage: comparison of standard and modified diathermy electrodes. *Int Ophthalmol*. 1993;17(5):255-258.
125. Dimitri T. Azar. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2006;104:264-302.
126. Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment *Science* 1985;230:1375-1378
127. Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, et al. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983;221:719-725
128. Li WW, Casey R, Gonzalez EM, et al. Angiostatic steroids potentiated by sulfated cyclodextrins inhibit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2898-2905.
129. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chévez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularization by Bevacizumab. *Br. J. Ophthalmol* 2007;91:804-807.

130. Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(2):281-284.
131. Yang L, Yang XC, Yang JK, Guo YH, Yi FF, Fan Q, Liu XL. Cyclosporin A Suppresses Proliferation of Endothelial Progenitor Cells: Involvement of Nitric Oxide Synthase Inhibition *Inter Med* 2008;47:1457-1464.
132. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;9:1370-1376,
133. Ma FX, Zhou B, Chen Z, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res* 2006;47:1227-1237.
134. Sedd, M.P, J.R. Brown, C.N. Freemantle, J.L. Papworth, P.R. Colville-Nash, D. Willis, K.W. Somerville, S. Asculadi, and D.A. Willoughby. The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronic. *Cancer Res.* 1997;57(9):1625-1629
135. Jones, M.K, H. Wang, B.M. Peskar, E. Levin, R.M. Itani, I.J. Sarfeh, and A.S. Tarnawski. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healin. *Nat. Med.* 1999;5:1418-1423
136. Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Youn J, Hwang SY, Park SH, Kim HY. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002;46(5):1202-1209.
137. Barakat S, Turcotte S, Demeule M, Lachambre MP, Régina A, Baggetto LG, Béliveau R. Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by P-glycoprotein/caveolin-1 interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(3):440-446.
138. Demeule M, Laplante A, Sepehr-Araé A, Beaulieu E, Averill-Bates D, Wenger RM, Béliveau R. Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites. *Biochem Cell Biol.* 1999;77(1):47-58.
139. Rehany U, Waisman M. Suppression of corneal allograft rejection by systemic cyclosporine-A in heavily vascularized rabbit corneas following alkali burns. *Cornea* 1994;13(5):447-453

140. Zhao JC, Jin XY. Local therapy of corneal allograft rejection with cyclosporine Am J Ophthalmol. 1995;119(2):189-194.
141. Tunç M, Erbilgen E. Topical Cyclosporine-A Combined With Mitomycin C For Conjunctival and Corneal Squamous Cell Carcinoma. Am J Ophthalmol 2006;142(4):673-675.
142. Xie L, Shi W, Wang Z, Bei J, Wang S. Prolongation of corneal allograft survival using cyclosporine in a polylactide-co-glycolide polymer. Cornea 2001; 20(7):748-752.
143. Ünal M, Yücel I, Evaluation of topical ciclosporin 0.05% for prevention of rejection in high-risk corneal grafts. Br. J. Ophthalmol. 2008;92;1411-1414
144. Poon A, Constantinou M, Lamoureux E, Taylor HR. Topical Cyclosporin A in the treatment of acute graft rejection: a randomized controlled trial. Clin Experiment Ophthalmol 2008;36(5):399-400
145. Lee SS, Kim H, Wang NS, Bungay PM, Gilger BC, Yuan P, Kim J, Csaky KG, Robinson MR. A pharmacokinetic and safety evaluation of an episcleral cyclosporine implant for potential use in high-risk keratoplasty rejection. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(5):2023-2029.

10. RESİMLEMELER LİSTESİ

Resimlemeler	Sayfa
Tablo-1. Korneal Neovaskularizasyona Neden Olan Hastalıklar.	20
Şekil-1. Siklosporinin Moleküler Yapısı Ve Üç Boyutlu Görünümü.	28
Şekil-2. Siklosporin-A'nın Etki Mekanizması.	29
Resim-1. Bovie Change A-Tip Koter (AARON MEDİCAL Florida USA).	31
Resim-2. Elektrokoterizasyon.	31
Resim-3. Temporal Bulber Konjonktiva Altına Siklosporin A Enjeksiyonu.	32
Resim-4. Ameliyat Mikroskobu Altında Korneaların Muayenesi.	33
Resim-5. Histopatolojik İncelemede Normal Kornea Kesiti.	34
Tablo-1. Grup 1 Korneal Muayene Bulguları.	35
Tablo-2. Grup 2 Korneal Muayene Bulguları.	36
Tablo-3. Grup 3 Korneal Muayene Bulguları.	37
Tablo-4. Grup 4 (Kontrol Grubu) Korneal Muayene Bulguları.	38
Tablo-5. Grup 1 Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı.	39
Resim-6. Grup 1'e Ait Bir Ratın Kornea Kesiti.	39
Tablo-6. Grup 2 Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı.	40
Resim7: Grup 2'ye Ait Bir Ratın Kornea Kesiti.	40
Tablo-7. Grup 3 Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı	41
Resim8: Grup 3'e Ait Bir Ratın Kornea Kesiti.	41
Tablo-8. Grup 4 (Kontrol Grubu) Histopatolojik Kesitlerdeki Toplam Damar Sayısı.	42
Resim9: Grup 4'e (Kontrol Grubu) Ait Bir Ratın Kornea Kesiti.	42
Tablo-9. Grup 1 ve Grup 2'nin Karşılaştırma Sonuçları.	43
Tablo-10. Grup 1 ve Grup 3'ün Karşılaştırma Sonuçları.	44
Tablo-11. Grup 1 ve Grup 4'ün Karlaştırma Sonuçları.	45
Tablo-12. Grup 2 ve Grup 3'ün Karlaştırma Sonuçları.	46
Tablo 13. Grup 2 ve Grup 4'ün Karşılaştırma Sonuçları.	47
Tablo-14. Grup 3 ve Grup 4'ün Karşılaştırma Sonuçları.	48

11. ÖZGEÇMİŞ

02.06.1979'da Sivas'ta doğdum. Babamın ordu mensubu olması nedeniyle ilk öğrenimimin ilk 6 yılını Isparta 7 ve 8. yıllarını Diyarbakırda tamamladım. Orta öğrenimimi Kütahya Simav Anadolu Öğretmen Lisesi'nde bitirdim ve 1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Doktorluluğu Bölümüne başladım. 2003 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Aynı yıl TUS sınavında Düzce Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nı kazanarak araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Orta derecede İngilizce bilmekteyim. Araştırma Görevlisi olarak biri yurt dışı olmak üzere 11 tane bildiri ve 2 tane yurt dışı makale olarak yayınlanan bilimsel çalışmaya katıldım. Şu an halen araştırma görevlisi olarak aynı fakültede çalışmaktayım.