

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**TAVŞAN KORNEALARINDA OLUŞTURULAN**  
**DENEYSEL ALKALİ YANIKLARDA**  
**AMNİYOTİK MEMBRAN TRANSPLANTASYONU VE**  
**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN MEMBRAN**  
**İMLANTASYONU TEDAVİLERİNİN**  
**KLİNİK, HİSTOLOJİK ve İMMÜNOHİSTOKİMYASAL**  
**OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Hasan Sami Kepenek**  
**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman**  
**Dr. Öğretim Üyesi Erdiñ Bozkurt**

**2. Danışman**  
**Doç. Dr. Seyid Ali Bingöl**

**KARS 2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**TAVŞAN KORNEALARINDA OLUŞTURULAN**  
**DENEYSEL ALKALİ YANIKLARDA**  
**AMNİYOTİK MEMBRAN TRANSPLANTASYONU VE**  
**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN MEMBRAN**  
**İMLANTASYONU TEDAVİLERİNİN**  
**KLİNİK, HİSTOLOJİK ve İMMÜNOHİSTOKİMYASAL**  
**OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

**Araş. Gör. Hasan Sami Kepenek**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman**

**Dr. Öğretim Üyesi Erdiñ Bozkurt**

**2. Danışman**

**Doç. Dr. Seyid Ali Bingöl**

**Bu tez KAÜ BAP tarafından 2019-TS-10 proje numarası ile desteklenmiştir**

**KARS 2019**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin bu sürecinde ve tezimin hazırlanması sürecinde desteklerini esirgemeyen Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hülya G. SOYSAL'a teşekkür ederim.

Tezimin hayvan deneyi kısmında, histolojik ve istatistiksel çalışmalarında zamanını ve emeğini esirgemeyen Doç. Dr. Seyit Ali BİNGÖL'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi için yolumun kesiştiği ilk andan bu yana desteğini esirgemeyen ve tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Erdinç BOZKURT'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimde benim için ayrı bir yere sahip olan ve telkinleriyle benim sevdiğim mesleğimde kalmamı sağlayan Doç. Dr. Refik OLTULU'ya teşekkür ederim.

Tezimin hayvan deneyi süresi boyunca her türlü yardımına koşan Dr. Şerif NİZAMOĞULLARI'na ve Kars'a geldiğim ilk andan beri desteğini ve kardeşliğini esirgemeyen Davut KİŞİOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemdeki emeklerini ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Zorlu uzmanlık eğitimimin her anında, yaşadığım en sıkıntılı dönemlerde, tezimin her aşamasında da olmak üzere bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren, desteklerini esirgemeyen sevgili hayat arkadaşım Öznur'a sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLO VE GRAFİK DİZİNİ

ÖZET

SUMMARY

<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Kornea</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1 Kornea Embriyolojisi</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Kornea Anatomisi</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2.1 Epitel Tabakası</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2.2 Bowman Tabakası</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.3 Stroma Tabakası</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.4 Descemet Membranı</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2.5 Endotel Tabakası</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3 Korneanın İnnervasyonu</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4 Korneanın Beslenmesi</b>	<b>7</b>
<b>2.1.5 Korneal Yara İyileşmesi, Neovaskülarizasyon ve Fibrozis</b>	<b>7</b>
<b>2.1.6 Anjiogenez</b>	<b>8</b>
<b>2.1.6.1 Anjiogenik Faktörler</b>	<b>9</b>
<b>2.1.7 Matriks Metalloproteinaz-9</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Korneal Kimyasal Yaralanmalar</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1 Asit Yaralanmaları</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2 Alkali Yaralanmaları</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2.1 Patogenez</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2.2 Klinik Muayene</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2.3 Klinik Süreç</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3 Kimyasal Yanıkların Sınıflandırılması</b>	<b>15</b>
<b>2.2.4 Kimyasal Yanıkların Tedavi Planlaması</b>	<b>17</b>

2.2.4.1 Acil Müdahale	17
2.2.4.2 Akut Faz Tedavisi	17
2.2.4.2.1 Epitelizasyonu Sağlamak	18
2.2.4.2.2 İnflamasyon Önleyici Tedavi	18
2.2.4.2.3 Yüksek Göz İçi Basıncı Tedavisi	19
2.2.4.2.4 Sekel Oluşumunu Önleme Tedavisi	19
2.2.4.3 Cerrahi Tedavi	20
2.2.4.3.1 Tenon İlerletilmesi	20
2.2.4.3.2 Limbal Kök Hücre Transplantasyonu	20
2.2.4.3.3 Korneal Transplantasyon	21
2.3 Amniyotik Membran	21
2.3.1 Tarihçe	21
2.3.2 Yapı ve İşlev	22
2.3.3 Özellikleri ve Etki Mekanizması	23
2.3.3.1 Mekanik Özellikleri	23
2.3.3.2 Antifibrotik ve Antiinflamatuvar Etki	23
2.3.3.3 Anti-Mikrobiyal Etki	24
2.3.3.4 İmmünomodülatör Etki	24
2.3.4 Donör Taraması	24
2.3.5 Amniyotik Membranın Alınması ve Hazırlanması	25
2.3.6 Amniyotik Membranın Oftalmolojide Kullanımı	26
2.3.7 Oküler Yanıklarda AM Transplantasyonu	26
2.3.7.1 Greft (İnlay) Tekniği	27
2.3.7.2 Yama (Overlay) Tekniği	27
2.3.7.3 Kombine (İnlay ve Overlay) Tekniği	28
2.3.8 Oftalmoloji Dışı Kullanımı	28
2.4 Oftalmolojide Otolog Kan Ürünleri	28
2.4.1 Otolog Serum	29
2.4.2 Trombositten Zengin Plazma	29
2.4.3 Büyüme Faktöründen Zengin Plazma(PRGF)	30
2.4.4 Trombositten Zengin Fibrin(TZF) Membran	31
2.4.4.1 TZF Membranın Oftalmolojide Kullanımı	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1 Denekler	34

<b>3.2 Alkali Yanık Modelinin Oluşturulması</b>	<b>34</b>
<b>3.3 alışma Gruplarının Oluşturulması</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Muayenelerin Yapılması</b>	<b>35</b>
<b>3.5 AM Elde Edilmesi ve Transplantasyonu</b>	<b>36</b>
<b>3.6 TZF Membran Oluşturulması ve İmplantasyonu</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Histoloji ve İmmunohistokimya</b>	<b>38</b>
<b>3.8 İstatistiksel Analizler</b>	<b>39</b>
<b>4.KORNEAL BULGULAR</b>	<b>39</b>
<b>5.HİSTOLOJİK BULGULAR</b>	<b>47</b>
<b>7.TARTIşMA VE SONUÇ</b>	<b>55</b>
<b>8.KAYNAKLAR</b>	<b>59</b>



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**µm:** Mikrometre

**3-B:** 3 boyutlu

**AM:** Amniyotik membran

**AMT:** Amniyotik membran transplantasyonu

**Ca(OH)<sub>2</sub>:** Kalasium hidroksit

**COOH:** Karboksil iyonu

**DALK:** Derin anterior lameller keratoplasti

**DEHUAM:** Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

**EDTA:** Sodyum etilendiamin tetra asetik asit

**EGF:** Epitel büyüme faktörü

**FGF:** Fibroblast büyüme faktörü

**GAG:** Glikozaminoglikan

**GİB:** Göz içi basıncı

**HGF:** Hepatosit büyüme faktörü

**HLA:** İnsan lökosit antijeni (Human lökosit antigen)

**HNF-3b:** Hepatosit nükleer faktörü-3b

**IFN-γ:** İnterferon gama

**İL:** İnterlökin

**KGF:** Keratinosit büyüme faktörü

**KNV:** Korneal neovaskülarizasyon

**KOH:** Potasyum hidroksit

**LKP:** Lameller keratoplasti

**LSCD:** Limbal kök hücre eksikliği

**Mg(OH)<sub>2</sub>:** Magnezyum hidroksit

**MMP:** Matriks metalloproteinaz

**N:** Normal

**NaCl:** Sodyum klorür

**NaOH:** Sodyum hidroksit

**NH<sub>3</sub>:** Amonyak

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

**NO:** Nitrik oksit  
**OKT:** Optik koherans tomografi  
**OCT-4:** Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü  
**OH:** Hidroksil iyonu  
**PDGF:** Trombosit kaynaklı büyüme faktörü  
**PIGF:** Plasental büyüme faktörü  
**PKP:** Penetran keratoplasti  
**PRGF:** Büyüme faktöründen zengin plazma  
**SKK:** Santral kornea kalınlığı  
**TGF- $\beta$ :** Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$   
**TNF  $\alpha$ :** Tümör nekrozis faktör  $\alpha$   
**TZF:** Trombositten zengin fibrin  
**TZP:** Trombositten zengin plazma  
**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü  
**vWF:** Von willebrand faktör



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Oküler yüzey yanıklarının şiddetini belirleyen Roper-Hall sınıflaması	<b>16</b>
<b>Tablo 2:</b> Oküler yüzey yanıkları yeni sınıflandırması (Dua)	<b>16</b>
<b>Tablo 3:</b> Üç önemli kan ürününün karşılaştırılması	<b>32</b>
<b>Tablo 4:</b> Vizitler arasında santral kornea kalınlıklarının gruplara göre karşılaştırılması.	<b>41</b>
<b>Tablo 5:</b> Gruplar arasında santral kornea kalınlıklarının vizitlere göre karşılaştırılması.	<b>42</b>
<b>Tablo 6:</b> Vizitler arasında epitel defekti oranlarının gruplara göre karşılaştırılması.	<b>43</b>
<b>Tablo 7:</b> Gruplar arasında epitel defekti oranlarının vizitlere göre karşılaştırılması	<b>44</b>
<b>Tablo 8:</b> Gruplar arasında opasite oranlarının vizitlere göre karşılaştırılması.	<b>45</b>
<b>Tablo 9:</b> Vizitler arasında opasite oranlarının gruplara göre karşılaştırılması.	<b>45</b>
<b>Tablo 10:</b> Gruplar arasında korneal neovaskülarizasyon (KNV) oranlarının vizitlere göre karşılaştırılması.	<b>46</b>
<b>Tablo 11:</b> Vizitler arasında korneal neovaskülarizasyon (KNV) oranlarının gruplara göre karşılaştırılması.	<b>47</b>

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1:</b> İnsan amniyotik membran	<b>22</b>
<b>Resim 2:</b> Deneklerden kan alınması, TZF membran oluşturulması ve sütünasyonu	<b>37</b>
<b>Resim 3:</b> Tüm korneanın piksel cinsinden ölçümü	<b>40</b>
<b>Resim 4:</b> Epitel defektinin piksel cinsinden ölçümü	<b>40</b>
<b>Resim 5:</b> Vizitlerdeki epitel defekti takibi ve görüntülenmesi	<b>43</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> İlaçlı grup korneasında gevşek stroma (uzun oklar) ve yangısal hücrelerin (kısa oklar) varlığı. HE, 10X.	<b>48</b>
<b>Şekil 2:</b> Amniyon grubu korneasının görünümü. HE, 20X.	<b>49</b>
<b>Şekil 3:</b> Fibrin grubu korneasının görünümü. HE, 20X.	<b>49</b>
<b>Şekil 4:</b> İlaçlı grup korneası, descemet membranının (uzun ok) belirgin görünümü ve epitel (kısa ok) ve altında yer alan bazal membran. PAS, 20X.	<b>50</b>
<b>Şekil 5:</b> Fibrin grubunda epitel altında uzanan ince bazal membranın (ok) görünümü. PAS, 40X.	<b>50</b>
<b>Şekil 6:</b> Fibrin grup korneasında MMP-9 immunoreaksiyonu. 10X.	<b>51</b>
<b>Şekil 7:</b> İlaçlı grup korneasında MMP-9 immunoreaksiyonu. 10X.	<b>51</b>
<b>Şekil 8:</b> Amniyon grup korneası MMP-9 immunoreaksiyonu. 10X.	<b>52</b>
<b>Şekil 9:</b> Amniyon grup korneasında VEGF immunoreaktivitesi. 10X.	<b>53</b>
<b>Şekil 10:</b> Fibrin grup korneası VEGF immunoreaktivitesi. 10X.	<b>53</b>
<b>Şekil 11:</b> İlaç grup korneası VEGF immunoreaktivitesi. 10X.	<b>54</b>

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, trombositten zengin fibrin (TZF) membran implantasyonu uygulamasının, deneysel alkali yanıklarda ortaya çıkacak inflamasyon, yeni damar oluşumu, korneal ülser ve opasite oluşumu üzerine etkisinin, morfolojik, histolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmesi, ayrıca medikal tedavi ve amniyotik membran transplantasyonu (AMT) tedavilerinin etkinliği ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya dahil edilen 24 adet Yeni Zelanda ırkı tavşanın 24 sağ gözü, biri kontrol grubu olmak üzere (1. Grup, n=6) 4 eşit gruba ayrıldı. İlk gün deneklerin kornealarında topikal anestezi (Alcaine % 0,5 damla; Alcon) altında 1 normal (N) NaOH ile alkali yanık oluşturuldu. Tedavi olarak 2. Gruba (n=6) topikal antibiyotik ve steroid, 3. Gruba (n=6) topikal tedaviyle birlikte AMT, 4. Gruba (n=6) topikal tedaviyle birlikte TZF membran implantasyonu yapılması planlandı. Birinci, 7, 14 ve 21. günlerde klinik muayeneleri yapıldı. Yirmibirinci günde denekler sakrifiye edilerek korneaları limbus sınırından çıkarılarak, dokular histopatolojik incelemeye gönderildi.

**Bulgular:** Alkali yanık sonrası ilk vizitte gruplar arasında epitel defekti, kornea kalınlığı ve opasite açısından fark yoktu ( $p>0,05$ ). Santral kornea kalınlığında vizitler ve gruplar arasında herhangi bir farklılık izlenmedi ( $p>0,05$ ). Epitel defektin büyüklüğünde, TZF membran ve AMT grubunda, tedavi sonrası ilk vizite göre anlamlı iyileşme görüldü ( $p<0,05$ ). Kornea opasitesi, son vizitte fibrin membran grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük izlendi ( $p<0,05$ ). Korneal neovaskülarizasyon, son vizitte, ilaç grubunda anlamlı şekilde daha fazla oluştu ( $p<0,05$ ).

**Sonuç:** AMT, alkali yanıkların cerrahi tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerin biridir. Çalışmamızda, morfolojik ve histolojik bulgular ışığında, TZF membran implantasyonunun alkali yanık tedavisinde 21 gün sonunda en az AMT kadar etkin olduğu gösterilmiştir. TZF membran, otolog olması, ulaşılabilirliğinin kolay olması, bulaş riskinin olmaması gibi üstünlükleri nedeniyle, alkali yanık cerrahi tedavisinde öncelikli olarak tercih edilebilir.

## SUMMARY

**Purpose:** In this study, we aimed to investigate the effect of platelet-rich fibrin (PRF) membrane implantation on inflammation, new vessel formation, corneal ulcer and opacity formation in experimental alkaline burns, morphological, histological and immunohistochemical examination, as well as medical treatment and amniotic membrane transplantation (AMT) therapies.

**Materials and Methods:** Twenty-four right eyes of 24 New Zealand rabbits included in the study were divided into four equal groups, one as the control group (Group 1, n = 6). On the first day, alkaline burns were created with 1 normal (N) NaOH under topical anesthesia (Alcaine 0.5% drops; Alcon) in the corneas of the subjects. Topical antibiotics and steroids were applied to Group 2 (n=6), AMT with topical treatment to Group 3 (n=6), and TZF membrane implantation with topical treatment to Group 4 (n=6). Clinical examinations were performed on days 1, 7, 14, 21. On day 21, subjects were sacrificed and their corneas were removed from the limbus and then tissues were sent for histological examination.

**Results:** There was no difference between groups in terms of epithelial defect, corneal thickness and opacity at the first visit after alkaline burn ( $p > 0.05$ ). No difference was observed in central corneal thickness between visits and groups ( $p > 0.05$ ). The significant improvement was observed in the epithelial defect in the PRF membrane and AMT group after treatment compared to the first visit ( $p < 0.05$ ). Corneal opacity was significantly lower in the PRF membrane group at the last visit than in the other groups ( $p < 0.05$ ). Corneal neovascularization was significantly higher in the medical treatment alone group at the last visit ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** AMT is one of the main methods used in the surgical treatment of alkali burns. TZF membrane implantation has been shown to be as effective as AMT in the treatment of alkali burns in the light of morphological and histological findings after 21 days of experimental study. TZF membrane may be preferred as a primary option in the clinical treatment of alkali burns because of its advantages such as autologous, easy accessibility and no risk of transmission.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkali yaralanmalar en sık korneal yaralanmalardan biridir. Alkali yaralanmaları da içeren kimyasal yanıklar tüm korneal travmaların %12' sini oluşturmaktadır (Tuft & Shortt 2009). Alkali yaralanmaların büyük çoğunluğu iş kazası şeklinde gerçekleşmekte olup ciddi iş gücü ve maddi kayıplara sebebiyet vermektedir.

Bu yaralanmalar ön segment yapılarının ciddi tahribatına neden olabilmektedir. Bu yaralanmaların belirtileri maruz kalınan ajanın tipine, şiddetine yani pH'ına ve maruziyet süresine göre değişir. Semptomlar ise hafif bir kızarıklık ve rahatsızlık hissinden total görme kaybına kadar değişmektedir. Alkali yanık olan korneanın erken iyileşme döneminde İnterlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-10 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a) gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin artan ekspresyonu, kornea hasarı ile ilişkilidir (Sotozono ve ark. 1997). Bu hasarlar ise limbal iskemi, limbal kök hücre kaybı, korneal neovaskülarizasyon, korneal skarlaşma ve erime hatta korneal perforasyon şeklinde olabilir.

Alkali yaralanmalarda tedavi olay anında başlaması gerekirken, tedavi skalası medikal ve topikal tedaviden cerrahi tedaviye kadar değişmektedir. Tedavide ilk olarak ajanın hızla gözden uzaklaştırılması ve yüzey pH'ın olabildiğince nötr değerlere yaklaştırılması için çabalanması gerekmektedir. Acil müdahalenin ardından oluşmuş inflamasyonu baskılayıcı ajanlar, göz yüzeyini yıkayan ve nemlendiren gözyaşı damlaları ve enfeksiyonu önlemek için antibiyotik tedavi başlanması gerekmektedir.

Medikal tedavinin yetmediği noktada cerrahi tedavilere geçiş yapılır. Bunlar amniotik membran transplantasyonu (AMT) (Shimazaki ve ark. 1997), konjonktival limbal otogreft (Ronk ve ark. 1994), penetran keratoplasti gibi işlemleri içerir. Bu teknikler invaziv olup uygulanırken ameliyathane şartlarına ve mikroskopa ihtiyaç olacaktır.

Amniotik membran transplantasyonu (AMT); Oküler yüzey rekonstrüksiyonu için bir greft olarak amniyotik membranın (AM) kullanımı 1995 yılında Kim ve Tseng tarafından bildirilmiştir (Kim & Tseng 1995). Daha sonraları oküler yüzey

problemlerinde kullanımı giderek artmıştır. AM'nin geçici veya kalıcı bir greft olarak transplantasyonunun, epitelyal yara iyileşmesini hızlandırdığı ve oküler yüzey üzerinde güçlü antienflamatuar ve skar oluşumunu engelleyici etkileri gösterdiği tespit edilmiştir (Tseng ve ark. 2004). Ayrıca, AM'nin değerli etkilerine rağmen, AM transplantasyonunun klinik uygulaması, şu anda çeşitli sütünle ilişkili komplikasyonlara neden olabilen invaziv bir cerrahi prosedür gerektirme eğiliminde olduğundan, ciddi oküler yüzey hastalıkları vakaları ile sınırlıdır (Park & Tseng 2000). AM'nin oküler yüzey üzerine birçok etkisi vardır. Epitelizasyonu desteklemesi, fibrozisi inhibe etmesi, anjiogenezisi ve inflamasyonu azaltması başlıca faydalı etkileridir. Kimyasal yanıklar sonrası da oküler yüzey rekonstrüksiyonu için kullanılmaktadır. Bazı olgularda gösterildiği üzere kullanıldıklarında korneal ve konjonktival hasarları iyileştirmekte ve sembleferon gelişmesini engellemektedir (Kheirkhah ve ark. 2008).

Doku onarımının her fazının, hücre fonksiyonunu modüle eden geniş bir büyüme faktörü ailesi ve sitokinler aracılığıyla kontrol edildiği iyi bilinmektedir. Epitel büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi oküler yüzey rejenerasyonunda rol oynayan birkaç büyüme faktörü, trombosit alfa granüllerinden salgılanır (Blair & Flaumenhaft 2009). Trombositten zengin fibrin (TZF) membranı ilk olarak Dohan ve ark. tarafından (2006) tarif edilmiştir. Bu membran konsantre trombositlerin, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, dolaşımda gezen kök hücrelerin ve yara iyileşmesinde bir miktar kemotaktik rolü olan birkaç adet lökositin de dahil edilmesiyle 3 boyutlu (3-B) polimerize otolog fibrin matriksten oluşmuştur (Dohan ve ark. 2006, Öncü & Alaaddinoğlu 2015). Bu zar geçici bir iskele gibi bir yapıya sahiptir ve hücrelerin kolayca içinden geçmesine imkân verir (Dohan ve ark. 2006). TZF membranı hali hazırda ağız, ortopedik ve plastik cerrahi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Alio ve ark. (2013) otolog TZF membran grefti içeren korneal perforasyonların cerrahi tedavisi için yeni bir alternatif tekniği ilk olarak tanımladılar. TZF membran fibriller ve aselüler bir yapıya sahip olup ülser tedavisi ve doku mühendisliğinde kullanılan, cerrahi yaraların kapatılmasında ve yumuşak dokuların tam epitelleşmesini destekleyen yoğun, hemostatik fibrin bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır.



Alkali yanık tedavilerinde kullanılan ve fayda sağlanan AMT tedavisine ek olarak TZF membran implantasyonu tedavisinin de alkali yanıklarda ortaya çıkan epitel defekti, neovaskülarizasyon ve diğer komplikasyonlar üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmamızda tavşan gözlerinde oluşturulan deneysel alkali yanıklarda TZF membran implantasyonu etkinliğini araştırmayı ve medikal tedavi, AMT gibi diğer yöntemlerin etkinliği ile karşılaştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kornea

Kornea, göz küresinin en ön bölümünde yer alan ve yaklaşık olarak 1/6' sını oluşturan saydam damardan yoksun bir tabakadır. Kornea 360 derece posteriorda ışığa geçirgen olmayan sklera ile devam eder ve yarı saydam damardan zengin konjonktiva ise sklerayı örterek kornea ile komşuluk yapar. Korneanın ön yüzeyini gözyaşı film tabakası kaplarken, göz içinde ise aköz hüner ile sürekli temas halindedir (Eğrilmez 2007).

#### 2.1.1 Kornea Embriyolojisi

Kornea doğum sonrası ilk zamanlarda gözün diğer bölümlerine göre daha büyüktür. İntrauterin olarak 5-6. Haftalarda kornea oluşmaya başlar. Kornea embriyolojik olarak nöroektoderm ve mezenşim olmak üzere iki tabakadan gelişmektedir. Lens vezikülü yüzey ektoderminde gelişmektedir ve o da ektodermden ayrılmaktadır. Lens vezikülünden ayrılan yüzeyel ektoderm primitif korneayı oluşturur. Kornea yüzeyindeki bu ektoderm ise ilerleyen zaman içinde epiteli oluşturur. Lens ön yüzeyi ve korneal epitel arasındaki kollajen fibriller kornea stromasını oluşturmaktadır. Altıncı haftada nöral krista kökenli mezenşim hücreleri lens ve epitel arasına göç ederek endoteli oluştururlar. Kırkıncı günden sonra tekrar nöral krista kökenli fibroblastların stromaya göçü ile stroma şekillenmeye başlar. Endoteli oluşturan hücreler küboidal yapıya sahiptir. Bu hücreler dördüncü ayda descemet membranını oluştururlar (Murphy ve ark. 1984, Wulle 1972). Bowman tabakasını epitelin bazal laminasından uzanan fibiller oluşturur. Korneaya ait sinirler

3. ayda stromaya 5. ayda ise epitele ulaşırlar. Daha sonra korneada başlayan dehidratasyon ile kornea saydam halinin almaya başlar.

### **2.1.2 Kornea Anatomisi**

Erişkinlerde korneanın ortalama ölçülen yatay çapı 12,6 mm olup ortalama dikey çapı ise 11,7 mm dir. Ön yüzeyin ortalama eğrilik yarıçapı 7,8 mm' dir. Yenidoğanlarda ise kornea çapı yaklaşık 10 mm olup 6 yaşına doğru kornea erişkin boyutlarına erişmektedir (Mishima 1968). Kornea ön yüzeyinin kırıcılığı 48 dioptridir. Arka yüzeyinin kırıcılığı ise -5,8 dioptri, net kırma gücü ise 43 dioptridir. Kornea kalınlığı merkezde en ince ve yaklaşık 0,52 mm olup perifere gidildikçe kalınlaşarak yaklaşık 0,65 mm'ye ulaşır. Kornea anatomik olarak 5 tabakadan oluşur: Epitel, bowman tabakası, stroma, descemet membranı ve endotel (Aydın P & Aydın Y 2010).

#### **2.1.2.1 Epitel Tabakası**

Epitel birçok fonksiyona sahip olup korneanın en yüzeyindeki tabakasıdır. Bariyer oluşturmak, saydam ve düzgün bir optik yüzey oluşturmak bu fonksiyonlardan bazılarıdır. Non-keratinize 5-6 kat hücre tabakasından oluşmaktadır. Epitel korneanın kalınlığının yaklaşık %10' unu oluşturmaktadır ve 3 tip hücre içermektedir.

- 1- Yüzeyel hücre
- 2- Poligonal kanat hücre
- 3- Bazal kolumnar hücre

Yüzeyel hücreler mikrovillus ve plikalara sahip hücrelerdir. Yüzeylerinde mikrokalks tabaka içerirler ve bu tabakanın görevi de gözyaşı tabakasının kornea yüzeyine tutunmasını sağlamaktır. Yüzeyel hücreler aralarındaki sıkı bağlantılar sayesinde epitel tabakasının bariyer fonksiyonunu üstlenirler. Yüzeyel hücreler birkaç gün içinde görevlerini tamamladıklarında gözyaşının içine dökülürler.

Kolumnar bazal hücreler tek sıra şeklinde bazal membran üzerinde yer alırlar. Bu hücreler mitotik aktiviteye sahiptir. Çogalırlar ve kornea içinde öne doğru ilerleyip kanatsız hücreleri oluşturlar. Kolumnar hücreler aktin filamanlar ve tonofilamanlara sahiptir. Tonofilamanların görevi hücre iskeletini korumaktır. Aktin filamanların görevi ise yara iyileşmesi sırasında hücre göçünde rol alır (Yanoff & Duker 2011).

Kolumnar bazal hücreler epitel tabakasının tek çoğalma yeteneğine sahip hücreleridir. Bazal hücreler yanlarındaki sıkı bağlantılarla birbirleriyle bağlı iken alt taraflarındaki hemidesmozomlar ile de bazal membrana sıkıca tutunurlar. Bazal hücrelerin mitoz bölünerek çoğalmasıyla oluşan yeni hücreler önce kanat daha sonra da yüzeyel hücelere transforme olurlar. Bu hücre turnover'i yaklaşık 7-14 gün sürer. Epitel hücrelerinin altında bazal membran yer alır. Epitel hücrelerinin hasarı durumunda korneada kalıcı iz oluşmaz, bu da yenilenme yeteneklerinin çok fazla olmasına bağlıdır.

Sağlıklı bir kornea yüzeyi için gerekli olan epitelyal kök hücreler, alt ve üst limbusta daha çok yer almaktadır. Bu hücreler büyük olasılıkla Vogt pallsadlarının içinde yer almaktadırlar. Bu kök hücreler aynı zamanda bir bariyer fonksiyonu ile konjonktiva dokusunun kornea üzerine ilerlemesine engel olmaktadır (Kanski & Bowling 2011).

#### **2.1.2.2 Bowman Tabakası**

Kollajen içeriği olarak tip I ve tip III kollajen fibrillerini içinde barındırır. Bu tip fibriller, stromanın ön kısmında yer alan keratositler tarafından üretilir. Travmaya karşı dirençlidirler. Mikroorganizma ve tümör hücrelerinin korneaya invazyonuna engel olup bariyer fonksiyonu üstlenir. Kornea hasarı geliştiğinde bowman tabakasının yenilenme yeteneğinin olmamasına bağlı olarak fibrozis ile skar oluşturarak iyileşir (Kraushmer ve ark. 2005).

#### **2.1.2.3 Stroma Tabakası**

Kornea kalınlığının yaklaşık %90' ını oluşturur ve ortalama kalınlığı 500 µm'dir. Kollajen fibrillerden oluşmaktadır ve birbirine paralel dizilen bu fibriller mukopolisakkaritler ile lameller tarzda birbirinden ayrılırlar. Paralel dizilişlerindeki bozukluklar korneanın saydamlığını etkilerler. Stromanın %78'ini su oluştururken kuru ağırlığının %70'ini ise kollajenler oluşturmaktadır. Düzenli ve paralel dizilim gösteren bu kollajen fibrillerinin çoğunluğunu tip 1 kollajen oluşturmaktadır. Geri kalanını ise tip 3, 5, 6 kollajenler oluşturmaktadır. Kollajen fibrillerinin arasını glikozaminoglikanlar doldurmaktadır. Bu glikozaminoglikanların büyük çoğunluğu keratan sülfattan oluşmakla birlikte geri kalanını kondroitin sülfat ve dermatan sülfat

oluşturur. Stroma da bowman tabakası gibi hasar sonrası yenilenme kabiliyetine sahip değildir (Krashmer ve ark. 2005).

#### **2.1.2.4 Descemet Membranı**

Yetişkinlerde ortalama 10 $\mu$  kalınlığında olup yeni doğanda ise 3 $\mu$  kalınlığındadır. Stroma ile endoteli birbirinden ayırır ve endotel için bazal membran görevi üstlenir. Limbusta sonlanarak Schwalbe hattını oluşturur. İki kısımdan oluşmaktadır, ön taraf intrauterin birikerek gelişmiştir ve kollajenlerden oluşur. Endotele komşu olan taraf ise elastik yapıdadır ve endotel tarafından sentezlenmektedir. Yaralanma durumunda endotel tarafından sentezlenerek rejenerer olur. Bazı hastalıklarda metal depolanabilir, örneğin arjiroziste gümüş, Wilson hastalığında bakır birikir (Krashmer ve ark. 1997).

#### **2.1.2.5 Endotel Tabakası**

Tek sıralı hegzagonal şekilli hücrelerden oluşmaktadır. Korneanın beslenmesinde ve saydamlığının korunmasında çok önemli göreve sahiptir. Aktif pompa aktivitesine sahip olup stroma içindeki fazla sıvıyı dışarı pompalar. Hücreler yaklaşık 5  $\mu$  kalınlığında, 20  $\mu$  genişliğindedirler. Çoğalma kabiliyeti olmayıp yaşla birlikte azalmaktadır. Doğumda yaklaşık 3500 hücre / mm<sup>2</sup> olup erişkinlerde ise 2500 hücre / mm<sup>2</sup> seviyelerine geriler. Rejenerasyon kabiliyeti olmadığı için ölen hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur. Endotel hücre sayısı 500 hücre / mm<sup>2</sup> altına düştüğü zaman kornea ödemi gelişip saydamlığı bozulur ( Krashmer ve ark. 1997).

#### **2.1.3 Korneanın İnnervasyonu**

Kornea çok yoğun duysal innervasyona sahiptir. Ciltten bile yaklaşık 300 kat fazladır. Duysal innervasyonu 5. Kranial sinirin (trigeminal sinir) 1. Dalı (oftalmik dalı) ile alınır. Limbus etrafında uzun silyer sinir sinir halkasını oluşturduktan sonra periferik stromaya miyelinli olarak giriş yapar. Bir süre sonra miyelinini kaybederek öne doğru ilerleyip Bowman tabakasını geçerek epitel içinde kanat hücreleri seviyesinde serbest sinir sonlanmaları olarak sonlanır (Krashmer ve ark. 2005).

#### 2.1.4 Korneanın Beslenmesi

Korneanın metabolik olarak en aktif tabakaları endotal ve epitel hücreleridir. Bu iki yapı korneanın beslenmesi ve dehidratasyonu için yüksek metabolizmaya sahiptirler. Enerji olarak glukozu kullanırlar. Oksijen bağımlı glikoliz için gerekli oksijeni gözyaşı aracılığıyla alırken glukozu ise aköz hümörden sağlamaktadır. Kornea beslenmesi için gerekli glukoz, aminoasit, vitamin ve besin ihtiyaçlarını limbus kaynaklı damarlar ve endotelden aktif transport veya difüzyon ile sağlamaktadır. Metabolik son ürünler ve karbondioksit de benzer yollar ile atılır (Egrilmez 2007, Krashmer ve ark. 2005).

#### 2.1.5 Korneal Yara İyileşmesi, Neovaskülarizasyon ve Fibrozis

Kornea dışardan sürekli fiziksel ve kimyasal olarak travmaya maruz kalmaktadır. Travmaların şiddeti de yara iyileşmesi ve sonucunu etkilemektedir. Yara iyileşmesi sırasında büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks elemanları birbiriyle etkileşerek iyileşmeyi düzenlerler. Fibrozis ve vaskülarizasyon normal yara iyileşmesinin bir parçasıdır ve genellikle inflamasyonu takiben oluşmaktadır. Kornea yapısal olarak damar ve lenf yapısından yoksun olup saydamdır (Freddo & Waring 1998). Patolojik bir durum karşısında korneada vaskülarizasyon ve fibrozis gelişebilmektedir. Bu fibrozis ve vaskülarizasyon karşısında korneanın saydamlığı ve optik özelliği kaybolabilir.

Kornea epiteli bağ dokusundan fakir bir yapıdadır. Yüzeysel epitel hasarında fibrozis gelişmemektedir. Kornea yaralanması derin ve çok geniş bir yapıda olduğunda ise fibrozis ve vaskülarizasyon gelişebilir. Bu fibrozis ve vaskülarizasyonun kaynağı ise ön stromal fibroblastlar ve komşu konjonktivadaki farklılaşan hücrelerdir. Hasarlanan bölgenin iyileşmesi sırasında aktif fibroblastlar ve komşu vasküler endotel hücreler tarafından ekstraselüler matriks sentezlenmektedir. Korneanın uzun süre hipoksik kaldığı bazı durumlarda yüzeysel konjonktivadan kornea üzerine vaskülarizasyon ve fibrovasküler yapı ilerleyebilir. Korneanın ağır yaralanmalarından biri olan alkali yanıklarda oluşan bu fibrovasküler yapılar korneayı tamamen kaplayacak kadar büyük olabilir.(Freddo & Waring 1998, Cogan 1948)

Korneanın görevini yerine getirebilmesi için sürekli dehidrate kalması gerekir. Fiziksel, kimyasal travmalar yüzünden oluşacak stromal ödem bu saydam, düzenli ve

lameller yapının bozulmasına sebep olacaktır. Her zaman olmasa da çoğunlukla inflamatuvar sitokinleri beraberinde getirecektir (Cogan 1948). Oluşan bu inflamasyon da stromal yeni damar oluşumlarına sebep olacaktır. Korneada neovaskülarizasyonu engelleyici mekanizmalar mevcuttur (Levene ve ark. 1963).

Kornea epitel ve stroma hücreleri damar oluşumunu engellemek için bazı etkilere sahiptir. Kornea epitel bazal membranında bulunan endostatin, trombospondin, doku inhibitör metalloproteinaz-3 gibi sitokinlerin neovaskülarizasyon engelleyici etkileri vardır (Lin ve ark. 2001, Armstrong & Bornstein 2003).

Ayrıca kornea epitelinde solubl vasküler endotelial büyüme faktörü (sVEGF) adı verilen vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGF-A) reseptörü vardır. VEGF için bir tuzak reseptörüdür ve membrana bağlı VEGF-A reseptörü 1 ve 2'nin heterodimerizasyonunu engeller (Ambati ve ark. (2006,2007), Chen ve ark. 2000). Limbal epitel hücreleri de bariyer görevi görmektedir. Limbusta kök hücreler vardır. Limbal kök hücre kaybı olduğunda kornea epitelinde oluşan hasarlar konjonktiva epiteli ile onarılmaya çalışılır. Konjonktiva epiteli, kornea epitelinin tersine vaskülarize bir yapıya sahiptir. Yara iyileşmesi konjonktiva epiteli ile yapıldığında saydam olarak iş yapan korneanın optik kalitesi azalır, görme keskinliği düşer ve korneanın diğer görevlerinden biri olan bariyer fonksiyonu bozulmaya başlar.

Korneal neovaskülarizasyonlar (KNV) genellikle stroma içinde yer alırlar. Bazı hastalıklara bağlı olarak farklı tabakalarda ve birden fazla tabakada birlikte yer alabilirler. Neovaskülarizasyon stroma içinde derin ve stromal olarak bulunabilir. Derin KNV descemet membranının üstünde yer alıp stromal herpetik veya sifilitik enfeksiyonlara bağlı olarak oluşabilir. Stromal yerleşimli KNV ler ise daha çok tüm stromal keratitler ve alkali yanıklara bağlı olarak meydana gelip derin KNV'a göre daha yüzeeldir (Chang ve ark. 2001).

### **2.1.6 Anjiogenez**

İnsanlarda damarların gelişimini sağlayan iki süreç vardır. Bunlar vaskülogenez ve anjiogenezdir ve birbirinden farklı süreçlerdir. Vaskülogenez embriyolojik dönemde damarların endotellerin öncü hücrelerinden çoğalıp damar haline gelmesi olayıdır. Bu olayda VEGF gerçek rolü oynamaktadır. Anjiogenez ise

daha önce gelişmiş olan damarlardan yeni damarların gelişmesidir. Bazı fizyolojik ve patolojik durumlarda anjiogenezis önemli role sahiptir. Bu patolojik durumlardan başlıcaları iskemi, inflamasyon ve tümör progresyon evreleridir.

Anjiogenez gerçekleşmesi için antianjiogenik ve proanjiogenik faktörlerin dengesinin bozulması gerekir. Proanjiogenik faktörlerin lehine denge bozulursa bu faktörlerin etkisiyle apoptotik yolağın elamanı olan matriks metalproteinazlar (MMP) ile vasküler yapıdaki bazal membranda yıkım meydana gelir. Daha sonra endotel hücre aktivasyonu sonrası proliferasyon, migrasyon gibi aşamalardan geçerek tüp oluşumu gerçekleşir (Distler ve ark. 2002). Bazal membranın tekrar oluşması ve oluşan bu tüp yapısının etrafına perisitlerin de eklenmesiyle damar oluşumu tamamlanır.

Proanjiogenik faktörlerin en önemlisi ve popülerleri VEGF'tir. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), anjiopoetin 1-2, tümör nekrozis faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) diğer başlıca proanjiogenik faktörlerdir.

Antianjiogenik faktörlerin başlıcaları ise trombospondin 1-2, arrestin, endostatin, anjiostatin, interlökinler (IL-4-12-18) dir (Klagsbrun & D'Amore 1996, Fayette ve ark. 2005).

### **2.1.6.1 Anjiogenik Faktörler**

Bilinen anjiogenik faktörlerden en önemlisi ve en popülerleri VEGF'tir. FGF, PDGF, EGF gibi sitokinler de diğer önemli anjiogenik faktörlerdir.

VEGF 1980' li yıllarda keşfedilmiş olup endotele özgü olduğu ve glikoprotein yapıda olduğu bulunmuştur. 45 KD büyüklüğünde olup VEGF ait gen kromozom 6p21.3 üzerinde yer almaktadır (Vincenti ve ark. 1996). VEGF damar oluşumunda önemli göreve sahiptir. Endotele ait fizyolojik veya fizyopatolojik birçok olayda da önemli görevlere sahiptir.

VEGF büyük bir grup şeklinde görev almaktadır. Bu grubun üyeleri VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve VEGF-F' dir. PDGF ve plasental büyüme faktörü (PIGF) ise VEGF-A ile benzer şekilde etki ederler (Yazır ve ark. 2004, Ferrara ve ark. 2003).

PIGF insan plasentasında keşfedilmiş olup VEGF-A ile benzer reseptörler üzerinden etki ederler (Leung ve ark. 1989).

VEGF-A anjiogenezde en etkili olan faktördür ve etkisini VEGF reseptörü-1 ve 2 (VEGFR-1,2) üzerinden gösterir. Aynı zamanda insan-VEGF'i olarak bilinir (Yazır ve ark. 2004). VEGF-A'nın bilinen 9 adet izoformu vardır (Shams & Ianchulev 2006). Göz patolojileri üzerinde en etkili olan ise VEGF-A<sub>165</sub>'dir (Ferrara & Davis-Smyth 1997).

VEGF-B en fazla iskelet kası, kalp ve pankreasta bulunmaktadır. VEGFR-1'e bağlanır ve hücre adezyonunda görev alır.

VEGF-C en fazla kalp, ince barsak, plasenta ve overde bulunmaktadır. VEGF-C ve VEGF-D lenfatik endotel hücrelerin mitozundan ve yara iyileşmesinden sorumludurlar. Lenfatik damarların hiperplazisinden sorumludurlar. VEGFR-3'ün spesifik aktivatörüdürler. Ayrıca VEGFR-1 ve 2'yi aktive ederek etki gösterirler (Byrne 2005).

VEGFR-1 ve VEGFR-2 daha çok vaskülogenezis ve anjiogenezisten sorumluyken VEGFR-3 lenfanjiogenezisten sorumludur (Kaiser 2006).

VEGF salınımından nötrofiller, makrofajlar, T ve B lenfositler sorumludur. Ayrıca retina pigment hücreleri ve düz kas hücrelerinin de katkısı vardır. TNF, PDGF, FGF, İL-6 gibi sitokinler VEGF üretimini artırırken, İL-10 ve İL-13 VEGF salınımını azaltırlar. Nitrik oksit (NO) de VEGF'in salınımını artırırken, NO'nun salınımını VEGF artırır. VEGF üretiminin ana faktörü iskemi ve hipoglisemidir (Clauss 2000). Makrofajlarla birlikte korneada fibroblastlar ve kornea epitel hücreleri VEGF-A salınımı için önemli hücrelerdir. Korneanın fiziksel ve kimyasal travmalarından sonra bu hücreler VEGF-A salgırlar (Sivak ve ark. 2011).

VEGF'in insan vücudunda birçok fonksiyonu vardır. Bunlardan başlıcaları;

- Anjiogenez, vaskülogenez ve lenfanjiogenezi düzenler (Kaiser 2006).
- Endotel hücreler için yaşamsal faktördür ve apoptozisi engelleyerek yaşamlarının devamlılığını sağlar (Ferrara 2004).
- Lökositlere bağlanarak proinflatuar etki gösterir.



- NO aracılığıyla ve kendi primer olarak vasküler geçirgenliği artırır.

- Yapılan bazı çalışmalarda retinal gangliyon hücrelere karşı koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (Kilic ve ark. 2006).

### **2.1.7 Matriks Metalloproteinaz-9**

Matriks metalloproteinazlar (MMP), gözdeki birçok fizyolojik ve patolojik süreçte temel bir rol oynayan endopeptidazlardır. MMP-9, kornea yüzeyinin yaralanmasından sonra hücre dışı matriksin yeniden biçimlenmesine katılır ve steril korneal yüzey ülseri, oküler alerji, fungal keratit, yanıklar, düzensiz yüzeyle ilerlemiş keratokonus, aktif pterjium, yanık, konjonktivaşalazis, blefarit ve kuru göz gibi hastalıklarda da seviyesi artar (Di Girolamo ve ark. 2000, Corrales ve ark. 2006, Acera ve ark. 2008,2013, Chotikavanich ve ark. 2009). MMP-9 (jelatinaz B) kornea epitel, fibroblastlar, sızan lökositler ve lakrimal bezden üretilir (Acera ve ark. 2008). İL-1, TNF a ve TGF b1 gibi proinflamatuvar sitokinler, MMP üretiminin güçlü uyarıcılarıdır (Stern ve Pflugfelder 2004). MMP-9, korneal hücre dışı matriks bozulmasını ve epitel hücre kaybını artırır (Corrales ve ark. 2006).

### **2.2 Korneal Kimyasal Yaralanmalar**

Kimyasal maddeler hayatımızın birçok yerinde kullandığımız ve yararlandığımız ürünlerdir. Temizlik maddeleri, kozmetik ürünleri, ilaçlar, gübreler, tarımsal ilaçlar gibi birçok çeşidi bulunmaktadır. Bu ürünlerle az ya da çok her insanın teması bulunmaktadır.

Kimyasal maddelerin gözle teması hafif bir sulanma ve blefarospazmdan gözün kaybına kadar giden geniş şiddet skalasında bir tabloya sebep olabilir. Günümüz sanayi toplumunda sık görülen problemlerden biridir. Bu etkilenmenin şiddeti temas edilen kimyasal ürünün pH'sı, yoğunluğu, temas süresi, çeşidi gibi birçok faktöre bağlıdır. Kimyasal yaralanmalar zirai ilaçlarla ve gübrelerle, sanayi ortamında çeşitli kimyasal ilaçlar ve yağlarla, yaşam alanlarında ise çamaşır suyu veya türlü temizlik ürünleriyle meydana gelebilir. Bu tür yaralanmalar endüstriyel kimya laboratuvarında çalışan 20-30 yaş arası erkek bireylerde meydana gelmektedir (Singh ve ark. 2013). Yaralanma durumunda sağlık kurumuna başvuru anında sorgulamamız gereken şeyler ise temas eden maddenin çeşidi, süresi ve yapılan herhangi bir müdahale olup olmadığıdır.

### 2.2.1 Asit Yaralanmaları

Asitler normal hücre pH olan 7,4'ten daha düşük pH'da olan maddelerdir. Asit maddeler ile olan oküler yüzey yaralanmaları bazik olan maddelerle olan yaralanmalara göre daha az ciddi olurlar. Bunun sebebi ise asitler oküler yüzeyde proteinin koagülasyonuna neden olur, bu da gözün daha derin katmanlarına daha fazla nüfuz etmeyi sınırlayan bir bariyer oluşturur. (hidroflorik asit, hücre zarlarından hızla geçebildiği için asit türleri arasında bir istisnadır) (McCulley 1990, Schrage ve ark. 2000, Kirkpatrick ve ark. 1995). Asidik maddeler ne kadar bazik maddeler kadar hızlı nüfuz etmeseler de oküler yüzeye ciddi zarar verecek potansiyele sahiplerdir.

Asitler kollajenlerle reaksiyona girer, boylarını kısaltır bu da sklera ve korneada kısalmaya sebep olarak ani göz içi basıncı (GİB) artışına sebep olur.

### 2.2.2 Alkali Yaralanmaları

Alkali ajanlar pH'ı 7,4'ten daha yüksek olan maddelerdir. Bazik maddeler daha lipofilik olup asit maruziyetlerine göre daha derine ve hızlı nüfuz ederler. Bazik maddelerle yaralanma sonrası trabeküler ağ, lens ve siliyer cisme zarar verecek şekilde ön kamaraya da girebilirler. Bu sürecin hızlı olmasından dolayı 5-15 dk içinde hastalarda geri dönüşü olmayan göz içi hasarlar oluşabilir (Fish & Davidson 2010). Oküler yüzeyin etkilenmesiyle birlikte kornea ve sklerada bükülmeyle birlikte büzülme meydana gelir. Buna bağlı olarak ani göz içi basınç artışı meydana gelir. Uzun dönem göz içi basıncı artışı ise trabeküler ağın fibrotik hasarına ve inflamatuvar maddelerin trabekülumda birikmesiyle meydana gelir.

Oküler yüzeyin hasarlanması, goblet hücrelerin kaybıyla gözde kuruluk ve fornikslerde kontraktür gelişir (Schrage ve ark. 2000, Spector & Fernandes 2008). Alkali yanıkla birlikte konjonktivada goblet hücrelerinde artış olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Wagoner 1997). Limbustaki yoğun hasar, normal korneal epitel iyileşmesinin başarısız olması, korneada neovaskülarizasyon ve konjonktivalizasyona yol açabilecek limbal kök hücre eksikliğine (LSCD) yol açabilir. Gelişebilecek olan lagoftalmus aynı zamanda yeniden epitelizasyonu da engelleyebilir. Lagoftalmus kapaklardaki mekanik değişikliklere, ödemlere veya skara sekonder olabilir. Yoğun konjonktival yanıklar, ilerdeki durumu daha fazla karmaşık

hale getirerek sembleferon, skatrisyel entropiyon, ektropiyon ve trikiyazis gibi uzun vadeli sonuçlara yol açabilir (Cauchi ve ark. 2008, Liang ve ark. 2009, Fish & Davidson 2010, Liu ve ark. 2010, Shekhar ve ark. 2013).

### 2.2.2.1 Patogenez

Olayların tipik patofizyolojik seyri doku pH'ında ani bir değişiklik ve pH bağımlı kimyasal değişikliklerle başlar. Yakın zamana kadar maruz kalınan maddenin pH'ı doku yaralanmasının tipi ve ciddiyetinde en önemli unsur olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, sıcaklık, miktar, darbe kuvveti, konsantrasyon, çözünme katsayısı (örneğin, ozmolarite), redoks potansi ve oküler dokularla spesifik reaktivite (pK değerleri) gibi diğer faktörler, dokunun kimyasal hasarının patofizyolojik kaskadını büyük ölçüde etkileyebileceği gösterilmiştir (Wagoner 1997).

Sıcak solüsyonlar soğuk olanlara göre daha fazla zarar verirler bunun sebebi ise enzimatik yolların sıcaklıkla hızının artmasıdır. Katı maddeler göz kırpmaya yoluyla gözden uzaklaştırılmaz. Kireç veya beton gibi aşındırıcı maddeler konjonktival kese içinde daha fazla konsantrasyonda kalabilir ve doku tahrip etme şansı daha yüksektir. Kireç parçacıkları derin fornikte kalıp zarar vermeye devam edebilir. Koroziv maddelerin darbe kuvveti de dikkate değerdir (Schrage ve ark. 2000). Düşük konsantrasyonda olan maddeler yüksek kuvvette göze çarptığında ciddi hasara neden olabilir. Sonuç olarak oluşan epitel hasarı nedeniyle koroziv madde ile stroma direk temas eder (Frazer ve ark. 1986, Bullock ve ark. 1997). Koroziv maddelerin osmotik gradienti kimyasal yanıkların yaptığı doku hasarında ve bu hasarın ilerlemesinde önemli etkiye sahiptir (Schrage ve ark. 2000).

Alkali ajanlar asit maddelere göre daha derine nüfuz ederler. Bazik maddelerin sahip olduğu hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) iyonu hücre membranında bulunan yağ asitleriyle sabunlaşma reaksiyonuna girer ve bu sebeple hücrede dağılmaya sebep olur. Katyonlar karboksil gruplarıyla ( $\text{COOH}$ ) stromal kollajen ve glikozaminoglikanlarla (GAG) reaksiyona girerler. GAG'lar bu reaksiyonla hidrasyona uğrarlar ve bu hidrasyon stromanın berraklığını yitirmesiyle sonuçlanır. Amonyak ( $\text{NH}_3$ ) maruziyetinde ön kamaraya geçişi nerdeyse hemen olur, sodyum hidroksit (NaOH) ile maruziyette ise yaklaşık 5 dakika sonra ön kamaraya geçiş olur (Paterson ve ark. 1975). Epitel hasar görüp tehlikeye girdiğinde alkali madde alttaki dokulara nüfuz edip proteoglikan

madde ve kollajen matriksi tahrip eder. Güçlü alkalın maddeler hızlıca ön kamaraya geçerler ve trabeküler ağda oluşturdukları skar dokusu ön kamara sıvısının dışı akımını engelleyerek sekonder glokoma sebebiyet verir. Ön kamaraya ulaşmış bu madde iris, siliyer cisim hatta lenste şiddetli inflamasyona neden olur (Eslani ve ark. 2014). Hücre zarlarının erimesi, prostaglandinler, lökotrienler ve interlökinler gibi kemotaksis ve iltihaplanma maddelerinin hızlı immünolojik tepkiye yol açmasını sağlar (Pfister ve ark. 1987,1993).

Alkali yanığına neden olan en sık kimyasal maddeler; genellikle amonyum hidroksit ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ), potasyum hidroksit ( $\text{KOH}$ ), magnezyum hidroksit [ $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ] ve kalsiyum hidroksittir [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ].

### **2.2.2.2 Klinik Muayene**

Kimyasal maruziyetten sonra tam bir göz muayenesi yapılmalıdır. Gözün fornikslerine kadar herhangi bir yabancı cisim olmadığından emin olana kadar muayene devam etmelidir. Yaralanmanın perioküler erken belirtilerinden bazıları; periorbital ödem eritem ve ciltte epitel kaybı, kaşlarda ve kirpiklerde kayıptır. Erken oküler belirtileri arasında ise korneal ve konjonktival epitel kaybı, kemozis, limbal iskemi, korneal bulanıklaşma, ödem, steril ülserasyon ve bazen perforasyon yer alır (Lin ve ark. 2011). Görsel sonuçlar için en önemli prognostik faktör limbal iskemi miktarına bağlı oküler yüzey hasarının derecesidir (Spector & Fernandez 2008, Lin ve ark. 2011) Limbal iskemiye bağlı gelişen limbal kök hücre kaybı prognozu kötüleştirir.

### **2.2.2.3 Klinik Süreç**

Oküler kimyasal yanıkların klinik süreci acil, akut, erken onarım (8-20 gün) ve geç onarım fazları şeklinde ayrılabilir (McCulley 1987).

Kimyasal ajanın gözle teması anında acil fazı başlamıştır. Korneal ve konjonktival epitel defekti alanı, limbal iskeminin saat kadranı şeklinde derecesi, göz içi basınç artışı, kornea opaklaşması miktarı, lens şeffaflığında bozulma gibi durumların belirlenmesi prognoz ve yaralanmanın ciddiyetini belirlemede önemlidir (Roper-Hall 1965, McCulley 1987).

Kimyasal yaralanmadan itibaren ilk 7 gün akut faz olarak sınıflandırılır. Bu süre zarfında, dokular kornea epitelinin yüzeysel koruyucu tabakasını yeniden tesis

ederken kendilerini kirletici maddelerden temizler. Önemli inflamatuvar mekanizmalar oküler yüzeyde ve ön kamarada gelişmeye başlar (McCulley 1987, Singh ve ark. 2013).

Erken onarım fazı yaralanmadan itibaren 8-20. Günleri içeren süre zarfıdır. Bu dönemde stromal skar ve tamiratın olduğu oküler iyileşme geçiş dönemidir. Yine bu dönemde persistant epitel defekti korneal ülserasyona dönüşebilir. İyileşen epitel, dokular ve lökositlerden salgılanan kollajenaz, matriks metalloproteinaz ve diğer proteolitik enzimlerin etkisiyle korneal ülserasyonun oluştuğu gösterilmiştir (Pfister ve ark. 1981, Golub ve ark. 1983, Perry ve ark. 1986, Seedor ve ark. 1987, Ralph 2000, Eslani ve ark. 2014).

Kimyasal yaralanmadan 3 hafta sonra devam eden iyileşme sürecine geç onarım fazı denmektedir. Bu evre iyi görsel prognoz ve sınırlı görsel prognoza neden olacak bazı komplikasyonların eşlik edebileceği iyileşme süreci ile karakterizedir. Kronik, ciddi bir inflamatuvar reaksiyonun sebebi kimyasal hasar nedeniyle yıkılmış ürünlerin antijen gibi davranması ile lökosit ve makrofajların invaze olmasıdır. Bazı ciddi olgularda bu kronik olaya retina ve vitreus da eşlik eder. Tedaviye dirençli sekonder glokom cerrahi müdahale ve uzun süre antiglokamatöz medikasyon gerekebilen sık bir komplikasyondur (Kuckelkorn ve ark. 1994). Kronik inflamasyon birçok geç komplikasyona sebep olabilir. Bunlar; katarakt, üveit, korneal skar, kseroftalmi, skatrisyel entropiyon, ektropiyon ve trikiastir.

### **2.2.3 Kimyasal Yanıkların Sınıflandırılması**

Kimyasal yanığın evresinin belirlenmesi sonuçların tahmini açısından faydalı olabilir. En önemli prognostik faktörün hayatta kalan limbal kök hücrelerin miktarı olduğu gösterilmiştir (Spector & Fernandez 2008, Lin ve ark. 2011).

Birkaç sınıflama önerilmiştir (Roper-Hall 1965, Pfister 1983, Dua ve ark. 20001): Roper-Hall sınıflaması ilk defa 1960' larda Ballen (1964) tarafından geliştirilmiştir ve Roper-Hall (1965) tarafından modifiye edilmiştir. Bu sınıflamanın temeli büyük ölçüde korneal haze derecesi ve limbal iskemi miktarına dayanmaktadır. (Tablo 1)

Tablo 1: Oküler yüzey yanıklarının şiddetini belirleyen Roper-Hall sınıflaması.

Grade	Klinik	Bulgular	Prognoz
	Kornea	Konjonktiva/Limbus	
I	Korneal epitel hasarı	Limbal iskemi yok	İyi
II	Korneal haze, iris detayları görünür	<1/3 Limbal iskemi	İyi
III	Total epitel kaybı Stromal haze İris detayları görünmez	1/3-1/2 Limbal iskemi	Sınırdadır
IV	Kornea opak İris ve pupil görünmez	>1/2 Limbal iskemi	Kötü

Pfister daha sonra yaralanmayı korneal haze ve perilimbal iskemi gösteren fotoğraflara dayanarak hafif, orta-hafif, orta, orta-ağır, ağır ve çok ağır şeklinde sınıflandıran yeni bir sınıflandırma sistemi sunmuştur (Pfister 1983).

Dua (2001), saat kadranı olarak limbal tutulum miktarına ve bulbar konjonktival tutulum yüzdesine dayanan bir sınıflandırma şeması önerdi.(Tablo 2)

Tablo 2: Oküler yüzey yanıkları yeni sınıflandırması(Dua)

Grade	Prognoz	Klinik Bulgular	Konjonktival katılım	Oran*
I	Çok iyi	Limbal katılım yok	0%	0/0%
II	İyi	≤ 3 saat kadranı limbal katılım	≤ 30%	0,1-3/1-29,9%
III	İyi	>3-6 kadran limbal katılım	>30-50%	3,1-6/31-50%
IV	Sınırlı iyi	>6-9 kadran limbal katılım	>50-75%	6,1-9/51-75%
V	Sınırlı kötü	>9-<12 kadran limbal katılım	>75-<100%	9-12/75,1-99,9%
VI	Çok kötü	Tüm limbus katılımı	Tüm konjonktiva katılımı	12/100%

\*Saat kadranı şeklinde limbal katılım/ katılan konjonktiva yüzdesi

## **2.2.4 Kimyasal Yanıkların Tedavi Planlaması**

Oküler kimyasal yanıkların tedavisi yaralanmanın mekanizması ve sonradan gelişecek olan inflamatuvar olaylar hesaplanarak planlanır.

### **2.2.4.1 Acil Müdahale**

Kimyasal yanık durumunda yapılacak tedavinin aciliyeti tedavinin sonucunu olumlu yönde etkiler ve bu nedenle dikkatli bir şekilde muayene yapılırken müdahale geciktirilmemelidir. Akut bir kimyasal yanmadan sonra, rahatsız edici kimyasalları yıkamak için acil ve kapsamlı bir yıkama gereklidir ( Paterson ve ark. 1975, Wagoner 1997, Salzman & O'Malley 2007, Spector & Fernandez 2008, Rodrigues 2009).

Yıkama için serum fizyolojik veya ringer laktat gibi solüsyonlar kullanılıp İV infuzyon seti takılarak en az 10 dakika yıkamaya devam edilmelidir. Oküler yüzey pH'ı normalleşinceye kadar yani 7 olana kadar yıkamaya devam edilir. Oküler yüzey pH'ı idrar pH şeridi kullanılarak ölçülebilir. Eğer şerit mevcut değilse fazla fazla yıkamakta fayda vardır (Schrage ve ark. 2000).

Yıkama sona erdirildiğinde oküler yüzey ve forniksler kontrol edilir. Üst ve alt kapağında altında kalmış olabilecek partiküller yumşak uçlu bir aplikatör ile temizlenir. Yıkama ile pH'ın normale getirildiğinden ve oküler yüzeyin kimyasal maddeden temizlendiğinden emin olduğunda temiz bir forseps veya pamuk çubuk ile nekroze olmuş, ölmüş epiteller debride edilip temizlenir.

Oküler kimyasal yanıklarda ilk müdahale yapacak oftalmolog olmayan kişilerin bu konuda eğitilmeleri ve bilgi sahibi edilmeleri hastaların prognozu için önemlidir (Kuckelkorn ve ark. 1995).

### **2.2.4.2 Akut Faz Tedavisi**

Tedavi planı büyük ölçüde muayene bulgularına bağlıdır. Akut faz tedavisinin temel amaçları, yeniden epitelizasyonu sağlamak, inflamasyonu azaltmak, enfeksiyonu önlemek, daha fazla epitel ve stromal bozulmayı önlemek ve sekeli en aza indirmektir (Eslani ve ark. 2014).

#### **2.2.4.2.1 Epitelizasyonu Sağlamak**

Koruyucu madde içermeyen gözyaşı preparatları ve lubrikant merhemler persistent epitelopatıyı düzeltebilir, tekrarlayan erozyon riskini azaltırken görsel iyileşmeyi hızlandırabilir (Singh ve ark. 2013). Oküler yüzey yanığına sahip hastalar sistemik C vitamini tedavisinden fayda görürler çünkü C vitamini kollajen sentezini ve yara iyileşmesini destekler (Pfister & Paterson 1980, Pfister ve ark. 1981,1988). İçeriğinde iyileşmeyi artıran birçok faktör olan otolog serum gözyaşları epitelizasyonu artırmak için kullanılabilir (Tsubota ve ark. 1999, Imanishi ve ark. 2000, Goto ve ark. 2001, Tananuvat ve ark. 2001, Poon ve ark. 2001, Vajpayee ve ark. 2003, Panda ve ark. 2012). Epitel iyileşmesi geciken hastaların epitel iyileşmesini hızlandırmak için kontakt lensler bandaj amacıyla kullanılabilir. Bandaj kontakt lensler aynı zamanda korneanın kurummasını, göz kapağının açılıp kapanırken ağrı hissi olmasını ve epitele hasar vermesini önleyebilir (Burns & Chylack Jr. 1979).

#### **2.2.4.2.2 İnflamasyon Önleyici Tedavi**

Topikal kortikosteroidler, kimyasal yaralanmaların tedavisinde akut inflamasyonun kontrolünde kilit bir role sahiptir. İnflamasyonda rol alan hücrelerin yara yerine infiltrasyon yeteneğini azaltırlar ve nötrofillerin içinde inflamatuvar sitokinleri taşıdığı sitoplazmik ve lizozomal zarlarını stabilize ederek salgılanmalarını önlerler. Oküler yüzeydeki ve ön kamaradaki inflamasyonun üzerinde geriletici etkiye sahiptir. Dezavantajı aynı zamanda reepitelizasyon ve kollajen sentezini de inhibe etmesidir(Saud ve ark. 2012).

Kortikosteroidlerle alakalı genel olarak inanılan düşünce 10-14 günden fazla kullanılmaması gerektiği yönündedir. Bunun sebebi ise kollajen sentezini azaltması, korneal incelmeyi kötüleştirilmesi ve olası bir perforasyona sebep olabileceği içindir (Beams ve ark. 1968, Donshik ve ark. 1978). Steroidler hakkında korkulan diğer bir yön ise persistent epitel defektine sebep olabilecekleridir. Korneal epitel defekti



kapanmışsa topikal kortikosteroidler 7-10 günden fazla güvenli bir şekilde kullanılabilir.(Phillips K ve ark. 1983).

Sitrat, polimorfonükleer lökositlerin yanmış dokuya göçünü engellemek için başarıyla kullanılmıştır, böylece serbest radikallerin ve proteolitik enzimlerin salınımını azaltmaktadır (Pfister & Paterson 1980, Pfister ve ark. 1981,1988). Serbest radikaller hidroksil iyonları tarafından oluşturulur. C vitamini ve tokoferoller ile bu serbest radikaller temizlenebilir (Schrage ve ark. 2000). Korneal yanıklardan sonra oluşan iris ve silier cisimde spazm meydana gelir. Bu spazm hastalarda künt ağrı, blefarospazm ve fotofobi oluşturur. Sikloplentolat %1, atropin %1, hematropin %5, skopolamin %0,25 gibi sikloplejik ajanlar kullanılarak siliyer spazm azaltılıp hastaların ağrısında azalma sağlanabilir (Wagoner 1997).

Korneal alkali yanık steril bir inflamasyona neden olur, fakat oküler yüzeyde meydana gelen hasar ve inflamasyon nedeniyle sekonder enfeksiyonlar açısından riskli durumdadır. Her ne kadar antimikrobiyal tedavi gerekmesede de profilaksi için topikal antimikrobiyal tedavi verilmelidir.

#### **2.2.4.2.3 Yüksek Göz İçi Basıncı Tedavisi**

Alkali yaralanmalarda alkali ajan kolayca trabeküler ağa ulaşabilir ve göz içi basıncında yükselmeye sebep olacak hasara neden olabilir. Bu yüzden göz içi basıncı mutlaka takip edilmelive yüksekliği gözden kaçırılmamalıdır. Mevcut olan epitel defekti de göz önüne alınarak epitel toksisitesini önlemek için topikal antiglokomatözler yerine oral veya i.v tedavi tercih edilmelidir. (Mannitol %20 1-2gr/kg, Asetazolamid 5-10 mg/kg günde 4 kere) Oküler yüzey yanıkların kronik döneminde sekonder dirençli glokom gelişebilir ve bunun tedavisi için de cerrahi müdahale gerekebilir (Tsai ve ark. 2006).

#### **2.2.4.2.4 Sekel Oluşumunu Önleme Tedavisi**

Semblefaron oluşumu için oküler yüzey günlük olarak kontrol edilmelidir. Semblefaron oluşumunu etkili bir şekilde önlemek için, fornikslere semblefaron halkası yerleştirilebilir. (Lin ve ark. 2011). Bu halkalar palpebral ve bulbar konjonktivayı birbirinden ayırarak akut dönemde semblefaron oluşumunu önlerler fakat ileriki dönemde adezyon ve yapışıklıklara sebebiyet verebilecek kronik skatrizan değişiklikleri önleyemeyebilir (Gregory 2008).

Korneada erime ve ülserasyon en ağır korneal kimyasal yanıklarda ortaya çıkmaktadır. Korneal incelme kollajenazlar ve matriks metalloproteinazlar tarafından meydana gelir.

Proteinaz inhibitörlerinden aprotinin gibi ve sistein, asetilsistein, sodyum etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), kalsiyum EDTA, penisilamin, sitrat ve özellikle tetrasiklinler gibi kollajenaz inhibitörlerinin kimyasal olarak yanan kornealarda incelmeyi önlediği bildirilmiştir (Reim ve ark. 1993, Wagoner 1997, Ralph 2000, Singh ve ark. 2013, Ling ve ark. 2013).

### **2.2.4.3 Cerrahi Tedavi**

Oküler kimyasal bir yanık durumunda cerrahi tedavinin öncelikli amacı glob bütünlüğünü korumak ve epitel iyileşmesini hızlandırmak olacaktır. Erken cerrahi tedavi eğer gerekliyse nekrotik materyali debride etmekten başlayıp, amniyotik membran transplantasyonu ile devam edip, tektonik greftlemeye kadar gidebilen çerçevede yapılabilir.

Geç cerrahi girişimler ise normal görme fonksiyonunu ve normal oküler yüzey anatomisini restore etmek için yapılır. Bunlar arasında göz kapağı anormalliklerinin düzeltilmesi, glokom cerrahisi, limbal kök hücre nakli ve en sonunda keratoplasti bulunur.

#### **2.2.4.3.1 Tenon İlerletilmesi**

Grade IV ve ciddi korneal yanıklarda limbal vaskülarite kaybı ön segment nekrozuna sebep olabilir. Ek olarak kornea konjonktivalizasyonuna ve reepitelizasyon yokluğuna neden olabilir. Limbal kan dolaşımını yeniden sağlamak için erken müdahale, potansiyel geç komplikasyonları önleyebilir.

Tenonplasti, nekrotik doku debridmanını ve iskemi alanının altındaki komşu sklera ve limbusun üzerine canlı vasküler Tenon tabakasını ilerletmeyi içerir. Bu işleme amniyotik membran transplantasyonu da eklenebilir (Kuckelkorn ve ark. 1995).

#### **2.2.4.3.2 Limbal Kök Hücre Transplantasyonu**

Limbal kök hücre eksikliği ağır kimyasal yanıkların görsel olarak en önemli uzun dönem sekellerinden biridir. Korneal neovaskülarizasyon ve persistent epitel defektin klinik belirtilerinden biri olan kronik irritasyondan muzdarip olan hastalar

için limbal kök hücre transplantasyonu düşünülebilir (Tseng ve ark. 1998, Fernandes ve ark. 2004, Bakhtiari & Djalilian 2010)

Genel olarak, limbal kök hücre transplantasyonunu (yaralanma zamanından itibaren) mümkün olduğunca geciktirmek en iyisidir, çünkü oküler yüzey inflamasyonu ne kadar fazla kontrol edilirse sonuçları o kadar iyi olur. Aynı şekilde, limbal kök hücre nakli düşünülmeden önce tüm göz kapağı anormalliklerinin (örneğin, trikiasis ve sembleferon) tedavi edilmesi önerilir (Bakhtiari & Djalilian 2010).

Limbal kök hücre hastanın kendisinden alınabildiği gibi kültürde üretilmiş limbal epitelyal hücre transplante edilebilir (Eslani ve ark. 2011,2012). Ayrıca kadavradan veya ebeveynleri, kardeşleri ve çocuklarını içeren yakın ailesinden de alınabilir. Otolog limbal kök hücre transplantasyonu sadece tek taraflı oküler yüzey yanıklarında uygulanabilir. Limbal kök hücre transplantasyonu için birçok cerrahi teknik tanımlanmıştır (Solomon ve ark. 2002, Kim ve ark. 2003, Espana ve ark. 2004, Javadi & Baradaran-Rafii 2009).

#### **2.2.4.3.3 Korneal Transplantasyon**

Yanık hastalarında son çare olarak cerrahi müdahale olan tektonik penetran keratoplasti (PKP), ciddi incelme, büyük desmatosel ve perfore olmak üzere veya kornea perforasyonu olan olgularda kaçınılmaz olabilir. Yaygın stromal skarlı hastaların görsel rehabilitasyonu için konvansiyonel lameller keratoplasti (LKP) veya derin anterior lamel keratoplasti (DALK) uygulanabilir (Alio ve ark. 2002, Baradaran-Rafii ve ark. 2013).

### **2.3 Amniyotik Membran**

#### **2.3.1 Tarihçe**

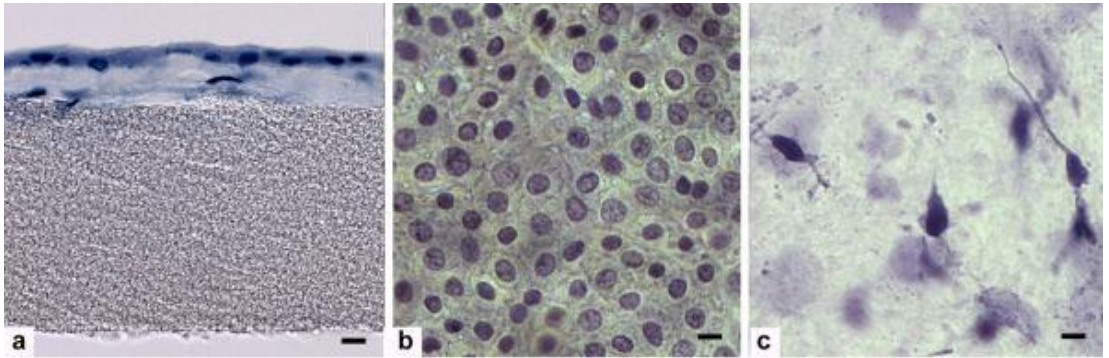
Amniyotik membran (AM) ilk olarak Davis (1910) tarafından cilt transplantasyonu için terapötik amaçla kullanıldı. Oftalmolojideki insan fetal membranlarının ilk uygulaması, semblefaronlu hastalarda oküler yüzeyin yeniden yapılandırılması amacıyla de Rotth (1940) tarafından tanımlanmıştır. Daha sonraları amniyotik membranın iyileşmeyen ülserlerin tedavisinde ve fizyolojik yara iyileşmesinde yardımcı olarak kullanıldığına dair birçok vaka raporlanmıştır (Dua ve

ark. 2004). Bununla birlikte, AM'in modern oftalmik kullanımı, Kim ve Tseng'in (1995) çalışmaları sonucunda gelişti.

Şeffaf yapısı, immünojenik yapıda olmaması, korneal ve konjonktival epitelyal hücrelerin büyümesi, göçü ve yapışması için bir substrat olarak mükemmel potansiyeli nedeniyle, AM, limbal kök hücre eksikliği ile ilişkili kornea bozuklukları da dahil olmak üzere konjonktival rekonstrüksiyon ameliyatları, glokom ameliyatları, skleral erimeler ve perforasyonları da içeren çeşitli oküler patolojilerde oküler yüzey rekonstrüksiyonu için giderek daha fazla kullanılmaktadır (Baradaran-Rafii ve ark. 2007, Rahman ve ark. 2009, Malhotra & Jain 2014).

### 2.3.2 Yapı ve İşlev

AM, fetüsle bitişik bulunan plasentadaki en içteki katmandır. Yarı saydam yapıda olup 0,02-0,05 mm kalınlıktadır. AM ne kan damarına sahiptir, ne de direk kanla teması vardır. Üç farklı tabakadan meydana gelir; epitelyum, bazal membran ve stroma. Epitel, çok sayıda mikroviliye sahip, metabolik olarak aktif tek katlı küboidal hücrelerden oluşur. Bazal membran özellikle tip IV ve VII kolojen, fibronektin, laminin ve hyaluronik asit içerir. Avasküler stroma kendi içinde üç tabakaya ayrılır; iç sıkı tabaka, gevşek fibroblast bağlantılara sahip orta fibroblast tabaka ve en dıştaki nerdeyse hücresiz süngerimsi tabaka. Stroma daha çok kollajen tip I, II, III, V ve VI'dan oluşur (Champliaud ve ark. 1996, Fukuda ve ark. 1999, Cunningham ve ark. 2001). (Resim 1)



Resim 1: İnsan amniyotik membran **a)** Nitroselüloz filtre kağıdına temas eden stromal tabaka ve epitel tarafı yukarı bakacak şekilde dondurulmuş doku **b)** Taze amniyotik membran-epitel dokusu **c)** Taze amniyotik membran-- mezenkimal hücrelerle birlikte stroma

Ek olarak, AM, su ve çözünür bileşiklerin taşınmasına izin verme, epitel büyüme faktörü (EGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve reseptörü, keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve reseptörü ve tümör büyüme faktörü (TGF a, TGF b-1, b-2 ve b-3 izoformları) gibi büyüme faktörlerinin üretilmesi kabiliyetinden dolayı önemlidir (Koizumi ve ark. 2000). Ayrıca, sitokinler (baskın olarak IL 6 ve 8 ve amniyotik interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )) ve vazoaktif peptitler AM tarafından salgılanır (Cunningham ve ark. 2001).

### **2.3.3 Özellikleri ve Etki Mekanizması**

AM, epitelizasyonu teşvik eder ve antifibrotik, antiinflamatuvar, antianjiyogenik ve antimikrobiyal özellikler gösterir. İmmünojenik olmayışı, greft olarak kullanılması ile ilgili olarak AM'nin önemli bir özelliğidir. Şeffaf yapısı nedeniyle AM'nin epitel hücrelerin büyümesi, göçü ve yapışması için mükemmel bir substrat görevi gördüğünden oküler yüzeye uygun bir şekilde uygulanabilir. Ek olarak, AM fizyolojik nemli mikro çevreyi muhafaza edebilir, su kaybını azaltır ve yara iyileşmesini destekler (Baradaran-Rafii ve ark. 2007).

#### **2.3.3.1 Mekanik Özellikleri**

AM'nin bazal membranı, özellikle kollajen bileşimi olarak konjonktiva ve korneanıninkine çok benzer (Fukuda ve ark. 1999). Bu özelliğine bağlı olarak oküler yüzey epitelinin büyümesi için iyi bir substrat görevi görür.

AM epitelin büyümesini ve diferansiasyonunu stimüle eder. Bazal epitelyal hücrelerin yapışmasını güçlendirir ve epitelyal hücrelerdeki apoptozisi önler. Epitelizasyon, EGF, HGF ve KGF üretimi ile kolaylaştırılmıştır (Keene ve ark. 1987, Guo & Grinnell 1989, Meller ve ark. 2002).

#### **2.3.3.2 Antifibrotik ve Antiinflamatuvar Etki**

AM'nin antifibrotik etkisi, TGF b-1, b-2 ve b-3 izoformlarının ve TGF-beta reseptörünün ekspresyonunun azaltılması ile birlikte TGFb sinyalinin baskılanmasıyla sağlanır. Bu, korneal, limbal ve konjonktival fibroblastların çoğalmasını ve aynı zamanda fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını önler (Tseng ve ark. 1999, Lee ve ark. 2000).

AM'nin antienflamatuar etkisi, interlökin IL-1a, IL-2, IL-8, IL10, IFN- $\gamma$ , bFGF, TNF- $\beta$  ve PDGF gibi hasarlı oküler yüzeyden üretilen proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunun azaltılması ile sağlanır (Solomon ve ark. 2001). AM'nin bazı antienflamatuar ve antifibrotik etkilerinin, özellikle epitel ve stromal hücreler üzerinde eksprese edilen Fas reseptörü aracılığıyla apoptozis aracılığından dolayı olduğuna inanılmaktadır (Kubo ve ark. 2001).

### **2.3.3.3 Antimikrobiyal Etki**

AM ve amniyotik sıvının antimikrobiyal etkisi, amniyon sıvısında baktrisidin, beta-lisin, lizozim, transferrin ve 7-S immüoglobulinlerin varlığıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca AM, yara yüzeyine yapışması nedeniyle gözün iç kısımlarına olası enfeksiyon girişine karşı etkili bir fiziksel bariyer görevi görür (Galask & Snyder 1970, Kjaergaard ve ark. 1999).

### **2.3.3.4 İmmünomodülatör Etki**

Başlangıçta, AM hücrelerinin yüzeyinin majör insan lökosit antijenleri (HLA) antijenleri HLA-A, B veya DR içermediğine inanılıyordu, ancak sonraki çalışmalar, AM epitel ve mezenkimal hücreleri tarafından sınırlı bir HLA sınıfı Ia (HLA-A, B, C, DR) ve sınıf Ib (HLA-E, G) antijenlerinin ekspresyonunu göstermiştir. AM transplantasyonu uygulanan hiçbir hastada akut red reaksiyonu gösterilmemiştir. Bu özelliklerinden dolayı AM transplantasyonundan sonra herhangi bir immünsüpresif kullanmaya gerek yoktur (Houlihan ve ark. 1995).

### **2.3.4 Donör Taraması**

Donörün maligniteler, genetik veya bulaşıcı hastalıklar için tıbbi geçmişinin kapsamlı bir doğum öncesi taraması yapılır. Ek olarak, donörün sosyal geçmişinin (yüksek riskli cinsel davranış öyküsü, intravenöz ilaç veya alkol kötüye kullanımı, kan transfüzyonu vb.) dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi yapılır ve özel bir dikkatle dövme izlerine de dikkat edilerek ayrıntılı bir fizik muayene yapılır. AM transplantasyonunun ne kadar risksiz olduğu bilinse de komplikasyonlar olabilir. Özellikle, eğer AM donörleri bulaşıcı hastalıklar için uygun bir şekilde taranmadığı takdirde, membran steril bir çalışma ortamında aseptik teknikler kullanılarak tedarik edilmemiş ve işlenmemişse veya saklama koşulları uygun değilse alıcılara bakteri, viral veya mantar enfeksiyonlarını iletme riski mümkündür (Malhotra & Jain 2014).

Donör kanı örnekleme bağı sırasında veya doğumdan kısa bir süre sonra alınmalıdır. HIV-1/2, hepatit B ve C ve sifiliz taraması zorunludur. HTLV-I / II, toksoplazmoz, CMV vb. gibi diğer seroloji testleri, ulusal yasalara veya kılavuzlara uygun olarak gerçekleştirilir (Keitel 2015).

### 2.3.5 Amniyotik Membranın Alınması ve Hazırlanması

Plasenta taranmış bir donörden elektif bir sezaryen sonrası eğitilmiş bir sağlık personeli tarafından aseptik şartlara uyularak alınmalıdır. AM tedavi amaçlı kullanmak için alındığında tüm donörlerden bilgilendirilmiş onam alınmalıdır. Alınan plasenta steril bir kaba alınmalıdır ve AM hazırlanması aşamasına geçilmelidir.

Amniyon zarı taze ve donmuş olarak iki farklı şekilde kullanılabilir. Donmuş AM hazırlanırken uygun şekilde taranmış donörden steril şartlarda alınmış plasenta gram pozitif, gram negatif ve funguslara etkili antibiyotik ve antimikotik karışımı bir solüsyonla içinde bekletilmelidir. Bu antibiyotik karışımı daha önce yapılan çalışmalara dayanılarak 50 µg/mL penisilin, 50µg/mL streptomisin, 100 µg/mL neomisin ve 2,5 µg/mL amfoterisin B içermelidir (Kim ve ark. 2001, Malhotra & Jain 2014). Alternatif olarak sterilizasyon için gama radyasyon uygulanabilir (Gajiwala 2014).

AM hazırlığı, göbek kordonuna yakın yapılan bir kesim ile başlar, sonra amniyonu koryondan ayırmak için künt diseksiyon kullanılır. Amniyon koryondan ayrılır ve koryon atılır. Büyük AM parçaları alınır ve kandan temizlenir. Epitel tarafı yukarda kalacak şekilde steril nitroselüloz filtre kağıdının üstüne yapıştırılır (Kim ve ark. 2001). Filtre kâğıdı üzerindeki AM düzenli boyutlarda (2x2, 3x3, 4x4 vs.) kesilerek gerft şeklinde hazırlanır. Bu preparatlar işlem yapılana kadar saklama solüsyonu içeren küçük şişelerde saklanır. Saklama solüsyonu 1:1 oranında Dulbecco'nun modifiye Eagle solüsyonu ile gliserol(%86) içerir (Kim & Tseng 1995, Lee & Tseng 1997). Bu preparatlar bu şekilde -80 derecede muhafaza edilir ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığında eritilir ve 24 saat içinde kullanılır.

Taze amnion zarı alınması planlanan gebe donörün Hepatit B, C, sifiliz ve HIV açısından araştırılıp doğumdan önceki 6 ay ve doğumda seronegatif olması gerekir. Elektif komplikasyonsuz sezeryandan steril şartlarda çıkarılan plasenta steril bir kaba alınır. Kordona yakın yerden kesi yapıp künt hareketlerle amniyon koryondan ayrılır.

Amniyonu ayırdıktan sonra 50 µg/mL gentamisin içeren steril serum fizyolojik ile yıkanır ve 30 dakika bu antibiyotikli solüsyonda bekletilip kullanılabilir (Gris ve ark. 2002).

Taze ve dondurulmuş AM'nin oküler yüzeye nakledildiğinde eşit derecede etkili olduğu bulunmuştur. Yukarıda belirtilen özelliklerin tümü her iki tip için geçerli değildir (Addis ve ark. 2001). Taze amnion zarının kullanımındaki en önemli sakınca, kanda rutin testlerde tespit edilemeyen yani pencere döneminde olan hepatit gibi viral hastalıkların iletilmesine sebep olabilmesidir. Tedavi edici etkinliği açısından bakıldığında, taze ve dondurulmuş amnion zarı arasında herhangi bir fark bulunmamıştır (Baum 2002).

### 2.3.6 Amniyotik Membranın Oftalmolojide Kullanımı

AM'nin oftalmik kullanımında birkaç temel amaç vardır: epitelizasyonu teşvik etmek, ağrıyı azaltmak, oküler yüzeyin inflamasyonunu en aza indirmek ve cerrahi adezyonları önlemek (Dua ve ark. 2004). AM'nin diğer önemli özelliği alıcı dokuya entegre olabilme özelliğidir. Hemidesmosomların ve dezmozomların oluşumu ile ilişkili bu entegrasyon, yenilenecek epitel için destek ve stabilite sağlar (Resch ve ark. 2006). AM, aşağıdaki endikasyonlar için oftalmolojide kullanılır;

- Persistent epitelyal defektler
  - İyileşmeyen korneal ülserler
  - Korneal perforasyonlar ve desmatoseller
  - Semptomatik büllöz keratopati
  - Kornea hastalıkları ve ilişkili limbal kök hücre eksikliği
  - Pterygium ve konjonktiva rekonstrüksiyonu (oküler yüzeydeki skuamöz neoplaziler)
    - Travma, yanık vs. sebebi ile meydana gelen kornea erimesi
    - Glokom filtrasyon cerrahisinde skar oluşumunu engellemek için
- (Rahman ve ark. 2009, Malhotra & Jain 2014).

### 2.3.7 Oküler Yanıklarda AM Transplantasyonu

Kimyasal ve termal yanıklarda oküler yüzeyde çok şiddetli inflamasyon gelişir. AM transplantasyonu yaralanmanın erken döneminde yapılırsa inflamasyonu azaltır, epitelizasyonu hızlandırır, semblefaron oluşumunu önler ve limbal kök hücreler



üzerine koruyucu etki yapar (Meller ve ark. 2000, Sangwan ve ark. 2006). AM transplantasyonu kimyasal ve termal yanıklarda kronik fazda yapılarak travmatik yüzeyin yeniden yapılanmasında, sembleferon oluşmasını engellemede kullanılır.

Akut kimyasal yanık nedeniyle iyileşmeyen epitel defekte sahip 5 göze ve yine kimyasal yanık nedeniyle limbal kök hücre yetmezliği olan 4 hastaya taze hazırlanmış AM kullanılarak AM transplantasyonu yapılmış. AM transplantasyonunun epitel hasarı olan olgularda epitel iyileşmesini hızlandırdığı, semptomları, enflamasyonu, vaskülarizasyonu azalttığı, yeniden epitel hasarı oluşumunu ve aberran fibrozis oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Limbal kök hücre yetmezliği olan hastalarda ise limbal kök hücre nakli ile birlikte veya tek başına oküler yüzey rekonstrüksiyonunu sağladığı bildirilmiştir (Uçakhan ve ark. 2001).

AM çoğunlukla, kornea veya konjonktival epitel hücrelerinin büyümesini kolaylaştıran bir substrat olarak kullanılır. Bu durumlarda AM epitelyal tarafı yukarı gelecek şekilde yerleştirilir. Az sayıdaki durumlarda, özellikle akut inflamasyonu önlemek için AM kullanıldığında, AM epitelyal tarafı aşağı doğru yerleştirilir.

Belirli patolojilere bağlı olarak üç ana cerrahi teknik vardır; greft(inlay) tekniği, yama(overlay) tekniği, kombine(inlay ve overlay) teknik.

#### **2.3.7.1 Greft (İnlay) Tekniği**

AM'nin epitelyal hücrelerin büyümesi için bir substrat veya iskele görevi görmesi amaçlanmıştır, bu nedenle AM epitelyal tarafı yukarı yerleştirilir. Bu teknik daha çok bazal membran hasarlanan durumlarda kullanılır. AM bu durumda bazal membran görevi görür ve epitel greftin üstünden büyüyebilir. AM epitelin altında bir süre kalabilir ve görme bir süre bozulacaktır.

Yara yerinden bir miktar büyük yerleştirilmelidir ve tespit için 10/0 nylon suture kullanılmalıdır.

#### **2.3.7.2 Yama (Overlay) Tekniği**

AM, hasarlı bölgeden daha büyük bir yama kullanılarak oküler yüzeye dikilir, böylece konakçı epiteli zarın altında bulunur. AM, biyolojik bir bandaj veya kontakt lens görevi görür ve epitelin zarın altında büyümesi beklendiğinden, epitelyal taraf yukarı veya stromal taraf yukarı kullanılabilir. AM' nin stromal tarafı pamuk uçlu bir aplikatör ile yükseltilebilir vitre benzeri telleri görerek anlaşılabilir. AM konjonktiva ve episkleraya 8/0 vcrlye suture ile dikilebilir.

### 2.3.7.3 Kombine (İnlay ve Overlay) Tekniği

İki veya daha fazla AM katmanı kullanılır, iç küçük katman bir greft görevi görür ve dış büyük AM bir yama görevi görür. Epitelin bu iki katman arasında büyümesi beklenmektedir (Dua ve ark. 2004, Baradaran-Rafii ve ark. 2007, Malhotra & Jain 2014).

### 2.3.8 Oftalmoloji Dışı Kullanımı

Oftalmolojinin yanı sıra AM, dermatolojide yaygın olarak kullanılmıştır, venöz bacak ülserleri, cilt ülserleri ve yanık sonrası geçici cilt kapaması için alternatif bir tedavi işlevi görmüştür (Koller & Orsag 2006, Tauzin ve ark. 2014). Ek olarak AM, vajinal rekonstrüksiyonda, cerrahi adezyonların önlenmesinde, oral ve çene-yüz cerrahisinde veya baş boyun ameliyatlarında kullanılmıştır (Dua ve ark. 2004, Kesting ve ark. 2014).

AM hücre yetiştirmek için bir substrat ve iskele görevi görür. AM kültür limbal epitelyal hücrelerin büyümesi için greft olarak kullanılmıştır.

AM'nin hücrelerin genişlemesi, çoğalması ve hücrelerin oküler yüzey üzerindeki klinik uygulamaları için bir taşıyıcı olarak başarılı kullanımı tekrar tekrar gösterilmiştir (Tseng ve ark. 2010).

AM'nin hem epitel hem de mezenkimal olmak üzere iki tip pluripotent hücre içermesi nedeniyle çeşitli hücre greftlemesi için potansiyel olarak cazip bir hücre kaynağı olduğu düşünülmektedir. AM hücreleri, oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü (OCT-4), nestin, nanog ve hepatosit nükleer faktörü-3b (HNF-3 b) dahil olmak üzere çeşitli kök hücre markerlerini eksprese eder (Toda ve ark. 2007).

## 2.4 Oftalmolojide Otolog Kan Ürünleri

Göz hastalıklarında kan ürünleri uzun sürelerdir ve daha çok oküler yüzey bozukluklarında kullanılmaktadır. Kan ürünlerinin kullanımı dokunun kendini iyileştirici özelliklerine dayanır. Oküler yüzeyin beslenmesi, devamlılığı ve antimikrobiositesi için gözyaşı önemli göreve sahiptir. Oküler yüzey bozukluklarında gözyaşı preparatları, bandaj lensler, amniyotik membran transplantasyonu gibi tedaviler kullanılır.

### 2.4.1 Otolog Serum

Serum kanın pıhtılaşp çökmesiyle üstte kalan sıvı yapıya serum denir. Pıhtılaşma gerçekleştiği için trombositlerden birçok büyüme faktörü salgılanır. Serum ve gözyaşı yapısının içeriği birbirine çok benzemektedir. Bu sebeple oküler yüzey bozukluklarında otolog serum kullanılarak lubrikasyon ve antimikrobiyal etkisinden yararlanılmak istenmiştir (Geerling ve ark. 2004). Serumun bileşimi gözyaşına benzer; serumun gözyaşından daha fazla A vitamini, lizozim, dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve fibronektin ve daha az immünoglobülin A (IgA), epitel büyüme faktörü (EGF) ve C vitamini içermesi dışında eşdeğerdir (Bradley ve ark. 2008). İlk olarak Ralph ve arkadaşları (1975) kuru göz için otolog serum göz damlası uyguladıklarını bildirmiştir. O zamandan beri, otolog serum, özellikle kuru göz hastalığı olan gözlerde ve yüzey hastalıklarında giderek daha popüler hale geldi.

### 2.4.2 Trombositten Zengin Plazma (TZP)

Plazma kanın antikoagulan içeren bir ortamda pıhtılaşması durdurulup, hücrelerin çökmesiyle üstte kalan saydam sıvı bölümüdür. Pıhtılaşma olmaz ve kandaki fibrinle birlikte diğer pıhtılaşma faktörlerinin hepsini içerir. Serumla karşılaştırılırsa fibrin ve diğer pıhtılaşma faktörler açısından serumdan daha zengin; fakat pıhtılaşma meydana gelirken trombositler tarafından salınan büyüme faktörleri açısından fakirdir (Herminghaus ve ark. 2004).

TZP pıhtılaşması engellenmiş kandan elde edilen büyüme faktörlerinden ve trombositten zengin kan ürünüdür. Normal kan içindeki trombosit konsantrasyonuna göre 3 kat daha fazla trombosit içerir. Trombositler kemik iliğinden köken alan çekirdeksiz hücrelerdir. Trombositler, pıhtılaşma durumunda tıkaç oluştururlar ayrıca yara iyileşmesinde, enflamasyonda, yumuşak doku olgunlaşmasında ve damar oluşumunda ve daha birçok fizyolojik kaskadda görev yaparlar (Anitua ve ark. 2004, Laurens ve ark. 2006). Trombositler üç farklı granül içerirler.

Alfa Granüller: En büyük ve majör granüllerdir. PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, FGF, VEGF, trombosit faktör-4, fibrinojen, trombospondin, fibronektin, von willebrand faktör (vWF), faktör V ve VII gibi pıhtılaşma proteinleri, albümin ve immünoglobulinleri içerirler (Anitua ve ark. 2004, Laurens ve ark. 2006).

Delta Granüller: Yoğun cisimcikler olarak adlandırılırlar. Kalsiyum, pirofosfat, ADP, ATP, histamin, epinefrin ve serotonin içerirler (Rendu & Brohard-Bohn 2001).

Lambda Granüller: En küçük granüllerdir. Sadece lizozom enzimlerini içerirler, bu enzimlerle bakterisid ve fibrinolitik etki yaparlar (Rendu & Brohard-Bohn 2001).

Trombositler fibrin tıkaç oluşumu, anjiogenez ve inflamasyonda rol alırlar.

TZP birinci nesil trombosit konsantresidir. Elde edilirken alınan kanın pıhtılaşmasını engellemek için EDTA ve sitrik asit kullanılır. İlk santrifüjle birlikte eritrositler çöker ve pıhtılaşma faktörlerinden zengin sarı renkli plazma üstte kalır. Üst kısımdan bir miktar alınır ve ikinci santrifüje geçilir. Bu santrifüj yapılırken ise yapay pıhtılaşma sağlamak için trombin veya  $CaCl_2$  katılır. Pıhtılaşmanın başlamasıyla trombositlerden birçok büyüme faktörü salgılanır. Bu elde edilen plazmaya da trombositlerden zengin plazma ismi verilir (Borzini ve ark. 2012).

TZP uzun süredir ortopedi, maxillofacial cerrahi, dermatoloji gibi farklı kliniklerde kullanılmaya devam edilmektedir. Trombositler yara iyileşmesinde görev alırlar. Trombositler hasarlı endotele yapışır ve birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılar. Yara iyileşmesini hızlandırır. Fibrin oluşturması ile yara iyileşmesi için oluşturduğu fibrin yapısal destek görevi görür (Alio ve ark. 2007). Oküler yüzey yaralanmalarının iyileşmesi sürecinde korkulan sonuç skar gelişimidir. TZP'nin skar formasyonunu artırabileceği konusunda in vitro yapılmış hücre kültürü çalışmasında skar oluşumunu artırmadığı gösterilmiştir (Anitua ve ark. 2011).

#### **2.4.3 Büyüme Faktöründen Zengin Plazma (PRGF)**

Büyüme faktöründen zengin plazma (PRGF), kemik ve yumuşak doku rejenerasyonuna yardımcı olabilecek proteinlerden ve dolaşımdaki büyüme faktörlerinden zenginleştirilmiş bir plazma türüdür. PRGF, yaralanma bölgesine yerleştirilebilecek jelatinli bir formda yüksek oranda konsantre olan birçok farklı hücre ve hücre tipi içerir: bu hücreler kan pıhtıları oluşturarak ve büyüme faktörlerini yaranın içine bırakarak iyileşme sürecini hızlandırır. PRGF, pıhtılaşma için sığır veya insan trombinine ihtiyaç duymaz; PRGF, plazma proteinlerini ve pıhtılaştırıcı faktörleri içerir ve daha sonra TZP ile karşılaştırıldığında daha avantajlıdır.

PRGF hazırlanırken geniş bir kanülle bazilik venden kan alınır. Alınan kan antikoagülanla (10 ml kan için 1 ml% 3,8 sodyum sitrat) birleştirilir ve 8 dakika içinde 460 G'de santrifüjlenir: santrifüjlemeden sonra, PRGF tüpün tabanından alınır. Daha sonra PRGF'ye (ml başına 0.05 ml) Kalsiyum Klorür ilave edilir: bu hareket genellikle en fazla 10 dakika içinde elde edilen pıhtılaşmayı arttırır. İşlem sonunda cerrahi bölgeye hemen yerleştirilecek bir jelatinli PRGF elde edilir. Yine içindeki sitokinlerle ve büyüme faktörleriyle yara iyileşmesini sağlarlar (Giannini ve ark. 2015).

#### **2.4.4 Trombositten Zengin Fibrin(TZF) Membran**

Trombositten zengin fibrin (TZF) membranı ilk olarak Choukroun ve ark.(2006) tarafından tarif edilmiştir. Bu membran yoğunlaştırılmış trombositlerin, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, dolaşımda gezen kök hücrelerin ve yara iyileşmesinde bir miktar kemotaktik rolü olan birkaç adet lökositin de dahil edilmesiyle 3 boyutlu (3-B) polimerize otolog fibrin matriksten oluşmuştur (Choukroun ve ark. 2006, Öncü & Alaaddinoğlu 2015). Bu zar geçici bir iskele gibi bir yapıya sahiptir ve hücrelerin kolayca içinden geçmesine imkân verir (Choukroun ve ark. 2006). TZF membranı hali hazırda ağız, ortopedik ve plastik cerrahi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Alio ve ark.(2013) ilk olarak otolog TZF membran grefti içeren korneal perforasyonların cerrahi tedavisi için yeni bir alternatif teknik tanımladılar. TZF membran fibriller ve aselüler bir yapıya sahip olup ülser tedavisi ve doku mühendisliğinde kullanılan, cerrahi yaraların kapatılmasında ve yumuşak dokuların tam epitelleşmesini destekleyen yoğun, hemostatik fibrin bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır. İçerisinde bulunan trombositler ve lökositlerden salınan sitokinler ve büyüme faktörleri yara iyileşmesinde, anjiogeneziste ve enfeksiyonun önlenmesinde rol alırlar.

TZF membran hazırlanırken hastadan venöz kan antikoagülan içermeyen kuru cam tüpe alınır ve hiç bekletilmeden santrifüj cihazına alınır 2700/rpm devirde 12 dakika boyunca santrifüj yapılır. Santrifüj sırasında antikoagülan olmadığı için tüp duvarıyla temas eden trombositler koagülasyon kaskadını başlatır. Trombin fibrinojeni fibrine çevirir ve fibrin pıhtısı alttaki kırmızı kan hücreleri ve üstteki aselüler plazma arasında tüpün ortasında birikir. Fibrin pıhtısı bir kafes oluşturur ve trombositler bu fibrin içinde tutulur. Steril ortamda çıkarılan fibrin membran metal bir kit veya steril

spanç arasında dehidrate edilerek sütürasyona hazır hale gelir. TZF membran oluşturmak gayet basit ve ekonomik bir tekniğe sahiptir.(Tablo 3) Bu tekniğin başarısı kan alma hızı ve bekletilmeden santrifüj yapılmasına bağlıdır, eğer bu işlem geciktirilirse fibrin santrifüj başlamadan polimerize olmaya başlar ve tüpün içinde dağınık bir halde yer almasına neden olur.

Tablo 3: Üç önemli kan ürününün karşılaştırılması (Giannini ve ark. 2015)

Trombositten zengin ürün	TZF	TZP	PZBF (PRGF) (plazma zengin büyüme faktörü)
Protokol	Kolay	Zor	Çok zor
Hız	Hızlı	Yavaş	Çok yavaş
Antikoagülan kullanımı	Hayır	Evet	Evet
Maliyet	Düşük	Orta	Yüksek
Fibrin miktarı	Yüksek	Düşük	Düşük
Fibrin oluşma hızı	Fizyolojik	Yüksek	Yüksek
Lökosit miktarı	65%	0-50%	0%
İmmünmodülatör özellik	Evet	Zayıf	Yok
Neoanjiogenez potansiyeli	+++	+	++
Kök hücre varlığı	Var	Var	Var

TZF membran içinde adheziv proteinler vardır, bunlar fibronektin ve vitronektin gibi proteinlerdir.

Anjiogenez, immünite ve epitelyal örtme, yara iyileşmesi ve yumşak doku olgunlaşmasının 3 anahtar olayıdır (Feng ve ark. 1999). TZF membran bu üç fenomeni birlikte destekleyebilir. Yara iyileşmesi ve hücre migrasyonunda görev alırlar.

Fibrin matriksin yara iyileşmesinde ve tümörlerde anjiogeneze sebep olduğu açıkça gösterilmiştir (Dvorak ve ark. 1987). TZF membranın anjiogenez özelliği 3 boyutlu yapısı ve bu ağa hapsolmuş trombositlerden salgılanan sitokin ve faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir. TZF membran içinde FGFb, VEGF, PDGF, IGF, TGF- $\beta$  anjiopoetin gibi faktörler bulunur ve hepsi yara iyileşmesinin aşamalarında görev yapar. Bu faktörlerin 7 gün boyunca düzenli salınım yaptığı gösterilmiştir (Wang ve ark. 2016).

PRF membran içindeki trombosit kaynaklı büyüme faktörleri dışında lökosit kaynaklı sitokinler vardır ve inflamasyonun regülasyonunda rol alırlar (Dohan ve ark. 2006). Bu sitokinler;

IL-1 $\beta$ : Makrofaj, endotel, nötrofil ve langerhans hücreleri gibi hücrelerden salgılanır ve T helper hücrelerin aktivasyonu sağlar.

TNF- $\alpha$ : Bakterilere karşı ilk sentezlenir. Nötrofil, makrofaj ve T lenfositlerden salgılanır.

IL-6: Kendi salgılanmasını artırıp azaltabilir. B lenfositlerin diferansiasyonu ve T lenfositlerin aktivasyonunu sağlar. Antikor salınımını başlatabilir.

IL-4: B lenfositlerin çoğalmasını ve diferansiasyonu sağlar. İnflamasyonu baskılayıp yara iyileşmesini destekler. Matriks metalloproteinazların uyarılmasını önler. Kollajen sentezini artırma özelliği vardır.

TZF membran içinde yer alan nadir kök hücreler vardır ve mezenkimal kökenlidir. Bu hücreler yara yerine ulaştığında farklılaşarak başka hücrelere dönüşebilir. Bazı çalışmalarda TZF membrandan kemik dokusuna benzer dokunun oluştuğu gösterilmiştir (Wang ve ark. 2016).

#### **2.4.4.1 TZF Membranın Oftalmolojide Kullanımı**

TZF membranın göz hastalıklarında kullanımı yeni yaygınlaşmaya başlarken otolog kan ürünleri uzun süredir kullanılmaktadır. Membranın gözde kullanıldığı durumlar;

- Pterijum ve konjonktivoplastide greft olarak kullanılmış olup daha az postoperatif inflamasyon ve daha kısa iyileşme süresi gösterilmiştir (Cakmak ve ark. 2017).
- Kornea erimesiyle birlikte desmatoseli olan bir hastaya acil olarak yara yerine örtülmüş olup yara iyileşmesini hızlandırmış olup perforasyonu önlemiştir (Can ve ark. 2016).
- Perfore korneal ülserlerde de kullanılmış ve faydası gösterilmiştir (Alio ve ark. 2013).

TZF membran otolog kan ürünlerinin kullanıldığı durumlarda ve birçok oküler yüzey bozukluklarında yapılan tedavilere alternatif olabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneklere alkali yanık oluşturulması, amniyon membran transplantasyonu, deneklerden kan alınması, TZF membran oluşturulması ve implantasyonu, sakrifikasyon ve alınan korneal dokuların hazırlanması işlemleri Kafkas Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (KAÜDEHUAM), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler, görüntüleme işlemleri ve immünohistokimyasal boyama işlemleri Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür. KAÜ-HADYEK 25.10.2018 karar tarihli 2018-087 sayılı etik kurul onayı ile çalışma yürütülmüştür.

#### 3.1 Denekler

Çalışmamızda toplam 24 adet, sağlıklı Avustralya-Yeni Zelanda Irkı (2000-2500 gr) albino dişi tavşan kullanılmıştır. Deneysel hayvanları, Ankara Saki Yenilli Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilerek, DEHUAM'da denekler için özel üretilmiş olan tavşan kafeslerinde, tek ya da ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, sıcaklığı ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması beyaz floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06.00-18.00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

#### 3.2 Alkali Yanık Modelinin Oluşturulması

Denekler DEHUAM'da 2 haftalık karantina sürelerini sağlıklı olarak geçirdikten sonra çalışmaya başlandı. Deneysel ilk günü kontrol grubu hariç tüm deneklerin sağ gözünde alkali yanık modeli oluşturuldu.

Denekler her grupta 6 adet denek olacak şekilde dörde ayrıldı, ilk grup kontrol grubu olarak belirlendi ve diğer üç grup alkali yanık modeline dahil edildi. Alkali yanık oluşturmak için 1N NaOH ve 8 mm çaplı daire şeklinde Whatman filtre kâğıtları kullanıldı. Çapları 8 mm olarak ayarlanmış filtre kâğıtları 1 dakika boyunca 1N NaOH içerisinde bekletildi, bu sırada Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0,5; Alcon) ile



uygulama yapılacak gözlerine topikal anestezi uygulanmış ve kapak spekulumu takılmış deneklerin sağ santral kornealarına bu filtre kâğıtları uygulandı ve 60 sn bekletildi. Daha sonra bu kâğıtlar hemen uzaklaştırıldı ve 2 dakika boyunca %0,9 Sodyum klorür (NaCl) ile deneklerin gözleri yıkandı ve nekroze olan dokular pamuklu çubuk yardımıyla uzaklaştırıldı.

### 3.3 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Alkali yanık oluşturulmasının ardından deneklerin hepsinin ön segment optik koherans tomografileri (OKT) ve ön segment kornea fotoğrafları çekildi. Ön segment fotoğraflarıyla epitel defekti miktarı belirlendi ve yanık sınıflaması yapıldı. Optik koherans tomografileri ile de kornea kalınlığı mikrometre cinsinden ölçüldü. Yanık yapılan tüm deneklerin 4. Derece (Roper Hall sınıflaması) korneal yanığa sahip olduğu gösterildi.

Denekler her grupta 6 denek olacak şekilde dört eşit gruba ayrıldı ve aşağıdaki gibi sınıflandı:

1. Grup: Sağlam grup (Hiçbir müdahalede bulunulmayan sağlam kornealar bulunmaktadır.)
2. Grup: İlaç grubu (Alkali yanık oluşturulan ve 21 gün boyu medikal tedavi alan gruptur.)
3. Grup: AMT grubu ( Alkali yanık oluşturulan ve 1. Gün AMT uygulanıp 21 gün medikal tedavi alan gruptur.)
4. Grup: TZF membran grubu (Alkali yanık oluşturulan ve 1. Gün TZF membran implantasyonu yapıp 21 gün medikal tedavi alan gruptur.)

Medikal tedavi olarak ilk 7 gün moksifloksasin ve deksametazon fosfat 5mg/1mg içeren (Moxidexa®,Abdi İbrahim) tedavi günde üç kere, takip eden günlerde ise sadece moksifloksasin (Moxai®,Abdi İbrahim) günde üç kere verildi. Bu medikal tedavi sağlam grup hariç tüm gruplara 21 gün boyunca uygulandı.

### 3.4 Muayenelerin Yapılması

Muayeneler alkali yanık modelinin oluşturulduktan sonra 1.gün, 7. gün, 14. Gün ve 21. günlerde toplam 4 ziyaret şeklinde yapıldı. Deneklerin gözüne Proparacain

Hydrochloride (Alcaine % 0,5; Alcon) damlatılarak topikal anestezi altında denekler tespit edilip kapak spekulumu takılarak muayeneleri yapıldı. Amniyon grubundan bir denek 2. Vizit sonrası kafesinde ölü bulunup çalışmadan çıkarıldı.

Muayenelerde öncelikle ön segment OKT, sonrasında ön segment fotoğrafı çekildi. Daha sonra kornealar floresein ile boyanarak kobalt mavisi altında ön segment fotoğrafları çekildi. Muayene sonrası deneklerin korneaları %0,9 NaCl ile yıkanarak floresein boya korneadan uzaklaştırıldı. Bu işlemler her vizitte tekrarlandı.

Her vizitte ön segment OKT'leri ile santral kornea kalınlıkları ölçüldü. Korneal opasitenin ve neovaskülarizasyonun takibi ve ölçülmesinde ön segment fotoğrafları kullanıldı. Floresein boyalı mavi ışık altındaki ön segment fotoğrafları ile de epitel defektinin miktarı ölçüldü ve iyileşmesi takip edildi.

Değerlendirilen tüm parametreler alınmış fotoğraflar üzerinde Adobe Photoshop CC programı ile piksel olarak hesaplanıp tüm kornea alanına göre oranlandı ve buna göre sonuç alındı.

Apoptotik yolların en aktif olduğu, geç onarım fazının ve korneal erimenin başladığı 21. gün deneyin sonlandırılıp deneklerin sakrifiye edilme günü olarak seçildi. Denekler 0,4ml Ksilazin Hidroklorür (Rompun % 2, 5 mg/kg) + 3,0ml Ketamine Hidroklorür (Ketasol %10, 25 mg/kg) ardından eter kullanılarak sakrifiye edildi. Deneklerin korneaları limbus hizasından makas ile cerrahi olarak eksize edildi. Doku örnekleri tamponlanmış formalin ile fikse edilip histoloji laboratuvarına gönderildi.

### **3.5 AM Elde Edilmesi ve Transplantasyonu**

Üçüncü gruba alkali yanık yapıldıktan 24 saat sonra AMT uygulaması planlandı. İşlemden yaklaşık 3 saat önce serolojik olarak negatif olan elektif sezeryan yapılan ve gerekli onamları alınan hastanın plasentası alındı. Alınan plasentadan künt diseksiyon ile amniyon zarı eksize edildi ve 50 µg/mL gentamisin içeren steril serum fizyolojik solüsyon ile yıkanıp aynı antibiyotikli solüsyonda cerrahi işleme kadar bekletildi.

Üçüncü grup yani AMT grup deneklerinde, alkali yanık yapıldıktan 24 saat sonra 0,2 mL Ksilazin Hidroklorür (Rompun %2, 5 mg/kg) ve 1 mL Ketamin

Hidroklorür (Ketasol %10, 25 mg/kg) intramusküler olarak yapılarak genel anestezi sağlandı. Aynı zamanda Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0,5; Alcon) damlatılarak topikal anestezi sağlandı. Steril şartlar sağlandıktan sonra kapak spekulumu takıldı. Hazırlanmış olan amniyon membran deneğin gözünün boyutuna göre kesildi ve 10/0 nylon ile korneoskleral alana kontinü olarak sütüre edildi.

Sütüre edilen amniyonlar 7 gün göz üzerinde kaldı ve bu süre zarfında topikal medikal tedavileri devam etti. Amniyon membran 7. Gün vizitinden önce sütürlerle birlikte eksplante edildi.

### 3.6 TZF Membran Oluşturulması ve İmplantasyonu

TZF membran grubuna alkali yanık yapıldıktan 24 saat sonra TZF membran oluşturulması ve implantasyonu yapılması planlandı.

Deneklere 0,2 mL Ksilazin Hidroklorür (Rompun %2, 5 mg/kg) ve 1 mL Ketamin Hidroklorür (Ketasol %10, 25 mg/kg) intramusküler olarak yapılarak genel anestezi sağlandıktan sonra kulak venlerinden yaklaşık olarak 4 cc venöz kan antikoagülan içermeyen kuru cam tüpe alındı. Zaman kaybedilmeden tüp santrifüj cihazına koyuldu ve 2.700 rpm devirde 12 dk boyunca santrifüj edildi.

Denekler devam eden genel anestezi altında steril şartlarda hazırlanarak kapak spekulumu takıldı. Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0,5, Alcon) damlatılarak topikal anestezi de sağlandı. Santrifüj sonrası oluşan TZF membran tüpün içinden steril spanç içine alındı. Kan artıklarından temizlenip spanç içinde sıkıştırılarak dehidrate edildi. İçine bulunan sıvı serumdan arındırılan TZF membrana son hali verildi. TZF membran deneklerin gözüne korneoskleral alana 10/0 nylon sütür ile separe sütüre edildi.(Resim 2)



Resim 2: Deneklerden kan alınması, TZF membran oluşturulması ve sütürasyonu

TZF membran deneklerin gözünde 7 gün kaldı ve bu süre zarfında topikal medikal tedavileri devam etti. 7. gün vizitinden önce korneal sütürlerle birlikte TZF membran da eksplante edildi.

### 3.7 Histoloji ve İmmunohistokimya

Histolojik inceleme için alınan kornealar %10'luk formaldehitte tespit edildi. Tespit işleminden sonra bir gece akarsuda yıkanan dokular rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi. Rutin histolojik takip işlemlerinden sonra dokular parafinde bloklandı. Daha sonra hem histolojik hem de immunohistokimyasal incelemeler için parafinde bloklanan dokulardan mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histolojik incelemeler için kesitlere Hemotoksilen-Eosin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) teknikleri uygulandı. Boyama işlemlerinin sonunda lam üzerindeki dokular Entellan ve lamel ile kapatıldı, ışık mikroskobunda (Olympus Bx51, Japan) incelenerek fotoğraflandı.

İmmunohistokimyasal inceleme için kesitler etüvde bir gece bekletildikten sonra 3 ksilol serisinde 5'er dk tutuldu. Parafinden arındırılan doku kesitleri azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra 5 dk distile suda yıkandı. Daha sonra fosfat buffer salin (PBS: 0,1 M, 7,2 pH) ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 10 dakika tutuldu. Kesitler, tekrar PBS ile yıkandıktan sonra proteinlerin antijen yüzeylerini açığa çıkarma işlemi için sitrat buffer solüsyonu içinde 10 dk mikrodalga fırında 600 watt ısıya maruz bırakıldı. PBS ile yıkama işleminden sonra spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için sekonder antikora uygun UV serumda 10 dk inkübe edilen kesitler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra primer antikor (anti-MMP-9 (abcam: ab58803), anti-VEGF-A (abcam: [VG-1] ab1316) (1: 500 dilüsyon oranında)) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan dokulara Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği uygulandı. Bu amaçla kesitler sekonder antikor ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar PBS ile yıkandı ve daha sonra streptavidin peroksidaz ile oda sıcaklığında 30 dk daha inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitlere kromojen uygulaması için Diaminobenzidin (DAB) tekniği uygulandı. Hazırlanan dokulara zemin boya olarak hemotoksilen uygulandı. Entallen damlatılarak lamelle kapatılarak hazırlanmış olan preparatlar ışık mikroskopta incelenerek

fotoğraflandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonlar 0 (reaksiyon yok), +1 (az yoğun), +2 (orta derecede yoğun), +3 (çok yoğun) olarak derecelendirildi.

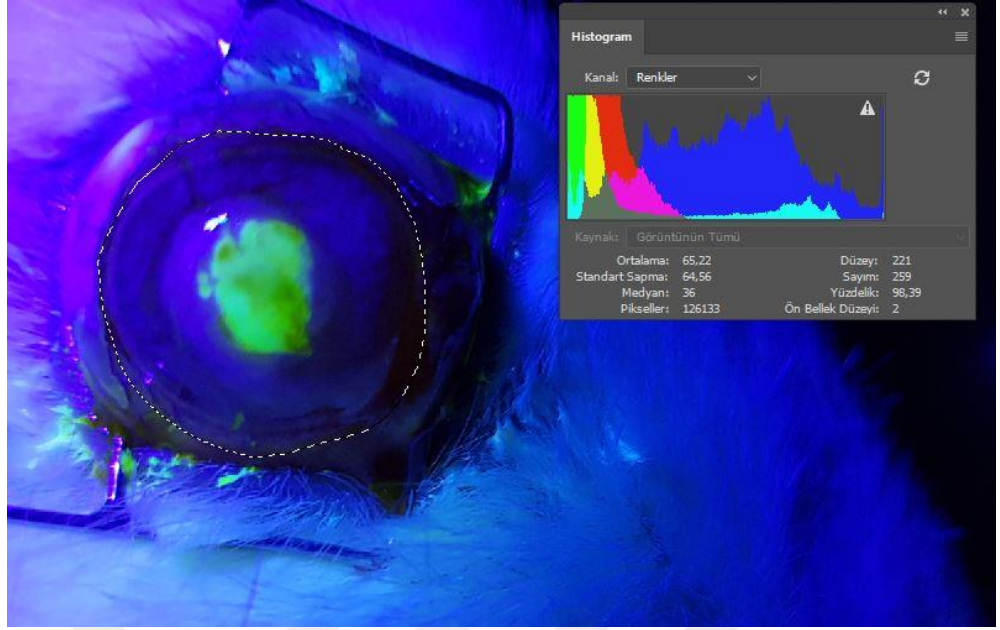
Dokulardaki immunoreaktivitenin spesifik olup olmadığını test etmek için negatif kontrol kesitlerine primer antikor aşaması atlatılarak diğer işlemler aynen uygulandı.

### **3.8 İstatistiksel Analizler**

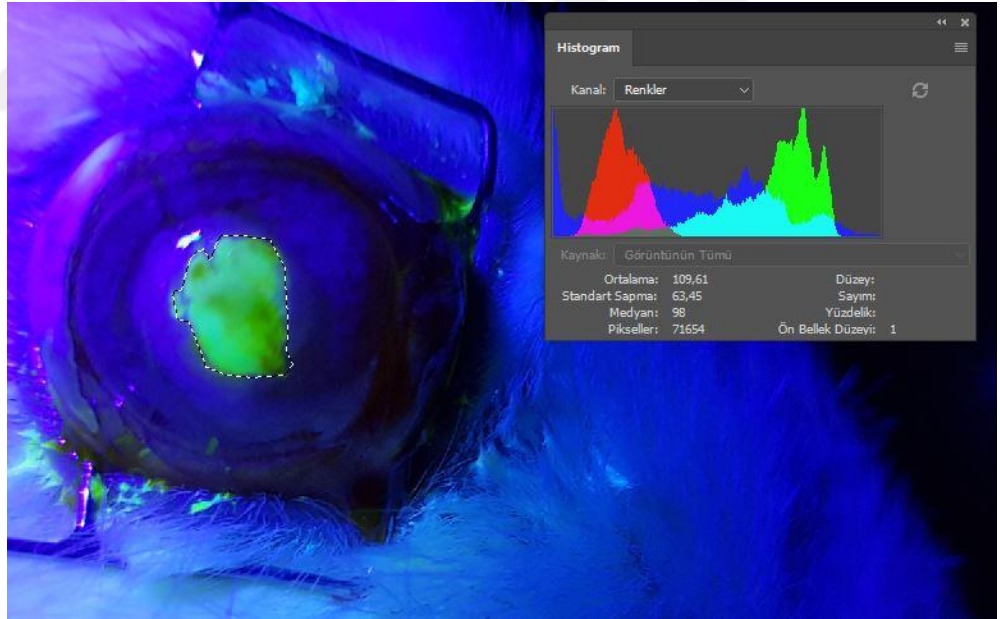
İstatistiksel analizlerde SPSS 16.0 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için One-Way ANOVA kullanıldı. Varyanslar eşit olduğunda Post-Hoc testlerinden Bonferroni, varyanslar eşit olmadığına Post-Hoc testlerinden Tamhane seçildi. İstatistiksel farklılık için  $p < 0.05$  veya  $p = 0.05$  değerleri baz alındı.

## **4. KORNEAL BULGULAR**

Deneklere alkali yanık yapıldıktan sonra ilki aynı gün yani tedaviden önce olmak üzere 7, 14 ve 21. günlerde toplam 4 kere klinik muayene yapıldı. Her muayenede ön segment OKT leri çekildi. Ön segment fotoğrafları, epitel defektini göstermek amacı ile önce kornea boyanmadan, sonra fluoresein boya ile boyanarak ve kobalt mavisi ışığı kullanılarak çekildi. Bu çekilen fotoğraflarda korneada oluşan opasiteler, yeni damar oluşumları ve epitel defektlerinin değerlendirilmesi yapıldı. Elde edilen bu fotoğraflar üstünde Adobe Photoshop CC programı ile bulgular piksel cinsinde tüm korneaya oranı şeklinde değerlendirildi ve veriler elde edildi.



Resim 3: Tm korneanın piksel cinsinden ölçümü



Resim 4: Epitel defektinin piksel cinsinden ölçümü

Alkali yanık sonrası ilk muayenede tüm deneklerin Roper-Hall sınıflamasına göre Grade 4 alkali yanığa sahip olduğu görülmüştür. Yanık çapları ve kornea kalınlıkları arasında da fark olmadığı görüldü ve istatistiksel olarak gösterildi.( $p>0,05$ )

Kontrol grubunda da ölçülen normal tavşan kornealarının santral kalınlıklarının ortalaması 344,6  $\mu$  olarak bulundu.

Alkali yanık sonrası yapılan ilk vizitte santral kornea kalınlıkları (SKK) ortalaması 646,70  $\mu$ m olarak bulundu. Yanık sonrası her grubun vizitlerde ölçülen SKK değerlerinin ortalamaları aşağıdaki Tablo 4 ve 5' te gösterilmiştir.

Tablo 4: Vizitler arasında santral kornea kalınlıklarının gruplara göre karşılaştırılması.

Gruplar	Vizitler	N	Santral Kornea Kalınlığı ( $\mu$ m) $\pm$ SD	F
Amniyon	V1	5	647,00 $\pm$ 53,82	1,097
	V2	5	735,80 $\pm$ 78,44	
	V3	5	737,80 $\pm$ 135,70	
	V4	5	742,80 $\pm$ 105,36	
Fibrin	V1	6	643,83 $\pm$ 63,17	0,421
	V2	6	658,16 $\pm$ 139,42	
	V3	6	673,00 $\pm$ 138,40	
	V4	6	735,33 $\pm$ 223,51	
İlaç	V1	6	649,33 $\pm$ 46,45	0,521
	V2	6	695,67 $\pm$ 60,60	
	V3	6	720,00 $\pm$ 109,33	
	V4	6	736,17 $\pm$ 219,50	

p<0,05

Tüm ölçümler karşılaştırıldığında grupların vizitler arasındaki ve vizitlerde gruplar arasındaki SKK ölçümleri arasında anlamlı fark görülmemiştir. Son vizitteki ölçümlere göre sonuç SKK ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grupların her hafta yapılan vizitlerdeki SKK ortalamalarını gösteren değerler Tablo 4' te gösterilmiştir.

Tablo 5: Gruplar arasında santral kornea kalınlıklarının vizitlere göre karşılaştırılması

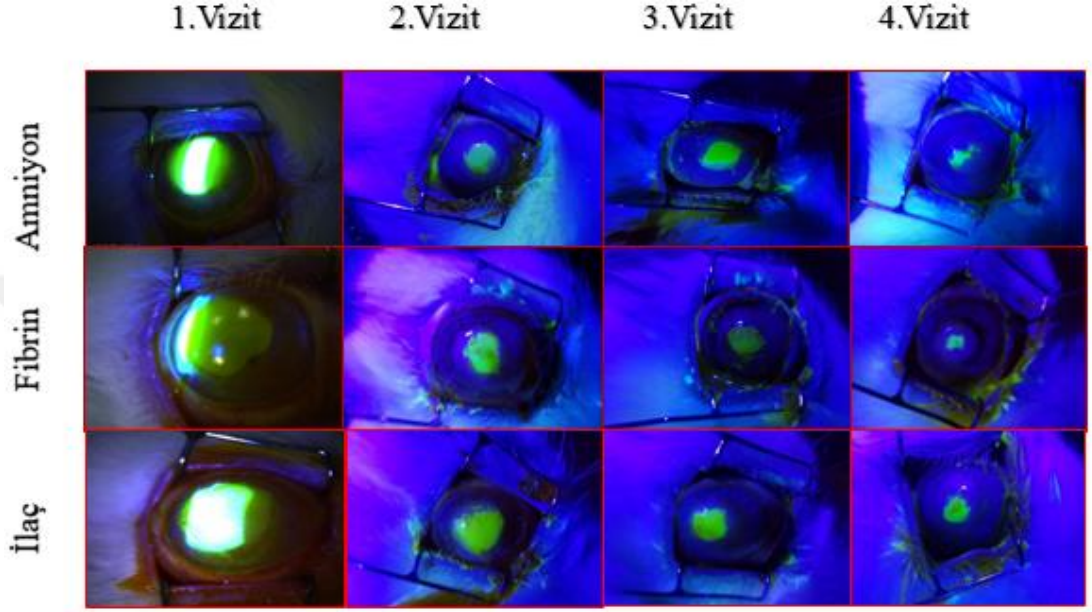
Vizitler	Gruplar	N	Santral Kornea Kalınlığı ( $\mu\text{m}$ ) $\pm\text{SD}$	F
Birinci Vizit	Amniyon	5	647,00 $\pm$ 53,82	0,015
	Fibrin	6	643,83 $\pm$ 63,17	
	İlaç	6	649,33 $\pm$ 46,45	
İkinci Vizit	Amniyon	5	735,80 $\pm$ 78,44	0,822
	Fibrin	6	658,16 $\pm$ 139,42	
	İlaç	6	695,67 $\pm$ 60,60	
Üçüncü Vizit	Amniyon	5	737,80 $\pm$ 135,70	0,386
	Fibrin	6	673,00 $\pm$ 138,40	
	İlaç	6	720,00 $\pm$ 109,33	
Dördüncü Vizit	Amniyon	5	742,80 $\pm$ 105,36	0,002
	Fibrin	6	735,33 $\pm$ 223,51	
	İlaç	6	736,17 $\pm$ 219,50	

\*p&lt;0,05

Deneklerin oluşan epitel defektlerinin izlenmesi Resim 5’de gösterildiği gibi fluoresein boyama ve ardından kobalt mavisi ışığı altında yapılan ön segment fotoğraflama sayesinde yapılmıştır. Her vizitte tekrarlanan bu test sayesinde epitel defektinin tüm korneaya oranı şeklinde değerlendirmeler yapılmıştır. Ön segment fotoğrafları ve epitel defektinin görüntülenmesi Resim 5’te gösterilmiştir. Resim 3 ve 4’te gösterildiği gibi Adobe Photoshop CC programında epitel defekti ölçümleri piksel cinsinden yapılmıştır. Tüm korneanın epitel defektine oranına göre değerler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 6 ve 7’de yüzdeler (%) değerler şeklinde gösterilmiştir. İlk vizitte elde edilen verilere göre oluşan epitel defekti tüm gruplarda birbirine çok yakın olup farklı olmadığı istatistiksel olarak gösterilmiştir. Birinci vizitteki yapılan ölçümlerde epitel defekti ortalama %35,66 (min. 35,87 $\pm$ 5,67, max. 35,46 $\pm$ 8,57) oranında bulunmuştur ve gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Tablo 7). Takip eden vizitlerde yapılan ölçümlerde amniyon ve fibrin grubunda istatistiksel olarak anlamlı iyileşme gösterilmiştir. Dördüncü vizitteki ortalama epitel defekti oranları amniyon ve fibrin gruplarında sırasıyla %15,98 $\pm$ 6,67 ve %7,08 $\pm$ 3,64



olarak bulunmuştur. Sonuç epitel defekti fibrin grubunda daha düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İlaç grubunda ise epitel defektinde anlamlı iyileşme izlenmemiştir. Grupların tüm vizitlerdeki epitel defekti ölçümlerinin ortalamaları Tablo 6’da gösterilmiştir.



Resim 5: Vizitlerdeki epitel defekti takibi ve görüntülenmesi

Tablo 6: Vizitler arasında epitel defekti oranlarının gruplara göre karşılaştırılması

Gruplar	Vizitler	N	Epitel Defekti Oranı(%) $\pm$ SD	F
Amniyon	V1	6	35,64 $\pm$ 8,99 <sup>a</sup>	6,238*
	V2	6	17,07 $\pm$ 11,45 <sup>b</sup>	
	V3	5	18,64 $\pm$ 7,12 <sup>b</sup>	
	V4	5	15,98 $\pm$ 6,67 <sup>b</sup>	
Fibrin	V1	6	35,87 $\pm$ 5,67 <sup>a</sup>	40,695**
	V2	6	12,59 $\pm$ 5,40 <sup>b</sup>	
	V3	6	11,69 $\pm$ 4,89 <sup>b</sup>	
	V4	6	7,08 $\pm$ 3,64 <sup>b</sup>	
İlaç	V1	6	35,46 $\pm$ 8,57 <sup>a</sup>	4,723*
	V2	6	21,09 $\pm$ 8,27 <sup>b</sup>	
	V3	6	25,60 $\pm$ 3,99 <sup>ab</sup>	
	V4	6	23,94 $\pm$ 6,34 <sup>ab</sup>	

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Farklı üst karakterler vizitler içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu ifade ediyor.

Tablo 7: Gruplar arasında epitel defekti oranlarının vizitlere göre karşılaştırılması

Vizitler	Gruplar	N	Epitel Defekti Oranı (%) $\pm$ SD	F
Birinci Vizit	Amniyon	6	35,64 $\pm$ 8,99	0,004
	Fibrin	6	35,87 $\pm$ 5,67	
	İlaç	6	35,46 $\pm$ 8,57	
İkinci Vizit	Amniyon	6	17,07 $\pm$ 11,45	1,417
	Fibrin	6	12,59 $\pm$ 5,40	
	İlaç	6	21,09 $\pm$ 8,27	
Üçüncü Vizit	Amniyon	5	18,64 $\pm$ 7,12 <sup>ab</sup>	10,084*
	Fibrin	6	11,69 $\pm$ 4,89 <sup>a</sup>	
	İlaç	6	25,60 $\pm$ 3,99 <sup>b</sup>	
Dördüncü Vizit	Amniyon	5	15,98 $\pm$ 6,67 <sup>ab</sup>	13,402**
	Fibrin	6	7,08 $\pm$ 3,64 <sup>a</sup>	
	İlaç	6	23,94 $\pm$ 6,34 <sup>b</sup>	

\*p<0,05, \*\*p<0,01, Farklı üst karakterler vizitler içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu ifade ediyor.

Vizitlerde çekilen ön segment fotoğraflarında değerlendirilen diğer bir parametre de kornea opasitesiydi. Kornea opasitesi diğer veriler gibi opasite alanının tüm korneaya oranlanarak değerlendirilmesiyle elde edilmiştir. Grupların her vizitteki opasite oranları Tablo 9’ da gösterilmiştir. Opasite oranında fibrin grubunda takip eden vizitlerde istatistiksel olarak anlamlı azalma izlenirken diğer gruplarda anlamlı azalma izlenmemiştir (Tablo 9). Birinci vizitte tüm grupların opasite oranı ortalama %34,03 $\pm$ 2,63 olup gruplar arasında istatistiksel olarak fark gösterilmemiştir. Sonuç yani dördüncü vizitteki opasite oranı ise amniyon, fibrin ve ilaç gruplarında sırasıyla %29,80 $\pm$ 3,05, %24,88 $\pm$ 3,97, %31,87 $\pm$ 2,66 bulunmuştur. Yanık sonrası oluşan opasitenin fibrin ve amniyon grubunda azaldığı görülmüştür fakat sadece fibrin grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir. Grupların vizitlerdeki ortalama opasite oranları Tablo 8 ve 9’ da gösterilmiştir.

Tablo 8: Gruplar arasında opasite oranlarının vizitlere göre karşılaştırılması

Vizitler	Gruplar	N	Opasite Oranları (%) $\pm$ SD	F
Birinci Vizit	Amniyon	6	33,65 $\pm$ 3,10	0,099
	Fibrin	6	34,36 $\pm$ 3,19	
	İlaç	6	34,07 $\pm$ 1,87	
İkinci Vizit	Amniyon	6	33,71 $\pm$ 2,82	2,87
	Fibrin	6	29,45 $\pm$ 3,74	
	İlaç	6	33,35 $\pm$ 3,60	
Üçüncü Vizit	Amniyon	5	30,75 $\pm$ 3,33	2,335
	Fibrin	6	27,86 $\pm$ 4,23	
	İlaç	6	32,59 $\pm$ 3,71	
Dördüncü Vizit	Amniyon	5	29,80 $\pm$ 3,05 <sup>ab</sup>	7,097*
	Fibrin	6	24,88 $\pm$ 3,97 <sup>a</sup>	
	İlaç	6	31,87 $\pm$ 2,66 <sup>b</sup>	

\*p<0,05, Farklı üst karakterler vizitler içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu ifade ediyor.

Tablo 9: Vizitler arasında opasite oranlarının gruplara göre karşılaştırılması

Gruplar	Vizitler	N	Opasite Oranları (%) $\pm$ SD	F
Amniyon	V1	6	33,65 $\pm$ 3,10	2,315
	V2	6	33,71 $\pm$ 2,82	
	V3	5	30,75 $\pm$ 3,33	
	V4	5	29,80 $\pm$ 3,05	
Fibrin	V1	6	34,36 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup>	6,50**
	V2	6	29,45 $\pm$ 3,74 <sup>ab</sup>	
	V3	6	27,86 $\pm$ 4,23 <sup>b</sup>	
	V4	6	24,88 $\pm$ 3,97 <sup>b</sup>	
İlaç	V1	6	34,07 $\pm$ 1,87	0,576
	V2	6	33,35 $\pm$ 3,60	
	V3	6	32,59 $\pm$ 3,71	
	V4	6	31,87 $\pm$ 2,66	

\*\*p<0,01, Farklı üst karakterler vizitler içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu ifade ediyor.

Alkali yanık modeli oluşturulduktan sonra yapılan tedaviye rağmen tüm grup kornealarında neovaskülarizasyon oluşumu beklenmiştir. Neovaskülarizasyon oluşumu yine diğer bulgularda olduğu gibi tüm vizitlerde tekrarlanan ön segment

fotoğraflarıyla izlenmiştir. Ölçülen neovaskülarizasyon alanı tüm kornea alanına oranlanarak veriler elde edilmiştir. Tüm grupların vizitlerdeki ortalama neovaskülarizasyon oranları Tablo 10 ve 11’de gösterilmiştir. İlk vizitte grupların hiç birinde neovaskülarizasyon izlenmemiştir. Sonuç yani dördüncü vizit KNV oranları amniyon, fibrin ve ilaç gruplarında sırasıyla %8,04±1,67, %9,73±2,54, %17,65±1,54 olarak bulunmuştur. İlaç grubunda KNV oranı diğer gruplara göre çok daha fazla ölçülmüştür ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Amniyon ve fibrin gruplarında da KNV meydana gelmiştir. İki grup arasından amniyon grubunda daha az KNV oluştuğu gösterilse de iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. Amniyon grubunda ikinci ve dördüncü vizitler arasında KNV oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Fibrin grubunda ise ikinci ve dördüncü vizitler arasında istatistiksel olarak fark izlenmemiştir.

Tablo 10: Gruplar arasında korneal neovaskülarizasyon(KNV) oranlarının vizitlere göre karşılaştırılması

Vizitler	Gruplar	N	KNV Oranı (%) ±SD	F
İkinci Vizit	Amniyon	6	3,86±0,65 <sup>a</sup>	7,848**
	Fibrin	6	6,16±2,74 <sup>ab</sup>	
	İlaç	6	8,50±1,62 <sup>b</sup>	
Üçüncü Vizit	Amniyon	5	5,90±0,84 <sup>a</sup>	15,807**
	Fibrin	6	8,60±2,45 <sup>ab</sup>	
	İlaç	6	11,43±0,91 <sup>b</sup>	
Dördüncü Vizit	Amniyon	5	8,04±1,67 <sup>a</sup>	38,098**
	Fibrin	6	9,73±2,54 <sup>a</sup>	
	İlaç	6	17,65±1,54 <sup>b</sup>	

\*\*p<0,01, Farklı üst karakterler vizitler içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu ifade ediyor.

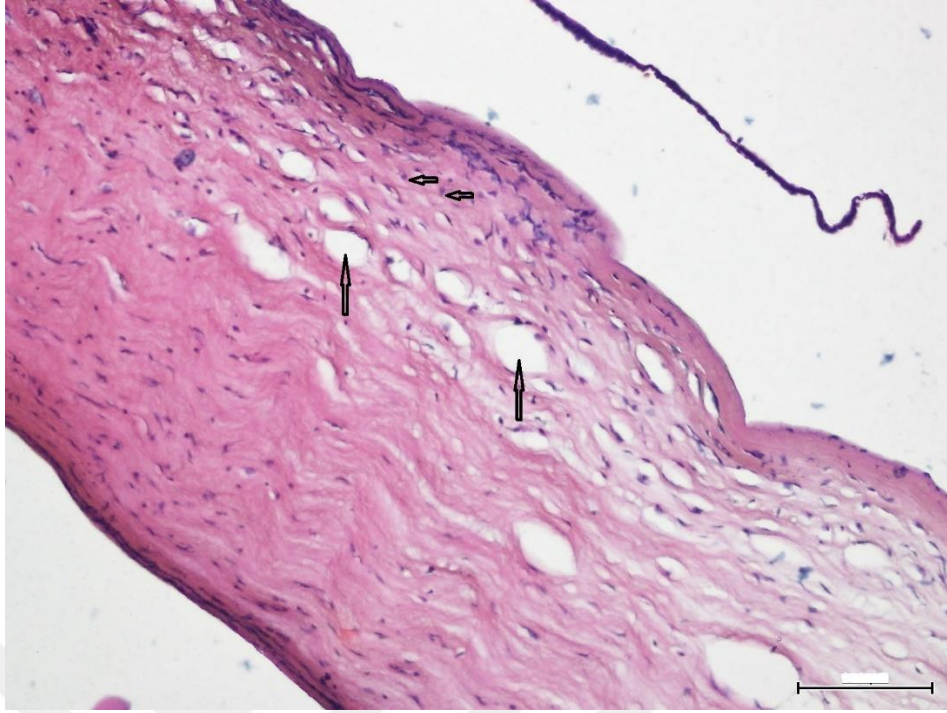
Tablo 11: Vizitler arasında korneal neovaskülarizasyon(KNV) oranlarının gruplara göre karşılaştırılması

Gruplar	Vizitler	N	KNV Oranı(%) $\pm$ SD	F
Amniyon	V2	6	3,86 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	16,714**
	V3	5	5,90 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	
	V4	5	8,04 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>	
Fibrin	V2	6	6,16 $\pm$ 2,74	2,988
	V3	6	8,60 $\pm$ 2,45	
	V4	6	9,73 $\pm$ 2,53	
İlaç	V2	6	8,50 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	67,170**
	V3	6	11,43 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>	
	V4	6	17,65 $\pm$ 1,54 <sup>c</sup>	

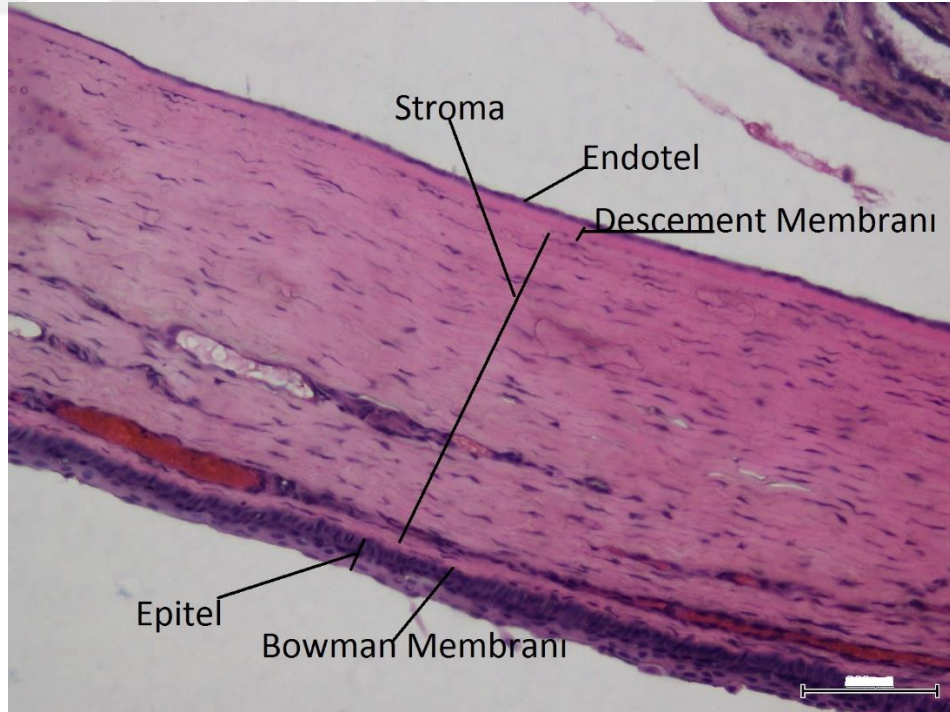
\*\*p<0,01, Farklı üst karakterler vizitler içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu ifade ediyor.

## 5. HİSTOLOJİK BULGULAR

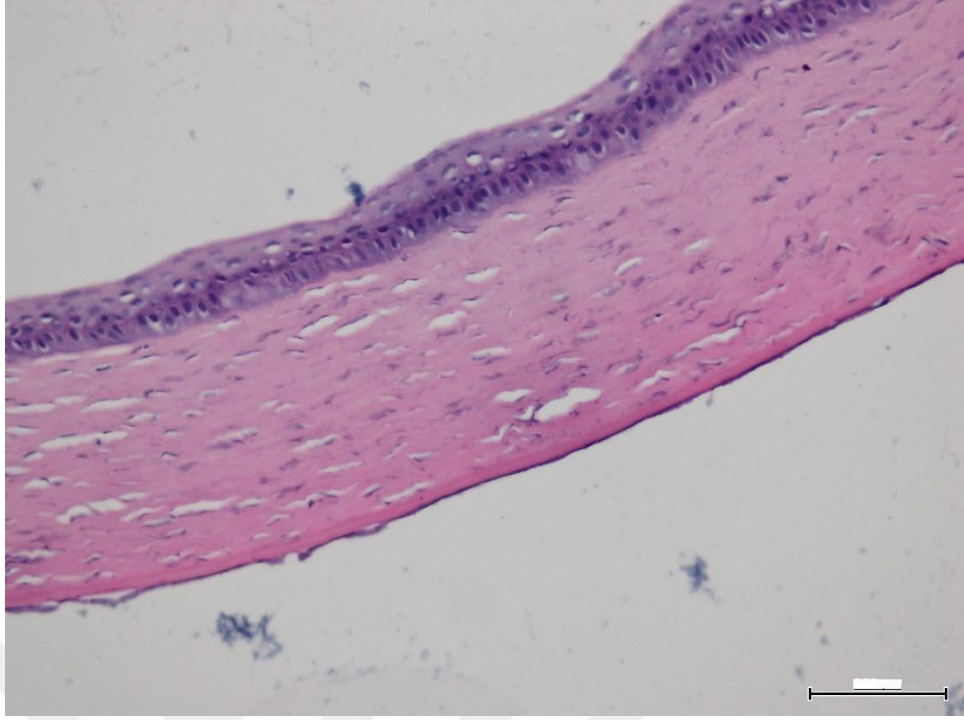
Histolojik açıdan incelenen tüm gruplara ait kornealarda; epitel, Bowman membranı, korneal stroma, descemet membranı ve edotel katmanları görüldü. Gruplar histolojik görünüm bakımından karşılaştırıldığında ilaçlı gruba ait bazı korneaların stromasında diğer gruplara göre bağ dokuyu oluşturan lameller arasında daha fazla açılmalar ve daha fazla yangısal hücrelerin olduğu görüldü (Şekil 1,2,3).



Şekil 1. İlaçlı grup korneası stromasında lameller arasında açıklıklar (uzun oklar) ve yangısal hücrelerin (kısa oklar) varlığı. HE, 10X.



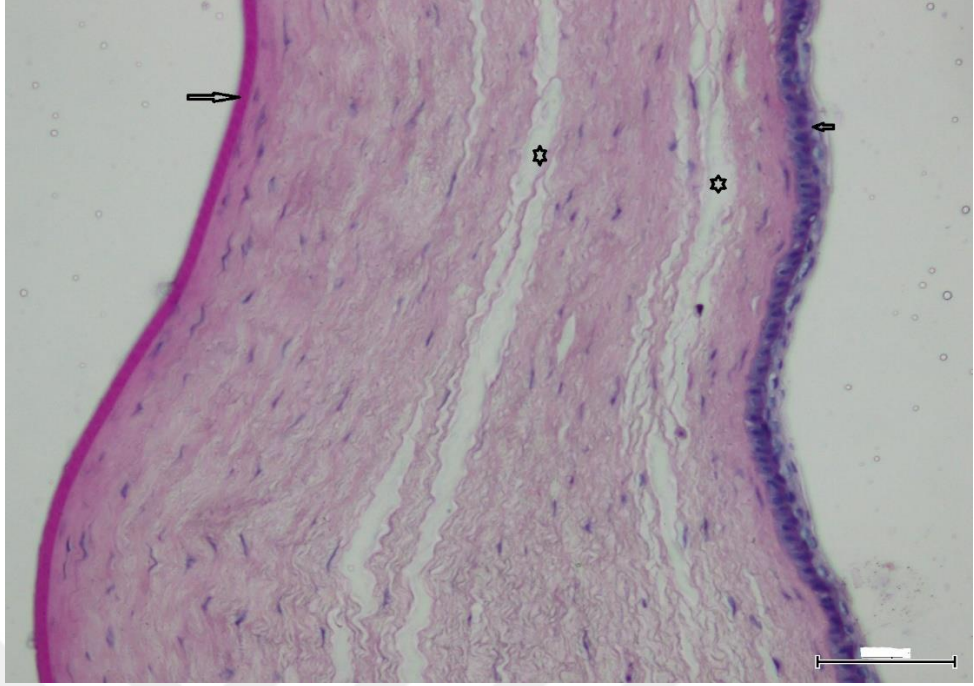
Şekil 2. Amniyon grubu korneasının histolojik olarak tüm katmanlarının görünümü. HE, 20X.



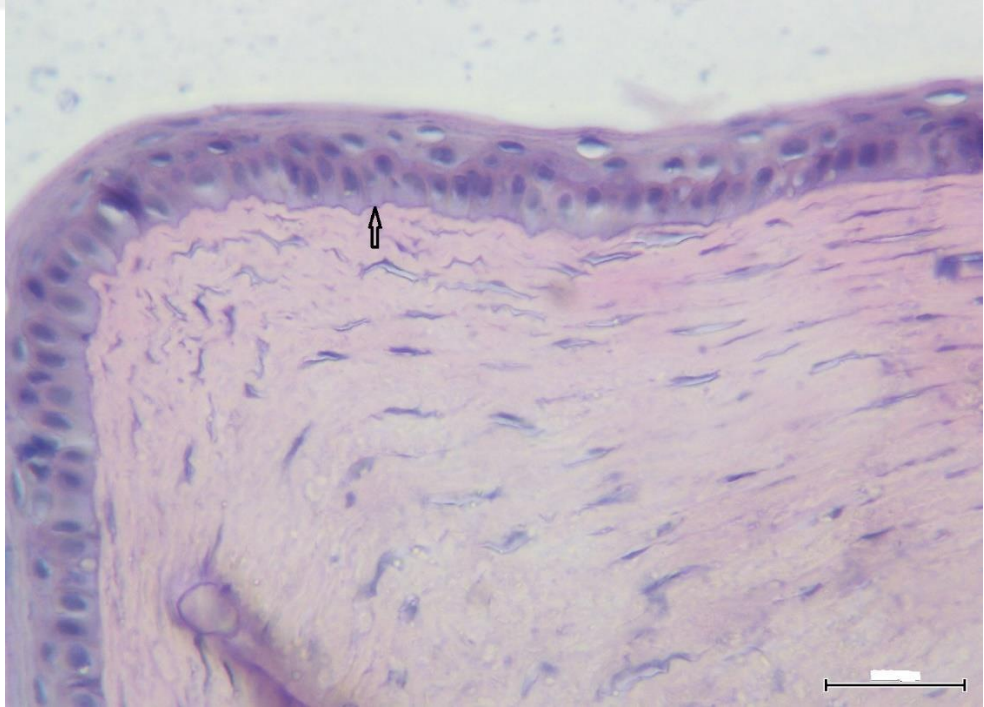
Şekil 3. Fibrin grubu korneasının histolojik görünümü. HE, 20X.

Yapılan PAS boyamasında tüm grupların korneasında Descement membranı oldukça belirginken epitel altında yer alan Bowman membranı ince bir çizgi şeklinde gözlendi (Şekil 4,5).





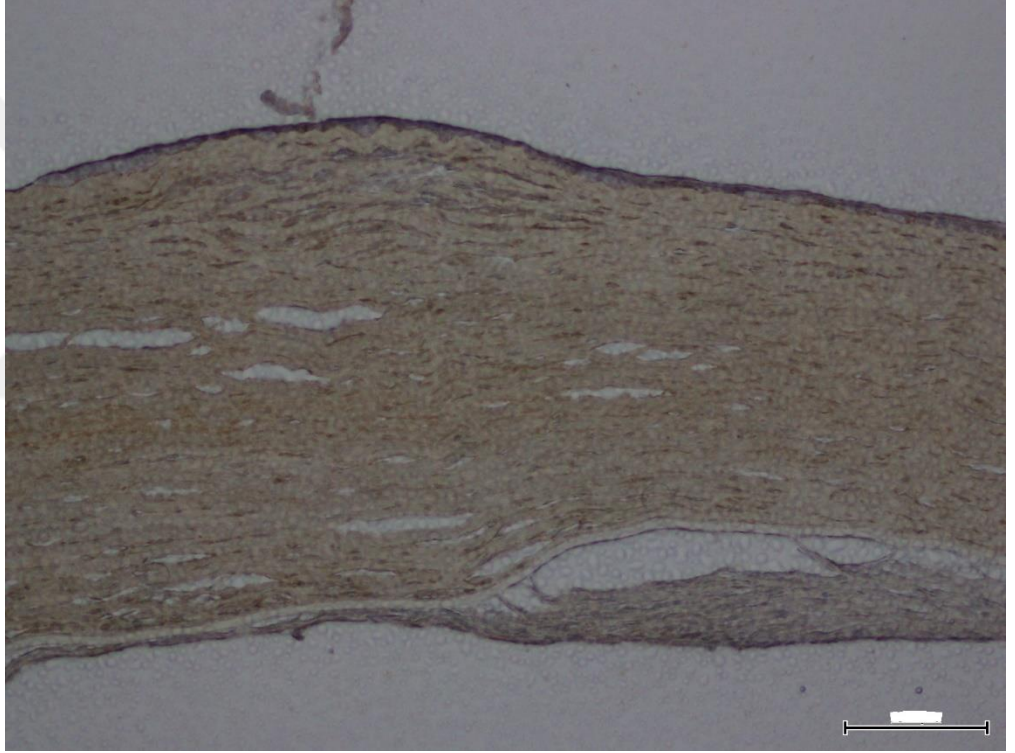
Şekil 4. İlaçlı grup korneasında Descemet membranının (uzun ok) belirgin görünümü, epitel (kısa ok), epitel altında yer alan Bowman membranı ve korneal stroma gevşek bağ doku lamelleri arasında açılmalar (yıldızlar). PAS, 20X.



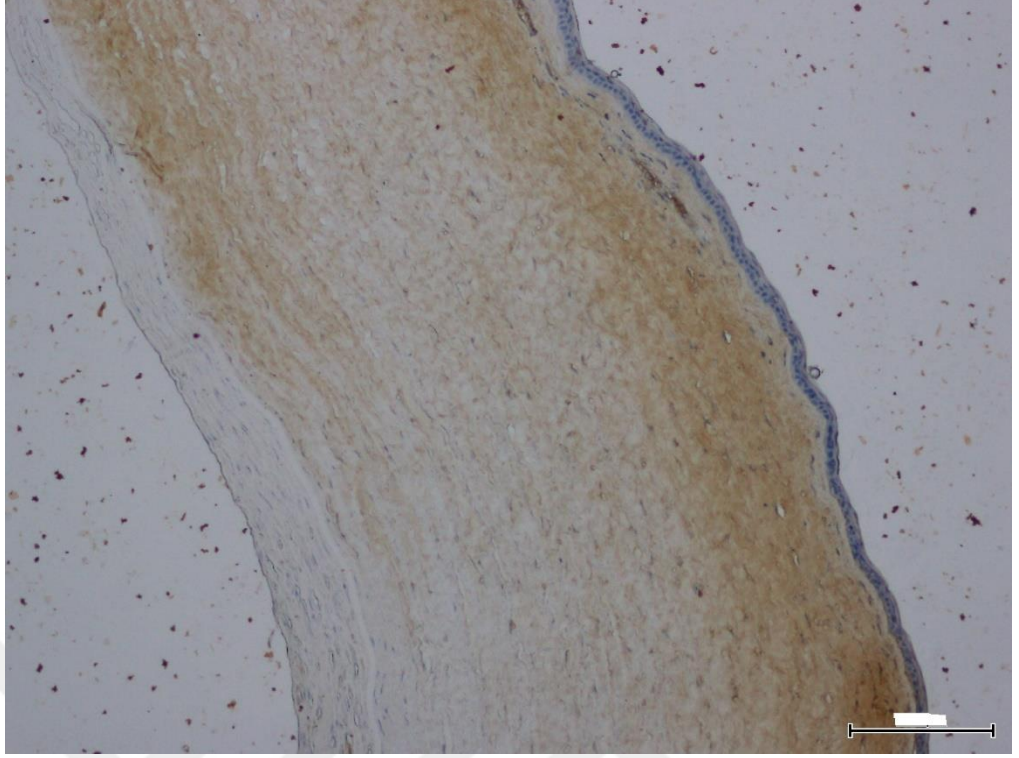
Şekil 5. Fibrin grubunda epitel altında uzanan ince Bowman membranının (ok) görünümü. PAS, 40X.



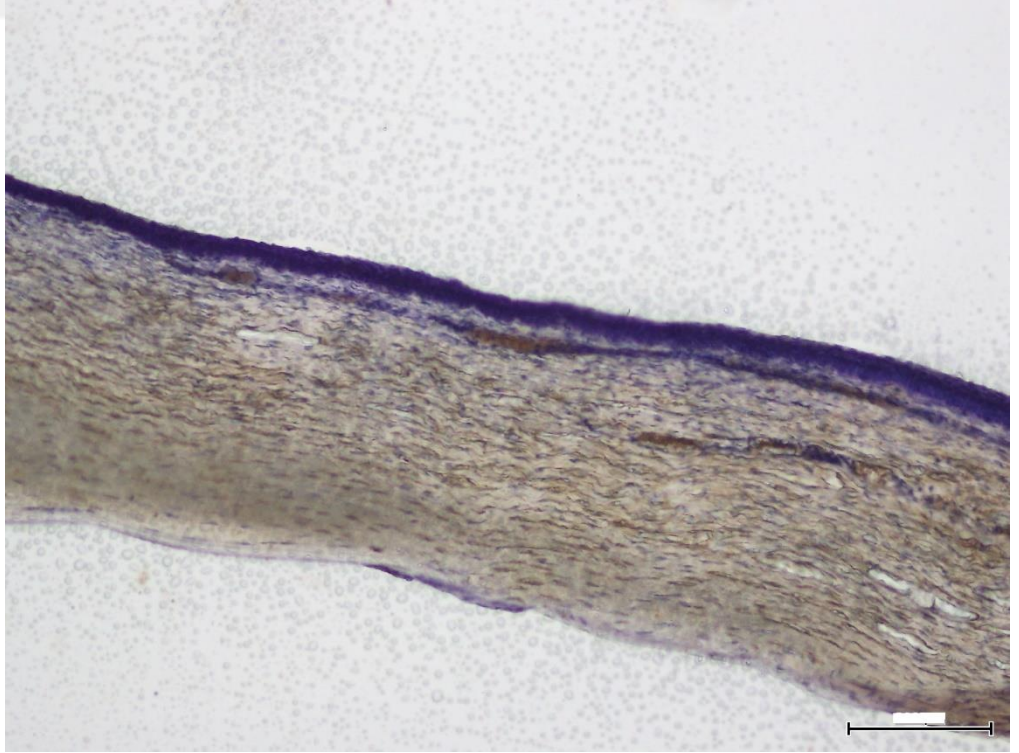
İmmunohistokimyasal incelemede korneada özellikle stromada belirgin bir MMP-9 immunoreaktivitesi görüldü. Fibrin ve Amniyon grupları stromasında ve ilaç grubu stromanın anterior ve posterior stromasında orta derecede MMP-9 immunoreaktivitesi gözlenirken ilaç grubunda stromanın merkezinde anterior ve posterior stromaya göre daha az yoğun MMP-9 immunoreaktivitesi gözlemlendi. Tüm grupların Descemet membranında MMP-9 immunoreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 6,7,8).



Şekil 6. Fibrin grubu korneasında MMP-9 immunoreaktivitesi. 10X.

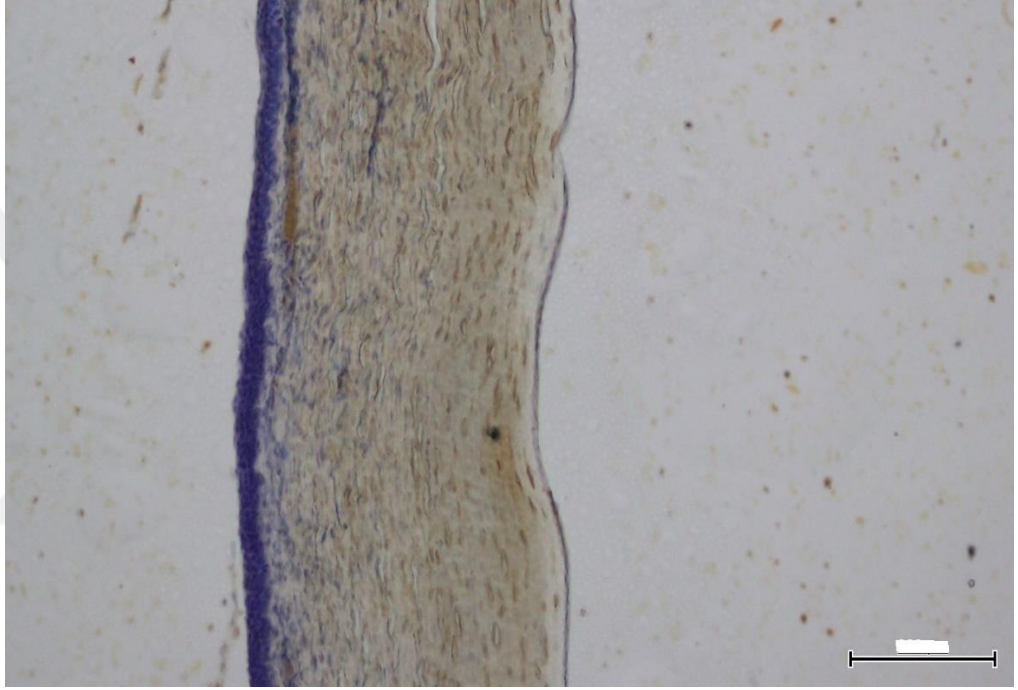


Şekil 7. İlaçlı grubu korneasında MMP-9 immunoreaksiyonu 10X.



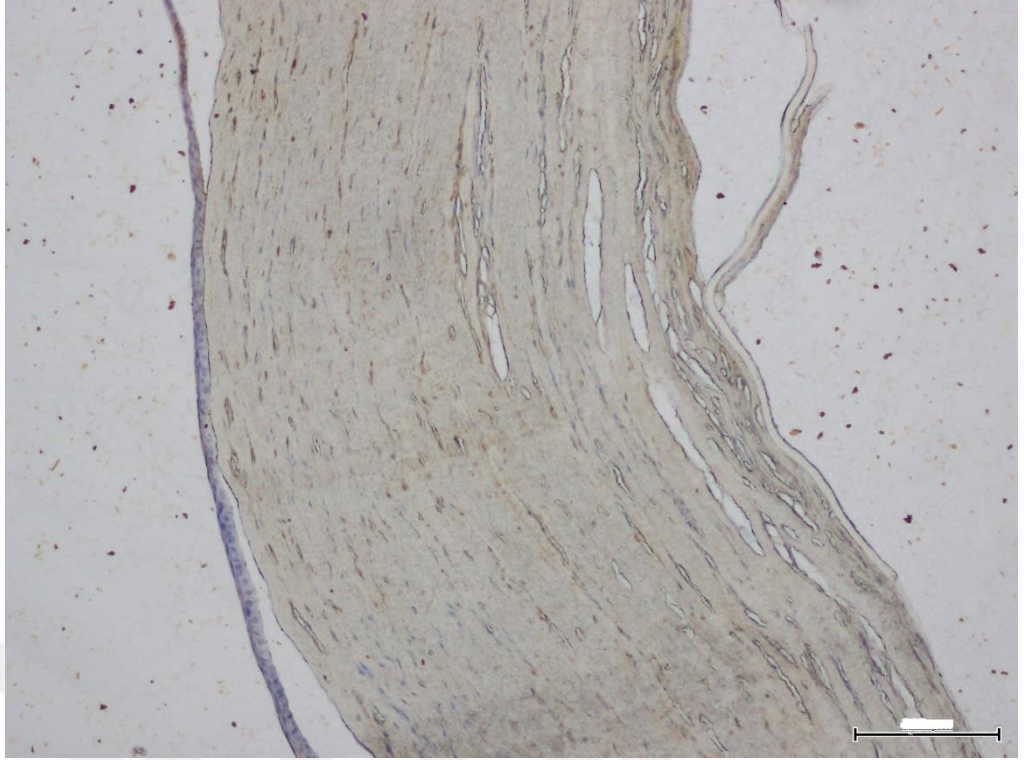
Şekil 8. Amniyon grubu korneasında MMP-9 immunoreaktivitesi. 10X.

Tüm grupların korneasında VEGF immunreaktivesi özellikle stromada orta derecede yoğunlukta görüldü. Tüm grupların Descemet membranında VEGF immunreaktivitesi görülmedi. Tüm gruplarda stroma içinde yeni oluşan neovaskülarizasyon odakları olduğu düşünülen küçük boşluklar etrafında yoğun VEGF immunreaktivitesi görüldü. Bu boşluklar ve etrafındaki VEGF immunreaktivitesi ilaçlı grupta diğer gruplara göre daha yaygın olarak gözlemlendi.

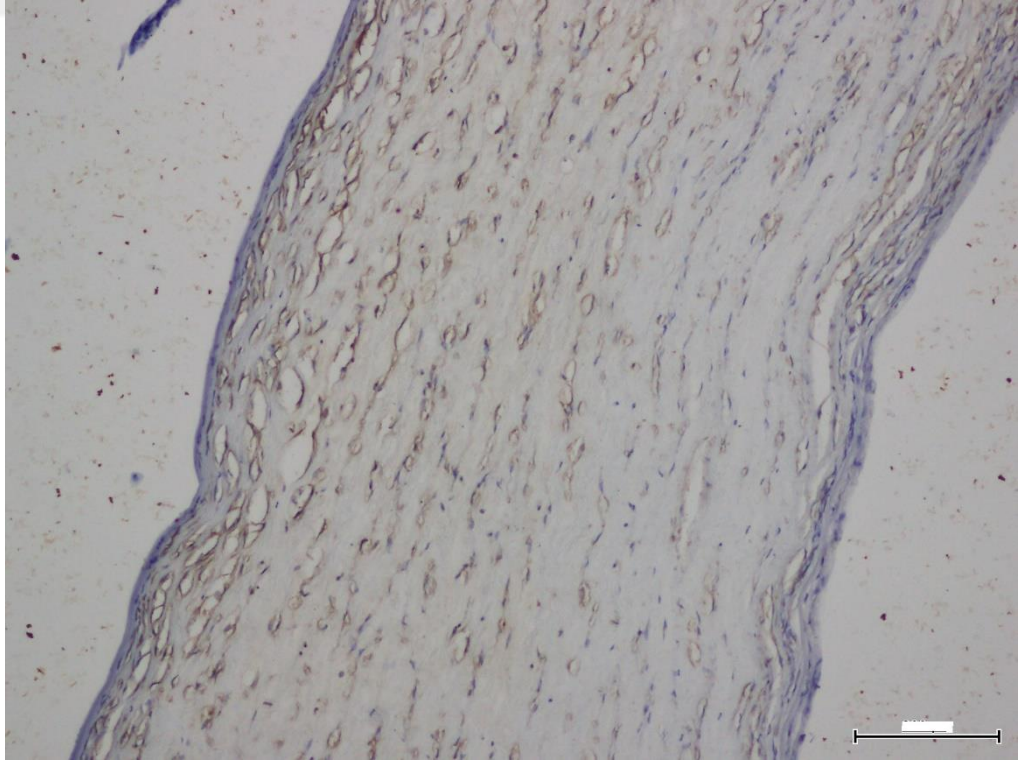


Şekil 9. Amniyon grubu korneasında VEGF immunreaktivitesi. 10X.





Şekil 10. Fibrin grubu korneasında VEGF immunoreaktivitesi. 10X.



Şekil 11. İlaç grubu korneasında VEGF immunoreaktivitesi. 10X

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sanayi ve teknolojideki gelişmeler nedeniyle, çeşitli kimyasal maddelerin kullanım alanlarının artması, kimyasal yaralanmaların da artması ile sonuçlanmıştır. Korneanın kimyasal yaralanmaları tüm kornea travmalarının %12'sini oluşturur. Korneal alkali yanıklar, persistant epitel defekti, korneal neovaskülarizasyon, korneal ülser, opasite oluşumu, korneal erime ve perforasyon gibi komplikasyonları nedeniyle ciddi morbidite ve görme kaybına sebep olmaktadır. (Tuft & Shortt 2009).

Korneal alkali yanığın tedavisinde birincil amaç, komplikasyonların önlenmesi ve yara iyileşmesinin hızlı, sekelsiz bir şekilde gerçekleşmesinin sağlanmasıdır. Yaralanmanın şiddeti, tedavi seçimi ve planlanmasında en önemli faktörlerden biridir. Günümüzde korneal alkali yanıkların tedavisinde, çok sayıda medikal ajan ve cerrahi teknikleri kapsayan seçenekler mevcuttur.

AMT, ilk kez 1995'te Kim ve Tseng tarafından tarif edildikten sonra oküler yüzey patolojilerinde kullanımı hızla artan oldukça popüler ve etkili bir tekniktir. Çalışmamızda da AMT uygulamasının alkali yanık tedavisindeki yararlı etkileri, morfolojik ve histolojik olarak gösterilmiştir. Önceki klinik ve deneysel çalışmalar, alkali yanıkta AMT'nun epitel rejenerasyonunu desteklediğini ve inflamasyonla birlikte neovaskülarizasyonu azalttığını göstermiştir. (Kim ve ark. 2000, Choi ve ark. 2011, Yin ve ark. 2011) Ancak, bazı çalışmalar AMT'nin ileri bir aşamada (Evre 4) akut alkali yanıkları için etkisiz bir tedavi olduğunu ortaya koymuştur (Joseph ve ark. 2001). AMT, yara iyileşmesini kolaylaştırmanın bir yoludur, ancak invaziv bir işlemdir ve özel imkânlarla ihtiyaç duyar. Bu prosedür, orta dereceli alkali yaralanmalarında kullanıldığında ağrıyı azaltmada ve erken epitelizasyonun sağlamada etkilidir. Ancak, ağır yaralanmalarda o kadar da etkili değildir (Tamhane ve ark. 2005).

Çalışmamız, TZF membran implantasyonunun korneal alkali yanık tedavisindeki etkinliğini morfolojik ve histolojik verilerle ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu çalışmada TZF membran uygulamasının, alkali yanık iyileşme sürecinde, epitel defekti, kornea kalınlığı, opasite oluşumu ve KNV oluşumu gibi bir çok kriter üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Literatürde, TZF membran implantasyonunun korneal patolji-

lerde kullanımını hakkında yapılan sınırlı sayıda klinik çalışmada, bu yöntemin korneal yara iyileşmesi üzerine etkilerinden bahsedilmektedir.

Korneal alkali yanığın cerrahi tedavisi olarak AMT ve TZF membran implantasyonunu karşılaştırdığımız çalışmamızda TZF membranın epitel defekti ve opasite üzerine AM'dan daha etkili olduğu gösterilmiştir. TZF membranın santral kornea kalınlığı üzerine etkisinin AM'dan farklı olmadığı ve korneal neovaskülarizasyonu üzerine ise en az AM kadar etkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki veriler değerlendirildiğinde epitel defektindeki iyileşme TZF membran tedavisi ile daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte AM tedavisi ile de iyileşme görülmüştür. Tablo 7' de de görüldüğü üzere son vizitteki epitel defekti ölçümleri fibrin grubunda diğer gruplara göre daha azdır. Alkali yanıklarda TZF membranla yapılmış bir çalışma olmamakla birlikte, Can ve arkadaşlarının (2016) desmatoseli olan hastalarda yaptığı çalışmada kullandıkları TZF membran greftinin kornea yüzeyinin epitelizasyonunu teşvik etmek için kornea epitel hücre göçünü kolaylaştırdığını göstermişlerdir.

Santral kornea kalınlığı için elde ettiğimiz verilerimizi değerlendirdiğimizde grupların arasında fark izlenmemiştir. İlaç ve fibrin grubunda ortalamanın altında santral kornea kalınlığına sahip birer denek vardır fakat bu deneklerin korneasında ülserasyon gelişmemiştir. Fibrin grubundaki deneğin korneasındaki TZF membran membranın diğer deneklere göre üç gün önce erimesine bağlayabiliriz. Alio ve arkadaşlarının (2013) korneal perforasyonlarda yaptığı çalışmada fibrin membranın göz bütünlüğü koruduğu ve defekti kapattığını ispatlamışlardır. TZF membrandaki trombositlerden salgılanan PDGF, TGF-beta, FGF, İGF-1 ve 2, VEGF ve EGF gibi büyüme faktörlerinin sürekli salınımı hücrel etkileşimleri düzenler ve yumuşak ve sert dokuların rahat iyileşmesini sağlamak için matriks sentezini hızlandırır (Dohan ve ark. 2009). Bu mekanizmaya dayanılarak TZF membranın kornea yaralanmalarında da iyileşmeyi hızlandığı söylenebilir.

Korneal alkali yanıkların diğer bir ciddi morbidite sebebi de korneal opasite oluşumudur. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilerde korneal opasite oranlarında amniyon ve ilaç grubunda vizitler arasında ve gruplar arasında fark izlenmemiştir. Fibrin grubunda ise son vizitte ilk vizite göre anlamlı olarak düzelme

ve opasite oranında azalma izlenmiştir. Aynı şekilde son vizitteki opasite oranları karşılaştırdığında fibrin grubunda anlamlı olarak daha az opasite ölçülmüştür. TZF membran içinde nadir kök hücreler yer alır ve mezenkimal kökenlidir. Bu hücreler yara yerine ulaştığında farklılaşarak başka hücrelere dönüşebilir. Bazı çalışmalarda TZF membrandan kemik dokusuna benzer dokunun olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark. 2016). Bu çalışmada da gösterildiği gibi TZF membran içinde bulunan az miktardaki kök hücrelerin içine koyulduğu dokuya dönüşerek deforme olmuş hücrelerin yerine geçebileceği söylenebilir. Bu mekanizmayla kornea opasitesini azalttığı düşünülebilir.

Limbal kök hücre eksikliği ağır kimyasal yanıkların görsel olarak en önemli uzun dönem sekellerinden biridir. Alkali yanıkta neovaskülarizasyon genellikle limbal kök hücre kaybı nedeniyle meydana gelirler. En ciddi morbidite sebeplerinden biridir. Çalışmamızın verileri değerlendirildiğinde KNV oranları son vizitte ilaç grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu. Yine son vizitte amniyon grubunda KNV oranı %  $8,04 \pm 1,67$ , fibrin grubunda ise %  $9,73 \pm 2,54$  oranında bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Amniyon zarı endostatin, doku metalloproteinaz inhibitörü 1, 2, 3, 4 (TIMP 1, 2, 3, 4) ve trombospondin-1 içermektedir. Trombospondin-1 ve TIMP-1, 2, 3, 4 anjiogenezi inhibe ederken, endostatin ise epitelyal büyüme faktörü inhibitörüdür (Hao ve ark. 2000, Dua ve ark. 2004). Yara iyileşmesi sırasında oluşan ve tümörlerde meydana gelen fibrin matriksin anjiogeneze neden olduğu gösterilmiştir (Dvorak ve ark. 1987). TZF membranın içeriğinde bulunan VEGF, FGF gibi anjiogeneze neden olabilecek faktörler nedeniyle KNV oluşumunun daha fazla olabileceği düşünülürken sonuçlarımızda AM' la karşılaştırıldığında anlamlı fark izlenmemiştir.

Histolojik boyamalarda da gösterildiği gibi amniyon ve fibrin grubunda inflamatuvar hücrelerin daha az olduğu gösterilmiştir. İki tedavi de inflamasyonun azaltılmasında oldukça etkilidir. Choukroun ve arkadaşları (2006), PRF membranının, enflamatuvar retrokontrol özelliği nedeniyle ameliyatlarda antiinflamatuvar bir adjuvan olarak davrandığını gösterdi. Postoperatif düşük iltihap oranlarının bu inflamasyon kontrol özelliğine bağlı olabileceğini savundular.

TZF membranının 3-B fibrin mimarisi, konsantre otolog trombositlerden oluşur; trombospondin-1, fibronektin ve vitronektin gibi matris proteinleri; ve küçük bir miktar lökosit, onu iskele olarak doku mühendisliği uygulamaları için uygun kılar (Dohan ve ark. 2006). Otolog 3-B fibrin mimarisinin yanı sıra, doku rejenerasyonu için önemli olan büyüme faktörlerinin uzun süreli salınımı, çevredeki sağlıklı kornea ile birleşme ve yeni kolajen lamellerinin sentezinin uyarılması PRF membranının ana avantajlarıdır (Can ve ark. 2016).

TZF membran tedavisinin göz üzerinde kullanımı yavaş yavaş yaygınlaşmaktadır. Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi pterijum eksizyonu, desmatosel, korneal perforasyon gibi durumlarda kullanılmıştır. Çalışmamızda ise alkali yanıklarda kullanılabilmesi ve komplikasyonlar üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. TZF membran persistant epitel defektleri, korneal ülserasyona sebep olabilecek oküler yüzey bozukluklarında, periferik korneal dejenerasyonlarının son evrelerinde, skleromalazi gibi skleral perforasyon, incelme ve kayıp durumlarında kullanılabilir.

AMT, alkali yanıklarda ve diğer kornea patolojilerinde son derece etkili bir yöntem olmakla birlikte, donör gerektirmesi, hazırlanmasındaki zorluklar, zaman alıcı olması, bazı mikroorganizmaların bulaş riski, erken degradasyon ve suture bağlı komplikasyonlar gelişebilmesi gibi dezavantajları mevcuttur. TZF membran uygulanmasında ise, otolog olması, bulaş riskinin olmaması, elde edilmesinin kolay ve ucuz olması, acil durumlarda güvenle kullanılabilmesi gibi çok önemli avantajlar söz konusudur.

Sonuç olarak, TZF membran implantasyonu, korneal alkali yanıklarda, iyileşmenin hızlanması ve komplikasyonların önlenmesi bakımından oldukça etkili bir yöntemdir. AMT gibi, bilinen mevcut diğer yöntemlerle kıyaslandığında, uygulama kolaylığı ve güvenilirliği açısından birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Ayrıca, elde edilen veriler ışığında TZF membran implantasyonunun AMT ile kombine uygulamasının da etkinliği artırabileceğini düşünmekteyiz. Deneysel olarak etkinliğini gösterdiğimiz TZF membran implantasyonu konusunda, gelecekte yapılacak olan, hem izole hem de kombine uygulamaları içeren klinik çalışmalar sayesinde, teorik ve pratik bilgilerimiz artacaktır.



## KAYNAKLAR

Acera A, Rocha G, Vecino E.(2008). Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res.* 40(6):315-321.

Acera A, Vecino E, Duran JA.(2013). Tear MMP-9 levels as a marker of ocular surface inflammation in conjunctivochalasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(13):8285-8291.

Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK.(2001). Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 85, 905–907.

Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A.(2007). Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res,* 39, 124-129.

Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, Rio AL.(2013). Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. *JAMA Ophthalmol,* 131, 745–751.

Alio JL, Shah S, Barraquer C, Bilgihan K, Anwar M, Melles GRJ. (2002). New techniques in lamellar keratoplasty, *Current Opinion in Ophthalmology,* 13(4), 224–229.

Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T & Kleinman ME. (2006). Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature,* 443(7114), 993.

Ambati BK, Patterson E, Jani P, Jenkins C, Higgins E, Singh N & Caldwell R. (2007). Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *British journal of ophthalmology,* 91(4), 505-508.

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT.(2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis,* 91(01), 4–15.

Anitua E, Sanchez M, Merayo-Llodes J, De la Fuente M, Muruzabal F, Orive G.(2011). Plasma Rich in Growth Factors (PRGF-Endoret) Stimulates Proliferation and Migration of Primary Keratocytes and Conjunctival Fibroblasts and Inhibits and Reverts TGF- $\beta$ 1-Induced Myodifferentiation. *Investigative Ophthalmology&Visual Science;* 52(9), 6066-6073.

Armstrong LC, Bornstein P.(2003) Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. In: *Matrix Biology.* Vol 22, 63-71.

Aydın P & Aydın Akova Y.(Eds).(2010). *Temel Göz Hastalıkları.*205-206; 2. Basım Güneş Tıp Kitapevleri.

Bakhtiari P & Djalilian A.(2010). Update on limbal stem cell transplantation, *Middle East African Journal of Ophthalmology,* 17(1), 9–14.

Ballen PH.(1964). Treatment of chemical burns of the eye, *Eye, Ear, Nose & Throat Monthly,* 43, 57–61.

Baradaran-Rafii A, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA.(2007). Amniotic membrane transplantation. *Iran J Ophthalmic Res*, 2, 58–75.

Baradaran-Rafii A, Eslani M, Sadoughi M, Esfandiari H, Karimian F.(2013). Anwar versus melles deep anterior lamellar keratoplasty for keratoconus: a prospective randomized clinical trial, *Ophthalmology*, 120(2), 252–259.

Baum J.(2002). Amniotic membrane transplantation: Why is it effective? *Cornea*, 21, 339 -341.

Beams R, Linabery L, Grayson M.(1968). Effect of topical corticosteroids on corneal wound strength, *American Journal of Ophthalmology*, 66(6), 1131–1133.

Blair P & Flaumenhaft R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23(4), 177–189.

Borzini P, Balbo V, Mazzucco L.(2012). Platelet concentrates for topical use: bedside device and blood transfusion technology. Quality and versatility. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(7), 1138–44.

Bradley JC, Bradley RH, McCartney DL, Mannis MJ.(2008). Serum growth factor analysis in dry eye syndrome. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 36(8), 717–20.

Bullock JD, Ballal DR, Johnson DA, Bullock RJ.(1997). Ocular and orbital trauma from water balloon slingshots: a clinical, epidemiologic, and experimental study, *Ophthalmology*, 104(5), 878–887.

Burns CL & Chylack Jr. LT.(1979). Thermal burns: the management of thermal burns of the lids and globes, *Annals of Ophthalmology*, 11(9), 1358–1368.

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.(2005). Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med*, 9: 777-794.

Cakmak HB, Can GD, Can ME, Cagil N. (2017). A novel graft option after pterygium excision: platelet-rich fibrin for conjunctivoplasty. *Eye*, 31(11), 1606.

Can ME, Dereli Can G, Cagil N, Cakmak HB, Sungu N. (2016). Urgent therapeutic grafting of platelet-rich fibrin membrane in descemetocoele. *Cornea*, 35(9), 1245-1249.

Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, Burr JM.(2008). A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans, *American Journal of Ophthalmology*, 146(2), 251–259.

Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE.(1996). Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol*, 132(6), 1189–1198.

Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT.(2001). Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 12(4), 242-249.

- Chen H, Ikeda U, Shimpo M, Maeda Y, Shibuya M, Ozawa K & Shimada K. (2000). Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble FLT-1 gene. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 36(4), 498-502.
- Choi JA, Choi JS, Joo CK.(2011). Effects of amniotic membrane suspension in the rat alkali burn model. *Mol Vis*. 17, 404–412
- Chotikavanich S, de Paiva CS, Li de Q.(2009). Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50(7):3203-3209.
- Clauss M.(2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*, 26(5), 561-9.
- Cogan D.(1948). Vascularization of the Cornea. Its Experimental Induction by Small Lesions and a New Theory of Its Pathogenesis. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 46, 457-471.
- Corrales RM, Stern ME, De Paiva CS.(2006). Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47(8): 3293-3302.
- Cunningham FG, MacDonald PC, Leveno KJ.(2001). *Williams obstetrics*, 21st edn. McGrawHill, New York.
- Davis JW.(1910). Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*, 15, 307.
- DeRotth A.(1940). Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol*,23, 522–525.
- Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT.(2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors at the advancing pterygium head. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41(13):4142-4149.
- Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S.(2002). The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*, 21(1), 33-49.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), e37-e44.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B.(2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 101, 51-5.
- Dohan DM, De Peppo GM, Doglioli P, et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to

achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009; 27:63–69.

Donshik PC, Berman MB, Dohlman CH, Gage J, Rose J.(1978). Effect of topical corticosteroids on ulceration in alkali burned corneas, *Archives of Ophthalmology*, 96(11), 2117–2120.

Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS.(2004). The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 49(1), 51–77.

Dua HS, King AJ, Joseph A.(2001). A new classification of ocular surface burns, *British Journal of Ophthalmology*, 85(11), 1379–1383.

Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. (1987). Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest*; 57(6), 673-86.

Eğrilmez S. (2007). Korneanın Anatomi, Fizyoloji ve Doku İyileşmesi. Akademik Eğitim Programı 27. Ulusal Oftalmoloji Kurs Kitabı. Ankara, 201-213.

Eğrilmez S.(2010). Kan Ürünü Gözyaşı Takviyeleri. Yağcı A. Editör. Kuru Göz Hastalığı Güncel Gelişmeler Işığında Ankara, 91-97.

Eslani M, Baradaran-Rafii A, Ahmad S.(2012). Cultivated limbal and oral mucosal epithelial transplantation, *Seminars in Ophthalmology*, 27(3), 80–93.

Eslani M, Baradaran-Rafii A, Djalilian A.(2011). Conjunctival Limbal Autograft (CLAU), in *Advances in Eye Research*, W. L. Thomsen, Ed. vol. 1, Nova Biomedical Press, Hauppauge, NY, USA.

Eslani M, Baradaran-Rafii A, Movahedan A, Djalilian AR. (2014). The ocular surface chemical burns. *Journal of ophthalmology*, Pages 9.

Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SCG. (2004). Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye*, 18(4), 406–417.

Fayette J, Soria JC, Armand JP.(2005). Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer*, 41(8), 1109-1116.

Feng X, Clark RA, Galanakis D, Tonnesen MG.(1999). Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of  $\alpha v/\beta 3$  mRNA by fibrin. *The Journal of investigative dermatology*, 113(6), 913-919.

Fernandes M, Sangwan VS, Rao SK, Basti S, Sridhar MS, Bansal AK, Dua HS. (2004). Limbal stem cell transplantation. *Indian journal of ophthalmology*, 52(1), 5.

Ferrara N & Davis-Smyth T.(1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.(2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6), 669-76.

Ferrara N.(2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25(4), 581-611.

Fish R & Davidson RS.(2010). Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Current Opinion in Ophthalmology*, 21(4), 317–321.

Frazer DG, Armstrong MFJ, Archer DB.(1986). Compression keratopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 102(2), 208–210.

Freddo TF, Waring GO.(1998). Pathologic responses in the cornea. Leibowitz HM. *Corneal Disorders Clinical Diagnosis and Management* 2. ed.154-200.

Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T.(1999). Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 18(1), 73–79.

Gajiwala K & Gajiwala AL.(2004). Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell & Tissue Bank*, 5(2), 73–80.

Galask RP & Snyder IS.(1970). Antimicrobial factors in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*, 106(1), 59–65.

Geerling G & Hartwig D. (2006). Autologous serum eyedrops for ocular surface disorders. In *Cornea and external eye disease*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-20.

Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, Falisi G.(2015). Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *European review for medical and pharmacological sciences*, 19(6), 927–30.

Golub LM, Lee HM, Lehrer G.(1983). Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action, *Journal of Periodontal Research*, 18(5), 516–526.

Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K.(2001). Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum, *Cornea*, 20(8), 807–810.

Gregory DG.(2008). The ophthalmologic management of acute Stevens-Johnson syndrome, *Ocular Surface*, 6(2), 87–95.

Gris O, del Campo Z, Wolley-Dod C, Güell JL, Bruix A, Calatayud M, Adán A. (2002). Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea*, 21(1), 22-27.

Guo M & Grinnell F.(1989). Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol*, 93(3), 372–378.

Hao Y, Ma DH, Hwang DG.(2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in humanamniotic membrane. *Cornea*, 19, 348-352.

Herminghaus P, Geerling G, Hartwig D, Wedel T, Dibbelt L.(2004). Epitheliotropic capacity of serum and plasma eyedrops. Influence of centrifugation. *Ophthalmologe*,101,998-1005.

Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. (1995). The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol*, 154(11), 5665–5674.

Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S.(2000). Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea, *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(1), 113–129.

Javadi M & A. Baradaran-Rafii A.(2009). Living-related conjunctivallimbal allograft for chronic or delayed-onset mustard gas keratopathy, *Cornea*, 28(1), 51–57.

Joseph A, Dua HS, King AJ.(2001). Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns. *Br J Ophthalmol*. 85, 1065–1069.

Kaiser PK.(2006). Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases. *Am J Ophthalmol*, 142(4), 660-668.

Kanski J.(2001). Konjonktiva hastalıkları. Kanski J.(ed.) *Klinik oftalmoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 55-90.

Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE.(1987). Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol*, 104(3), 611–621.

Keitel S.(2015). Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application, European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2nd edn. Council of Europe, Strasbourg, 349–355.

Kesting MR, Wolff KD, Nobis CP, Rohleder NH.(2014). Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg* 18(2), 153–164.

Kheirkhah A, Johnson DA, Paranjpe DR, Raju VK, Casas V, Tseng SC. (2008). Temporary sutureless amniotic membrane patch for acute alkaline burns. *Arch Ophthalmol*, 126(8), 1059-66.

Kilic U, Kilic E, Järve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, Hermann DM. (2006). Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci*, 26(48), 12439-12446.

Kim JC & Tseng SC.(1995). Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14(5), 473-84.

Kim JS, Kim JC, Na BK.(2000). Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res*. 70, 329–337.

Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC.(2001). Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea* 20(7), 720–726.

Kim JY, Djalilian AR, Schwartz GS, Holland EJ.(2003). Ocular surface reconstruction: limbal stem cell transplantation, *Ophthalmology Clinics of North America*, 16(1), 67–77.

Kirkpatrick JJR, Enion DS, Burd DAR.(1995). Hydrofluoric acid burns: a review, *Burns*, 21(7), 483–493.

Kjaergaard N, Helmig RB, Schonheyder HC, Uldbjerg N, Hansen ES, Madsen H.(1999). Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group b streptococcus in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 83(2), 165–169.

Klagsbrun M, D'Amore PA.(1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor*, 7(3), 259-270.

Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S.(2000). Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20(3), 173–177.

Koller J & Orsag M.(2006). Skin grafting options at the Burn and Reconstructive Surgery Department of the Faculty Hospital in Bratislava. *Acta Chir Plast* 48(2), 65–71.

Krashmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. (2005). *Cornea: fundamentals, diagnosis and management*. Krashmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (eds).(1997). *Cornea*, 1, 3-27.

Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M.(2001). Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(7), 1539–1546.

Kuckelkorn R, Kottek A, Reim M.(1994). Intraocular complications following severe eye burns. Frequency and management, *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 205(2), 86–92.

Kuckelkorn R, Kottek A, Schrage N, Reim M.(1995). Poor prognosis of severe chemical and thermal eye burns: the need for adequate emergency care and primary prevention. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 67(4), 281–284.

Kuckelkorn R, Schrage N, Reim M.(1995). Treatment of severe eye burns by tenoplasty, *The Lancet*, 345(8950), 657–658.

Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM.(2006). Fibrin structure and wound healing. *Journal of thrombosis and haemostasis(JTH)*, 4(5), 932–9.

Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC.(2000). Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20(5), 325–334.

Lee SH & Tseng SC.(1997). Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*, 123(3), 303–312.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.(1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306-1309.

Levene R, Shapiro A, Baum J.(1963). Experimental corneal vascularization. *Arch Ophthalmol*, 70, 242-249.

Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SCG.(2009). Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges, *Eye*, 23(10), 1946–1953.

Lin A, Patel N, Yoo D, Demartelaere S, Bouchard C.(2011). Management of ocular conditions in the burn unit: thermal and chemical burns and stevens-johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis, *Journal of Burn Care & Research*, 32(5), 547–560.

Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, Azar DT. (2001). Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(11), 2517-2524.

Ling S, Li W, Liu L, Zhou H, Wang T, Ye H, Yuan J. (2013). Allograft survival enhancement using doxycycline in alkali-burned mouse corneas. *Acta Ophthalmologica*, 91(5), 369-378.

Liu J, Sheha H, Fu Y, Liang L, Tseng SCG.(2010). Update on amniotic membrane transplantation, *Expert Review of Ophthalmology*, 5(5), 645–661.

Malhotra C & Jain AK.(2014). Human amniotic membrane transplantation: different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant*, 4(2), 111–121.

Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J.(2004). Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent*. 13(1):65-72.

McCulley JP. (1990). Ocular hydrofluoric acid burns: animal model, mechanism of injury and therapy, *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 88, 649–684.

McCulley.(1987).*Chemical injuries in The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice*, Boston, Mass, USA.

Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP.(2011). Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int*, 108, 243–248.

Meller D, Pires RT, Tseng SCG.(2002). Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*, 86(4), 463–471.



Meller D, Pires RTF, Mack RJS, Figueiredo F, Heiligenhaus A, Park WC, Prabhasawat P, John T, McLeod SD, Steuhl KP, Tseng SCG.(2000). Amniotic membrane transplantation for acute chemical and thermal burns. *Ophthalmology*;107:980-990.

Mishima S.(1968). Corneal Thickness, *Surv Ophthalmol*, 13, 57-96.

Murphy C, Alvarado J, Juster R.(1984). Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25(12), 1402-15.

Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105(suppl 1):S13-S33.

Öncü E & Alaaddinoğlu EE.(2015). The effect of platelet-rich fibrin on implant stability. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 30(3), 578–582.

Panda A, Jain M, Vanathi M, Velpandian T, Khokhar S, Dada T.(2012). Topical autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury, *Cornea*, 31(9), 989– 993.

Park WC & Tseng SC.(2000). Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(10), 2906-14.

Paterson CA, Pfister RR, Levinson RA.(1975). Aqueous humor pH changes after experimental alkali burns. *Am. J. Ophthalmol.* 79(3), 414–419.

Perry HD, Kenyon KR, Lamberts DW, Foulks GN, Seedor JA, Golub LM. (1986). Systemic tetracycline hydrochloride as adjunctive therapy in the treatment of persistent epithelial defects, *Ophthalmology*, 93(10), 1320–1322.

Pfister RR & Paterson CA.(1980). Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye, *Ophthalmology*, 87(10), 1050–1057.

Pfister RR, Haddox JL, Dodson RW, Harkins LE.(1987). Alkali-burned collagen produces a locomotory and metabolic stimulant to neutrophils, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 28(2), 295–304.

Pfister RR, Haddox JL, Lank KM.(1988). Citrate or ascorbate/citrate treatment of established corneal ulcers in the alkali-injured rabbit eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(7), 1110–1115.

Pfister RR, Haddox JL, Sommers CI.(1993). Alkali-degraded cornea generates a low molecular weight chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(7), 2297–2304.

Pfister RR, Nicolario ML, Paterson CA.(1981). Sodium citrate reduces the incidence of corneal ulcerations and perforations in extreme alkali-burned eyes—acetylcysteine and ascorbate have no favorable effect. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 21(3), 486–490.

- Pfister RR.(1983). Chemical injuries of the eye, *Ophthalmology*, 90(10), 1246–1253.
- Phillips K, Arffa R, Cintron C, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983;101:640–3.
- Poon AC, Geerling G, Dart JKG, Fraenkel GE, Daniels JT.(2001). Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *British Journal of Ophthalmology*, 85(10), 1188–1197.
- Rahman I, Said DG, Maharajan VS, Dua HS.(2009). Amniotic membrane in ophthalmology: indications and limitations. *Eye*, 23(10), 1954–1961.
- Ralph RA, Doane MG, Dohlman CH.(1975). Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump. *Archives of Ophthalmology*, 93(10), 1039–43.
- Ralph RA.(2000). Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review, *Cornea*, 19(3), 274–277.
- Reim M, Bahrke C, Kuckelkorn R, Kuwert T.(1993). Investigation of enzyme activities in severe burns of the anterior eye segment. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 231(5), 308–312.
- Rendu F & Brohard-Bohn B.(2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5), 261–273.
- Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Cursiefen C, Kruse FE, Beckmann MW, Seitz B.(2006). Adhesion structures of amniotic membranes integrated into human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(5), 1853–1861.
- Rodrigues Z.(2009). Irrigation of the eye after alkaline and acidic burns. *Emergency Nurse*, 17(8), 26–29.
- Ronk JF, Ruiz-Esmenjaud S, Osorio M, Bacigalupi M, Goosey JD. (1994). Limbal conjunctival autograft in a subacute alkaline corneal burn. *Cornea*, 13(5), 465-468.
- Roper-Hall MJ.(1965). Thermal and chemical burns, *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom*, 85, 631–653.
- Salzman M & O'Malley RN.(2007). Updates on the evaluation and management of caustic exposures. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 25(2), 459–476.
- Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andí'a I, Padilla S, Mujika I. (2007). Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 35(2):245-251.
- Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK.(2006). Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol*, 54(1), 29-34.

- Saud EE, Moraes Jr. HV, Marculino LG, Gomes JA, Allodi S, Miguel NC. (2012). Clinical and histopathological outcomes of subconjunctival triamcinolone injection for the treatment of acute ocular alkali burn in rabbits. *Cornea*, 31(2), 181–187.
- Schrage NF, Langefeld S, Zschocke J, Kuckelkorn R, Redbrake C, Reim M. (2000). Eye burns: an emergency and continuing problem, *Burns*, 26(8), 89–699.
- Seedor JA, Perry HD, McNamara TF, Golub LM, Buxton DF, Guthrie DS. (1987). Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits. *Archives of Ophthalmology*, 105(2), 268-271.
- Shams N & Ianchulev T.(2006). Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am*, 19(3), 335-344.
- Shekhar H, Titiyal J, Sinha R, Tinwala S.(2013). Amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders: a review, *Journal of Clinical Ophthalmology and Research*, 1(1), 64–69.
- Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K.(1997) Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*, 104(12), 2068–2076.
- Singh P, Tyagi M, Kumar Y, Gupta KK, Sharma PD. (2013). Ocular chemical injuries and their management. *Oman journal of ophthalmology*, 6(2), 83-86.
- Sivak JM, Ostriker AC, Woolfenden A, Demirs J, Cepeda R, Long D, Jaffee B.(2011). Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem*, 286(52), 44965-44975.
- Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG.(2002). Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*, 109(6), 1159-1166.
- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG.(2001). Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*, 85(4), 444–449.
- Sotozono C, He J, Matsumoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S. (1997). Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Current eye research*, 16(7), 670-676.
- Stern ME, Pflugfelder SC.(2004). Inflammation in dry eye. *Ocul Surf*. 2004;2(2):124-130.
- Spector J & Fernandez WG.(2008). Chemical, thermal, and biological ocular exposures, *Emergency Medicine Clinics of North America*, 26(1), 125–136.
- Tamhane A, Vajpayee RB, Biswas NR, Pandey RM, Sharma N, Titiyal JS, Tandon R. (2005). Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical

therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns. *Ophthalmology*. 112, 1963–1969.

Tananuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, Yi Q, McKelvie P, McCarty DJ, Taylor HR.(2001). Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients, *Cornea*, 20(8), 802–806.

Tauzin H, Rolin G, Viennet C, Saas P, Humbert P, Muret P.(2014). A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell & Tissue Bank*, 15(2), 257–265.

Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T.(2007). The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*, 105(3), 215–228.

Tsai JH, Derby E, Holland EJ, Khatana AK.(2006). Incidence and prevalence of glaucoma in severe ocular surface disease, *Cornea*, 25(5), 530–532.

Tseng SCG, Chen SY, Shen YC, Chen WL, Hu FR.(2010). Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Curr Mol Med*, 10(9), 841–850.

Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA, Li W, He H, Liu TS, Cho TH, Gao YY, Yeh LK, Liu CY.(2004). How does amniotic membrane work? *Ocul Surf*, 2(3), 177-87.

Tseng SCG, Li DQ, Ma X.(1999). Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*, 179(3), 325–335.

Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meiler D.(1998). Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Archives of Ophthalmology*, 116(4), 431–441.

Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, Shimmura S.(1999). Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *British Journal of Ophthalmology*, 83(4), 390–395.

Tuft SJ & Shortt AJ. (2009). Surgical rehabilitation following severe ocular burns. *Eye*, 23(10), 1966.

Uçakhan ÖÖ, Köklü G, Fırat E.(2001). Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunda Amniotik Membran Transplantasyonu. *T Klin Ophthalmol*, 10(4), 199-205.

Vajpayee RB, Mukerji N, Tandon R, Sharma N, Pandey RM, Biswas NR, Melki SA.(2003). Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects, *British Journal of Ophthalmology*, 87(11), 1312–1316.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico MG.(1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.13. *Circulation*, 93(8), 1493-1495.

Wagoner MD.(1997). Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology*, 41(4), 275–313.

Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, Bai SZ, Dong Y, Chen FM, Zhao YM. (2016). The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering. *Scientific reports*, 6, 28126.

Wulle K.(1972). Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol*, 11(11), 897-904.

Yanoff M & Duker JS (eds).(2011). *Ophthalmology*. In: Ming XW, Carol LKarp, Robert P Selkin, Dimitri TA. Mosby edition. Chapter 5: 12-18

Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalcık H.(2004). Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(4), 181-184.