



**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN KORNEAL ALKALİ YANIK
MODELİNDE YARA İYİLEŞMESİNDE VE KORNEAL SKAR
OLUŞUMUNUN ÖNLENMESİNDE KERATİNOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ -2
VE
SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ**

Dr. Şebnem KAYA ERGEN

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2021



KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN KORNEAL ALKALİ YANIK MODELİNDE YARA
İYİLEŞMESİNDE VE KORNEAL SKAR OLUŞUMUNUN ÖNLENMESİNDE
KERATİNOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ -2
VE
SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ**

Dr. Şebnem KAYA ERGEN

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ Sevgi SUBAŞI

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Etik Kurul Onayı: 30.04.2020 karar tarihli KOÜ/HADYEK 3/2-2020

Bu tez, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2177 numarası ile desteklenmiştir- 2020

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bana destek veren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Nurşen Yüksel, Prof. Dr. Levent Karabaş, Dr. Öğr. Üyesi Dilara Pirhan ve Dr. Öğr. Üyesi Büşra Yılmaz Tugan'a,

Gerek hastalarına, gerek asistanlarına ve gerekse kliniğimizde emek veren tüm personele karşı nazik ve içten yaklaşımıyla kendime örnek edindiğim, eğitimim boyunca desteğini hep hissettiğim, tezimin her aşamasında büyük emeği geçen hocam Dr. Öğr. Üyesi Sevgi Subaşı'ya,

Aynı klinikte birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve tüm göz hastalıkları personeline,

Varlığıyla bana güven veren, tezimin zorlu aşamalarında bana destek olan, sevgisini ve desteğini her daim hissettiğim sevgili eşime,

Tüm hayatım boyunca desteklerini hep hissettiğim, her türlü fedakarlığı büyük keyifle yapan biricik ailem anneme, babama ve ablama yürekten teşekkür ediyorum.

Dr. Şebnem KAYA ERGEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER.....	1
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	4
FİGÜRLER DİZİNİ	5
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ	7
1. AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1.Gözün Anatomisi	11
2.2.Kornea Anatomisi	11
2.3.Korneanın Histolojik Yapısı	11
2.3.1.Epitel Tabakası	11
2.3.2.Bowman Tabakası	11
2.3.3.Stroma Tabakası	11
2.3.4.Descement Membranı	11
2.3.5.Endotel Tabakası	13
2.4.KORNEANIN İNERVASYONU	13
2.5.KORNEA FİZYOLOJİSİ	13
3.KORNEAL KİMYASAL YARALANMALAR	14
3.1.Epidemiyoloji	14
3.2.Patogenez	15
3.2.1.Asit Yanıkları ve Patogenez	15
3.2.2.Alkali yanıklar ve Patogenez	15
3.3.Klinik Süreç	17
3.3.1.Acil Faz	17
3.3.2.Akut Faz	17
3.3.3.Erken Onarım Fazı	18
3.3.4.Geç Onarım Fazı	18
3.4.Kimyasal Yaralanmaların Sınıflandırılması	18
3.5.Oküler Kimyasal Yanıklara Yaklaşım	20
3.5.1.Acil Tedavi	20

3.5.2.Akut Tedavi	22
3.5.2.1.Re-epitelizasyonun Sağlanması ve ülserasyonun önlenmesi	22
3.5.2.2.Antiinflamatuvar Tedavi	23
3.5.2.3.Antimikrobiyal Tedavi	23
3.5.2.4.Yüksek GİB Tedavisi	24
3.5.3 Kronik Tedavi	24
3.5.3.1.Sekelden Korunma	24
3.5.3.2.Kuru Göz Tedavisi	24
3.5.3.3.Kalıcı Epitelyum Defekti Tedavisi	24
3.5.3.4.Korneal Skar ve Melting Yönetimi	25
4. SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ (NGF)	25
4.1. Yapısı	25
4.2. Fonksiyonu	25
4.3. Etki Mekanizması	26
4.4. Klinik önemi	26
5. KERATİNOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ-2 (KGF-2)	29
5.1. Yapısı	29
5.2. Fonksiyonu	29
5.3. Etki Mekanizması	30
5.4. Klinik önemi	30
6. GEREÇ VE YÖNTEM	31
6.1. Denekler	31
6.2. Model Oluşturulması	32
6.3. Çalışma Dizaynı	32
6.4. Muayene Dizaynı ve Deneyin Sonlandırılması	33

6.5. KGF-2 ve NGF damla uygulması	34
7.KLİNİK BULGULAR	34
8.HİSTOLOJİK BULGULAR	46
8.1 Materyal-Metod	46
8.1.1. Hematoksilen&Eozin Boyamaları	46
8.1.2. Masson Trikrom Boyamaları	46
8.1.3. TGF- β , MMP-2 ve MMP-9 İmmünohistokimyasal Boyaması	46
8.2.Bulgular	47
8.2.1.Hematoksilen&Eozin ve	47
8.2.2.Masson Trikrom	47
8.2.3 İmmünohistokimyasal (IHC) incelemeler	56
8.2.3.1.Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)	56
8.2.3.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)	57
8.2.3.3. TGF- β	58
9.TARTIŞMA KLİNİK VE HİSTOLOJİK BULGULAR	67
10.SONUÇLAR	70
11.ÖZET	71
12.ABSTRACT	72
13.KAYNAKLAR	73

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

NGF : Nerve Growth Factor

RhKGF: Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor

RhNGF: Recombinant Human Nerve Growth Factor

KGF-2: Keratinocyte Growth Factor-2

MMP: Matriks metalloproteinaz

TGF β : Transforming Growth Factor β

İP: İntraperitonel

İV: İntravenöz

CXL: Cross-Linking

TrkA: Tirozin Kinaz A

IHC: İmmünohistokimya

LASİK: Lazer insitu keratomilesius

DETAB: Deneysel tıbbi araştırma birimi

ABDEHAM: Bursa Aykut Bolu Deney Hayvanları Merkezi

SKK: Santral korneal kalınlık

H&E: Hematoksilen-Eozin

MT: Masson Trichrome

OCT: Optik Koherens Tomografi

NaCl: Sodyum klorür

NaOH: Sodyum hidroksit

NH₃: Amonyak

NH₄OH: Amonyum Hidroksit

COOH: Karboksil

KOH: Potasyum Hidroksit

MgOH₂: Magnezyum Hidroksit

OH: Hidroksil

CaOH₂: Kalsiyum Hidroksit

RGTA: Matriks rejenerasyon ajanı

PMNL: Polimorfonükleer lökosit

PRK: Fotorefraktif keratektomi

PTK: Fototerapötik keratektomi

IL-1 β : İnterlökin 1 beta

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör-alfa

BSS: Dengeli Tuz Solüsyonu

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

DHA: Doksaheksaenoik Asit

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

Figürler Dizini

Figür Numarası ve Başlığı:

Figür-1A: Korneal Epitel Defektinin Hesaplanması.....34

Figür-1B: Korneal Vaskülarizasyonun Yarıklı Lamba Mikroskobu ile Fotoğraflanması.....34

Figür-1C: Ön Segment OCT görüntüleri- SKK.....34

Figür-1D: Ön Segment OCT görüntüleri- Yanık Boyutu.....34

Figür-2: KGF-2, NGF ve kontrol gruplarında sırayla 1., 2., 3. vizit epitel defekti büyüklüğünün ön segment fotoğraflarıyla takibi..... 39

Figür 3: KGF-2 grubu, NGF grubu ve kontrol gruplarında sırasıyla 2., ve 3. vizitlerde vaskülarizasyonun ön segment fotoğraflarıyla takibi.....44

Figür 4: H&E boyama uygulanan sağlıklı kornea grubu kornea kesitleri.....48

Figür 5: H&E boyama uygulanan sağlıklı kornea grubu kornea kesitleri.....49

Figür 6-8: H&E boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri.....49

Figür 9: H&E boyama uygulanan KGF-2 grubu kornea kesitleri.....51

Figür 10: H&E boyama uygulanan NGF grubu kornea kesitleri.....	51
Figür 11: H&E boyama uygulanan sağlıklı, kontrol, KGF ve NGF grubuna ait kornea kesitleri.....	52
Figür 12: Masson Trikrom boyama uygulanan sağlıklı kornea grubu kornea kesitleri.....	52
Figür 13-15: Masson Trikrom boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri.....	53
Figür 16: Masson Trikrom boyama uygulanan KGF-2 grubu kornea kesitleri.....	54
Figür 17: Masson Trikrom boyama uygulanan NGF grubu kornea kesitleri.....	55
Figür 18: TGF-beta immünohistokimya boyama uygulanan sağlıklı kornea grubu kornea kesitleri.....	59
Figür 19-20: TGF-beta immünohistokimya boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri...	59
Figür 21: TGF-beta immünohistokimya boyama uygulanan KGF-2 grubu kornea kesitleri.....	60
Figür 22: TGF-beta immünohistokimya boyama uygulanan NGF grubu kornea kesitleri.....	61
Figür 23: MMP-2 immünohistokimya boyama uygulanan NGF grubu kornea kesitleri.....	61
Figür 24: MMP-2 immünohistokimya boyama uygulanan KGF-2 grubu kornea kesitleri.....	62
Figür 25: MMP-2 immünohistokimya boyama uygulanan sağlıklı kornea grubu kornea kesitleri...	62
Figür 26: MMP-2 immünohistokimya boyama uygulanan NGF grubu kornea kesitleri.....	63
Figür 27-28: MMP-2 immünohistokimya boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri....	63
Figür 29: MMP-9 immünohistokimya boyama uygulanan NGF grubu kornea kesitleri.....	64
Figür 30: MMP-9 immünohistokimya boyama uygulanan sağlıklı kornea grubu kornea kesitleri.....	65
Figür 31: MMP-9 immünohistokimya boyama uygulanan KGF grubu kornea kesitleri.....	65

Figür 32: MMP-9 immunhistokimya boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri.....66

Tablolar ve Grafikler Dizini

Tablo Numarası ve Başlığı:

Tablo-1: Roper-Hall (Ballen) sınıflaması.....19

Tablo-2: Oküler yüzey yanıklarının yeni sınıflandırması.....19

Tablo-3: Model sonrası ortalama yara büyüklüğü ve santral kornea kalınlığı ölçümleri.....35

Tablo-4: 1., 2. ve 3. ziyaret SKK ölçümleri (μ)36

Tablo-5: Grup içi 1.,2. ve 3. ziyaret SKK ölçümlerinin karşılaştırılması (μ)37

Tablo-6: 1., 2., ve 3. ziyaret epitel defekti ölçümleri (%).....38

Tablo-7: Gruplar arası 2. ve 3. ziyaret epitel defekti ölçümlerinin karşılaştırılması.....39

Tablo-8: Grupların kendi içinde 1., 2. ve 3. ziyaret epitel defekti ölçümlerinin karşılaştırılması..40

Tablo-9: Kontrol grubu, grup içi 1., 2. ve 3. ziyaret epitel defekti ölçümlerinin karşılaştırılması..40

Tablo-10: 1.,2. ve 3. ziyaret korneal opasite ölçümleri (%)42

Tablo-11: Gruplar arası 2. ve 3. ziyaret opasite ölçümlerinin karşılaştırılması.....42

Tablo 12: Grupların kendi içinde 1., 2. ve 3. ziyaret opasite büyüklüğü ölçümlerinin karşılaştırılması..43

Tablo-13: 2. ve 3. ziyaret vaskülarizasyon büyüklüğü ölçümleri (%).....45

Tablo 14: 3. ziyaret sonunda gruplararası vaskülarizasyon büyüklüğü karşılaştırması.....45

Tablo 15: İmmunboyama skorlaması.....47

Tablo-16: Grupların epitel kaybı, stromal ödem, korneal hemoraji ve korneal inflamasyon skorları ortalamaları.....55

Tablo-17: Grupların epitel kaybı skorları istatistiksel karşılaştırılması.....55

Tablo-18: Grupların stromal ödem skorları istatistiksel karşılaştırılması.....56

Tablo-19: Grupların korneal hemoraji skorları istatistiksel karşılaştırılması.....56

Tablo-20: Grupların korneal inflamasyon skorları istatistiksel karşılaştırılması.....56

Tablo-21: Grupların MMP-2 boyanma skorları ortalaması.....57

Tablo-22: Grupların MMP-2 boyanma skorları istatistiksel karşılaştırılması.....57

Tablo-23: Grupların MMP-9 boyanma skorları ortalaması.....57

Tablo-24: Grupların MMP-9 boyanma skorları istatistiksel karşılaştırılması.....58

Tablo-25: Grupların TGF-beta boyanma skorları ortalaması.....58

Tablo-26: Grupların TGF-beta boyanma skorları istatistiksel karşılaştırılması.....58

Grafik Numarası ve Başlığı:

Grafik-1: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 1., 7. ve 14. gün santral kornea kalınlık ölçümleri36

Grafik-2: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 1., 7. ve 14. gün epitel defekt büyüklüğü ölçümleri (%).....38

Grafik 1: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 1., 7. ve 14. gün opasite büyüklüğü ölçümleri (%).....41

Grafik 4: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 7. ve 14. gün vaskülarite büyüklüğü ölçümleri (%).....43

1. AMAÇ VE KAPSAM

Saydam ve avasküler yapısıyla kornea, göze gelen ışık ışınlarının görme merkezine iletilmesini sağlamaktadır. Kornea, gözün dış katmanı olması sebebiyle dışarıdan gelebilecek çeşitli travmalara açıktır ve travma sonrası korneal yara iyileşmesi önemli bir klinik sorundur.¹

Gözdeki kimyasal yaralanmalar, oküler travmaların %11,5-%22,1'ini oluşturur.² Bu yaralanmalar, gözün ön segmentinde görüş kaybıyla sonuçlanan tek taraflı ya da bilateral kalıcı hasar oluşturmaktadır. Kimyasal bir travma olan alkali yanığına neden olan amonyum hidroksit, sodyum hidroksit, potasyum hidroksit gibi maddeler, temizlik malzemelerinin, havai fişeklerin, kireç ve çimento gibi inşaat malzemelerinin yapısında bulunmaktadır. Bu maddelerin kornea yüzeyi ile teması gözde alkali yanık oluşturabilmektedir.³

Alkali yaralanmalar ev kazaları ve iş kazaları sonrası oluşan bir yaralanma çeşidi olup genellikle çalışma hayatındaki genç yaş grubunu etkilemektedir. Yaralanmanın doğası gereği kalıcı hasar bırakmakta, uzun tedavi süreci gerekmekte ve bu tedavi süreci boyunca hem iş gücü kaybına hem de maddi kayba sebep olmaktadır. Genellikle çalışma hayatındaki erkek hastaları etkilemekte ve bu hastalar genellikle genç erişkinler olduğu için beklenen yaşam ömrünün uzun olması nedeniyle rehabilite etmek gerekmektedir. Yaralanma kornea dokusunun iyileşme kabiliyetini bozmakta ve opasite ve vaskülarite ile istenmeyen bir iyileşme sürecine sebep olmaktadır.

Kimyasal kazaların medikal sağaltımında, 4 temel amaç vardır. Bunlar; kimyasal ajanın hızla uzaklaştırılması, reepitelizasyonun sağlanması, keratositler aracılığıyla kollajen dokunun yeniden oluşturulmasını sağlayarak, matriksmetalloproteinaz enzimlerinin baskılanması ve yangının kontrolüdür.⁴

Tıbbi tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda cerrahi yöntemlere başvurulur (limbal kök hücre transplantasyonu, amniyon zar transplantasyonu, keratoplasti, tarsorafî vb.). Hücre proliferasyonu ve canlılığı korneada iyileşme cevabında önemli faktörlerdendir. Korneal yenilenme ekstrasellüler matriks proteinleri ve büyüme faktörlerini içeren bir dizi komponent içermektedir.⁵

Keratinosit büyüme faktörü-2 (KGF-2) korneal yara iyileşmesini düzenlemek üzere hasara cevap olarak stroma ve lakrimal glanddan salınmaktadır.^{6,7} Derideki epidermal onarımın kilit araçları olarak da tanımlanan çoklu büyüme faktörleri, EGF, dönüştürücü büyüme faktörü β ,

hepatosit büyüme faktörü ve keratinosit büyüme faktörü dahil olmak üzere epitel iyileşmesinde rol oynar.

Korneal skar gelişimi alkali yanık sonrası kalıcı körlükle sonuçlanan majör bir yan etkidir. Korneal yara iyileşmesi sürecinde, epitel hücreleri ve keratositler arasındaki etkileşimler skar oluşumuna aracılık eder. Bu nedenle, keratosit aktivasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesi stromal skar oluşumunun azaltılmasında çok önemlidir. Keratosit fenotipi skar benzeri doku oluşumunu önlemek için büyüme faktörleriyle düzenlenir. Bu anlamda rekombinant insan KGF-2 (RhKGF)'nin alkali yanık sonrası skar oluşumunun önlenmesinde ve yara iyileşmesini hızlandırmada etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir.⁸

Epitel rejenerasyonu ayrıca göz kırpma refleksini düzenleyen ve bu sayede kornea epitel hücrelerinin turnoverını düzenleyen kornea sinirleri ile desteklenir.⁹ Ayrıca, kornea sinirlerinin P maddesi, kalsitonin geni ile ilişkili peptid ve sinir büyüme faktörü gibi epitelotropik faktörler sağladığı gösterilmiştir.⁹ Örneğin; herpetik hastalık veya diyabetik polinöropati gibi sistemik hastalıklar nedeniyle kornea sinirlerinin dejenerasyonundan muzdarip hastalar (nörotrofik keratopati olarak adlandırılır), genellikle gecikmiş epitelyal yara iyileşmesi gösterir ve kalıcı ve potansiyel olarak görme tehlikesi taşıyan epitelyal yaralara maruz kalabilir.¹⁰ Nörotrofik ve immünmodülatör bir medyatör olan sinir büyüme faktörünün (NGF) duyuşal nöronların büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması ve yara iyileşmesinin hızlanması için sorumlu olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Rekombinant insan NGF (RhNGF) ile topikal tedavinin epitel iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir ve şu anda oküler yüzeydeki çeşitli hastalıkların tedavisi için, kuru göz hastalığı ve nörotrofik keratit gibi ve ayrıca korneal sinir rejenerasyonunun teşviki için klinik deneylerde bulunmaktadır.¹¹ NGF'nin yanı sıra birçok başka büyüme faktörü umut verici sonuçlar doğurdu.

Çalışmamızda KGF-2 ve NGF isimli iki büyüme faktörünü alkali yanık modeli oluşturduğumuz tavşan korneaları üzerinde kullanarak iyileşme sürecindeki etkileri gözlemlemek ve birbirleriyle karşılaştırarak tedavi sonrası klinik ve histopatolojik değişimleri ortaya koymayı hedefledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Gözün Anatomisi

Göz, gözküresi (bulbus oculi) ve bunun koruyucu kısımları olan göz kapakları (palpebra) ve gözyaşı bezlerinden oluşur. Bulbus okulinin duvarı dıştan içe doğru 3 katmandan meydana gelir.¹²

Bunlar;

1-Tunica externa bulbi (Tunika fibroza bulbi): Kornea-Sklera

2-Tunica media bulbi (Tunika vaskuloza bulbi): Uvea-Koroidea-Korpus silyare-İris

3-Tunica interna bulbi (Tunika nevroza bulbi): Retina¹³

2.2.Kornea Anatomisi

Kornea, göz küresinin ön kısmında yer alan, pupili, ön kamarayı ve irisi örten transparan kısmı olup tüm kürenin 1/6 sını oluşturmaktadır. Saydam ve avasküler yapıda olan kornea, enfeksiyonlara karşı gözü koruyan yapısal bir bariyer olarak görev alır.¹⁴

Horizontal uzunluğu 11-12 mm, vertikal uzunluğu 9-11mmdir. Kornea göze gelen ışıkışınlarının görme merkezine iletilmesini sağlamaktadır ve 43 diyoptrilik kırma gücüyle gözün optik gücünün ortalama olarak dörtte üçünden sorumludur.¹⁵

Santralden periferde doğru gidildikçe kornea kalınlığı kademeli olarak artar.¹⁶ Normal kalınlığı merkezde yaklaşık 540 mikrometre, periferde yaklaşık 650 mikrometredir(μm). İnsan korneasının sklerayla sınırını oluşturan yapı korneal limbustur.¹⁷

Sağlıklı kornea kan damarlarından yoksun olup, ön yüzde gözyaşı film tabakası, arka yüzde ise aköz hümeör sayesinde beslenmesini sağlayıp metabolik ürünleri uzaklaştırır.¹⁸

2.3.Korneanın Histolojik Yapısı

Kornea klasik olarak 5 tabakadan oluşur. En dıştan başlayarak sıralaması aşağıda belirtilmiştir.

1. Epitel tabakası
2. Bowman tabakası
3. Stroma tabakası
4. Descemetmembranı
5. Endotel tabakası

Bu tabakalara ek olarak Dua tarafından kornea stroması ile descementmembranı arasında 2013 yılında tanımlanan Dua tabakası mevcuttur.¹⁹

2.3.1.Epitel Tabakası

Kornea epiteli çok katlı yassı keratinleşmemiş epiteldir. Tüm kornea kalınlığının %10'unu oluşturur ve ilaçlara, yabancı cisimlere, mikroorganizmalara karşı bir bariyer görevi görür. Bazal kolumnar hücreleri, kanat hücreleri ve yüzeysel hücreler olmak üzere 3 tip epitel hücresi içerir. Yüzeysel hücrelerin yenilenme kapasitesi sayesinde epitel hasarı sonrası korneada skar oluşmaz.²⁰ Korneal kök hücreler korneal skleral limbusta yer alırlar ve bu hücrelerin hasarlanması korneada kronik epitelyal defektler ve konjonktivalizasyon (vaskülarizasyon, goblet hücre varlığı) ile sonuçlanabilir.¹⁸

Sonuç olarak, limbustaki kök hücreler sadece korneal epitelyal yenilenmede hücre kaynağı olarak görev almayıp, aynı zamanda gözün çeşitli bölümleriyle kornea arasında bir ayırım ve bariyer görevi görmektedir.⁹ Epitel bazal hücrelerinin altında epitelyal bazal membran bulunur.

2.3.2.Bowman Tabakası

Stromanın kollajen liflerinden oluşan, hücreden yoksun yüzeysel tabakasıdır. Hasara uğradığında yenilenme özelliği yoktur.

2.3.3.Stroma Tabakası

Yaklaşık 500 mcm kalınlığı ile kornea kalınlığının %90'ını oluşturmaktadır ve yenilenme yeteneği yoktur. Düzgün dizilim gösteren kollajen lifi tabakalarından ve onları üreten keratosit hücreleri olarak adlandırılan fibroblastlardan oluşur. Kollajenin düzgün bir sıra halinde dizilimi korneanın saydamlılığının sağlanmasında önem arz eder.

Kornea stromasının %78 oranında su içermesi saydamlılığın devamında önemlidir. Epitel tabakasının sağlam yapısı ve endotelyal pompa fonksiyonu korneal hidrasyonun kontrolünden sorumludur.

2.3.4.Descemet Membranı

Descemet membranı kornea endotelinin bazal membranıdır. Stromal kollajenden ayrı olarak kafes şeklinde dizilim gösteren ayrı bir kollajen tabakasından oluşur. Travma sonrası rejenerasyon olabilir.

2.3.5.Endotel Tabakası

Tek sıralı poligonal hücrelerden oluşana kornea saydamlığının korunmasında oldukça önemli bir tabaka olan endotel tabakası, stromadaki sıvıyı dışarı pompalayarak optik saydamlığı sağlar. Sağlıklı yetişkinlerde ortalama hücre sayısı 2500 hücre/milimetrekaredir. Tüm kornea katmanları içinde, endotel en düşük mitotik aktiviteye sahip olan katmandır. Küçük endotel rüptürlerini kapatmak için bitişikteki diğer endotelyal hücreler genişleyerek bölgeye göç ederler. Endotelyal hücrelerin hasarı onarılrken hücreler bariyer ve taşıma fonksiyonlarını yeniden kurar ve kornea saydamlığının onarımını sağlar.²¹ Hücre sayısı milimetrekarede 500'ün altına düşerse kornea ödemi gelişir ve saydamlık bozulur.

Stroma ve Descement membranı arasında Dua tabakası olarak 6. bir korneal tabaka tanımlanmış olsada kimi yazarlar bu tabakanın daha önce tarif edilen posterior stroma ile aynı tabaka olduğunu düşünmektedirler.

2.4.KORNEANIN İNERVASYONU

Kornea trigeminal sinirin birinci dalı ile beslenen subepitelyal ve daha derinde yer alan stromal sinir ağları ile vücuttaki en yoğun innervasyona sahip dokudur. Duyu sinirlerinden ve ağrı reseptörlerinden oldukça zengin olan korneanın bu reseptör zenginliği onu dış etmenlerden korumaktave hasar aldığı durumlarda refleks sulanma fotofobi ve belirgin ağrı gibi semptomlarla bireyi uyarmaktadır.

2.5.KORNEA FİZYOLOJİSİ

Korneanın en önemli özellikleri kırıcılığı, saydamlığı, dehidratasyonu ve ilaç geçirgenliğidir. Kornea saydam yapısıyla ışığın retinaya ulaşmasını sağlar. Korneanın saydamlığı, avasküler oluşundan, stromal glikozaminoglikan yapının ozmotik gücünün büyük rol aldığı, sabit tutulan su içeriği düzeyinden ve uniform yapıdaki, birbirlerine paralel ve düzgün dizilmiş stromal kollajen yapısından kaynaklanır. Endoteldeki aktif bikarbonat pompası, endotel ve epitelin bariyer fonksiyonu relatif dehidratasyona katkı sağlar. İntakt epitelden yağda eriyen moleküller geçebilirken, stromadan suda eriyebilenler geçer.

Saydam doğası ve korneanın tanımlanmış eğriliği, ışığın lens boyunca ve retinaya saçılmadan odaklanmasını ve iletilmesini sağlar. Bu nedenle, korneanın doku bütünlüğü net görüş için özellikle önemlidir. Fiziksel veya kimyasal travma veya ciddi enfeksiyonlar gibi göz yaralanmaları, opaklaşma ve görme keskinliği kaybına neden olan kalıcı kornea hasarına neden olabilir. Bu nedenle, yaralanma sonrası kornea bütünlüğünün hızlı bir şekilde restorasyonu, kalıcı görme kaybına veya

hatta gözün kendisinin bile kaybına neden olabilecek göz içi enflamasyonunun önlenmesi için anahtardır.⁹

3.KORNEAL KİMYASAL YARALANMALAR

Alkali veya asidik ajanlardan kaynaklanabilen kimyasal yaralanmalar oftalmolojik acillerden biridir.²² Kimyasal madde hızla kornea katmanlarına penetre olarak ağır görme kaybına sebebiyet verebilmektedir. Dolayısıyla oküler yüzeyin kimyasal yaralanmaları acil ve yoğun bir değerlendirme ve tedavi gerektirir. Temas eden kimyasal ajanın hızlıca tanımlanması, ağır görme kaybı potansiyeli oluşturan bu durum için mümkün olan en iyi sonucu sağlamada önem arz etmektedir.

3.1.Epidemiyoloji

Ev, iş yeri ve okul gibi çeşitli yerlerde meydana gelebilen oküler kimyasal hasar tüm oküler travmaların %11,5 ile %22,1 ini oluşturmaktadır.²³ Korneal alkali yanıklar çoğunlukla iş kazaları şeklinde görülmekte ve özellikle 20 ila 40 yaş arası çalışan genç erkek popülasyonu etkilemektedir. Oküler kimyasal yaralanmalar ile ilgili yapılan retrospektif bir çalışmada 1 yıl boyunca başvuran 171 oküler kimyasal yaralanma vakalarının %61'i iş yeri kazası, %37'si evde, geri kalanının ise bilinmeyen bir sebepten ötürü gerçekleştiği görülmüştür.²⁴

Alkali maddeler temizlik malzemelerinde ve inşaat malzemelerinde daha sık bulunmakta olup asit yaralanmalarından daha sık görülmektedir.²⁵

Alkali yanığına neden olan en sık kimyasal maddeler; genellikle amonyum hidroksit (NH₄OH), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), magnezyum hidroksit (MgOH₂) ve kalsiyum hidroksittir (CaOH₂) , kireç,çimento , amonyum, aerosoldur.

Amonyum hidroksit gübre üretiminde, ev emizlik solüsyonlarında, sodyum hidroksit (kostik soda) giderlerin ve boruların temizlenmesinde, endüstriyel temizleme solüsyonlarında, kalsiyum hidroksit kireç, sıva ve çimentoda bulunur.

Yaygın asidik ajanlar arasında sülfirikasid araba akülerinde ve hidroklorik asit yüzme havuzlarında kullanılmaktadır.

3.2.Patogenez

3.2.1.Asit Yanıkları ve Patogenez

Asitler normal insan gözünün pH değerinden (7.4) daha düşük pH değerlerine sahiptir. Temas ettikleri dokularda proteinleri denatüre edip çökeltirek hasara neden olurlar. Pıhtılaşmış proteinler, daha fazla penetrasyonu önlemek için bir bariyer görevi görür. Bu nedenle asit yanıkları alkali yanıklara göre daha az ciddi olma eğilimindedir.^{26,27} Bunun bir istisnası hızla hücre membranlarından geçebilen ve ön kamaraya girebilen hidroflorik asittir.²⁸

3.2.2.Alkali yanıklar ve Patogenez

Alkali yanıklar, pH değişikliği, ülserasyon, proteoliz ve kollajen sentezinde hasar oluşturarak kornea hasarına neden olur.

Oküler hasarın şiddetinde penetrasyon miktarı, temas hızı, alkali maddenin temas ettiği toplam yüzey alanı, ısı, konsantrasyon, ozmolaritesi, redoks potansiyeli, oküler dokularla spesifik reaktivitesi etkili rol oynar.²⁹

Alkali ajanlar lipofiliktir ve bu nedenle dokulara asitlerden daha hızlı nüfuz ederler. Artı yüklü bir katyon ve hidroksil gruplarının birleşiminden oluşan alkali maddeler hücre zarının yağ asitlerini sabunlaştırır, kornea stromasına nüfuz ederler ve proteoglikan maddeyi ve kollajen demetlerini yok ederler.³⁰

Pek çok alkali kimyasalda ortak olan hidroksil iyonları, korneanın kolajen matrisini denatüre eder ve daha fazla kimyasal penetrasyonu kolaylaştırır. Oluşan tablo likefaksiyon nekrozudur. Epitel hasarından sonra derin katmanlara penetre olan alkali maddenin katyon grubu, kollajen matriksin hasarından sonra stromadaki kollajen ve glikozaminoglikanların karboksil (COOH) gruplarıyla tepkimeye girer. Glikozaminoglikanlar hidrasyona uğrar ve bu durum stromada bulanıklığa yol açar.²⁵

Kollajen fibrillerin hidrasyonu, trabeküler ağları deforme eden kalınlaşma ve kısalma ile sonuçlanır. Trabeküluma ulaşan ajan skarlaşmaya neden olarak dışa akımı bozar ve iriste ve siliyer cisimde inflamasyona sebep olur. Hücre membranlarında oluşturduğu lizis ile prostaglandin salınımına yol açar. Prostaglandinler alkali yaralanmalardan sonra akut olarak görülebilen göz içi basıncının artışından sorumludur.^{31,32,33}

Ön üveadaki damarsal ve epitelyal dokularda hasar sonrası inflamatuvar nekroz oluşabilir ve bu durum sonrasında kalıcı anterior üveite sebebiyet verebilir.³⁴

Hasar görmüş dokular daha sonra proteolitik enzimler salgılar ve bu da daha fazla zarara yol açar. Alkali maddeler ön kamaraya nüfuz ederek katarakt, siliyer cisim ve trabeküler ağ hasarına neden olabilir.

Penetrasyon, ilk maruziyet gerçekleşikten çok sonra da devam edebilir.³⁵

Konjonktivaya olan direkt kimyasal hasar, skarlaşmaya, perilimbal iskemiye ve forniks kontraktürüne ve skatrisyel entropion ve ektropiona yol açan semblefaron oluşumu nedeniyle kapak malpozisyonuna neden olabilir. Goblet hücre kaybı ve konjonktival inflamasyon oküler yüzeyi kuruluğa eğilimli hale getirir.^{36,37}

Alkali hasarın goblet hücrelerinde kayıp oluşturmadığını söyleyen çalışmalarda mevcuttur. Limbal kök hücrelerde oluşan ciddi yanıklar limbal kök hücre eksikliğine neden olabilir, bu da korneal epitelyal progenitör hücrelerin kaybına bağlı olarak korneanın opaklaşmasına ve nihayetinde neovaskülarizasyonuna neden olabilir. Uzun dönemde göziçi basıncı (GİB) yükselmesi inflamatuvar materyalin trabeküler ağda birikmesinden ve trabeküler ağ hasarından kaynaklanabilir.^{36,37} Ön kamaraya penetrasyon, amonyak (NH₃) ile maruziyetten sonra çok hızlı (neredeyse hemen), sodyum hidroksit (NaOH) ile maruziyetten sonra 3-5 dakikada gerçekleşir.³⁴ Ortam pH'ı normal düzeye döndürülürse eğer aköz pH seviyeleri 30 dk-3 saat arasında normale döner.^{31,34} Aköz pH seviyesinin uzun süre 11.5 ve üzerinde seyretmesi kronik hipotoni ve fitizis bulbi ile sonuçlanabilir.³⁸

Siliyer cisim epitelindeki hasar askorbat sekresyonunun ve ön kamaradaki konsantrasyonunun azalmasına sebep olur. Bu durum korneal keratositlerin kollajen sentezini bozar ve stromanın yara iyileşmesinde aksaklığa sebep olur.³⁹

Kornea epitelini limbustaki epitelyal kök hücrelerinden elde edilir ve bu kök hücreler epitelyal yara iyileşmesinde önem arz ederler.²² Limbus, konjonktiva ve kornea epitelini arasındaki sınırı oluşturur. Goblet hücreleri ve kan damarları kornea yüzeyinden uzak tutulur. Limbal kök hücre kaybı olan bölgelerde bu sınır işlevi bozulur ve korneal yüzey epitelinin doğru farklılaşma derecesine sahip olmayan hücreler ile kaplanması, korneanın konjonktivalizasyonuna neden olur. Bu durum vaskülarizasyon, korneada goblet hücre varlığı, zayıf epitelyal bağlantılar ile tekrarlayan erozyonlar ve travmanın şiddetine göre inflamasyon ile sonuçlanır.⁴⁰

3.3.Klinik Süreç

McCulley'in oluşturduğu derecelendirme sistemine göre kimyasal yanık olayları acil faz, akut faz (0-7 gün), erken onarım fazı (7-21 gün) ve geç onarım fazı (21 gün sonrası) olmak üzere klinik ve patofizyolojik olarak dört ayrı dönem geçirmektedir.⁴¹

3.3.1.Acil Faz

Acil faz kimyasal ajanın oküler yüzeyle temas ettiği ilk andan itibaren başlar. Kimyasal yanığı takiben oluşan klinik bulgular etkilenme alanı, penetrasyon derinliği ve maddenin toksisitesine bağlı olarak değişmektedir. En yaygın semptomlar şiddetli ağrı, epifora, fotofobi, kemozis, blefarospazm ve azalmış görme keskinliğidir.⁴²

Prognozun ve oküler hasarın belirlenmesindeki ana unsurlar şunlardır:

- Korneadaki epitel defektinin toplam alanı
- Konjonktival epitel defektin büyüklüğü
- Limbal iskeminin oranı
- Korneadaki opasifikasyon alanının yoğunluğu
- Göz içi basıncını yüksekliği
- Lensin şeffaflığının kaybolması

3.3.2.Akut Faz

Kimyasal ajanla olan göz yaralanmasından sonraki ilk 7 gün, iyileşmenin akut evresini oluşturur. Kornea ve konjunktiva epiteli, goblet hücreleri, keratositler, trabeküler ağ, korpus siliare ve lens epiteli ciddi hasara uğrayabilir. Stromal rejenerasyonda önemli rol oynayan kornea epitelinin bu dönemde yeniden kurulması ve etkenden temizlenmesi önemlidir. Alkali travmadan sonraki ilk birkaç gün içinde epitelyum genellikle hasarın periferinden merkezine doğru onarılmaya başlanılır. Göz içi basıncı akut fazda bimodal yükselme eğilimi gösterir.³³

3.3.3.Erken Onarım Fazı

Kornea epitelinin onarımının ve stromal tamirin ve skarlaşmanın olduğu, kornea epiteli ile keratositlerin fonksiyonel ve yapısal olarak normal oküler yüzeyi sağlamaya çalıştığı, korneal yara iyileşmesinin olduğu geçiş dönemidir. Bu dönemde korneal ülser gelişebilmektedir. Stromalülserasyon ilk 7-10 günden sonra herhangi bir dönemde şekillenebilmektedir ve yenilenen kornea epiteli ve polimorfonükleer lökositlerden (PMNL) salınan kollajenaz, metalloproteinaz ve diğer proteazlar gibi sindirim enzimlerinin aktivitesi sonucu gelişir.

3.3.4.Geç Onarım Fazı

Kimyasal hasardan 3 hafta ve daha sonrasını tanımlar. Bu aşamada Grade 1 ve 2 yanıklar iyi bir görsel prognozla iyileşirken, grade 3 ve 4 yanıklar sınırlı görme keskinliği ile iyileşirler ve bu hastalarda komplikasyonlar şekillenir. Korneal kimyasal hasarın geç komplikasyonları arasında; azalmış görme keskinliği, korneal skar oluşumu, kseroftalmi, kuru göz, semblefaron, ankioblefaron, glokom, üveit, katarakt, lagoftalmi, ektropion, entropion, trikiazis vb. sayılabilir.³⁶

3.4.Kimyasal Yaralanmaların Sınıflandırılması

Kimyasal yaralanmanın hemen ardından, limbal kök hücre hasarının ciddiyetini (limbal, konjonktival ve skleral iskemi ve nekroz derecesini değerlendirerek) ve zararlı ajanın göz içi penetrasyonunu (korneanın netliğini ve ön segment anomaliliklerini değerlendirerek) tahmin etmek ve klinik olarak derecelendirmek önemlidir.²⁵

Korneal kimyasal yaralanmalarla ilgili sınıflama ilk kez 1964 yılında Ballen tarafından yapıldıktan 1 yıl sonra Roper-Hall korneal haze ve perilimbal iskemiye temel alarak bu sınıflamayı modifiye etmiştir (Tablo-1).^{43,44}

Dua ve arkadaşları saat kadranı olarak limbal tutulum ve bulbar konjonktivanın yüzdesel tutulumunu temel alan yeni bir sınıflama ileri sürmüşlerdir (Tablo-2).²²

Akut yanıkların randomize, kontrollü çalışmasında Dua sınıflaması, ağır yanıklarda sonucu tahmin etmede Roper-Hall sınıflamasına göre üstün bulunmuştur.⁴⁵

Tablo-1: Roper-Hall (Ballen) sınıflaması

Evre	Korneal Bulgular	Konjonktival Bulgular	Prognoz
Evre 1	Korneal epitelyal hasar	Limbal iskemi yok	İyi
Evre 2	Korneal haze İris detayları görünüyor	<1/3 limbal iskemi	İyi
Evre 3	Total epitelyal kayıp Stromal haze İris detayları görünmüyor	1/3-1/2 limbaliskemi	Sınırlı
Evre 4	Kornea opak İris ve pupil görünmüyor	>1/2 limbaliskemi	Kötü

Tablo-2: Oküler yüzey yanıklarının yeni sınıflandırması (Dua ve ark.)

Evre	Prognoz	Limbal Tutulum (Saat Kadranı)	Konjonktival Tutulum (%)	Analog Ölçek (%)
1	Çok iyi	0	0	0/0
2	İyi	≤3	<30	0.1-3/1-29.9
3	İyi	3-6	>30-50	3.1-6/31-50
4	Belirsiz	6-9	>50-75	6.1-9/51-75
5	Kötü	9-12	>75, <100	9.1-11.9/75.1-99.9
6	Çok kötü	12	100	12/100

3.5.Oküler Kimyasal Yanıklara Yaklaşım

Kimyasal yaralanmaların yönetimi, yaralanmaya sebep olan ajanın irrigasyon yoluyla oküler yapılara penetrasyonunu ortadan kaldırmayı ya da sınırlamayı ve tıbbi ve cerrahi müdahale yoluyla oküler yüzeyin iyileşmesini sağlamayı içerir.

3.5.1.Acil Tedavi

Alkali yaralanma sonrası tedavinin mümkün olan en erken sürede başlaması oküler bulguların nihai sonuçları açısından önem arz etmektedir. Temas eden kimyasal madde belirlenmeli, ancak bu tedaviyi geciktirmemelidir. Yapılacak olan ilk işlem kimyasal ajanın oküler yüzeyden uzaklaştırılması amacıyla oküler lavaj uygulamasıdır.^{46,47}

Su veya izotonik ile irrigasyon kimyasal yaralanmalarda olumlu prognoz ve sonuç açısından etkili yerleşik müdahale olmaya devam etmektedir.^{48,49,50}

Su neredeyse her yerde bol miktarda mevcut olması sebebiyle genellikle tavsiye edilen bir irrigasyon sıvısıdır ve seyreltici etkisi vardır ancak suyunkornealstroma ve göz içi ortamına göre hipotonik olma özelliği vardır. Su ile irrigasyon bu sebeple ortamda kalan partiküllerin kendisiyle beraber korneanın derin katmanlarına geçişini kolaylaştırabilmekte, kornea ödemi nedeniyle olabilmektedir. Bu amaçla daha yüksek ozmalaritedeki sıvıların kornea yüzeyine irrigasyon amaçlı kullanılması koroziv maddenin uzaklaştırılması ve kornea içine girişini önlemek açısından etkili olacaktır.

Normal izotonik solüsyonlar da ayrıca gözyaşı sıvısından daha düşük bir ozmalariteye sahiptirler ve kimyasal yaralanmalarda irrigasyon ajanı olarak suya nazaran daha az etkilidirler.^{48,51,52}

Dengeli tuz çözeltisi, ringer laktat gibi solüsyonlar normal saline göre daha efektifdirler çünkü aköz hümele aynı ozmalariteye sahiptirler.^{48,53} Dengeli salin solüsyonunun kornea ödemi önleyerek endoteli koruma etkisi vardır.⁵⁴

Diphoterine® hipertonic bir solüsyondur ve alkali ve asitlerin her ikisine de bağlanabilmektedir. Hipotonik ön kamaradan hipertonic korneanın yüzeyine su hareketi sağladığı için normal salin solüsyonundan daha iyi sonuçlara sahip olduğu gösterilmiştir.^{48,55,56}

Eğer bu sıvılara ulaşamazsa başka bir toksik ve kirli olmayan solüsyon örneğin karbonatlı içecekler tedavinin başlanmasına geç kalmamak için kullanılabilir.

Bazı acil yıkama solüsyonları fosfat tamponları içerir ancak bunların kullanımını stromal kalsifikasyon ile ilişkilendirilmiş olup ilk seçenek olarak önerilmemektedir. Ekzojen verilen fosfat, hasara uğramış hücrelerden açığa çıkan endojen kalsiyum ile kalsiyum-fosfat kompleksi oluşturabilmektedir.^{48,49}

Etkilenen göz en az 1.0-1.5 litre su veya izotonik ile 15 dakikadan az olmamak üzere yıkanmalıdır.⁵⁷

Yıkama işlemi , intravenöz (İV) damar seti ,irriga edici spekulum veya İV sete bağlı özel bir skleral kontak lens olan Morgan lens® kullanılarak da yapılabilir ancak bu durumda kimyasalın konjunktiva ile Morgan lens® arasında tutulumu gibi teorik bir risk vardır ve bu da yanığı şiddetlendirir. Eğer Morgan lens® kullanılıyorsa, salin uygulamaları arasında lensin değiştirilmesini önerilmektedir. Irrigasyon kimyasal etki olasılığı ortadan kalkana kadar devam edilmelidir. Ağrıyı azaltmak ve yıkamayı kolaylaştırmak için topikal anestezik damlalar kullanılabilir.

Irrigasyon sonrası indikatör kağıtlar ile pH değerinin 7.0-7.2 düzeyine dönüp dönmediği kontrol edilebilir. Eğer bu mümkün değilse pH'nın normale döndüğüne kanaat getirene kadar yıkamaya uzun süre devam edip fazladan tedavi uygulamak daha iyidir.

Partiküller bazen fornikte veya kapak altında hapsolür. Bu nedenle, kapak altına bakılması ve nemli bir pamuklu çubukla veya uygun bir forseps yardımıyla kalan partiküllerin alınması önemlidir.⁴⁸

Göz kimyasal ajandan arındırıldıktan sonra canlılığını kaybetmiş kornea ve konjunktivaepiteli cerrahi spanç veya dakron pamuklu çubuğu ile debride edilir.

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

Oftalmologlar dışındaki acil kimyasal yaralanmalara müdahale edecek kişilerin eğitilmesi iyi bir prognoz için çok önemlidir. Yaralanmanın hemen ardından yoğun irrigasyon ile ilk yardım uygulaması bu tür yaralanmalarda gözün klinik seyri ve prognozu üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir.⁵⁸

3.5.2.Akut Tedavi

Tedavi planı büyük oranda muayene bulgularına bağlıdır. Yeterli mekanik temizliği takiben medikal tedavide amaç inflamasyonu baskılamak, ülserasyonu minimuma indirmek ve intraoküler basıncı kontrol altında tutmaktır. Akut tedavinin ana hedefleri; re-epitelizasyonu sağlamak, enfeksiyondan korunmak, daha fazla epitel ve stroma hasarı oluşumunu önlemek ve sekeli minimuma indirmektir.

3.5.2.1.Re-epitelizasyonun Sağlanması ve ülserasyonun önlenmesi

Prezervan içermeyen suni gözyaşları ve jeller persistanepitelyopatinin iyileşmesinde, rekürren erozyonların önlenmesinde ve vizüel rehabilitasyonun hızlandırılmasında etkilidir.^{25,36} Fibronektin bağ dokusunun temel bileşenlerindedir. Epitelyal büyüme faktörü epitelyal ve keratosit proliferasyonunu sağlayan bir büyüme faktörüdür. Fibronektinin ve epidermal büyüme faktörünün hayvanlarda oluşturulan deneysel alkali yanık modellerinde epitelyal yara iyileşmesine katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.^{59,60,61,62}

Vitamin A (Retinoik asid) normal epitel büyümesi ve farklılaşması için gerekli olup retinoik asidin anormal terminal epitelyal farklılaşmayı önlediği, goblet hücrelerinde geri kazanımı sağladığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur.^{63,64}

Otolog serum çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve vitaminler açısından zengin bir kaynak olup epitelizasyonunu desteklemek ve limbal hasarı azaltmak için kullanılabilir.^{65,66,67}

Siliyer epitelyal transport sürecinde veya siliyer cisim vaskülatüründe alkali hasar oluşması sonrası korneada ve humor aközde kollajen sentezi için bir kofaktör olan askorbik asitin eksikliği meydana gelebilmekte vebu durum fibroblastların onarım için yeterli kollejen üretememesine ve nihayetinde korneal ülserasyon gelişimine sebebiyet verebilmektedir.⁶⁸ Vitamin C nin topikal ve ya oral olarak takviyesinin kollajen sentezini iyileştireceği düşünülmektedir.Kimyasal yanık sonrası askorbik asit topikal damla ve ya oral olarak kullanılabilir.

Tetrasiklin, çeşitli hayvan deneylerinde bakterisidal etkisinin yanında matriks metalloproteinaz inhibisyonu yaparak korneal stromada enzimatik proteolizi önlemede hem sistemik ve hem de topikal olarak uygulandığında etkili bulunmuştur.⁶⁹

N-asetil-sistein debir matriksmetalloproteinaz inhibitörü olup aynı zamanda yara alanına nötrofil göçünü inhibe eder.⁷⁰

Terapatik bandaj kontakt lensler kalıcı epitelyaldefekti olan hastaların tedavi sürecinde tercih edilebilir. Korneanın kurummasını önlemek ve göz kapaklarının sürtünerek korneaya zarar vermesini önlemek için etkili olan geniş çaplı, gaz geçirgen skleralkontakt lensler (Boston skleral lens) kullanılabilir.⁷¹

3.5.2.2.Antiinflamatuvar Tedavi

İnflamasyonun onarım mekanizmalarını harekete geçirmek için kaynak sağlama ve bu mekanizmaların kontrolsüz ilerlemesi sonucu olan hasarı dah da kötüleştirmek gibi 2 yönü vardır. Dolayısıyla bu iki taraf arasında olumlu yönde bir denge kurmak iyileşme sürecinde önemlidir. Topikal kortikosteroidler, kimyasal yaralanmalardan sonra akut inflamasyonun kontrolünde kritik bir rol oynamaktadır. Goblet hücre sayısındaki azalmayı önlemede, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltmada ve nötrofillerin sitoplazmik ve lizozomal zarlarını stabilize etmede etkilidirler.^{72,73} Ancak uzun süreli kortikosteroid kullanımı korneal ve skleral ülserlerle ve melting oluşumuna sebep vermekte ve bu sebeple alkali hasar sonrası kortikosteroid kullanımında genel kanı, kollajen sentezinin inhibisyonu, korneanın incilmesi ve perforasyon riskleri nedeniyle bu ilaçların 10-14 günden fazla kullanılmamalarıdır.^{74,75} Eğer epitel defekti kapanmışsa kortikosteroidler 7-10 günden fazla da kullanılabilir.³⁹

Sodyum sitrat, güçlü bir kollajenaz inhibitörü olmakla beraber lökosit göçünü engellemede etkilidir. Kimyasal yanıkların akut aşamasında topikal %10 sitrat uygulaması önerilmektedir.^{76,77,78}

Silier spazmı çözüp ağrıyı azaltmak, damar permeabilitesini ve inflamasyonu azaltmak amacıyla sikloplejik ajanlar kullanılabilir (atropin %1, skopolamin %0.25 günde 2 defa veya homatropin %5 günde 3 defa). Sikloplejik damlalar ayrıca iris-siliyer cisim spazmından kaynaklanan ağrının azaltılmasını da sağlarlar.¹

Adrenerjik ajanlardan vazokonstriksiyona neden olarak limbaliskemiye şiddetlendirebilmeleri sebebiyle kaçınılmalıdır.

3.5.2.3.Antimikrobiyal Tedavi

Steril bir ülserasyon tablosu oluşturan alkali yanık, açık kornea epiteli ve erimeye başlayan stromal yüzey nedeniyle sekonder enfeksiyon riski taşımaktadır. Eritromisin merhem gibi topikal antibiyotikler günde dört kez uygulamayla süperenfeksiyonu önlemek amacıyla kullanılabilir. Şiddetli yaralanmalarda topikal florokinolon gibi daha güçlü antibiyotikler kullanılır.

3.5.2.4.Yüksek GİB Tedavisi

Yüksek göz içi basıncının atlanma riski özellikle göz içi basıncını değerlendirmenin tek yönteminin palpasyon olduğu durumlarda akılda bulundurulmalıdır. Topikal ajanların yan etkilerinden kaçınabilmek amacıyla oral veya IV tedaviler tercih edilebilir (Mannitol %20 1-2g/kg 1-2 saat içinde IV, Asetazolamid 5-10mg/kg IV 6-8 saat arayla).

3.5.3 Kronik Tedavi

3.5.3.1.Sekelden Korunma

Göz yüzeyi, semblefaron oluşumu açısından her gün kontrol edilmelidir. Sembefaron oluşumunu etkin bir şekilde engellemek için fornikslere halka yerleştirilebilir.⁷⁹ Bunlar akut fazda semblefaron oluşumunu başarılı bir şekilde engellemelerine rağmen, skarlaşma ve yapışıklık oluşumuna neden olan kronik sikatrisyel değişiklikleri engelleyemezler. Amniotik membran veya oral mukoz membran grefti simblefaron onarımı ve forniks rekonstriksiyonu amacıyla yapılabilir.

Göz içi basıncı kontrolünde aynı prensipler çerçevesinde takip ve tedaviye devam edilmelidir. Kornea epiteli normal olarak iyileşiyorsa topikal antiglokmatöz de kullanılabilir.

3.5.3.2.Kuru Göz Tedavisi

Suni gözyaşlarının sık sık damlatılması, punktalokluzyon, kapak malpozisyonunun düzeltilmesi, oral mukus membran greftleri ve tükrük bezi transplantı tedavi seçenekleri arasındadır.⁸⁰

3.5.3.3.Kalıcı Epitelyum Defekti Tedavisi

Özellikle korneal duyarlılığın azaldığı durumlarda tekrarlayan ve enfeksiyona zemin oluşturan kalıcı epitelyum defektleri sorun teşkil edebilmektedir. Matrix rejenerasyon ajanı (RGTA), koenzimQ10 epitel iyileşmesini destekler.⁸¹

Limbal kök hücre yetersizliğinde limbal kök hücre nakli uygulanabilir. Anti mikrobiyal tedavi; kullanımına günde dört kez olarak yüzey epiteli iyileşinceye kadar devam edilmelidir

3.5.3.4.Korneal Skar ve Melting Yönetimi

Anterior stromal skarda anterior lamellar greft veya derin anterior lamellar keratoplasti uygulanabilir seçeneklerdir. Endotel disfonksiyonu veya incelme ya da delinmeyle giden santral nekrotik stroma varlığında penetran keratoplasti prosedürü seçilir.

4. SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ (NGF)

4.1. Yapısı

NGF ilk başta alfa, beta ve gama olmak üzere 3 proteinden oluşan 130-kDa luk bir protein kompleksidir. Bu formuna proNGF (NGF öncüsü) de denilmektedir. Fonksiyonel NGF, yani sinyal molekülleri olarak işlev gören hali 26-kDa boyutundaki beta alt birimidir ki sinir büyüme faktörü terimi genellikle bu formu için kullanılır.

4.2.Fonksiyonu

Nörotrofinler (NT) yetişkin bir sinir sisteminde sinaptik fonksiyonların kontrolü, plastisite, nöronal yaşam morfolojisi ve farklılaşmasını sürdürmek için gereklidir. Sinir büyüme faktörü, nörotrofin ailesinin önemli bir üyesidir ve hedef nöronların büyümesinde, korunmasında, proliferasyonunda ve hayatta kalmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir nöropeptittir. NGF yokluğunda nöronlarda apoptoz meydana gelir.⁸²

NGF; nöroblast çoğalması, dorsal kök gangliyonu olgunlaşması, akson büyümesi; periferel uyarıma karşı reaksiyon gösteren doku ile bu dokuyu uyaran sinirler arasında mesaj alıcı rolü olan trofik (büyüme) bir protein olarak tanımlanmıştır.⁸³

1950-1960 yılları arasında StanleyCohen ve R. Levi- Monthalcini isimli iki bilim insanı farenin submandibulartükrük bezini incelemiş ve buldukları bir faktörü saflaştırarak 44,000 dalton ağırlığında bir protein olduğunu belirtmişler ve Sinir Büyüme Faktörü olarak adlandırmışlardır.^{84,85} R. Levi-Monthalcini 13 Ekim 1986 yılında bu başarılı çalışması ile Nobel ödül konseyi tarafından ödüllendirilmiştir.⁸⁶

4.3. Etki Mekanizması

Tirozinkinazlar (Trk) transmembran proteinleridir ve nörotrofinler tarafından aktive edilmektedirler. İnsanda gebeliğin 15-16. haftalarında neokortekste, 23-28. haftalarında hipokampusta eksprese edilmekte olan NGF vücutta Trk-A reseptörüne bağlanarak etki eder.⁸⁷ NGF, beta4 integrin ve matriks metalloproteinaz-9 aracılığı ile kornea epitelyum iyileşmesini kolaylaştırır.⁸⁸

4.4. Klinik önemi

Oküler yüzey, gözyaşı filmi, kornea, konjonktiva, lakrimal bez ve bunlarla ilgili innervasyondan oluşan fonksiyonel bir birim olup bu yapılar sitokinler, büyüme faktörleri ve nöropeptitler dahil olmak üzere medyatörlerin salınması yoluyla, bütünlüğü sürdürmek ve gözü korumak için ortak bir amaç ile karşılıklı etkileşime girer.^{89,90,91}

Kornea insan vücudunda en yoğun şekilde innerve edilen dokudur ve otonom sinirler ve trigeminalsininrinoftalmikdalı tarafından innerve edilir. Kornea sinir lifleri, korneada yara iyileşmesini uyararak, anatomik bütünlüğü koruyan ve fizyolojik yenilenmeyi sağlayan, substance P, kalsitonin gen ilişkili peptit, asetilkolin, kolesistokinin, nöradrenalin, serotonin, nöropeptit Y, vazointestinalpeptit, vazopressin, nörotensin gibi çeşitli nöromedyatörler üretir.^{92,93} Kornea epiteli ve keratositler de sinir liflerinin yaşamasında, farklılaşmasında ve maturasyonunda etkili olan nörotrofin, nöropeptit ve içlerinde sinir büyüme faktöründe bulunduğu çeşitli büyüme faktörlerini serbest bırakırlar.^{91,94} Bu medyatörler normal korneal yara iyileşmesi için kornea epiteli ve korneal sinirler arasında etkileşim sağlayarak karşılıklı olarak nöromedyatör ve büyüme faktörü salınımı ile sitokin, nöropeptit ve nöromedyatör üretimi için birbirlerini aktive ederler.⁹⁴ Kornea epiteli sinir trofizmini ve iyileşmesini sağlamak için nörotrofik faktörler üretir ve salar ve korneal sinirlerde kornea epitelinin iyileşmesi için nöromedyatörler üretir.^{93,94} Bu denge kornea iyileşmesinde hayati önem taşır ve sinir hasarı durumunda nörotrofikkeratopati olarak bilinen korneal his kaybı ve sonucunda epitelyal hasar ve yara iyileşmesi ile sonuçlanan tabloya yol açar. Kornea sinir hasarının en yaygın nedenleri arasında kimyasal yanıklar bulunmaktadır.⁹⁵ Bu sebeple, korneal duyu sinir hasarı yapan her lokal ve sistemik durum bu etkileşimi hasara uğrattır ve kornea epitelinin yenilenme ve iyileşme hızını bozar.⁹⁴ Son yıllarda içlerinde sinir büyüme faktöründe bulunduğu birkaç büyüme faktörünün korneal yenilenme üzerine olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir. NGF nintopikal tedavi olarak

uygulanmasının trigeminal sinir fonksiyonunda kalıcı bir iyileşme sağlamak konusunda umut verici olduğu görülmüştür. NGF innerve dokular ve sinir hücreleri arasında mesaj alıcı rolü üstlenmektedir. NGF, nörotrofin ailesinin ilk tanımlanan ve en iyi bilinen üyesidir ve periferik ve santral sinir sisteminin, endokrin sistem, immün sistem ve görme sisteminin işlevlerinin düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol üstlenmektedir.⁹⁶

NGF'nin görevini yerine getirebilmesi için belirli bir konsantrasyona ulaşması gerekir. Eksojen kaynaklı NGF'nin yeterli konsantrasyona ulaştığında nöronların yaşamsal faaliyetlerini artırdığı nakledilmiştir. NGF sinirlere özel büyüme faktörü olarak belirtilmesine rağmen daha sonra yapılan çalışmalar sinir sistemi dışında da görevlerinin olduğunu göstermiştir.⁸³

NGF'nin 1950'lerdeki keşfinden bu yana NGF'nin kornea ve konjonktivanın iyileşmesinde, duyarlılığında ve trofizminde önemli bir faktör olduğunu gösteren klinik kanıtlar artmaktadır.^{89,97,98}

Bir çalışmada, diğer medikal tedavilere dirençli olan nörotrofikkeratitli 45 göz üzerinde 2 gün boyunca 200mcg/ml yükleme dozunda mNGF her iki saatte 1 uygulanmış ve ülser iyileşene kadar 6x1 pozolojiyle devam edilmiş ve ülser iyileşmesini izleyen 2 hafta boyunca 100 mcg/ml idame dozunda 4x1 pozolojide tedaviye devam edilmiştir. Epitel defekti, korneal duyarlılık, en iyi düzeltilmiş görme keskinliği, takip eden zamanda hastalığın nüks etmesi ve yan etki açısından incelenmişlerdir. 6 haftalık tedavi sonrası orta ve şiddetli nörotrofik keratitte NGF'nin kornea duyarlılığını geliştirdiği ve kornealepitelyal iyileşmeyi hızlandırdığı ve bu tedavinin oküler yüzey bütünlüğünde ve görsel fonksiyonun restorasyonunda umut vaat ettiğini göstermişlerdir.⁹⁹

Lambiase ve arkadaşlarının, nörotrofikkeratiti olan 12 hastanın 14 gözü üzerinde uygulanan mNGF göz damlasının 10 gün ile 6 hafta uygulama sonrasında %100 iyileşme sağladığını gösteren bir başka çalışmaları da mevcuttur.¹⁰⁰

Trigeminal yetmezliğe sekonder bilateral korneal anestezisi olup korneasında nörotrofik ülser gelişmiş olan bir çocuk hastaya çeşitli topikal medikal tedavi ve tarsorafî uygulanmış olup iyileşme kaydedilememesi üzerine başlanılan topikal NGF tedavisi sonucunda 1 hafta içerisinde epitelyal iyileşme sağlanmış olup olgunun uzun yıllar takibinde topikal NGF tedavisinin etkili ve güvenli bir terapi olduğu sonucuna varılmıştır.¹⁰¹

Orta-ağır derecede kuru göz hastalığına sahip 40 hastanın prospektif olarak incelendiği bir çalışmada, 1 grup 20 mcg/ml dozunda, diğer bir grup 4 mcg/ml dozunda olmak üzere her iki göze 2x1 pozolojide 28 gün boyunca rhNGF göz damlası damlatılmış ve rhNGF damlasının her iki dozunun da hastalarda semptomları ve oküler yüzey hasarını geriletmediği, her iki dozunda güvenli ve etkili olduğu ortaya konulmuştur. Yüksek dozda rhNGF uygulamasının gözyaşı film tabakası

stabilitesinde iyileştirici etkisinin (BUT) ve konjonktivalhasarı geriletici etkisinin daha fazla olduğu gösterilerek rhNGFninteröpatik etkisinin doza bağımlı olduğu ortaya konulmuştur.¹⁰²

Katarakt ameliyatı olan 30 hasta ameliyat sonrası 2 grub ayrılmış ve 1 gruptaki hastalara 20 mcg/ml dozunda topikal NGF solüsyonu 2 saatte 1 1 damla olarak 2 hafta boyunca uygulanmış ve sonraki hafta 4x1 pozolojiye düşülmüştür. 1., 7. ve 21. günlerde optik kohorens topografi cihazı ile cerrahi yara sahasının korneal kalınlığı ölçülmüş, endotel sayımı yapılmış ve stromadaki insizyon hattı değerlendirilmiştir. NGF tedavisi alan grupta, 21. Günde tam yara iyileşmesi olduğu OCT ile ortaya konulmuş ve stromal kesinin görünmediği belirtilmiştir. Çalışmada katarakt ameliyatı sonrası topikal NGF uygulanmasının korneal yara iyileşmesini hızlandırmada etkili olduğu sonucuna varmışlardır.¹⁰³

Diyabet modeli oluşturulan ve 3 gruba bölünen toplam 18 rat üzerinde yapılan bir başka çalışmadaçalışma grubundaki ratlara 21 gün boyunca 3x1 pozolojide NGF-beta uygulanmış. İnterlökin 1beta (IL-1 β), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve başka birçok faktör açısından incelenmiş ve NGF- beta'nın, diyabette ortaya çıkabilen kornea hücrelerinde apoptozu ve inflamasyonu azalttığı ortaya konulmuş ve diyabetik keratopatinin tedavisinde etkili olabileceği sonucuna varmışlardır.¹⁰⁴

Laser-Assisted in SituKeratomileusis (LASIK) tedavisi uygulanan 16 tavşana işlem sonrası topikal NGF ve kontrol grubu oluşturmak amaçlı dengeli tuz solüsyonu (BSS) damlatılmış ve kornea duyarlılıkları esteziometre kullanılarak her hafta 2 ölçüm yapıp ortalaması alınarak değerlendirilmiştir.Topikal NGF uygulamasının LASIK tedavisi sonrası kornea duyarlılığının iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır.¹⁰⁵

Yine benzer bir çalışmada LASIK uygulanan 12 tavşan 2 gruba bölünmüş ve bir gruba 100 mcg/ml fareNGF (mNGF), diğer gruba dengeli tuz solüsyonu 8 hafta boyunca 2x1 pozolojide uygulanmış. Korneal sinir liflerini görüntülemek için konfokal mikroskopunun kullanıldığı çalışmada sonuçlar göstermiş ki, LASIK sonrası kornealflep alanındaki sinir lifi yoğunluğu normal tavşanlarıkiyle kıyaslanınca önemli ölçüde azalmış bulunmuştur. mNGF'nin LASIK sonrası subbazal sinir pleksusu ve yüzeysel stroma üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.¹⁰⁶

Tavşanlarda uygulanan fotorefraktif keratektomi (PRK) modelinde doksaheksaenoik asit (DHA) ile sinir büyüme faktörünü kombinasyon halinde uygulamanın kornea sinir rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada 21 tavşan DHA, NGF ve DHA+NGF gruplarında 6 şar, kontrol grubunda 3 tavşan olmak üzere 4 gruba ayrılır ve 8 hafta sonunda ortaya çıkan sonuçta PRK sonrası NGF+DHA kullanan grupta diğer gruplara kıyasla artmış korneal sinir yüzey alanı ve artmış

epitelproliferasyonu izlenmiş olup NGF ile tedavi edilen grupta rosebengal ile boyanmanın azaldığı, kombine grupta ise hiç boyanma olmadığı gösterilmiştir.¹⁰

Oxervate markası altında satılan ve rekombinant insan sinir büyüme faktörü (rhNGF) olarak da bilinen Cenegermin, insan sinir büyüme faktörünün (NGF) rekombinant bir şeklidir. Temmuz 2017'de, Avrupa Birliği'nde yetişkinlerde orta veya şiddetli nörotrofikkeratit tedavisi için bir göz damlası formülasyonu olarak onaylandı.^{95,107,108} 20 mcg/ml NGF dozunda 6x1 pozolojide kullanılmak üzere prezervansız olarak üretilmiştir.

5.KERATİNOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ-2 (KGF-2)

5.1.Yapısı

Keratosit büyüme faktörü, 1989 yılında Rubin ve arkadaşları tarafından insan embriyonik fibroblast hücre hattının uygun ortamından saflaştırılıp izole edilmiştir. Akciğerden izole edilen bir cDNA'nın 208 aminoasitlik moleküler kütlesi 23.4 kD olan İnsan KGF-2 faktörü olarak adlandırılacak olan bir proteini kodladığı görülmüştür.

Isıya dayanıksız ve asit özellikteki KGF tek bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır.^{109,110} KGF için tamamlayıcı DNA dizilerinin analizi onu fibroblast büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olarak belirler ve FGF10, "keratinosit büyüme faktörü 2" olarak da bilinir.¹¹¹ Keratinosit büyüme faktörü (KGF) ailesi, KGF-1 (FGF-7) ve KGF-2 (FGF-10) olmak üzere FGF ailesinin 2 üyesini içerir.^{112,113}

5.2. Fonksiyonu

Fibroblast büyüme faktörü en az 19 üyeden oluşan ve hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında, embriyolojik gelişimde, anjiyogenez ve yara iyileşmesinde çeşitli aktivitelerden sorumlu bir faktör ailesi olup, FGF -10 bu ailenin yeni bir üyesidir ve biyolojik aktivitesi açıklanmaya devam etmektedir. KGF-2 (FGF-10) tirozin kinaz keratinosit büyüme faktörü reseptörüne yüksek afinite gösterir ve insan keratinosit hücrelerine potent bir mitojen olarak aktivite gösterir.¹¹⁴

5.3. Etki Mekanizması

Rekombinant İnsan Keratinosit Büyüme Faktörü-2 / FGF-10, FGF2 IIIb ve FGFR1III-b reseptörlerine bağlanan, epitelyal hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen ve korneal yara iyileşmesini artırabilen heparin bağlayıcı bir proteindir.

Keratinosit büyüme faktörü-2 yaralanmaya cevap olarak stroma ve lakrimal bezden salınır ve korneal yara iyileşmesini düzenler.¹¹⁵

İnsan keratinosit büyüme faktörü-2, epitel hücreleri üzerinde proliferatif bir etki yapar ve keratinosit göçüne aracılık eder.¹¹⁶

5.4. Klinik Önemi

Korneada karbondioksit lazer hasarı oluşturulan tavşan modelinde 25 mcg/ml dozunda topikal uygulanan KGf-2 nin yara iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiş ve kontrol grubuna kıyasla KGF-2 uygulanan grupta inflamasyonun, stromal ödemin ve fibrozisin azaldığı ve korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.¹¹⁵

Hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve keratinosit büyüme faktörünün (KGF) kornea epitelinde ve stromada yara iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmak için kornealkeratosit hücre kültürüne ve hasarlı kornea organ kültürüne HGF ve KGF ile 5 güne kadar tedavi uygulanmış kültürler proliferasyon, migrasyon, miyofibroblasta farklılaşma ve hasar sonrası reepitelizasyon açısından incelenmiş. Sonuç olarak KGF'nin reepitelizasyonu hızlandırdığı, keratositproliferasyonunu arttırdığı, miyofibroblasta dönüşümü indüklemediği ortaya konulmuştur.¹¹⁷

İnsan kornea epitelyal hücre kültüründe ekzojen olarak uygulanan KGF dahil pek çok büyüme faktörünün epitelyal hücre proliferasyonu, motilitesi ve farklılaşması üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada KGF nin insan kornea epitel hücre proliferasyonunu hücre yoğunluğundan bağımsız olarak uyardığı, motiliteyi önemli ölçüde etkilemediği ve hücre farklılaşması üzerine etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.¹¹⁸

Başka bir çalışmada, 16 adet tavşanın kornealarında 10 mm çapında epitelyum defekti oluşturulmuş ve gruplardan birine 10 mcg/ml dozunda KGF 5x1 pozolojide uygulanırken, kontrol grubu olarak belirlenen kornealara fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi uygulanmış ve korneal epitelyum defekti her 12 saatte 1 fotoğraflanarak incelenmiş ve S-fazı hücrelerinin dağılımı gruplar arasında karşılaştırılmış. KGF uygulanan grupta epitelyum iyileşmesinin kontrol grubuna göre daha hızlı

olduğu ve yenilenen korneada S fazındaki hücre sayısının kontrol grubuna göre 2 kat daha yüksek olduğu ortaya konulmuş.¹¹⁹

Ratlarda tam kalınlıktaki kesi yarasında KGF-2'nin in vivo olarak yara iyileşme potansiyelini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada KGF-2 nin yara iyileşmesinde gücü bir uyarıcı olduğu sonucuna varılmıştır.¹²⁰

1999 yılında Xia ve meslektaşlarının yaptığı bir çalışmada tavşan kulağında iskemik ülser modeli oluşturulmuş ve KGF-2 kullanımının iskemik yaraları iyileştirdiği sonucuna varmışlardır.¹²¹

KGF-2'nin venözstaz ülserleri, kısmi kalınlıkta yanık yaraları ve deri greftleri gibi çeşitli yara tiplerinde özellikle epitelizasyon yoluyla yara iyileşmesini hızlandırdığını ortaya koymuşlardır.¹²²

24 adet tavşan KGF-2 (1, 50, 100 microg/ml) ve PBS solüsyonuyla tedavi edilen olmak üzere 4 gruba ayrılmış ve alkali yanık modeli oluşturulduktan sonra korneal epitelyum defektleri 24 saatte 1 fotoğraflanmış ve 7., 14. ve 21. gün olmak üzere her gruptan 2'şer adet tavşan ışık mikroskopunda inceleme açısından sakrifiye edilmiş. KGF-2'nin her 3 dozda da topikal uygulamasının kontrol grubuna göre epitelyal iyileşmeyi daha olumlu etkilediği ortaya konulmuştur.¹²³

Ratlar üzerinde yapılan bir alkali yanık modelinde 50 mcg/ml dozunda 3x1 pozolojide topikal KGF-2 göz damlası, topikal FGF göz damlası ve kontrol olmak üzere 3 grup oluşturulmuş ve 2 hafta boyunca incelenmiştir. KGF-2'nin kornea hasarını iyileştirmede yeni bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiş ve bFGF ye göre reepitelizasyonda, migrasyonda ve skar oluşumunun azaltılmasında daha iyi etkiler sergilediği ortaya konulmuştur.¹²⁴

6.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneklere alkali yanık modeli uygulanması, NGF tedavisi, KGF tedavisi, sakrifikasyon ve alınan korneal dokuların hazırlanması işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler, görüntüleme işlemleri ve immünohistokimyasal boyama işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

6.1. Denekler

Çalışmamızda toplam 24 adet, sağlıklı Avustralya-Yeni Zelanda Irkı (1500-2000 gr) albino tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanları, Bursa Aykut Bolu Deney Hayvanları Merkezi'nden

(ABDEHAM) temin edilerek, DETAB’da kendileri için özel üretilmiş olan tavşan kafeslerinde, tek ya da ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, ısısı ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması flöresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00-18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

6.2. Model Oluşturulması

Denekler DETAB’da 20 günlük karantina sürelerinin ardından hepsi sağlıklı olarak çalışmaya başlandı. İlk gün tüm deneklere 1.1 ml KetamineHydrochloride (Ketarlar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.4 ml XylazineHCl’in (Alfazyne %2,5 mg/kg) intraperitoneal (İP) uygulanması ile genel anestezi sağlanarak alkali yanık modeli oluşturuldu. Model sonrası her grupta 8 denek olacak şekilde denekler 3 gruba ayrıldı.

1N (1 Normal) NaOH ve 8 mm çaplı daire şeklinde Watman filtre kağıtları kullanıldı. Filtre kağıtları 60 sn boyunca 1N NaOH içerisinde bekletildi, ardından bu filtre kağıtları ProparacainHydrochloride (Alcaine %0.5; Alcon) ile topikal anestezi uygulanarak, kapak spekulumu takılan deneklerin sağ santral kornealarına uygulandı ve 60 sn beklendi.¹²⁵ Sonrasında alkali ajan hemen uzaklaştırılarak 2 dakika boyunca 500 cc %0.9 Sodyum klorür (NaCl) ile oküler yüzey yıkandı ve nekroze olan dokular uzaklaştırıldı.

6.3. Çalışma Dizaynı

İlk gün model oluşturulmasının ardından gruplar belirlenmeden tüm deneklerin ön segment kornea fotoğrafları (software version 3.13.1; TOPCON Slit Lamp Microscopy 703963 Tokyo, Japan) ve ön segment optik koherans tomografileri (software versiyon 6.0.11.0; Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany) çekilmiştir. Optik koherans tomografi kesitlerinden mikrometrik olarak yanık büyüklükleri ölçülmüş ve gruplar homojen olarak her grupta 8 er denek bulunacak şekilde oluşturulmuştur. Çalışmaya alınan tüm deneklerin yanık dereceleri RoperHall sınıflamasına göre 4. derece (total epiteldefekti ve pupilla ve iris görünümünü engelleyen opak kornea) olduğu gösterilmiştir.⁴⁴

Tüm gruplara medikal tedavi aynı şekilde uygulanmıştır. Medikal tedavi olarak enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla yanık oluşumundan itibaren deney sonlanıncaya kadar moksifloksasin %0,5 (Moxai®) topikal olarak günde 3 kez; akut dönemdeki şiddetli inflamasyonu baskılamak amacıyla rutin tedavide yeri olan güçlü bir steroidtopikal preparatı olan prednizolon (Pred-forte®) ilk 10 gün günde 3 kez olarak uygulanmış ve kesilmiştir.

Gruplar aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

GRUP: Sağlam (Hiçbir müdahalede bulunulmamış sağlıklı denek kornealarından oluşur.)

GRUP: Kontrol grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp, 14 gün sadece rutin medikal tedavi verilen grup.)

GRUP: KGF-2 grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp, rutin medikal tedavi yanında 1. Gün KGF-2 tedavisi başlanan ve 14 gün 3x1 pozolojide uygulanan grup.)

GRUP: NGF grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp, rutin medikal tedavi yanında 1. Gün NGF tedavisi başlanan ve 14 gün 3x1 pozolojide uygulanan grup.)

6.4. Muayene Dizaynı ve Deneyin Sonlandırılması

Her muayene öncesi deneklere genel anestezi uygulanmıştır. 1.1 ml KetamineHydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.4 ml XylazineHCl'in (Alfazyne %2,5 mg/kg) intraperitonel (İP) uygulanması ile genel anestezi sağlanarak önsegment fotoğrafları ve optik koherens tomografileri (OCT) tekrar alınmıştır. (KGF-2 ve NGF grubundan 2'şer adet denek uygulanan anestezi sonrası öldü.)

Muayeneler model oluşturulmasının ardından ilk gün: 1. vizit, 7. gün: 2. vizit ve 14. gün: 3. vizit olarak gerçekleştirilmiştir. Muayene sırasında floressein gibi uygulanan ajanların uzaklaşmasına fırsat vermek için son muayeneler sonrasında sakrifikasyon öncesi deneklerin korneleri 500 cc %0,9 NaCl ile yıkanmıştır.

OCT'de her vizit sırasında santral korneal kalınlık ölçülmüştür. Ön segment fotoğrafları opasite muayenesinde, vaskülarizasyon takibinde ve floresein boyalı mavi ışık altındaki fotoğraflar ise epitel hasarı tamiri seyrinin izlenmesinde kullanılmıştır. Vaskülarizasyon, opasite ve epitel defekti büyüklükleri alınan fotoğraflarla AdobePhotoshop programı ile belirlenmiş ve değerlendirilen parametrelerin tüm kornea dokusuna oranları şeklinde bu program ile hesaplanmıştır.

14. gün sakrifikasyon günü olarak belirlenmiş ve denekler 0,4ml XylazineHydrochloride (Alfazyne%2,5 mg/kg) + 3,0ml KetamineHydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ardından eter ile sakrifiye edilip kornealar limbus sınırından kornea makasıyla alınmıştır. Limbus hizasından skleradan ayrılan korneal doku örnekleri nötral tamponlanmış formaline konularak fikse edilip histoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

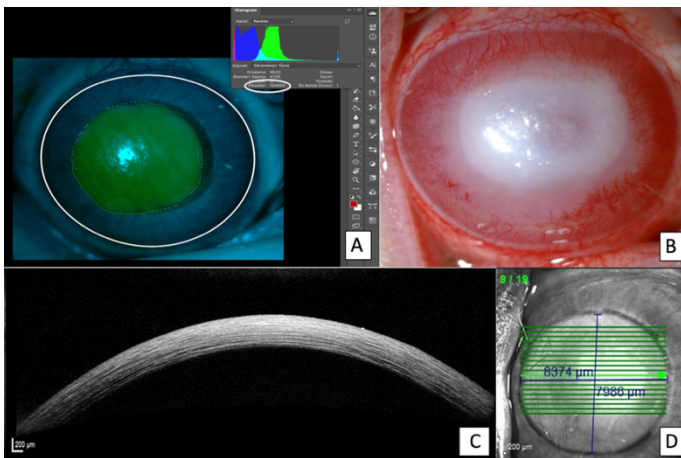
6.5.KGF-2 ve NGF damla uygulaması

Rekombinant sinir büyüme faktörü (RhNGF; ABclonal Biotechnology®, Massachusetts, United States) konsantirasyonu 20 mcg/ml olacak şekilde, rekombinant insan keratinosit büyüme faktörü-2 (RhKGF2; ABclonal Biotechnology®, Massachusetts, United States) konsantirasyonu 50 mcg/ml olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı ve 4 derece sıcaklıkta tutuldu.

KGF-2 ve NGF damla gruplarındaki deneklere alkali yanık modeli uygulanmasının ve muayenenin ardından 24. Saatte ilk KGF-2 ve NGF damla uygulaması yapıldı. Her iki çalışma ilacı 14 gün boyunca günde 3 sefer olarak uygulandı. Yıkama etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, çalışma ilaçlarının uygulamasının diğer topikal tedavilerle arasında uygun süre olmasına dikkat edilmiştir.

7.KLİNİK BULGULAR

Alkali yanık modeli oluşturulmasının ardından deneklerin klinik muayeneleri 0. gün (model oluşturulduktan sonra, tedavi öncesi) 7. gün ve 14. gün olmak üzere 3 vizitte yapıldı. Her vizitte deneklerin ön segment fotoğrafı çekildi, floresein boyama ile kobalt mavisi ışıkta epitel defektleri değerlendirildi ve ön segment OCT'leri çekildi (Figür 1). Ön segment fotoğraflarında deneklerin korneal opasitesi, vaskülarizasyonu ve epitel defektleri değerlendirildi. Bu değerlendirmede veriler, AdobePhotoshop CC programı ile opasite/vaskülarizasyon/epitel defekti alanlarının işaretlenerek piksel olarak hesaplanmasının ardından tüm kornealarının işaretlenip piksel olarak hesaplanarak birbirine bölünmesiyle yüzdesel olarak elde edildi (Fig.1A). Deneklerin ön segment OCT'leri Heidelberg Spectralis Domain OCT cihazı ile çekildi. Ön segment OCT'lerinde santral kornea kalınlığı (SKK) değerlendirildi (Fig. 1C).



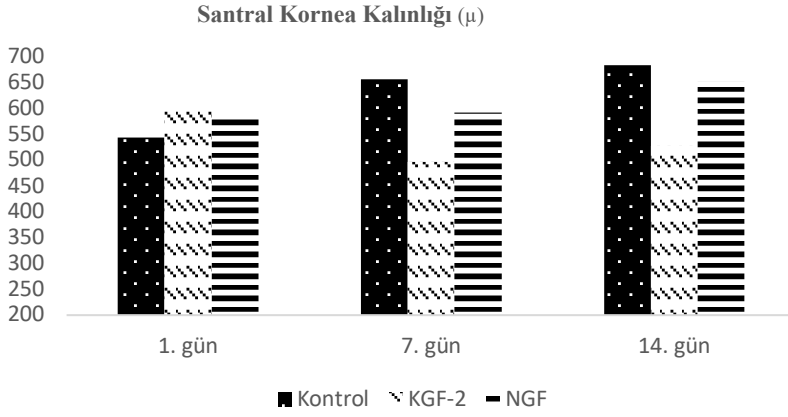
FİĞÜR 1. A. Epitel defektinin hesaplanması, epitel defekti alanının tüm kornea alanına oranı ile hesaplanmıştır. Sağ üstte beyaz işaretli alan epitel defektinin alanını piksel cinsinden vermektedir. **B.** Korneal vaskülarizasyonun yarıklı lamba mikroskobu yardımıyla fotoğraflanması. **C.** Ön segment optik kohorens görüntüleri CCT ve ortalama yanık boyutunun **(D)** değerlendirilmesi için kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenler ortalama±standart sapma, normal dağılım göstermeyen değişkenler medyan (25.-75. persentil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA) ile, normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey, Dunnett ve Dunn testleri kullanıldı. Değişkenler içindeki zamana bağlı değişimler normal dağılım varsayımı sağlandığında eşleştirilmiş t testi ve tekrarlı ölçümler tek yönlü ANOVA (Repeated Measures ANOVA), normal dağılım varsayımı sağlanmadığında Wilcoxon işaretli sıralar testi ve Friedman iki yönlü varyans analizi ile incelendi. İki yönlü hipotezlerin testinde $p < 0.05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.

İlk gün tüm grupların ortalama yara büyüklüklerinin (horizontal ve vertikal uzunluklarının ortalaması) ve korneal kalınlıklarının arasında fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p > 0,05$). Normalde ortalama 350 mikron olan sağlam tavşan korneasının alkali yanık sonrası ortalama santral korneal kalınlığı $574,3 \pm 52$ mikron (μ) olarak bulunmuştur. Ortalama yara büyüklükleri $8,1 \pm 0,37$ milimetre (mm) olarak tespit edilmiştir. Grupların yara büyüklükleri ve santral korneal kalınlıklarının başlangıç ölçümleri Tablo-3’de gösterilmiştir.

Tablo-3: Model sonrası ortalama yara büyüklüğü ve santral kornea kalınlığı ölçümleri

	Ortalama yara büyüklüğü (mm)	Santral korneal kalınlık (μ)
KGF-2	$8,15 \pm 0,65$	$595,67 \pm 73$
NGF	$8,0 \pm 0,15$	$585,83 \pm 39$
KONTROL	$8,25 \pm 0,43$	$543,5 \pm 45$
P değeri	0,605	0,18



Grafik 2: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 1., 7. ve 14. gün santral kornea kalınlık ölçümleri

Tekrarlanan ölçümlerde grupların SKK değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir değişim saptanmadı ($P=0.18$, $P=0.157$ ve $P=0.288$) (Tablo 4). Bununla birlikte grupların 2. ve 3. hafta ortalama ölçümlerine bakıldığında kontrol grubunun SKK ortalamasının diğer gruplardan fazla olduğu ($656,50 \pm 127$ ve $684,38, \pm 120$), en düşük SKK ortalamasının ise KGF-2 grubunda ($497,17 \pm 177$ ve $528,50 \pm 224$) olduğu görüldü (Tablo-4). Kontrol ve NGF gruplarının SKK değerleri 2. ve 3. vizitlerde zamanla artış gösterirken, KGF-2 grubunda ilk vizite göre 2. ve 3. vizitte SKK değerinde azalma olduğu görüldü (Grafik1). Grupların OCT ile SKK ölçüm örnekleri figür-1’de gösterilmiştir. Her bir grubun tekrarlayan vizitlerde santral korneal kalınlıkları incelendiğinde; tüm grupların vizitler arasındaki SKK ortalama değerlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo-5).

Tablo-4: 1.,2. ve 3. vizit SKK ölçümleri (μ)

	1.Vizit	2.Vizit	3.Vizit
KGF-2	595,67 ± 73	497,17 ± 177	528,50 ± 224
NGF	585,83 ± 39	591,83 ± 131	652,00 ± 203
KONTROL	543,50 ± 45	656,50 ± 127	684,38 ± 120
P Değeri	0,18	0,157	0,288

Tablo-5: Grupiçi 1.,2. ve 3. vizit SKK ölçümlerinin karşılaştırılması (μ)

Grup	Vizit	Vizit	P değeri
Kontrol	1	2	0,157
		3	0,075
	2	3	1,000
NGF	1	2	1,000
		3	1,000
	2	3	0,677
KGF	1	2	0,209
		3	1,000
	2	3	1,000

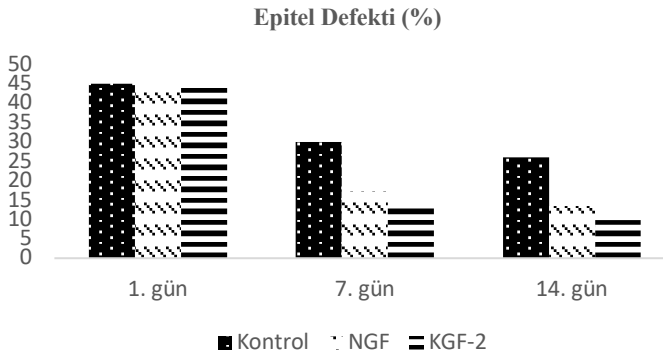
Her bir grubun tekrarlayan vizitlerde santral korneal kalınlıkları incelendiğinde; tüm grupların vizitler arasındaki SKK ortalama değerlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Epitelyal iyileşme floresein boyanma sonrası kobalt mavisi ışıkla yapılan biyomikroskopik muayene görüntülerinin AdobePhotoshop programıyla defektin, tüm kornea çapına oranı olarak değerlendirildi (Fig.1A). Epitel defekti büyüklük yüzdeleri açısından gruplar arasında ilk vizitte istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gösterildi ($P=0.662$) (Tablo-6). Takiplerde grupiçi karşılaştırmada her 3 grupta da ilk vizite göre 2. ve 3. vizitte istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu (KGF-2; $P=<0,001$, NGF; $P<0,001$, Kontrol; $P=0,002$). Yapılan tüm vizitlerde KGF ve NGF arasında anlamlı bir fark olmazken, her iki grubun kontrol grubu ile arasında hem 2. hem de 3. vizitte istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü. (Tablo-7, Grafik-1). Bu farkın sebebi kontrol grubunun tedavi gruplarına göre epitelyal yara iyileşmesinin daha az olmasıydı.

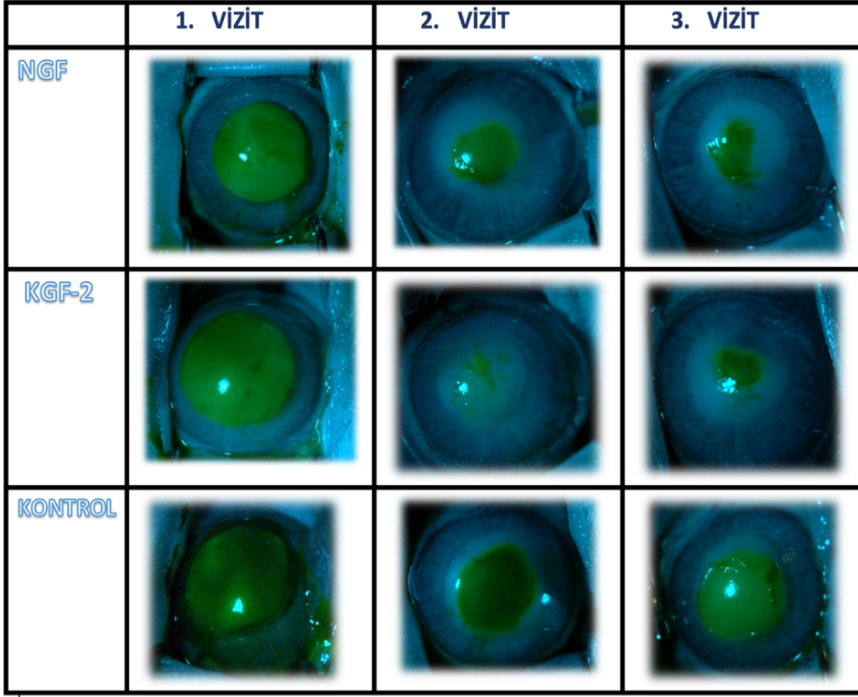
Tablo-6: 1., 2., ve 3. vizit epitel defekti ölçümleri (%)

EPİTEL DEFEKTİ	1.vizit	2.vizit	3.vizit
Kontrol	%45± 2,2	%30± 9,2	%26± 9,8
NGF	%43,5 ± 1,1	%17,3± 3,3	%13,5± 6,2
KGF-2	%44,6 ± 3,2	%13,4± 8,6	%9,9± 6,8
P Değeri	0,662	0,003	0,004

Alkali yanık sonrası alınan ilk ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok iken, takiplerde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu. Bu farkı oluşturan kontrol grubunun tedavi gruplarına göre epitelial yara iyileşmesinin daha az olmasıydı.



Grafik 3: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 1., 7. ve 14. gün epitel defekt büyüklüğü ölçümleri (%)



Figür2: KGF-2, NGF ve kontrol gruplarında sırayla 1., 2., 3. vizit epitel defekti büyüklüğünün ön segment fotoğraflarıyla takibi

Tablo-7: Gruplar arası 2. ve 3. vizit epitel defekti ölçümlerinin karşılaştırılması

EPİTEL DEFEKTİ	Grup	Grup	P değeri
2.vizit	KGF	NGF	0,663
		Kontrol	<u>0,002</u>
	NGF	Kontrol	<u>0,018</u>
3.vizit	KGF	NGF	0,718
		Kontrol	<u>0,003</u>
	NGF	Kontrol	<u>0,019</u>

İkinci ve üçüncü vizitte gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilen farkın sebebi kontrol grubunun hem NGF grubuyla hem de KGF-2 grubuna göre daha az iyileşme göstermesiydi. NGF ve KGF-2 arasında ise her 3 vizitte de epitel defekti büyüklük yüzdeleri arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo-8: Grupların kendi içinde 1., 2. ve 3. ziyaret epitel defekti ölçümlerinin karşılaştırılması

Grup	Vizit	Vizit	P değeri
NGF	1	2	<u><0,001</u>
		3	<u><0,001</u>
	2	3	0,483
KGF	1	2	<u><0,001</u>
		3	<u><0,001</u>
	2	3	0,924

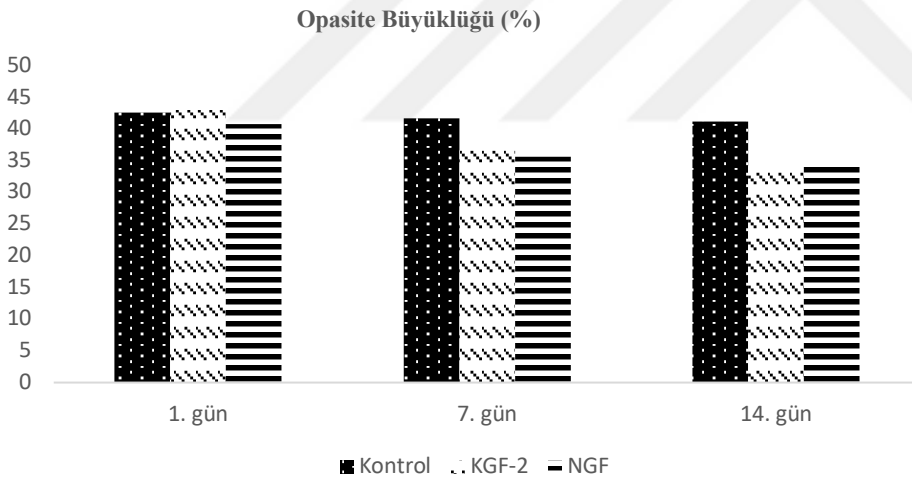
KGF-2 ve NGF nin epitel defekti alan yüzdeleri açısından ziyaretler arasında kendi içlerindeki karşılaştırmalarda 2. ve 3. ziyarette 1. ziyete oranla anlamlı azalma mevcutken, 2. ve 3. ziyaretler arasında her iki grupta da defekt büyüklüğü yüzdesinde azalma olsada bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Tablo 9: Kontrol grubu, grupıçi 1., 2. ve 3. ziyaret epitel defekti ölçümlerinin karşılaştırılması

Vizit	P Değeri
VİZİTLER ARASI	<u>0,002</u>
2.VİZİT-1.VİZİT	<u>0,003</u>
3.VİZİT-1.VİZİT	<u>0,018</u>
3.VİZİT-2.VİZİT	1,000

Kontrol grubunun epitel defekt büyüklüğü açısından ziyaretler arasında kendi içlerindeki karşılaştırmalarda 2. ve 3. ziyarette 1. ziyete oranla anlamlı azalma mevcutken, 2. ve 3. ziyaretler arasında defekt büyüklüğü yüzdesinde azalma olsada bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Opasite değerlendirmesi yine AdobePhotoshop programı ile opasite alanının ölçülerek tüm kornea alanına bölünmesiyle yüzdeler olarak hesaplandı. Korneal opasite büyüklüklerinin değerlendirmesinde gruplar arasında yanık modeli oluşturulduktan sonraki ilk vizitte istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı gösterildi ($P=0,220$), (Tablo10). 2. ve 3. vizitte opasite büyüklüğü yüzdelerindeki azalmada tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($P=0,02$, $P=0,019$). Bu farkı 2. vizitte, NGF grubunun kontrol grubuna göre ($P=0,02$), 3. vizitte ise hem KGF-2 hem de NGF grubunun kontrol grubuna göre ($P=0,031$, $P=0,028$) opasite büyüklüğündeki iyileşmenin daha fazla olmasından kaynaklandığı görüldü. KGF-2 ve NGF grupları arasında tekrarlayan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P>0,05$). Grupları karşılaştırmada kontrol grubunun opasite büyüklüğünün tekrarlayan ölçümlerde azaldığı ancak ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. NGF grubunda 3. ve 1. vizit arasında anlamlı bir azalma varken ($P=0,006$), KGF-2 grubunda hem 2. hem de 3. vizitte 1. vizite göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü ($P=0,003$, $P=0,015$).



Grafik 4: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 1., 7. ve 14. gün opasite büyüklüğü ölçümleri (%)

Tablo-10: 1.,2. ve 3. ziyaret korneal opasite ölçümleri (%)

OPASİTE	1.vizit	2.vizit	3.vizit
Kontrol	%42,6± 2,3	%41,7 ± 2,8	%41,2± 3,2
NGF	%40,8±0,6	%35,6± 3,8	%34,1±3,1
KGF	%43± 3	%36,6±5,2	%34,2±7,4
P Değeri	0,220	0,020	0,019

Opasite büyüklüğü karşılaştırmasında gruplar arasında ilk ziyarette anlamlı fark yok iken, hem ikinci hem de üçüncü ziyarette istatistiksel açıdan anlamlı fark olduğu görüldü.

Tablo-11: Gruplar arası 2. ve 3. ziyaret opasite ölçümlerinin karşılaştırılması

OPASİTE BÜYÜKLÜĞÜ	Grup	Grup	P değeri
2.vizit	KGF	NGF	0,904
		Kontrol	0,052
	NGF	Kontrol	<u>0,020</u>
3.vizit	KGF	NGF	0,998
		Kontrol	<u>0,031</u>
	NGF	Kontrol	<u>0,028</u>

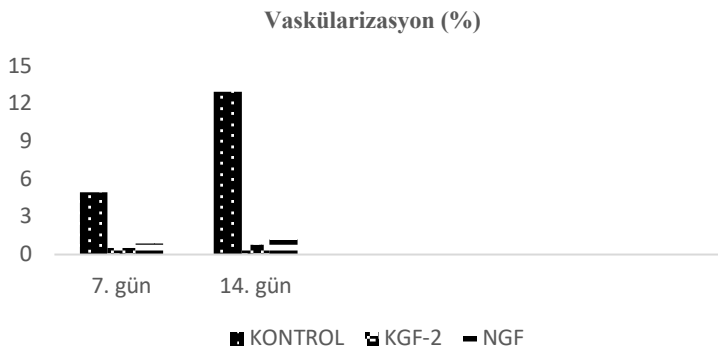
NGF grubunun kontrol grubuna göre daha fazla iyileşmesi 2. ziyarette gruplar arasında oluşan istatistiksel anlamlı farkın sebebini oluştururken, 3. ziyarette bu farkın sebebi hem NGF grubunun hem de KGF-2 grubunun kontrol grubuna göre daha fazla iyileşmesiydi. Opasite büyüklüğü yüzdesi açısından KGF-2 ve NGF grupları arasında tüm ziyaretlerde istatistiksel anlamlı bir fark mevcut değildi.

Tablo 12: Grupların kendi içinde 1., 2. ve 3. vizit eopasite büyüklüğü ölçümlerinin karşılaştırılması

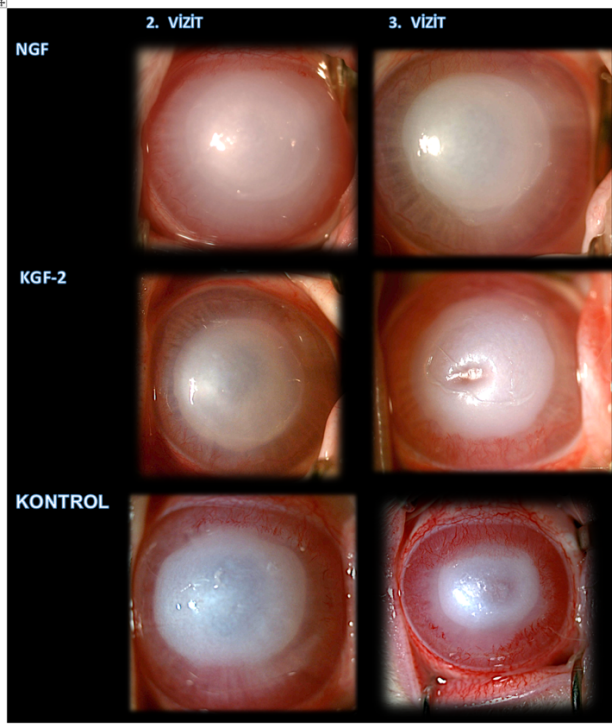
Grup	Vizit	Vizit	P değeri
Kontrol	1	2	0,124
		3	0,075
	2	3	0,485
NGF	1	2	0,051
		3	<u>0,006</u>
	2	3	0,170
KGF	1	2	<u>0,003</u>
		3	<u>0,015</u>
	2	3	0,404

Tekrarlayan ölçümler de opasite büyüklük yüzdesinde grup içi karşılaştırmalara bakıldığında kontrol grubunda opasite büyüklüğündeki azalma vizitler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmazken, NGF grubunda 1. ve 3. vizitler arasında, KGF-2 grubunda ise hem 2., hem de 3. vizitlerle ilk vizit arasında anlamlı azalma olduğu görüldü.

Vaskülarizasyon büyüklüğü de opasite ve epitelyal hasar gibi ön segment fotoğraflarının AdobePhotoshop programıyla total korneaya oranlanması şeklinde hesaplandı. 2. vizitte gruplar arasında anlamlı bir fark yokken (P=0,147), 3. vizitte vaskülarizasyon açısından aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark mevcuttu (P=0,011) (Tablo 13). Bu farkı oluşturan sebep kontrol grubunun NGF grubundan daha fazla vaskülarize olmasıydı (P=0,017) (Tablo 14).



Grafik 5: Kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubunun 7. ve 14. gün vaskülarite büyüklüğü ölçümleri (%)



Figür 3: KGF-2 grubu, NGF grubu ve kontrol gruplarında sırasıyla 2., ve 3. vizitlerde vaskülarizasyonun ön segment fotoğraflarıyla takibi

Tablo-13: 2. ve 3.vizit vaskülarizasyon büyüklüğü ölçümleri (%)

Vaskülarizasyon	2.vizit	3.vizit
Kontrol	%5 (2,5-7,5)	%13(5,3-42,4)
NGF	%0,9(0,01-2,8)	%1,4 (0,02-4,1)
KGF	%0,5 (0,02-8)	%0,8 (0,04-9,9)
P Değeri	0,147	<u>0,011</u>

Korneal vaskülarizasyon değerlendirmesinde 3. vizitte gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu.



Tablo 14: 3. vizit sonunda gruplararası vaskülarizasyon büyüklüğü karşılaştırması

Vaskülarizasyon-3. VİZİT	P DEĞERİ
NGF-Kontrol	<u>0,017</u>
KGF-Kontrol	0,07
KGF-NGF	1

3. vizitteki istatistiksel anlamlı farkı oluşturan sebep, NGF grubunun kontrol grubuna göre daha az vaskülarize olmasıydı.

8. HİSTOLOJİK BULGULAR

8.1. Materyal-Metod

Sakrifiye edilen tavşanların kornea dokuları %10'luk nötral tamponlanmış formalin solüsyonu içerisine alınarak fikse edildi. Ardından yükselen dereceli etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24'er saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dakika süreyle tutuldu ve toluen içinde 15 dakika süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56°C'deki etüvde 1:1 oranında toluen-parafin karışımında 30 dk bekletilen örnekler ardından saf sıvı paraffin içerisine alındı ve 1,5 saat inkübe edildi. Bloklanan korneal dokulardan 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Morfolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması yapıldı.

8.1.1. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyaması

Deparafinize edilen kesitler, azalan alkol serisinden (100°, 96°, 90°, 70°) geçirildi ve saf suya alındı. Ardından Mayer Hematoksilen'de 5 dakika bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyanın giderilmesi için iki kere saf sudan geçirilen kesitler mavileştirme solüsyonunda 10-15 saniye bekletildi ve tekrar saf suya alındı. Daha sonra %100 etanolden hızlıca geçirilen kesitler sitoplazmik boyanma için Eozin Y solüsyonunda 2-3 dk tutuldu ve hızlıca %100 etanole alındı. 3 kez %100 etanol serisinden geçen kesitler toluende ikişer kez 15'er dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Tüm preparatlar Leica DM 1000 model ışık mikroskopunda değerlendirildi fotoğrafları çekildi.

8.1.2. Masson Trichrome (MT) Boyaması

Distile suya indirgenen kesitler eşit hacimde Weigert A ve Weigert B karışımından oluşan solüsyonun içerisinde 5 dk inkübe edildikten sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır. Distile sudan geçirilen kesitler asit fuksin solüsyonunda 15 dk bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Ardından kesitler fosfotungustik asit ile 15 dk diferensiyel edilmiş ve yıkama işlemi olmadan 5-10 dk süreyle Anilin blue solüsyonuna alınmıştır. Distile su ile yıkamanın ardından, asetik asit solüsyonunda 3 dk bekletilen kesitler hızlıca iki kez %96 alkolden ve ardından %100 alkolden geçirilerek toluen içerisine alınmıştır. Son olarak Entellan ile kapama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kollajen liflerin organizasyonu, vaskülarizasyon, inflamasyon ve ödem morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

8.1.3. TGF-β , MMP-2 ve MMP-9 İmmünohistokimyasal Boyaması

Parafin bloklardan polilizinli lamalar üzerine alınan 4 µm'lik kesitlerin 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve toluende 3'er kez 5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Ardından, sırasıyla 2x5 dk 100° alkolden, 1x5 dk 96° alkolden, 1x5 dk 90° alkolden, 1x5 dk 70° alkolden ve son olarak 2x5 dk distile su içinde bekletildi. Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)-Tx solüsyonu içerisinde 5 dakika bekletilen kesitler antijen retrieval işlemi için sitrik asit solüsyonuna alınarak mikrodalgada 10 dk kaynatıldı ve soğuması için 20 dk bekletildi. Hidrofobik bir havuz oluşturmak amacıyla Pap-pen ile çevrelenen kesitlere endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için H₂O₂ solüsyonu (ab64264, Abcam))

damlatılarak 10 dk bekletildi. Ardından PBS'de yıkanan kesitlere, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere protein blok solüsyonu (ab64264, Abcam) 10 dk süre ile uygulandı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere ayrı ayrı MMP-2 (ab2462, Abcam, 1:200 dilüsyon oranı), TGF- β (ab190503, Abcam, 1:200) ve MMP-9 (ab58803), primer antikorları damlatıldı ve +4°C'de 1 gece/overnight bekletildi. PBS ile yıkanan doku kesitleri biyotinli goat antipolyvalent solüsyonu (ab64264, Abcam) ile 10 dakika inkübe edildikten sonra tekrar PBS ile yıkandı ve streptavidin peroksidaz solüsyonu (ab64264, Abcam) kesitler üzerine eklendi. 10 dakikalık inkübasyonun ardından PBS 'ten geçirilen kesitlere diaminobenzidin (DAB) adı verilen kromojen damlatıldı ve MMP-2, TGF- β ve MMP-9 ekspresyonunun olduğu bölgeler kahverengi renkte gözlemlendi. Mayer hematoksilen (ab128990, Abcam) ile zıt boyama yapılan dokular dehidrasyon işleminin ardından (artan alkol serilerinden geçirilerek) toluen içerisine alındı ve Entellan (Merck) ile lamel yardımıyla kapatıldı. MMP-2, TGF- β ve MMP-9 ekspresyonu semikantitatif olarak skorlandı.¹²⁷ Buna göre;

Tablo 15: İmmünboyama skorlaması

İndeks	İmmünboyama
0-0.5	Boyanma azlığı : <%10
1	Mikroskobik alanın %10-%25 i
2	%25-%50
3	>%50
4	>%75
5	>%95

8.2 Bulgular

8.2.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trichrome Boyaması

H&E boyalı kesitlerin morfolojik değerlendirmesinde epitelyal hasar, korneal hemoraji ve ödem parametreleri skorlanmıştır. Bu skorlamaya göre; Epitelyal kayıp (0 = yok, 1 = minimal splitting, 2 = hafif erozyon, 3 = orta erozyon, ve 4 = güçlü erozyon).¹²⁸ Korneal hemoroji : 0 = yok, 1 = subepitelyal, 2 = subepitelyal ve ön stromal doku, 3 = subepitelyal ve kısmi stromal doku, ve 4 = toplam stromal doku olarak sınıflandırılmıştır.¹²⁹ Stromal ödem, 1 = yok, 2 = orta derecede ödem, and 3 = şiddetli ödem olarak sınıflandırılmıştır.¹³⁰

Alkali yanık modeli uygulanmamış olan sağlam denek kornealarına ait H&E ve MT boyanmış korneal doku kesitleri incelendiğinde; korneal epitel (anterior epitel, çok katlı yassı epitel) ve endotelin (posterior epitel) sağlam ve devamlılık gösterdiği, avasküler sağlıklı bir stromaya sahip oldukları ve ödemin görülmediği tespit edilmiştir (Figür 4-5-12).

Alkali yanık modeli uygulanmış olup çalışma ilacı kullanılmayan kontrol grubu değerlendirildiğinde ise; korneal epitelin büyük hasar aldığı (Figür 6-13), şiddetli ödemle birlikte korneanın düzgün yapısının kaybolduğu ve kalınlaşarak ondüleli/dalgalı bir yapı kazandığı (Figür 7A-14), re-epitelizasyonun gerçekleştiği bölgelerde yer yer hiperplazik epitel hücrelerine rastlandığı (Figür 7B), stromanın vaskülarizasyonu ile birlikte lökositik infiltrasyonun ve hemorajinin arttığı (Figür 8-15), stromal ödemin şiddetli olduğu (Figür 4-5) ve bu ödeme bağlı olarak kollajen lifler arasındaki bağların zayıflayarak

ayrışmaların oluştuğu (Figür 13B), fibroblast morfoloji ve dağılımının bozulduğu (Figür7B-15D) gözlemlenmiştir.

KGF grubunda kontrol grubuna göre daha iyi bir korneal morfoloji gözlemlenmiştir. Epitelyal onarımın arttığı, ödemin azaldığı, ancak bir miktar vaskülarizasyonun subepitelyal olarak devam ettiği görülmüştür (Figür 9-16)

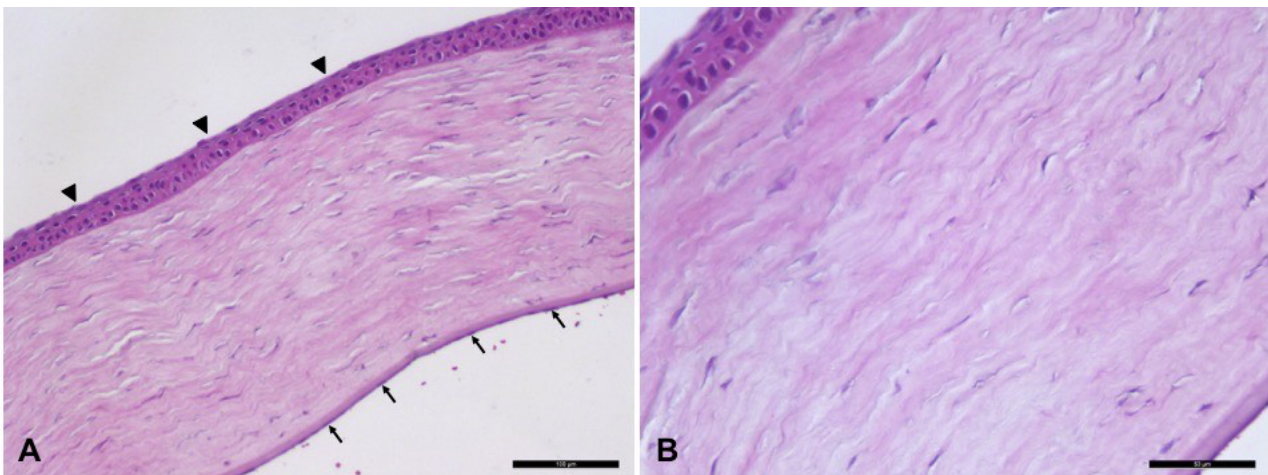
NGF grubunda da KGF grubuna benzer olarak tüm parametrelerde iyileşme gözlemlenmiştir. Epitelizasyon sağlıklı kornea ile benzer seviyeye gelmiş, ödem hiç yok denecek kadar az görülmüştür. Vaskülarizasyonun oldukça azalmasıyla birlikte hem hemoraji hem de lökositik infiltrasyon ortadan kalkmıştır (Figür10-17).

Epitel kaybı skorlamasında sağlam grup, KGF-2 ve NGF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Kontrol grubunda, sağlıklı kornea grubuna göre epitel kaybı skorlamasında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0.001$). NGF grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ile epitelial kaybın NGF grubunda daha az olduğu görüldü ($p=0.01$) (Tablo16,17).

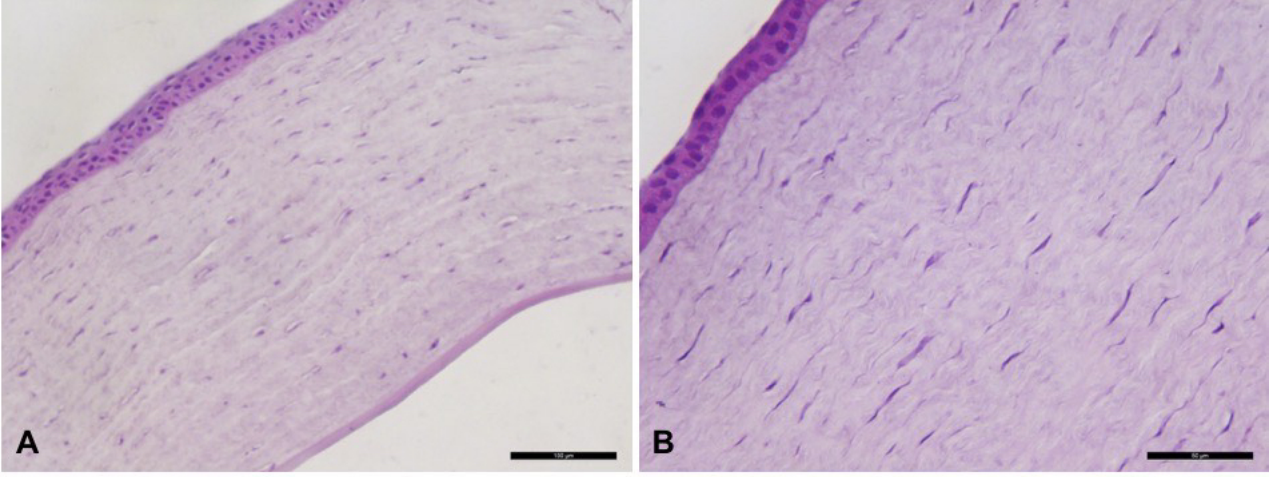
Stromal ödem skorlamasında sağlam grup, KGF-2 ve NGF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p<0,05$) (Tablo 18).

Korneal hemoroji skorlamasında sağlam grup, KGF-2 ve NGF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Kontrol grubunda, sağlıklı kornea grubuna göre korneal hemoroji skorlamasında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0.001$). NGF grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ile korneal hemorojinin NGF grubunda daha az olduğu görüldü ($p=0.03$) (Tablo 19).

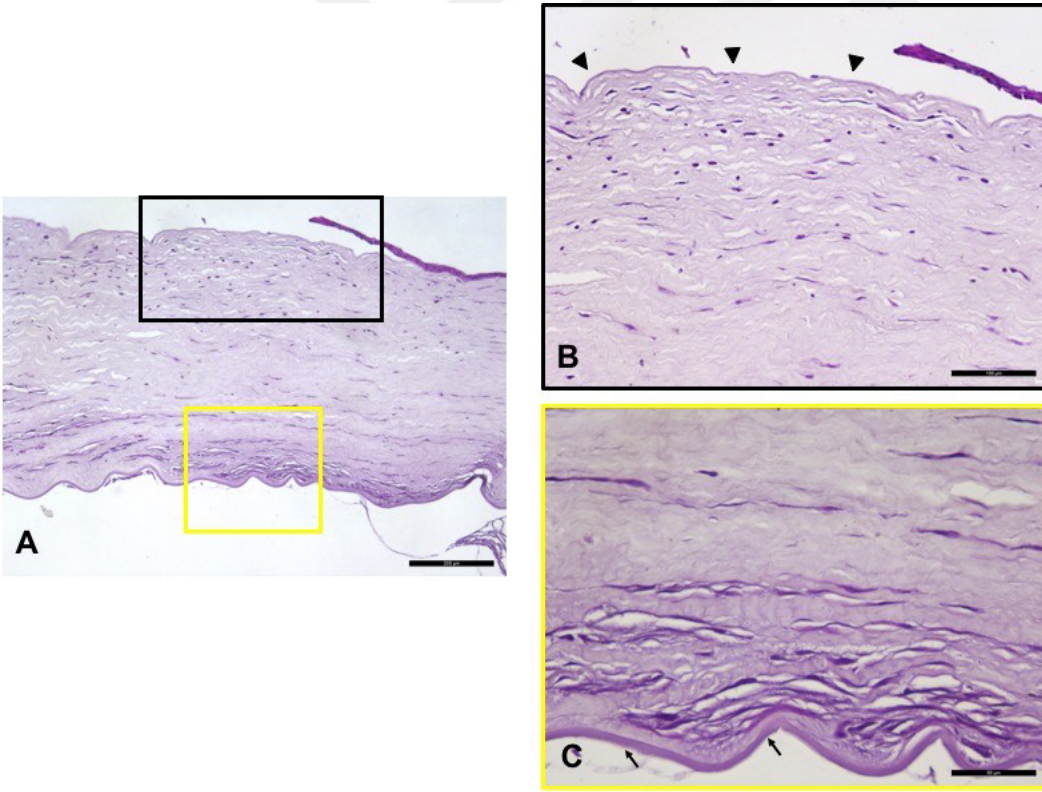
Lökositik infiltrasyon skorlamasında sağlam grup, KGF-2 ve NGF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p<0,05$) (Tablo 20).



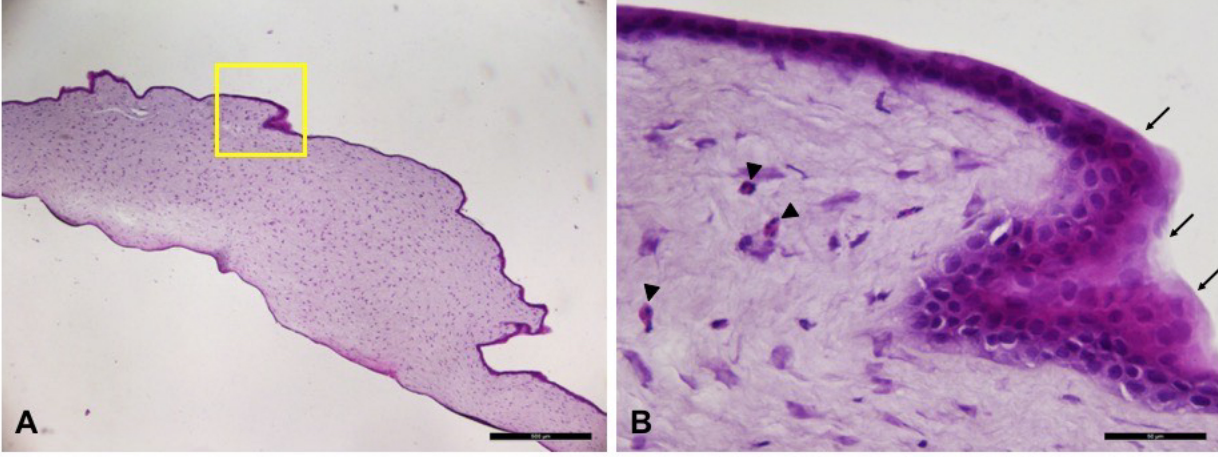
Figür 4. Alkali yanık modeli oluşturulmamış gruba ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Figür 1A'da korneal epitel (siyah okbaşı) ve endotel (siyah ok) bütünlük ve devamlılık göstermektedir. Korneal stroma da avasküler sağlıklı bir morfoloji göstermektedir. H&E, A,200X; B,400X magnifikasyon.



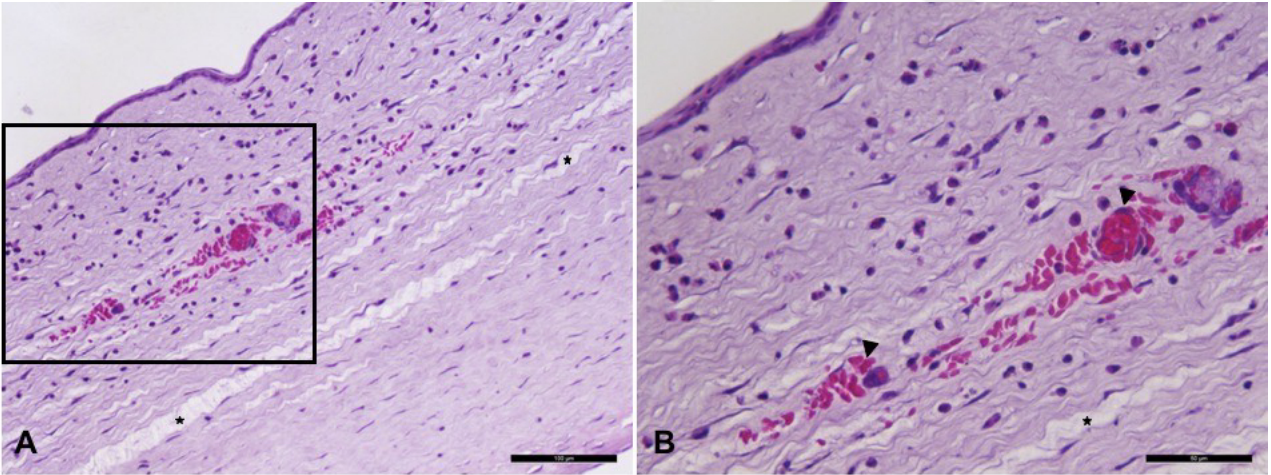
Figür 5. Alkali yanık modeli oluşturulmamış gruba ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon.



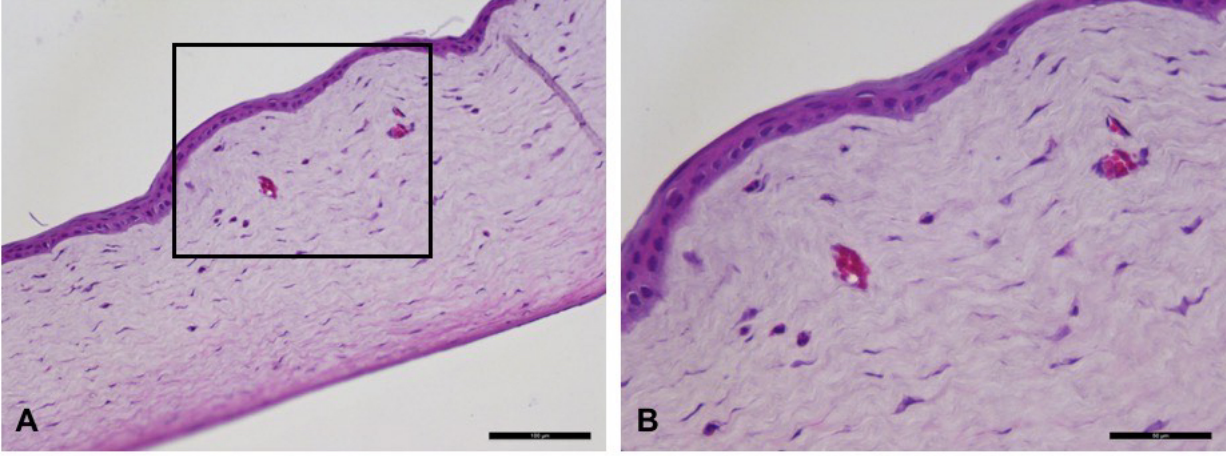
Figür 6. Kontrol grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Figür3A'da siyah ve sarı çerçeve içerisine alınmış olan bölgeler sırasıyla Figür 3B ve Figür 3C'de daha büyük magnifikasyonda gösterilmiştir. Korneal epitelin devamlılık göstermediği (siyah okbaşı), endotelin döküldüğü (siyah ok) ve stromal ödemin varlığı dikkat çekmektedir. İnflamatuvar hücreler de stromaya yayılmış bir şekilde görülmektedir. H&E, A-100X ve B-200X ve C-400X magnifikasyon.



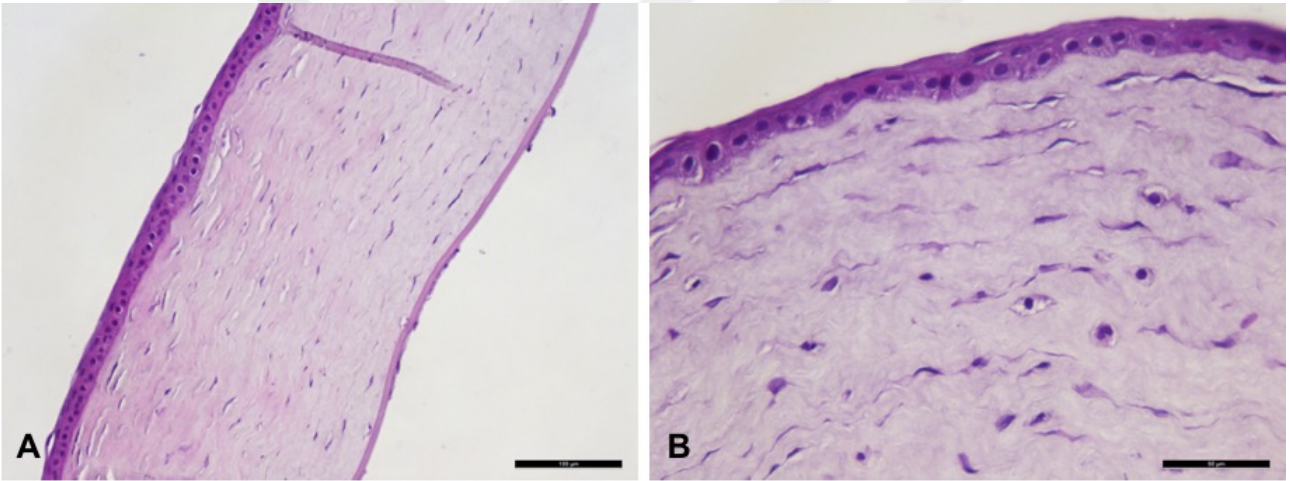
Figür 7. Kontrol grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Figür4A’da sarı çerçeve içerisine alınmış alan Figür 4B’de daha büyük magnifikasyonda gösterilmiştir. Figür4A’da korneal dokunun genel morfolojisinin bozulduğu görülmektedir. Figür4B’de re-epitelizasyonun gerçekleştiği bölgelerde hiperplazik epitel hücreleri (siyah ok) dikkat çekmektedir. Stromada inflamatuvar hücreler (siyah okbaşı) ve düzensiz organize olmuş fibroblastlar görülmektedir. H&E, A-40X ve B-400X magnifikasyon.



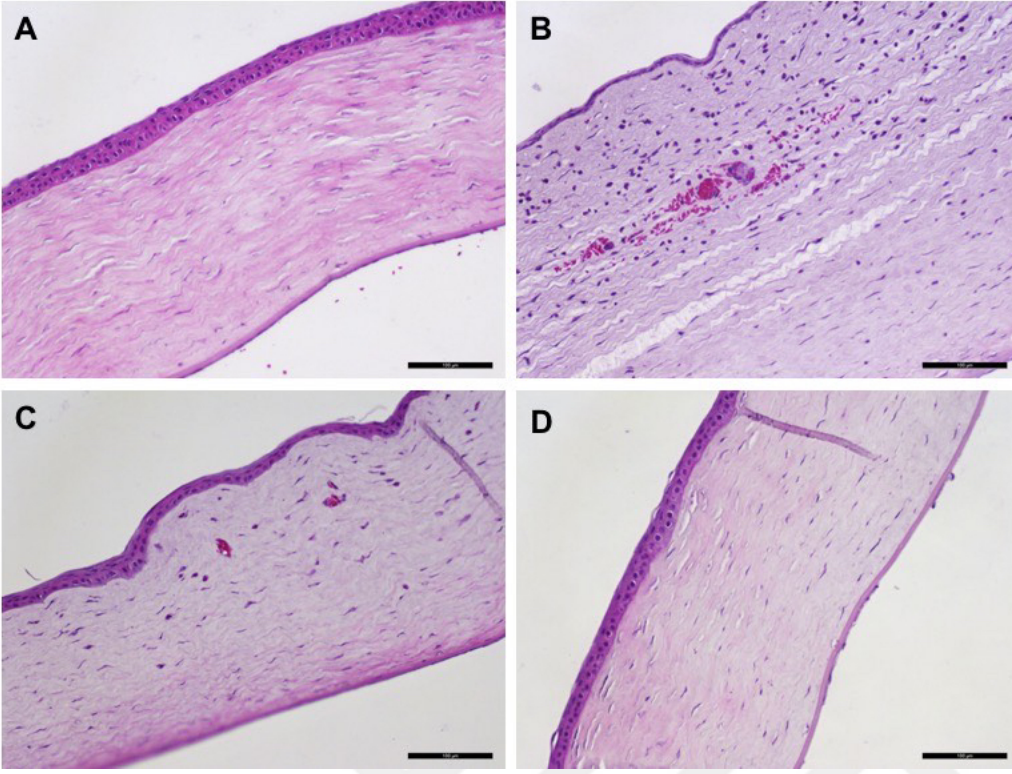
Figür 8. Kontrol grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Figür5A’da siyah çerçeve içerisine alınmış alan Figür 5B’de daha büyük magnifikasyonda gösterilmiştir. Artan vaskülarizasyon ve hemoraji (siyah okbaşı), lökositik infiltrasyon ve kollajen lifler arasındaki ayrılma(yıldız) dikkat çekmektedir. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon.



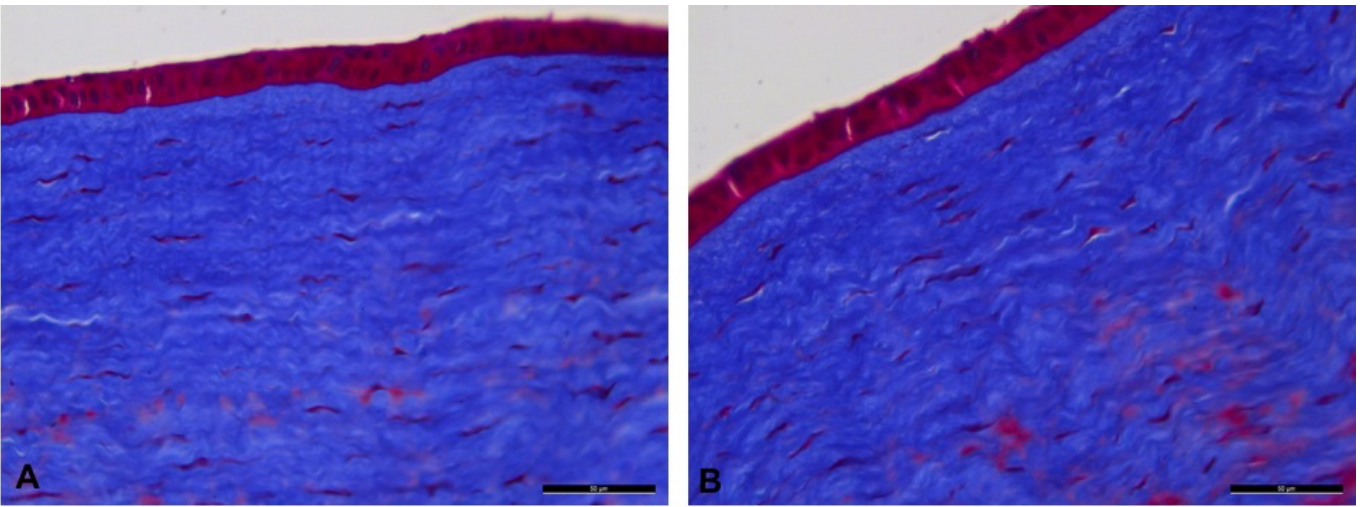
Figür 9. KGF-2 grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Figür6A’da siyah çerçeve içerisine alınmış alan Figür 6B’de daha büyük magnifikasyonda gösterilmiştir. Stromal ödemin ve inflamasyonun azaldığı ve vaskülarizasyonun hafif bir şekilde devam ettiği görülmektedir. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon.



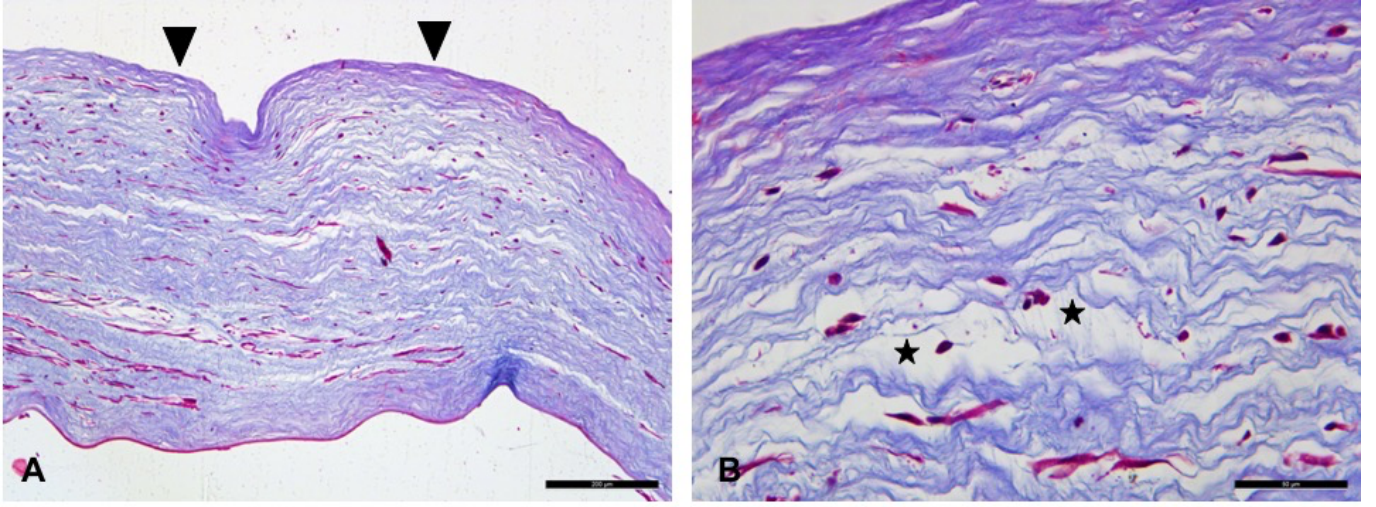
Figür 10. NGF grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Korneal epitelin ve endotelin yeniden oluştuğu, stromal ödemin ve vaskülarizasyonun oldukça azaldığı ve genel morfolojinin sağlıklı korneaya yakın seviyelerde olduğu görülmektedir. H&E, A-200X, B-400X magnifikasyon.



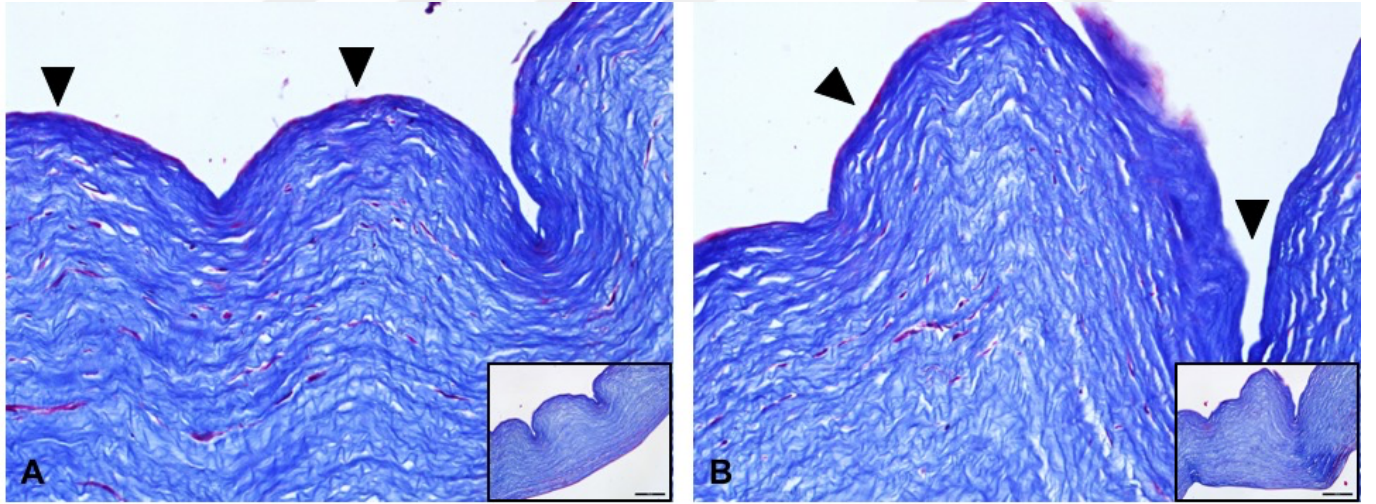
Figür 11. Sağlıklı, kontrol, KGF ve NGF grubuna ait korneal dokuların genel morfolojisini gösteren fotomikrograf. A, Kontrol; B, Sham; C, KGF; D, NGF. 200X magnifikasyon.



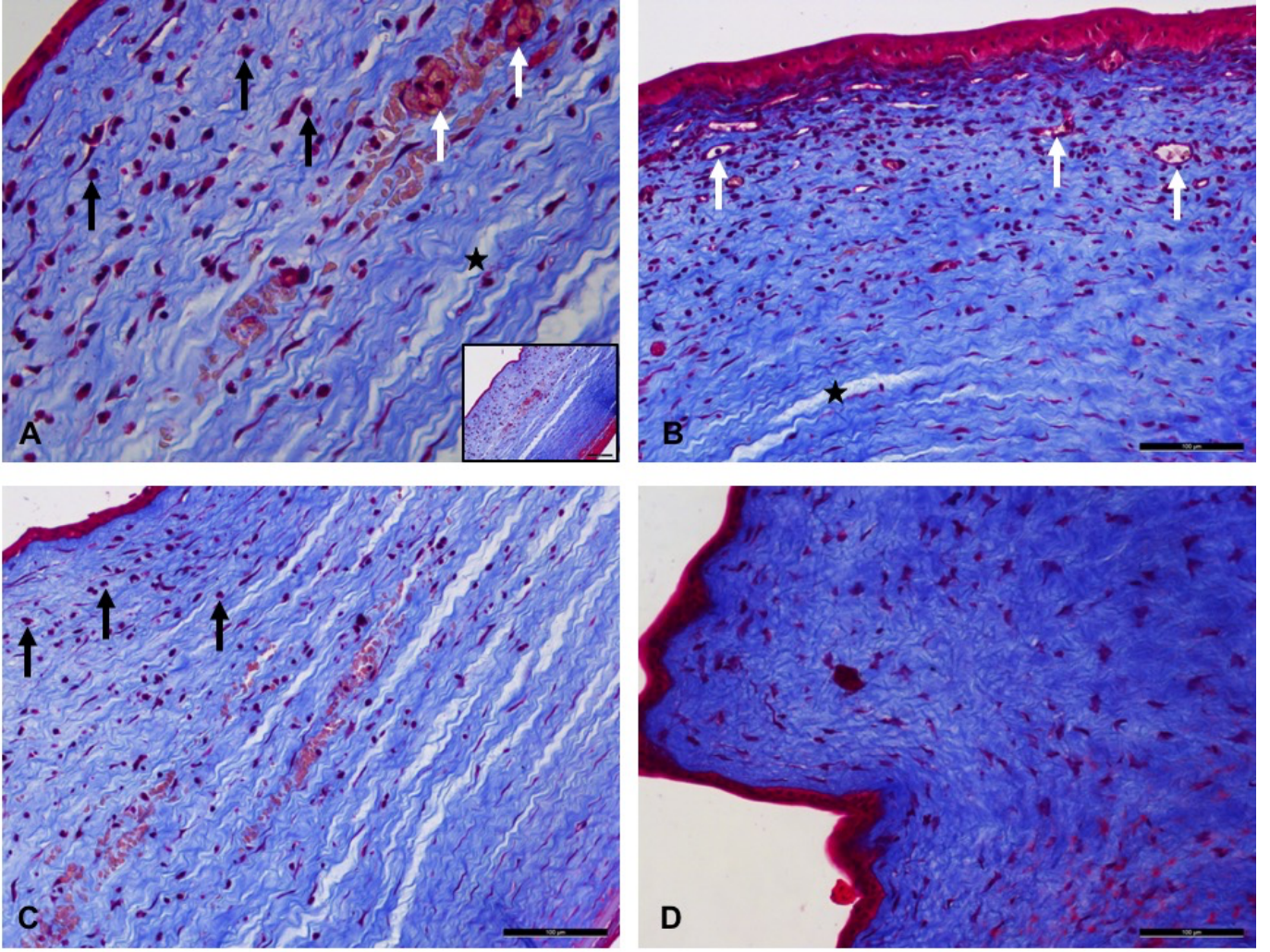
Figür 12. Sağlam kornea grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. MT, 400X magnifikasyon.



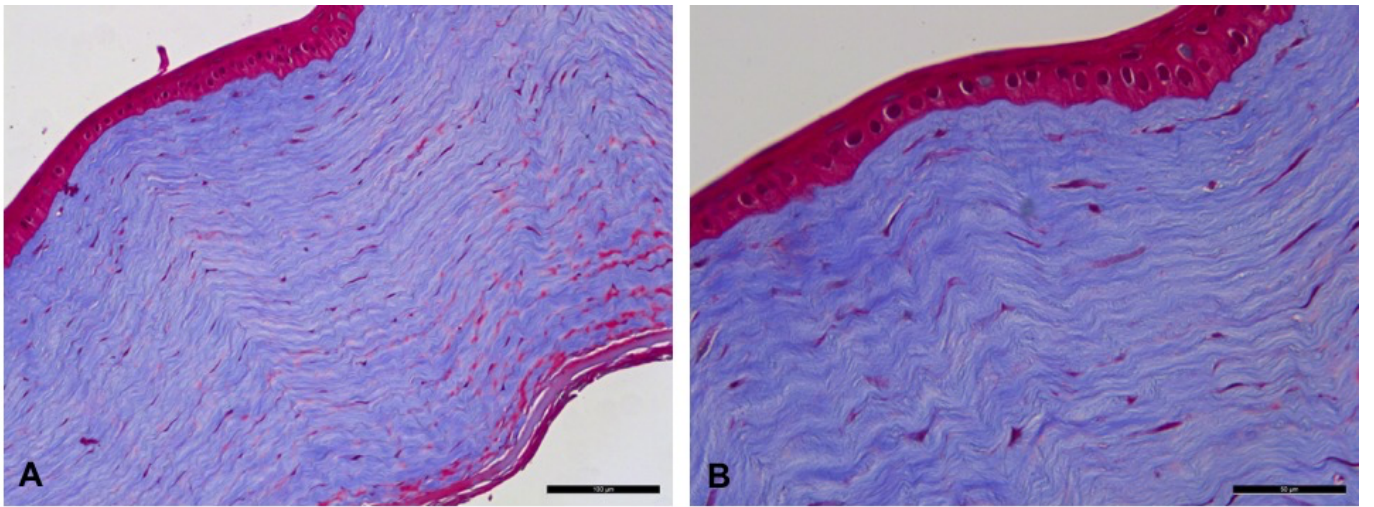
Figür 13. Kontrol grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Korneal epitelin devamlılık göstermediği (siyah okbaşı), endotelin döküldüğü, kollajen liflerin organizasyonunun bozulduğu ve stromal ödemin varlığı (yıldız) dikkat çekmektedir. MT, A-100X ve B-400X magnifikasyon.



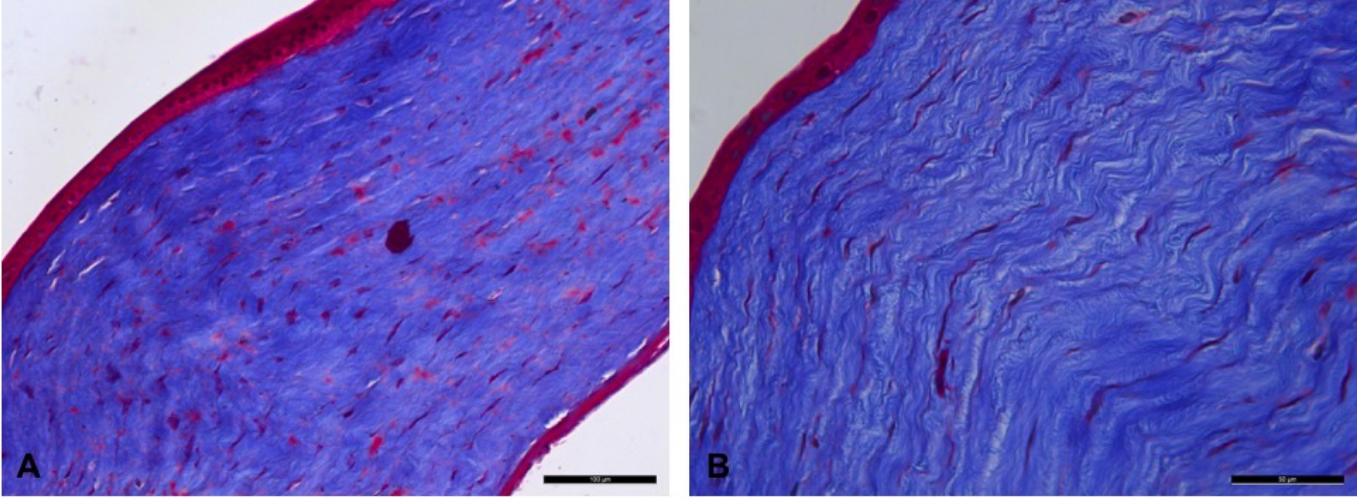
Figür 14. Kontrol grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Kornea morfolojisinin bozularak ödematöz ve ondüleli bir yapı aldığı (siyah okbaşı), epitelin devamlılık göstermediği dikkat çekmektedir. MT, 200X magnifikasyon (siyah çerçeve içerisine alınan fotomikrograflar 100X magnifikasyon).



Figür 15. Kontrol grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Artan vaskülarizasyon ve hemoraji (beyaz ok), lökositik infiltrasyon (siyah ok), kollajen lifler arasındaki ayrılma (yıldız) ve fibroblast morfolojisindeki değişim (D) dikkat çekmektedir. MT, A-400X ve B-D-200X magnifikasyon.



Figür 16. KGF grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Korneal histomorfolojinin düzeldiği, stromal ödemin ve kollajen lifler arasındaki mesafenin azaldığı görülmektedir. MT, A-200X ve B-400X magnifikasyon.



Figür 17. NGF grubuna ait kornea dokusunu gösteren fotomikrograf. Korneal epitelin yeniden oluştuğu, stromal ödemin, vaskularizasyonun ve inflamasyonun oldukça azaldığı ve genel morfolojinin sağlıklı korneaya yakın seviyelerde olduğu görülmektedir. MT, A-200X, B-400X magnifikasyon.

Tablo-16: Grupların epitel kaybı, stromal ödem, korneal hemoroji ve korneal inflamasyon skorları ortalamaları

	Epitelyal Dejenerasyon	Stromal Ödem	Korneal Hemoroji	Korneal İnflamasyon
Sağlıklı	0	0	0	0
Kontrol	3.00 (3.00-4.00)	2.50 (2.00-3.00)	2.50 (2.00-3.00)	3.00 (3.00-3.00)
KGF-2	1.00 (0.75-1.00)	1.00 (0.00-1.00)	1.00 (0.75-1.00)	1.00 (0.00-1.00)
NGF	0.00 (0.00-0.25)	1.00 (0.00-1.00)	0.00 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.00)

Tablo-17: Grupların epitel kaybı skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0.001	p=0.427	p=1
Kontrol	p<0.001	-----	p=0.173	p=0.001
KGF-2	p=0.427	p=0.173	-----	p=0.893
NGF	p=1	p=0.001	p=0.893	-----

Tablo-18: Grupların stromal ödem skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0.001	p=0.923	p=0.923
Kontrol	p<0.001	-----	p<0.031	p=0.031
KGF-2	p=0.923	P=0.031	-----	p=1
NGF	p=0.923	P=0.031	p=1	-----

Tablo-19: Grupların korneal hemoroji skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0.439	p=1
Kontrol	p<0,001	-----	p=0.129	p=0.003
KGF-2	p=0.439	p=0.129	-----	p=1
NGF	p=1	p=0.003	p=1	-----

Tablo-20: Grupların korneal inflamasyon skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0.904	p=1
Kontrol	p<0,001	-----	p=0.043	P=0.013
KGF-2	p=0.904	p=0.043	-----	p=1
NGF	p=1	p=0.013	p=1	-----

8.2.3 İmmünohistokimyasal (IHC) incelemeler

İmmünohistokimyasal olarak MMP-2, MMP-9 ve TGF-beta boyamaları yapıldı.

8.2.3.1. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)

Matriks metalloproteinaz-2 ekspresyonu kontrol grubunda sağlıklı kornea grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (p<0.001). Aynı şekilde MMP-2 immünreaktivitesi de daha çok üst stromal (yaklaşık %50-%70 üst kısım) tabakada tespit edilmiştir (Fig.27,28). KGF-2 grubunda bu immünreaktivitenin şiddeti azalmakla birlikte hem stromal hem de epitelyal olarak devam etmektedir (Fig. 24). NGF grubunda ise KGF-2 grubuna oranla MMP-2 ekspresyonu azalmıştır; daha çok epitel tabakasının bazalinde görülmektedir (Fig.23,26). MMP-2 ekspresyonu açısından kontrol grubunda NGF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür (p=0.022).

Tablo-21: Grupların MMP-2 boyanma skorları ortalaması

Gruplar	Median Değerleri
Sağlıklı	0.25 (0.0-0.5)
Kontrol	4.0 (3.0-4.0)
KGF-2	1.0 (1.0-1.25)
NGF	0.75 (0.5-1.0)

Tablo-22: Grupların MMP-2 boyanma skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0.070	P=0.88
Kontrol	p<0,001	-----	p=0.404	P=0.022
KGF-2	p=0.070	p=0.404	-----	p=1
NGF	P=0.88	P=0.022	p=1	-----

8.2.3.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)

MMP-9 immünreaktivitesi sağlıklı kornea grubunda da bir miktar epitelyal olarak gözlemlenmiştir. Gruplara ait MMP-9 immünreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda, sağlıklı kornea grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0.001$), immünreaktivite stromanın yaklaşık 2/3'lik üst kısmında stromal olarak tespit edilmiştir (Fig.32). KGF-2 grubunda MMP-9 ekspresyonu kontrol grubuna göre oldukça azalmıştır ve daha çok epitelyal ekspresyon gözlemlenmektedir (Fig.31). NGF grubunda ise MMP-9 ekspresyonu sağlıklı kornea grubuna benzer olarak az miktarda epitelyal olarak saptanmıştır ve ekspresyonun NGF grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür ($p=0.009$) (Fig.29).

Tablo-23: Grupların MMP-9 boyanma skorları ortalaması

Gruplar	Median Değerleri
Sağlıklı	0.5 (0.375-0.625)
Kontrol	4.0 (3.0-4.25)
KGF-2	1.0 (1.0-1.25)
NGF	0.75 (0.5-1.0)

Tablo-24: Grupların MMP-9 boyanma skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0.223	p=1
Kontrol	p<0,001	-----	p=0.302	p=0.009
KGF-2	p=0.223	p=0.302	-----	p=1
NGF	p=1	p=0.009	p=1	-----

8.2.3.3. TGF-beta

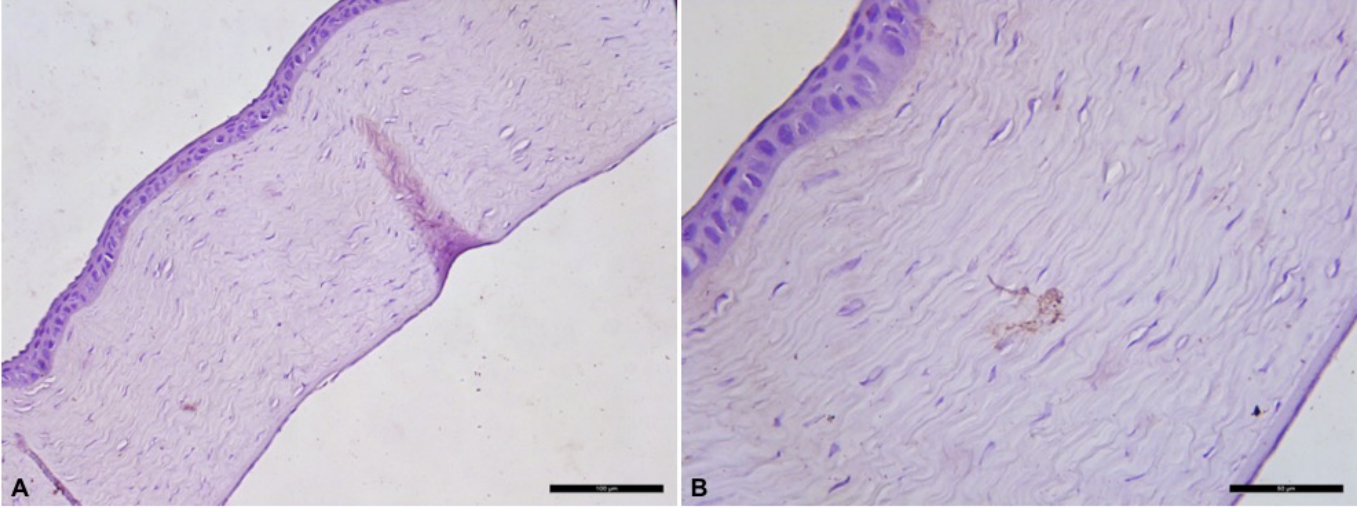
Gruplara ait TGF-beta immünreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda, sağlıklı kornea grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p<0.001). Tgf-beta ekspresyonunun daha çok üst stromal kısımda vasküler alanlarda olduğu tespit edilmiştir (Fig.19,20). KGF ve NGF tedavi gruplarında kontrol grubuna göre TGF-beta ekspresyonunda bir azalış olduğu görülmüştür (Fig.21,22), NGF ile kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.017). İki tedavi grubunda da TGF-beta ekspresyonunun daha çok epitelial olduğu görülmüştür.

Tablo-25: Grupların TGF-beta boyanma skorları ortalaması

Gruplar	Median Değerleri
Sağlıklı	0. (0-0.5)
Kontrol	4.0 (3.0-4.0)
KGF-2	1.0 (0.875-1.0)
NGF	0.5 (0.5-0.625)

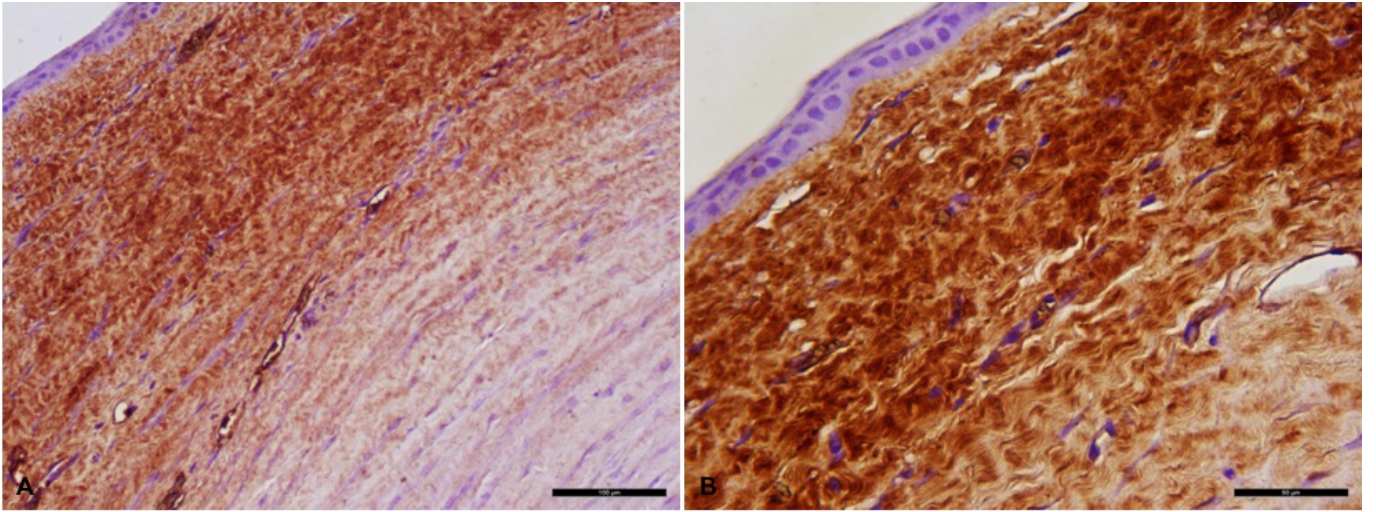
Tablo-26: Grupların TGF-beta boyanma skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	KGF-2	NGF
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0.078	p=1
Kontrol	p<0,001	-----	p=0.420	p=0.017
KGF-2	p=0.078	p=0.420	-----	p=1
NGF	p=1	p=0.017	p=1	-----

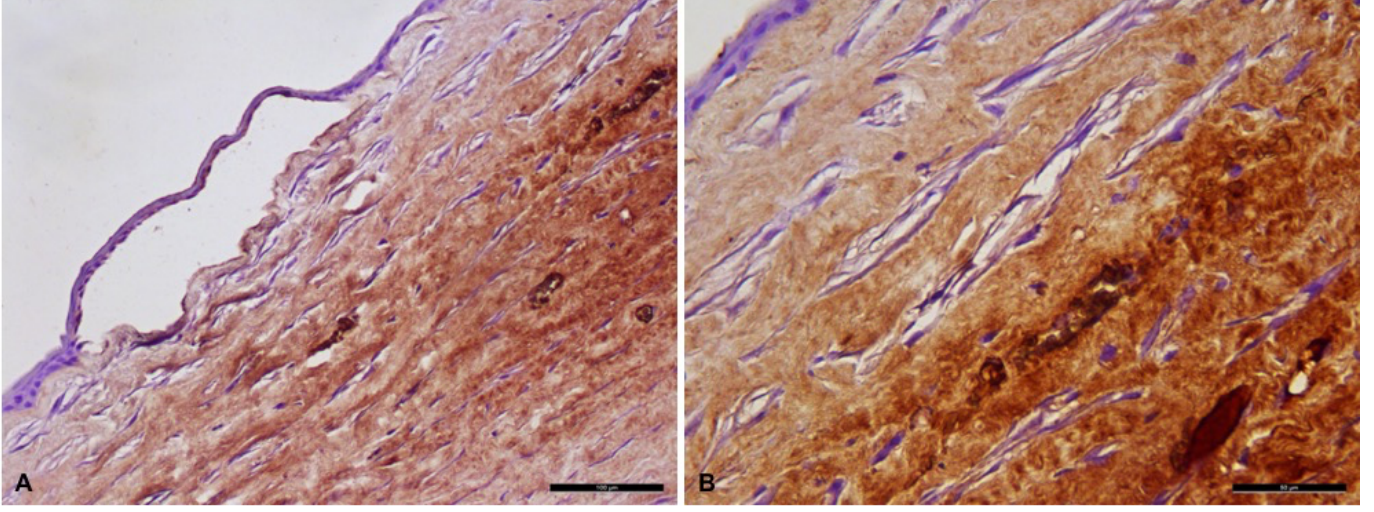


Figür 18. Sağlıklı kornea grubuna ait TGF-beta ekspresyonunu gösteren fotomikrograf.

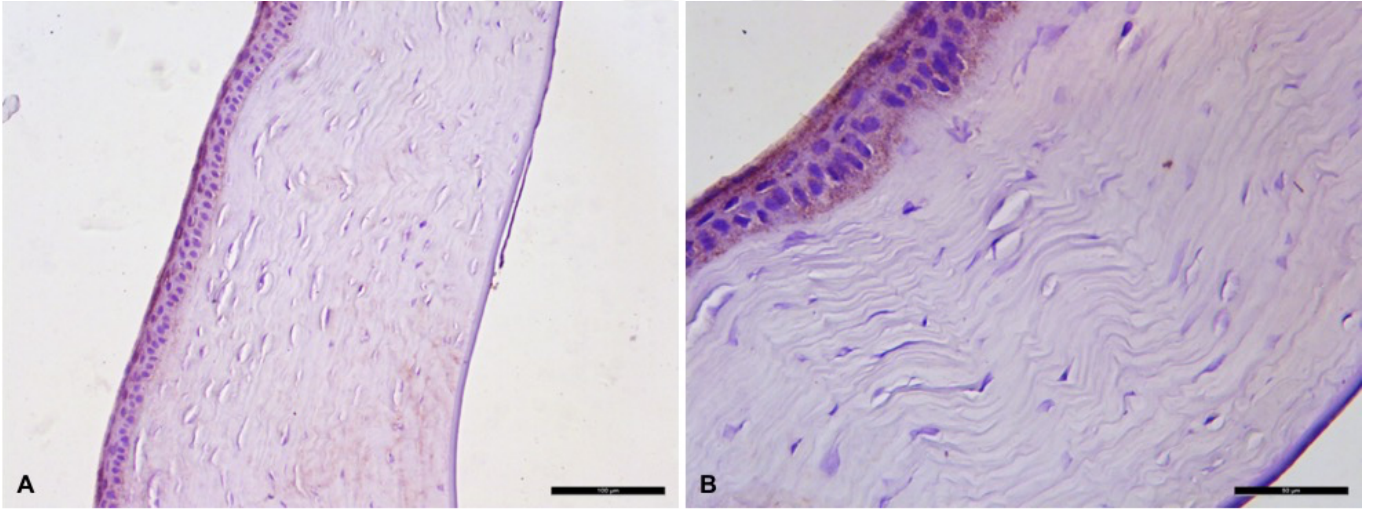
A,200X; B,400X magnifikasyon.



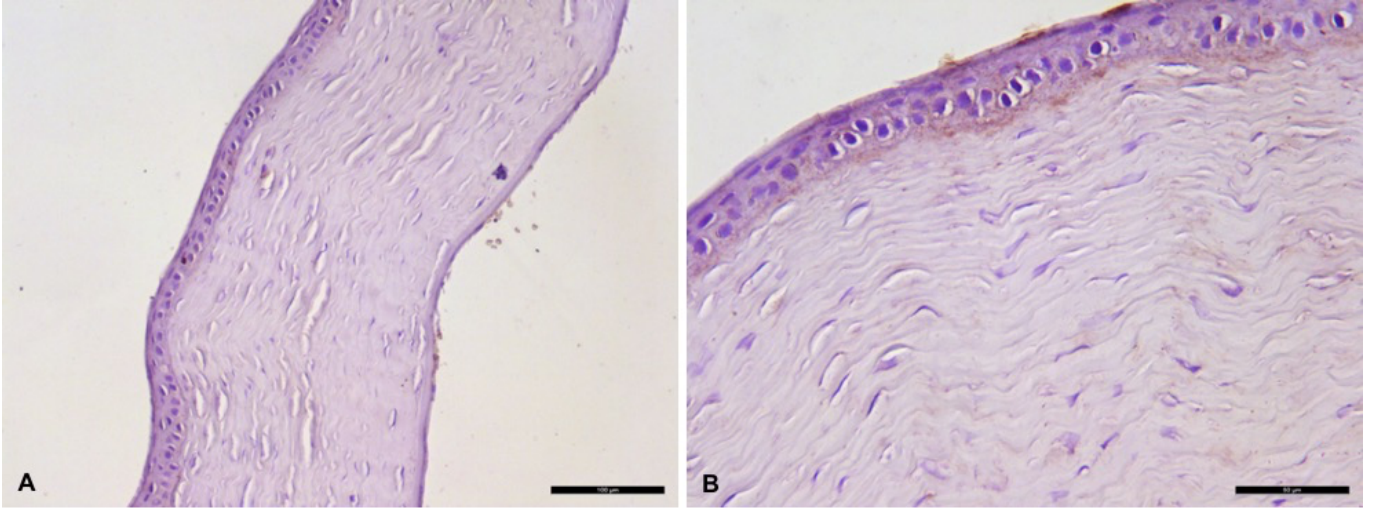
Figür 19. Kontrol grubuna ait TGF-beta ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. TGF-beta ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre immünreaktivite, vasküler alanların çevresinde daha yoğun olmak üzere yaklaşık 2/3 üst stromal bölgede tespit edilmiştir. A-100X ve B-400X magnifikasyon.



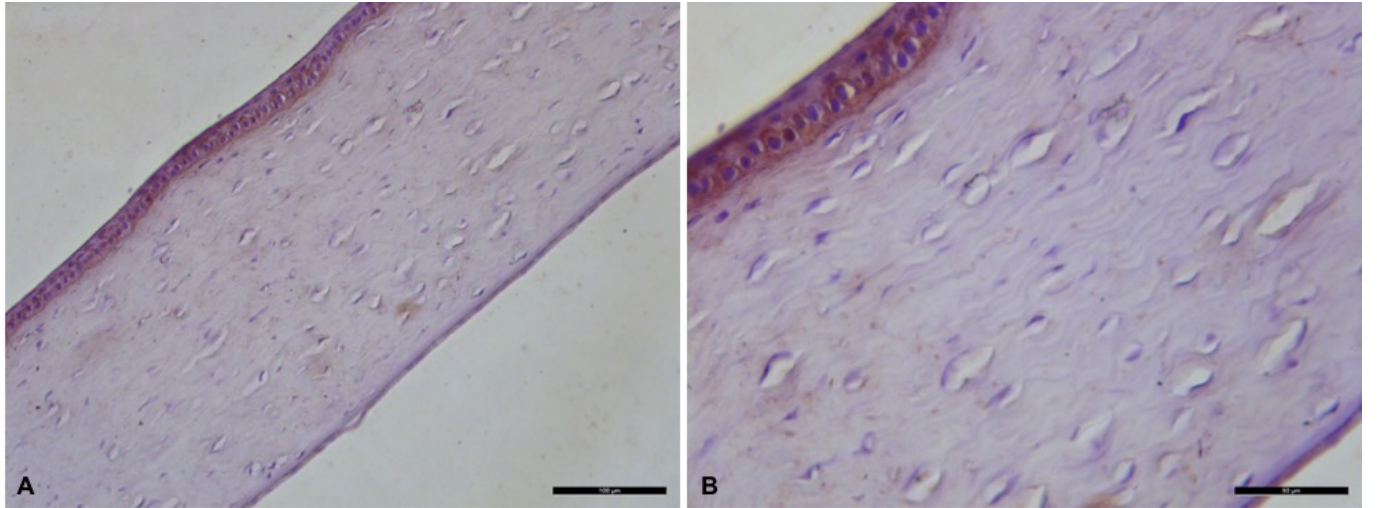
Figür 20. Kontrol grubuna ait TGF-beta ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A,200X; B,400X magnifikasyon.



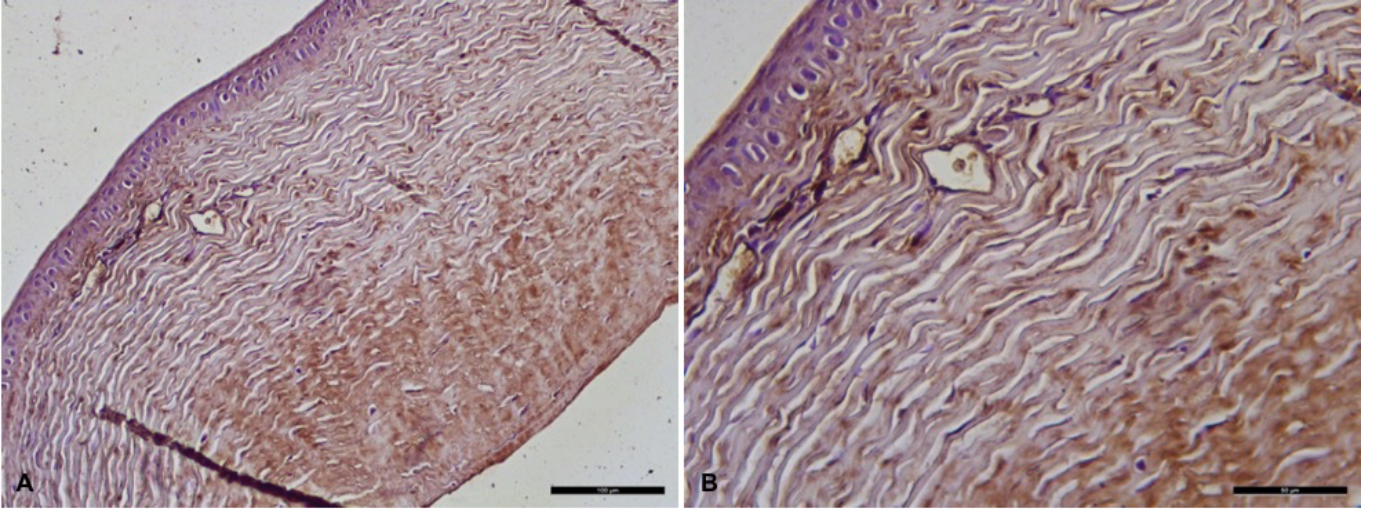
Figür 21. KGF grubuna ait TGF-beta ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. TGF-beta ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre immünreaktivite, epitelial alanda, hücrelerin bazal kısmında tespit edilmiştir. A-200X ve B-400X magnifikasyon.



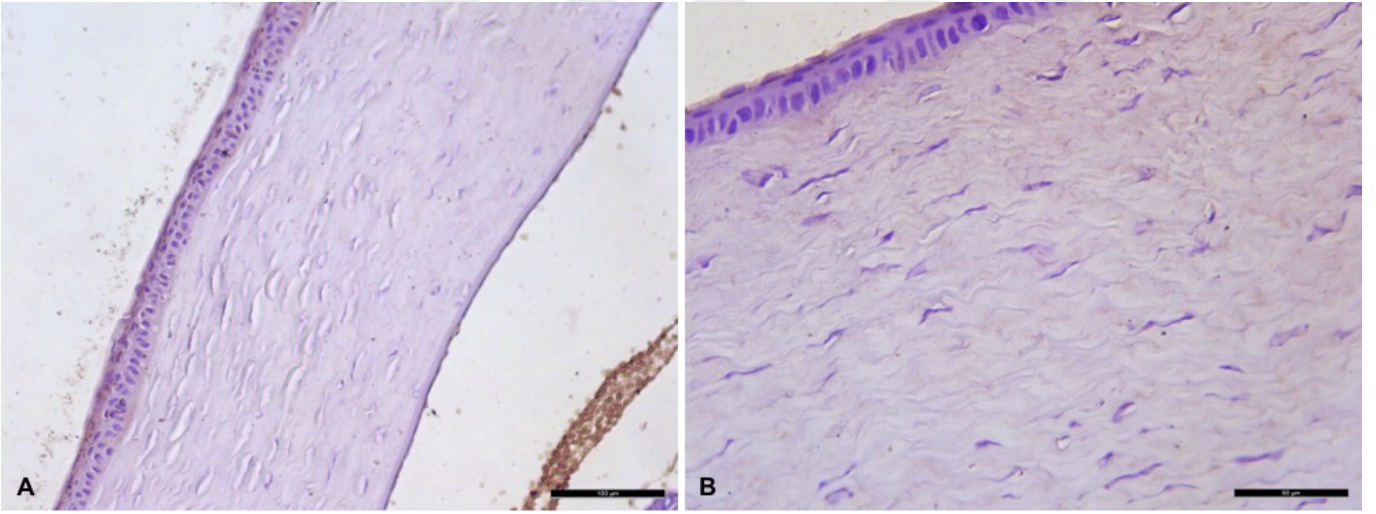
Figür 22. NGF grubuna ait TGF-beta ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. TGF-beta ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre immünreaktivitenin alkali yanık grubuna göre oldukça azalmakla birlikte az miktarda epitelyal olarak devam ettiği tespit edilmiştir. A-200X ve B-400X magnifikasyon.



Figür 23. NGF grubuna ait MMP-2 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A-200X ve B-400X magnifikasyon. MMP-2 ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre, MMP-2 pozitif alanlar bazal epitel hücrelerinde görülmektedir.

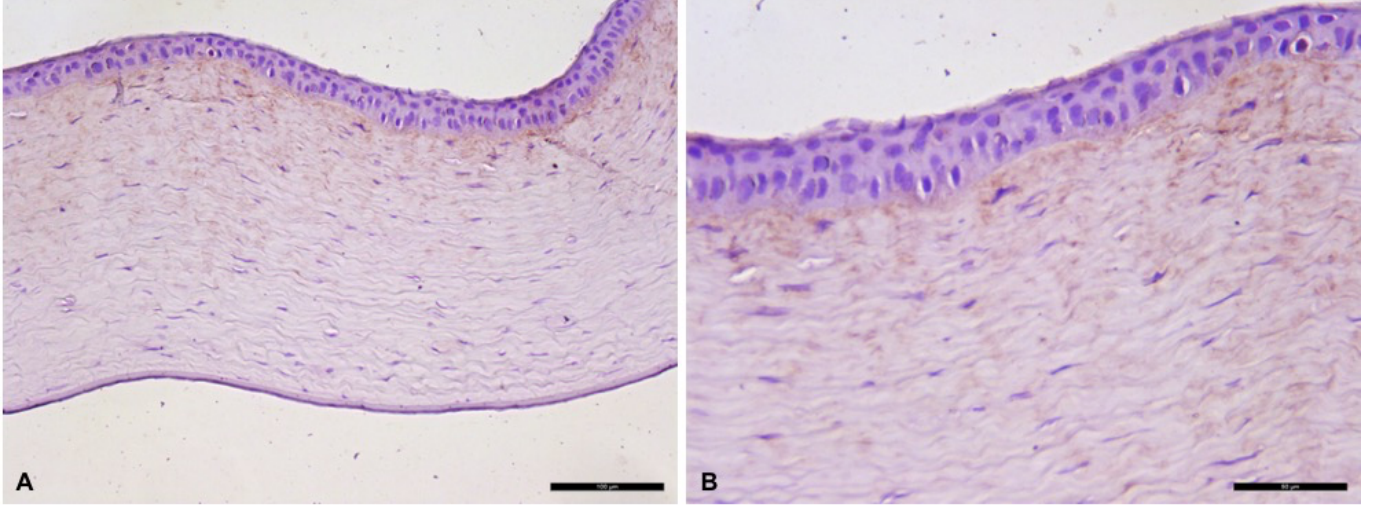


Figür 24. KGF grubuna ait MMP-2 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A-200X ve B-400X magnifikasyon. MMP-2 ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre, MMP-2 pozitif alanlar şiddeti azalmakla birlikte tüm stromaya yayılmış görülmektedir.

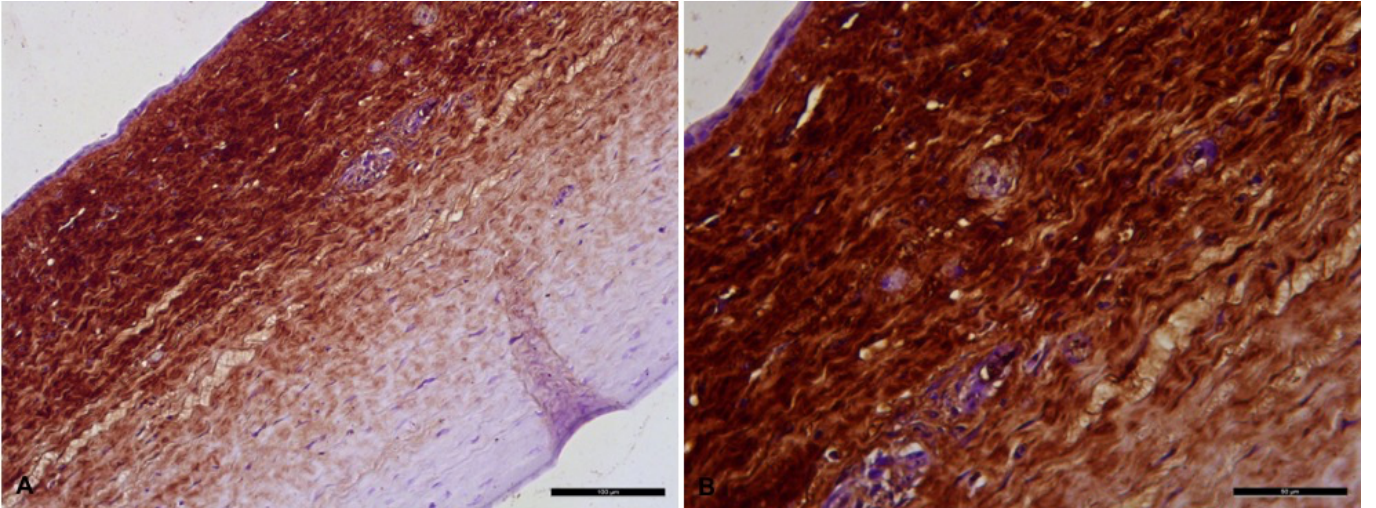


Figür 25. Sağlıklı kornea grubuna ait MMP-2 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf.

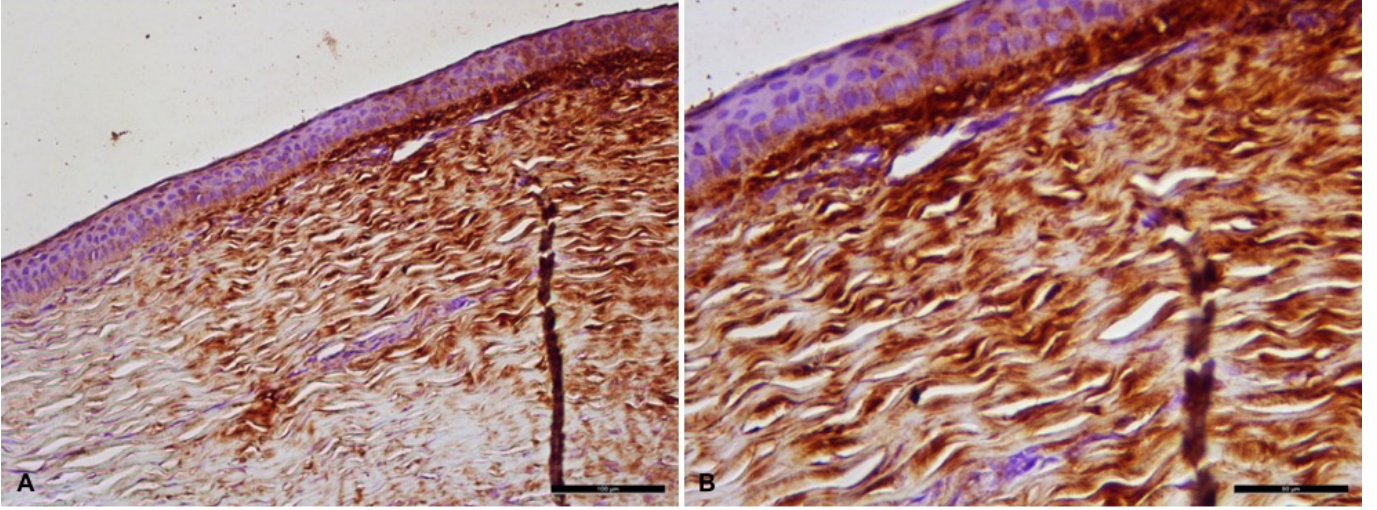
A,200X; B,400X magnifikasyon.



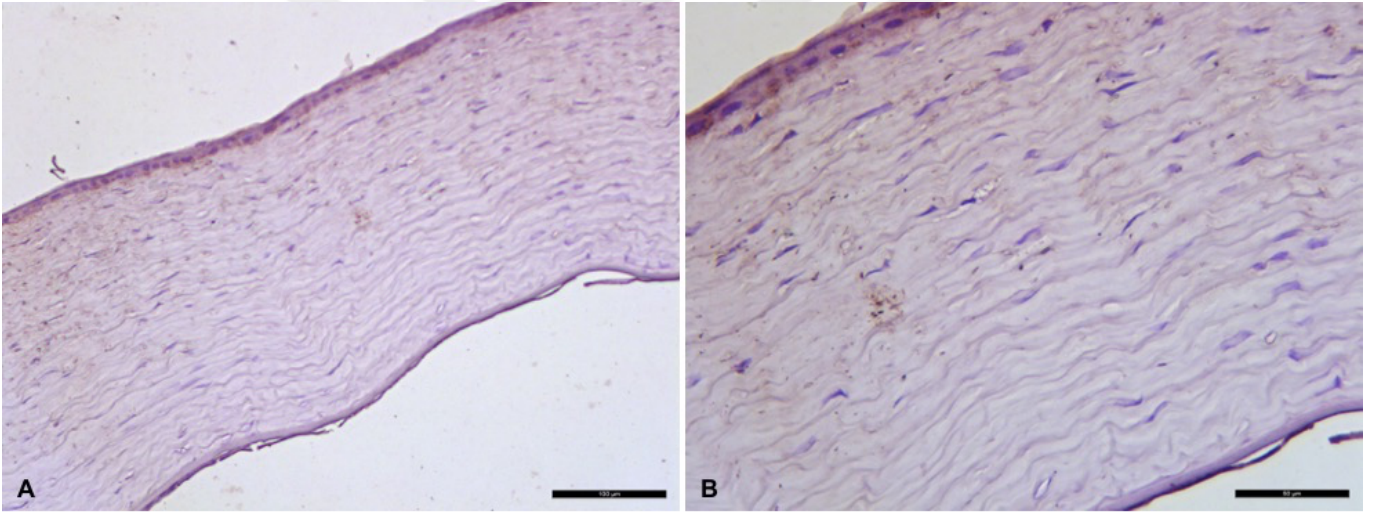
Figür 26. NGF grubuna ait MMP-2 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A-200X ve B-400X magnifikasyon.



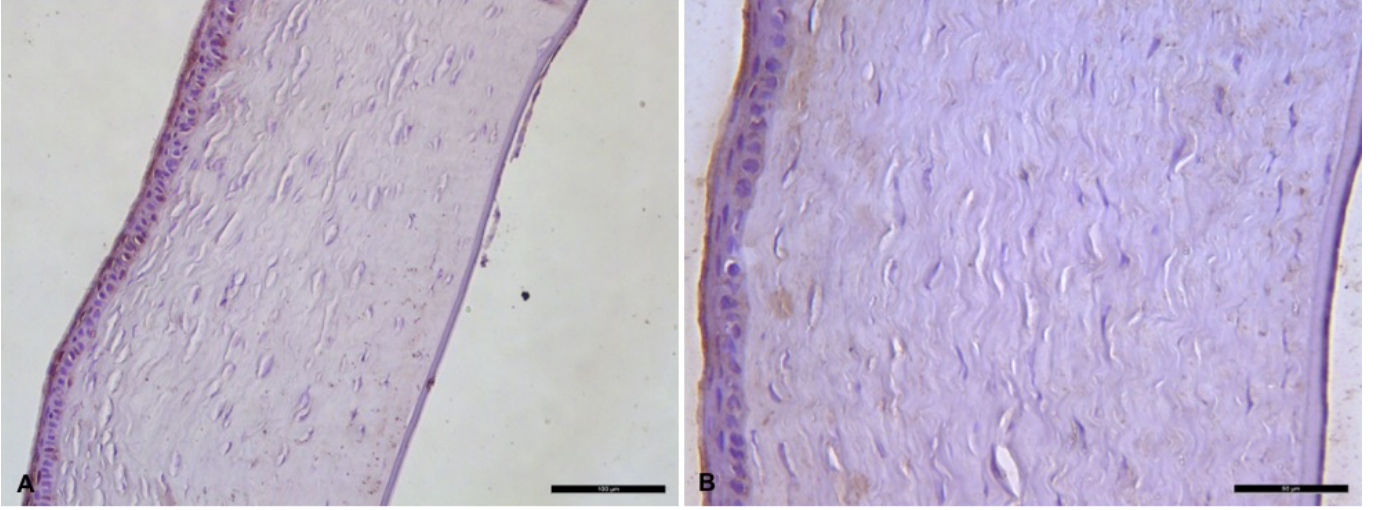
Figür 27. Kontrol grubuna ait MMP-2 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. MMP-2 ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre immünreaktivite, 2/3 üst stromal bölgede yoğun olarak tespit edilmiştir. A-100X ve B-400X magnifikasyon.



Figür 28. Kontrol grubuna ait MMP-2 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A,200X; B,400X magnifikasyon.

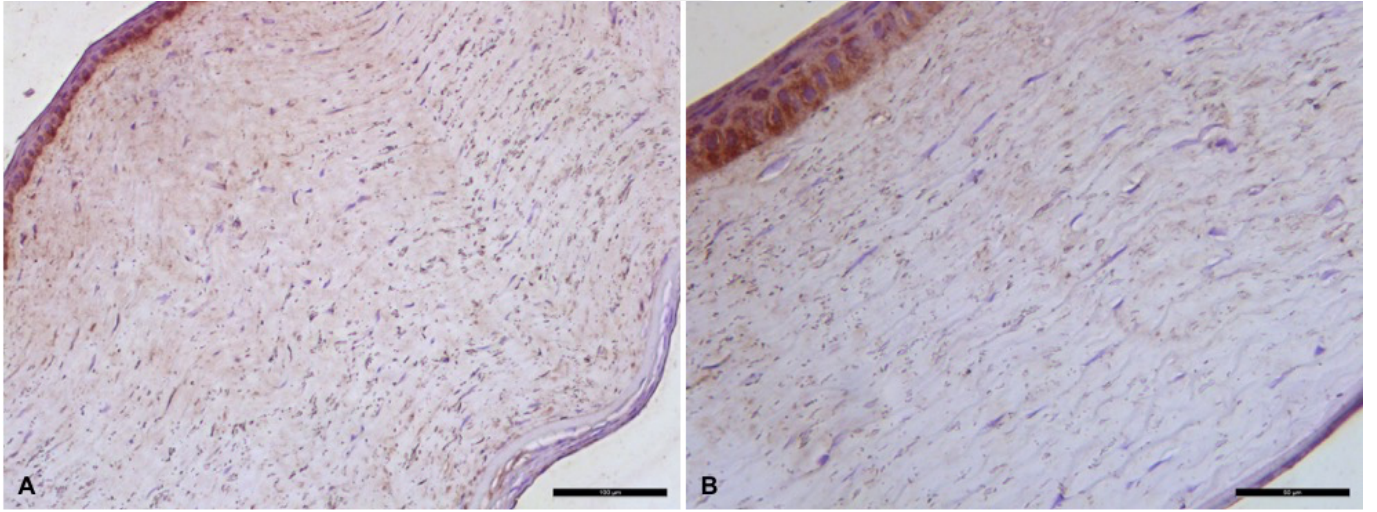


Figür 29. NGF grubuna ait MMP-9 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A-200X ve B-400X magnifikasyon.

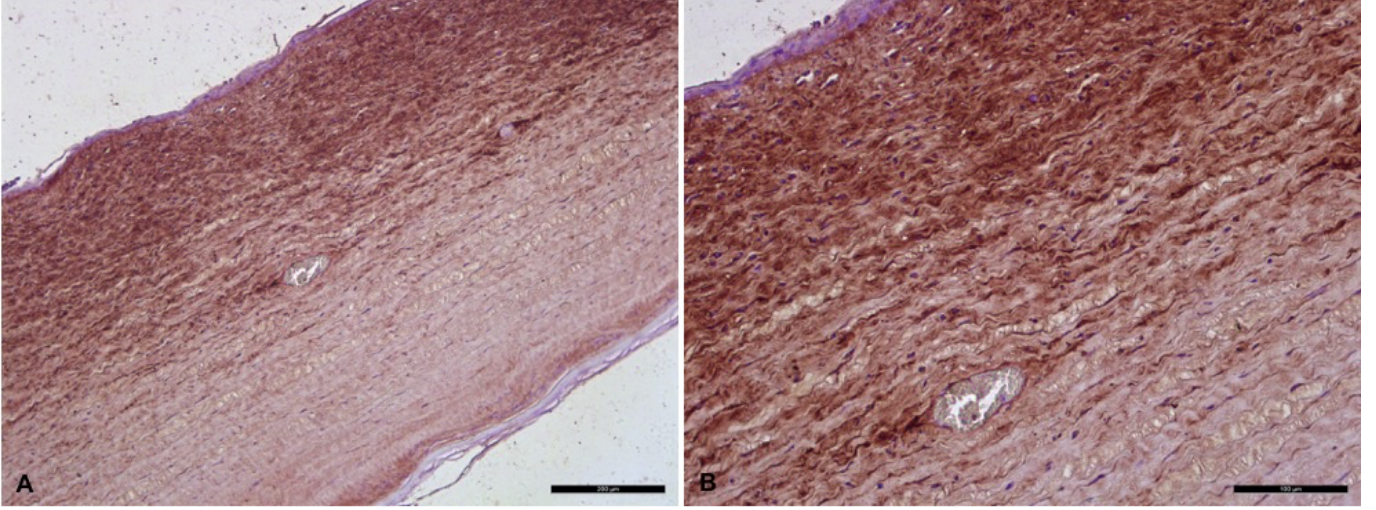


Figür 30. Sağlıklı kornea grubuna ait MMP-9 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf.

A,200X; B,400X magnifikasyon.



Figür 31. KGF grubuna ait MMP-9 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. A-200X ve B-400X magnifikasyon. MMP-9 ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre, MMP-9 pozitif alanlar bazal epitel hücrelerinde görülmektedir. A-200X ve B-400X magnifikasyon.



Figür 32. Kontrol grubuna ait MMP-9 ekspresyonunu gösteren fotomikrograf. MMP-9 ekspresyonunun olduğu alanlar DAB (diaminobenzidin) ile kahverenginde gözlemlenmektedir. Buna göre immünreaktivite, 2/3 üst stromal bölgede yoğun olarak tespit edilmiştir. A-100X ve B-400X magnifikasyon.

9. TARTIŞMA KLİNİK VE HİSTOLOJİK BULGULAR

Kornea epiteli kimyasal, termal ve mekanik travmalara çok duyarlı olup oküler travmaların beşte birini kimyasal travmalar oluşturmaktadır. Kimyasal travmalar içerisinde alkali maddelerin inşaat sanayinde ve temizlik maddelerinin içeriğinde bulunması sebebiyle asidik madde ile yaralanmaya oranla daha sık karşılaşılmaktadır. Alkali yanık travmasının, günümüzde geliştirilen tedavi yöntemlerine rağmen korneada yarattığı yıkıcı süreç sebebiyle tedavi yönetimi oftalmoloji hekimleri için zorlayıcı olmaya devam etmektedir. Korneal sinir rejenerasyonunu uyaran, epitel iyileşmesinin hızlandıran moleküllerin geliştirilmesi, keşfedilmesi bu hastalığın klinik yönetimini ve sonuçlarını iyileştirecektir.

Başarılı yara iyileşmesi hücre göçü, hücre proliferasyonu ve doku şekillenmesi dahil olmak üzere bir dizi komponent içerir.¹²⁶ Bu sürecin en kritik aşaması hasarlı dokuya koordineli olarak salınan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin hücre göçü ve proliferasyonunu yönlendirmesidir. Bu nedenle, büyüme faktörü aracılı iletişim, korneal yara iyileşmesi için önemlidir.¹²⁸

Kgf-2 hasar sonrası yaralanmaya cevap olarak salınır ve epitelyal hücrelerde büyümeyi, proliferasyonu ve farklılaşmayı tetikler.¹¹⁴

Bir diğer büyüme faktörü olan sinir büyüme faktörü TrkA reseptörüne bağlanarak etki etmekte olup korneada travma sonrası TrkA sentezi olur¹²⁹ ve hasar sonrası korneada NGF seviyesinde bir artış olur.⁸⁹

Kornea epiteli korneanın fonksiyonunu yerine getirmesinde ve bütünlüğünü korunmasında önemli bir rol oynar ve kimyasal, termal ve mekanik hasara oldukça hassastır. Yara iyileşmesini desteklemede reepitelizasyonun hızlandırılması önemli bir adımdır.¹²⁹ Son çalışmalarda, alkali yanık sonrası ilk haftada epitel hasarının daha az olduğu gözlerde inflamasyon ve neovaskülarizasyonun daha az olduğu gösterilmiştir.¹³¹

Çalışmamızda hem 7. gün hem de 14. gün yapılan muayenelerde epitel defekti büyüklüğü açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu ve bu farkı oluşturan sebebin kontrol grubuna göre hem KGF-2 grubunun hem de NGF grubunun epitelyal yara iyileşmesinin daha iyi olması olduğu görüldü. Histolojik preparatlarda kontrol grubunda korneal epitelin büyük hasar aldığı, re-epitelizasyonun gerçekleştiği bölgelerde yer yer hiperplazik epitel hücrelerine rastlandığı görüldü. Takiplerdeki tüm vizitlerde epitel hasarı açısından KGF-2 ve NGF grupları arasında klinik bulgularda istatistiksel anlamlı bir fark yokken, histolojik preparatlara baktığımızda klinik sonuçlara paralel

olarak KGF grubunda kontrol grubuna göre epitelyal onarımın arttığı, morfolojik düzelmenin daha fazla olduğu, NGF tedavisi alan grupta ise epitelizasyonun sağlıklı kornea ile benzer seviyeye geldiği görüldü. Literatürdeki çalışmalara baktığımızda, çeşitli yara modelleri üzerinde denenmiş KGF'nin korneal epitelyal hücre proliferasyonunu indüklediğini ve epitelyal hasarın iyileşme hızını arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur.^{117,118,119,123,124,131} Çalışmamızdaki bir diğer tedavi ilacımız olan NGF'nin korneal nörotrofik ülseri olan hastalarda topikal uygulamasının herhangi bir lokal veya sistemik yan etki olmaksızın kornea duyarlılığının restorasyonunu indüklediği ve epitel iyileşmesini desteklediği yakın zamanda gösterilmiştir.^{100,132} Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları da yapılan diğer çalışmalarla aynı doğrultuda olup hem KGF-2'nin hem de NGF'nin topikal uygulamasının reepitelizasyonu hızlandırmada ve travma sonrası sağlıklı kornea morfolojisine yaklaşımda etkili olduğu görülmüş olup klinik değerlendirme sonucunda aralarında istatistiksel açıdan fark olmasa da histopatolojik olarak NGF grubunda bir miktar daha iyi bir iyileşme olduğu gözlemlenmiştir.

Santral kornea kalınlığı açısından çalışmamızda klinik verilerin sonuçlarına göre tekrarlanan ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir değişim saptanmadı ancak grupların 2. ve 3. hafta ortalama ölçümlerine bakıldığında kontrol grubunun SKK ortalamasının diğer gruplardan fazla olduğu en düşük SKK ortalamasının ise KGF-2 grubunda olduğu görüldü. Histolojik preparatlarda da kontrol grubunda şiddetli ödemle birlikte korneanın kalınlaşarak ondüleli/dalgalı bir yapı kazandığı, KGF grubunda kontrol grubuna göre morfolojik düzelmenin daha fazla olduğu, NGF tedavisi alan grupta ise ödemin hiç yok denecek kadar aza indiği görüldü.

Sağlıklı kornea avasküler yapıdadır ve bu özellik net görebilmek için büyük önem taşımaktadır.¹³³ Kornea neovaskülarizasyonu ve opaklaşma şiddetli alkali yanık travması sonrası körlüğün en sık nedenidir.¹³⁴

Güncel farmakolojik tedavide sıkça kullanılan kortikosteroidlerin^{135,136}, glokom, katarakt ve kornea incilmesi gibi önemli yan etkileri bulunmaktadır.¹³⁷ Steroidler aynı zamanda epitel iyileşmesini geciktirdiği için akut dönemde verilmesini kısıtlamaktadır. Tedaviye rağmen neovaskülarizasyon, ödem, lipid birikimi ve skar gelişimi izlenebilmektedir.

Çalışmamızda korneal vaskülarizasyonun 7. gün oluşmaya başladığını ancak gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı farkın 14. gün oluştuğu görüldü. NGF grubu ve KGF-2 grupları arasında tüm vizitlerde korneal vaskülarizasyon büyüklüğü açısından anlamlı bir fark olmayıp, 14. gün gruplar arasındaki farkı oluşturan, kontrol grubunun NGF grubuna göre daha fazla korneal vaskülarizasyon göstermesiydi ve bu durum histolojik preparatlarda da gösterildi. KGF-2 grubu korneal vaskülarizasyon büyüklüğü açısından en düşük yüzdeye sahip olsa da bu durum kontrol grubuyla

arasında istatistiğe anlamlı olarak yansımada. Histopatolojik preperatlarda kontrol grubunda stromanın vaskülarizasyonu ile birlikte lökositik infiltrasyonunun ve hemorojinin arttığı, stromal ödemin şiddetli olduğu ve bu ödeme bağlı olarak kollajen lifler arasındaki bağların zayıflayarak ayrışmaların olduğu, fibroblast morfoloji ve dağılımının bozulduğu gözlemlenmiştir. KGF-2 grubunda ise ödemin azaldığı, ancak bir miktar vaskülarizasyonun subepitelyal olarak devam ettiği görülmüştür. NGF grubunda vaskülarizasyonun oldukça azalmasıyla birlikte hem hemoroji hem de lökositik infiltrasyon ortadan kalkmıştır.

Opasite büyüklük yüzdeleri değerlendirildiğinde 2. ve 3. vizitte tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Bu farkı 2. vizitte, NGF grubunun kontrol grubuna göre, 3. vizitte ise hem KGF-2 hem de NGF grubunun kontrol grubuna göre opasite büyüklüğündeki iyileşmenin daha fazla olmasından kaynaklandığı görüldü. KGF-2 ve NGF grupları arasında tekrarlayan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Grup içi karşılaştırmada kontrol grubunun opasite büyüklüğünün tekrarlayan ölçümlerde azaldığı ancak ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülürken, NGF grubunda 14. gün ve 1.gün arasında anlamlı bir azalma olduğu, KGF-2 grubunda hem 7. hem de 14. gün yapılan ölçümlerde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü.

Matriks metalloproteinazlar (MMP), laminin, fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matriks proteinlerini bozan hücre dışı bir endoproteinaz ailesidir.¹³⁸ İnsan korneasında, epitel, stromal ve nötrofil hücrelerinden MMP sentezi gerçekleşmektedir.¹³⁹ MMP-2'nin kornea neovaskülarizasyonunda üretiminin arttığı tespit edilmiştir.¹⁴⁰ MMP-9 jelatinaz/tip-4 kollajenaz grubunun bir üyesidir ve normalde de sağlıklı kornea epitelinden bir miktar salınabilmektedir.¹⁴¹ Matriks metalloproteinazlar kornea yüzeyinde epitel bazal membran bileşenleri ve sıkı bağlantı proteinlerinin parçalanmasında merkezi bir öneme sahiptirler.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Çalışmamızda gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında kontrol grubunun MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun sağlıklı korneaya göre anlamlı bir farkla fazla olduğu görülürken, KGF-2, NGF ve sağlıklı kornea gruplarının birbirleriyle aralarında istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar gösteriyor ki hem KGF-2 hem de NGF tedavisi korneadan MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu anlamlı ölçüde baskılamaktadır. NGF grubunun korneadan MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu çok daha başarılı şekilde engellediği görülmüştür.

Transforming growth faktör- β 'nin genel olarak epitel hücreleri, endotel hücreleri ve lökositlerin büyümesini engellediği ve fibroblast üretimini uyardığı kabul edilmektedir.¹⁴⁵ Transforming growth faktörün epitelden stromaya salgılanması ve gözyaşında üretimi stromal hücrelerde çoğalma ve göçe

neden olur. TGF- β 'nın enflamasyon odağına fibroblast, monosit ve makrofajları çekme özelliği de vardır.¹⁴⁶ Gruplara ait TGF-beta immünreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda, sağlıklı kornea grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenirken, her iki tedavi grubu ve sağlıklı kornea grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

10. SONUÇLAR

Korneal alkali yaralanmalar oftalmolojik acillerden olup, alkali madde, dokularda oluşturduğu sabunlaşma etkisiyle korneadan daha derine penetre olabilmekte, tüm ön segment yapılarını etkileyerek iris, pupil, lens anormallikleri, göziçi basınç sorunları gibi pekçok probleme yol açarak yaralanmaya maruz kalan gözde ciddi hasara sebebiyet verebilmektedir. Bu hasarı en aza indirmek ve nihai sonucu en olumlu yönde yönetmek adına uygulanan tedavinin hızı ve niteliği oldukça önemlidir. Tedavi süreci, oluşan inflamasyonun kontrolünü, iyileşmenin hızlandırılmasını ve sekel ve komplikasyonların yönetimini içeren disiplinli ve kapsamlı bir yaklaşımı gerektirmektedir. Tüm oküler travmaların yaklaşık %20'sini oluşturan oküler kimyasal hasarlar azımsanmayacak sıklıkta olup, oftalmoloji hekimini zorlu bir tedavi yönetimiyle karşı karşıya bırakmaktadır. Özellikle çalışma hayatındaki genç yaş grubunun etkilendiği bu yaralanma tipinde bugüne kadar uygulanan, etkinliği kanıtlanmış tedavi modalitelerinin yanında, alkali yaralanmanın gözde bıraktığı kalıcı hasarla mücadele adına, yeni ilave tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, günümüzde deneysel olarak korneal alkali yanık modelleri oluşturulmakta ve bu çalışmalarda korneal lezyonların iyileşme süreleri, korneal saydamlığın sağlanması, vaskularizasyonun önlenmesi veya geriletmesi üzerine odaklanılmaktadır. Günümüzde farklı tedaviler, alkali yanıklara bağlı oluşan komplikasyonların sağaltımında denenmektedir.

Çalışmamızdaki verilere göre, epitelyal hasarda iyileşme her iki tedavi grubunda kontrol grubuna göre ilk haftadan itibaren daha hızlı başlamış olup neovaskülarizasyon, opasite, stromal ödem ve inflamasyon yoğunluğunun da yine NGF ve KGF-2 grubunda kontrol grubuna göre daha az olduğu klinik verilerde ve histolojik preparatlarla gösterilmiştir.

Mevcut sonuçlar birlikte ele alındığında, dışarıdan uygulanan sinir büyüme faktörü ve keratinosit büyüme faktörü tedavisinin korneal epitelyal hücre büyümesine olan katkısı, korneal opasite üzerine geriletici etkisi ve travma ile indüklenmiş neovaskülarizasyonu inhibe edici etkisi, bu iki büyüme faktörünü alkali yaralanmalarda terapötik bir seçenek haline getirebilir.

11. ÖZET

Amaç: Keratinosit büyüme faktörü- 2 (KGF-2) ve sinir büyüme faktörü (NGF) isimli iki büyüme faktörünün korneal alkali yanıklarında klinik ve histolojik etkilerini incelemek

Method: Alkali yanık modelinin oluşturulmasının ardından 24 adet tavşan, kontrol grubu, KGF-2 grubu ve NGF grubu olmak üzere 3 gruba bölündü. Epitelyal yara iyileşmesi, opasite ve neovaskülarizasyon gibi klinik parametreler, hasar sonrası 1., 7. ve 14. günlerde incelendi. Histolojik parametreler olarak hematoksilen / eozin (H&E) ve Masson trichrome boyalı korneal preparatlar incelendi. Matriks mettalloproteinaz-2 (MMP-2), MMP-9 ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) immünohistokimyasal analiz yöntemiyle incelendi.

Bulgular: Hasar sonrası 14. günde epitel defektinin, KGF-2 {9.9% [standart sapma (sd), \pm 6,8]} ve NGF [13.5% (sd, \pm 6.2)] gruplarında, kontrol [26% (sd, \pm 9.8)] grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla daha az olduğu görüldü ($p = 0.004$). Gruplar arasında santral korneal kalınlıkları açısından istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi ($p = 0.288$). Hasar sonrası 14. günde opasite büyüklüğü KGF-2 [34.2% (sd, \pm 7.4)] grubunda ve NGF [34.1% (sd, \pm 3.1)] grubunda kontrol [41.2% (sd, \pm 3.2)] grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla daha az olduğu görüldü ($p=0,019$). 14. gündeki vaskülarizasyon büyüklüğü değerlendirmesinde, NGF [1.4% (IQR, 0.02%–4.1%)] grubunun, kontrol [13% (IQR, 5.3%–42.4%)] grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla daha az vaskülarize olduğu görüldü. Histolojik incelemede kontrol grubuyla tedavi grupları arasında stromal ödem ve inflamasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p<0.05$). Epitel defekti büyüklüğünün ve vaskülarizasyonun histolojik değerlendirmesinde kontrol grubu ve NGF arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p<0.05$). MMP-2, MMP-9 ve TGF- β immünreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda NGF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0.05$).

Sonuç: KGF-2 ve NGF tedavisi korneal alkali yanıklarda, reepitelizasyonu sağlamada, inflamasyonu ve neovaskülarizasyonu azaltmada umut verici bir yardımcı tedavi yöntemidir.

Anahtar kelimeler : korneal alkali yanık, tavşan, keratinosit büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü

12. ABSTRACT

Purpose: To investigate clinically and histologically examining the effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) and nerve growth factor (NGF) treatments in corneal alkali burns.

Materials and Methods: After establishment of an alkali burn model, 24 rabbits were divided into three groups: control group, KGF-2 group, and NGF group. Clinical parameters such as epithelial healing, opacification and neovascularization were evaluated on the 1st, 7th and 14th days after injury. Histological parameters were examined in hematoxylin / eosin and Masson trichrome stained corneal sections. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and transforming growth factor-beta (TGF- β) immunohistochemical analysis methods were examined.

Results: On the 14th day after the injury, epithelial defect of KGF-2 {9.9% [standard deviation (sd), \pm 6.8]} and NGF [13.5% (sd, \pm 6.2)] groups were significantly lower than the control [26% (sd, \pm 9.8)] group ($P = 0.004$). No significant difference was detected between the groups in terms of central corneal thickness ($P = 0.288$). On the 14th day after the injury, opacity size of KGF-2 [34.2% (sd, \pm 7.4)] and NGF [34.1% (sd, \pm 3.1)] groups were significantly lower than the control [41.2% (sd, \pm 3.2)] group. In the assessment of vascularization size on day 14, the NGF {1.4% [interquartile range (IQR), 0.02% –4.1%]} group was found to be less vascularized with a statistically significant difference than the control [13% (IQR, 5.3% –42.4%)] group. In histological examination; There was a statistically significant difference between control group and treatment groups for stromal edema and inflammation ($p < 0.05$). In histological examination, there was a statistically significant difference between the control group and the treatment groups in terms of stromal edema and inflammation ($p < 0.05$). There was a statistically significant difference between the control group and NGF in the histological evaluation of epithelial defect size and vascularization ($p < 0.05$). When MMP-2, MMP-9 and TGF- β immunoreactivity was examined, a statistically significant increase was observed in the control group compared to the NGF group ($p < 0.05$).

Conclusion: KGF-2 and NGF therapy is a promising adjunct treatment method in corneal alkali burn, providing reepithelization, reducing inflammation and neovascularization.

Keywords: corneal alkali burn, rabbit, keratinocyte growth factor, nerve growth factor

KAYNAKLAR

1. Wagoner, M.D., 1997. Chemical injuries of the eye: current concepts in patho- physiology and therapy. *Surv. Ophthalmol.* 41 (4), 275e313.
2. Clare G, Suleman H, Bunce C, Dua H. Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Sep 12;(9):CD009379.
3. Wang, X., Zhou, X., Ma, J., Tian, H., Jiao, Y., Zhang, R., Huang, Z., Xiao, J., Zhao, B., Qian, H., Li, X., 2010. Effects of keratinocyte growth factor-2 on corneal epithelial wound healing in a rabbit model of carbon dioxide laser injury. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 971e976.
4. Çaroğlu, Murât, Nuri ARIKAN, Tavşanlarda Deneysel Oluşturulan Kornea Alkali Yanıklarının Sağaltımı Üzerine Araştırmalar *J. Fac. Vet. Med. Univ. Istanbul*28 (2). 287 - 300, 2002
5. Guru-DuttSharma, Jiucheng He, andHaydee E. P. Bazan .p38 and ERK1/2 Coordinate Cellular Migration andProliferation in EpithelialWoundHealing. *JBC Papers in Press*, March 26, 2003, DOI 10.1074/jbc.M302650200
6. Wang X, Zhou X, Ma J, et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 on corneal epithelial wound healing in a rabbit model of carbon dioxide laser injury. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:971–976.
7. Yan L, Wu W, Wang Z, et al. Comparative study of the effects of recombinant human epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on corneal epithelial wound healing and neovascularization in vivo and in vitro. *Ophthalmic Res.* 2013;49:150–160.
8. Cai J, Zhou Q, Wang Z, Guo R, Yang R, Yang X, Li W, Ahmad N, Chen Q, Hui Q, Wang X. Comparative Analysis of KGF-2 and bFGF in Prevention of Excessive Wound Healing and Scar Formation in a Corneal Alkali Burn Model. *Cornea.* 2019 Nov;38(11):1430-1437.
9. Bukowiecki, Anne, Deniz Hos, ClausCursiefenand Sabine A. Eming. Wound-Healing Studies in Cornea and Skin: Parallels, Differences and Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1257; doi:10.3390/ijms18061257
10. Esquenazi S, Bazan HE, Bui V, He J, Kim DB, Bazan NG. Topical combination of NGF and DHA increases rabbit corneal nerve regeneration after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Sep;46(9):3121-7.
11. Mastropasqua L, Massaro-Giordano G, Nubile M, Sacchetti M. Understanding the pathogenesis of neurotrophic keratitis: the role of corneal nerves. *J Cell Physiol.* 2017;232:717–724.

12. Di Fiore MSH. Atlas of Human Histology. Fourth Edn. Lea&Febiger. Philadelphia 2001; 340-5.
13. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. Eighth Edn. Appleton and Lange. Stamford 1995; 448-65.
14. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. J Cataract Refract Surg. 2011 Mar;37(3):588-98. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037. PMID: 21333881.
15. Wilhelmus KR, Huang AJW, Hwwang DG, Parrish CM, Sutpuin JE, Whitsett, JC, External Disease and Cornea Basic Science Course American Academy of Ophthalmology 1999-2000;(8): 11-3,39-54
16. Fares U, Otri AM, Al-Aqaba MA, Dua HS. Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. Cont Lens Anterior Eye. 2012 Feb;35(1):39-45. doi: 10.1016/j.clae.2011.07.004. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21885326.
17. Chalam KV, Ambati BK, Beaver HA, Grover S, Levine LM. Fundamentals and Principles of Ophthalmology 2010-2011. American Academy of Ophthalmology, 2010.
18. Kanski JJ: Kornea. In Kanski JJ, Bowling B. Klinik oftalmoloji sistematik yaklaşım, 7. Baskı, Oxford, 2011, Elsevier.
19. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). Ophthalmology. 2013 Sep;120(9):1778-85. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.01.018. Epub 2013 May 25. PMID: 23714320.
20. Aydın P, Akova YA. Temel Göz Hastalıkları. Güneş Kitabevi. Ankara 2001; 3-51, 289-92.
21. Jumblatt MM, Willer SS. Corneal endothelial repair. Regulation of prostaglandin E2 synthesis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996 Jun;37(7):1294-301. PMID: 8641832.
22. Dua H, King AJ, Joseph A. A new classification of ocular surface burns. Br J Ophthalmol. 2001;85(11):1379-83. doi: 10.1136/bjo.85.11.1379
23. Clare, G., et al., Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. Cochrane database of systematic reviews, 2012. 9: p. CD009379
24. Kuckelkorn R, Makropoulos W, Kottek A, Reim M. Retrospective study of severe alkali burns of the eyes. Klin Monbl Augenheilkd. 1993;203:397-402.
25. Wagoner, M.D., Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. Survey of ophthalmology, 1997. 41(4): p. 275-313.

26. Barouch F, Colby KA. Evaluation and initial management of patients with ocular and adnexal trauma. In: Miller JW, Azar DT, Blodi B eds. *Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Elsevier: 2008: 5071-5092.
27. Merle H, Gerard M, Schrage N. Severe ocular burns. *Eur Ophthalmic Rev.* 2011;5(2):130–3.
28. McCulley, J., *Chemical Injuries*. 2 ed. *The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice*, ed. S.G.a.T. RA1987, Boston: Little, Brown and Co.
29. Schrage, N. F. et al. Eye burns: An emergency and continuing problem. *Burns* 26, 689– 699 (2000).
30. Fish, R. and R.S. Davidson, Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Current opinion in ophthalmology*, 2010. 21(4): p. 317-21.
31. GRANT WM, KERN HL. Action of alkalis on the corneal stroma. *AMA Arch Ophthalmol.* 1955 Dec;54(6):931-9. doi: 10.1001/archopht.1955.00930020937019. PMID: 13268149.
32. T.S. Chiang, L.R. Moorman, R.P. Thomas Ocular hypertensive response following acid and alkali burns in rabbits. *Inv Ophthalmology*, 10 (1971), pp. 270-273
33. Paterson CA, Pfister RR. Intraocular pressure changes after alkali burns. *Arch Ophthalmol.* 1974;91:211–8
34. Paterson, C. A., Pfister, R. R. & Levinson, R. A. Aqueous humor pH changes after experimental alkali burns. *Am. J. Ophthalmol.* 79, 414–419 (1975).
35. Houman D. Hemmati, Kathryn A. Colby, Treating Acute Chemical Injuries of the Cornea. *EyeNet Magazine*, 2020
36. P. Singh, M. Tyagi, Y. Kumar et al., “Ocular chemical injuries and their management,” *Oman Journal of Ophthalmology*, vol. 6, no. 2, pp. 83–86, 2013.
37. Houman D. Hemmati, Kathryn A. Colby, Treating Acute Chemical Injuries of the Cornea. *EyeNet Magazine*, 2020
38. Pfister, R. R., Haddox, J. L., Dodson, R. W. & Deshazo, W. F. Polymorphonuclear leukocytic inhibition by citrate, other metal chelators, and trifluoperazine. Evidence to support calcium binding protein involvement. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 955– 970 (1984).

39. Davis AR, Ali QK, Aclimandos WA, Hunter PA. Topical steroid use in the treatment of ocular alkali burns. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:732-4.
40. Fagerholm P, Lisha G. Corneal stem cell grafting after chemical injury. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999;77:165-169.
41. McCulley JP. Chemical injuries. In: Smolin G, Thoft RA, editors. *The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice.* Boston Mass: Little Brown and Co; 1987. pp. 527-42.
42. Merle H, Gérard M, Schrage N. Ocular burns. *J Fr Ophthalmol.* 2008;31(5):1-12.
43. Ballen, P. H. Treatment of chemical burns of the eye. *Eye. Ear. Nose Throat Mon.* 43, 57-61 (1964).
44. Roper-Hall, M. J. Thermal and chemical burns. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 85, 631-653 (1965).
45. Gupta, N., M. Kalaivani, and R. Tandon, Comparison of prognostic value of Roper Hall and Dua classification systems in acute ocular burns. *The British journal of ophthalmology*, 2011. 95(2): p. 194-8
46. Burns RP, Hikes CE. Irrigation of the anterior chamber for the treatment of alkali burns. *Am J Ophthalmol.* 1979;88(1):119e20.
47. Nelson JD, Kopietz LA. Chemical injuries to the eyes. Emergency, intermediate, and long-term care. *Postgrad Med.* 1987;81(4):62e6, 69e71, 75.
48. Kuckelkorn R, Schrage N, Keller G, et al. Emergency treatment of chemical and thermal eye burns. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80:4-10.10.1034/j.1600-0420.2002.800102.x
49. Schrage NF, Langefeld S, Zschocke J, et al. Eye burns: an emergency and continuing problem. *Burns.* 2000;26:689-99.10.1016/S0305-4179(00)00044-9
50. Rihawi S, Frentz M, Becker J, et al. The consequences of delayed intervention when treating chemical eye burns. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245:1507-13.10.1007/s00417-007-0597-2.
51. Khathutshelo Mashige (2016) Chemical and thermal ocular burns: a review of causes, clinical features and management protocol, *South African Family Practice*, 58:1, 1-4.
52. Kompa S, Redbrake C, Hilgers C, Wustemeyer H, Schrage N, Remky A. Effect of different irrigating solutions on aqueous humour pH changes, intraocular pressure and histological findings after induced alkali burns. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005;83(4):467e70

53. McDermott MI, Edelhauser HF, Hack HM et al. (1998): Ophthalmic irrigants. A current review and update. *Ophthalmic Surg* 19: 724–733.
54. Herr RD, White GL Jr, Bernhisel K, et al. Clinical comparison of ocular irrigation fluids following chemical injury. *Am J Emerg Med*. 1991;9:228–31.
55. Schrage NF, Kompa S, Haller W, et al. Use of an amphoteric lavage solution for emergency treatment of eye burns. *Burns*. 2002;28:782–6.10.1016/S0305-4179(02)00194-8
56. Merle H, Donnio A, Ayeboua L, et al. Alkali ocular burns in Martinique (French West Indies). *Burns*. 2005;31:205–11.10.1016/j.burns.2004.09.001
57. Merle H, Gérard M, Schrage N. Ocular burns. *J Fr Ophthalmol*. 2008;31(5):1–12.
58. Saari K & Parvi V (1984): Occupational eye injuries in Finland. *Acta Ophthalmol Suppl* 161: 17–28.
59. Ren G, Song C, Liang P, Zhang Z. The effect of fibronectin on re-epithelialization of rabbits cornea after alkali burn. *Yan Ke Xue Bao*. 1994;10(3):138e43
60. Spigelman AV, Vernot JA, Deutsch TA, Peyman GA, Molnar J. Fibronectin in alkali burns of the rabbit cornea. *Cornea*. 1985;4(3):169e72
61. Reim M, Busse S, Leber M, Schulz C. Effect of epidermal growth factor in severe experimental alkali burns. *Ophthalmic Res*. 1988;20(5):327e31
62. Reim M, Kehrer T, Lund M. Clinical application of epiderm growth factor in patients with most severe eye burns. *Ophthalmologica*. 1988;197(4):179e84
63. Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation. *Ophthalmologica*. 1997;211(6):358e61
64. Toshida H, Odaka A, Koike D, Murakami A. Effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Curr Eye Res*. 2008;33(1):13e8
65. Goto, E., Shimmura, S., Shimazaki, J. & Tsubota, K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 20, 807–10 (2001).

66. Vajpayee, R. B. et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br. J. Ophthalmol.* 87, 1312–1316 (2003).
67. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology.* 2004;111(6):1115e20. doi:10.1016/j.ophtha.2003.10.019
68. Pfister RR, Paterson CA. Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye. *Ophthalmology.* 1980 Oct;87(10):1050-1057. DOI: 10.1016/s0161-6420(80)35126-9.
69. Ralph RA. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea.* 2000;19(3):274e7. doi:10.1097/00003226-200005000-00003
70. Pfister RR, Haddox JL, Sommers CI. Effect of synthetic metalloproteinase inhibitor or citrate on neutrophil chemotaxis and the respiratory burst. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(7):1340e9.
71. Rosenthal, P. & Cotter, J. The Boston scleral lens in the management of severe ocular surface disease. *Ophthalmology Clinics of North America* 16, 89–93 (2003).
72. Chung JH, Paek SM, Choi JJ, Park YK, Lee JS, Kim WK. Effect of topically applied 0.1% dexamethasone on endothelial healing and aqueous composition during the repair process of rabbit corneal alkali wounds. *Curr Eye Res.* 1999;18(2):110e6.
73. Brent BD, Karcioğlu ZA. Effect of topical corticosteroids on goblet-cell density in an alkali burn model. *Ann Ophthalmol.* 1991;23(6):221e3.
74. Beams, R., Linabery, L. & Grayson, M. Effect of Topical Corticosteroids on Corneal Wound Strength. *Am. J. Ophthalmol.* 66, 1131–1133 (1968).
75. Donshik, P. C. et al. Effect of topical corticosteroids on ulceration in alkali-burned corneas. *Arch. Ophthalmol.* 96, 2117–2120 (1978).
76. Paterson CA, Williams RN, Parker AV. Characteristics of polymorphonuclear leukocyte infiltration into the alkali burned eye and the influence of sodium citrate. *Exp Eye Res.* 1984;39(6):701e8. doi:10.1016/0014-4835(84)90069-1
77. Sharma N, Kaur M, Agarwal T, Sangwan VS, Vajpayee RB. Treatment of acute ocular chemical burns. *Surv Ophthalmol.* 2018;63:214–235. doi:10.1016/j.survophthal.2017.09.005

78. Soleimani M, Naderan M. Management Strategies of Ocular Chemical Burns: Current Perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2020;14:2687-2699
79. Lin, A., Patel, N., Yoo, D., DeMartelaere, S. & Bouchard, C. Management of ocular conditions in the burn unit: thermal and chemical burns and Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *J. Burn Care Res*. 32, 547–60 (2011).
80. Dua, H.S., Ting, D.S.J., Al Saadi, A. et al. Chemical eye injury: pathophysiology, assessment and management. *Eye* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41433-020-1026-6>
81. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benitez-DelCastillo JM, Hossain PN, et al. Neurotrophic keratopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2018;66:107–31.
82. Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, Lomb DJ, Schoell MC, Straub JA, Xie L (2004). "NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand?". *NGF and Related Molecules in Health and Disease*. Progress in Brain Research. 146. pp. 111–26.
83. Aras, S.Y., Sari, E. K. NGF ve Fonksiyonları. *MAE Vet Fak Derg*, 2 (1): 91-96, (2017).
84. Levi-Montalcini R, Cohen S. In vitro and in vivo effects a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1956; 42 (9): 695-9.
85. Cohen S. (1960). Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. N. A. S.*, 46: 302-311.
86. Aloe L. Levi-Montalcini R.: The discovery of Nerve Growth Factor and modern neurobiology. *Trends in Cell Biol*. 2004; 14 (7): 395-9.
87. Pizutti A, Borsini G, Falini A, Rugarli EI, Sidoli A, Barelle FE, Scarlato G, Silani V. Detection of beta Nerve Growth Factor mRNA in the human fetal brain. *Brain Res*. 1990; 518: 337-341.
88. T. Blanco-Mezquita, C. Martinez-Garcia, R. Proenca et al., "Nerve growth factor promotes corneal epithelial migration by enhancing expression of matrix metalloproteinase-9," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 54, no. 6, pp. 3880–3890, 2013.
89. Lambiase A, Manni L, Bonini S, et al. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1063–1069.

90. Lambiase A, Micera A, Pellegrini G, et al. In vitro evidence of nerve growth factor effects on human conjunctival epithelial cell differentiation and mucin gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:4622–4630.
91. Sacchetti M, Lambiase A. Neurotrophic factors and corneal nerve regeneration. *Neural Regen Res* 2017; 12:1220–1224.
92. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol*. 2014;59:263–285.
93. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 2003;76:521–542.
94. Mastropasqua L, Massaro-Giordano G, Nubile M, Sacchetti M. Understanding the pathogenesis of neurotrophic keratitis: the role of corneal nerves. *J Cell Physiol*. 2017;232:717–724
95. Sheha H., Tighe S., Hashem Ö., Hayashida Y. Update On Cenergermin Eye Drops In The Treatment Of Neurotrophic Keratitis. *Clin Ophthalmol*. 7 Ekim 2019; 13: 1973-1980
96. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154–62.
Lambiase A, Mantelli F, Sacchetti M, et al. Clinical applications of NGF in ocular diseases. *Arch Ital Biol* 2011;149:283–92.
97. Lambiase A, Sacchetti M, Bonini S. Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2012;23:296–302.
98. Bonini S, Aloe L, Bonini S, et al. Nerve growth factor (NGF): an important molecule for trophism and healing of the ocular surface. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:531–7.
99. Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 2000;107:1347–1351. discussion 1351-1342.
100. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med*. 1998;338:1174–1180.
101. Tan, M. H., Bryars, J., Moore, J. Use of nerve growth factor to treat congenital neurotrophic corneal ulceration. *Cornea*. 2006 Apr;25(3):352-5.
102. Sacchetti M, Lambiase A, Schmidl D, Schmetterer L, Ferrari M, Mantelli F, Allegretti M, Garhofer G. Effect of recombinant human nerve growth factor eye drops in patients with dry eye: a phase IIa, open label, multiple-dose study. *Br J Ophthalmol*. 2020 Jan;104(1):127-135. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312470. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30944103.

103. M. Cellini, E. Bendo, G. O. Bravetti, and E. C. Campos, "The use of nerve growth factor in surgical wound healing of the cornea," *Ophthalmic Research*, vol. 38, no. 4, pp. 177–181, 2006.
104. J. H. Park, S. S. Kang, J. Y. Kim, and H. Tchah, "Nerve growth factor attenuates apoptosis and inflammation in the diabetic cornea," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 57, no. 15, pp. 6767–6775, 2016.
105. M. J. Joo, K. R. Yuhan, J. Y. Hyon et al., "The effect of nerve growth factor on corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis," *Archives of Ophthalmology*, vol. 122, no. 9, pp. 1338–1341, 2004.
106. K. Ma, N. Yan, Y. Huang, G. Cao, J. Deng, and Y. Deng, "Effects of nerve growth factor on nerve regeneration after corneal nerve damage," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 4584–4589, 2014.
107. Deeks ED, Lamb YN. Cenergermin: A Review in Neurotrophic Keratitis. *Drugs*. 2020 Apr;80(5):489-494. doi: 10.1007/s40265-020-01289-w. PMID: 32185680.
108. Sacchetti M, Bruscolini A, Lambiase A. Cenergermin for the treatment of neurotrophic keratitis. *Drugs Today (Barc)*. 2017 Nov;53(11):585-595. doi: 10.1358/dot.2017.53.11.2722395. PMID: 29451275.
109. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:802-806.
110. Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, Katsumata T, Negoro T, Nakatsuka M, Birnbaum D, Coulier F, Itoh N. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem*. 1997 Sep 12;272(37):23191-4. doi: 10.1074/jbc.272.37.23191. PMID: 9287324.
111. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*. 1989;245:752-755.
112. Tagashira S, Harada H, Katsumata T, Itoh N, Nakatsuka M. Cloning of mouse FGF10 and up-regulation of its gene expression during wound healing. *Gene*. 1997 Sep;197(1-2):399-404. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00187-x.
113. Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF) -10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem* 1998;273:13230–5.

114. Marchese, C., Felici, A., Visco, V., Lucania, G., Igarashi, M., Picardo, M., Frati, L., Torrisi, M.R., 2001. Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116, 623e628.
115. Wang X, Zhou X, Ma J, et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 on corneal epithelial wound healing in a rabbit model of carbon dioxide laser injury. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:971–976.
116. Soler PM, Wright TE, Smith PD, Maggi SP, Hill DP, Ko F, Jimenez PA, Robson MC. In vivo characterization of keratinocyte growth factor-2 as a potential wound healing agent. *Wound Repair Regen.* 1999 May-Jun;7(3):172-8. doi: 10.1046/j.1524-475x.1999.00172.x. PMID: 10417753.
117. Carrington LM, Boulton M. Hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor regulation of epithelial and stromal corneal wound healing. *J Cataract Refract Surg.* 2005 Feb;31(2):412-23. doi: 10.1016/j.jcrs.2004.04.072. PMID: 15767167.
118. Wilson SE, He YG, Weng J, Zieske JD, Jester JV, Schultz GS. Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 1994 Dec;59(6):665-78. doi: 10.1006/exer.1994.1152. PMID: 7698260.
119. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S. Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Jul;36(8):1524-9. PMID: 7601632.
120. Pablo A. Jimenez, Mark A. Rampy. Keratinocyte Growth Factor-2 Accelerates Wound Healing in Incisional Wounds. *Journal of Surgical Research* 81, 238–242 (1999).
121. Xia YP, Zhao Y, Marcus J, Jimenez PA, Ruben SM, Moore PA, Khan F, Mustoe TA. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J Pathol.* 1999 Aug;188(4):431-8.
122. Soler P. M., Wright T. E., Smith P. D., Maggi S. P., Hill D. P., Ko F., Jimenez P. A., Robson M. C., *Wound Repair Regen.*, 7, 172—178 (1999)
123. Liu L, Li Y, Huang S, Lin J, Zhang W. Keratinocyte growth factor-2 on the proliferation of corneal epithelial stem cells in rabbit alkali burned cornea. *Yan ke xue bao* (2016). 2007 Jun;23(2):107-116.
124. Cai, JianQiu MBBS^{*†}; Zhou, Qingde MSc[†]; Wang, Zhitao MSc[†]; Guo, Ruide MBBS[‡]; Yang, Rongshuai MSc[†]; Yang, Xuanxin MSc[†]; Li, Wenqing MSc[†]; Ahmad, Naveed PhD[§]; Chen, Qi MBBS^{†¶}; Hui, Qi PhD^{*†}; Wang, Xiaojie

PhD*† Comparative Analysis of KGF-2 and bFGF in Prevention of Excessive Wound Healing and Scar Formation in a Corneal Alkali Burn Model, *Cornea*: November 2019 - Volume 38 - Issue 11 - p 1430-1437

125. Li ZN, Yuan ZF, Mu GY, et al. Inhibitory effect of polysulfated heparin endostatin on alkali burn induced corneal neovascularization in rabbit. *Int J Ophthalmol*. 2015;8:234–238.

126. Fini, M. E., Cook, J. R. & Mohan, R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch. Dermatol. Res*. 290 Suppl, S12-23 (1998).

127. Stern ME, Gao J, Beuerman RW, Farley W, Zhuo L, McDonnell P. Effects of fourth-generation uoroquinolones on the ocular surface, epithelium, and wound healing. *Cornea*. 2006;25(9):S12-S24.

128. Schneider NI, Plieschnegger W, Geppert M, et al. Validation study of the Esohisto consensus guidelines for the recognition of microscopic esophagitis (histoGERD Trial). *Hum Pathol*. 2014;45:994–1002.

129. Arikan S, Karaca T, Ertekin YH, et al. Effect of topically applied azithromycin on corneal epithelial and endothelial apoptosis in a rat model of corneal alkali burn. *Cornea*. 2016;35:543–549.

130. Dursun A, Arici MK, Dursun F, et al. Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int J Ophthalmol*. 2012;5:448–451.

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

132. Lambiase, A.; Bonini, S.; Aloe, L.; Rama, P.; Bonini, S. Anti-inflammatory and healing properties of nerve growth factor in immune corneal ulcers with stromal melting. *Arch. Ophthalmol*. 2000, 118, 1446–1449.

133. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Surv Ophthalmol*. 2012 Sep;57(5):415-29.

134. Chang, J. H., Gabison, E. E., Kato, T. & Azar, D. T. Corneal neovascularization. *Curr. Opin. Ophthalmol*. 12, 242–249 (2001).

135. Den, S., Sotozono, C., Kinoshita, S. & Ikeda, T. Efficacy of early systemic betamethasone or cyclosporin A after corneal alkali injury via inflammatory cytokine reduction. *Acta Ophthalmol. Scand.* 82, 195–199 (2004).
136. Kuckelkorn, R., Schrage, N., Keller, G. & Redbrake, C. Emergency treatment of chemical and thermal eye burns. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 80, 4–10 (2002).
137. Ferrari G, Dastjerdi MH, Okanobo A, Cheng SF, Amparo F, Nallasamy N, et al. Topical ranibizumab as a treatment of corneal neovascularization. *Cornea.* 2013;32(7):992-7.
138. Li, D. Q. et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 73, 449–459 (2001).
139. Fini, M.E., J.R. Cook, and R. Mohan, Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res*, 1998. 290 Suppl: p. S12-23.
140. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2000; 70: 419-428.
141. Smith, V. A., Rishmawi, H., Hussein, H. & Easty, D. L. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 147–153 (2001).
142. Asahi, M. et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 21, 7724–7732 (2001).
143. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463–516 (2001).
144. Behzadian, M. A., Wang, X. L., Windsor, L. J., Ghaly, N. & Caldwell, R. B. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 853–859 (2001).

145. Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, Trinkaus-Randall. TGF-beta1 regulates TGFbeta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Mol Pathol* 2002; 55: 164- 176.

146. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong JW, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 625-637.

