

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RATLARDA IL-1 ANTAGONİSTİNİN KORNEAL  
VASKÜLARİZASYON ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ**

DR. TÜRKAN ÖZGE TEKE

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2023



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RATLARDA IL-1 ANTAGONİSTİNİN KORNEAL  
VASKÜLARİZASYON ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ**

DR. TÜRKAN ÖZGE TEKE

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF. DR. NAZMİ ZENGİN

KONYA, 2023

## TEŞEKKÜR

Göz Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde büyük katkı ve emekleri olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Nazmi Zengin'e ve değerli hocalarım, Prof. Dr. Mehmet Okka, Prof. Dr. Ahmet Özkağnıcı, Prof. Dr. Hürkan Kerimoğlu, Prof. Dr. Günhal Şatırtav Akdeniz, Prof. Dr. Refik Oltulu, Doç. Dr. Gülfidan Bitirgen ve Dr. Öğr. Üyesi Selman Belviranlı, Dr. Öğr. Üyesi Enver Mirza, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Adam'a,

Tez aşamasında tanıştığım için kendimi şanslı hissettiğim ve tezimin ilerlemesinde destekleri olan Patoloji Anabilim dalından Doç. Dr. Pembe Oltulu'ya, Biyokimya Anabilim dalından Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Kılınç'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma ortamımı güzelleştiren, uzmanlık eğitimini tamamlamış ve hala araştırma görevlisi olarak görev yapan tüm arkadaşlarıma;

Yoğun çalışma temposunda dahi desteklerini ve hoşgörülerini esirgemeyen Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda servis, ameliyathane, poliklinik ve birimlerde çalışan hemşire, teknisyen, sekreter ve personel arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, her türlü fedakârlık ve özveriyi gösteren eşim Dr. Furkan Teke'ye, anneme, babama ve sevgili kardeşlerime,

Minnet, saygı, sevgi ve şükranlarımı sunar; içtenlikle teşekkür ederim.

Dr. Türkan Özge Teke

Konya, 2023

## ÖZET

### RATLARDA IL-1 ANTAGONİSTİNİN KORNEAL VASKÜLARİZASYON ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ

**Amaç:** Çalışmanın amacı, deneysel korneal kimyasal yanık modellemesinde IL-1 reseptör antagonistinin korneal neovaskülarizasyon üzerine etkisini göstermektir. IL-1alfa reseptör antagonistinin (IL-1ra) etkisini kontrol grubu, plasebo grubu ve bevacizumab grubu ile karşılaştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları laboratuvarında 40 adet Wistar Albino cinsi dişi 8'erli ratlar 5 gruba ayrıldı. Ratların her iki göz kornealarına gümüş nitrat çubuk uygulanarak kimyasal yanık modellemesi ile korneal neovaskülarizasyonlar elde edildi. Grup I kontrol grubu olup tedavi almadı. Anestezi altında 1. ve 5. gün subkonjonktival olmak üzere Grup II 0.1 ml serum fizyolojik, Grup III 0.25 mg/0.1ml IL-1a reseptör antagonisti, Grup IV 2.5 mg/0.1 ml IL-1a reseptör antagonisti, Grup V 2.5 mg/0.1 ml bevacizumab uygulanmıştır. Rat korneaları 14. günde eksize edilip sağ gözleri patolojik incelemeye, sol gözleri biyokimyasal ELISA incelemesine gönderilmiştir. Patolojik incelemede hematoksilen & eozin, CD 34 ve IL-1 alfa boyanması ile inflamatuvar ve damarsal parametreler mikroskopik olarak incelenmiştir. Biyokimyasal ELISA testinde ise IL-1 alfa, Transforming Büyüme Faktörü (TGF-B), Tümör Nekrozis Faktör (TNF-a), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler istatistiksel olarak incelenmiştir.

**Bulgular:** Çalışma grupları arasında Grup I ratlarda IL-1 $\alpha$  düzeyinin Grup III, Grup IV ve Grup V ratlara kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklı bir fark tespit edildi (p değerleri sırasıyla; p=0,001; p=0,001; p=0,001). VEGF düzeylerinin dağılımında Grup IV ratlarda ölçülen VEGF düzeyinin Grup I, Grup III ve Grup V ratlara kıyasla daha düşük olmasından kaynaklı anlamlı bir fark izlendi (p değerleri sırasıyla; p=0,003; p=0,040; p<0,001; p<0,001; p=0,005; p<0,001). Bu sonuçlara göre en düşük ortalama VEGF değeri 101,08 olup Grup IV'te tespit edilmiştir. Patolojik incelemede ise Grup IV ratlardaki inflamatuvar membran oranı Grup II ve Grup V ratlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p değerleri sırasıyla; p=0,041; p=0,005). Fibroblast proliferasyon düzeyinde Grup II ratlarda, Grup III ve Grup IV ratlara göre daha yüksek olmasından kaynaklı istatistiksel bir fark bulundu (p değerleri sırasıyla; p=0,030; p=0,045). Damarsal

yapılaşma değerlendirildiğinde Grup I ratlardaki damarsal yapılaşma düzeyinin Grup IV ve Grup V ratlara göre daha yüksek, Grup II ratlarda Grup IV ratlara göre daha yüksek olduğu görüldü (p değerleri sırasıyla; p=0,015; p=0,030; p=0,045). Damarsal yapılaşma ortalama skoru 1,5 değeri ile en düşük Grup IV'te izlendi. Grup

**Sonuç:** Bu çalışmada korneal kimyasal yanık modellemesinde subkonjonktival IL-1 $\alpha$  reseptör antagonistinin IL-1 $\alpha$  ve VEGF düzeyini düşürdüğü ELISA ile gösterilmiştir. Korneaların patolojik incelemesinde fibroblast proliferasyonunun, inflamatuvar ve vasküler yapıların azalmış olduğu görülmüştür. Sonuçlar karşılaştırıldığında IL-1 $\alpha$  reseptör antagonistinin antianjiogenik etkisi bevacizumab grubuna kıyasla daha yüksek oranda izlenmiştir. IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti inflamasyona sekonder oluşan korneal neovaskülarizasyonlar üzerinde inhibitör etkiye sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** IL-1 alfa reseptör antagonisti, Korneal vaskülarizasyon, Alkali korneal yanık

## ABSTRACT

### INHIBITORY EFFECT of IL-1 ANTAGONIST ON CORNEAL VASCULARIZATIONS IN RATS

**Purpose:** The aim of this study was to demonstrate the effect of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on corneal neovascularization in an experimental corneal chemical burn model. The effect of IL-1ra was compared with a control group, a placebo group, and a bevacizumab group.

**Materials and Methods:** In this study, 40 female Wistar Albino rats were divided into 5 groups and chemically induced corneal neovascularization by applying silver nitrate sticks to both eyes. Group I served as the control group without any treatment. Group II received 0.1 ml physiological saline subconjunctivally on day 1 and day 5 under anesthesia. Group III received 0.25 mg/0.1 ml IL-1ra, Group IV received 2.5 mg/0.1 ml IL-1ra, and Group V received 2.5 mg/0.1 ml bevacizumab via subconjunctival administration. After 14 days, rat corneas were excised for pathological examination of the right eyes and for biochemical ELISA examination of the left eyes. Pathological examination involved microscopic analysis of inflammatory and vascular parameters using hematoxylin & eosin, CD34, and IL-1 alpha staining. Biochemical ELISA test measured IL-1 alpha, Transforming Growth Factor-B (TGF-B), Tumor Necrosis Factor-a (TNF-a), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), and Malondialdehyde (MDA) levels.

**Results:** According to the ELISA test results among the study groups, there was a statistically significant difference in the distribution of IL-1 alpha levels. This difference was due to higher IL-1 alpha levels in Group I rats compared to Group III, Group IV, and Group V rats (p values:  $p=0.001$ ;  $p=0.001$ ;  $p=0.001$ , respectively). In the distribution of VEGF levels, significant differences were observed with the lowest mean VEGF value of 101.08 in Group IV compared to Group I, Group III, and Group V rats (p values:  $p=0.003$ ;  $p=0.040$ ;  $p<0.001$ ;  $p<0.001$ ;  $p=0.005$ ;  $p<0.001$ , respectively). In the pathological examination, Group IV rats had a significantly lower inflammatory membrane ratio compared to Group II and Group V rats (p values:  $p=0.041$ ;  $p=0.005$ ). Fibroblast proliferation was higher in Group II rats compared to Group III and Group IV rats (p values:  $p=0.030$ ;  $p=0.045$ ). When evaluating vascular structuring, Group I rats showed higher vascular structuring compared to Group IV and Group V rats, and Group II rats had higher vascular structuring than Group IV rats (p

values:  $p=0.015$ ;  $p=0.030$ ;  $p=0.045$ ). The lowest average vascular structuring score of 1.5 was observed in Group IV.

**Conclusion:** This study demonstrated that subconjunctival IL-1 alpha receptor antagonist reduced IL-1 $\alpha$  and VEGF levels in corneal chemical burn model as shown by ELISA. Pathological examination of corneas revealed decreased fibroblast proliferation, inflammatory, and vascular structures. As a result, the anti-angiogenic effect of IL-1 $\alpha$  receptor antagonist was observed to be higher compared to the bevacizumab group. IL-1 alpha receptor antagonist has an inhibitory effect on corneal neovascularization secondary to inflammation.

**Keywords:** IL-1 alfa Receptor Antagonist, Corneal Vascularization, Alkali induced Corneal Burn

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kornea .....	3
2.1.1. Kornea Anatomisi .....	3
2.1.2. Kornea Embriyolojisi .....	3
2.1.3. Kornea Histolojisi .....	3
2.1.4. Kornea İnnervasyonu .....	7
2.2. Gözyaşı Film Tabakası.....	7
2.3. Korneal Neovaskülarizasyon.....	7
2.3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Epidemiyolojisi.....	8
2.3.2. Korneal Neovaskülarizasyon Patolojisi.....	8
2.3.3. Korneal Neovaskülarizasyonda İnflamasyonun Rolü .....	9
2.3.4. Korneal Neovaskülarizasyon Etiyolojisi .....	12
2.3.5. Korneal Neovaskülarizasyon Tedavisi .....	15
2.3.6. IL-1 $\alpha$ Reseptör Antagonisti / Anakinra .....	17
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>18</b>
3.1. Deney Hayvanları .....	18
3.2. Gruplar .....	18
3.3. Anestezi Tekniği .....	19
3.4. Gümüş Nitrat Çubuğu ile Korneal Kimyasal Yanık Modellemesi .....	19
3.5. İlaçların Uygulanması .....	20
3.6. Korneaların Fotoğraflanması.....	21
3.7. Korneaların Eksizyonu .....	22
3.8. Korneaların Patolojik Değerlendirilmesi .....	22

3.9. Korneaların Biyokimyasal ELISA Değerlendirmesi .....	23
3.10. İstatistiksel Analiz.....	23
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
4.1. Kornea Örneklerinin ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	24
4.2. Kornea Örneklerinin Patolojik Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	29
4.3 Patoloji Örneklerinin Fotoğraflanması.....	37
4.4. Korneaların Fotoğraflanması.....	43
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>52</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>

## TABLÖLAR

<b>Tablo 1:</b>	Biyokimyasal parametrelerin gruplar arasında dağılımı.....	25
<b>Tablo 2:</b>	Gruplar arasında membran ve fibroblast demet dağılımı.....	29
<b>Tablo 3:</b>	Patoloji sonuçlarının gruplar arasında dağılımı.....	30
<b>Tablo 4:</b>	Gruplar arasında inflamatuvar hücrelerin dağılımı .....	37

## ŞEKİLLER

Şekil 1: Kornea epiteli ve Bowman membranı (11) .....	4
Şekil 2: Kornea katmanlarının histolojik gösterimi (11) .....	5
Şekil 3: Endotel tabakasının speküler mikroskopi görünümü (11) .....	6
Şekil 4: Neovaskülarizasyonda makrofajların rolü. VEGF-A ve makrofajlar arasındaki ilişki şematik olarak gösterilmiştir (16) .....	11
Şekil 5: Ucu %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat kaplı çubuk .....	19
Şekil 6: Üstte kimyasal yanık uygulaması öncesi kornea fotoğrafı, altta kimyasal yanık uygulaması sonrası kornea fotoğrafı .....	20
Şekil 7: Anakinra (Kineret 100mg/0,67 ml) .....	21
Şekil 8: Bevacizumab (Altuzan 100mg/ml ampul) .....	21
Şekil 9: IL-1 $\alpha$ düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	26
Şekil 10: TGF B düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	27
Şekil 11: TNF-a düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	27
Şekil 12: VEGF düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	28
Şekil 13: MDA düzeylerinin gruplar arasında dağılımı .....	29
Şekil 14: Epitel proliferasyon skorunun gruplar arasında dağılımı .....	31
Şekil 15: Fibroblast proliferasyon skorunun gruplar arasında dağılımı .....	31
Şekil 16: Damarsal yapılaşma skorunun gruplar arasında dağılımı .....	32
Şekil 17: İnflamatuar yapılaşma skorunun gruplar arasında dağılımı .....	33
Şekil 18: Epitel hücrelerinin sitoplazmik IL-1 $\alpha$ boyanma gruplar arasında dağılımı .....	34
Şekil 19: Epitel hücrelerinin membranöz IL-1 $\alpha$ boyanma gruplar arasında dağılımı .....	34
Şekil 20: İltihap hücrelerinde IL-1 $\alpha$ boyanma gruplar arasında dağılımı .....	35
Şekil 21: Endotel hücrelerinde IL-1 $\alpha$ boyanma gruplar arasında dağılımı .....	35
Şekil 22: Fibroblast hücrelerinde IL-1 $\alpha$ boyanma gruplar arasında dağılımı .....	36
Şekil 23: Kornea örneklerinin patolojik olarak incelenmesinde genel verileri gösteren fotoğraf .....	37
Şekil 24: Normal kornea ve hasarlı kornea patolojik gösterimi .....	38
Şekil 25: x100 büyütmede Hematoksilin&Eozin boyası ile boyanmış kornea örneklerin fotoğrafları .....	40
Şekil 26: Sırasıyla X100 ve X400 büyütmede CD34 damar boyası ile boyanmış kornea örneklerinin fotoğrafları .....	42

<b>Şekil 27:</b> İmmunohistokimyasal membranöz ve sitoplazmik IL-1 $\alpha$ boyanmayı göstermekte olan fotoğraf. ....	42
<b>Şekil 28:</b> Rat kornealarının fotoğraflanması .....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ECM</b>	: Ekstraselüler Matriks
<b>EO</b>	: Eozinofil
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>HSK</b>	: Herpes Simpleks Keratiti
<b>HSV</b>	: Herpes Simpleks Virüs
<b>IL-1 ra</b>	: İnterlökin -1 reseptör antagonisti
<b>IL-1</b>	: İnterlökin -1
<b>IL-1a</b>	: İnterlökin -1 alfa
<b>IL-1b</b>	: İnterlökin -1 beta
<b>IL-2</b>	: İnterlökin -2
<b>IL-6</b>	: İnterlökin -6
<b>IL-7</b>	: İnterlökin-7
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>IRS-1</b>	: İnsülin Benzeri Substrat-1
<b>LYM</b>	: Lenfosit
<b>MCF</b>	: Makrofaj
<b>µm</b>	: mikrometre
<b>mm</b>	: milimetre
<b>MMP 2</b>	: Matriks Metalloproteinaz 2
<b>MMP 9</b>	: Matriks Metalloproteinaz 9
<b>MMP 12</b>	: Matriks Metalloproteinaz 12
<b>TGF-B</b>	: Transforming Growth Faktör beta
<b>TNF-α</b>	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>VLA</b>	: Çok Geç Antijen

## 1. GİRİŞ

Kornea gözün en ön kısmında yer alan, göze gelen ışığı geçiren ve kıran saydam bir dokudur. Saydam olması görme fonksiyonunun gerçekleşebilmesi için gereklidir. Korneaya saydamlık sağlayan avasküler yapıda olmasıdır. Ayrıca kornea göze karşı gelen travma, yabancı cisim penetrasyonu, kimyasal madde teması gibi tüm durumlarda ilk ve en çok etkilenen dokulardan biridir.

Korneanın yapısını oluşturan tabakalar dıştan içe epitel tabaka, Bowman tabakası, Stroma, Desmecent membran ve endotel hücre tabakasıdır. Bu yapıların ayrı ayrı görevleri sayesinde kornea işlevini gerçekleştirmektedir (1). Ayrıca gözyaşı film tabakası ışığın kırılmasına yardım eder ve görme fonksiyonuna katkıda bulunur, içerdiği lizozomal enzimlerle antimikrobiyal etki ve lipid tabaka ile yüzeyde uzun süre kalarak kornea epitelinin yapısını korur (2). Korneal stroma tabakası ekstraselüler matrix içeriği ve dizilimi ile korneal avaskülarizasyonun sağlandığı özel bir dokudur. Stromal kollajen fibriller korneanın şeklini, mekanik dayanıklılığını, transparan yapısını ve avaskülaritesini oluştururlar (3).

Göze gelen travmaların içerisinde %9.9'unu kimyasal madde ile yaralanmalar oluşturur. Bu durumdan en çok etkilenen en ön kısımda yer alan korneadır (4). Korneal epitel defekti, periorbital ödem ve kızarıklık, konjonktival ödem ve iskemi, limbal iskemi, sembleferon, kapak kenarlarında skatrizasyon ve kirpik kaybı gelişebilir. Bu durumlar içerisinde en önemlilerinden biri korneal skar ve vaskülarizasyon gelişimidir (5). Kimyasal yanık sonrasında korneal skar ve vaskülarizasyon gelişimi görme keskinliğini düşürmektedir (6).

Korneal kimyasal yanık sonrası inflamatuvar bir süreç başlamaktadır. Kimyasal temas sonrası oküler yüzeyde IL-1, interlökin-6 (IL-6), Tümör Nekrozis Faktör-a (TNF-a) gibi proinflamatuvar sitokinlerin arttığı görülmüştür. Limbal hücre hasarı sonucu vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), leptin, prostaglandin, interlökin-2 (IL-2), interlökin-8 (IL-8), platelet büyüme faktörü (PDGF) gibi anjiojenik moleküller salınarak korneal vaskülarizasyon meydana gelir (7). Göz yaşı film tabakasında IL-1 reseptörünü baskılayan IL-1 reseptör antagonisti ve vitamin A varyasyonları olduğu gösterilmiştir. Göz yaşı bu moleküller sayesinde inflamasyonu azaltmaya çalışmaktadır (8).

Korneal anjiojenik ve antianjiojenik moleküller arası oluşan dengesizlikten dolayı korneada olmaması gereken yeni damarlar meydana gelir. Korneal vaskülarizasyon sonrası kalıcı görme kaybı gelişir ve günümüzde kesin bir tedavisi mevcut değildir. Günümüzde korneal neovaskülarizasyonların yönetimi topikal damla ya da enjeksiyonlar, laser fotokoagülasyon, korneal transplantasyon cerrahileri şeklinde sıralanabilmektedir. Topikal damla tedavilerinde proinflamatuvar sitokinleri baskılayan anti inflamatuvar ajanlar ve steroid türevi ilaçlar lenfosit sayısını azaltır, antiangiogenik bir etki oluştururlar. Anti- VEGF moleküllerin topikal ya da enjeksiyon şeklinde kullanımları VEGF reseptörünü bloke ederek yeni damar oluşumunu engellemeye çalışmaktadır (9).

Bu tez çalışmasında ise deneysel olarak rat kornealarında korneal kimyasal yanık modellenmesi oluşturulmuştur. IL-1'in bu süreçte oküler yüzeyde inflamasyonu başlatan faktörler arasında olduğu ve vaskülarizasyonda rol oynadığı düşünülmüştür. Bu nedenle kimyasal yanık sonrası oluşturulan korneal vaskülarizasyonlara IL-1 reseptör antagonisti (Anakinra) molekülü uygulanarak bu molekülün inflamasyon ve vaskülarizasyon üzerine etkilerini göstermek amaçlanmıştır. Sonuçların kontrol grubu, Serum fizyolojik (%0.9 NaCl) grubu, Anti-VEGF (Bevacizumab) grubu ile karşılaştırılarak etkisinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kornea**

#### **2.1.1. Kornea Anatomisi**

Erişkinlerde ortalama kornea horizontal çapı 11.5 mm - 12 mm arasında, vertikal çapı ise 9mm - 10 mm civarındadır. Yaklaşık kalınlığı ise santralde 0.5 mm'dir (10). Kornea sklera ile beraber göz küresinin duvarını oluşturur ve göz içi yapıları korur. Periferde daha düz, santralde dik yapısı ile optik asferik bir yapıdadır. Ayrıca refraktif yapısı ile görme fonksiyonuna katkıda bulunur. Göze gelen ışınları minimum saçılma ile retina üzerine odaklamakla görevli gözün en ön kısmında yer alan yapıdır (11).

#### **2.1.2. Kornea Embriyolojisi**

Kornea epitelı yüzey ektoderminden gelişir ancak zamanla kornea stromasını oluşturan mezenkimal doku ile birleşir ve saydamlaşır (12). Kornea epitelı altındaki tabakalar mezenkimal dokudan köken alır. Bowman membranı stromanın yüzeyel mezenkimal hücrelerinden gelişir. Stroma mezenkimal hücrelerden, Descemet membran ise derim stromal mezenkimal hücrelerden köken alır. Endotel hücreleri posterior stromal mezenkimal hücrelerden oluşur önce kübik şekilde olan hücreler zamanla daha düz bir yapı kazanırlar (13).

#### **2.1.3. Kornea Histolojisi**

Kornea dokusu 5 adet tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar dıştan içe doğru şu şekilde sıralanmaktadır:

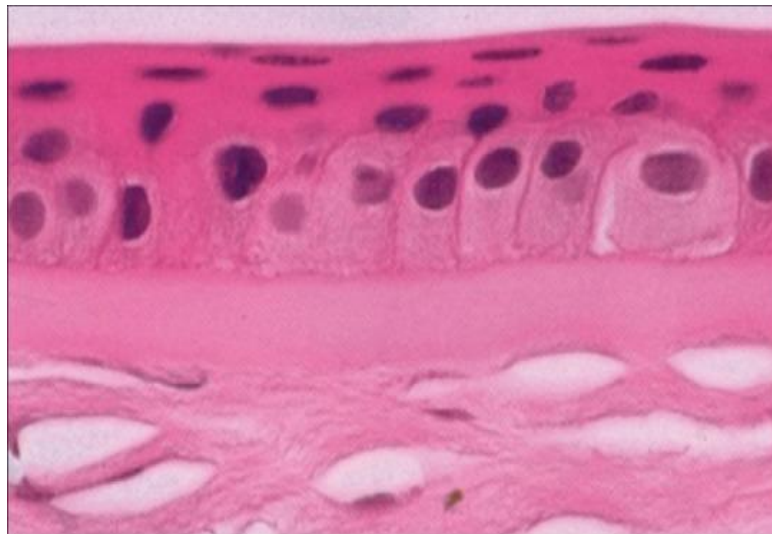
1. Epitel tabakası
2. Bowman tabakası
3. Stroma tabakası
4. Descemet membran
5. Endotel tabakası

### 2.1.3.1. Epitel Tabakası

Kornea epiteli oldukça düzgün bir şekilde sıralanmış 5-7 hücre tabakasından oluşur. Kalınlığı yaklaşık 50µm'dir. Epitel yüzeyi pürüzsüz, uniform sıralı keratenize olmayan çok katlı skuamöz epitelden oluşur. Epitel tabakası gebeliğin 5 ila 6. haftaları arasında yüzey ektoderminden gelişir. Epitel, üç tip hücre içeren 5-6 katmanlı bir yapıdır. Bu hücre tipleri yüzeyel hücreler, kanat hücreleri ve bazal hücrelerdir. Yüzeyel hücreler düz çokgen yapıdadır, 2-3 sıra olup çapları 40-60 µm'dir. Sahip oldukları mikrovilluslarla yüzey alanını artırırlar. Kanat hücreleri 2-3 tabakalıdır, kanat şekline benzedikleri için bu ismi almışlardır. Bazal hücreler ise küboidal ya da kolumnar hücre yapısında olan tek katlı bir epitel tabakasıdır. Bu hücrelerden tip IV kollajen yapısında olan basal membran ve laminin salgılanır. Bazal epitel hücreleri basal membranı geçerek tip VII kollajen yapısındaki çapa ve tip I kollajen yapısındaki plaklar sayesinde Bowman membranına uzanır (11). Kornea epiteli hızlı büyüyen, rejenere olabilen multiselüler bir yapıya sahiptir. Ayrıca göz yaşı film tabakası ile direk temas halinde olan katmandır (14).

### 2.1.3.2. Bowman Tabakası

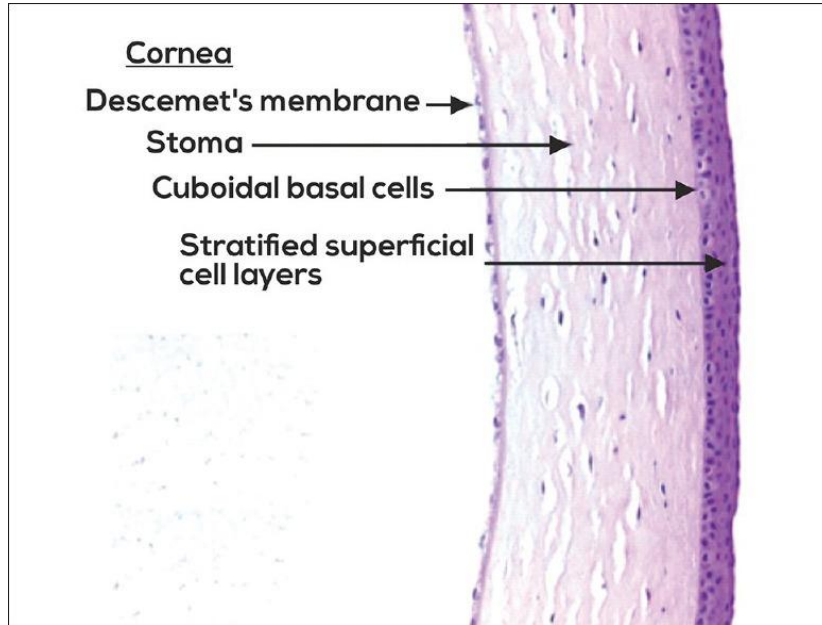
Bowman tabakası kollajen ve proteoglikanlardan meydana gelir. Kalınlığı 12 µm'dir. Tip I ve V kollajen içerir. Rejenerasyon kapasitesi bulunmadığından hasarlandığında skar bırakarak iyileşir. Bowman membranı anterior stroma üzerinde uzanır ancak gerçek bir membran değildir. Anterior stromanın aselüler bir parçası olarak düşünülür. Bu düzgün yapı tabaka korneanın şeklini almasına yardım eder (11).



**Şekil 1:** Kornea epiteli ve Bowman membranı (11)

### 2.1.3.3. Stroma Tabakası

Kornea stroması, korneanın yapısal çerçevesinin büyük kısmını ve kalınlığının yaklaşık %80-85 'ini oluşturur. Embriyolojik olarak primitif endotelyumun kurulmasından sonra gebeliğin 7. haftasında meydana gelen ikinci nöral krest migrasyonu sonucu oluşur. Stroma, stromal liflerin hassas organizasyonunun bir sonucudur. Ağırlıklı olarak tip I kollajen olmak üzere tip VI ve tip XII kollajen de stromada bulunur. Kornea stroması keratositler ve ekstraselüler matriks (ECM)'den oluşur. ECM tip I, III, V, VI kollajenlerden ve glikozaminoglikan içerir. Glikozaminoglikanlar keratan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfattan oluşur. Bunlar içerisinde en çok bulunan keratan sülfattır, daha az olmak üzere dermatan sülfat ve kondroitin sülfat mevcuttur. Bebeklik döneminde ise hyaluronat vardır (11). Kollajen lifleri paralel demetler halinde dizilerek fibril adı verilen yapıları oluştururlar. Bu fibriller de lamellar halde paketlenir. Stroma tabakası birbirine dik olarak dizilmiş yaklaşık 200-250 farklı lamel içerir (15).



Şekil 2: Kornea katmanlarının histolojik gösterimi (11)

### 2.1.3.4. Descement Membran

Descement membranı 7  $\mu$  kalınlığındadır. Tip IV kollajen ve lamininden oluşur. Descement membranı gebeliğin 8. haftasında oluşmaya başlar. Endotel hücreleri Descement membranını salgılar. Doğumdan önce Descement membranı bantlı bir yapıya sahipken doğumdan sonra bantsız hale gelir. Descement membranı yaşla beraber 10  $\mu$  kalınlığına ulaşır. Descement membranı elastik bir yapıya sahiptir, koştukça kıvrılır (11). Kornea

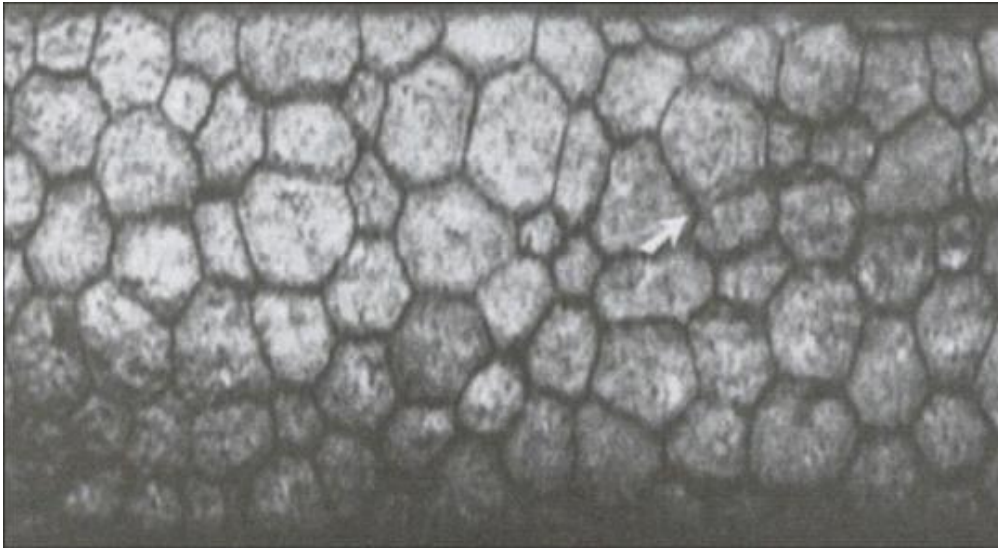
endotelinin modifiye edilmiş bazal membranı olarak işlev gören, tip IV kolajenden yapılmış hücreli bir tabakadır (16).

### 2.1.3.5. Endotel Tabakası

Endotel 5 µ kalınlığında tek katmanlı bir yapıdır. Petek benzeri mozaik gibi görünen hücreler altıgendir ve metabolik olarak aktiftir. Bu hücreler korneanın su içeriğini düzenleyen bir endotel pompası oluşturmak üzere yüksek miktarda Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPaz pompası ve hücre içi karbonik anhidraz yolu içerir. Bu iki yolak stromadan aköz humore iyon akışı sağlamaktadır. Endotelin bazal yüzeyi Descemet membrana yapışmayı destekleyen çok sayıda hemidesmozom içerir (11).

Doğumda endotel tabakası yaklaşık 10 µ kalınlığındadır. Descemet membran endotel tabakasının hemen önündedir. Descemet membran trabeküler ağ ile birleşerek gonyoskopik bir belirteç olan Schwalbe hattını meydana getirir.

Endotel hücre yoğunluğu yaşam boyu değişmeye devam eder. Doğumda hücre yoğunluğu 3500 hücre / mm<sup>2</sup> 'dir. Ancak erişkin dönemde 3000-4000 hücre/ mm<sup>2</sup>'den 2600 hücre / mm<sup>2</sup> olur. Altıgen hücreler yaklaşık %75'ten %60'a düşer. Endotel hücre yoğunluğu erişkin yaşam boyunca yılda ortalama %0.6 oranında azalır ve polimegatizm ve pleomorfizmde kademeli bir artış görülür (17). Erişkinlerde endotel hücreleri yenilenmez (18).



**Şekil 3:** Endotel tabakasının speküler mikroskopi görünümü (11)

#### **2.1.4. Kornea İnnervasyonu**

Kornea, vücuttaki en yoğun innerve olan ve en hassas dokulardan biridir. Trigeminal sinirin birinci bölümünün (oftalmik) nazosilyer dalından innerve edilir. Kalın ve düz stromal sinir gövdeleri, stroma içinde çeşitli seviyelerde ilerleyici olarak ince sinir liflerinin pleksiform düzenlemelerine yol açmak için laterale ve anteriora doğru uzanır (19). Sinir lifleri Bowman tabakasını deler ve sonunda bazal epitel hücre tabakasının hemen altında yoğun bir sinir pleksusu oluşturur ve kıvrımlı, ince boncuklu sinir lifleri çok sayıda sinir elemanı ile birbirine bağlanır. Kornea ayrıca otonom sempatik sinir lifleri içerir.

#### **2.2. Gözyaşı Film Tabakası**

Gözyaşı filmi, korneanın ışığın temas ettiği ilk tabakasıdır. Oküler yüzeye kayganlık ve hidrasyon sağlar. Aynı zamanda bir oksijen, immünoglobulinler, lizozimler, laktoferrin ve  $\alpha$ - ve  $\beta$ -defensinlerin kaynağıdır. Gözyaşı filminin geleneksel olarak üç farklı katmandan oluştuğu kabul edilir. En yüzeysel tabaka Meibomus bezlerinin yağlı salgılarından oluşur. Bu yağlı tabaka ayrıca gözyaşı filminin buharlaşmasına karşı önemli bir bariyer sağlar. Gözyaşı filminin aköz tabakası, yağlı tabakanın hemen altında yer alır; göz yaşı bezlerince salgılanır. En içteki müsin tabakası esas olarak konjonktival goblet hücreleri tarafından üretilir, ancak kornea ve konjonktivanın epitel hücreleri de katkıda bulunur (20). Gözyaşı film tabakası IL-1 reseptörünü bağlayan ve IL-1 aktivitesini inhibe eden interlökin 1 reseptörü antagonisti, TGF-B ve A vitamini ve metabolitleri gibi iltihabı baskılayan faktörler içerir (21).

#### **2.3. Korneal Neovaskülarizasyon**

Sağlıklı bir kornea, iris ve pupilin önünde yer alan şeffaf, avasküler bir dokudur. Şeffaflığı ve damarsızlığı korumak, gözü enfeksiyonlara ve yapısal hasara karşı korumanın yanı sıra optimum görmeyi sağlamak için de çok önemlidir.

Anormal yeni damarlar, normalde kornea şeffaflığını koruyan ve daha sonra korneal neovaskülarizasyona yol açan anjiyojenik ve antianjiyojenik faktörlerin dengesindeki bozulmanın bir sonucu olarak önceden var olan perikorneal yapılardan kornea stromasını istila edebilir (22).

### **2.3.1. Korneal Neovaskularizasyon Epidemiyolojisi**

Korneal neovaskularizasyonlar enfeksiyon, inflamasyon, iskemi, dejenerasyon, travma ve limbal kök hücre bariyerinin kaybı dahil olmak üzere çok çeşitli oküler hasarlardan kaynaklanır. Neovaskularizasyona yol açabilen korneal patolojiler arasında lipid keratopati, kornea ülserleri ve yara izleri, herpes virüsü, enfeksiyöz keratit, kimyasal yanıklar, greft reddi ve kontakt lens kullanımından kaynaklanan hipoksik hasarlar yer alır (23,24).

Korneal neovaskularizasyon, görmeyi tehdit eden bir durumdur ve giderek artan bir halk sağlığı sorunudur. Bir çalışma, tahmini insidans oranını yılda 1.4 milyon kişi olarak bildirmiştir ve bunların %12'si görme kaybı ile sonuçlanmıştır (25). Ayrıca, keratoplasti ameliyatlarında alınan kornea örneklerinin %20'sinde korneal neovaskularizasyona ait kanıtlar bulunmuştur (24).

### **2.3.2. Korneal Neovaskularizasyon Patolojisi**

Sağlıklı bireylerde kornea avaskülerdir; ancak belirli patolojik koşullar altında kornea içinde yeni kılcal damarlar büyüyebilir. Ciddiyetine göre üç neovaskularizasyon kategorisi vardır: yüzeysel neovaskularizasyon, vasküler pannus ve derin stromal vaskularizasyon. Korneal neovaskularizasyon mekanizmaları, hayvan modellerinde önemli ölçüde ayrıntılı olarak gözlenir. Bu modellerden, korneal neovaskularizasyonun herhangi bir yaralanma süreci sonucu başladığı varsayılmıştır (24).

Kornea hasar gördüğünde, epitel defektleri normal olarak kornea ve limbal epitel tarafından iyileştirilir. Korneal limbus, korneoskleral bileşkede bulunur. Limbal epitel yapısı farklılaşma kapasitesine sahip kök hücreler açısından zengindir. Bununla birlikte, korneal hücrelerin apoptoza girmesine ve konjonktival epitel tarafından anormal bir şekilde onarılmasına yol açan kusurlar meydana gelebilir (26). Konjonktiva epitelinin goblet hücrelerinden zengin olması ve oldukça vaskülarize olması nedeniyle asıl problem ortaya çıkar. Sonuç olarak, ortaya çıkan kornea yapısı optik anlamda etkilenir ve görmenin bozulmasına yol açar (27). IL-8'in kornea neovaskularizasyonunun ortaya çıkışına da katkıda bulunabileceğini düşünülmektedir(28).

Herpes keratiti korneal neovaskularizasyonun gelişmesine yol açabilir. Herpes enfeksiyonu, immün aracılı bir hastalık olarak sınıflandırılır ve gözün immün ayrıcalıklı olması nedeniyle, Herpes için hedef doku olarak kabul edilir. VEGF'nin Herpes enfeksiyonu sonucu korneal neovaskularizasyon gelişiminde önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Herpes varlığının VEGF reseptörü (sVEGFR-1) sentezinin VEGF'ye göre daha yüksek oranda inhibisyonuna yol açarak sVEGFR-1 ile VEGF arasında oran dengesizliğine yol açtığı ve bu nedenle VEGF salınımının sonuç olarak hızlandığı öne sürülmüştür, bu durum anjiyogeneze neden olur (29). VEGF'nin bir başka kaynağı da, IL-6 ekspresyonunun bir sonucu olarak VEGF üretimini uyaran enfekte hücrelerdir (30). Hücreleri VEGF salması için uyaran interlökin-7 (IL-7) eksprese eden enfekte hücelere yanıtta da benzer bir ilişki gözlemlenmiştir (31). Aşırı VEGF salınımı, korneada kırılğan yeni kan damarlarının gelişmesine yol açar.

Korneal neovaskularizasyon sürecinde çeşitli büyüme faktörleri ve proteinazlar yer alıyor gibi görünmektedir. Kornea yaralanması sırasında, anjiyojenik faktörler, makrofajlar gibi infiltre olan immün hücrelerin yanı sıra korneal epitelyal ve stromal hücrelerden salınır. Aslında, anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki denge, korneal neovaskularizasyonda anjiyojenik moleküllere doğru kaydırılır. Çok sayıda araştırma, VEGF' in, endotel hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve tübülogenezini indükleyerek korneal neovaskularizasyonda çok önemli bir rol oynadığı fikrini desteklemektedir (32).

### **2.3.3. Korneal Neovaskularizasyonda İnflamasyonun Rolü**

İnflamatuar kemokinler, sitokinler ve hücre adezyonu molekülleri, inflammatuar hücrelerin infiltrasyonunu kolaylaştırır, anjiyogenezi kolaylaştırmaya yardımcı olur. İnterlökin-1 (IL-1) multipotent bir sitokindir ve akut inflammatuar yanıt, inflammatuar hücrelerin aktivasyonu, adezyon moleküllerinin düzenlenmesi ve kemotaksis olmak üzere tüm bu yollar ile anjiyogeneze doğru çalışır (33). İnflamatuar süreçte IL-1 artışı görüldü ve bunun korneal anjiyogeneze kritik bir ilk adım olduğu kabul edildi. Artan IL-1 seviyeleri yaralanmanın erken döneminde tespit edildi; yaralanmadan iki saat sonra ortaya çıktığı ve eğer bir reseptör ile bloke edilirse anjiyojenik yanıtı önemli ölçüde azaltabileceği gösterilmiştir. Ancak daha sonra uygulandığında antagonistin daha az etkisi olmuştur bunun nedeni olarak anjiyogenezin çoktan başladığı düşünülmüştür (34). Korneal yaralanmadan sonra oluşan inflammatuar kaskad kornea anjiyogenezisi harekete geçirir. Salınan IL-1, VEGF-A ekspresyonunu indükleme yeteneğini içerir ayrıca kornea stromasındaki fibroblastlardan prostaglandinler,

nükleer faktör kb salınmasını indükler (35). IL-6 çok işlevli bir glikoproteindir ve çeşitli sinyalleşme yetenekleri ile anjiyogenez için başka bir uyarıcıdır (36). IL-6 uyarımı sonrası VEGF salınımı artırdığı bir yolak olarak düşünülmüş, buna kanıt olarak anti-VEGF uygulanan hastalarda neovasküler yanıtın köreldiği görülmüştür (37).

Ayrıca diğer kemokinler arasında lökosit migrasyonunu ve aktivasyonunu uyaran faktörler, hasarlı hücrelerden salınan platelet aktivasyon faktörü (PAF) yer alır. IL-1 ile kombinasyon halinde ve diğer enflamatuar sitokinler ve faktörler, makrofajların bulunduğu inflammatuar bir ortam, kornea epitel ve konjonktival epitelde VEGF salgılatır. Bu sonuç olarak vasküler endotel proliferasyonunu ve göçünü uyarır (38).

İnterlökin-1 (IL-1) gen ailesi, iki proinflammatuar form (IL-1 alfa ve IL-1 Beta) ve doğal olarak oluşan bir anti-inflamatuar form, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) içerir. IL-1, makrofajlar, monositler, nötrofiller, lenfositler ve epitel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir ve tip 1 IL-1-reseptörüne bağlanarak vücudun hemen hemen her hücre tipi üzerinde etki gösterebilir (39). IL-1'in proinflammatuar formları, oküler yüzey immün ve inflammatuar yanıtlarında ve yara iyileşmesinde önemli rol oynar. IL-1 ve reseptörü, yapısal olarak kornea epitel tarafından eksprese edilir. Keratositler ayrıca yapısal olarak IL-1R'yi eksprese ederken, bu hücreler tarafından IL-1 üretimi, yaralanmadan sonra bir otokrin döngü tarafından uyarılır (40).

Korneal vaskülarizasyonda proanjiojenik faktörler arasında en önemli olarak görülen faktörlerden biri de VEGF'tir. VEGF büyüme faktörü ailesi beş bileşenden oluşur. VEGF-A, VEGFR1'e ve VEGFR2'e bağlanır. Plasental büyüme faktörü ve VEGF-B bağlanması sadece VEGFR1'dir. VEGF-C ve D, VEGFR2'ye ve VEGFR3'e bağlanır (41,42,43). Birçok çalışmaya göre VEGF-A bu ailenin dominant üyesi olmakla beraber diğerleri de önemli role sahiptir. VEGFR3 bloke edilmesinin anjiogenezi baskıladığını düşünen çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, VEGF-A'nın ana reseptörü olan VEGFR2 engellenmesi durumunda, VEGFR3 sinyalleşmesinin angiogenezi harekete geçirebileceği gösterilmiştir(44).

Ayrıca VEGFR-3 özgül ligandlar içeren pelletlerin korneal stromaya implante edilmesinin, VEGFR-3 eksprese eden kan damarlarıyla karakterize neovaskülarizasyonu indüklediğini göstermiştir. Bu pelletlerin implante edilmesi aynı zamanda VEGF-A salgılayan makrofajların da toplanmasına yol açmıştır. VEGFR-3 sinyalleşmesinin olası bir şekilde yeni oluşan kan damarlarını indükleyebileceği ve bu olgunlaşmamış damarların,



Chen ve arkadaşları tarafından VLA-1'in korneal allo greftlerin reddini ve eşlik eden anjiogenezi düzenleme rolü araştırılmıştır. Çalışmada, korneal allogreft uygulanan farelerde anti-VLA-1 antikorumun kullanılmasıyla, korneal greftteki makrofajlar dahil olmak üzere inflamatuvar hücre sayısını önemli ölçüde azaltabildikleri bulunmuştur. Yüzeğe uygulanan anti-VLA-1 antikoru veya VLA-1 eksik farelerde, kontrollere kıyasla neredeyse evrensel greft sağkalımı elde edilebilmiş ve korneal NV miktarı önemli ölçüde azaltılmıştır (49).

Matriks metalloproteazlar 2, 12, 9 (MMP2, MMP12, MMP9), serin proteazlar, fibroblast büyüme faktörü (FGF) infalasyonu ile ilişkili proanjiogenik yollarda görev alan moleküllerdir.

#### **2.3.4. Korneal Neovaskülarizasyon Etiyolojisi**

##### **2.3.4.1. Alkali Yaralanma**

Kimyasal yaralanma, özellikle alkali yanıklar, inflamatuvar korneal neovaskülarizasyonun iyi araştırılmış bir etiyojisidir. Alkali ile yanmış korneada sitokin ekspresyonu meydana gelmektedir. Fare korneasına NaOH uygulandıktan sonra, Mrna, IL-1beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10 ve TNF-a'nın alkali ile yanmış kornealarda eksprese edildiğini görmüşlerdir (25). ELISA kullanarak, IL-1 $\alpha$  ve IL-6 proteinlerinde keskin bir artış tespit ettiler. Hem IL-1 $\alpha$  hem de IL-6 seviyesi, alkali yanığının şiddetiyle ilişkilidir ve IL-1 $\alpha$  ve IL-6'nın hücresele kaynağı, çoğunlukla infiltrasyon yapan enflamatuvar hücrelerden ziyade kornea içinden gelmektedir. Kornea epitelyal hücreleri, sitokin ağına ilk tepki veren hücrelerdir. Alkali yanıktan sonra kornea epitelyal tabakasında IL-1 $\alpha$ 'nın artan ifadesi, anjiyogenik yanıtı başlatmak için diğer sitokinlerle birlikte etki edebilir (50). Yaralanmış kornea epitelyumundan salınan IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , yara iyileşme tepkisinin erken aşamasında keratosit apoptozunu iletmek için sinyal görevi de görür. Bu şekilde daha fazla inflamatuvar belirteç üretilir ve anjiogenezi artırır (51).

Bu yanıtın sonra VEGF pro-angiyojenik belirteç olarak açığa çıkar. Alkali yaralanmanın şiddeti büyük ölçüde limbal kök hücre hasarının miktarı tarafından belirlenir. Kök hücreler iyileşirse, pro-angiyojenik uyarıcılar genellikle azalır ve sonuç olarak saydam anjiyogen bir kornea oluşabilir. Ancak, kök hücreler yeterince zarar görürse, kornea epitelyumu yok olur; sonuç olarak, epitelyuma özgü birçok anti-angiyojenik faktör eksik olur ve kornea vaskülerleşebilir.

#### **2.3.4.2. Enfeksiyonlar**

Herpes Simpleks Keratiti, Amerika Birleşik Devletleri'nde korneal körlüğün en sık görülen nedenidir. 100.000 kişi-yıl başına 8.4 yeni vaka ortaya çıkmakta ve yaygınlığı 100.000 kişilik nüfusta 149 olarak bildirilmektedir. Herpes Simpleks virüsü (HSV)'den körlük yaşayan birçok kişinin vaskülerize olmuş korneal yara izleri vardır (52).

HSV'nin neden olduğu korneal neovaskülarizasyon en sık herpetik stromal keratit (HSK) durumunda ortaya çıkar ve kornea HSV ile enfekte olduktan sonra virüs, angiyojenik bir geçiş etkisi oluşturarak kuvvetlerin dengesini angiogeneze doğru yönlendirir.81 HSV, VEGF, FGF, MMP-2 ve 9, IL-6 ve PDGF gibi pro-angiyojenik faktörlerin oluşumunu tetikleyebilir.

HSV'nin neden olduğu korneal neovaskülarizasyon en sık herpetik stromal keratit (HSK) durumunda ortaya çıkar ve kornea HSV ile enfekte olduktan sonra virüs, anjiyogenik bir geçiş etkisi oluşturarak kuvvetlerin dengesini anjiogeneze doğru yönlendirir.81 HSV, VEGF, FGF, MMP-2 ve 9, IL-6 ve PDGF gibi pro-anjiyogenik faktörlerin oluşumunu tetikleyebilir (53). Ayrıca, HSV'de IL-1 aracılığıyla sağlanan anjiyogenezin rolü iyi bir şekilde belirlenmiştir ve IL-1'in bir reseptör antagonist ile bloke edilmesinin hem hastalık şiddetini hem de anjiyogenezini azalttığı gösterilmiştir (54).

Pseudomonas aeruginosa, sıklıkla kontakt lens kullanımıyla ilişkili enfeksiyöz korneal ülserlere neden olan bir gram-negatif basil bakterisidir. Bu organizmanın neden olduğu enfeksiyon kaynaklı korneal ülserler genellikle büyük bir inflamatuvar yanıt gösterir ve genellikle korneal skarlaşma ve neovaskülarizasyon ile ilişkilidir. Pseudomonas aeruginosa'nın etkisiyle, Toll benzeri reseptör aracılı sinyal yollarının aktifleşmesiyle birlikte, epitel hücrelerinde IL-6 ve IL-8'in transkripsiyonu indüklenmiştir. IL-6'nın HSV çalışmalarında, korneal epitelyal ve stromal hücreleri uyararak VEGF ve diğer pro-anjiyogenik uyarıcıların yüksek miktarlarda üretimini teşvik etmek için parakrin bir şekilde etki ettiği gösterilmiştir (55).

#### **2.3.4.3. Korneal Transplantasyon**

Korneal allograftta korneal neovaskülarizasyon, hem inflamasyonun bir nedeni hem de sonucudur ve greft reddi oranlarını önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Greft neovaskülarizasyonundan sonra reddin artmasının en önemli faktörlerinden biri, greft ile kan damarı temasının genel yüzey alanının artmasıdır. Artan yüzey alanı, immün yanıtın etkici

kolonun artan aktivitesini kolaylaştırır ve grefti hedeflemek için artan sayıda T hücrelerini kolaylaştırır (56, 57).

#### **2.3.4.4. Korneal Suture**

Korneal suturların, korneal nakillerde inflamasyonu ve ardından neovaskularizasyonu tetiklediği bilinmektedir. Naylon dikişler, ipek dikişlere kıyasla çok daha düşük oranda inflamatuvar yanıtla ilişkilidir, ancak naylon dikişlere karşı inflamatuvar reaksiyon olasılığı hala mevcuttur (58,59).

Suture yabancı cisim reaksiyonu, hasarlı bölgeye makrofajlar, lenfositler ve plazma hücrelerinin çekilmesini içerir. Bu hücreler, doğal bağışıklık sistemi aracılığıyla tepki verir ve IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinleri salgılar. Bu sitokinlerin suture malzemesi nedeniyle neovaskularizasyonun oluşumuna yol açacaktır. Çalışmalar, suture yaralanması fare modellerinde VEGF salgısının arttığını göstermiştir (47). Ekstraselüler matriksi yeniden şekillendirme için kritik olan MMP-2 ve 9'un, fare kornealarında suture yaralanmasından sonra arttığı gösterilmiştir (60).

#### **2.3.4.5. Kontakt Lens Kullanımı**

Korneal neovaskularizasyonun yaygınlığı her çalışmada değişmekle birlikte, yumuşak kontakt lens kullananların %1.3 ila %35'i arasında değiştiği görülmektedir, oysa sert lenslerde bu oran oldukça düşüktür.3 Birçok vaka raporu, basit periferik panus (yüzeyel) durumundan çok daha ciddi bir durum olan şiddetli bilateral derin stromal neovaskularizasyonla sunulmuştur, ki bu en yaygın görülen tablodur (61).

Bu durumda, korneal neovaskularizasyona neden olduğu düşünülen iki faktör bulunmaktadır: kronik hipoksi ve inflamasyon. Her birinin ne ölçüde neovaskularizasyon oluşumunu kolaylaştırdığı bilinmemekle birlikte, uzatılmış kontakt lens kullanımı hayvan modellerinde VEGF'nin yukarı regüle olduğu bilinmektedir. Kontakt lens kullanımı, korneada hipoksi ve metabolik değişikliklerle ilişkilidir. Doku içinde VEGF üretimi için bilinen uyarıcılardan biri hipoksidir (62,64).

Hipoksi tarafından VEGF'nin uyarılması, nükleer bir yanıtı içeren karmaşık bir süreçtir. Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 alfa tarafından çekirdek cevabı uyarılarak VEGF proteinlerinin nükleer transkripsiyonu artar (65,66). Uzun süreli yumuşak lens kullanımına bağlı olan neovasküler yanıtın ikinci bileşeni, sitokrom p450 yolak tarafından iletilen artmış göz yüzeyi inflamasyonu ile ilişkilidir (67).

### **2.3.5. Korneal Neovaskularizasyon Tedavisi**

Korneal neovaskularizasyonun tedavisi karmaşık bir durumdur. Kornea nakli şu anda bu hastalık süreci için tek başarılı evrensel tedavi olarak sayılabilir. Bununla birlikte, topikal tedaviler, enjeksiyonlar ve lazer/fototerapi gibi çeşitli tedavi prosedürleri etkili olabilir. Bu tedavilerin terapötik hedefleri anti-anjiogenez başlatmak, neo-anjiogenezin erken aşamalarında durdurmak ve olgunlaşmamış damarların geri dönüşünü indükleyerek anjiyoregresyon elde etmeyi amaçlamaktadır.

#### **2.3.5.1. Topikal Tedavi**

Korneal neovaskularizasyonun başlangıç tedavisinde şu anda steroidler ve anti-VEGF ajanları temel tedavi yöntemidir (68). Kortizon, deksametazon ve prednizolon gibi topikal steroidlerin tümü anti-anjiyogenik etkiye sahip olduğu ve dolayısıyla korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (69). Bununla birlikte, steroidlerin korneal vaskularizasyonun gelişimini engellemediğini öne süren çalışmalar da bulunmaktadır. Klintworth, steroidlerin kornea yaralanmasından hemen sonra veya öncesinde uygulandığında en etkili olduğunu ve daha sonra uygulanması durumunda korneal vaskularizasyonun gelişimi üzerinde etkisi olmadığını göstermiştir (70). Steroidlerin hücre kemotaksisini engelleyerek ve IL-1 ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinleri inhibe ederek çalıştığı düşünülmektedir. Ayrıca bu moleküllerin inhibisyonu lenfositleri öldürür ve vasküler dilatasyonu engeller, bu da anti-angiyojenik etkilerine katkıda bulunur (71).

Pro-anjiyogenik faktörler arasında VEGF, FGF ve PDGF bulunur. Bu anjiyogenik büyüme faktörlerini seçici olarak hedeflemek, steroidlere göre daha seçici bir etkiye ve daha az yan etkiye sahip olmaları nedeniyle tercih edilebilir. Anti-VEGF ilaçlar, VEGF'in inhibisyonu yoluyla, endotel hücre proliferasyonunun düşmesiyle yeni kan damarı oluşumunu önler. Bevacizumab, tüm VEGF izoformlarına bağlanan humanize bir monoklonal antikorudur bu nedenle topikal kullanılabilir (72). Başka bir çalışma, bevacizumab'ın korneal neovaskularizasyon ve inflamasyon üzerinde inhibisyon etkisi olduğunu, ancak etkilerin çok kısa süreli olduğunu göstermektedir. Lin ve meslektaşları da benzer şekilde, bevacizumab ile erken tedavinin korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiğini, ancak geç tedavinin bu özellikleri göstermediğini göstermiştir (73,74). Bu, olgun kan damarlarına sahip bireylerde anti-VEGF tedavisinin o kadar etkili olmadığını göstermektedir, çünkü onlar pro-anjiyogenik faktörlere dayanmazlar. Anti-VEGF tedavisi,

proliferasyon için pro-anjiyogenik faktörlere bağımlı olan olgunlaşmamış kan damarlarının var olduğu aktif damar büyümesi sırasında önemlidir (75).

İnsülin rezistan substrat (IRS-1) proteinlerinin aktivasyonunun anjiyogenez için hayati olduğu ve korneal neovaskülarizasyon bölgelerinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir [40]. Aganirsen, IRS-1 mRNA'sının, IL-1 $\beta$  mRNA'sının ve VEGF mRNA'sının ifadesini inhibe eden bir oligonükleotiddir. Bu molekülünün topikal kullanımının korneal neovaskülarizasyonu azalttığı ayrıca güvenli ve tolere edilebilir olduğu görülmüştür (76).

Doksisiklin, bir tetrasiklin analogudur ve antibiyotik etkisi olduğu gibi aynı zamanda bir matriks metalloproteinaz inhibitörüdür. Matriks metalloproteinazlar, kollajen, bazal membranlar ve ekstraselüler matriksi parçalayan enzimlerdir. Doksisiklin ayrıca, metalloproteinaz bağımlı olmayan bir mekanizma aracılığıyla anjiyogenezin inhibe edilmesini sağlar ve anti-inflamatuar etkiye sahiptir (77). Jovanovic ve Nikolic, insan korneal neovaskülarizasyonunda topikal doksisiklin kullanımının neovaskülarizasyonu azaltmada etkili olduğunu ve yan etkisi olmadan iyileşme sürecinde etkili olduğunu göstermişlerdir (78).

### **2.3.5.2. Enjeksiyon Tedavisi**

Anti-VEGF ajanların enjeksiyon şeklinde kullanımı da neovaskülarizasyonu azaltmak için bir seçenektir. Petsogulu C ve ark. 30 korneal neovaskülarizasyonlu göz ile yaptıkları çalışmada bevacizumab etkilerini serum fizyolojik ile kıyaslamışlardır. Çalışmada 2.5 mg/0.1 ml subkonjonktival bevacizumab enjeksiyon alacak şekilde rastgele seçilen 15 göz ve %0.9 NaCl alacak şekilde rastgele seçilen 15 göz mevcuttur. Bevacizumab alan 15 gözde korneal neovaskülarizasyonun ortalama alanında %36 azalma olduğunu, serum fizyolojik alan gözlerde ise %90 artış olduğunu göstermişlerdir (78).

Gen terapileri de enjeksiyon şeklinde kullanılabilir. Lai ve meslektaşları korneal epitelyal hücrelere VEGFR-1 genini içeren bir adenovirüs vektörü nakletmiş ve bir kemirgen modelinde korneal neovaskülarizasyonu başarıyla inhibe ettiğini bulmuşlardır (79).

### **2.3.5.3. Lazer / Fototerapi**

Korneal neovaskülarizasyon için lazer tedavisi, bir argon lazer ışınının kullanılmasına dayanmaktadır. Bu lazer ışını saydam korneadan geçer, ancak çok sayıda damar bulunduğu hemoglobin üzerinde argon enerjisini absorbe eder ve korneal damarların

pıhtılaşmasına neden olarak korneal neovaskülarizasyonun geri dönmesine yol açar (80). Fotodinamik tedavi, bir fotosensitif madde, ışık ve oksijen kullanır. Fotosensitif madde, neovasküler dokuda emilir ve lazer tedavisiyle aktive edilir, bu da serbest radikallerin salınmasına neden olur ve korneal neovaskülarizasyonun geri dönmesini sağlar. Fotodinamik tedavinin insanlarda güvenli ve yüksek etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir; ancak maliyetli ve zaman alıcı bir tedavi yöntemidir (81).

#### **2.3.5.4. Korneal Transplantasyon Cerrahisi**

Birçok farklı nedenle korneal neovaskülarizasyon geliştirmiş ve opaklaşmış korneaların saydamlığını yitirmiş olmaları günümüzde korneal transplantasyon cerrahilerine duyulan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır. İnflamasyon, travma, kimyasal madde teması, enfeksiyon ve daha birçok etiyoloji kaynaklı ortaya çıkan proanjiogenik faktörler yüzeysel veya derin korneal neovaskülarizasyonlar oluşturmaktadır. Bu durumun ciddiyeti saydam bir kornea dokusunun nakil edilmesi ile cerrahi bir boyuta ulaşılabilir. Bu durumun ciddiyeti saydam bir kornea dokusunun nakil edilmesi ile cerrahi bir boyuta ulaşılabilir.

Ameliyat öncesi var olan neovaskülarizasyon ameliyatın başarısını uzun dönemde etkileyebilmektedir. Bir meta-analizde, 24.000 kornea grefti üzerinde yapılan çalışmalar, neovaskülarizasyonu olan hastalarda nakledilen korneaların reddedilme oranının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Analiz, cerrahi öncesi korneal neovaskülarizasyonun varlığının, naklin başarısız olma olasılığını %30 artırdığını ve greft reddi riskini iki katına çıkardığını göstermektedir. Başka bir deyişle, neovaskülarizasyon ne kadar fazlaysa, reddetme riski o kadar yüksektir (82).

#### **2.3.6. IL-1 $\alpha$ Reseptör Antagonisti / Anakinra**

IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti/ anakinra molekülü, Kineret 100 mg/0,67 ml (Swedish Orphan Biovitrum AB) enjeksiyonluk çözelti formunda bulunmaktadır. Romatoid artirit, IL-1 $\alpha$  reseptör yetmezliği hastalığı, kriyoprin ilişkili meperiyodik sendrom gibi romatolojik hastalıklarda kullanılmaktadır. IL-1 $\alpha$  reseptör blokajı yapan anti inflamatuvar ve immün modülatör bir ilaçtır. IL-1 sitokininin ve akut faz reaktanları oluşumunu baskılamaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Necmettin Erbakan Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2022/09 tarihinde etik kurul onayı alındı (2022-044 nolu karar sayısı). Çalışmanın deney hayvanları ile olan ilk bölümü Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında yapıldı. Çalışmanın devamı eksize edilen kornealarla Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalı ve Biyokimya Anabilim dalında laboratuvar ortamında gerçekleştirildi.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda kullanılacak ratlar 22-250C oda ısısında 12 saat ışık (7:00–19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00–7:00) tutulacak şekilde özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Tüm gruba aynı standart sıçan yemi verilerek su, yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük olarak altları temizlenerek bakımları yapıldı. Ağırlıkları 225-300 gr arasında değişen 6-8 haftalık 40 adet Wistar Albino cinsi dişi 8'erli sıçanlar 5 gruba ayrıldı.

#### 3.2. Gruplar

- **Grup I (Sham):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyon sonrası herhangi bir müdahalede bulunulmayan grup olarak ayrıldı.
- **Grup II (Serum fizyolojik):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 1. gün ve 5. gün subkonjonktival 0,1 ml %0,9 NaCl (serum fizyolojik) uygulandı.
- **Grup III (0,25mg/0,1ml IL-1 $\alpha$  antagonisti / anakinra):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 1. gün ve 5. gün subkonjonktival 0,25mg/0,1ml IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti/anakinra uygulandı.
- **Grup IV (2,5mg/0,1ml IL-1 $\alpha$  antagonisti /anakinra):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 1. gün ve 5. gün subkonjonktival 2,5mg/0,1ml IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti / anakinra uygulandı.

- **Grup V (2,5mg/0,1ml Anti-VEGF / Bevacizumab):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 1. gün ve 5. gün subkonjonktival 2,5mg/0,1ml anti-VEGF / bevacizumab uygulandı.

### 3.3. Anestezi Tekniği

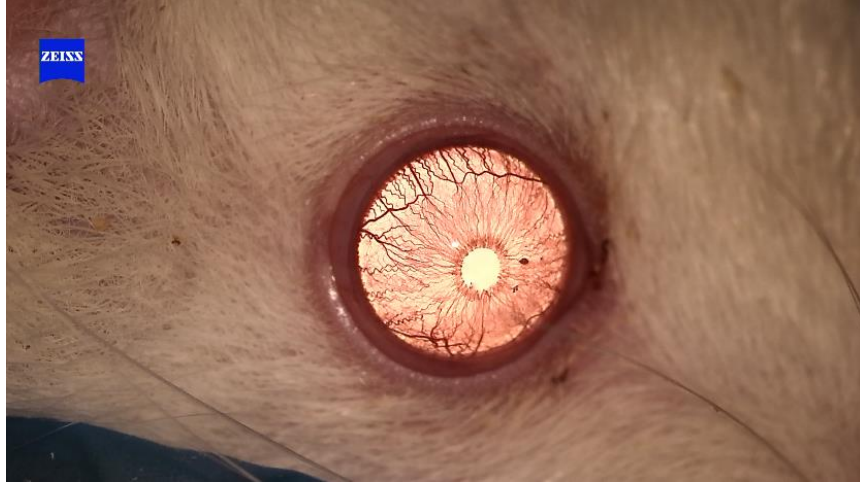
Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 50 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına %0.5'lik proparakain hidroklorid (Alcaine, Alcon, Fort Worth, Texas, ABD) damlatıldı.

### 3.4. Gümüş Nitrat Çubuğu ile Korneal Kimyasal Yanık Modellemesi

Korneal kimyasal yanık ve sonucunda korneal neovaskülarizasyon oluşturmak için Mahoney ve Waterbury modellemesi kullanıldı (83). Genel anestezi altında deney hayvanlarının her iki göz korneası %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubuk 10 saniye süresince santral korneaya temas ettirildi (Şekil 5). Kornea santralinde kimyasal yanık oluşturuldu (Şekil6). Gümüş nitrat ve potasyum nitrat uçlu çubuk başka hiçbir noktaya temas ettirilmeden uzaklaştırıldı.



**Şekil 5:** Ucu %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat kaplı çubuk



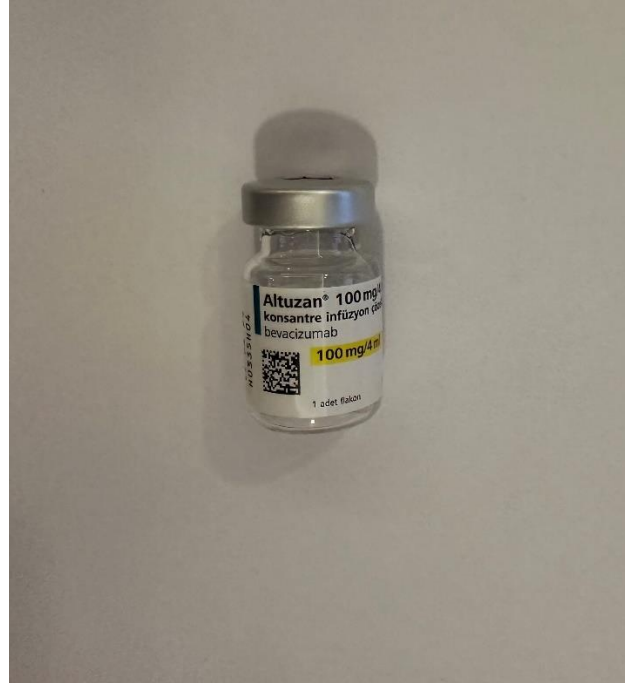
**Şekil 6:** Üstte kimyasal yanık uygulaması öncesi kornea fotoğrafı, altta kimyasal yanık uygulaması sonrası kornea fotoğrafı

### 3.5. İlaçların Uygulanması

Rat kornealarında oluşturulan korneal neovaskülarizasyonlar sonrası 5 gruba farklı yaklaşımlarda bulunuldu. İlk gruba 1.gün kimyasal yanık oluşturuldu ve devamında müdahalede bulunulmadı. 2. Gruba subkonjonktival %0,9 NaCl (serum fizyolojik) / 0,1 ml uygulandı. 3. gruba subkonjonktival 0,25 mg / 0,1 ml Anakinra (Kineret, Swedish Orphan Biovitrum AB) uygulandı. 4. gruba subkonjonktival 2,5 mg / 0,1 ml Anakinra (Kineret, Swedish Orphan Biovitrum AB) uygulandı (Şekil 7). 5. gruba subkonjonktival 2,5 mg / 0,1 ml Bevacizumab (Altuzan 100mg/ml ampul, Bristol Myers Squibb Co, Princeton, NJ, ABD) uygulandı (Şekil 8). 2, 3, 4 ve 5. gruplara uygulanan ilaçların kimyasal yanık işleminin hemen ardından 1.gün ve 5. gün genel anestezi altında uygulanmıştır. Subkonjonktival enjeksiyonlar saat 2 yönüne 30 Gauge iğne ile uygulanmıştır.



**Şekil 7:** Anakinra (Kineret 100mg/0,67 ml)



**Şekil 8:** Bevacizumab (Altuzan 100mg/ml ampul)

### **3.6. Korneaların Fotoğraflanması**

Tüm gruplardaki deney hayvanları her iki göz korneaları ilk gün kimyasal yanık oluşturulmadan önce, 5. gün işlem uygulanmadan önce ve 14. gün kornealar eksize edilmeden önce Zeiss S100/OPMI® Pico ameliyathane mikroskopu (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) ile fotoğraflanmıştır.

### 3.7. Korneaların Eksizyonu

Tüm deney gruplarındaki ratlar kendi grubuna uygun işlemlerden geçtikten sonra 14. gün genel anestezi altında limbus sınır alınarak ve tam kat olacak şekilde her iki göz korneaları eksize edildi. Sağ göz korneaları Patoloji Anabilim dalına, sol göz korneaları is Biyokimya Anabilim dalına verildi.

### 3.8. Korneaların Patolojik Değerlendirilmesi

Eksize edilen sağ göz kornealar oda sıcaklığında %10 formalin solüsyonuna koyuldu ve patoloji laboratuvarına götürüldü. Formalin solüsyonu ile sabitleme işleminden sonra örnekler alkol ile dehidre edildi, ksilen içinde açıldı ve parafin içine gömüldü. Her bir örneğin üzerinden 5 mm kalınlığında parafin kesitleri kesildi ve poli-L-lizin kaplı slaytlara yerleştirildi. Her bir kornea için örnekler Hematoksilen Eozin boyası, CD34 boyası ve IL-1 $\alpha$  immünohistokimyasal boyası ile boyandı. Hücre ve yapısal yoğunluklar 1 HPF (X100 büyütme)'de değerlendirildi. Bu değerlendirmelerde aşağıdaki parametrelere bakıldı.

- Membran varlığı: Endotel tabakası ile Descement membran tabakası arasında damarsal yapılardan ve nötrofillerden oluşmuş membran varlığı izlendi.
- Demetleşme: En az 7 fibroblast hücrenin bir araya gelerek yaptığı demet görüntüsü
- Epitel proliferasyonu: 4-6 sıra epitel tabakası 1, 7-9 sıra epitel tabakası 2, 10 sıra ve üstü epitel tabakası 3 olmak üzere puanlandırıldı.
- Fibroblast proliferasyonu: Fibroblast hücreleri yoğunluğuna göre azdan çoğa doğru 0-3 arasında puanlandırıldı.
- Damarsal yapılaşma: 0-10 adet damar yapısı 1, 10-30 adet damar yapısı 2, 30 üstü damar yapısı ise 3 olarak puanlandırıldı.
- İnflamatuar hücre yoğunluğu: İnflamatuar hücreler yoğunluğuna göre azdan çoğa doğru 0-3 arasında puanlandırıldı.
- IL-1 $\alpha$  immünohistokimyasal boyanma: Epitel hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz, İltihap hücrelerinde, Endotel hücrelerinde ve Fibroblast hücrelerinde membranöz IL-1 $\alpha$  boyanması yoğunluğuna göre göre azdan çoğa doğru 0-3 arasında puanlandırıldı.
- İnflamatuar hücre tipi: Örneklerdeki baskın olan inflammatuar hücre tipi nötrofil (NPL), lenfosit (LYM), eozinofil (EO), makrofaj (MCF) ya da platelet (PL) olmak üzere gruplandırıldı.

### **3.9. Korneaların Biyokimyasal ELISA Değerlendirmesi**

Eksize edilen sol göz kornealar serum fizyolojik solüsyonuna koyuldu. -40 0C'de 45 dakika – 2 saat arası bekletildikten sonra -80 0C'ye alındı. Kornealar makasla küçük parçalara kesildi ve bir homojenizatör (Stuart SHM1, İngiltere) ile homojenize edildi. Örnekler 500 mL çekme tamponunda lize edildi ve 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj yapıldı. BT LAB (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai Korain Biotech) ELISA kitleri ile IL-1  $\alpha$ , VEGF, TNF-a, TGF-B, malendialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

### **3.10. İstatistiksel Analiz**

Araştırma sonucu elde edilen veriler bilgisayar ortamında SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 18.0 paket programı ile analiz edildi.

Tanımlayıcı analizlerde frekans verileri sayı (n) ve yüzde (%) kullanılarak, sayısal veriler ise ortalama  $\pm$  standart sapma, ortanca (minimum-maximum) kullanılarak verildi.

Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi ve Fisher'in kesin Ki-kare testi kullanıldı.

Sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelendi. Bağımsız ikiden fazla grupta normal dağılan sayısal verilerin dağılımı One Way ANOVA testi ile incelendi. ANOVA test sonucu anlamlı olan değişkenlerde varyasyonların homojenliğine göre Tukey ve Tamhane post-hoc analizleri kullanıldı. Normal dağılmayan sayısal verilerin bağımsız ikiden fazla grupta dağılımı Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Kruskal Wallis test sonucu anlamlı olan değişkenlerin post hoc analizinde Mann Whitney U testi kullanıldı ve Dunn Bonferoni düzeltmesi yapıldı.

Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Kornea Örneklerinin ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Ratlardan alınan sol göz kornea örnekleri Biyokimya Laboratuvarında gerekli aşamalardan geçirilerek ELISA testi ile değerlendirildi. ELISA ile kornea örneklerinden IL-1 $\alpha$ , TGF-B, TNF-a, VEGF, MDA düzeylerinin sayısal değerleri ölçülmüştür. Tüm bu parametrelerinin gruplar arası dağılımı Tablo 1’de verilmiş olup ortalama ve ortanca değerleri gösterilmiştir.

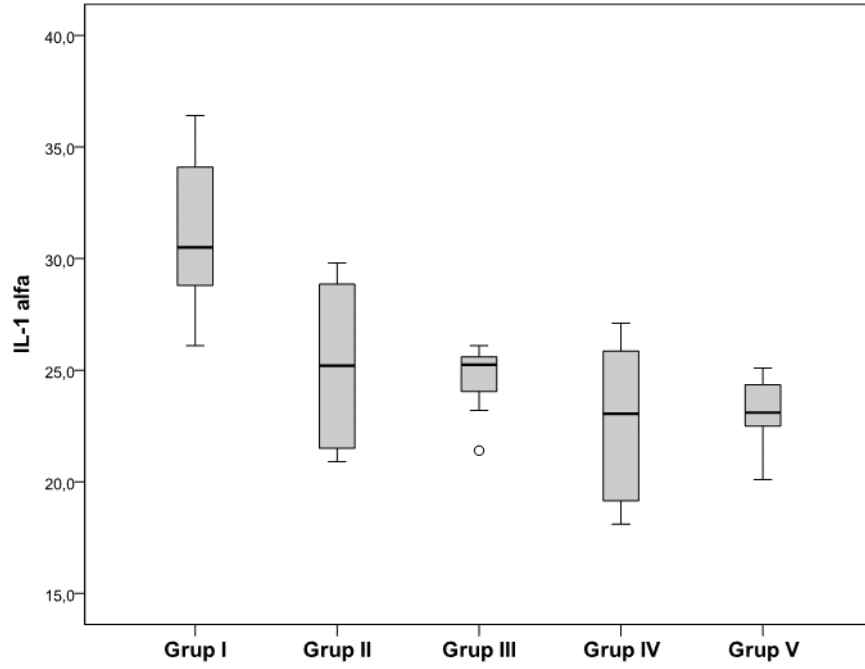
**Tablo 1:** Biyokimyasal parametrelerin gruplar arasında dağılımı

	<b>Grup I A</b>	<b>Grup II B</b>	<b>Grup III C</b>	<b>Grup IV D</b>	<b>Grup V E</b>	<b>Test Değeri</b>	<b>p</b>	<b>Post Hoc</b>
<b>IL-1alfa</b>	31,16±3,47 30,50 (26,10-36,40)	25,22±3,86 25,20 (20,90-29,80)	24,66±1,58 25,25 (21,40-26,10)	22,66±3,60 23,05 (18,10-27,10)	23,13±1,57 23,10 (20,10-25,10)	18,295*	<b>0,001</b>	*** <b>A-C: 0,001</b> <b>A-D: 0,015</b> <b>A-E: 0,001</b>
<b>TGF-B</b>	233,20±21,57 239,95 (194,50-257,00)	217,06±27,73 219,00 (176,20-250,90)	232,68±18,25 232,25 (197,90-262,00)	193,01±38,58 (192,95 (149,10-233,50)	204,11±28,87 195,10 (175,60-261,30)	10,577*	<b>0,032</b>	*** <b>A-D: 0,021</b> <b>C-D: 0,021</b>
<b>TNF-A</b>	99,77±9,95 98,05 (84,40-117,30)	103,51±15,02 105,95 (84,50-119,60)	95,36±6,11 94,60 (85,70-106,20)	96,76±10,15 94,90 (81,20-113,50)	89,36±6,45 90,10 (79,30 -96,60)	2,194**	0,090	
<b>VEGF</b>	152,10±17,56 148,50 (128,20-184,80)	113,46±14,35 115,25 (96,40-129,30)	149,26±24,31 148,45 (120,00-187,60)	101,08±16,59 103,30 (75,20-120,60)	160,27±5,40 159,90 (153,00-169,50)	19,488**	<b>&lt;0,001</b>	***** <b>A-B: 0,003</b> <b>A-D: &lt;0,001</b> <b>B-C: 0,040</b> <b>B-E: &lt;0,001</b> <b>C-D: 0,005</b> <b>D-E: &lt;0,001</b>
<b>MDA</b>	4,75±0,26 4,73 (4,38-5,12)	3,71±0,16 3,70 (3,55-4,00)	3,72±0,16 3,78 (3,48-3,93)	3,48±0,19 3,49 (3,23-3,74)	3,52±0,14 3,54 (3,28-3,74)	58,846**	<b>&lt;0,001</b>	***** <b>A-B: &lt;0,001</b> <b>A-C: &lt;0,001</b> <b>A-D: &lt;0,001</b> <b>A-E: &lt;0,001</b>

Ortalama±Standart Sapma, Ortanca (minimum-maximum)

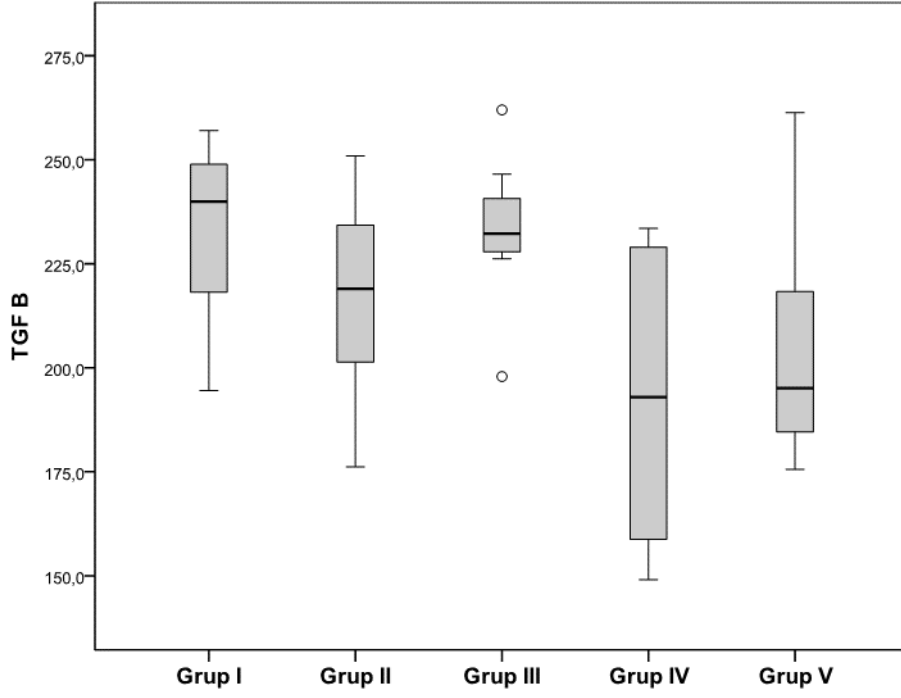
\*: Kruskal Wallis Testi / \*\*: One Way ANOVA Testi / \*\*\*: Mann Whitney U Testi / \*\*\*\*: Tamhane Post-hoc Testi / \*\*\*\*\*: Tukey Post-hoc Testi

IL-1 $\alpha$  değerlerinin gruplar arası dağılım Őeması Şekil 9’da gösterilmiştir. Çalışma grupları arasında IL-1 alfa düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark tespit edildi (p=0,001). Bu fark Sham olan Grup I ratlarda IL-1 $\alpha$  düzeyinin Grup III, Grup IV ve Grup V ratlara kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklanmaktaydı (p değerleri sırasıyla; p=0,001; p=0,001; p=0,001). Bu da IL-1 $\alpha$  antagonisti verilen gruplarda ve Anti-VEGF verilen grupta IL-1 $\alpha$  düzeyinin daha düşük tespit edildiğini göstermektedir.



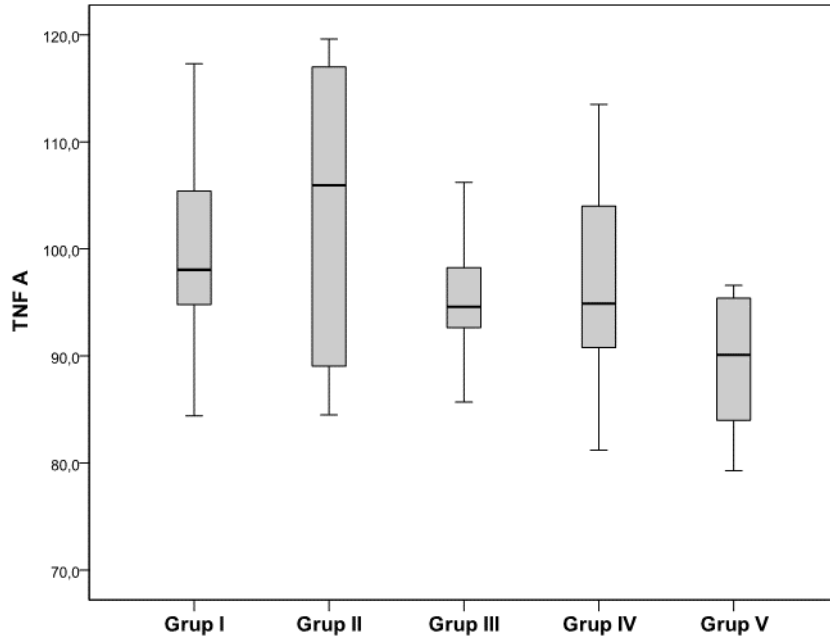
**Şekil 9:** IL-1  $\alpha$  düzeylerinin gruplar arasında dağılımını

TGF-B düzeyleri gruplar arası dağılımını Şekil 10’da verilmiştir. Çalışma grupları arasında TGF-B düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark bulundu (p=0,032). Bu fark Grup IV ratlarda TGF-B düzeyinin Grup I ve Grup IV ratlara göre daha düşük olmasından kaynaklanmaktaydı (p=0,021).



**Şekil 10:** TGF B düzeylerinin gruplar arasında dağılımı

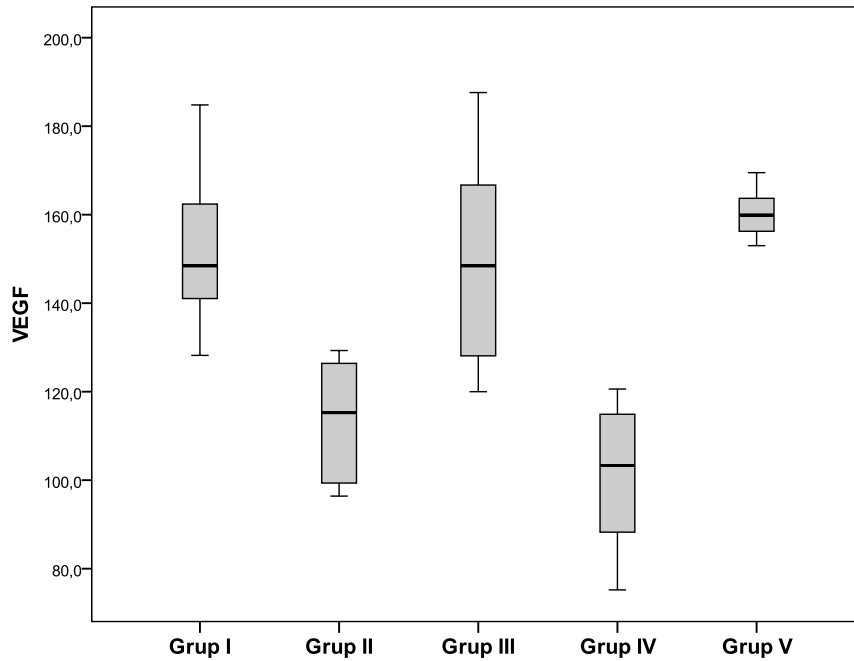
TNF-a düzeyleri gruplar arası dağılımı Şekil 10’da verilmiştir. Gruplar arasında TNF-a düzeyleri istatistiki olarak benzer bulundu ( $p>0,05$ ).



**Şekil 11:** TNF-a düzeylerinin gruplar arasında dağılımı

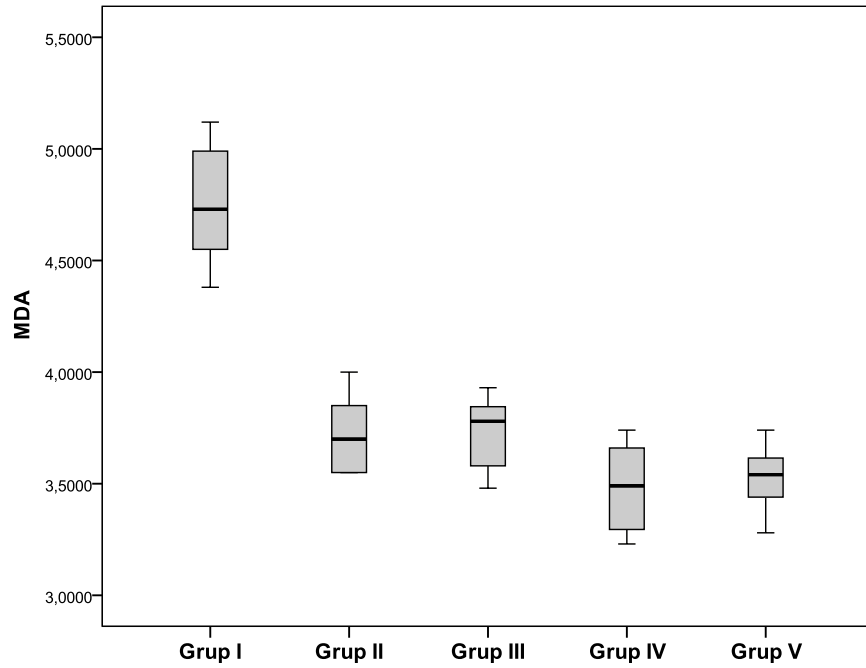
VEGF değerlerinin gruplar arası dağılımını Şekil 12’de verilmiştir.

Çalışma grupları arasında VEGF d¼zeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı d¼zeyde fark tespit edildi ( $p < 0,001$ ). Bu fark Grup II ratlarda ölç¼len VEGF d¼zeyinin Grup I, Grup III ve Grup V ratlara kıyasla daha d¼ř¼k olmasından ve Grup IV ratlarda ölç¼len VEGF d¼zeyinin Grup I, Grup III ve Grup V ratlara kıyasla daha d¼ř¼k olmasından kaynaklanmaktaydı ( $p$  değerleri sırasıyla;  $p=0,003$ ;  $p=0,040$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p=0,005$ ;  $p < 0,001$ ). Bu sonuçlara göre en d¼ř¼k ortalama VEGF değeri 101,08 olup Grup IV’te tespit edilmiştir.



**Şekil 12:** VEGF d¼zeylerinin gruplar arasında dağılımını

MDA değerlerinin gruplar arası dağılımını Şekil13’te verilmiştir. Araştırma grupları arasında MDA d¼zeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı d¼zeyde bir fark bulundu ( $p < 0,001$ ). Bu fark MDA d¼zeyinin Grup I ratlarda diğer gruplara (II, III; IV ve V) göre daha y¼ksek olmasından kaynaklanmaktaydı ( $p < 0,001$ ).



Şekil 13: MDA düzeylerinin gruplar arasında dağılımı

#### 4.2. Kornea Örneklerinin Patolojik Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarındaki ratların patolojik sonuçlarından membran varlığı ve fibroblast demet düzeylerinin dağılımı Tablo 2’de sunuldu. Tespit edilen membran sayılarının gruplar arasında dağılımı incelendi. Grup IV ratlardaki membran oranı Grup II ve Grup V ratlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p değerleri sırasıyla; p=0,041; p=0,005). Gruplar arasında en az 7 fibroblast demetinin dağılımında istatistiki bir fark izlenmedi (p>0,05).

Tablo 2: Gruplar arasında membran ve fibroblast demet dağılımı

	Grup I A	Grup II B	Grup III C	Grup IV D	Grup V E	Post Hoc*
<b>Membran</b>						<b>B-D: 0,041</b>
Var	6 (75,0)	7 (87,5)	5 (62,5)	2 (25,0)	8 (100,0)	
Yok	2 (25,0)	1 (12,5)	3 (37,5)	6 (25,0)	0 (0,0)	<b>D-E: 0,005</b>
<b>En az 7 Fibroblast Demeti</b>						
Var	1 (12,5)	5 (62,5)	2 (25,0)	1 (12,5)	2 (25,0)	
Yok	7 (87,5)	3 (37,5)	6 (25,0)	7 (87,5)	6 (75,0)	

\*: Fisher Exact Testi

Epitel proliferasyonu, fibroblast proliferasyonu, damarsal yapılaşma, inflamatuvar yapılaşma, IL-1 $\alpha$  boyanma (epitel hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz, iltihap

hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve fibroblast hücrelerinde) yoğunluklarının ortalama ve ortanca değerlerinin gruplar arası dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3:** Patoloji sonuçlarının gruplar arasında dağılımı

	Grup I A	Grup II B	Grup III C	Grup IV D	Grup V E	Test Değeri	P	Post Hoc**
<b>Epitel Proliferasyonu</b>	1 (0-3)	1,5 (1-3)	0 (0-2)	0 (0-2)	2 (1-3)	9,371*	0,052	
<b>Fibroblast Proliferasyonu</b>	1 (1-3)	2 (1-2)	0 (0-1)	0,5 (0-1)	1 (1-2)	19,942*	<b>0,001</b>	<b>B-C: 0,030 B-D: 0,045</b>
<b>Damarsal Yapılaşma</b>	3 (2-3)	3 (2-3)	2 (1-3)	1,5 (0-2)	2 (2-2)	23,041*	<b>&lt;0,001</b>	<b>A-D: 0,015 A-E: 0,030 B-D: 0,045</b>
<b>İnflamatuar Yapılaşma</b>	2 (1-3)	2,5 (1-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	2 (1-3)	8,795*	0,066	
<b>Epitel Hücre Sitoplazmalarında IL-1 boyama</b>	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (0-2)	1 (1-2)	2 (2-3)	12,018*	<b>0,017</b>	<b>D-E: 0,049</b>
<b>Epitel Hücre Membranlarında IL-1 boyama</b>	0,5 (0-5)	1 (0-2)	0 (0-2)	0,5 (0-2)	0 (0-2)	1,067*	0,900	
<b>İltihap Hücrelerinde IL-1 boyama</b>	3 (3-3)	3 (2-3)	2,5 (1-3)	3 (1-3)	3 (2-3)	7,105*	0,130	
<b>Endotel Hücrelerinde IL-1 boyama</b>	3 (2-3)	3 (2-3)	3 (1-3)	3 (2-3)	3 (2-3)	1,910*	0,752	
<b>Fibroblast Hücrelerinde IL-1 boyama</b>	2 (2-3)	2 (2-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	2,5 (1-3)	3,190*	0,527	

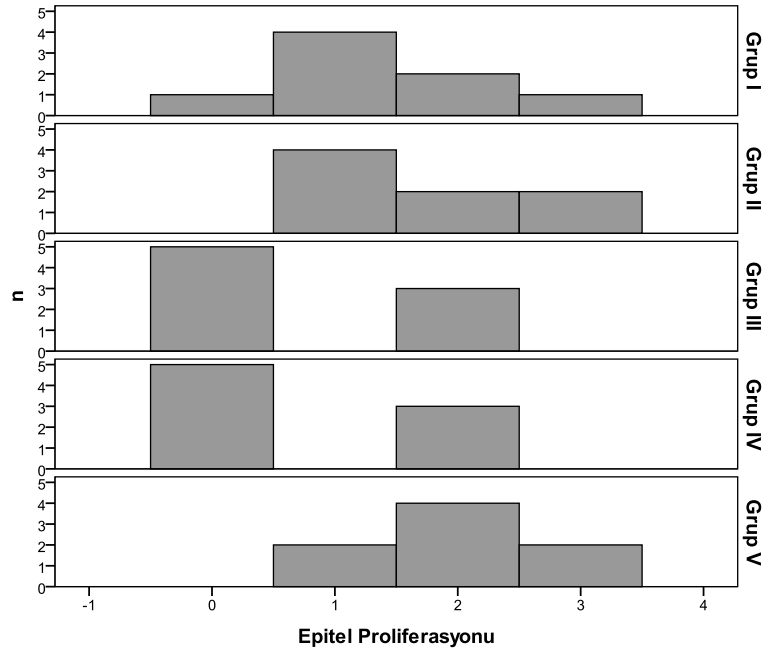
Ortalama±Standart Sapma, Ortanca (minimum-maximum)

\*: Kruskal Wallis Testi

\*\* : Mann Whitney U Testi

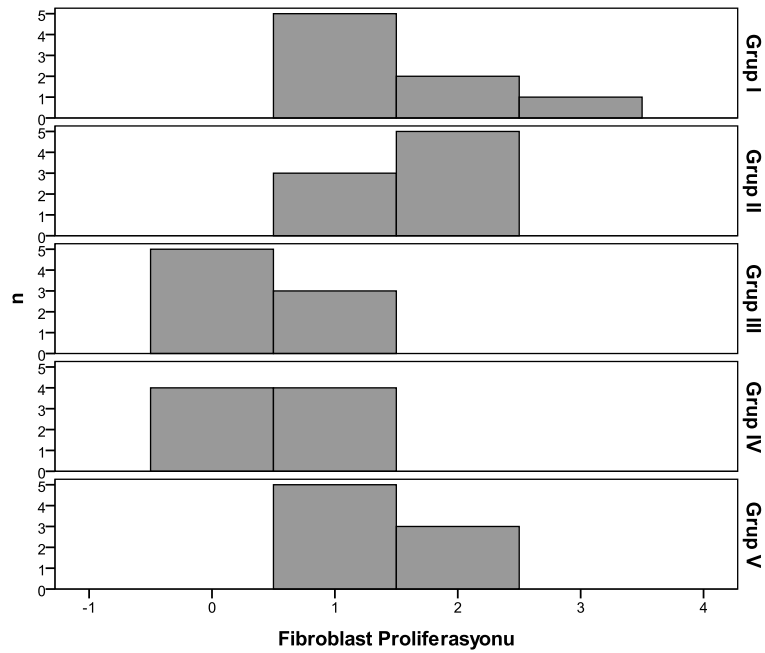
Patolojik değerlendirmede 3 ratta inflammatuar hücre tespit edilmedi.

Epitel proliferasyonu skorunun gruplar arası dağılımı Şekil 14'te verilmiştir. Epitel proliferasyonunun yoğunluğu en az Grup III ve Grup IV'te tespit edilmiş olup en çok Grup V'te izlenmiştir. Gruplar arasında epitel proliferasyonu açısından anlamlı fark tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).



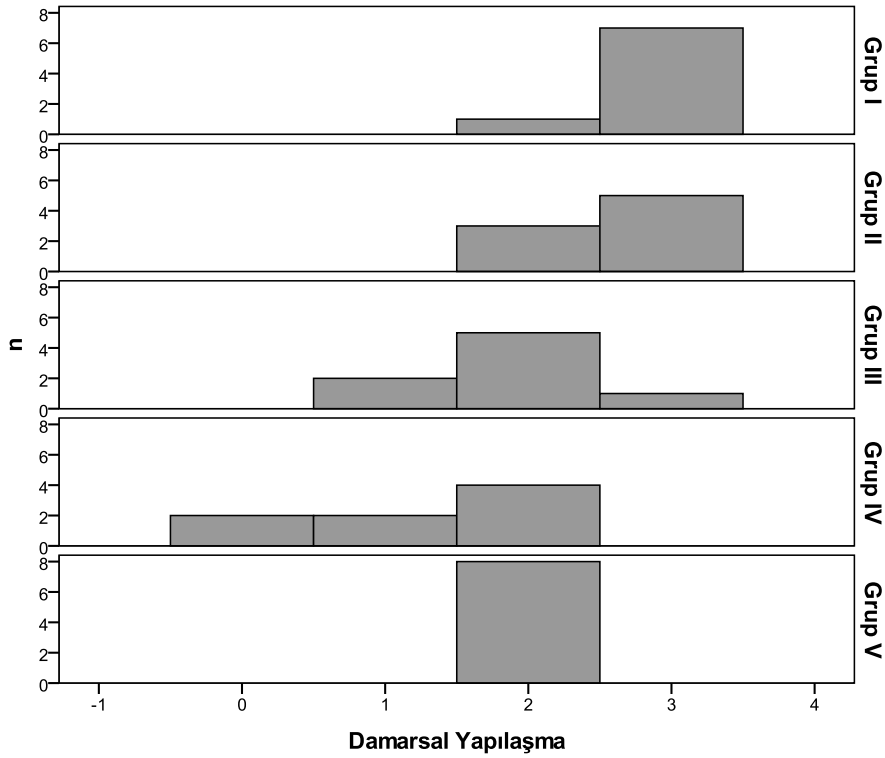
**Şekil 14:** Epitel proliferasyon skorunun gruplar arasında dağılımı

Fibroblast proliferasyonu skorunun gruplar arası dağılımı Şekil 15’te gösterilmiştir. Fibroblast proliferasyon düzeyinin gruplar arasında dağılımında istatistiki fark bulundu ( $p=0,001$ ). Bu fark Grup II ratlardaki fibroblast proliferasyon düzeyinin Grup III ve Grup IV ratlara göre daha yüksek olmasından kaynaklanmaktaydı ( $p$  değerleri sırasıyla;  $p=0,030$ ;  $p=0,045$ ).



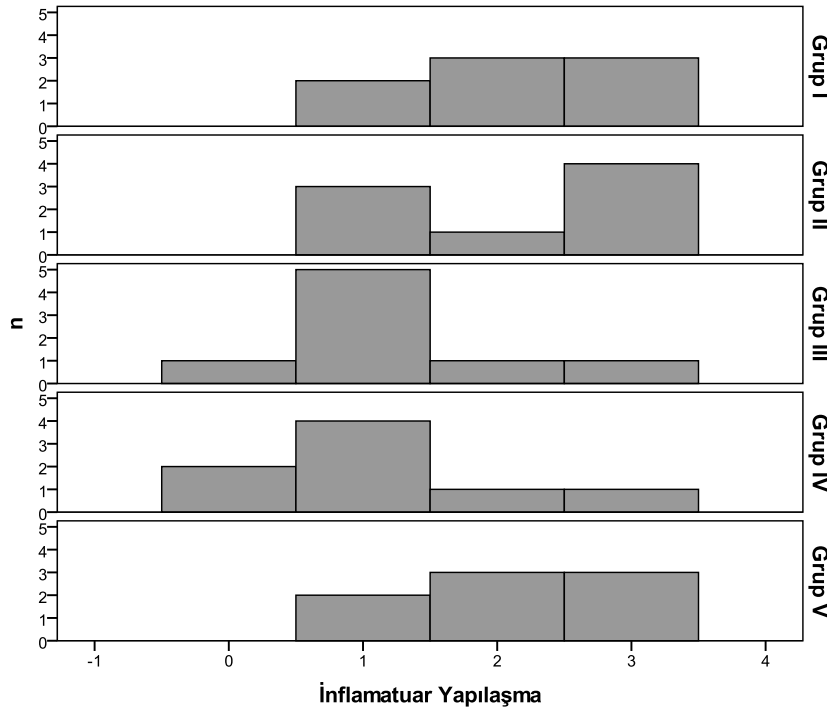
**Şekil 15:** Fibroblast proliferasyon skorunun gruplar arasında dağılımı

Damarsal yapılaşma skorunun gruplar arası dağılımı Şekil 16’da gösterilmiştir. Damarsal yapılaşma ortalama skoru 1,5 değeri ile en düşük Grup 4’te izlenmektedir. Bunu takiben Grup 3 ve Grup 5’te bu skorun ortalaması 2 düzeyindedir). Damarsal yapılaşma düzeyinin gruplar arasında dağılımında istatistiki fark bulundu ( $p<0,001$ ). Bu fark Grup I ratlardaki damarsal yapılaşma düzeyinin Grup IV ve Grup V ratlara göre daha yüksek, Grup II ratlarda Grup IV ratlara göre daha yüksek olmasından kaynaklanmaktaydı (p değerleri sırasıyla;  $p=0,015$ ;  $p=0,030$ ;  $p=0,045$ ).



**Şekil 16:** Damarsal yapılaşma skorunun gruplar arasında dağılımı

İnflamatuar yapılaşma skorunun gruplar arasında dağılımı Şekil 17’de gösterilmiştir. İnflamatuar yapılaşma ortalama değeri en çok Grup II’de, en az Grup III ve Grup IV’te izlense de gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ).



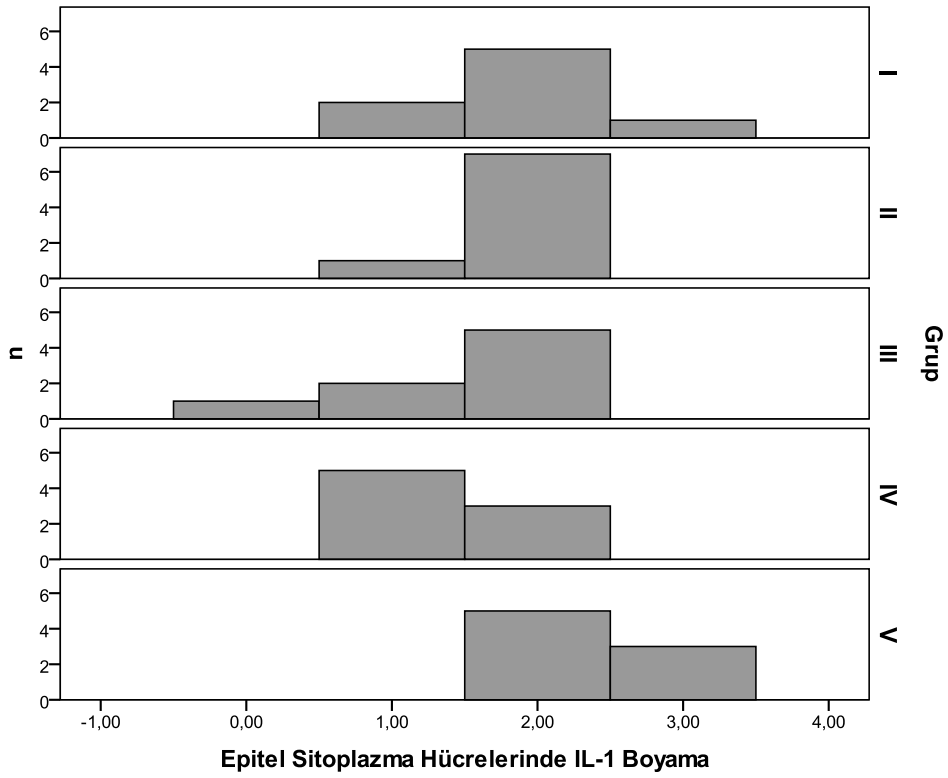
**Şekil 17:** İnflamatuar yapılaşma skorunun gruplar arasında dağılımı

IL-1 $\alpha$  boyanması epitel hücrelerde membranöz ve sitoplazmik olarak boyanma değerlendirilmiştir. İltihap hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve fibroblast hücrelerinde ise membranöz boyanma değerlendirilmiştir.

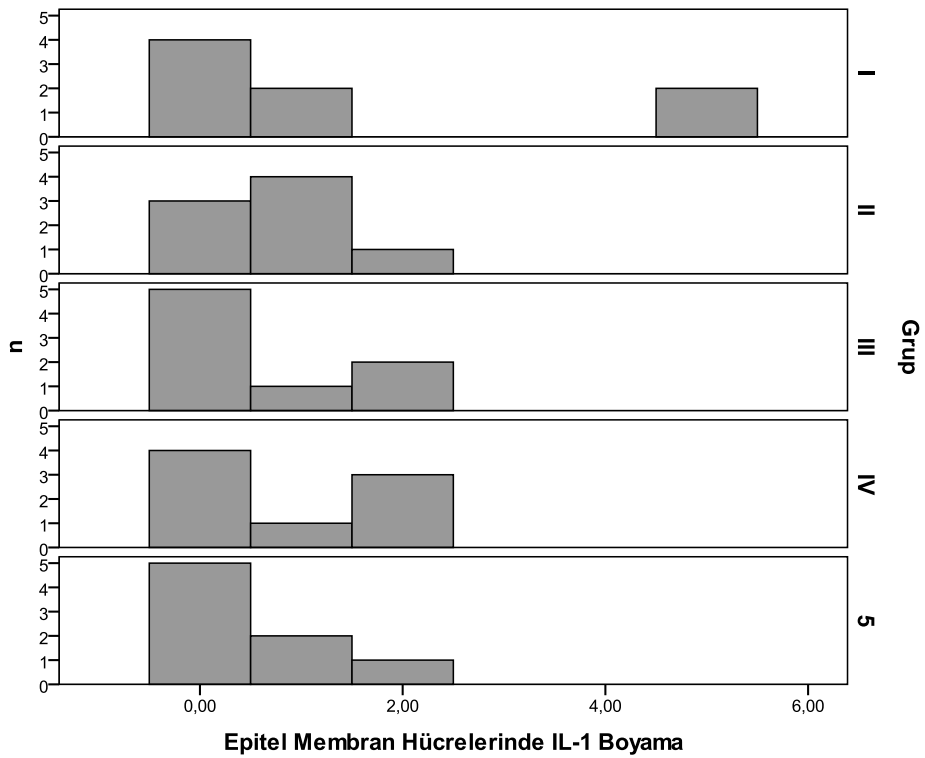
Epitel hücre sitoplazmalarında IL-1 boyanma düzeyinin gruplar arasında dağılımı istatistiksel olarak farklı bulundu ( $p=0,017$ ). Bu fark Grup IV ratlarda bu düzeyin Grup V ratlara göre daha düşük olmasından kaynaklanıyordu ( $p=0,049$ ).

Epitel hücre membranlarında IL-1 boyama, iltihap hücrelerinde IL-1 boyama, endotel hücrelerinde IL-1 boyama ve fibroblast hücrelerinde IL-1 boyanma düzeyleri gruplar arasında benzer tespit edildi ( $p>0,05$ ).

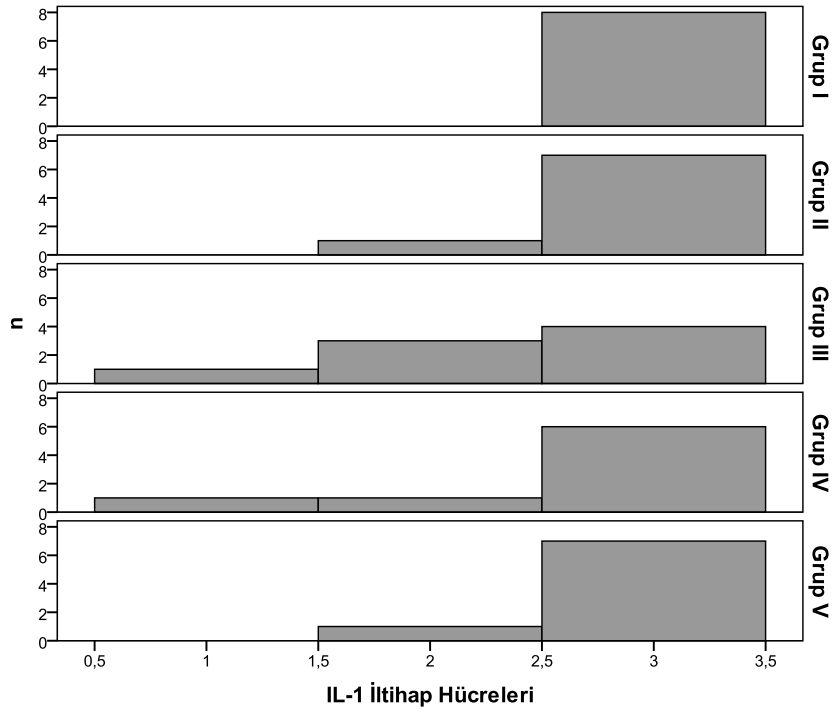
IL-1 $\alpha$  boyanması gruplar arası dağılımı epitel hücrelerinin sitoplazmalarında Şekil 18'de, epitel hücrelerinin membranlarında Şekil 19'da iltihap hücrelerinde Şekil 20'de, endotel hücrelerinde Şekil 21'de, fibroblast hücrelerinde ise Şekil 22'de gösterilmiştir.



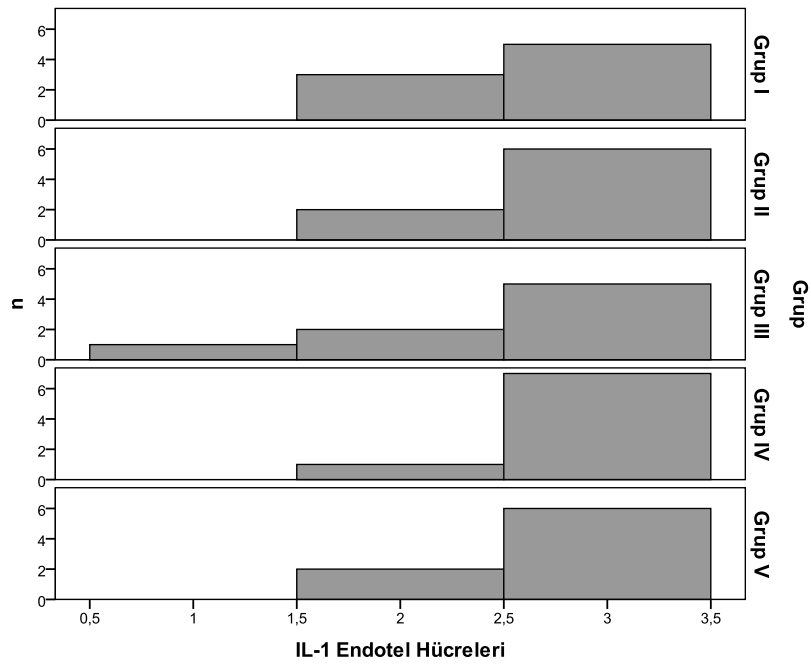
Şekil 18: Epitel hücrelerinin sitoplazmik IL-1 $\alpha$  boyanma gruplar arasında dağılımı



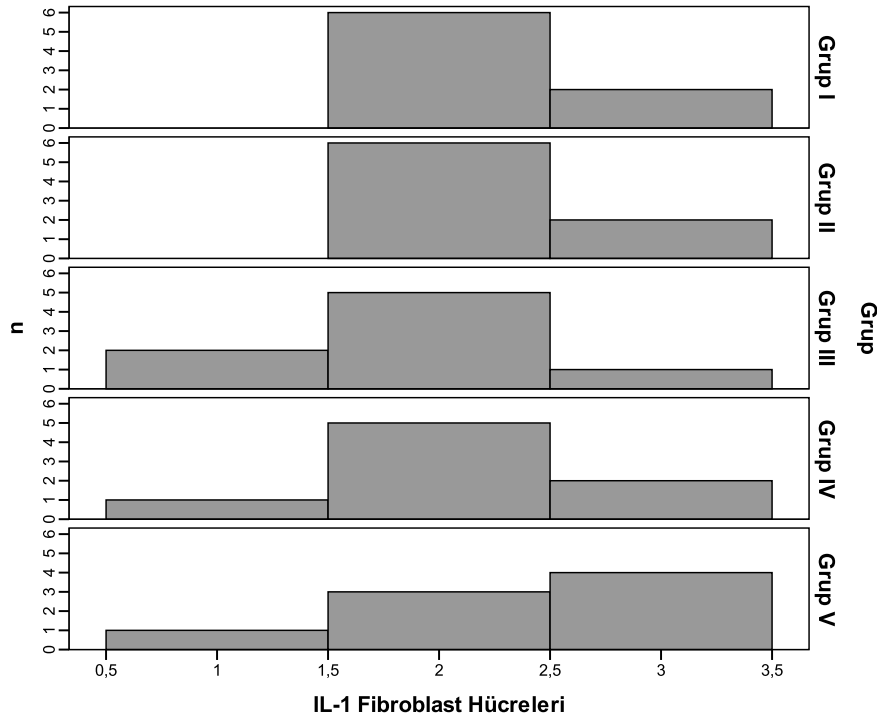
Şekil 19: Epitel hücrelerinin membranöz IL-1 $\alpha$  boyanma gruplar arasında dağılımı



Şekil 20: İltihap hücrelerinde IL-1 $\alpha$  boyanma gruplar arasında dağılımı



Şekil 21: Endotel hücrelerinde IL-1 $\alpha$  boyanma gruplar arasında dağılımı



**Şekil 22:** Fibroblast hücrelerinde IL-1 $\alpha$  boyanma gruplar arasında dağılımı

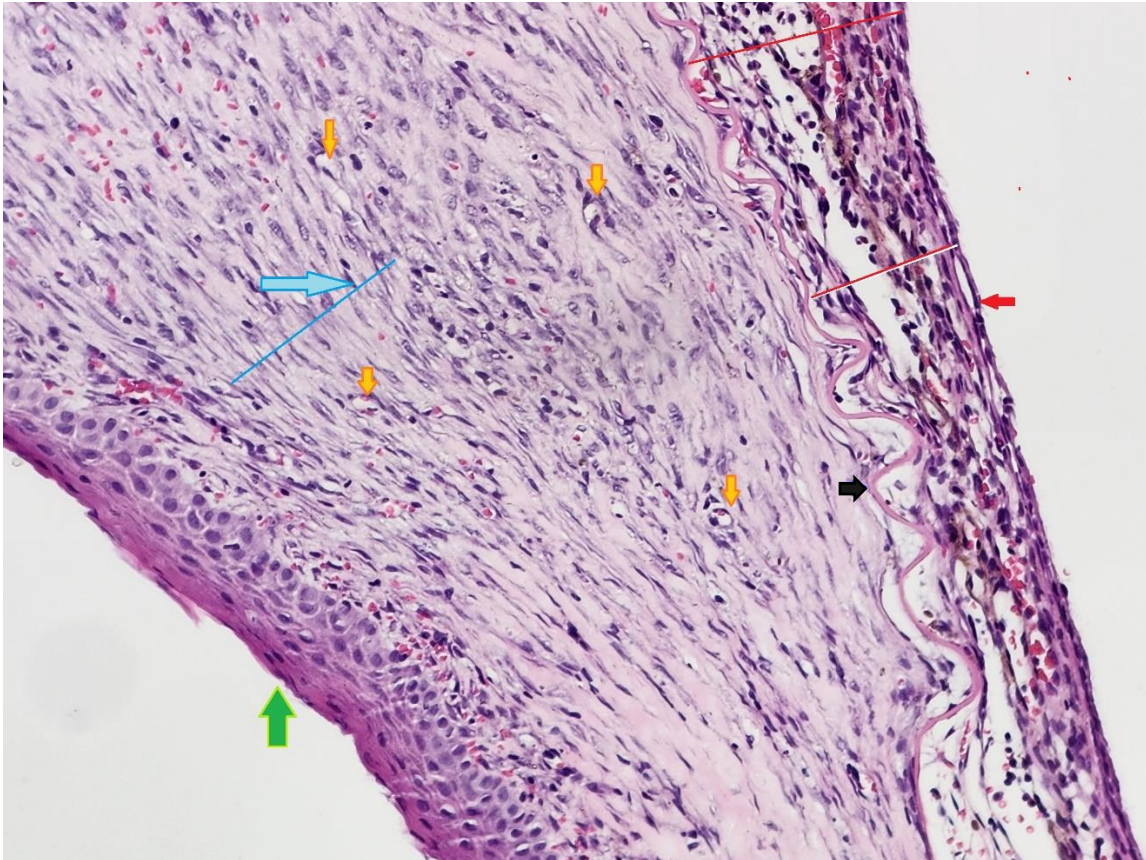
Çalışma grupları arasında inflamatuvar hücrelerin dağılımı (NPL, LYMP, EO, MCF ve PL olmak üzere) Tablo 4'te sunuldu. NPL hücreleri Grup I'de %75,0, Grup II'de %100,0, Grup III'te %50,0, Grup IV'te %75,0 Grup V'te ise %100,0 oranında tespit edildi. LYMP hücreleri Grup I'de %62,5, Grup II'de %37,5, Grup III'te %75,0, Grup IV'te %25,0 Grup V'te ise %62,5 oranında tespit edildi. EO hücreleri Grup I'de %25,0, Grup II'de %37,5, Grup III'te %25,0, Grup IV'te %0 Grup V'te ise %75 oranında tespit edildi. Grup V'te Grup IV'e göre EO oranı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p=0,007$ ). MCF hücreleri Grup I'de %0 Grup II'de %50,0, Grup III'te %25,0, Grup IV'te %12,5 Grup V'te ise %37,5 oranında tespit edildi. PL hücreleri Grup I'de %37,5, Grup II'de %0, Grup III'te %0, Grup IV'te %0 Grup V'te ise %12,5 oranında bulundu.

**Tablo 4:** Gruplar arasında inflamatuvar hücrelerin dağılımı

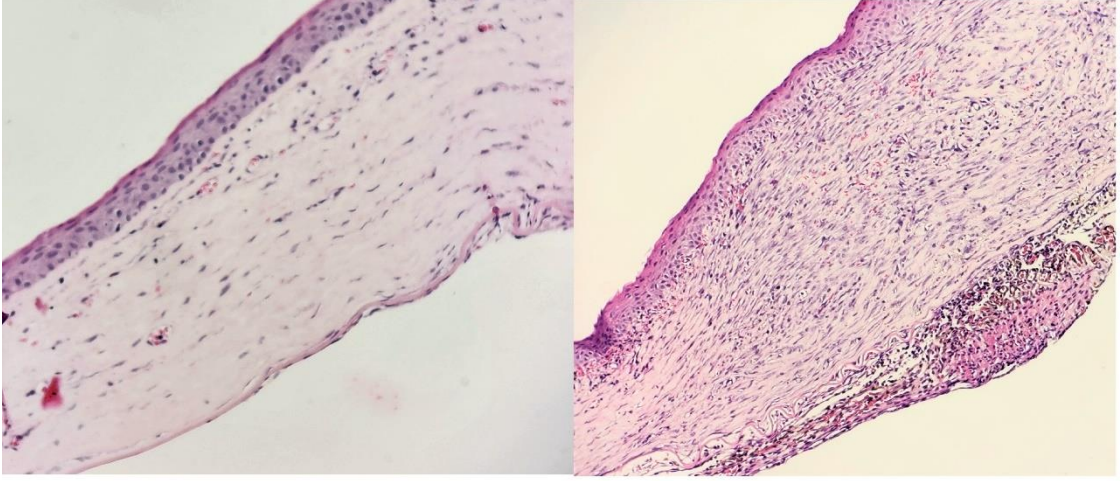
	Grup I A	Grup II B	Grup III C	Grup IV D	Grup V E	Post Hoc*
<b>NPL</b>						
Var	6 (75,0)	8 (100,0)	4 (50,0)	6 (75,0)	8 (100,0)	
Yok	2 (25,0)	0 (0,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	
<b>LYMP</b>						
Var	5 (62,5)	3 (37,5)	6 (75,0)	2 (25,0)	5 (62,5)	
Yok	3 (37,5)	5 (62,5)	2 (25,0)	6 (75,0)	3 (37,5)	
<b>EO</b>						
Var	2 (25,0)	3 (37,5)	2 (25,0)	0 (0,0)	6 (75,0)	<b>D-E: 0,007</b>
Yok	6 (75,0)	5 (62,5)	6 (75,0)	8 (100,0)	2 (25,0)	
<b>MCF</b>						
Var	0 (0,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	1 (12,5)	3 (37,5)	
Yok	8 (100,0)	4 (50,0)	6 (75,0)	7 (87,5)	5 (62,5)	
<b>PL</b>						
Var	3 (37,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0(0,0)	1 (12,5)	
Yok	5 (62,5)	8 (100,0)	8 (100,0)	8 (100,0)	7 (87,5)	

\*: Fisher Exact Testi

### 4.3 Patoloji Örneklerinin Fotoğraflanması

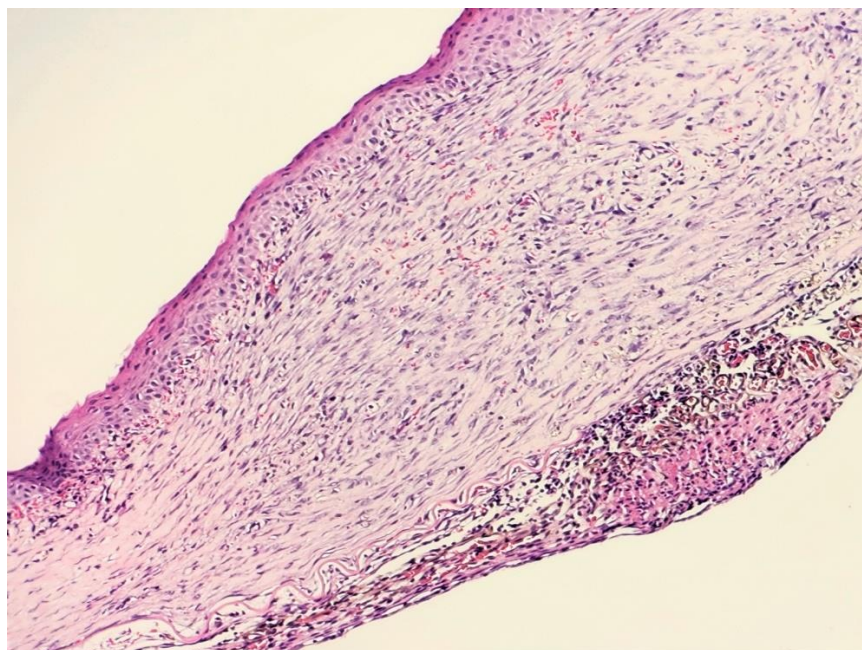


**Şekil 23:** Kornea örneklerinin patolojik olarak incelenmesinde genel verileri gösteren fotoğraf. Kırmızı ok: endotel tabakasını, kırmızı çizgi: membran varlığını, siyah ok: desme membranını, sarı oklar:damarları, mavi ok: fibroblastları, mavi çizgi:fibroblast demetleşmesini, yeşil ok: epiteli göstermektedir.

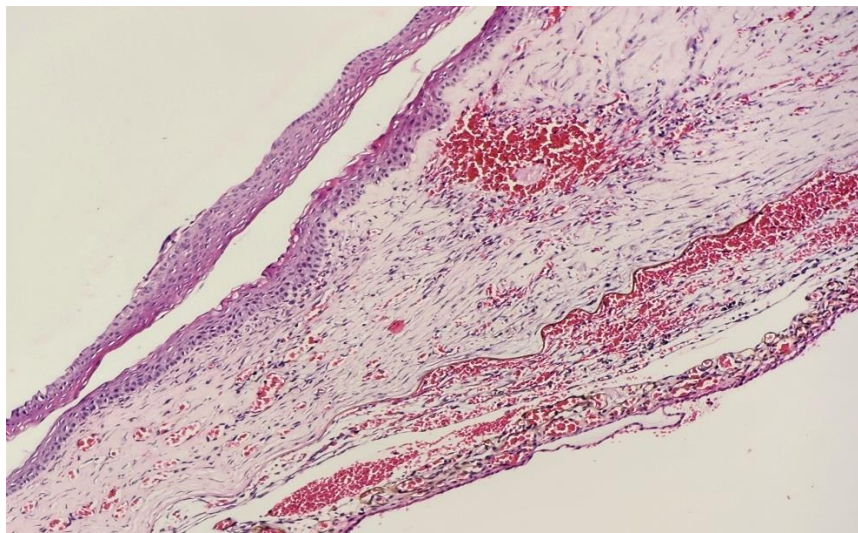


**Şekil 24:** Normal kornea ve hasarlı kornea patolojik gösterimi. Soldaki resim normal kornea dokusu patoloji fotoğrafı, sağdaki resim inflamatuvar hücrelerin ve vaskülerin yapıların arttığı, membran oluşumunun izlendiği hasarlı kornea dokusu patoloji fotoğrafı .

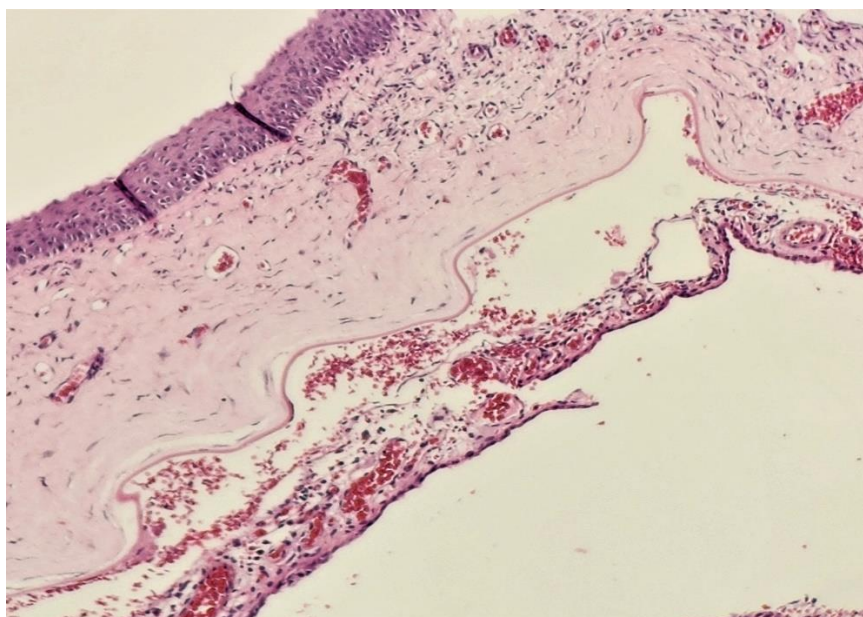
Grup I



Grup II



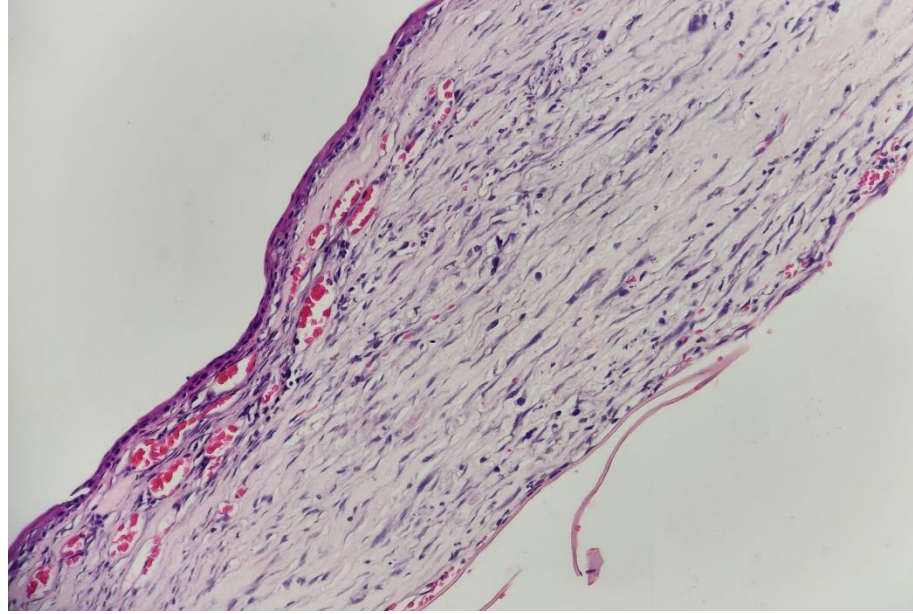
Grup III



Grup IV



Grup V

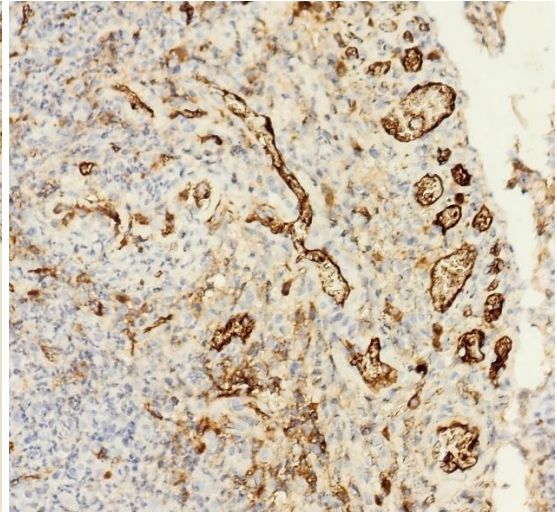
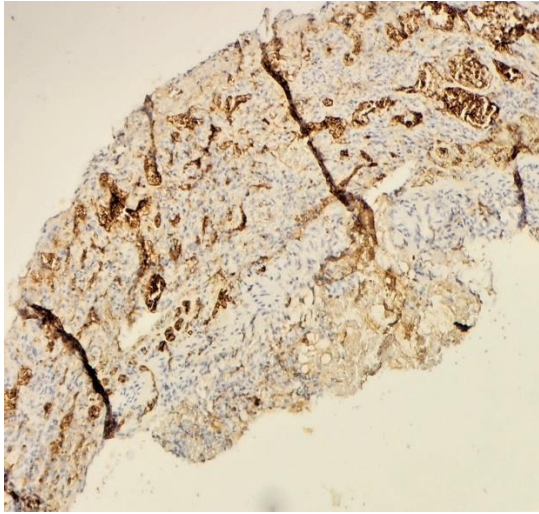


**Şekil 25:** x100 büyütmede Hematoksilen&Eozin boyası ile boyanmış kornea örneklerin fotoğrafları. İnflamatuvar yapılar, membran varlığı, fibroblast demetleşmesi, damarsal yapılar ve fibroblastların gösterimi.

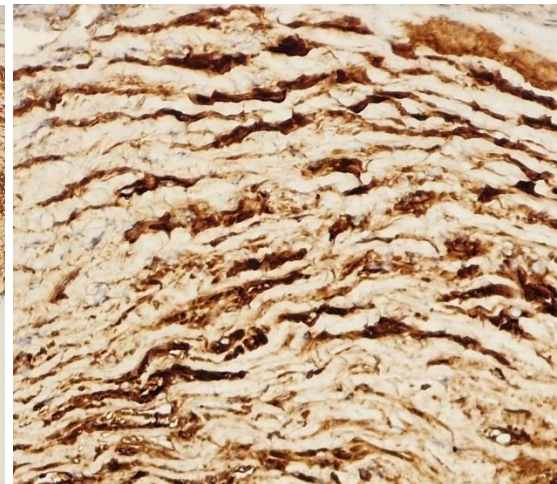
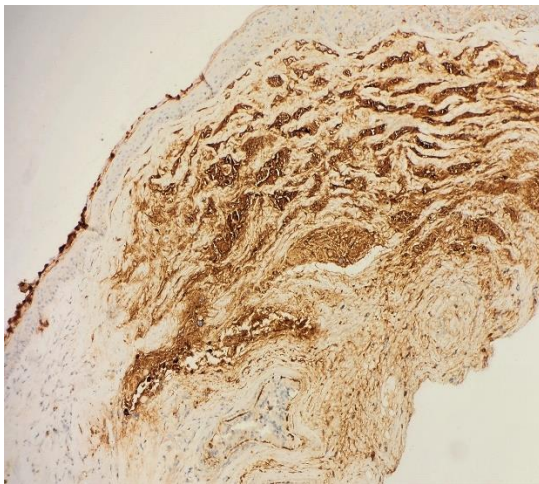
X100

X400

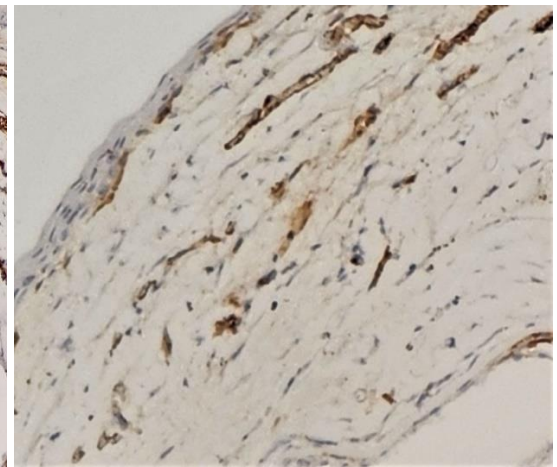
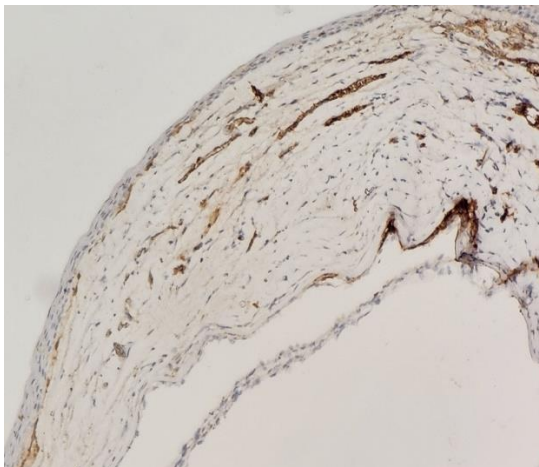
Grup I

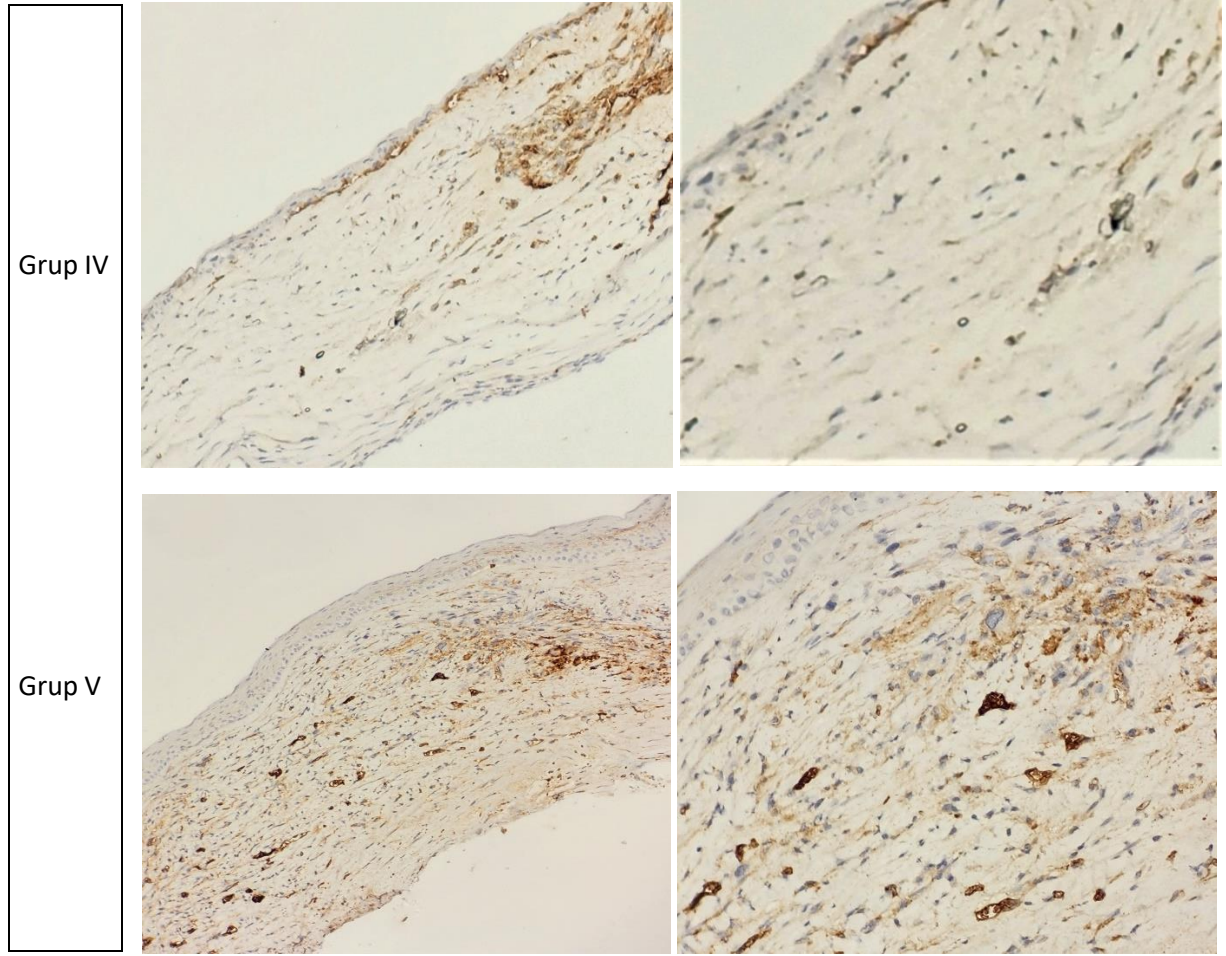


Grup II

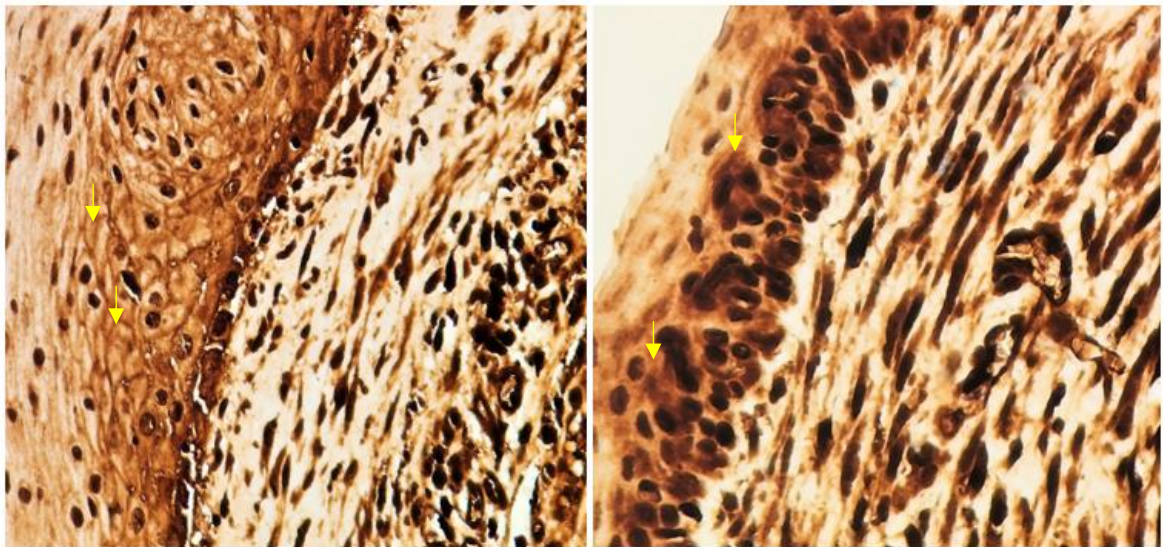


Grup III





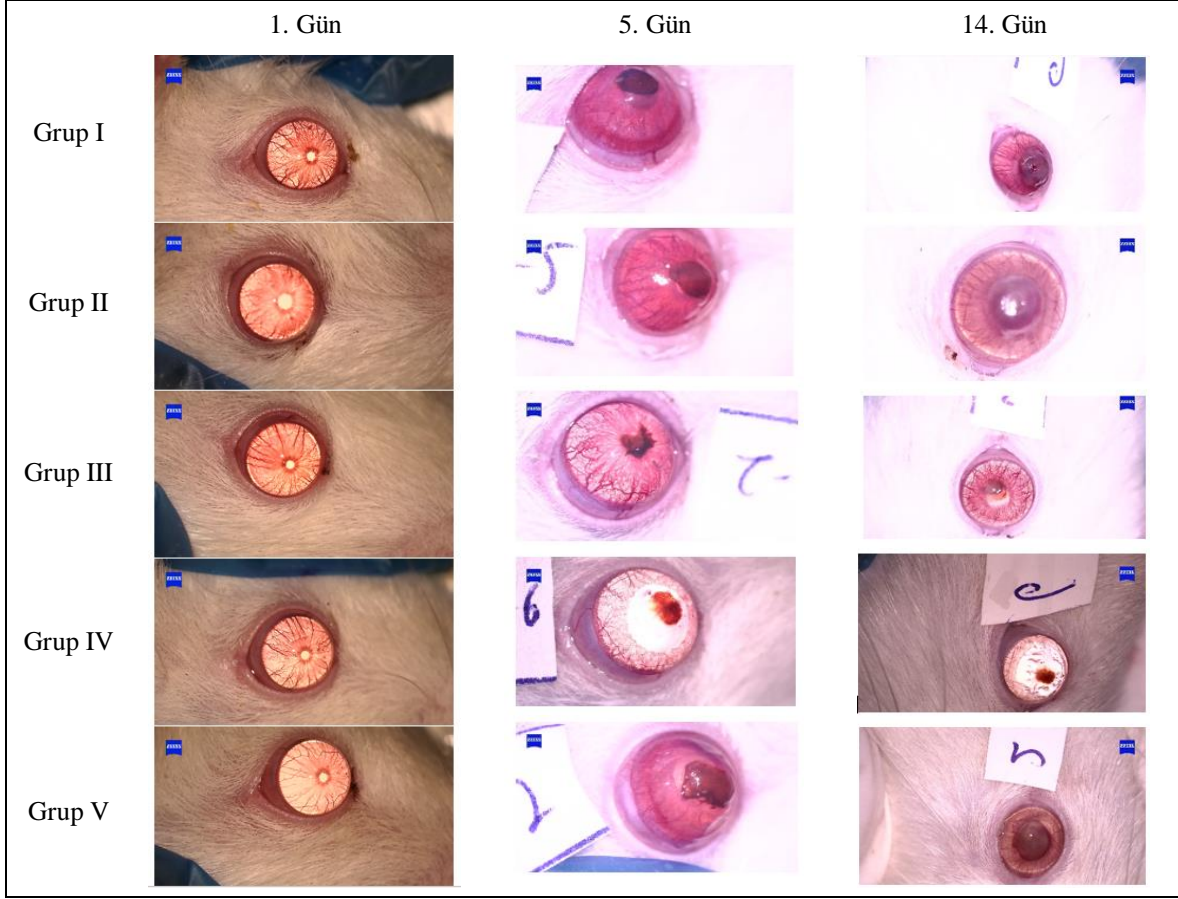
**Şekil 26:** Sırasıyla X100 ve X400 büyütmede CD34 damar boyası ile boyanmış kornea örneklerinin fotoğrafları.



**Şekil 27:** İmmunohistokimyasal membranöz ve sitoplazmik IL-1 $\alpha$  boyanmayı göstermekte olan fotoğraf. Soldaki resimde sarı oklar hücre duvarlarında membranöz IL-1 $\alpha$  boyanmayı,

sağdaki resimde sarı oklar hücre içi sitoplazmik IL-1 $\alpha$  boyanmayı göstermekte olan fotoğraf.

#### 4.4. Korneaların Fotoğraflanması



Şekil 28: Rat kornealarının fotoğraflanması

## 5. TARTIŞMA

Korneal neovaskularizasyonlar birçok nedene bağlı olarak oluşabilmektedir. Bunun temelinde inflamasyon ve vaskularizasyon oluşturan moleküller yer almaktadır. Korneanın saydam kalması görme fonksiyonunun yerine getirilmesi için en önemli koşullardan biridir. Biz de çalışmamızda rat kornealarında kimyasal yanık yaparak bir inflamasyon ve neovaskularizasyon süreci oluşturduk. Bu süreçte inflamasyonu baskılamak için IL-1 $\alpha$  antagonistinin etkisini gözlemledik. Kornealar üzerinde yapılan çalışmamız sonucu neovaskularizasyonu, VEGF düzeyini ve inflamatuvar parametrelerini azalttığını gördük.

Korneal neovaskularizasyon tedavisinde steroidlerin çeşitli formlarının kullanıldığı ve bu moleküllerin korneal neovaskularizasyonu azalttığı gösterilmiştir (84). Cursiefen ve ark. yaptıkları çalışmada keratoplasti sonrası gelişen korneal neovaskularizasyonlarda uzun süreli ve kısa süreli kortikosteroid kullanımı arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (85). Steroidler sitokinleri ve inflamatuvar parametreleri baskılayarak korneal inflamasyonu azaltır.

Cooper ve ark. yaptığı çalışmada ise korneal neovaskularizasyon tedavisinde topikal %0,1'lik flurbiprofen kullanımının topikal %1'lik prednisolon kullanımına benzer oranda vaskularizasyonu azalttığını gözlemlemişlerdir (86). Flurbiprofen molekülü steroid olmayan antiinflamatuvar bir ajandır ve kontakt lens kullanımına bağlı korneal neovaskularizasyonu azalttığı gösterilmiştir (87). Steroidler ve non steroid anti inflamatuvar ajanlar sitokinleri, inflamatuvar parametreleri azaltarak korneal vaskularizasyon oluşumunu engellemeye çalışmaktadırlar. Bizim çalışmamızda da benzer olarak IL-1 $\alpha$  molekülünün inhibisyonunun inflamasyonu başlangıcından itibaren azalttığı düşünülmüştür. Bunun sonucu olarak IL-1 $\alpha$  antagonisti verilen gruplarda inflamatuvar parametreler daha düşük seviyede bulunmuştur.

Peyman ve ark. ise rat kornealarında kimyasal koterizasyon oluşturmuş ve doksisisiklinin vaskularizasyonu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (88). Jovanovic ve ark. korneal vaskularizasyonu olan altı hastaya uyguladıkları topikal doksisisiklin tedavisi ile vaskularizasyonların gerilediğini gözlemlemişlerdir (89).

Bazı immunmodülatör ilaçların da korneal vaskularizasyonları azalttığı gösterilmiştir. İmmunmodülatör ilaçlardan mTor inhibitörü everolimus daha efektif olmak üzere multikinaz inhibitörü olan sunitinibin de korneal vaskularizasyonu azalttığı gösterilmiştir (90). Sunitinib selektif olarak VEGF inhibisyonu yapmaktadır ve

bevacizumaba göre korneal vaskülarizasyonu daha iyi baskılmaktadır. İmmun modülatör ilaçların korneal vaskülarizasyonu anti-VEGF ilaçlara göre daha da azaltması hem inflamasyonu hem de VEGF molekülünü baskılamasından kaynaklanabilir. Bizim çalışmamızda IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen gruplarda VEGF oranının bevacizumab verilen gruplardan daha düşük olmasının nedeninin erken safhada inflamasyonun kontrolü olduğu düşünülmüştür.

IL-6 antagonisti tocilizumabın anti inflamatuvar etki göstererek korneal neovaskülarizasyonu azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Tavşanlarda yapılan deneysel bir çalışmada subkonjonktival IL-6 reseptör antagonisti tocilizumabın bevacizumab ile benzer oranda antianjiogenik etkisi olduğu görülmüştür (91). Sarı ve ark. yaptığı çalışmada da ratlar üzerinde korneal alkali kimyasal yanık modeli oluşturulmuş ve subkonjonktival tocilizumabın korneal vaskülarizasyonu azaltmada olumlu etkileri olduğu görülmüştür (92). Tocilizumabın immün modülatör etkisi ile rat allograft kornealarında sağ kalımı arttığı gözlemlenmiştir (93). IL-6 ve IL-1 molekülleri kornea üzerinde benzer etkilerle sahip proinflamatuvar sitokinlerdir. Bu çalışmada da bizim çalışmamıza benzer olarak bu sitokinlerin inhibitörleri subkonjonktival uygulanmış ve korneal vaskülarizasyonu azalttıkları görülmüştür. Ayrıca bu ilaçların subkonjonktival yolla uygulanabilirliği ve bu uygulama şeklinin güvenilirliği ve etkinliği açısından dikkat çekmektedir.

İnfliksımab ise TNF-a'yı inhibe ederek inflamasyonu azaltmayı hedefleyen bir ajandır. 12 tavşan ile yapılan bir çalışmada topikal infliksımab uygulanmasının korneal vaskülarizasyonu azalttığı gözlemlenmiştir (94). Voiculescu ve ark. yaptığı çalışmada korneal yanık modellemesinde infliximabın fibroblastlar aktivitesini azaltarak korneal vaskülarizasyon oluşumunu azalttığı görülmüştür (95). İnfliksımabın vasküler endotel hücrelerinde TNF-a'yı inhibe ederek inflamasyonu azalttığı bu sayede korneal dokuda hemanjiogenez ve lenfanjiogenez kontrol ederek korneal vaskülarizasyon tedavisinde kullanılabilir bir ajan olduğu düşünülmüştür (96). Özdemir ve ark. TNF-a inhibitörü olan etanersept ile bevacizumabın korneal vaskülarizasyon üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla 28 rat üzerinde deneysel bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada etanersept, bevacizumab ve iki ajanın beraber uygulandığı gruplar karşılaştırılmıştır ve etanersept ve bevacizumabın beraber uygulandığı grupta vaskülarizasyonun en az olduğu izlenmiştir (97). Ancak bizim çalışmamızda TNF-a düzeyi en düşük Grup V'te tespit edilse de gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (p= 0,090). IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen grupta

inflamasyonun baskılamasına rağmen TNF-a düzeyi bevacizumab verilen gruba göre daha yüksek bulunmuştur.

Korneanın askorbik asit açısından zengin bir doku olduğu ve korneal yaralanmalardan sonra askorbik asitin iyileşmeye olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (98). Askorbik asitin tavşan kornealarında VEGF ve matriks metalloproteinaz-9 seviyelerini düşürerek korneal vaskülarizasyona olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (99). Askorbik asitle yapılan bir başka çalışmada ise prolin, lizin ve yeşil çay ekstratı ile beraber korneaya uygulanan askorbik asit tedavisinin anjiogenezi azalttığı görülmüştür (100). Askorbik asit, yeşil çay ekstratı anti oksidan moleküllerdir. Bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da toksik maddelerin vaskülarizasyonu artıracığı düşünülmüştür. Çalışmamızda ölçülen MDA toksik bir moleküldür. İlaç almayan Grup I'de MDA molekülünün en yüksek düzeyde olduğu görülmüştür.

Takrolimus T hücrelerden IL-2 yapımını azaltarak inflamasyonu baskılamaktadır. Turgut ve ark. yaptığı çalışmada kimyasal korneal yanık modellemesinde takrolimusun topikal ve sistemik kullanımının vaskülarizasyonu azalttığını göstermişlerdir (101). Tavşanlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada topikal ve subkonjonktival takrolimus kullanımının bevacizumabla kıyaslanabilir derecede VEGF ve inflamatuvar parametreleri azalttığı gösterilmiştir (102). Alkali yanıkta takrolimus kullanımının uzun dönem etkileri arasında anti-VEGF'e kıyasla korneal vaskülarizasyonun, opasitenin ve inflamasyonun anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür (103). Ayrıca korneal ve limbal greft uygulanmış 26 hasta ile yapılan bir çalışmada topikal takrolimus kullanımının korneal sağ kalımı artırdığı gösterilmiştir (104). Takrolimusun sklerit, kronik konjonktivit gibi oküler yüzey inflamatuvar hastalıklarında inflamasyonu kontrol altına alarak korneal epitel iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür (105). IL-1 sitokini, IL-2 ile benzer özellikler taşımaktadır. IL-2 inhibisyonunun anti-VEGF'e göre korneal vaskülarizasyonu daha iyi ve daha uzun süre kontrol ettiği gösterilmiştir. IL-1 $\alpha$  inhibisyonu da VEGF'i ve inflamatuvar parametreleri takrolimusa benzer şekilde azaltmıştır. Bu durum iki anti inflamatuvar ajanın benzer etkilerle korneanın saydamlığını artırabilir nitelikte olduğunu göstermektedir.

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç grubu anti- VEGF ajanlardır. Topikal ya da subkonjonktival yolla anti-VEGF kullanımı kliniklerde oldukça sık görülmektedir. Kim ve ark. epitelyal erozyon nedeniyle korneal vaskülarizasyonu olan 7 hastanın 10 gözüne 3 ay boyunca topikal bevacizumab uygulanmıştır. Bu çalışmanın

sonucunda 3 ay sonraki korneaların başlangıca göre daha az vaskülarizasyon içerdiği gözlemlenmiştir (106).

Korneal vaskülarizasyon tedavisinde ranibizumab ve bevacizumab etkinliğini araştıran bir çalışmada ikisinin de güvenli ve etkili ajanlar olduğu ancak ranibizumabın antianjiogenik etkisinin hafif üstün olduğu görülmüştür (107). Limbal kök hücre yetmezliği olan hastalarda bevacizumabın 6 aylık uzun dönem topikal kullanımında belirgin bir yan etki olmadan korneal vaskülarizasyon alanlarının azaldığı görülmüştür (108). Bahar ve ark. yaptığı çalışmada ise subkonjonktival 2.5 mg/0.1 ml bevacizumab uygulamasının kısa dönemde korneal vaskülarizasyonu regrese ettiğini görmüşlerdir. Bevacizumabın topikal ya da subkonjonktival yoldan uygulanması güvenli bulunmuştur (109). Erdurmuş ve ark. ise keratit ve korneal grefte sekonder oluşmuş vaskülarizasyonlarda subkonjonktival bevacizumab uygulamış ve hastaların 3 aylık takiplerinde relaps izlenmemiştir (110). 10 hastaya topikal %0,1 bevacizumab uygulanan başka bir çalışmada ise damar çaplarının ve vaskülarizasyon alanının başlangıca göre daraldığı ancak hastalarda görme keskinliğinde anlamlı artış olmadığı görülmüştür (111). Ranibizumab ile yapılan benzer bir çalışmada ise 9 hastaya topikal %1 ranibizumab uygulanmış ve vaskülarize alanların anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (112). Ancak ranibizumab ve bevacizumabın karşılaştırıldığı bir çalışmada ise subkonjonktival 2.5 mg bevacizumab ve 1 mg ranibizumab uygulanmıştır. Bu iki grup karşılaştırıldığında bevacizumab verilen gruptaki vasküler regresyonun ranibizumaba göre anlamlı oranda daha çok olduğu görülmüştür (113).

Bir diğer anti-VEGF ajan ise aflibersepttir. Aflibercept, korneal neovaskülarizasyona karşı terapötik bir ilaçtır. Bevacizumab ve ranibizumab gibi VEGF'ye karşı antagonistiktir, ancak ek avantajı da vardır; çünkü platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ile de etkileşime geçer. Aflibercept'in yapısı diğer ilaçlardan farklıdır ve daha önce ranibizumab veya bevacizumab ile tedavi edilmiş hastalarda korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılması önerilmiştir. Afliberceptin, VEGF'ye karşı bağlanma yeteneği açısından, enjeksiyondan sonra 10 ila 12 hafta arasında bevacizumab veya ranibizumaba kıyasla daha yüksek bir bağlanma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (114). Aflibersept ve bevacizumabın karşılaştırıldığı deneysel bir çalışmada aynı dozda verilmiş iki ilacın VEGF mRNA düzeylerini aynı oranda azalttığı ancak afliberseptin bevacizumaba göre plasental büyüme faktörünü (PIGF) daha çok azalttığı gösterilmiştir (115).

Pegaptanib ise VEGF-A izomerlerinden VEGF-165'in kompetitif inhibitörüdür. VEGF'i baskılamak için neovaskülarizasyon süreci içeren retinal hastalıklarda da

kullanılabilir. Bu nedenle korneal neovaskularizasyon tedavisinde kullanımı da aklı gelmektedir. 16 rat ile yapılan deneysel bir çalışmada subkonjonktival 1.25 mg bevacizumab, 0.5 mg ranibizumab ve 0.15 mg pegaptanib karşılaştırılmıştır. Her üç grupta da korneal vaskularizasyonda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiştir. Bevacizumab grubunun ranibizumab ve pegaptanib gruplarına göre daha fazla vasküler regresyon sağladığı görülmüştür. Ranibizumab ve pegaptanib grupları arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (116).

Tirozin kinaz inhibitörleri VEGF’i baskılayan ajanlar arasında sayılabilir. Bir tirozin kinaz inhibitörü olan regorafenib VEGF, anjiopoetin-1 ve 2 ‘yi baskılamaktadır. Ratlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada regorafenibin korneal vaskularizasyonu kısmen azalttığı görülmüş ancak bevacizumaba üstünlüğü gösterilememiştir (117). SU5416 ise düşük molekül ağırlıklı bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Bu molekül selektif olarak VEGF-2 reseptörüne bağlanmaktadır. Keskin ve ark. yaptıkları çalışmada SU5416 molekülünün damar uzunluğu ve damar sayısını kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Bu moleküllerin korneal neovaskularizasyon tedavisinde yeni bir alternatif olabileceği düşünülmüştür (118). Amparo ve ark. ise bir başka tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibi %0.5 dozunda topikal olarak 20 korneal vaskularizasyonlu hastaya uygulamışlardır. 12 haftanın sonunda damar uzunluğunun ve genişliğinin azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca bu süreçte belirgin bir yan etki olmadığı ve hastalarda görme keskinliği değişmediği için bu ajanın topikal kullanımının güvenli olduğu gözlemlenmiştir (119).

Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki VEGF molekülünün baskılanması korneal vaskularizasyon tedavisinde önemli bir basamaktır. Bu nedenle biz de çalışmamızda hem VEGF molekülünün ölçülmesine hem de damar yapılarının patolojik değerlendirilmesine yer verdik. Ayrıca IL-1 $\alpha$  antagonistinin VEGF molekülüne etkisinin değerlendirilmesi ve bu etkinin bevacizumab ile karşılaştırılması bu çalışmanın güvenilirliğini ve anlamını ortaya koymaktadır. VEGF molekülü en düşük düzeyde Grup IV, daha sonra Grup III’te tespit edilmiş olup bevacizumab grubuna göre IL-1 $\alpha$  antagonisti verilen gruplarda daha düşük düzeydedir. Bu durum IL-1 $\alpha$  antagonistinin inflamasyonu azaltarak buna sekonder VEGF oluşumunu azalttığını destekler niteliktedir.

Deksametazon grubu ilaçlar IL-1 beta, IL-6 ve VEGF’i bloke etmektedir. Ratlarda korneal suture sekonder anjiogenez modeli oluşturulup topikal deksametazon etkisine bakılmış ve korneal vaskularizasyonun azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca deksametazon

inflamasyonu inhibe ederek erken makrofaj göçünü ve limbal kapiller genişlemeyi azaltmıştır (120). Deksametazon IL-1 betayı inhibe ederek CD11 hücrelerin çoğalmasına engel olur. Ayrıca stromal fibroblast hücrelerinde Nükleer Faktör-kB'nin aktivasyonunu inhibe ederek inflamasyonu azaltır. Bu sayede inflamasyona sekonder anjiogenezi erken fazında azaltmaktadır (121). Huang ve ark. yaptıkları bir çalışmada inflamasyona sekonder korneal neovaskülarizasyonda VEGF düzeyleri karşılaştırılarak avastin ve deksametazonun beraber kullanımının tek başına avastin kullanımına göre daha üstün olduğunu göstermişlerdir (122). Korneal fibroblast hücre kültüründe yapılan bir çalışmada deksametazon ve TGF-B'nin, IL-1 üzerinde inhibitör etkisi olduğu görülmüştür (123). TGF-B da deksametazon gibi anti inflamatuvar bir maddedir. Çalışmamızda da bu anti inflamatuvar etkiyi gözlemek için TGF-B düzeyi ölçülmüştür. Ancak TGF-B düzeyi sırasıyla en yüksek Grup I ve Grup III'te olup en az Grup IV'te bulunmuştur. Bu durumun Grup IV'te zaten IL-1 $\alpha$  antagonisti ile inflamasyonun erken evrede yüksek oranda baskılanmasından kaynaklı olabileceği düşünüldü.

İnflamatuvar moleküller, kemokinler ve sitokinler hücrel inflamasyonu başlatıp anjiogenezin oluşmasına neden olurlar. Korneal yaralanmalardan sonra iki saat içinde, oldukça erken dönemde salınan IL-1 molekülü inflamatuvar hücre aktivasyonuna, adezyon moleküllerinin artmasına ve kemotaksise yol açar. IL-1 korneal stromal fibroblastlarda VEGF-A, prostaglandinler ve Nükleer Faktör-kB moleküllerini indükler. IL-1, inflamatuvar anjiogenezde önemli bir sitokindir. Genellikle yaralanmış korneal epitel hücrelerinden salınır ve endotel hücrelerinin çoğalmasını ve migrasyonunu doğrudan uyarmaktadır. IL-1 ayrıca güçlü pro-anjiyojenik moleküller olan VEGF ve FGF'in üretimini artırır, insan korneal epitel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ve inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu artırır ve kemokinlerin üretilmesiyle lökositleri çeker. Bunun sonucunda inflamasyona sekonder anjiogenez yolağı başlamış olur (27, 124).

Dana ve ark. yaptıkları çalışmada rat kornealarında stromal sutur ile korneal vaskülarizasyon oluşturmuşlardır. Bir gruba topikal 20 mg/ml IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti bir gruba ise %0.2 hyaluronik asit uygulamışlardır. Bir haftalık sonuçlarda IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen grupta korneal vaskülarizasyonun güçlü bir şekilde baskılandığını görmüşlerdir (34). Bir başka çalışmada ise rat kornealarında NaOH ile oluşturulan kimyasal yanık sonrası topikal IL-1 reseptör antagonisti verilmiş ve kornea saydamlığı değerlendirilmiştir. Günde 3 kez olmak üzere 14 gün boyunca topikal IL-1 reseptör antagonisti alan grupta IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 seviyeleri anlamlı oranda düşük

bulunmuştur. IL-1 reseptör antagonisti uygulanan grupta korneal saydamlığın daha iyi korunduğu gösterilmiştir (125). Bu çalışma ve bizim çalışmamız göz önüne alındığında IL-1 $\alpha$  antagonistinin her iki şekilde topikal ya da subkonjonktival yolla kullanımının korneal vaskülarizasyonu azaltıcı etkileri olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti düşük doz 0.25 mg/0.1 ml (Grup III) ve yüksek doz 2.5 mg/0.1 ml (Grup IV) olmak üzere 2 ayrı dozda uygulanmıştır. Bu dozların yüksek olanına eş değer olarak 2.5 mg/ml bevacizumab (Grup V) oluşturulmuştur. IL-1 $\alpha$  antagonistinin etkisi, vaskülarizasyonun temelinde yer alan VEGF'i baskılayan ve sıklıkla tedavide tercih edilen bevacizumab molekülü ile aynı dozda kıyaslanmıştır. Bu sayede IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisinin etkilerini daha net ortaya koymak ve çalışmanın güvenilirliği artırmak hedeflenmiştir.

Biyokimya laboratuvarında yapılan ELISA testleri sonucu VEGF düzeyi en düşük 2.5 mg/0.1 ml IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen Grup IV'te tespit edilmiştir. VEGF düzeyi incelendiğinde Grup IV'ü takiben Grup III ve Grup V gelmektedir. Bu sonuç IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen gruplarda bevacizumab verilen gruba göre daha düşük düzeyde VEGF oluştuğunu göstermektedir.

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan toksik bir moleküldür. Hasarlı kornea dokularında ya da keratokonusta korneal MDA düzeyi artmaktadır. Bu durum oksidatif stresin arttığını göstermektedir (126). Bizim çalışmamızda MDA düzeyi en düşük Grup IV'te izlenmiştir. Bu biyokimyasal ELISA sonuçlarına göre inflamasyonun, oksidatif stresin ve anjiogenez çağrısının yüksek doz IL-1 reseptör antagonisti verilen grupta daha az olduğu görülmüştür. Bu durumun sonucu olarak korneal vaskülarizasyon gelişiminin IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisinin subkonjonktival uygulaması ile azaldığı görülmüştür. Bu tez çalışması MDA molekülünün toksik etkisinin korneal vaskülarizasyon üzerine olası etkilerini ortaya koyarak önceki çalışmalardan farklılık içermektedir.

Çalışmamızda yapılan korneal patolojik incelemelerde kornea ile descemet tabakaları arasında inflamatuvar bir membran ve en az 7 adet fibroblasttan oluşan demetleşmeler görülmüştür. Bu membran varlığı ve demetleşme yapısı en az Grup IV'te izlenmiştir. Bu da inflamasyonun ve fibroblast baskılanmasının en iyi yüksek doz IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen grupta olduğunu göstermektedir. Preparatlarda fibroblast proliferasyonu ve CD34 ile boyanan damarlar incelenmiştir. Bu iki parametrede de en az

fibroblast proliferasyonu ve damarsal yapılaşma sırasıyla IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen Grup IV, Grup III ve sonrasında bevacizumab verilen Grup V'te yer almaktadır. Bu durum önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere kimyasal yanıkta inflamasyonun, vaskülarizasyon gelişimi için bir ön basamak olduğunu doğrulamaktadır.

Epitel hücrelerinde IL-1 $\alpha$  sitoplazmik boyanması en düşük Grup IV'te tespit edilmiş olup inflamasyonun en iyi kontrol altına alındığı grup olarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında incelenen parametreler temelde inflamatuvar ve vasküler olmak üzere 2 grup olarak sınıflandırılabilir. Yüksek doz 2.5 mg/0.1 ml IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen Grup IV'te korneal vaskülarizasyon oluşumunun azalmış olduğu izlenmiştir. Bu sonuç üzerine yapılmış ELISA testlerinde düşük VEGF düzeyine ve inflamatuvar parametrelere ulaşılmış olup bu kanı desteklenmiştir. Patolojik boyanmalarda ise belirgin bir şekilde Grup IV'te fibroblast yapıların azalmış olduğu görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ( $p=0,001$ ). Damar yapıları belirgin bir şekilde en az Grup IV'te izlenmiş olup diğer gruplara oranla istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır ( $p<0,001$ ). Bu verilere dayanarak alkali yanık modeli sonrası subkonjonktival IL-1 $\alpha$  reseptör antagonistinin inflamasyonu ve buna sekonder olarak gelişen korneal vaskülarizasyonu azalttığı söylenebilir.

Bu deneysel tez çalışması rat kornealarında gümüş nitrat ile oluşturulan kimyasal yanık modellemesinde IL-1 $\alpha$  reseptör antagonistinin subkonjonktival uygulanması ile bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

## 6. SONUÇ

Korneal hasarlanma sonucu korneal epitel hücrelerinden salınan kimyasal moleküller ile başlayan inflamasyon süreci korneanın saydamlığını yitirmesine neden olan neovaskülarizasyonların oluşumu ile sonlanabilmektedir. Çalışmamızda 40 adet ratın her iki gözünde toplamda 80 göz olmak üzere gümüş nitrat uygulaması ile deneysel korneal alkali yanık modellenmesi oluşturulmuştur. Bu yanık modellenmesine sekonder olarak korneal neovaskülarizasyonlar geliştirilmiştir.

ELISA sonuçlarına göre korneal inflamasyon parametrelerinden IL-1 $\alpha$  düzeyi ve MDA düzeyi IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen gruplarda anlamlı olarak düşük izlenmiştir. Vaskülarizasyonu gösteren en önemli parametre olan VEGF düzeyi sırasıyla yüksek doz ve düşük doz IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen gruplarda en düşük düzeyde tespit edilmiştir. IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen gruplardaki VEGF düzeyi bevacizumab verilen gruba kıyasla daha düşük tespit edilmiştir. Ayrıca patolojik incelemelerdeki fibroblast yoğunluğu, inflamatuvar membran varlığı inflamasyonu göstermektedir. Bu inflamasyon parametreleri ve damarsal yapılaşma düzeyi 2.5 mg/ 0.1 ml IL-1 $\alpha$  reseptör antagonisti verilen grupta (Grup IV) en düşük seviyede izlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında savunulan IL-1 $\alpha$  reseptör antagonistinin korneal yaralanmalarda erken dönemde gelişen inflamasyonu baskılayarak korneal neovaskülarizasyon oluşumunu azalttığını ortaya koymuştur. Bu çalışma korneal neovaskülarizasyon tedavisinde subkonjonktival IL-1 $\alpha$  reseptör antagonistinin inhibitör etkisini göstermek ve ileriki çalışmalara ışık tutmak niteliğindedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Almubrad, Turki, and Saeed Akhtar. "Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea." *Molecular vision* 17 (2011): 2283.
2. Dilly, P. N. "Structure and function of the tear film." *Lacrimal gland, tear film, and dry eye syndromes: basic science and clinical relevance* (1994): 239-247
3. Espana, Edgar M., and David E. Birk. "Composition, structure and function of the corneal stroma." *Experimental eye research* 198 (2020): 108137.
4. Pfister, Rosweel R. "Chemical corneal burns." *International ophthalmology clinics* 24.2 (1984): 157-168.
5. Eslani, Medi, et al. "The ocular surface chemical burns." *Journal of ophthalmology* 2014 (2014).
6. Yoeruek, Efdal, et al. "Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn." *Acta Ophthalmologica* 86.3 (2008): 322-328.
7. Bakunowicz-Łazarczyk, Alina, and Beata Urban. "Assessment of therapeutic options for reducing alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation." *Advances in Medical Sciences* 61.1 (2016): 101-112.
8. Pflugfelder, Stephen C., and Michael E. Stern. "Biological functions of tear film." *Experimental eye research* 197 (2020): 108115.
9. Hui-Kang, David, et al. "Matrix revolution: molecular mechanism for inflammatory corneal neovascularization and restoration of corneal avascularity by epithelial stem cell transplantation." *The ocular surface* 7.3 (2009): 128-144.
10. DelMonte, Derek W., and Terry Kim. "Anatomy and physiology of the cornea." *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 37.3 (2011): 588-598.
11. Sridhar, Mittanamalli S. "Anatomy of cornea and ocular surface." *Indian journal of ophthalmology* 66.2 (2018): 190.
12. Hoar, Richard M. "Embryology of the eye." *Environmental Health Perspectives* 44 (1982): 31-34.
13. Sevel, David, and Rob Isaacs. "A re-evaluation of corneal development." *Transactions of the American Ophthalmological Society* 86 (1988): 178.
14. Pradeep, Tejus, Divy Mehra, and Patrick H. Le. "Histology, eye." (2019).

15. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res.* 2015;49:1–6.
16. Chen SY, Terry MA. Step-by-step Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery. *Taiwan J Ophthalmol.* 2019 Jan-Mar;9(1):18-26.
17. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:779–82.
18. Rio-Cristobal A, Martin R. Corneal assessment technologies: Current status. *Surv Ophthalmol.* 2014;59:599–614.
19. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea.* 2001;20:374–84.
20. Gipson IK. The ocular surface: The challenge to enable and protect vision: The Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4390.
21. Solomon, Abraham, et al. "Pro-and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease." *Investigative ophthalmology & visual science* 42.10 (2001): 2283-2292.
22. Beebe DC. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(2):125–133.
23. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001;12(4):242–249.
24. Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA, Salem H, Elkhanany AE, Hussein H, Abd El-Baky N. Clinical correlates of common corneal neovascular diseases: A literature review. *Int J Ophthalmol.* 2015;8:182–193.
25. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol.* 1998;43(3):245–269.
26. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology.* 2000;44:415–425.
27. Clements JL, Dana R. Inflammatory corneal neovascularization: Etiopathogenesis. *Semin Ophthalmol.* 2011;26:235–245.
28. Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Faghihzadeh S, Hassan ZM. Roles of IL-8 in ocular inflammations: A review. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011;19:401–412.
29. Suryawanshi A, Mulik S, Sharma S, Reddy PB, Sehrawat S, Rouse BT. Ocular neovascularization caused by herpes simplex virus type 1 infection results from breakdown of binding between vascular endothelial growth factor a and its soluble receptor. *J Immunol.* 2011;186:3653–3665.

30. Zahir-Jouzdani F, Atyabi F, Mojtabavi N. Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology*. 2017;24(3):123–131.
31. Kim SY, Yeo A, No H. Downregulation of IL-7 and IL-7R Reduces Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 14 in Granular Corneal Dystrophy Type 2 Keratocyte. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(13):5693–5703.
32. Shakiba, Yadollah, et al. "Corneal neovascularization: molecular events and therapeutic options." *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery* 3.3 (2009): 221-231.
33. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. Mar 15 1996;87(6):2095–2147.
34. Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea*. Jul 1998;17(4):403–409
35. Nakao S, Hata Y, Miura M, et al. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced corneal neovascularization: Role of nuclear factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol*. Sep 2007;171(3):1058–1065.
36. Banerjee K, Biswas PS, Kim B, Lee S, Rouse BT. CXCR2<sup>-/-</sup> mice show enhanced susceptibility to herpetic stromal keratitis: A role for IL-6-induced neovascularization. *J Immunol*. Jan 15 2004;172(2):1237–1245
37. Ebrahim Q, Minamoto A, Hoppe G, Anand-Apte B, Sears JE. Triamcinolone acetonide inhibits IL-6- and VEGF-induced angiogenesis downstream of the IL-6 and VEGF receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov 2006;47(11):4935–4941.
38. Lim P, Fuchsluger TA, Jurkunas UV. Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin Ophthalmol*. May-Jun 2009;24(3):139–148.
39. Dinarello, Charles A. "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." *International reviews of immunology* 16.5-6 (1998): 457-499.
40. Wilson, Steven E., et al. "The corneal wound healing response:: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells." *Progress in retinal and eye research* 20.5 (2001): 625-637.
41. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4–10.
42. Mastuyugin V, Mosaed S, Bonazzi A, Dunn MW, Schwartzman ML. Corneal epithelial VEGF and cytochrome P450 4B1 expression in a rabbit model of closed eye contact lens wear. *Curr Eye Res*. Jul 2001;23(1):1–10.

43. Cao Y, Linden P, Farnebo J, et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 24 1998;95(24):14389–14394.
44. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. Jul 31 2008;454(7204):656–660.
45. Chung ES, Chauhan SK, Jin Y, et al. Contribution of macrophages to angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor-3-specific ligands. *Am J Pathol*. Nov 2009;175(5):1984–1992.
46. Chen L, Hamrah P, Cursiefen C, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Nat Med*. Aug 2004;10(8):813–815.
47. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest*. Apr 2004;113(7):1040–1050.
48. Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. Integrin alpha9- beta1 directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. *J Biol Chem*. May 18 2007;282(20):15187–15196.
49. Chen L, Huq S, Gardner H, de Fougères AR, Barabino S, Dana MR. Very late antigen 1 blockade markedly promotes survival of corneal allografts. *Arch Ophthalmol*. Jun 2007;125(6):783–788.
50. Sotozono C, He J, Matsumoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S. Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res*. Jul 1997;16(7):670–676
51. Wilson SE, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res*. Sep 2001;20(5):625–637.
52. Garcia DD, Shtein RM, Musch DC, Elner VM. Herpes simplex virus keratitis: histopathologic neovascularization and corneal allograft failure. *Cornea*. Oct 2009;28(9):963–965
53. Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta*. Mar 4 2004;1654(1):13–22.
54. Biswas PS, Banerjee K, Zheng M, Rouse BT. Counteracting corneal immunoinflammatory lesion with interleukin-1 receptor antagonist protein. *J Leukoc Biol*. Oct 2004;76(4):868–875.
55. Zhang J, Wu XY, Yu FS. Inflammatory responses of corneal epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Curr Eye Res*. Jul 2005;30(7):527–534.

56. Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov 1996;37(12):2485–2494.
57. The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in highrisk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol*. Oct 1992;110(10):1392–1403.
58. Paque J, Poirier RH. Corneal allograft reaction and its relationship to suture site neovascularization. *Ophthalmic Surg*. Aug 1977;8(4):71–74.
59. Salthouse TN, Matlaga BF, Wykoff MH. Comparative tissue response to six suture materials in rabbit cornea, sclera, and ocular muscle. *Am J Ophthalmol*. Aug 1977;84(2):224–233.
60. Shi W, Liu J, Li M, Gao H, Wang T. Expression of MMP, HPSE, and FAP in stroma promoted corneal neovascularization induced by different etiological factors. *Curr Eye Res*. Nov 2010;35(11):967–977
61. Wong AL, Weissman BA, Mondino BJ. Bilateral corneal neovascularization and opacification associated with unmonitored contact lens wear. *Am J Ophthalmol*. Nov 2003;136(5):957–958.
62. Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1990;31(8):1542–1554.
63. Lin MC, Polse KA. Hypoxia, overnight wear, and tear stagnation effects on the corneal epithelium: Data and proposed model. *Eye Contact Lens*. Nov 2007;33(6 Pt 2):378–381; discussion 382.
64. Liesegang TJ. Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J*. Jan 2002;28(1):12–27
65. Sasaki H, Ray PS, Zhu L, Galang N, Maulik N. Oxidative stress due to hypoxia/reoxygenation induces angiogenic factor VEGF in adult rat myocardium: possible role of NFkappaB. *Toxicology*. Nov 30 2000;155(1-3):27–35.
66. Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H, Sueishi K. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes in vitro angiogenesis. *Virchows Arch*. 1995;426(5):479–486
67. Conners MS, Stoltz RA, Davis KL, et al. A closed eye contact lens model of corneal inflammation. Part 2: Inhibition of cytochrome P450 arachidonic acid metabolism alleviates inflammatory sequelae. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Apr 1995;36(5):841–850

68. Maddula S, Davis DK, Burrow MK, Ambati BK. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology*. 2011;118:591–599.
69. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol*. 1983;101:640–643.
70. Klintworth GK. *Corneal angiogenesis a comprehensive critical review*. New York: Springer; 1991.
71. Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene b<sub>4</sub> by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;250:598–605.
72. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (avastin), a humanized anti-vegf monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:328–335.
73. Awadein A. Subconjunctival bevacizumab for vascularized rejected corneal grafts. *J Cataract Refract Surg*. 2007;33:1991–1993.
74. Lin CT, Hu FR, Kuo KT, Chen YM, Chu HS, Lin YH, Chen WL. The different effects of early and late bevacizumab (avastin) injection on inhibiting corneal neovascularization and conjunctivalization in rabbit limbal insufficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:6277–6285.
75. Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT. Inhibition of platelet-derived growth factor b signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol*. 2006;168:2036–2053.
76. Al-Mahmood S, Colin S, Farhat N, Thorin E, Steverlynck C, Chemtob S. Potent in vivo antiangiogenic effects of gs-101 (5'-tatccggagggctcgccatgctgct-3'), an antisense oligonucleotide preventing the expression of insulin receptor substrate-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329:496–504.
77. Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Stamp-Cole M, Scott PS, Wallace TL, Copeland J, Petzold G, Mitchell M, Ledbetter S, Poorman R. The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;36:418–424.

78. Petsoglou C, Balaggan K, Dart JK, Bunce C, Xing W, Ali RR, Tuft SJ. Subconjunctival bevacizumab induces regression of corneal neovascularisation: a pilot randomised placebo-controlled, double-masked trial. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(1):28–32.
79. Williams KA, Jessup CF, Coster DJ. Gene therapy approaches to prolonging corneal allograft survival. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4:1059–1071.
80. Reed JW, Fromer C, Klintworth GK. Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. *Arch Ophthalmol.* 1975;93:1017–1019.
81. Gomer CJ, Ferrario A, Hayashi N, Rucker N, Szirth BC, Murphree AL. Molecular, cellular, and tissue responses following photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 1988;8:450–463.
82. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: An evidence-based meta-analysis. *Ophthalmology.* 2010;117:1300–1305.
83. Mahoney, Janette M., and L. David Waterbury. "Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea." *Current Eye Research* 4.5 (1985): 531-535.
84. BenEzra, David, et al. "Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization." *Investigative ophthalmology & visual science* 38.10 (1997): 1954-1962.
85. Cursiefen, Claus, et al. "Impact of short-term versus long-term topical steroids on corneal neovascularization after non-high-risk keratoplasty." *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 239 (2001): 514-521.
86. Cooper, Charles A., Michael VW Bergamini, and Irving H. Leopold. "Use of flurbiprofen to inhibit corneal neovascularization." *Archives of Ophthalmology* 98.6 (1980): 1102-1105.
87. Duffin, R. Michael, et al. "Flurbiprofen in the treatment of corneal neovascularization induced by contact lenses." *American journal of ophthalmology* 93.5 (1982): 607-614.
88. Peyman, Gholam A., et al. "The effect of combinations of flurbiprofen, low molecular weight heparin, and doxycycline on the inhibition of corneal neovascularization." *Cornea* 25.5 (2006): 582-585.
89. Jovanovic, Vesna, and Ljubisa Nikolic. "The effect of topical doxycycline on corneal neovascularization." *Current eye research* 39.2 (2014): 142-148.

90. Cakmak, Harun, et al. "The effects of topical everolimus and sunitinib on corneal neovascularization." *Cutaneous and Ocular Toxicology* 35.2 (2016): 97-103.
91. Yoo, Ae Ri, and Sung Kun Chung. "Effects of subconjunctival tocilizumab versus bevacizumab in treatment of corneal neovascularization in rabbits." *Cornea* 33.10 (2014): 1088-1094.
92. Sari, Esin Sogutlu, et al. "Inhibitory effect of sub-conjunctival tocilizumab on alkali burn induced corneal neovascularization in rats." *Current eye research* 40.1 (2015): 48-55.
93. Wu, Xiao-Song, et al. "Tocilizumab promotes corneal allograft survival in rats by modulating Treg-Th17 balance." *International Journal of Ophthalmology* 12.12 (2019): 1823.
94. Kim, Jae Woo, and Sung Kun Chung. "The effect of topical infliximab on corneal neovascularization in rabbits." *Cornea* 32.2 (2013): 185-190.
95. Voiculescu, O. B., and L. M. Voinea. "Infliximab eye drops treatment in corneal neovascularization." *Journal of Medicine and Life* 8.4 (2015): 566.
96. Ferrari, Giulio, Fabio Bignami, and Paolo Rama. "Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors as a treatment of corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis." *Eye & contact lens* 41.2 (2015): 72-76.
97. Ozdemir, Ozdemir, et al. "Effects of subconjunctivally injected bevacizumab, etanercept, and the combination of both drugs on experimental corneal neovascularization." *Canadian Journal of Ophthalmology* 48.2 (2013): 115-120.
98. Campbell, F. W., and I. D. Ferguson. "The role of ascorbic acid in corneal vascularization." *The British Journal of Ophthalmology* 34.6 (1950): 329.
99. Lee, Mee Yon, and Sung Kun Chung. "Treatment of corneal neovascularization by topical application of ascorbic acid in the rabbit model." *Cornea* 31.10 (2012): 1165-1169.
100. Shakiba, Yadollah, and Ali Mostafaie. "Inhibition of corneal neovascularization with a nutrient mixture containing lysine, proline, ascorbic acid, and green tea extract." *Archives of medical research* 38.7 (2007): 789-791.
101. Turgut, Burak, et al. "The impact of tacrolimus on vascular endothelial growth factor in experimental corneal neovascularization." *Current eye research* 36.1 (2011): 34-40.
102. Park, Jin-Heung, Choun-Ki Joo, and Sung Kun Chung. "Comparative study of tacrolimus and bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits." *Cornea* 34.4 (2015): 449-455.

103. Chen, Ling, et al. "The long-term effect of tacrolimus on alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation surpasses that of anti-vascular endothelial growth factor." *Drug Design, Development and Therapy* (2018): 2959-2969.
104. Sloper, C. Myra L., Richard J. Powell, and Harminder S. Dua. "Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts." *Ophthalmology* 108.10 (2001): 1838-1844.
105. Lee, Young Ji, Sun Woong Kim, and Kyoung Yul Seo. "Application for tacrolimus ointment in treating refractory inflammatory ocular surface diseases." *American journal of ophthalmology* 155.5 (2013): 804-813.
106. Kim, Sang Woo, et al. "The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization." *Ophthalmology* 115.6 (2008): e33-e38.
107. Stevenson, William, et al. "Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin)." *The ocular surface* 10.2 (2012): 67-83.
108. Bock, Felix, et al. "Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization." *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 246 (2008): 281-284.
109. Bahar, Irit, et al. "Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization." *Cornea* 27.2 (2008): 142-147.
110. Erdurmus, Mesut, and Yuksel Totan. "Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization." *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 245 (2007): 1577-1579.
111. Dastjerdi, Mohammad H., et al. "Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study." *Archives of ophthalmology* 127.4 (2009): 381-389.
112. Ferrari, Giulio, et al. "Topical ranibizumab as a treatment of corneal neovascularization." *Cornea* 32.7 (2013): 992.
113. Kim, Jin-Hyoung, et al. "The effect of bevacizumab versus ranibizumab in the treatment of corneal neovascularization: a preliminary study." *Korean Journal of Ophthalmology* 27.4 (2013): 235-242.
114. Al-Debasi, Tariq, et al. "Topical versus subconjunctival anti-vascular endothelial growth factor therapy (Bevacizumab, Ranibizumab and Aflibercept) for treatment of corneal neovascularization." *Saudi Journal of Ophthalmology* 31.2 (2017): 99-105.

115. Park, Yi-Ryeong, and Sung Kun Chung. "Inhibitory effect of topical aflibercept on corneal neovascularization in rabbits." *Cornea* 34.10 (2015): 1303-1307.
116. Akar, Ebru Eren, et al. "Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model." *International journal of ophthalmology* 6.2 (2013): 136.
117. Onder, Halil Ibrahim, et al. "Inhibitory effects of regorafenib, a multiple tyrosine kinase inhibitor, on corneal neovascularization." *International journal of ophthalmology* 7.2 (2014): 220.
118. Keskin, Uğurcan, et al. "Inhibitory effects of SU5416, a selective vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, on experimental corneal neovascularization." *Ophthalmic research* 47.1 (2011): 13-18.
119. Amparo, Francisco, et al. "Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization." *Investigative ophthalmology & visual science* 54.1 (2013): 537-544.
120. Mirabelli, Pierfrancesco, et al. "Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model." *Experimental eye research* 125 (2014): 118-127.
121. Nakao, Shintaro, et al. "Dexamethasone inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced corneal neovascularization: role of nuclear factor- $\kappa$ B-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis." *The American journal of pathology* 171.3 (2007): 1058-1065.
122. Huang, Jinhai, et al. "Combination of dexamethasone and Avastin® by supramolecular hydrogel attenuates the inflammatory corneal neovascularization in rat alkali burn model." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 159 (2017): 241-250.
123. West-Mays, Judith A., et al. "Differential inhibition of collagenase and interleukin-1 $\alpha$  gene expression in cultured corneal fibroblasts by TGF- $\beta$ , dexamethasone, and retinoic acid." *Investigative ophthalmology & visual science* 40.5 (1999): 887-896.
124. Roshandel, Danial, et al. "Current and emerging therapies for corneal neovascularization." *The ocular surface* 16.4 (2018): 398-414.
125. Yamada, Jun, et al. "Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury." *Experimental eye research* 76.2 (2003): 161-167.
126. Buddi, Rajeev, et al. "Evidence of oxidative stress in human corneal diseases." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50.3 (2002): 341-351.