



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

**KORNEA EPİTEL İYİLEŞMESİNDE TOPİKAL İNSAN SERUMU,
AMNİON SIVISI, UMBLİKAL KORD SERUMU ve ANNE SÜTÜ
ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. ASLIHAN YÜCE SEZEN

ANKARA – 2017



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

**KORNEA EPİTEL İYİLEŞMESİNDE TOPİKAL İNSAN SERUMU,
AMNİON SIVISI, UMBLİKAL KORD SERUMU ve ANNE SÜTÜ
ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. ASLIHAN YÜCE SEZEN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. DİLEK DURSUN ALTINÖRS

ANKARA – 2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Dilek Dursun Altınörs'e, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak emeklerini harcayan sayın hocalarım; anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Sibel Oto'ya, Prof. Dr. Gürsel Yılmaz'a, Prof. Dr. Ahmet Akman'a, Prof. Dr. İmren Akkoyun'a, Yrd. Doç. Dr. Sirel Gür Güngör'e ve Doç. Dr. Sezin Akça Bayar'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Tez hazırlık sürecinde desteğini eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr. Leyla Asena'ya teşekkür ederim. Konya Başkent Hastanesi'nde eğitimimize destek veren hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi hazırlamamdaki yardımları için Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Attila Dağdeviren ve Öğr. Gör. Dr. Fatma Helvacıoğlu'na, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Hüseyin Akıllı'ya, Patoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Çiğdem Sercan'a, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden Vetr. Dr. Didem Bacanlı'ya teşekkürlerimi sunarım. Araştırma Laboratuvarı Teknisyenleri sayın Adem Kurtcuoğlu ve Sezai Kölcük'e deneyler sürecindeki sabırlı desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin tüm hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olup sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşime ve değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Aslıhan Yüce Sezen

ÖZET

Kornea Epitel İyileşmesinde Topikal İnsan Serumu, Amnion Sıvısı, Umbilikal Kord Serumu ve Anne Sütü Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Bu çalışma; antimikrobiyal özellikleri, içerdikleri pek çok büyüme faktörü ve sitokin komponentleri ile doğal gözyaşına benzer özellikteki biyolojik sıvılar olan insan periferik kan serumu, umbilikal kord serumu, amnion sıvısı ve anne sütünün kornea re-epitelizasyonu üzerine etkilerini karşılaştırmak amacıyla yapıldı.

Çalışmada Bal-b/C türü 36 adet dişi fare kullanıldı. Sedasyon altında topikal anestezi sağlandıktan sonra 2 mm çapında, kornea santralinde epitel defekti oluşturulan fareler rastgele seçilen 6 gruba ayrıldı. Grup A'ya insan serumu, grup B'ye umbilikal kord serumu, grup C'ye amnion sıvısı, grup D'ye anne sütü, grup E'ye prezervansız suni gözyaşı uygulandı. Tüm topikal damlalar 3 gün boyunca eş zamanlı olarak günde 4 kere damlatıldı. Grup F'ye damla damlatılmayarak kontrol grubu olarak ayrıldı. On ikinci saat, 1.gün, 2. gün ve 3. gün biyomikroskopik muayeneleri yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Üçüncü gün fareler sakrifiye edildi, histopatolojik inceleme yapıldı.

Epitel defekti kapanma oranları karşılaştırıldığında sadece anne sütü damlatılan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha hızlı bir kapanma görüldü ($p \leq 0,050$). Amnion sıvısı kullanılan grupta 12. saatte defekt kapanma oranları kıyaslandığında kan ürünlerine göre klinik uygulamada farklılık yaratabilecek daha hızlı bir re-epitelizasyon mevcuttu. Histopatolojik değerlendirmelere göre normal kornea yapısına en yakın olan ve en iyi epitelize olan anne sütü damlatılan gruptu.

Oküler yüzey hastalıklarında doğal gözyaşı içeriğine benzer ideal bir epitelizan veya suni gözyaşı bugün için mevcut olmamakla beraber, konvansiyonel tedavilere alternatif biyolojik sıvılar içerisinde anne sütü iyi bir seçenek olarak görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kornea epitel iyileşmesi, İnsan serumu, Amnion sıvısı, Umbilikal kord serumu, Anne sütü

ABSTRACT

Comparison of Topical Human Peripheral Blood Serum, Amniotic Fluid, Umbilical Cord Serum and Human Breast Milk Therapy for Corneal Epithelial Wound Healing

This study aims to compare the effects of human blood serum, umbilical cord serum, amniotic fluid and human breast milk on corneal epithelial wound healing. These are all biological agents similar to natural tears that have antimicrobial properties, include numerous growth factors and cytokines.

Thirty-six female Bal-b/C mice were included in our study. After topical anesthesia was provided under sedation, a central corneal epithelial defect was created using a 2 mm trephine. Six groups were formed by a random pick-up. Topical human peripheral blood serum 4 × 1 was applied to Group A, topical umbilical cord serum 4 × 1 to Group B, topical amniotic fluid 4 × 1 to Group C, topical human breast milk 4 × 1 to Group D and preservative-free artificial tears 4 × 1 to Group E. Group F was evaluated as control. Mice corneas were evaluated by slit-lamp biomicroscopy and corneal photographs were taken with a digital camera on the twelfth hour and on days 1, 2, and 3. Mice were sacrificed on the third day. Histopathological examinations were performed as well.

Re-epithelization of Group D was significantly faster than control ($p \leq 0,050$). Comparison of re-epithelization rate on the twelfth hour showed that, amniotic fluid provided faster healing than blood-derived topical therapy. However, no statistically significant differences in healing rates were observed between groups. Histopathological examination revealed that Group D corneas were significantly similar to healthy, intact cornea.

There is no ideal therapeutic agent for ocular surface diseases that can act like natural tears. The rich content of human breast milk makes it a good alternative to epithelial healers among other biological agents.

Key Words: Epithelial wound healing, Human serum, Amniotic fluid, Umbilical cord serum, Human breast milk

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| TEŞEKKÜR | ii |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| KISALTMALAR | vii |
| ŞEKİL LİSTESİ | ix |
| TABLO LİSTESİ | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Kornea..... | 3 |
| 2.1.1. Gözyaşı Film Tabakası | 3 |
| 2.1.2. Epitel Tabaka | 5 |
| 2.1.3. Bowman Tabakası | 6 |
| 2.1.4. Stroma..... | 6 |
| 2.1.5. Dua Tabakası | 7 |
| 2.1.6. Desme Membranı..... | 7 |
| 2.1.7. Endotel..... | 7 |
| 2.2. Kornea İnnervasyonu | 8 |
| 2.3. Kornea Vaskülarizasyonu | 8 |
| 2.4. Kornea Metabolizması..... | 9 |
| 2.5. Korneal Epitel Yara İyileşmesi..... | 9 |
| 2.6. Kornea Fonksiyonları Üzerine Etkili Büyüme ve İyileştirme Faktörleri | 11 |
| 2.6.1. Epidermal Büyüme Faktörü..... | 11 |
| 2.6.2. Hepatosit Büyüme Faktörü | 12 |
| 2.6.3. Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF)..... | 12 |
| 2.6.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü- β | 13 |
| 2.6.5. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü..... | 13 |
| 2.6.6. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) | 14 |
| 2.6.7. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)..... | 14 |
| 2.6.8. Fibronektin..... | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.6.9. İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), Kemik Morfogenik Proteini, Opioid Büyüme Faktörü (OGF), P Maddesi (SP), Jelatinaz B, A Vitamini, E Vitamini | 15 |
| 2.6.10. Sitokinler..... | 16 |
| 2.7. Kan Ürünü Gözyaşı Takviyeleri | 16 |
| 2.7.1. Serum..... | 16 |
| 2.7.2. Kord Kanı Serumu | 19 |
| 2.7.3. Trombosit Bağımlı Plazma Ürünleri | 19 |
| 2.8. İnsan Amnion Sıvısı..... | 20 |
| 2.9. Anne Sütü | 21 |
| 2.10. Suni Gözyaşı | 22 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 24 |
| 3.1. Topikal Damla Hazırlanışı..... | 24 |
| 3.2. Hayvan Modeli | 24 |
| 3.3. Biyomikroskopik Değerlendirme | 28 |
| 3.4. Histopatolojik Değerlendirme..... | 28 |
| 3.5. İstatistiksel Analiz..... | 29 |
| 4. BULGULAR | 30 |
| 4.1. Biyomikroskopik Bulgular | 30 |
| 4.2. Patolojik Bulgular | 41 |
| 4.3. Histolojik Bulgular | 47 |
| 5. TARTIŞMA..... | 54 |
| 6. SONUÇ..... | 64 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 65 |

KISALTMALAR

| | |
|--------------|---|
| Ab | : Antikor |
| Ag | : Antijen |
| BSS | : Dengeli tuz solüsyonu |
| FGF | : Fibroblast büyüme faktörü |
| D | : Dioptri |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| ELISA | : Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EGF | : Epidermal büyüme faktörü |
| EGFR | : Epidermal büyüme faktörü reseptörü |
| ESM | : Ekstraselüler matriks |
| FGF | : Fibroblast büyüme faktörü |
| GVHD | : Graft-Versus-Host Hastalığı |
| HGF | : Hepatosit büyüme faktörü |
| HGFR | : Hepatosit büyüme faktörü reseptörü |
| HMF | : Heksozmonofosfat |
| Ig A | : İmmünglobulin A |
| Ig G | : İmmünglobulin G |
| Ig M | : İmmünglobulin M |
| IGF | : İnsülin-benzeri büyüme faktörü |
| IL | : İnterlökin |
| KGf | : Keratinosit büyüme faktörü |
| MMPs | : Matriks metalloproteinazlar |
| MMP-9 | : Matriks metalloproteinaz 9 |
| NF-κB | : Nükleer faktör kappa B |
| NGF | : Sinir büyüme faktörü |
| OGF | : Opioid büyüme faktörü |
| OSDI | : Okuler yüzey hastalık indeksi |
| PDGF | : Platelet kaynaklı büyüme faktörü |
| PRK | : Fotorefraktif keratektomi |
| SP | : P maddesi |
| TDP | : Taze donmuş plazma |
| TGF-β | : Transformasyon edici büyüme faktörü-β |

TKA : Trikarboksilik asit

UV-B : Ultraviyole B

ŞEKİL LİSTESİ

| | | |
|-------------|--|----|
| Şekil 2.1. | Kornea tabakaları | 4 |
| Şekil 2.2. | Epitel hücre dizilimi | 6 |
| Şekil 3.1. | İşlem öncesi normal fare gözünün görünümü | 25 |
| Şekil 3.2. | Korneada 2 mm işaretleme için kullanılan punch | 25 |
| Şekil 3.3. | 2mm'lik santral kornea kazıma alanının işaretlenme işlemi | 26 |
| Şekil 3.4 | Korneal işaretleme sonrası görünüm | 26 |
| Şekil 3.5. | İşaretlenen santral kornea alanın 11 numara bistüri ile kazıma işlemi | 27 |
| Şekil 3.6. | 2 mm çapında santral kornea epitel defekti alanı | 27 |
| Şekil 3.7. | 2mm santral kornea epitel defektinin floresein boyama sonrası görünümü... .. | 28 |
| Şekil 4.1. | İnsan serumu damlatılan (Grup A) biyomikroskopik muayene fotoğrafları.. | 30 |
| Şekil 4.2. | Umblikal kord serumu damlatılan (Grup B) biyomikroskopik muayene fotoğrafları..... | 31 |
| Şekil 4.3. | Amnion sıvısı damlatılan (Grup C) biyomikroskopik muayene fotoğrafları . | 32 |
| Şekil 4.4. | Anne sütü damlatılan (Grup D) biyomikroskopik muayene fotoğrafları | 33 |
| Şekil 4.5. | Suni gözyaşı damlatılan (Grup E) biyomikroskopik muayene fotoğrafları ... | 34 |
| Şekil 4.6. | Kontrol grubunun (Grup F), biyomikroskopik muayene fotoğrafları | 35 |
| Şekil 4.7. | İnsan serumu damlatılan grup patolojik kesitler | 42 |
| Şekil 4.8. | Umblikal kord serumu damlatılan grup patolojik kesitler | 42 |
| Şekil 4.9. | Amnion sıvısı damlatılan grup patolojik kesitler | 42 |
| Şekil 4.10. | Anne sütü damlatılan grup patolojik kesitler | 43 |
| Şekil 4.11. | Suni gözyaşı damlatılan grup patolojik kesitler | 43 |
| Şekil 4.12. | Kontrol grubu patolojik kesitler | 43 |
| Şekil 4.13. | Limbal inflamasyon skorlarına göre grupların karşılaştırılması | 44 |
| Şekil 4.14. | Stromal lökosit infiltrasyonu skorlarına göre grupların karşılaştırılması..... | 45 |
| Şekil 4.15. | Bazal hücre dizilimine göre grupların karşılaştırılması | 46 |
| Şekil 4.16. | Yüzeysel hücre dizilimine göre grupların karşılaştırılması | 47 |
| Şekil 4.17. | Kontrol grubu ışık mikroskopi kesitleri | 48 |
| Şekil 4.18. | Suni gözyaşı damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri | 49 |
| Şekil 4.19. | İnsan serumu damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri | 50 |
| Şekil 4.20. | Umblikal kord serumu damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri..... | 51 |
| Şekil 4.21. | Amnion sıvısı damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri | 52 |
| Şekil 4.22. | Anne sütü damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri | 53 |

TABLO LİSTESİ

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tablo 4.1. | Gruplar arası epitel kapanma yüzdesi karşılaştırması..... | 36 |
| Tablo 4.2. | İnsan serumu ile umblikal kord Serumu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 36 |
| Tablo 4.3. | İnsan serumu ile amnion sıvısı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 37 |
| Tablo 4.4. | İnsan serumu ile anne sütü arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma..... | 37 |
| Tablo 4.5. | İnsan serumu ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma..... | 37 |
| Tablo 4.6. | İnsan serumu ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 38 |
| Tablo 4.7. | Umblikal kord ile amnion sıvısı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 38 |
| Tablo 4.8. | Umblikal kord ile anne sütü arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma..... | 38 |
| Tablo 4.9. | Umblikal Kord ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 39 |
| Tablo 4.10. | Umblikal Kord ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 39 |
| Tablo 4.11. | Amnion sıvısı ile anne sütü arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma..... | 39 |
| Tablo 4.12. | Amnion sıvısı ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 40 |
| Tablo 4.13. | Amnion sıvısı ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 40 |
| Tablo 4.14. | Anne sütü ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma..... | 40 |
| Tablo 4.15. | Anne sütü ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma..... | 41 |
| Tablo 4.16. | Suni gözyaşı ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma | 41 |
| Tablo 4.17. | Patolojik skorlar | 44 |

1. GİRİŞ

Kornea epitel, hava ve gözyaşı ile bir ara yüzey oluşturarak gözün refraktif gücünde etkin bir rol oynar. Korneanın dehidrate kalmasına yardımcı olur ve bir yüzey bariyeri olarak patojenlerin stromaya geçişini engeller [1]. Çeşitli kimyasal, fiziksel etkenler ve patolojik ajanlarla epitel defektleri oluşarak bu bariyer yapı bozulabilir. Defektin hızlı ve doğru bir şekilde kapanması kornea saydamlığının ve görme keskinliğinin korunmasında önemlidir [2]. İyileşme sürecinde herhangi bir aksama körlükle sonuçlanabilecek kalıcı kornea defektlerine neden olabilir [3]. Bu nedenle kornea reepitelizasyonunun hızlandırılması, desteklenmesi önemlidir. Suni gözyaşları, otolog serum, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibronektin gibi doku yapıştırıcıları, kortikosteroid gibi anti-inflamatuvar ajanlar ve travmadan korunma re-epitelizasyonu arttırmaktadır [4].

Korneal yara iyileşmesi hücre migrasyonu, proliferasyonu, adhezyonu, tabakalaşmayı ve farklılaşmayı içeren kompleks bir mekanizmadır. Yara yerinde epitel integrasyonunun ve homeostasisinin yeniden sağlanması büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks (ESM) iletişimi ile sağlanır [2]. Gözyaşı tabakası büyüme faktörleri, vitaminler, elektrolitler ve nöropeptitler için kaynak oluşturarak kornea epitel hücrelerinin integrasyonunda ve epitel iyileşmesinde büyük rol oynar [5, 6]. Konvansiyonel tedavi seçeneklerine ek olarak gözyaşı içeriğine benzer şekilde epitel farklılaşmasını ve çoğalmasının uyarıcı topikal tedavilerin kullanılması ilave fayda sağlayabilmektedir.

Periferik kan serumu; EGF, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), hepatosit büyüme faktörü (HGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), albumin, α 2-makroglobulin, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), nörotrofik faktörler, fibronektin, vitamin A ve E, sitokinler, lizozim, immunglobulin G (IgG) ve komplemanlar gibi bakteriyostatik komponentler içermesine ek olarak pH, osmolalite ve biyomekanik özellikler bakımından gözyaşına çok benzemesi nedeniyle oküler yüzey hastalıklarında kullanılmaktadır. Suni gözyaşlarında bu komponentler bulunmazlar. Ayrıca serumun prezervan içermemesi önemli bir avantajdır [7]. Kord kanı serumu periferik kan serumu gibi gözyaşına benzer içerikte olup birçok büyüme faktörü ve nörotrofik faktör için kaynaktır [8, 9].

Amniotik membranın içeriğindeki antiinflamatuvar ve antianjiyogenik proteinlerle korneal zedelenme sonrası oküler hasarı azalttığı gösterilmiştir [10]. Amnion membranındaki birçok protein amnion sıvısında da bulunmaktadır [11]. Yapılan

Çalışmalarda farelerde alkali yanık sonrasında korneal opasite ve skar oluşununun insan amnion sıvısı kullanılarak azaldığı kanıtlanmıştır [12]. Tavşanlarda fotorefraktif keratektomi sonrası insan amnion sıvısı kullanılarak daha hızlı korneal sinir rejenerasyonu ve korneal sensitivitenin daha hızlı geri kazanımı sağlanmıştır [13].

Serum ve gözyaşına benzer bir şekilde anne sütü de kornea epitel hücre döngüsü ve yara iyileşmesinde etkinliği olan birçok komponent içerir. Farelerde epitel defekti oluşturularak yapılan çalışmada anne sütü ile iyileşmenin suni gözyaşına göre daha üstün olduğu gösterilmiştir [14].

Kornea yara iyileşmesine etki eden en önemli çevresel faktör olan gözyaşının azaldığı durumlarda ve kuru göz sendromunda gecikmiş yara iyileşmesi beklenmektedir.

Bu çalışmada; kornea epitel iyileşmesinde etkin rol oynayan büyüme faktörleri, sitokinler, vitaminleri farklı oranlarda ve farklı çeşitlilikte içeren insan serumu, insan umbilikal kord serumu, insan amnion sıvısı, anne sütü ile kuru göz sendromunda yaygın olarak kullanılan suni gözyaşının farelerde deneysel kornea epitel defekti modelinde etkinliklerini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea

Kornea embriyolojik olarak incelendiğinde nöroektoderm ve mezenşim olmak üzere iki dokudan köken almıştır. Lens vezikülünün yüzey ektoderminden ayrılması ile kornea oluşumu başlar. Yüzeyel ektodermden kornea epiteli ve desme zarı gelişmektedir. Gestasyonel 39. günde 2 tabakalı epitel, bazal lamina üzerinde uzanmakta olup, 2-3 tabakalı endotelden dar asellüler boşluk ile ayrılır. Nöroektodermden endotel oluşmaktadır. Periferden gelen mezenşimal hücreler 7. haftada epitel ile endotel arasındaki bu boşluğa göç eder. Mezenşimal hücreler gestasyonel süreçte keratosit hücrelerini oluşturur. Üçüncü ayda epitel 2-3 kat hücreden oluşurken, stroma 25-30 kat keratositten oluşur. Descemet membranı ise en arkadaki keratositlerle tek tabakalı endotel arasında uzanır. Bu aşamada descemet membranı, stromaya komşu lamina densa ve endotele komşu lamina lusida olarak 2 zondan oluşur. Ön stromanın asellüler olan bowman tabakası ise dördüncü ayın sonunda oluşur [15, 16].

Kornea gözün ön yüzeyinde uzanıp enfeksiyonlardan ve dış etkenlerden koruyan avasküler, saydam, yapısal bir bariyerdir. Üzerindeki gözyaşı film tabakası ile bereber göze refraktif bir ön yüzey sağlar. Kornea merkez kalınlığı yaklaşık olarak 0,5 mm olup periferde gidildikçe artar [17]. Erişkinde horizontal kornea çapı 11,5-12,0 mm olup vertikal çapı horizontal çapından 1,0 mm daha geniştir [18]. Ön eğrilik yarıçapı 7,8 mm ve arka eğrilik yarıçapı 6,5 mm olup ön yüzey kırma gücü +48,6 dioptri (D), arka yüzeyinin kırma gücü – 6,8 D olmak üzere toplam kırıcılık gücü +42 D'dir. [19-21]. Ortalama refraktif indeksi 1,3375'tir [1].

Yenidoğan döneminde vertikal kornea çapı 10 mm, kırıcılık gücü yaklaşık 51 D olup 1 yaşında erişkin seviyeye ulaşır [22, 23].

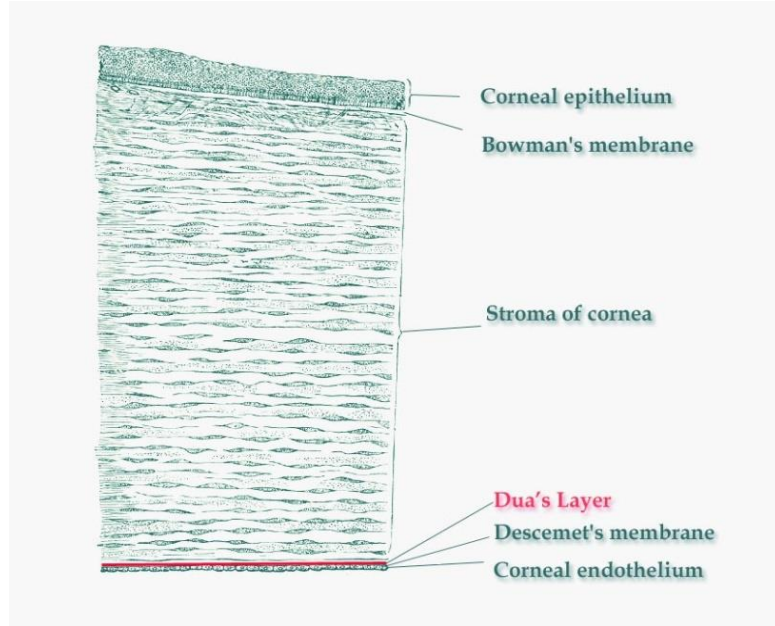
2.1.1. Gözyaşı Film Tabakası

Hava-gözyaşı film tabakası ara yüzeyi ve kornea gözün toplam refraktif gücünün 2/3'ünü oluşturur [17]. Gözyaşı kornea ön yüzeyindeki mikro düzensizlikleri yok ederek optik sistemde önemli bir rol oynar [17]. Aynı zamanda özellikle mikrobiyal invazyon olmak üzere kimyasal, toksik ve yabancı cisim hasarına karşı korneanın primer koruyucusudur [24]. Ayrıca epitel sağlığı, proliferasyonu ve tamirinde etkin immünolojik faktörler ve büyüme faktörleri içerir [24].

Gözyaşı filmi 3 tabakadan oluşur:

- 1- Lipit tabaka: Gözyaşının en dış kısmında yer alır. En önemli görevi; aköz tabakanın buharlaşmasına engel olmaktır. Antibakteriyel özelliği olduğu da düşünülmektedir [25, 26]. Kolesterol esterleri ve yağ içerir, Zeis, Moll ve meibomian bezlerden üretilir.
- 2- Aköz tabaka: Gözyaşı film tabakasının orta kısmında yer alır, gözyaşı bezi ve Krause ve Wolfring bezleri tarafından salgılanır. Gözyaşının üç komponentinden, kalınlığı en fazla olanıdır. Aköz tabakada; elektrolitler, proteinler, büyüme faktörleri, vitaminler, antibakteriyel moleküller, sitokinler, immünglobulinler ve hormonlar bulunmaktadır. Aköz tabakanın içeriği, oküler yüzeyin beslenmesini ve korunmasını sağlar [27]. Salgılanması; sempatik, parasempatik uyarılarla ve hormonal olarak düzenlenir. Çevresel ve fizyolojik değişimler, içeriği oluşturan bileşenlerin miktarını etkilemektedir [28, 29].
- 3- Müsin tabaka: Kornea epiteli ile direkt teması olan tabaka olup konjonktival goblet hücreleri tarafından üretilir. Kornea epiteli glikokaliks tabakası ile hidrofilik bağ kurarak her göz kırpma hareketinde gözyaşının yayılmasını sağlar. Bu glikokaliks tabakanın korneal yaralanma ile hasarlanması sonucu gözyaşı stabilitesi kaybolur ve oküler optik zincir kırılır [30].

Kornea, hücresel (epitel, stroma, endotel) olan üç ve iki tanesi de ara yüz (Bowman tabakası, Dua tabakası, Desme membranı) olmak üzere 6 tabakadan oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kornea tabakaları

2.1.2. Epitel Tabaka

Epitel tabaka yüzey ektoderminde gestasyonel 5.-6. haftada gelişir. Yaklaşık 40-50 µm kalınlığında, 4-6 sıra çok katlı, keratinize olmayan yassı epitel hücrelerinden oluşur (Şekil 2. 2) [31].

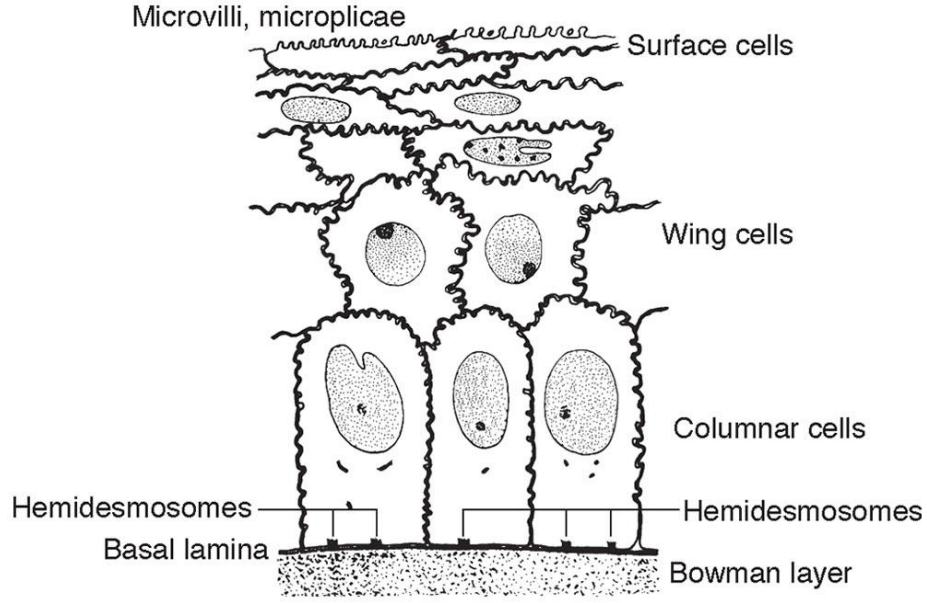
Epitel tabakanın en üstünde 2-3 sıra düz, çok kenarlı yüzey hücreleri bulunur. Bu hücreler glikokaliks ile örtülmüş mikrovilli ve mikroplikalar içerir. Böylece gözyaşı müsin tabakası ile temas ve adhezyon artmış olur ki bu yüzey artışı düz ve saydam optik yüzey için önemlidir. Yüzey hücreleri arasındaki 'tight junction' enfeksiyöz ajanların ve toksinlerin derin tabakalara ulaşmasını engelleyen bir bariyer görevi görür [31].

Yüzey hücrelerinin altında yüzey hücresi kadar yassı olmayan ancak benzer sıkı interselüler bağlantıları olan 2-3 sıra suprabazal ya da poligonal kanatsız hücreler adı verilen hücreler yer alır [17].

Epitel tabakanın en derininde yaklaşık 20 µm kalınlıkta olan tek sıra dizilmiş bazal kolumnar hücreler yer alır. Bu hücrelerin mitotik aktivitesi olup çoğalıp öne doğru ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar. Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunur. Tonofilamanlar ile hücrenin iskeleti korunur. Aktin filamanlar ise yara iyileşmesi sırasında hücre göçünde rol alır [32].

Bazal hücreler hemidesmozomlarla altındaki bazal membrana, desmozomlarla da yan komşu hücrelere bağlanırlar. Eğer bazal membranla olan bu sıkı bağlantıda defekt gelişirse klinik olarak iyileşmeyen epitel defektleri ve rekürren korneal erozyon karşımıza çıkar. Bazal epitel hücreleri 50 nm kalınlığında, tip IV kollajen, laminin ve diğer proteinlerden oluşan epitelyal bazal membranı sentezler [17].

Epitel hücreleri, korneada çevreden merkeze doğru ilerler. Bazal ve kanatsız hücreler, arkadan öne doğru ilerler ve dökülürler. Bu, X-Y-Z hipotezi olarak bilinmektedir [32]. Limbal bazal epitelde yer alan epitel kök hücreleri kornea epitel hücrelerin ana kaynağıdır. Kornea santraline göç ederken transient amplifying hücrelere (sınırlı bölünme yeteneği olan hücreler) ve bazal hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler de çoğalıp farklılaşarak yüzey epitel hücrelerine dönüşür, yüzeyleri gözyaşındaki müsinin daha iyi yapışmasını sağlayan mikrovilluslarla örtülür ve birkaç gün sonra deskuamasyona uğrayarak gözyaşına dökülür. Bu döngü yaklaşık 7-10 gün sürer [17, 33, 34].



Şekil 2.2. Epitel hücre dizilimi

2.1.3. Bowman Tabakası

Epitel bazal membranının altında yer alan gelişigüzel yerleşen kısa kollajen fibrillerden oluşan aselüler tabakadır. Yaklaşık 8-12 μm kalınlıkta olup yaşla beraber kalınlığında azalma olur. Rejenere olmadığı için hasarlanması durumunda skarla iyileşir [17, 35]. Epiteldeki patolojilerin stromaya yayılmasını engelleyen bir bariyerdir.

2.1.4. Stroma

Kornea kalınlığının yaklaşık olarak %80-85'ini oluşturan en kalın tabakasıdır. Embriyolojik olarak primitif endotel oluşumundan sonra ikinci nöral krest hücre göçüyle 7. gestasyonel haftada gelişir [17].

Stroma diğer kollajen yapılardan farklı olarak ekstraselüler matriks ve liflerin organizasyonu sonucu saydamlık kazanmaktadır [36, 37]. Tip I ve tip V kollajenden oluşan kollajen lifler birbirine paralel halde bir araya gelerek fibril demetlerini bu fibril demetleri de lamelleri oluşturur. İnsan stromasında yaklaşık olarak 250-300 lamelden oluşmaktadır [37, 38]. Yüksek bir organizasyon gösteren bu kollajen ağları ışık saçılmalarını azaltmakta, korneaya saydamlık ve mekanik güç kazandırmaktadır [17]. Lameller dizilim stroma derinliğine göre değişmektedir. Stroma derinlerinde yüzeyel tabakalara göre daha sıkı bir organizasyon vardır. Korneal cerrahi kesilerin stroma derinlerinde daha kolay olması bu nedendir [17]. Bu varyasyon ayrıca korneal ödeme cevabı da farklılaştırmaktadır. Desme kırışıklıkları bu asimetrik kabarıklığın bir sonucudur [39].

Kollajen kompleksleri keratan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat ile yan zincirlerle bağlanarak çevrelenmiştir. Glikozaminoglikanlar stromaya yapısal destek olup hidrasyonun düzenlenmesinde de yardımcıdır [17].

Keratositler stromanın esas hücreleri olup tabakanın integrasyonuna katkıda bulunmasının yanı sıra kollajen, glikozaminoglikan ve stroma homeostazında etkin rol oynayan matrix metalloproteinazları (MMPs) sentezler [17]. Keratositler çoğunlukla anterior stromada bulunur ve %25-30 oranında korneal kristalin denilen çözünebilir protein içerir. Kristalin, keratositlerden ışık saçılımının azalmasında ve korneal saydamlıkta etkilidir [40].

2.1.5. Dua Tabakası

Predesmetik stroma içerisinde yer alan aselüler, iyi sınırlanmış ve esas olarak tip 1 kollajenden oluşan $10,15 \pm 3,6$ μm kalınlığında bir tabakadır. Dua ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup kornea katlarını birbirinden ayırmak için küçük hava kesecikleri enjekte ettikten sonra elektron mikroskopuyla gözlemleyerek tespit etmiştir [41].

2.1.6. Desme Membranı

Kornea endotelinin bazal membranı olup çocuklarda 3 μm , erişkinlerde 10 μm kalınlığındadır. İki katmandan oluşur. Ön bantlı tabaka, fetal korneada gestasyonel 12. haftada görülür, kollajen lameller ve proteoglikan içerir. Bantsız arka katman ise endotel hücrelerinin hemen altında uzanır, endotel hücreleri tarafından sekrete edilir ve yaşla kalınlaşır [42].

Yapısındaki esas kollajen tip IV olup merdiven şeklinde dizilim gösteren tip VIII kollajen desme membranına özgüdür [42, 43].

Cerrahi müdahale, travma veya keratokonustaki gibi kendiliğinden rüptüre olursa stromaya doğru retraksiyon gösterir ve endotel tarafından tamir edilir [44].

2.1.7. Endotel

Desme membranının arka yüzeyini örten, mozaik paternde dizilmiş poligonal çoğunlukla da hegzagonal şekilli tek sıra hücrelerden oluşur. Hücreler yaklaşık olarak 5 μm kalınlığında ve 20 μm genişliğindedir [1]. Hücrelerin lateral duvarlarında yoğun sodyum-potasyum ATPaz pompası bulunmaktadır [45]. Endotel hücre aktivitesi ile stroma dehidrate kalmakta ve korneanın saydamlığı korunmaktadır [46]. Bu dehidrasyon

hipoosmolar olan stromadan hiperosmolar olan aköze pasif transportla pompa sızdırma yoluyla sıvı geçişiyle sağlanır. Stroma ve aköz arasındaki osmotik gradient ise endotel membranındaki sodyum-potasyum ATPaz pompası ve intraselüler karbonik anhidraz yolu ile iyonların stromadan aköze aktif transport ile sağlanır [47].

Endotel hücrelerinin mitotik aktivitesi yoktur. İnsanlar endotel rezervi ile doğarlar. Doğumda yaklaşık olarak 3500 hücre/mm² olan endotel yoğunluğu yılda yaklaşık olarak %0.6 azalmaktadır [48]. Hücre yoğunluğu 500 hücre/mm² altına düşmesi korneal ödem için risk faktörüdür. Endotel hücre morfolojisi de pompa fonksiyonu ile bağlantılı olup hücre boyutunda artma (polimegatizm) ve şekil varyasyonlarında artma (pleomorfizm) sonucunda endotelin pompa fonksiyonu azalmaktadır [49]. Yaş, travma, inflamasyon ve bazı hastalıklarda (Fuchs endotelyal distrofi gibi) endotel sayısı azalmaktadır ancak kalan hücreler uzayıp esneyerek boşluk alanları doldurabilir. Bu süreçle beraber kalan endotel hücrelerinde de polimegatizm ve pleomorfizm gelişmiş olur [17].

2.2. Kornea İnnervasyonu

Kornea insan vücudunda en yoğun innervasyonu olan dokulardan biridir. Duyusal sinir lifleri trigeminal sinirin oftalmik dalından ayrılır. Uzun silier sinirler perilimbal sinir halkasını oluşturur. Sinir lifleri korneayı derin periferal stroma tabakasından radyal olarak penetre eder ve anteriora doğru yönlenerken Bowman ve ön stroma arasında subepitelyal sinir pleksusunu oluşturur. Daha sonra bu sinir lifleri Bowman tabakasını delerek epitelyal bazal hücreleri innerve eden subbazal epitelyal sinir pleksusu adını alırlar [50]. Sinir lifleri şeffaf korneaya girer girmez miyelinlerini kaybeder. Endotel seviyesinde ise sinir lifi yoktur [51]. Klinik olarak subepitelyal sinir pleksusunu açığa çıkaran yüzeysel epitel hücrelerinin kaybı şiddetli ağrı ile sonuçlanır.

2.3. Kornea Vaskülarizasyonu

Avasküler bir doku olan korneanın lenfatik drenajı yoktur. Limbal vasküler ağ, kornea ön yüzey beslenmesine katkı sağlar. Oftalmik arterin dalı olan ön siliyer arter ile dış karotis arterin fasyal dalı anastomoz yapar. Dolayısıyla limbal vasküler ağ hem iç, hem de dış karotid arterlerden beslenir [52].

2.4. Kornea Metabolizması

Avasküler olan korneanın beslenmesi ve metabolik artıkların uzaklaştırılması arka yüzeyde humör aköz, ön yüzeyde gözyaşı film tabakası ve limbal damarlar ile sağlanır. Glikoz; epitel hücreleri, keratositler ve endotel için esas metabolik maddedir. Stroma, glikozu humör aközden aktif transport ile alırken, epitel ise glikozu stromadan pasif difüzyon ile alır. Endotelde yer alan sodyum-potasyum ATPaz ve karbonik anhidraz enzimleri aktif transporttaki en önemli yollar olup stroma ile aköz humör arasında iyon transportunda görev alır. Kornea glikozunun yaklaşık %10'u gözyaşı tabakası ve limbal damarlar ile sağlanır [53].

Glikoz, korneada üç metabolik yolak ile metabolize edilir. Bunlar trikarboksilik asit (TKA) siklusu, anaerobik glikoliz ve heksoz monofosfat (HMF) yoludur. Epitel ve endotelde glikozun %35-65'i HMF yoluyla yıkılırken, keratositlerde HMF yolunun önemli bir enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz bulunmadığından stromal keratositler bu yolla çok az miktarda glikozu metabolize edebilir. TKA siklusu epitele göre endotelde daha etkindir. Glikolizin son ürünü olan pirüvik asit ya aerobik şartlarda karbondioksit ve suya ya da anaerobik ortamda laktik aside çevrilir. Laktik asit, oksijen azlığı durumunda artar. Artmış laktik asit düzeyinin korneal ödem veya endotel morfolojisini ve fonksiyonunu değiştiren stromal asidoz gibi zararlı sonuçları vardır [53].

İnsan korneasında yüksek oranda aldehid dehidrogenaz ve transketolaz vardır. Bu iki enzim korneal stromal çözünebilir proteinlerin %40-50'sini oluşturur ve korneanın optik özelliğine katkıda bulunur. Aynı zamanda her iki protein kornea hücrelerini, serbest radikallere ve oksidatif hasara karşı ultraviyole B (UV-B) ışınlarını emerek korur [51].

2.5. Korneal Epitel Yara İyileşmesi

Kornea epiteli limbusta yer alan ve hayat boyu epitel rejenerasyonu için kaynak sağlayan kök hücreler sayesinde kendi kendini yenileyebilen bir dokudur [54, 55]. Çeşitli kimyasal, fiziksel ve patolojik etkenlerle epitelde defekt oluşabilir epitelin bariyer fonksiyonu kesintiye uğrayabilir [2]. Böyle bir durumda epitel hücreleri körlüğe kadar gidebilecek fırsatçı enfeksiyonlardan gözü korumak için defektin hızlıca etkin bir şekilde kapatılması için sinyal yolağını başlatırlar [3]. Korneal integrasyonun sağlanması, korneanın saydam kalarak görme keskinliğinin korunması için etkin ve doğru bir iyileşme süreci gereklidir. Hücre migrasyonu, proliferasyonu, adhezyonu, tabakalaşmayı ve farklılaşmayı içeren kompleks bir mekanizma olan epitel yara iyileşme süreci sessiz ilk faz

ve kapanma fazı olarak ikiye ayrılabilir [2]. İlk fazda hücrel ve hücre dışı mekanizmalarla yara yeri etrafındaki epitel hücrelerin migrasyonu tetiklenir [56, 57]. Kapanma fazı ise hücre göçü ile başlar ve hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ile devam edip çok katlı epitel oluşumuna kadar devam eden süreçtir [57]. Kornea epitelinde defekt geliştiği zaman kenardaki hücreler bazal hücrelerle hemidesmozomlarını kaybedip hücre zarında uzantılar oluştururlar, mitokondriyel enerji üretimini arttırlar, migrasyon ve yayılma ile defekt alanın kapatmaya başlarlar. Bu erken mitotik olmayan evrede epitel kapanma hızı 60-80 µm/saattir [58]. Hücre göçünde aktin zengin stress liflerinin etkin rolü vardır [3]. Hücre zarının sitoplazmik tarafında fokal yapışma plaklarında bulunan 130kD sitoplazmik protein olan vinkülin, intrasitoplazmik aktin stres liflerinin hücre zarına bu fokal birleşme noktalarında tutunmasında etkili olabilir [59]. Vinkülin aktin liflerini hücre zarı proteinine bağlar, diğer tarafta talin bir majör hücre alt yapısı yapışma proteini olan integrin ile bağlıdır [59]. Bu yapışma protein kompleksleri en çok göçen hücrelerin ilerleyen kenarında yoğundur, bu hücrelerin hemidesmozom yokluğunda bazal membrana yapışmasını sağlar [59]. Yapılan çalışmalarda göç eden epitel hücrelerinin altındaki substrata sıkı bağlı olduğu gösterilmiş ve bu da göç esnasında lider hücrelerin arkalarında kalan hücreleri çektiğini düşündürmüştür [60]. Fibronektin hücre-substrat adhezyonunda ve hücre migrasyonunda etkin rol oynar [17]. Yirmi dört–30 saat sonra mitoz ve hücre çoğalması başlar ve yoğun olmayan bir hücre topluluğu oluşur. Geniş epitel yaralanmalarından 96 saat sonra hücre bölünmesinde belirgin artış görülür [61]. Sadece bazal hücreler, geçici çoğalan hücreler ve limbal kök hücreleri bu yeniden yapılandırıcı mitozla katılırlar [62].

Reepitelizasyonu şu faktörler artırır:

- A. Suni gözyaşı
- B. Otolog serum
- C. Rejenere olan epitelin travmadan uzak tutulması
- D. İnflamasyonun azaltılması (steroidler)
- E. EGF
- F. Doku yapıştırıcıları (fibronektin gibi)

Reepitelizasyon sonrasında bazal membran komplekslerinin yavaş rejenerasyonu nedeniyle epitel erozyonları, kapanmayan defektler görülebilir. Epitel iyileşmesi için adezyon molekülleri ve gözyaşındaki sitokinler büyük önem taşır [63].

2.6. Kornea Fonksiyonları Üzerine Etkili Büyüme ve İyileştirme Faktörleri

Epitel yara iyileşmesi sırasında hücrelerin büyüme, çoğalma, göç, farklılaşma, adhezyon fonksiyonları ve ECM üretimi, proteinaz regülasyonunda büyüme faktörleri ve sitokinler etkin rol oynar. Farklı hücrelerin hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyonu düzenlenir. Korneal hücreler, epitel hücreler üzerine farklı etkinlikleri olan birçok sitokin ve büyüme faktörü üretir [2]. Gözyaşı filmi de yine oküler yüzeyde epitel hücrelerinin döngüsünü regüle eden büyüme faktörleri ve diğer besin maddelerinin kaynağını oluşturur [64]. Epitel defekti sonrası gözyaşındaki sitokin miktarı artmaktadır. Kornea yara iyileşmesine etki eden en önemli çevresel faktör olan gözyaşının azaldığı durumlarda ve kuru göz sendromunda gecikmiş yara iyileşmesi beklenmektedir.

2.6.1. Epidermal Büyüme Faktörü

Epidermal büyüme faktörü epitelyal yara iyileşmesini uyararak hücrelerin göçünü ve çoğalmasını başlatan esas sinyal molekülüdür [63, 65, 66]. Yaklaşık 6 kDa molekül ağırlığa sahip bir polipeptit olup epitel hücreleri için güçlü bir mitojendir. Hücreler tarafından eksprese edilen EGF reseptörünün (EGFR) düşük afinite ve yüksek afinite bölgelerine bağlanır. Lakrimal bezde ve kornea epitel hücrelerinde üretilir. Gözyaşında bulunur [67]. EGF, lakrimal bez ve gözyaşı filminde 0.7-9.7 ng/ml konsantrasyonda bulunur [66, 68].

Kornea epitel (özellikle limbal bölgede) ve endotel hücrelerinde düşük afiniteli ve yüksek afiniteli EGFR bulunurken stromal keratositlerde sadece az miktarda düşük afiniteli EGFR vardır. EGF; parakrin, otokrin ve jukstakrin yollarla kornea hücrelerini uyarır. Normal korneal epitelyal kalınlığının devamlılığında otokrin ve lakrimal bez tarafından üretilen EGF önemli rol oynamaktadır [66].

EGF, EGFR'ye bağlanarak intrinsik tirozin kinaz reseptör aktivasyonunu sağlamaktadır. Böylelikle DNA sentezi ve ESM moleküllerinin (fibronektin ve hyalüronik asit) üretimine yol açar. Hücre proliferasyonu, hücre membranlarının birbirine teması ile ortaya çıkan yanıt ile sınırlandırılır. Reseptör fosforilasyonu ayrıca hücre içi anti-apoptotik proteinleri ve sitoskeleton proteinlerini aktifleyerek hücre morfolojisini ve motilitesini ayarlar. ESM moleküllerinin, özellikle de fibronektinin polarizasyonunun değişmesi ile migrasyonun doğru yönü belirlenir ve integrinler ile EGFR arasındaki bağlantı kolaylaşır [67, 69]. Ayrıca EGFR'nin yine epitel hücrelerinde hücre göçü ve proliferasyonu ile sonuçlanan nükleer faktör kapp B (NF-κB) yolağını da uyardığı gösterilmiştir [70-73].

Son çalışmalarda NF- κ B p50 eksiliği yapılan farelerde korneal epitel iyileşmesinde dikkat çekici bir gecikme görölmüştür[74]. Bu da EGF ile uyarılan NF- κ B yolağının korneal epitel hücre yenilenmesi ve yara iyileşmesinde etkinliğini kanıtlamaktadır [2].

EGF'nin kornea vaskülarizasyonu ile ilişkiili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur [75, 76]. EGF tarafından uyarılan anjiyogenezisin, yara iyileşmesi sırasında özellikle fibroblast büyüme faktörü olmak üzere diğer büyüme faktörleriyle olan kombine ilişkiisi ile bağlantılı olabileceği düşünölmektedir [77]. EGF'nin korneal epitel hücrelerinin terminal diferansiasyonunu inhibe ettiği ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [73].

2.6.2. Hepatosit Büyüme Faktörü

HGF, 90 kDa molekül ağırlığında ekstraselöler matrikse bağlanan glikoproteindir. Esas üretimi stromal fibroblastlar tarafından olup hedef hücreleri parakrin etki ile epitel hücrelerdir. Korneal epitel hücreleri üzerindeki etkilerini c-Met trozin kinaz protoonkogen HGF reseptörü (HGFR) ile gerçekleştirir [78, 79]. HGF, kornea epitel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve apoptozisini düzenler [80-84]. Epitel yara iyileşmesi sürecinde keratosit ve epitel hücrelerden salınım artar [82, 85, 86]. HGF bu süreçte epitel hücreleri üzerinde parakrin, otokrin, intrakrin etki gösterir [80, 85]. Hem santral hem de periferdeki epitel hücreleri üzerine etkilidir [3].

Lakrimal bez tarafından üretilir ve gözyaşında (200 pg/ml) bulunur. Korneal epitelin sağlığının sürdürölmesine katkıda bulunur [87].

2.6.3. Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF)

KGF; 28 kDa molekül ağırlığına sahip bir polipeptiddir. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesinden olup diğer adı FGF-7'dir. Uyarı yolağı EGF, FGF ve TGF- α ile aynıdır [88]. Limbal korneal stroma ve lakrimal bez tarafından üretilir. Esas olarak limbal epitel hücreler üzerinde hücre homeostazisi ve yara iyileşmesi sürecinde HGF benzeri parakrin etkisi vardır [80, 89].

KGF, kornea epitel hücrelerinin migrasyon ve diferansiasyonunu etkilemeden selektif olarak proliferasyonu uyarır. Korneal hasarın olmadığı durumlarda da KGF'nin bazal ekspresyonun devam etmesi korneal epitel bütönlüğünün sürdürölmesini sağlamaktadır[90].

2.6.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

TGF- β ailesi üç izoformu bulunan, her biri yaklaşık 25 kDa moleküler ağırlığa sahip polipeptidlerden oluşur. Birçok hücre tarafından sentezlenen TGF- β ; hücre bölünmesi, farklılaşması, adezyonu, morfogenezi, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır [91]. Birçok farklı yollar ile etkileşerek oküler yüzeyin homeostazında önemli rol oynamaktadır. TGF- β genel olarak epitelyal, endotelyal ve lökosit hücre büyümesini inhibe ederken, fibroblastların proliferasyonunu stimüle etmektedir [92]. TGF- β reseptörleri; kornea stromal hücrelerinde, limbal ve santral korneal epitelyal hücrelerde bulunmaktadır. Üç tipi mevcuttur. Bunlar arasında TGF- β 2, kornea ve humör aközde bulunan ana formdur.

TGF- β 'nın EGF tarafından uyarılan epitelyal hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde zayıf, KGF ve HGF tarafından uyarılan proliferasyon üzerinde ise güçlü bir inhibisyon etkisi vardır. Hem TGF- β 1 hem de TGF- β 2 epitel hücre proliferasyonunu inhibe eder. Ancak inhibitör etki esas olarak TGF- β 2 reseptörleri ile oluşturulur [73].

TGF- β 1 ve TGF- β 2 epitel yara iyileşmesinde hücre proliferasyonun düzenlenmesinde negatif düzenleyiciler olarak önemli rol oynar [3]. Kornea ve humör aköz içerisinde bulunan TGF- β ile bu bölgedeki anjiyogenezis kontrol altına alınır [93].

2.6.5. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PDGF; A, B,C, D olmak üzere 4 polipeptit zincirinin kombinasyonlarından oluşan, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD izoformları olan bir glikoproteindir [94]. Korneada ilk üç izoform bulunur [95]. Biyolojik aktiviteleri temelde benzerdir ve reseptöre bağlandıklarında mitojenik etki gösterirler [91]. PDGF-BB izoformu, kornea epitelinde üretilir ve bazal membrana bağlanır. PDGF için reseptör korneal fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde bulunur. Fibronektin varlığında PDGF-AA ve PDGF-BB kemotaksisi uyarır [96].

Ayrıca TGF- β tarafından uyarılan fibroblast proliferasyonuna aracılık eder. TGF- β , keratinositlerde PDGF proteini ve reseptör ekspresyonu üzerinden doku büyümesini düzenler. Düşük TGF- β konsantrasyonunda PDGF üretimi artarken, yüksek TGF- β konsantrasyonunda PDGF reseptör ekspresyonu azalır [97].

2.6.6. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF ailesi 20 farklı protein içerir ve yaklaşık 18 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Degradasyona uğramamak için koruyucu glikoproteinlere (heparan sülfat) bağlanır [98]. FGF, yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörüne bağlanır. Epitel, endotel ve stroma için mitojeniktir [99]. Proliferasyonu, migrasyonu, diferansiasyonu, ekstraselüler matriks yapısını ve anjiyogenezi düzenlemektedir [92].

2.6.7. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

NGF, nörotropin ailesinin bir üyesi olup sempatik ve duyuşal sinirlerin büyümesi ve devamlılığında kritik rol oynayan sinyal molekülüdür. Bir transmembran tirozin kinaz olan NGF reseptörleri kornea ve konjonktivada bulunur [100,101]. NGF, kornea epitelinin proliferasyonuna ve duyuşal fonksiyonuna destek olur [100]. Kornea homeostazı ve yara iyileşmesi için ısı, mekanik ve kimyasal uyarılarla intakt korneal sinirlerden salınan nörotropinler önemlidir [102]. NGF, proliferasyonu ve diferansiasyonu artırır. Ancak etkinliği EGF'ye göre çok daha azdır [103]. Korneal ülseri olan hastalarda topikal NGF kullanımının korneal duyarlılığı ve epitel iyileşmesini arttırdığı çalışmalarda gösterilmiştir [104, 105]. Daha sonraki çalışmalarda NGF'nin matriks metalloproteinaz-9'un (MMP-9) ekspresyonunu artırarak ve integrin β -4 'ün parçalanması ile migrasyonu arttırdığı ve haze oluşumunu azalttığı kanıtlanmıştır [106, 107].

2.6.8. Fibronektin

Fibronektin; plazma, serebrosipinal sıvı, amniotik sıvı, tükürük, humör aköz ve gözyaşı gibi vücut sıvılarında bulunan yüksek molekül ağırlıklı (~440 kDa) bir glikoproteindir. Hücre adezyonunda, migrasyonunda ve farklılaşmasında rol oynar. Lökosit ve makrofajların fagositik aktivitelerini artırır. Fibronektin, korneal yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Oküler yüzey hasarlanmalarında refleks lakrimasyon ve konjonktival damarlarda dilatasyon olur. Oküler yüzey hasarlanmalarında plazma fibronektini dilate konjonktiva damarlarından gözyaşı filmine sızar. Ek olarak korneal yara iyileşmesi sırasında korneal epitel hücreleri ve keratositler tarafından fibronektin üretimi olmaktadır [108]. Persistan korneal epitel defektlerinin tedavisinde fibronektin içeren göz damlaları ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir [109].

2.6.9. İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü (IGF), Kemik Morfogenik Proteini, Opioid Büyüme Faktörü (OGF), P Maddesi (SP), Jelatinaz B, A Vitamini, E Vitamini

IGF kornea epitel hücrelerinin büyümesi, enerji metabolizması, hücre göçü, diferansiasyonu, proliferasyonu ve hayatta kalmasında önemlidir [110-112]. IGF ve reseptörü keratosit ve epitel hücrelerinde bulunur [113]. Farelerde yapılan çalışmada IGF'nin limbal epitel hücrelerinde proliferasyonu arttırmadan diferansiasyonu arttırdığı görülmüştür [111]. SP, duyuşal sinir liflerinden salınan bir nöropeptittir. Nörotransmitter ve nöromodülatör olarak görev yapmaktadır ve oküler dokular üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. SP ile IGF-I 'in nörotrofik keratopati modeli oluşturulan farelerde sinerjistik etki ile epitel kapanmasını hızlandırdığı gösterilmiştir [114].

Kemik morfogenik proteini, TGF- β ailesindedir. Stromal keratositlerin proliferasyonunu ve kemotaksisini uyarır [99].

OGF, kendi reseptörüne (OGFR) bağlanarak kornea epitel hücreleri üzerinde parakrin ve otokrin yollarla DNA sentezinin, hücre göçünün ve doku organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynar [115, 116]. Epitel bazal ve suprabazal membranında sentezlenir ve proliferasyon üzerinde inhibe edici etkisi vardır [117]. Opioid antagonisti olan naltreksonun sistemik enjeksiyonu ya da topikal kullanımı ile insanlarda epitel yara iyileşmesini ve re-epitelizasyonu belirgin bir şekilde hızlandırdığı gösterilmiştir [118].

MMP-9 (jelatinaz B) mekanik, termal ve lazer yaralanmaları sonrasında korneal epitel hücreleri tarafından üretilir ve travma sonrası epitel bazal membranının çözülmesine yol açar [119, 120]. İnsanlarda iyileşmeyen korneal ülser kenarlarındaki bazal korneal epitel hücrelerinde MMP-9 gösterilmiştir [121]. Bu da artmış MMP-9 üretiminin veya tam karşılanmayan nötralizasyonunun epitel iyileşmesinde olumsuz sonuçlar doğurduğunu düşündürebilir [122]. Yapılan çalışmalarda doksisisiklin ve kortikosteroid tedavisi ile antiinflamatuvar etkiye ek olarak MMP-9 inhibisyonu ile inatçı rekürren korneal erozyonlarda nüks önlenmiştir [122].

A vitamini kornea ve konjonktivada hücrelerin yassı epitele farklılaşması için gereklidir ve normalde de oküler yüzeyde bulunur. Eksikliğinde goblet hücre sayısı azalır [123]. Ayrıca eksikliği durumunda yassı epitel farklılaşması tam olamayacağı için yüzey keratinizasyonu, kuru göz, korneal ülserasyon gelişebilir [124]. E vitamini de benzer bir şekilde hücre farklılaşmasında etkindir ek olarak güçlü bir antioksidan olarak serbest radikallerin etkisini azaltır [125]. İnsanlarda fotorefraktif keratektomi (PRK) sonrası topikal E vitamini uygulamasının keratosit apoptozisini azalttığı gösterilmiştir [126].

2.6.10. Sitokinler

Sitokinler; hücre büyümesi, farklılaşması, bağışıklık, inflamasyon, yara iyileşmesi ve apoptozis gibi birçok fonksiyonu olan düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir. Epitel yara iyileşmesinde birçok yerde aktif rol oynarlar [3]. Özellikle proinflamatuvar interlökin 1 α (IL-1 α) ve IL-6 defekt oluşumundan sonra büyük miktarda ve hızlıca artış gösterirler. Seviyeleri zedelenmenin boyutuyla doğru orantılıdır [127]. IL-6, fibronektin üzerinden integrin salınımını arttırarak epitel migrasyonunu arttırır [128]. IL-1 ise epitel hücre migrasyonunu ve epitel kapanmasını EGF ile sinerjistik etki ederek düzenler [129]. IL-1 ayrıca korneal fibroblastlardan KGF-1 ve HGF salınımını uyararak epitel hücre proliferasyonunu arttırır [130, 131]. Stromal erimeye neden olan MMP salınımı da IL-1 tarafından baskılanır [132]. Hasarlanmış kornea epitelinden salınan IL-1 keratosit apoptozisini de düzenler [3].

2.7. Kan Ürünü Gözyaşı Takviyeleri

Gözyaşı film tabakası, oküler yüzey sağlığının temel dayanağıdır. Kornea epitelini mekanik etkenlerden korumasının yanı sıra epitel hücrelerinin büyüme döngüsünü ve migrasyonunu için gereken büyüme faktörleri, vitaminler, elektrolitler ve nöropeptitler için kaynaktır [5, 6]. Gözyaşının mekanik ve epitelyotrofik özelliği epitel integrasyonu ve yara iyileşmesinde önemlidir [133].

Kan ürünleri içerdikleri bazı büyüme faktörleri, sitokinler, vitaminler ve bakteriyostatik komponentler bakımından gözyaşına çok benzemektedir. Bu nedenle klasik tedavilere dirençli oküler yüzey hastalıklarında eşsiz bir tedavi seçeneği olarak gündeme gelmiştir [134]. Oküler yüzey hastalıklarında ilk kullanımı 1975 yılında Ralph ve arkadaşları tarafından literatüre girmiştir [135]. Kontaminasyon riski, hazırlanışının hasta için zor olması ve standart hazırlama protokollerinin olmaması bu ürünlerin yaygın kullanımını kısıtlamaktadır [136].

2.7.1. Serum

Serum, kanın şekilli elemanlarından ve pıhtılaşma faktörlerinden ayrılmış olan sıvı içeriğidir. Serum içindeki EGF, TGF- β , HGF, PDGF, albumin, α 2-makroglobulin, IGF, nörotrofik faktörler, fibronektin, vitamin A ve E, sitokinler, lizozim, IgG ve komplemanlar gibi bakteriyostatik komponentler ile pH, osmolalite ve biyomekanik özellikler bakımından gözyaşına çok benzemesi nedeniyle doğal gözyaşı kaynağı amacıyla oküler yüzey

hastalıklarında kullanılmaktadır. Prezervan içermeyen serumda bulunan bu komponentler suni gözyaşlarında bulunmazlar [7]. Serumdaki birçok yara iyileşmesini hızlandıran faktörün yanı sıra IL-17, interferon- γ (IFN- γ) ve TGF- β gibi epitel çoğalmasını azaltan ve inflamasyonu arttıran faktörler de içerir [137, 138]. Serumun A vitamini, TGF- β , IGF-1, NGF, fibronektin ve lizozim konsantrasyonları gözyaşından fazla iken IgA, EGF ve C vitamini konsantrasyonları gözyaşındaki düzeylerden düşüktür [139]. Fibronektin, hücre göçünde en etkin faktörlerden biridir. EGF, epitel hücrelerinin migrasyonunu artırır ve antiapoptotik etki gösterir. TGF- β , stroma ve epitel tamirinde görev alır. Albuminin ise antiapoptotik, α 2 makroglobulinin antikollajenaz etkileri vardır. A vitamini eksikliği; goblet hücre kaybına, keratinizasyona, kornea ve konjonktiva epitel metaplazisine yol açar. PDGF, korneal fibroblast proliferasyonunu düzenler ve yara iyileşmesinde migrasyonu artırır. HGF, kornea epitel hücrelerinin proliferasyonu, motilitesi ve diferansiyasyonunda önemlidir. FGF, hücre proliferasyonunu aktive ederek yara iyileşmesini uyarır [64, 73, 140-143].

Otolog serum ilk olarak 1984 yılında Fox ve arkadaşları tarafından kuru göz hastalarını tedavisinde kullanılmıştır [144]. 1999'da Tsubota ve arkadaşlarının Sjögren sendromlu kuru göz hastalarında ve persistan epitel defekti olan hastaların tedavisinde otolog serum kullandıkları ve başarılı sonuçlar aldıkları çalışmaları ile otolog serumun güvenlik ve etkinliği sistematik bir şekilde gösterilmiştir [145, 146]. Birçok yayın özellikle ciddi seyirli kuru göz olgularında otolog serum kullanımının etkili bir tedavi seçeneği olduğunu kanıtlamıştır [5, 147].

Otolog serum oftalmolojide kuru göz, persistan epitel defekti, rekürren korneal erozyon, superior limbik keratokonjonktivit, kimyasal korneal hasar, graft-versus-host hastalığı (GVHD), limbal kök hücre yetmezliği, nörotrofik keratopati, Stevens-Johnson Sendromu, oküler sikatrisyel pemfigoid hastalarında kullanılmaktadır [146, 148-151]. Oküler yüzey hastalıklarında klasik tedaviler ile otolog serumun karşılaştırıldığı çalışmaların sonucunda otolog serumun daha etkili ve güvenli olduğu gösterilmiştir [147].

Otolog serum göz damlası hazırlama protokolü çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. Literatürde otolog serum göz damlaları için farklı seyrelticiler tarif edilmiştir. Serum fizyolojik, dengeli tuz solüsyonu (BSS), gentamisin, kloramfenikol, sodyum hyalüronat gibi maddeler otolog serum hazırlanmasında kullanılmıştır [145, 152-155]. Liu ve arkadaşları epitel proliferasyonunu, migrasyonunu, diferansiyasyonunu en iyi uzun pıhtılaşma bekleme süresi (>120 dk), 15 dk 3000 g santrifüj ve %12,5-25 arası BSS ile dilüsyonla en iyi desteklendiğine karar vermişlerdir [156]. Pıhtılaşma için ayrılan

sürenin uzaması ile büyüme faktörlerinin miktarı artarsa da klinik uygulamada yaygın olan pıhtılaşma için 2 saatlik sürenin ayrılmasıdır.

Farklı dilüsyonlarda otolog serum hazırlamak mümkündür. Serumda (50 ng/ml) gözyaşı (10 ng/ml) konsantrasyonunu yaklaşık olarak 5 katı kadar TGF- β bulunmaktadır. Bu nedenle birçok oftalmolog tarafından epitel hücre proliferasyonunu azaltmamak adına tercih edilen dilüsyon oranı %20 'dir [134, 157, 158]. Ancak serumun dilüe edilmesi ile diğer epitelyotrofik faktörlerin konsantrasyonları düşmektedir. Ek olarak yüzey hastalıklarında kullanımında %50-100 konsantrasyonlarda daha etkili sonuçlar alınmıştır [147, 154, 159, 160]. Ayrıca dilüe edilmemiş serum kullanımında insan epitel hücre migrasyonunun muhtemelen daha yüksek orandaki fibronektin nedeniyle daha hızlı olduğu gösterilmiştir [156]. Tedavinin başarısını etkileyen diğer önemli bir değişken doz sıklığıdır. Takamura ve arkadaşları, otolog serum damla günde sekiz defa kullanıldığında hastaların %94'ünde, günde dört defa kullanıldığında hastaların % 54'ünde subjektif yakınmaların düzeldiğini bildirmişlerdir [161]. Otolog serumun günlük dozlara bölünmüş olarak çok sayıda ve bir defada hazırlanması, + 4°C'de 1 aya, -20°C'de 3 aya kadar saklanabilmesi eğilimi klinikte yaygındır [145, 156].

En iyi etkinin sağlandığı minimum konsantrasyon ve doz hastanın ihtiyacına göre, hastalık bulgularının şiddetine göre ayarlanmalıdır.

Yoğun protein içeren otolog serum kontaminasyona oldukça açık bir preparattır. Ancak protein içeriğinin yanı sıra lizozim, kompleman ve bazı Ig'ler gibi bakteriyostatik maddeleri de içermektedir. Bu nedenle ayrıca bakteriyostatik bir madde eklenmesi gerekli görülmemektedir. Otolog serumun hazırlanması, saklanması ve kullanılması sırasında son derece dikkatli olunmalı ve sterilite şartlarına uyulmalıdır. Bu şartlara gerektiği gibi uyulması durumunda ciddi bir enfeksiyon ya da komplikasyon riski oldukça azdır [145, 147, 162].

Otolog serum göz damlası uygulaması, allojenik serum göz damlası uygulamasına tercih edilmelidir. Ancak infantlarda, anemik hastalarda, ağır sistemik enfeksiyonu olanlarda, akut oto-immün hastalıklarda otolog serum yerine allojenik serum (tercihen 1. derece yakınardan alınan kan ile hazırlanan) kullanımı etkindir. Bu durumlarda kan yoluyla taşınan hastalık riski açısından dikkatli olunmalı, serolojik taramalar (HIV, HCV, HBV) yapılmalıdır [163, 164].

2.7.2. Kord Kanı Serumu

Kord kanı serumu otolog serum gibi gözyaşına benzer içerikte olup birçok büyüme faktörü ve nörotrofik faktör için kaynaktır. Periferik kan serumu ile kıyaslandığında daha fazla konsantrasyonda EGF, TGF- β (yaklaşık 2-3 katı) içerir. A vitamini ise en fazla periferik kan serumunda sonra kord kanı serumunda en az da gözyaşında bulunur. NGF ve SP yine kord kanında daha fazla iken IGF-1 konsantrasyonu periferik kan serumundan daha azdır [8, 9]. Literatürde Sjögren sendrom olan ve olmayan kuru göz hastalarında, GVHD, persistan epitel defektlerinde, nörotrofik keratopatilerde, rekürren korneal erozyonda, kimyasal oküler yaralanmalarda ve keratorefraktif cerrahi sonrasında kullanımları mevcuttur [8, 165-171]. Kord kanı serumu özellikle otolog serum kullanımına uygun olmayan genel durumu bozuk olan, kan diskrazisi ve hematolojik malignensi olan, kanında pro-inflamatuar sitokin içeren GVHD ve Sjögren sendromlu hastalarda iyi bir seçenektir [172, 173]. Yapılan çalışmalarda farklı oküler yüzey hastalıklarında otolog serumla kıyasla daha etkin olduğu gösterilmiştir [9, 166, 167, 174]. Persistan kornea epitel defektlerinde otolog serumla göre daha hızlı epitel kapanması sağlamıştır [9].

Gebeliğinin 8. ve 38. haftasında HIV, HCV ve HBV taraması yapılan ve vajinal ya da sezaryen doğum yapan donör gebeden fetüs geldikten sonra umbilikal venden 60-80 ml kan toplanır [172]. Geri kalan hazırlama basamakları otolog serum gibidir. Oda ısısında 2 saat bekletildikten sonra 15 dk 3000 g santrifüj edilir [172]. BSS ile %20'lik konsantrasyonda hazırlanır. Beş ml'lik steril şişelere ultraviyole korumasında yerleştirilir [172]. Açılmamış şişeler -20 °C 3 ile 6 ay saklanabilirken açılan şişeler +4 °C de tutularak 1 hafta kullanılabilir [172]. Yaygın klinik kullanımı günde 4 ya da 6 kere şeklindedir [172]. Bir defada birçok hasta için örnek hazırlanabilmektedir. Bu otolog serumla göre avantajdır [133]. Ancak otolog serumla karşılaştırıldığında allerji ve bulaşıcı hastalık riski gibi dezavantajları vardır. HIV, HBV ve HCV gibi bulaşıcı hastalıklar açısından inceleme yapılsa bile hastalıkların pencere dönemi akılda tutulmalıdır [9, 163].

2.7.3. Trombosit Bağımlı Plazma Ürünleri

Trombosit bağımlı plazma ürünleri içerdikleri yüksek konsantrasyonlardaki büyüme faktörleri nedeniyle farklı cerrahi branşlarda yara iyileşmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [175-177]. Trombositler trombin ile uyarılınca birçok büyüme faktörü salar [7]. Trombosit membranları santifüj ile uzaklaştırıldığında bu trombosit kaynaklı büyüme faktörlerince zengin trombosit jeli (platelet releasate) elde edilir ve bu jel

dondurularak aylarca saklanabilmektedir. Trombosit jelleri, taze donmuş plazma (TDP) ve seruma göre çok daha yüksek konsantrasyonlarda büyüme faktörü içermektedir. Hücre kültürü ortamında, hücre proliferasyonunu en iyi trombosit jelinin desteklediği, bunu serum ve TDP'nin izlediği, hücre göçü ve farklılaşmasını ise en iyi serumun desteklediği, bunu trombosit jeli ve TDP'nin izlediği gösterilmiştir [7]. Hücre göçü üzerine serumun daha üstün olması, serumda fibronektinin trombosit jeline göre daha yüksek konsantrasyonda bulunmasıyla açıklanabilir.

2.8. İnsan Amnion Sıvısı

İnsan amniotik membranını oftalmolojide ilk olarak 1940 yılında Rotth ve arkadaşları tarafından konjonktival defektlerde kullanılmıştır [178]. Daha sonra persitan epitel defekti, nörotrofik keratitler, kimyasal yaralanmalar, rekürren korneal erozyonlar ve sikatriyel hastalıklar gibi geniş bir kullanım alanı olmuştur [179-184]. Kornea epitelinde re-epitelizasyon, inflamatuvar cevap ve skar oluşumu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir [185, 186]. Amniotik membranın korneal zedelenme sonrası içerdiği antiinflamatuvar ve antiangiogenik proteinlerle oküler hasarı azalttığı kanıtlanmıştır [10].

İnsan amnion sıvısı amnion membranı ile çevrili amnion kesesini doldurmaktadır. Amnion sıvısındaki proteinlerin ana kaynağı anne serumu olup proteinlerinin %5'ten azının kaynağı amnion membranıdır [187, 188]. Anne serumu amnion sıvısı içindeki birçok büyüme faktörü için kaynaktır. Albumin, IgG, α -1 antitripsin, transferrin, IGF bağlayıcı protein 1, D vitamini bağlayıcı protein, seruloplazmin amnion sıvısındaki başlıca proteinlerdir [189-192]. Amnion membranındaki birçok protein amnion sıvısında da bulunmaktadır [11].

Embriyogenetik gelişim sırasında fetüste yara iyileşmesinin düzenleyen amnion sıvısı fetal oküler yüzey ile temas halindedir. Bu durum amnion sıvısı ile tedavinin hastalar tarafından kolay tolere edilebilirliğini açıklayabilir [193].

Yapılan çalışmalarda farelerde alkali yanık sonrasında insan amnion sıvısının kullanımının korneal opasite ve skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [12]. Tavşanlarda PRK sonrası insan amnion sıvısı kullanıldığında daha hızlı korneal sinir rejenerasyonu ve korneal sensitivitenin daha hızlı geri kazanımı sağlanmıştır [13].

Standart bir amnion sıvısı damlası hazırlama yöntemi oluşturulmamıştır. Farklı çalışmalarda farklı teknikler kullanılmıştır. Bu yöntemlerden biri şu şekildedir: 16-21 haftalık gebelerden karyotip analizi için yapılan amniosentez sonrası analizden sonra alınan amnion sıvıları kullanılarak 10 dk 1800 g santrifüj edilmiş ve süpernatant -70 °C 'de

saklanmıştır [194]. Diğer bir yöntemde ise term doğum sonrası alınan amnion sıvısı örnekleri yine 10 dk 1800 g santrifüj edilmiş ve süpernatant -20 °C’de kullanım anına kadar bekletilip kullanım esnasında +4 °C de saklanmıştır [195]. Hazırlanan bu %100 amnion sıvıları genelde günde 4 kez uygulanmıştır.

2.9. Anne Sütü

Anne sütü, infantların gelişimini sağlayan ve immün sistem matüritesi tamamlanana kadar onları enfeksiyonlardan koruyan birçok antimikrobiyal ve immünmodulator komponent içeren kompleks biyolojik sıvıdır. İçeriği infantın yaşına ve diğer özelliklerine göre gerekli olan ihtiyacına göre değişir [196, 197].

EGF, A vitamini, laktoferrin, oligosakkaritler, omega 3 ve omega 6 yağ asitleri literatürde oküler yüzey çalışmalarında etkin bulunan anne sütü komponentlerdir [145, 198-201]. EGF, epitel hücrelerinin proliferasyonu ve goblet hücre sayısını arttırarak, apoptozisi azaltarak korneal yara iyileşmesinde etkilidir [198]. A vitamini eksikliği kornea epitelinde metaplaziye sebep olmaktadır [202, 203]. Gözyaşının anti-inflamatuar bir komponenti olan laktoferrinin eksikliği ise inflamasyonu arttırmaktadır [199, 204]. Omega 3 ise meibomian glandlar üzerine anti-inflamatuar etki göstererek gözyaşı buharlaşmasını engeller. Oligosakkaritler de gözyaşı film tabakasının stabilizasyonunun korunmasını sağlar [200]. Böylece oküler yüzeyde epitel hücrelerinin döngüsünü regüle eden ve yara iyileşmesinde etkin olan gözyaşı film tabakasının devamlılığı sağlanmış olur. NGF ve IGF de yine anne sütünde bulunan komponentlerdendir [205].

Anne sütü içeriğindeki lizozimler, Ig A, Ig G, sitokinler, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β ve β -defensin-2, laktoperoksidaz ile antienfektif etki gösterir [206-209].

Anne sütünde immün hücreler de bol miktarda bulunmaktadır. Kolostrumda daha çok olup, bunların çoğu nötrofildir. İkinci sıklıkta makrofajlar bulunmaktadır, kolostrumdaki lökositlerin %40’ını oluşturmaktadır. Lenfositler anne sütündeki lökositlerin %10’unu oluşturur, bunlarında %20’si antikör üreten B lenfositlerdir. Geri kalanı ise enfekte hücreleri direkt öldüren ya da immün sistemin diğer komponentlerinin göçünü sağlayan kimyasal uyarıları gönderen T lenfositlerdir [210].

Anne sütündeki bazı komponentler (örneğin kortizol ve bazı proteinler örneğin EGF, NGF, IGF ve somatomedin C) mukozal bir bariyer oluşturarak mikroorganizmaların invazyonunu engeller [205].

Anne sütündeki yağlarının %98’i trigliseritlerden oluşur. Palmitik ve oleik asitler trigliserit yapısında en fazla bulunan yağ asitleridir. Kolostrumda daha fazla olmak üzere

anne sütünün çoklu doymamış yağ asitlerden zengin olması beyin gelişimi, miyelinizasyon, retinal işlevler ve hücre proliferasyonunun normal olmasını sağlar [211].

Anne sütünde potasyum, sodyum ve kalsiyum serbest iyonlar olarak, diğer mineraller de kompleks bileşikler halinde bulunurlar. Anne sütünün demirin yoğunluğu düşük (0,2–0,8mg/lt) ancak biyoyararlanımı yüksektir. Anne sütünde çinko genellikle whey proteinlerine bağlıdır. Anne sütündeki selenyum miktarı inek sütünden daha fazladır. Selenyum, humoral ve hücresele bağışıklık sisteminde görevli olup toksik maddelerin yıkımını katalize eden glutatyon peroksidazın yapısına girer. Anne sütünde potasyum iyonları sodyum iyonlarından daha fazladır. Bu özelliği ile anne sütü intrasellüler sıvılarla uyumluluk gösterir [212].

Anne sütü, serum ve gözyaşına benzer bir şekilde kornea epitel hücre döngüsü ve yara iyileşmesinde etkinliği olan birçok komponent içerir. Buradan yola çıkılarak kliniğimizce farelerde epitel defekti oluşturularak yapılan çalışmada anne sütü ile iyileşmenin suni gözyaşına göre daha üstün olduğu gösterilmiştir [14].

2.10. Suni Gözyaşı

Topikal suni gözyaşları ve jelleri ile gözyaşı replasmanı kuru göz tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemidir. Gözyaşı tedavisi ile oküler yüzey nemlenmesi sağlanmakta, gözyaşı osmolalitesi azaltılmakta ve inflamatuvar ajanlar dilüe olmaktadır [213]. Suni gözyaşları damla, pomad ve jel formunda olabilir. Damlalar polivinil alkol, selüloz deriveleri (hypromellose), mukomimetikler veya Na-hyalüronat içerir.

Doğal gözyaşı komponentleri olan su, tuz, hidrokarbon, proteinler, lipitler, büyüme faktörleri suni gözyaşında bulunmaz. Suni gözyaşı, doğal gözyaşı film tabaka yapısı göstermez. Ayrıca suni gözyaşı ile sağlanan nemlilik kullanım sıklığı ile ilgili olup sürekli salınan doğal gözyaşı gibi nemliliğinin sürekliliğini sağlayamaz. Suni gözyaşı ile sağlanan nemliliğin süresini arttırmak için mukoadesiv özelliği olan, müsin tabakaya benzer olan maddeler eklenmeye başlanmıştır. Çoğu vizköz jel şeklinde olan bu preparatların ile oküler yüzeyde kalış süresinin artmasına rağmen iritasyon, kapaklarda yapışıklık ve ağırlık hissi, bulanık görme gibi yan etkiler nedeniyle kullanımları zordur [214]. Suni gözyaşlarında bakteriyel kontaminasyonu engellemek için kullanılan koruyucu maddeler (prezervan) bu ürünlerin kullanımını kısıtlayan en önemli faktördür. En sık kullanılan koruyuculardan olan benzalkonium klorid (BAK) konjonktiva ve kornea hücrelerinde hücre zarı lipit tabakasını emülsifiye ederek hücre zarını yıkar. Suni gözyaşını günden dörtten fazla kullanması gereken hastalara prezervansız tek dozluk preparatlar önerilmelidir.

Doğal gözyaşının pH'ı 7,4 olup suni gözyaşlarındaki bu alkali özellik bikarbonat iyonu ile sağlanır [214].

Kuru göz hastalarında gözyaşı hiperosmolardır [214]. Hipotonik damlaların tedavide daha etkili olduğu bildirilmiştir [215]. Oküler yüzey epitel sağlığı için kullanılan gözyaşlarının elektrolit içeriği önemlidir. Özellikle kornea kalınlığını korumak ve saydamlığını sağlamak için potasyum, hasarlı epitelin yenilenmesi ve müsin tabakanın devamlılığı için bikarbonat gereklidir. Lubrikanların elektrolit oranları gözyaşına benzer şekildedir [216].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. (Onay no: DA 17/13).

3.1. Topikal Damla Hazırlanışı

Anne sütü topikal damlası için 6 aylık term bebeğini emziren anneden alınan süt kullanılmıştır. Beş ml'lik damlalıklarda -18 C° de dondurularak maksimum 3 gün saklanmış ve günlük kullanımda +4 C° de korunmuştur.

İnsan serumu için gönüllü vericiden 20 ml periferik kan alınmıştır. Alınan kan oda sıcaklığında 2 saat bekletilip 15 dk 3000 g santrifüj edilmiş ve serum fizyolojik ile %20 dilüe edilerek 5 ml 'lik damlalıklara bölüştürülmüş ve -20 C° de maksimum 3 gün saklanmıştır. Kullanım sırasında +4 C° de korunmuştur.

Umbilikal kord serumu, 8. hafta ile 38. haftada serolojik testleri negatif olan 38. gestasyonel haftada sezaryen ile doğum yapan gebeden doğum anında bebeğin gelişinden sonra umbilikal venden alınan 20 ml kanla insan serumu hazırlama basamakları kullanılarak hazırlanmış olup -20 C° de maksimum 1 ay saklanmıştır. Kullanım sırasında +4 C° de korunmuştur.

Amnion sıvısı, 38 haftalık sezaryen doğum esnasında 2 hastadan alınmış olup 10 dk 1800 g de santrifüj edilip -20 C° de dondurulmuş ve kullanımdan önce +4 C° de çözülmüştür. Yine kullanım sırasında +4 C° de saklanmıştır.

Suni gözyaşı grubunda prezervansız Na-hyalüronat damla kullanılmıştır.

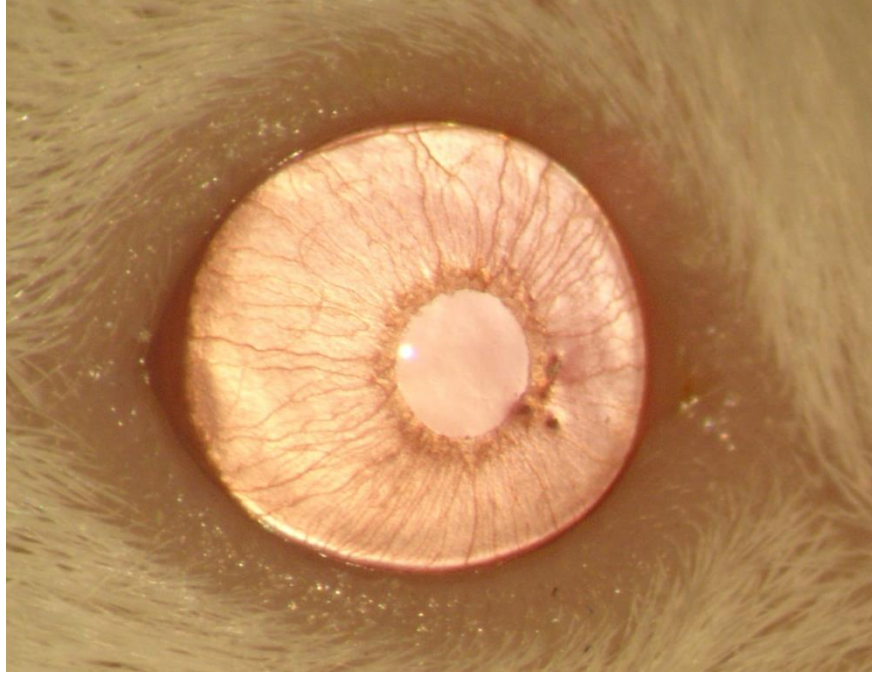
3.2. Hayvan Modeli

Çalışmada 36 adet, ağırlıkları 20–30 gr arasında değişen, erişkin dişi Balb/C fare kullanıldı. 40 mg/kg intraperitoneal Ketamin Hidroklorid + 4 mg/kg Xylazine ile sedasyona ek olarak % 0,5 propakain hidroklorid ile topikal anestezi yapıldı (Şekil 3.1). Kornea epiteli santralde tek kullanımlık 2mm çapında dermatolojik deri punch (Acu-Punch, Acuderm, Ft. Lauderdale, FL) ile işaretleme sonrası mikroskop altında 11 numara bistüri ile kazındı (Şekil 3.2, 3.7). Bütün bu işlemler aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

Epitel kazınması sonrası fareler rastgele seçilen 6 gruba ayrıldı;

1. Grup A (n=6) İnsan serumu damla günde 4 kez topikal
2. Grup B (n=6) Umblikal kord serum damla günde 4 kez topikal
3. Grup C (n=6) Amnion sıvısı günde 4 kez topikal
4. Grup D (n=6) Anne sütü damla günde 4 kez topikal
5. Grup E (n=6) Suni gözyaşı damla günde 4 kez topikal
6. Grup F (n=6) Kontrol

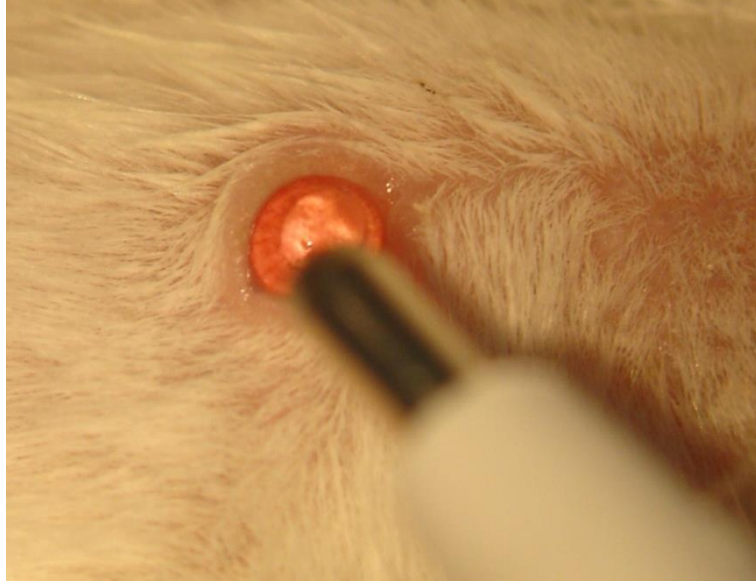
Epitel kazınmasından hemen sonra bütün gruplara aynı günde uygulamalara başlandı ve 3 gün süreyle devam edildi.



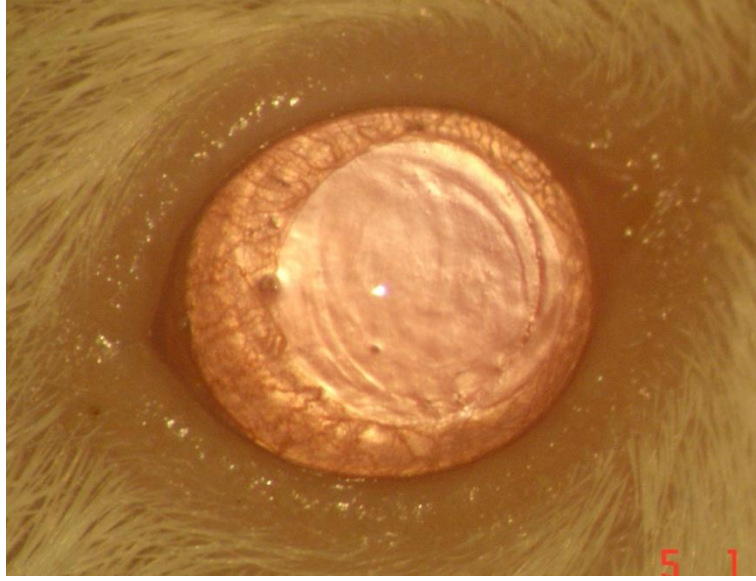
Şekil 3.1. İşlem öncesi normal fare gözünün görünümü



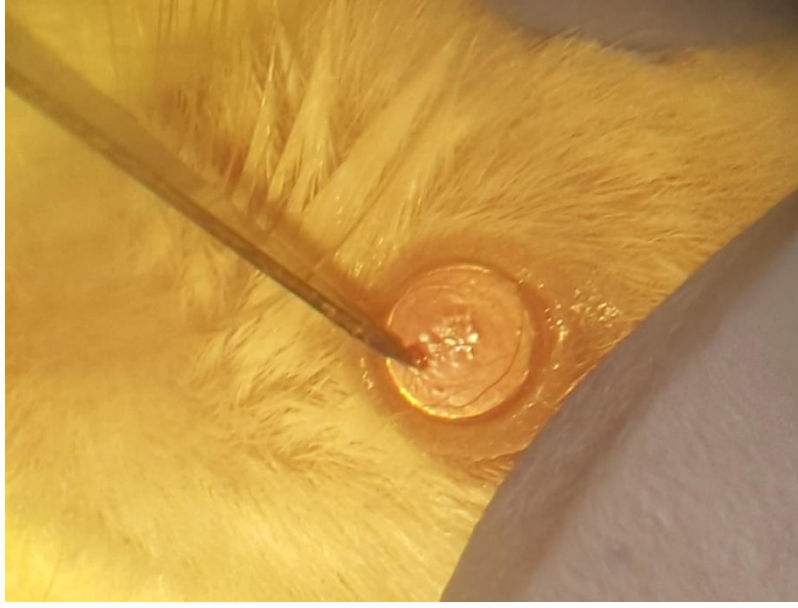
Şekil 3.2. Korneada 2 mm işaretleme için kullanılan punch



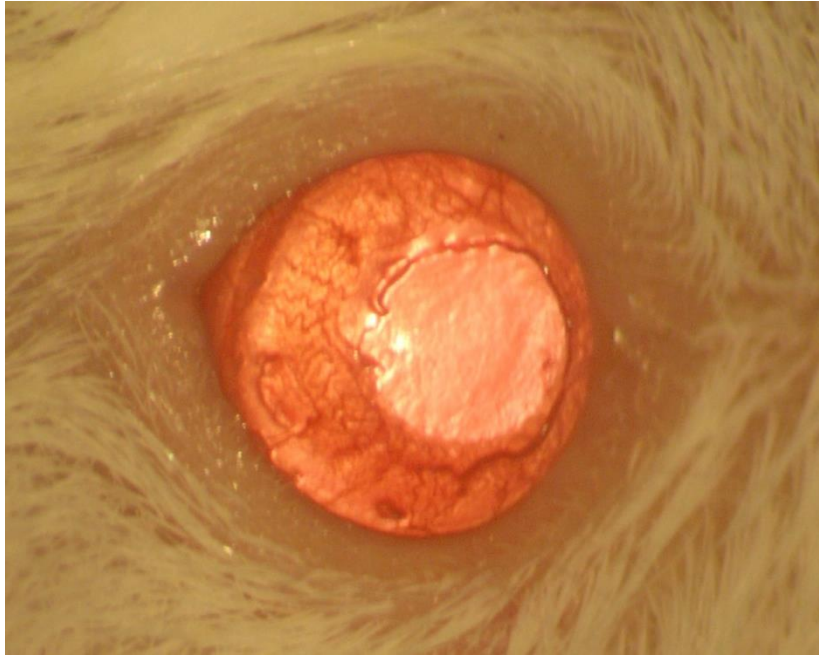
Şekil 3.3. 2mm'lik santral kornea kazıma alanının işaretlenme işlemi



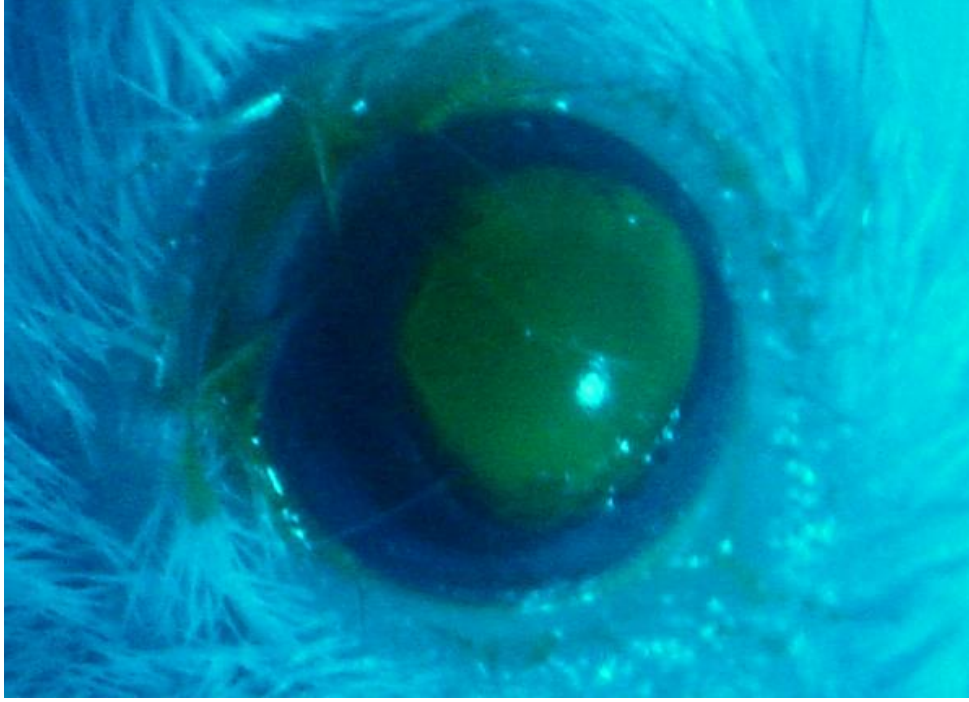
Şekil 3.4 Korneal işaretleme sonrası görünüm



Şekil 3.5. İşaretlenen santral kornea alanın 11 numara bistüri ile kazıma işlemi



Şekil 3.6. 2 mm çapında santral kornea epitel defekti alanı



Şekil 3.7. 2mm santral kornea epitel defektinin floresein boyama sonrası görünümü

3.3. Biyomikroskopik Değerlendirme

Bütün farelerin 12. saat, 1. 2. ve 3. gün biyomikroskopik muayenesi yapıldı. Epitel defekti boyutu her muayenede floresein boyama yapılarak değerlendirildi ve Sony 5.1 mega pixels dijital fotoğraf makinesi ile x16 büyütmede mikroskop altında fotograflandı. ImageJ programı ile alan hesabı yapılarak defekt kapanma yüzdesi hesaplandı.

3. gün muayene sonrası 50 mg/kg intramüsküler ketamin hidroklorid ile fareler sakrifiye edildi ve enükleasyon yapıldı.

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Herbir gruptaki 6 fare gözünün rastgele 3'ü patolojik değerlendirme kalan 3'ü ise histolojik değerlendirme için hazırlandı.

Patolojik inceleme için ayrılan grupta, enükleasyonun hemen ardından fiske edici sıvının tüm globa girebilmesi için 27 gauge iğne kullanılarak, limbustan 1 mm mesafeden globlar saat 3 ve 9 meridyenlerinden perfore edildi. Globlar %10 formaldehit içinde muhafaza edildi. Yirmi dört saat sonra formaldehitten çıkarılarak dehidrate edildi ve parafin içine gömülerek hematoksilin ve eozinle boyanmak üzere 3 mikronluk kesitler alındı. Standartizasyon amacıyla optik disk hizasından geçen santral kornea alanı değerlendirildi. Bu kesitlerden x10, x20 ve x40'lık büyütme altında fotoğraf çekildi.

Histolojik inceleme için enüklüe edilen globlar fosfat tamponlu % 2,5 gluteraldehit içinde 2-3 saat fikse edildi. Sonra fosfat tamponlu % 1 osmium tetroksit ile postfiksasyon ve dereceli alkol serisi (%25, %50, %75, %95, absolü alkol) ile dehidratasyon yapılmıştır. Propilen oksitten geçirildikten sonra, spesimenler Araldehit CY 212, DDSA (2-dodocenil süksinik anhidrit) BDMA (benzildimetil amin) ve dibütilpitalat içine gömülmüştür. 48 saat, 56°C inkübatörde polimerize edilmiştir. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir

3.5. İstatistiksel Analiz

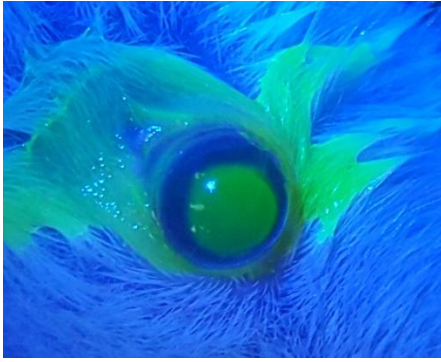
Araştırma verileri SPSS (20,00 Version) ile analiz edilmiştir. Örneklem büyüklüğü 6 olduğundan nonparametrik analizler kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Mann Whitney U analizi, üç ve üzerindeki karşılaştırmalarda Kruskal Wallis H analizi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

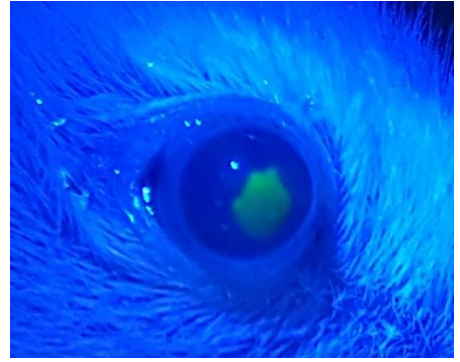
4.1. Biyomikroskopik Bulgular

Bütün farelerin santral 2 mm korneal epitel defekti floresein boya kullanılarak kontrol edildi ve tüm fareler çalışmaya alındı.

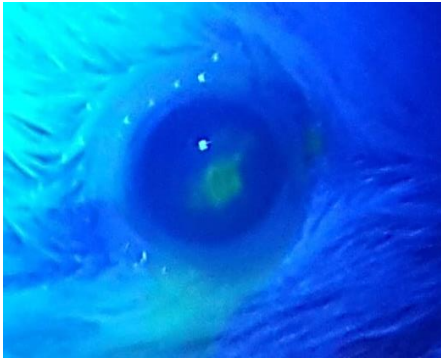
Onikinci, 24., 48. ve 72. saatteki muayeneler sırasında çekilen fotoğraflar üzerinden (Şekil 4.1-4.6) ImageJ programı kullanılarak belirtilen saatlerdeki defekt kapanma yüzdeleri hesaplandı.



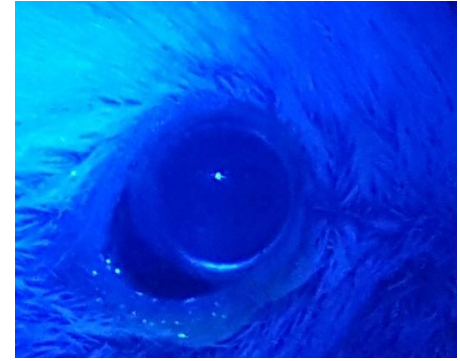
(A)



(B)



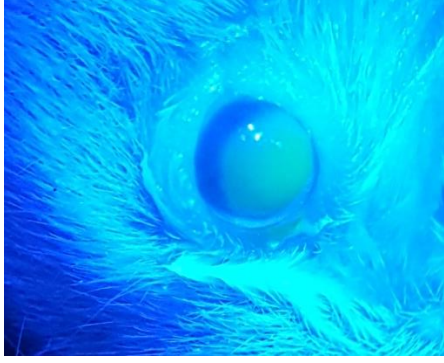
(C)



(D)

Şekil 4.1. İnsan serumu damlatılan (Grup A) biyomikroskopik muayene fotoğrafları

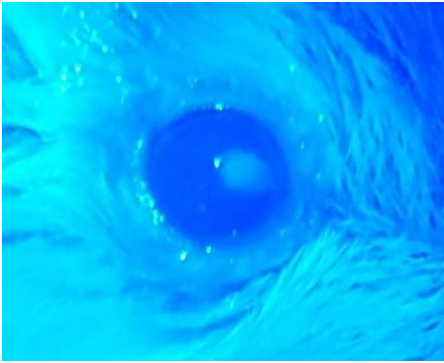
A. Grup A biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 12. Saat görülmektedir. **B.** Grup A, 1. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **C.** Grup A, 2. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **D.** Grup A, 3. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir.



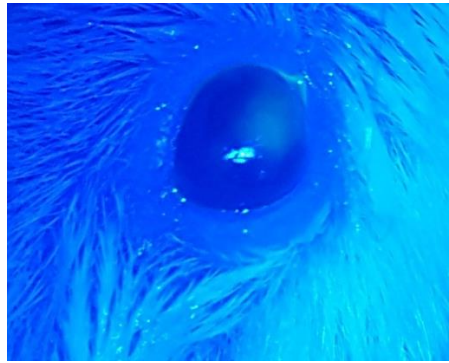
(A)



(B)



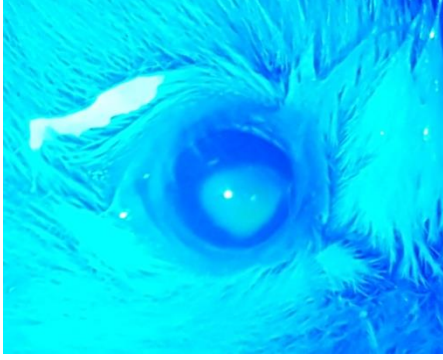
(C)



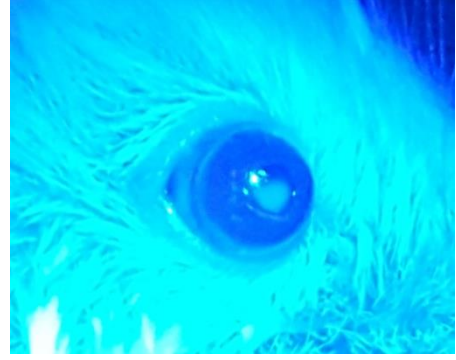
(D)

Şekil 4.2. Umbilikal kord serumu damlatılan (Grup B) biyomikroskopik muayene fotoğrafları

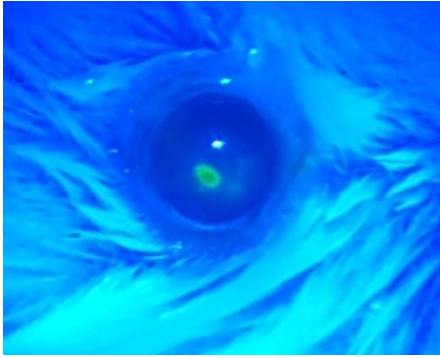
A. Grup B biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 12. saat görülmektedir. **B.** Grup B, 1. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **C.** Grup B, 2. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **D.** Grup B, 3. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir.



(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 4.3. Amnion sıvısı damlatılan (Grup C) biyomikroskopik muayene fotoğrafları

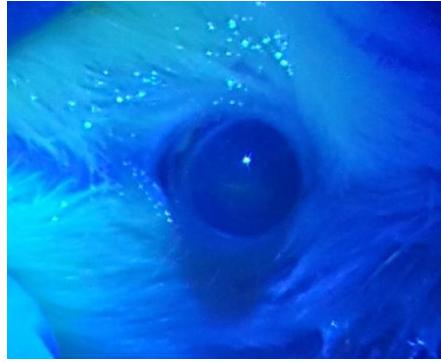
A. Grup C biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 12. saat görülmektedir. **B.** Grup C, 1. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **C.** Grup C, 2. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **D.** Grup C, 3. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir.



(A)



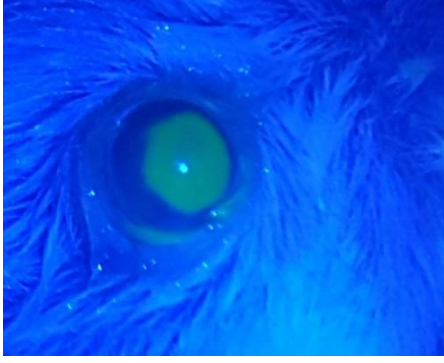
(B)



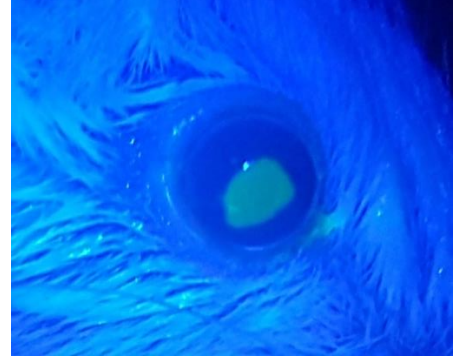
(C)

Şekil 4.4. Anne sütü damlatılan (Grup D) biyomikroskopik muayene fotoğrafları

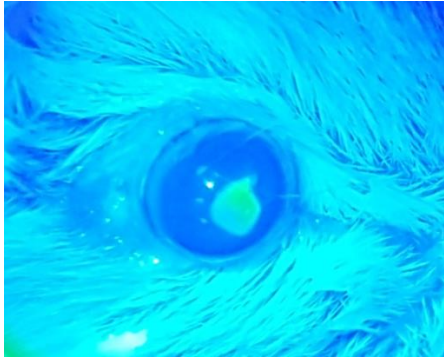
A. Grup D biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 12. saat görülmektedir. **B.** Grup D, 1. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **C.** Grup D, 2. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir.



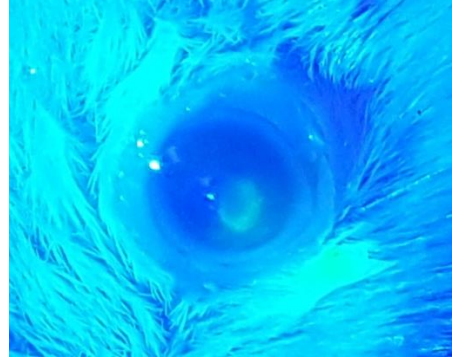
(A)



(B)



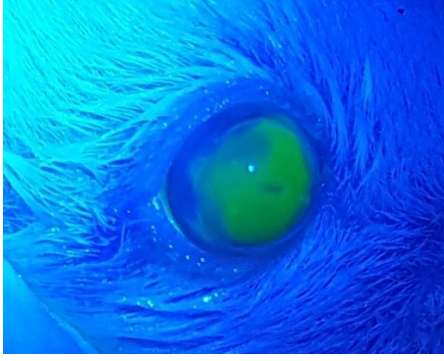
(C)



(D)

Şekil 4.5. Suni gözyaşı damlatılan (Grup E) biyomikroskopik muayene fotoğrafları

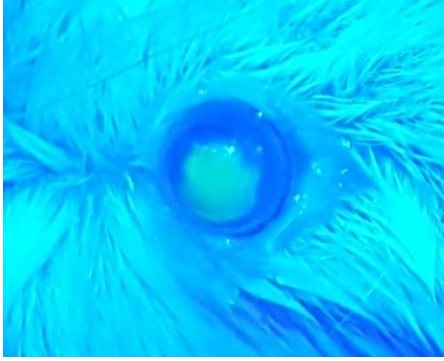
A. Grup E biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 12. saat görülmektedir. **B.** Grup E, 1. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **C.** Grup E, 2. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **D.** Grup E, 3. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir.



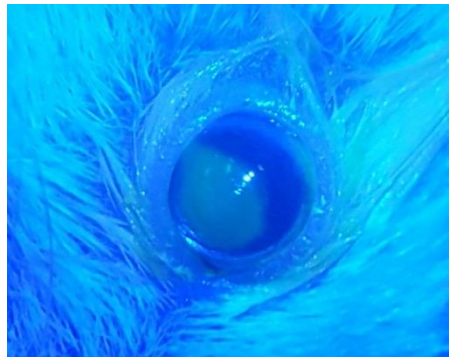
(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 4.6. Kontrol grubunun (Grup F), biyomikroskopik muayene fotoğrafları

A. Grup F biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 12. saat görülmektedir. **B.** Grup F, 1. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **C.** Grup F, 2. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir. **D.** Grup F, 3. gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları görülmektedir.

Gruplar arasında epitel kapanma yüzdeleri arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.1). Ancak örneklem sayısının küçük olması nedeniyle ayrıca ikili gruplar arasında Mann Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

Tablo 4.1. Gruplar arası epitel kapanma yüzdesi karşılaştırması

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| İnsan Serumu | 13,68±14,98 | 32,96±23,73 | 60,31±38,98 | 64,98±39,20 |
| Umbilikal Kord Serumu | 11,53±11,52 | 24,25±12,36 | 47,14±22,03 | 74,16±12,63 |
| Amnion Sıvısı | 22,57±11,99 | 46,47±32,56 | 55,59±36,68 | 68,27±37,98 |
| Anne Sütü | 11,74±2,15 | 36,59±22,41 | 68,79±21,75 | 84,55±18,23 |
| Suni Gözyaşı | 10,45±10,11 | 20,38±18,21 | 45,86±26,55 | 60,52±20,51 |
| Kontrol | 9,40±10,01 | 19,90±17,52 | 43,96±26,27 | 56,71±21,55 |
| Kruskal Wallis | 6,008 | 6,195 | 3,548 | 7,093 |
| P | 0,305 | 0,288 | 0,616 | 0,214 |

İnsan serumu ve umbilikal kord serumu kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Tablo 4.2) ($p>0,05$).

Tablo 4.2. İnsan serumu ile umbilikal kord Serumu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| İnsan Serumu | 13,68±14,98 | 32,96±23,73 | 60,31±38,98 | 64,98±39,20 |
| Umbilikal Kord Serumu | 11,53±11,52 | 24,25±12,36 | 47,14±22,03 | 74,16±12,63 |
| Mann Whitney U | 17,000 | 16,000 | 16,000 | 18,000 |
| P | 0,937 | 0,818 | 0,748 | 0,942 |

İnsan serumu ve amnion sıvısı kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İnsan serumu ile amnion sıvısı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| İnsan Serumu | 13,68±14,98 | 32,96±23,73 | 60,31±38,98 | 64,98±39,20 |
| Amnion Sıvısı | 22,57±11,99 | 46,47±32,56 | 55,59±36,68 | 68,27±37,98 |
| Mann Whitney U | 10,000 | 15,000 | 16,000 | 17,500 |
| P | 0,240 | 0,699 | 0,818 | 0,937 |

İnsan serumu ve anne sütü kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. İnsan serumu ile anne sütü arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| İnsan Serumu | 13,68±14,98 | 32,96±23,73 | 60,31±38,98 | 64,98±39,20 |
| Anne Sütü | 11,74±2,15 | 35,59±22,41 | 68,79±21,75 | 84,55±18,23 |
| Mann Whitney U | 16,000 | 15,000 | 15,000 | 13,500 |
| P | 0,818 | 0,728 | 0,629 | 0,442 |

İnsan serumu ve suni gözyaşı kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. İnsan serumu ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| İnsan Serumu | 13,68±14,98 | 32,96±23,73 | 60,31±38,98 | 64,98±39,20 |
| Suni Göz Yaşı | 10,45±10,11 | 20,38±18,21 | 45,86±26,55 | 60,52±20,51 |
| Mann Whitney U | 17,000 | 9,000 | 13,000 | 16,000 |
| P | 0,937 | 0,180 | 0,485 | 0,867 |

İnsan serumu kullanılan grup ve kontrol arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. İnsan serumu ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| İnsan Serumu | 13,68±14,98 | 32,96±23,73 | 60,31±38,98 | 64,98±39,20 |
| Kontrol | 9,40±10,01 | 19,90±17,52 | 43,96±26,27 | 56,71±21,55 |
| Mann Whitney U | 16,000 | 11,000 | 13,000 | 16,000 |
| P | 0,831 | 0,310 | 0,423 | 0,747 |

Umbilikal kord serumu ve amnion sıvısı kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Umbilikal kord ile amnion sıvısı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Umbilikal Kord Serum | 11,53±11,52 | 24,25±12,36 | 47,14±22,03 | 74,16±12,63 |
| Amnion Sıvısı | 22,57±11,99 | 46,47±32,56 | 55,59±36,68 | 68,27±37,98 |
| Mann Whitney U | 9,000 | 13,000 | 16,000 | 16,000 |
| p | 0,180 | 0,485 | 0,818 | 0,818 |

Umbilikal kord serumu ve anne sütü kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Umbilikal kord ile anne sütü arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Umbilikal Kord Serum | 11,53±11,52 | 24,25±12,36 | 47,14±22,03 | 74,16±12,63 |
| Anne Sütü | 11,74±2,15 | 35,59±22,41 | 68,79±21,75 | 84,55±18,23 |
| Mann Whitney U | 10,000 | 12,000 | 8,000 | 10,000 |
| p | 0,240 | 0,337 | 0,109 | 0,240 |

Umbilikal kord serumu ve suni gözyaşı kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Umblikal Kord ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Umblikal Kord Serum | 11,53±11,52 | 24,25±12,36 | 47,14±22,03 | 74,16±12,63 |
| Suni Göz Yaşı | 10,45±10,11 | 20,38±18,21 | 45,86±26,55 | 60,52±20,51 |
| Mann Whitney U | 17,000 | 13,000 | 17,000 | 11,000 |
| P | 0,937 | 0,485 | 0,937 | 0,310 |

Umblikal kord serumu kullanılan grup ve kontrol arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Umblikal Kord ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Umblikal Kord Serum | 11,53±11,52 | 24,25±12,36 | 47,14±22,03 | 74,16±12,63 |
| Kontrol | 9,40±10,01 | 19,90±17,52 | 43,96±26,27 | 56,71±21,55 |
| Mann Whitney U | 15,000 | 13,000 | 17,000 | 7,000 |
| P | 0,631 | 0,485 | 0,873 | 0,086 |

Amnion sıvısı ve anne sütü kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Amnion sıvısı ile anne sütü arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Amnion Sıvısı | 22,57±11,99 | 46,47±32,56 | 55,59±36,68 | 68,27±37,98 |
| Anne Sütü | 11,74±2,15 | 35,59±22,41 | 68,79±21,75 | 84,55±18,23 |
| Mann Whitney U | 9,000 | 17,000 | 14,000 | 14,500 |
| P | 0,180 | 0,937 | 0,589 | 0,598 |

Amnion sıvısı ve suni gözyaşı kullanılan gruplar arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Amnion sıvısı ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Amnion Sıvısı | 22,57±11,99 | 46,47±32,56 | 55,59±36,68 | 68,27±37,98 |
| Sunni Göz Yaşı | 10,45±10,11 | 20,38±18,21 | 45,86±26,55 | 60,52±20,51 |
| Mann Whitney U | 7,000 | 10,000 | 15,000 | 14,000 |
| p | 0,177 | 0,240 | 0,699 | 0,589 |

Amnion sıvısı kullanılan grup ve kontrol arasında epitel kapanma yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Amnion sıvısı ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Amnion Sıvısı | 22,57±11,99 | 46,47±32,56 | 55,59±36,68 | 68,27±37,98 |
| Kontrol | 9,40±10,01 | 19,90±17,52 | 43,96±26,27 | 56,71±21,55 |
| Mann Whitney U | 6,500 | 7,000 | 14,000 | 13,000 |
| P | 0,065 | 0,093 | 0,589 | 0,485 |

Anne sütü ve suni gözyaşı kullanılan gruplar arasında 12. ve 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). Ancak 24. ve 72. saatte iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p\leq 0,050$) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Anne sütü ile suni gözyaşı arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Anne Sütü | 11,74±2,15 | 35,59±22,41 | 68,79±21,75 | 84,55±18,23 |
| Sunni Göz Yaşı | 10,45±10,11 | 20,38±18,21 | 45,86±26,55 | 60,52±20,51 |
| Mann Whitney U | 8,000 | 6,000 | 10,000 | 6,00 |
| P | 0,132 | 0,05 | 0,240 | 0,05 |

Anne sütü kullanılan grup ve kontrol arasında 48. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). Ancak 12.; 24. ve 72. saatte iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,050$) (Tablo 4. 15).

Tablo 4.15. Anne sütü ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Anne Sütü | 11,74±2,15 | 35,59±22,41 | 68,79±21,75 | 84,55±18,23 |
| Kontrol | 9,40±10,01 | 19,90±17,52 | 43,96±26,27 | 56,71±21,55 |
| Mann Whitney U | 6,000 | 6,000 | 8,000 | 3,000 |
| P | 0,05 | 0,05 | 0,109 | 0,015 |

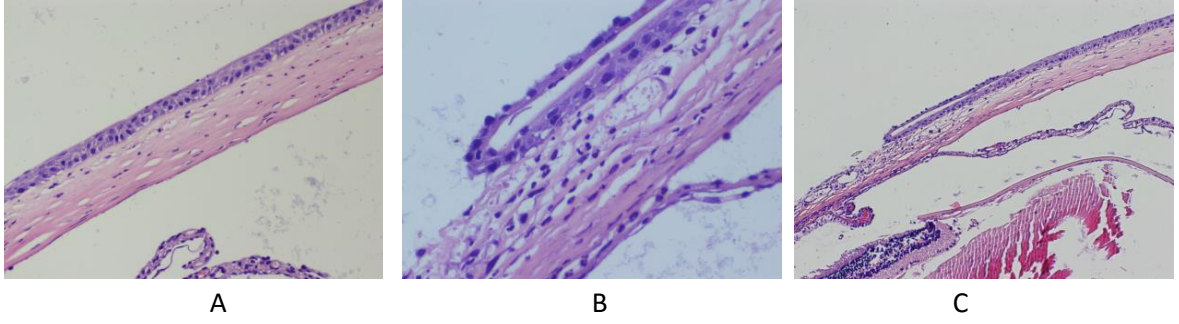
Suni gözyaşı kullanılan grup ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Suni gözyaşı ile kontrol grubu arasında epitel kapanma yüzdesi ikili karşılaştırma

| | 12.saat Ort±SS | 24.saat Ort±SS | 48.saat Ort±SS | 72.saat Ort±SS |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Kontrol | 9,40±10,01 | 19,90±17,52 | 43,96±26,27 | 56,71±21,55 |
| Suni Göz Yaşı | 10,45±10,11 | 20,38±18,21 | 45,86±26,55 | 60,52±20,51 |
| Mann Whitney U | 15,000 | 16,000 | 17,000 | 14,000 |
| P | 0,699 | 0,818 | 0,937 | 0,589 |

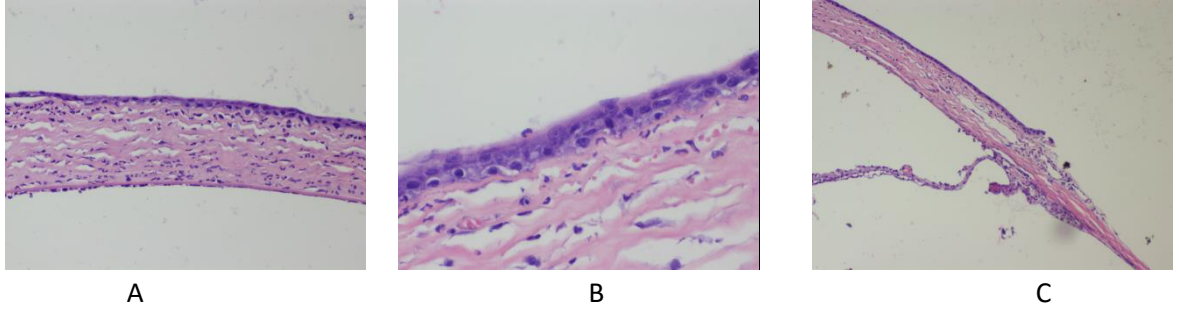
4.2. Patolojik Bulgular

Tüm preparatlar gruplar bilinmeden aynı patolog tarafından hemotoksilen eozin boyama ile incelendi (Şekil 4.7- 4.12). Bütün gruptaki farelerden elde edilen histopatolojik inceleme sonucu limbal infiltrasyon, stromal lökosit infiltrasyonu, bazal hücre dizilimi, yüzeyel hücre dizilimini göre sınıflandırılarak gösterilmiştir (Tablo 4.17). Limbal inflamasyon ve stromal lökosit infiltrasyonu için skora 0= yok, 1=orta şiddette, 2=yoğun, bazal hücre dizilimi ve yüzeyel hücre dizilimi için skora 0=düzenli, 1=orta, 2=kötü olarak yapıldı.



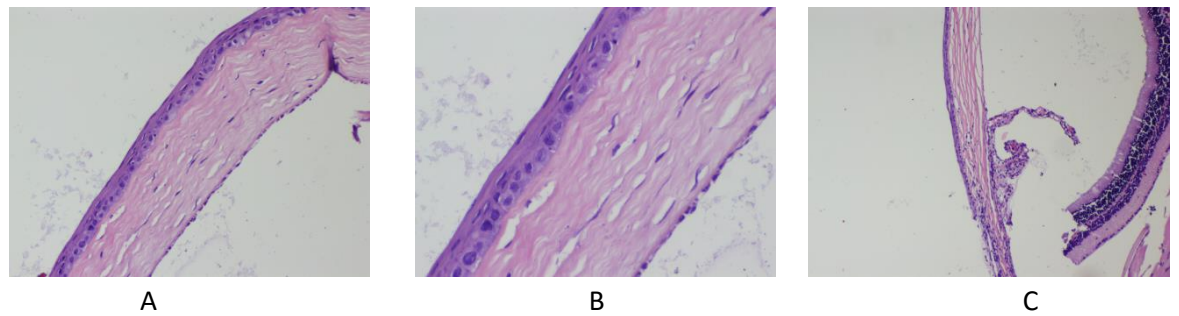
Şekil 4.7. İnsan serumu damlatılan grup patolojik kesitler

A.Grup A hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x20 büyütme görülmektedir. **B.** Grup A hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x40 büyütme görülmektedir **C.** Grup A limbal infiltrasyonu hemotoksilen eozin boyanması x10 büyütme görülmektedir.



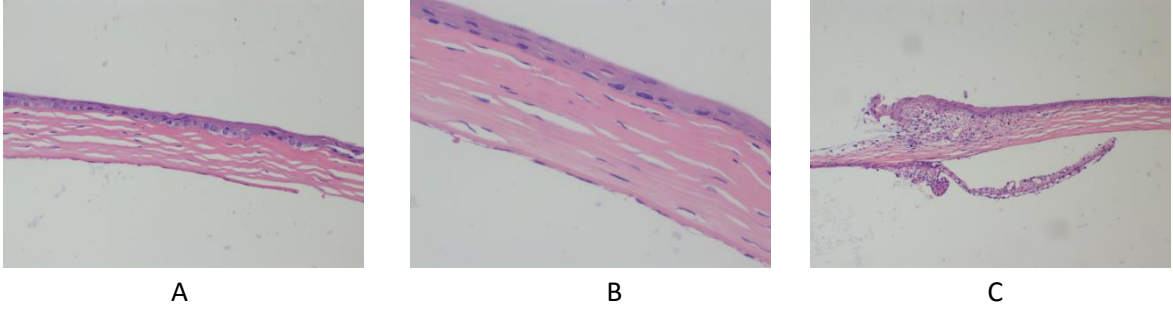
Şekil 4.8. Umbilikal kord serumu damlatılan grup patolojik kesitler

A.Grup B hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x20 büyütme görülmektedir. **B.** Grup B hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x40 büyütme görülmektedir **C.** Grup B limbal infiltrasyonu hemotoksilen eozin boyanması x10 büyütme görülmektedir.



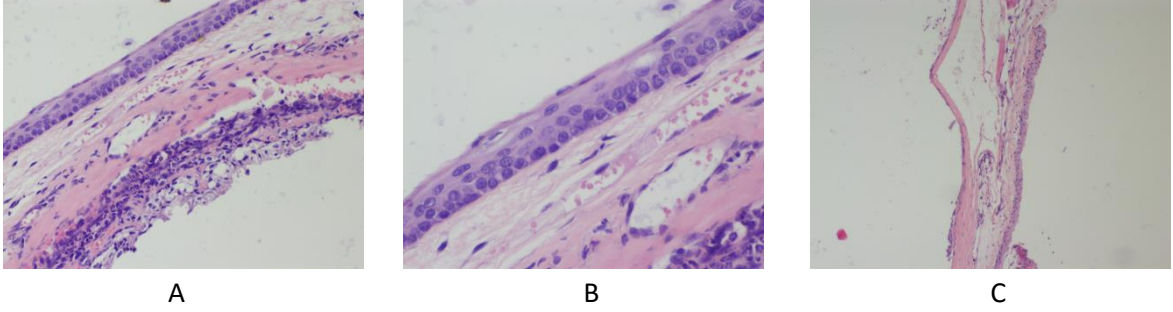
Şekil 4.9. Amnion sıvısı damlatılan grup patolojik kesitler

A.Grup C hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x20 büyütme görülmektedir. **B.** Grup C hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x40 büyütme görülmektedir **C.** Grup C limbal infiltrasyonu hemotoksilen eozin boyanması x10 büyütme görülmektedir.



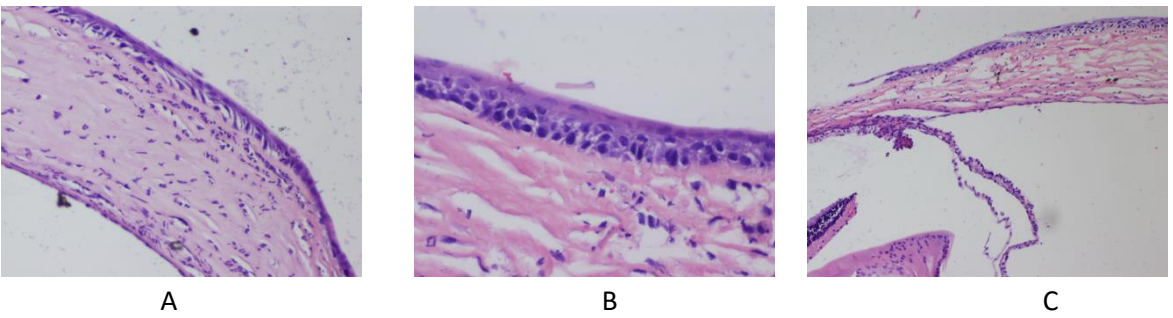
Şekil 4.10. Anne sütü damlatılan grup patolojik kesitler

A.Grup D hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x20 büyütme görülmektedir. **B.** Grup D hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x40 büyütme görülmektedir **C.** Grup D limbal infiltrasyonu hemotoksilen eozin boyanması x10 büyütme görülmektedir.



Şekil 4.11. Suni gözyaşı damlatılan grup patolojik kesitler

A.Grup E hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x20 büyütme görülmektedir. **B.** Grup E hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x40 büyütme görülmektedir **C.** Grup E limbal infiltrasyonu hemotoksilen eozin boyanması x10 büyütme görülmektedir.



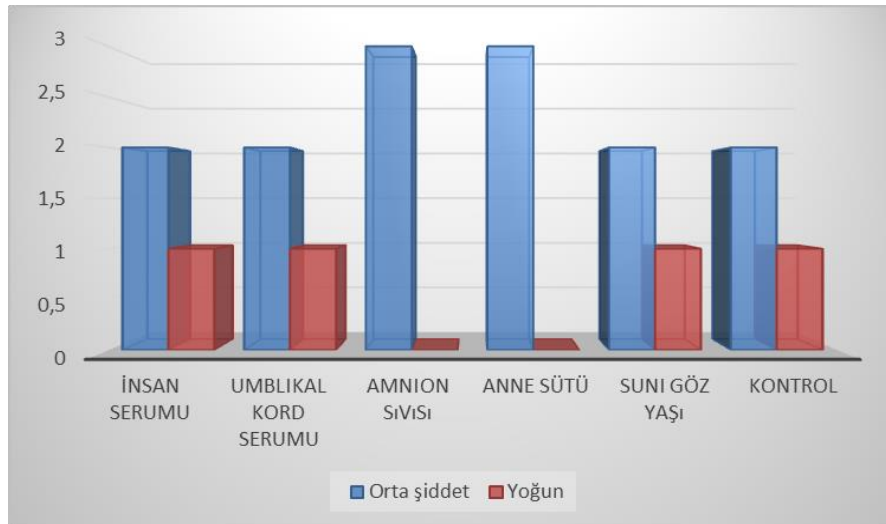
Şekil 4.12. Kontrol grubu patolojik kesitler

A.Grup F hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x20 büyütme görülmektedir. **B.** Grup F hemotoksilen eozin boyanma patolojik kesitleri x40 büyütme görülmektedir **C.** Grup F limbal infiltrasyonu hemotoksilen eozin boyanması x10 büyütme görülmektedir.

Tablo 4.17. Patolojik skorlar

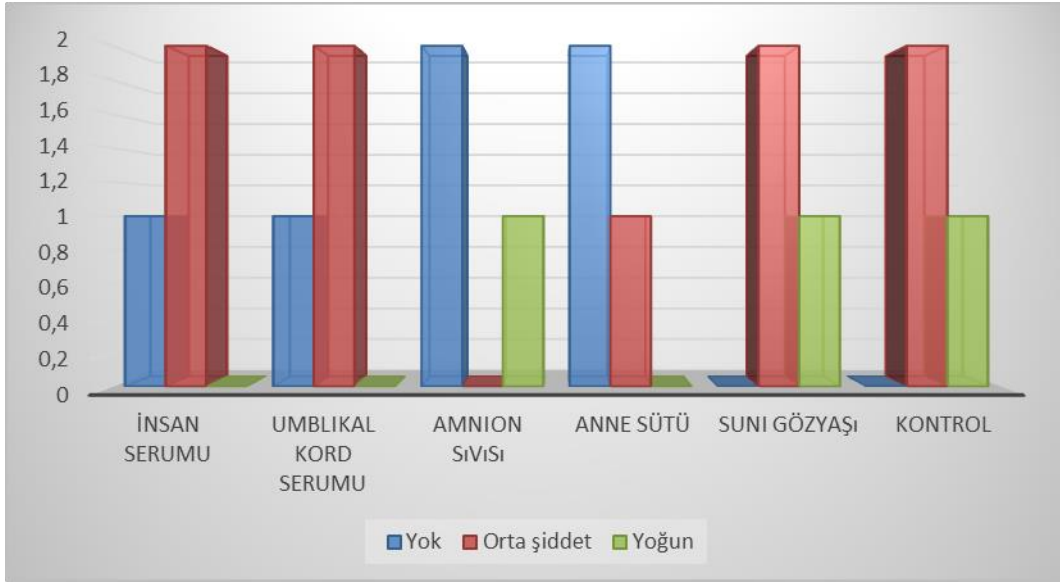
| | Limbal inflamasyon | Stromal infiltrat | Bazal hücre dizilimi | Yüzeyel hücre dizilimi |
|----|--------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| A1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| A3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| A5 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| B1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| B3 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| B5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| C1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| C3 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| C5 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| D1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| D3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| D5 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| E1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| E3 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| E5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| F3 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| F5 | 2 | 2 | 1 | 2 |

Limbal inflamasyonda gruplardaki farelerin elde ettiği skorlar arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir (x^2 : 2,429; $p>0,05$). Örneklem küçük olması nedeniyle her grubun ikili karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile analiz edilmiş ve ikili karşılaştırmalarda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.13).



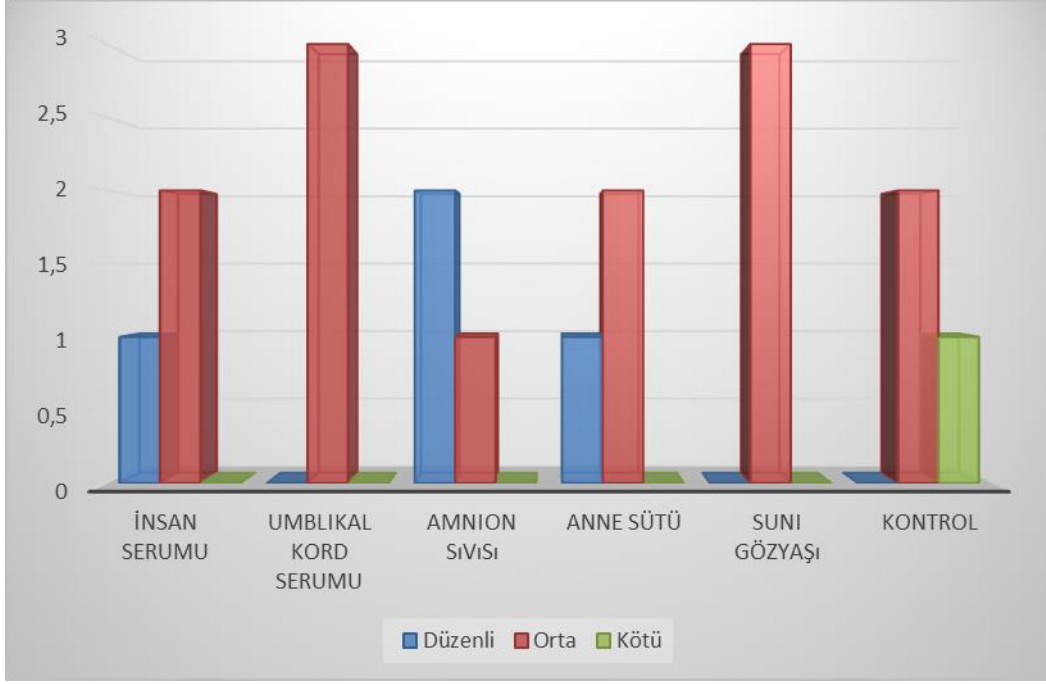
Şekil 4.13. Limbal inflamasyon skorlarına göre grupların karşılaştırılması

Stromal lökosit infiltrasyonu açısından gruplar arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir (χ^2 : 5,163; $p>0,05$). Örneklem küçük olması nedeniyle her grubun ikili karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile analiz edilmiş ve ikili karşılaştırmalarda anne sütü ile suni gözyaşı ve anne sütü ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir (U: 1,000; $p\leq 0,05$). Diğer ikili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.14).



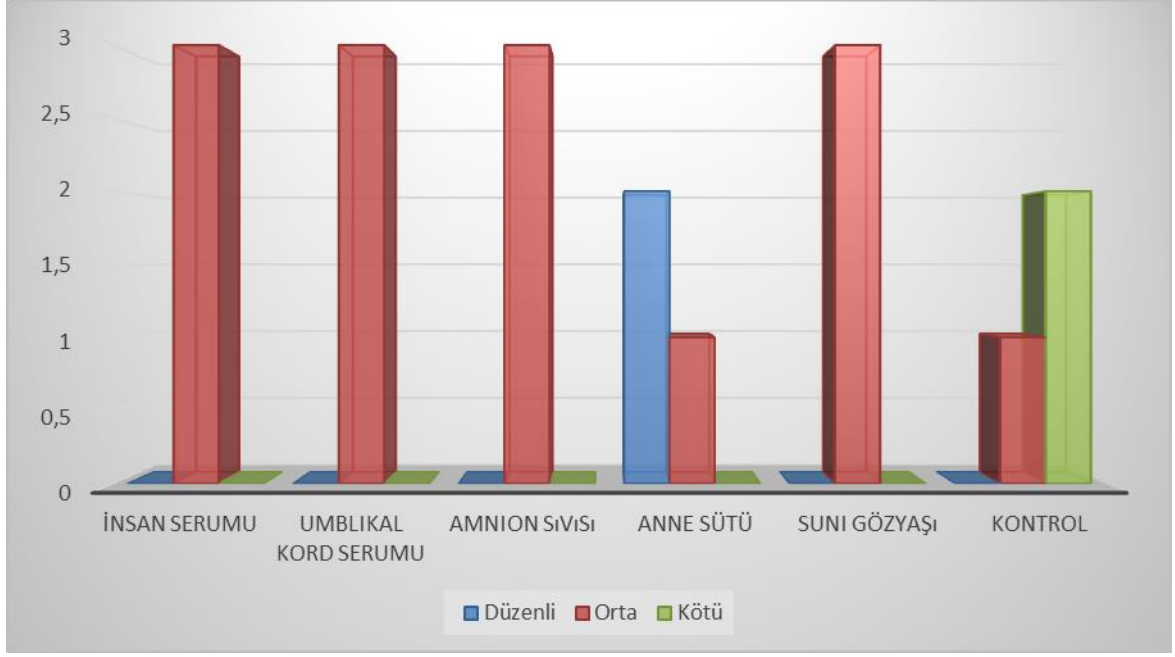
Şekil 4.14. Stromal lökosit infiltrasyonu skorlarına göre grupların karşılaştırılması

Bazal hücre dizilimi açısından gruplar arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir (χ^2 : 6,876; $p>0,05$). Örneklem küçük olması nedeniyle her grubun ikili karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile analiz edilmiş ve ikili karşılaştırmalarda sadece amnio sıvısı ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark olduğu (U: 1,000; $p\leq 0,05$), diğer ikili gruplarda ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Bazal hücre dizilimine göre grupların karşılaştırılması

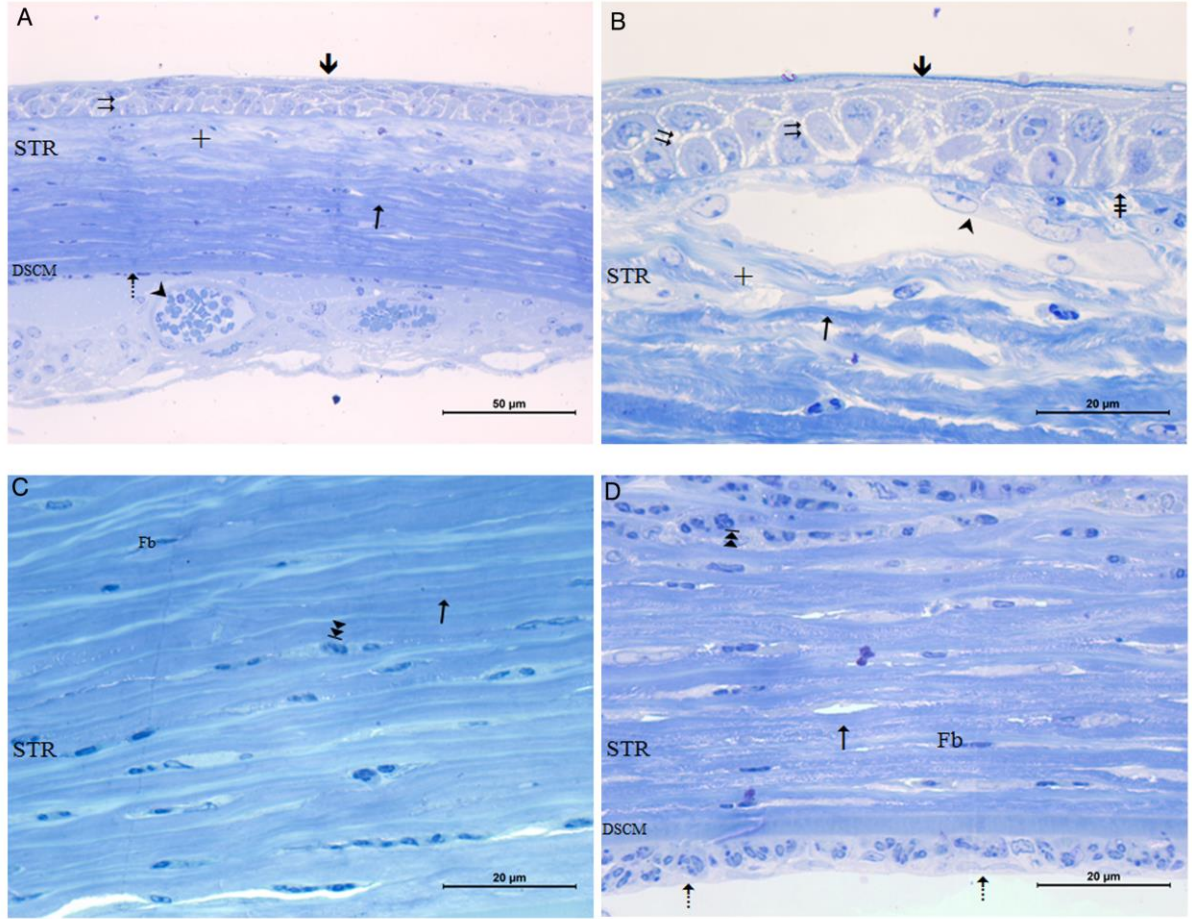
Yüzey dizilimi açısından gruplar arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (χ^2 : 11,333; $p < 0,05$). Örneklemin küçük olması nedeniyle her grubun ikili karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile analiz edilmiş ve ikili karşılaştırmalarda sadece anne sütü ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark olduğu (U : 0,500; $p \leq 0,031$), diğer ikili gruplarda ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Yüzeysel hücre dizilimine göre grupların karşılaştırılması

4.3. Histolojik Bulgular

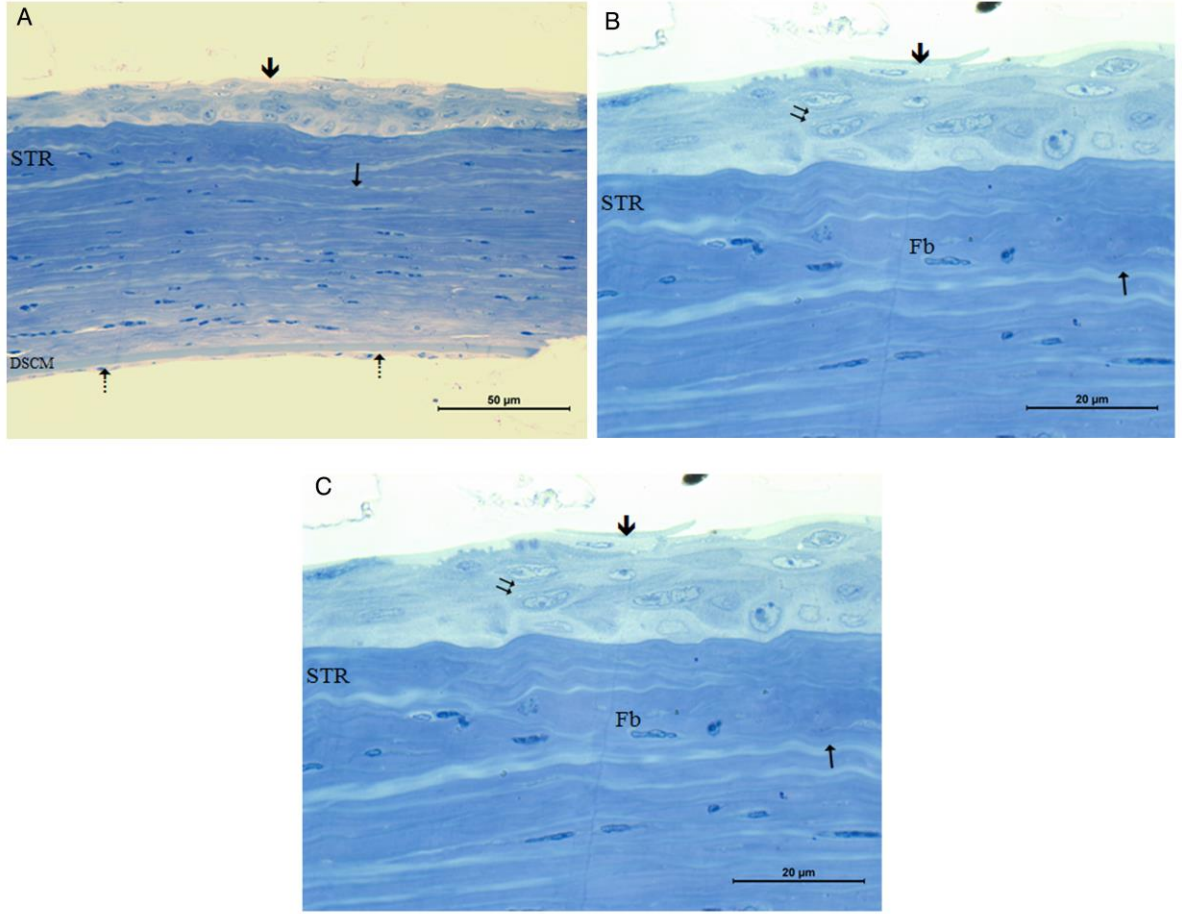
Kornea hasarı sonrasında hiçbir işlem uygulanmayan grupta ışık mikroskop kesitinde küçük büyültmede yüzey epitel hücreleri arasında sıvı birikimi sonucu açılmalar ve bazı alanlarda epitel hücre katmanlarının döküldüğü izlendi. Bowman zarının normal yapısını koruyamadığı ve kesintiye uğradığı alanlar ayırt edildi. Stromanın hem subepiteliyal hem de subendoteliyal alanda granülasyon dokusuna benzer şekilde hücreden ve damardan zengin olduğu ve ödemli görünüm sergilediği ayırt edildi. Stromanın dokunun genelinde geniş lümenli damarlar içerdiği görüldü. Kornea epitelinin korunduğu alanlarda stroma da kollajen lifler ve fibroblastların arasında nötrofil infiltrasyonu izlendi. Diğer gruplardan farklı olarak kornea endotelinin hemen altında endotel çekirdeği ve lümeni belirgin kapillerler görüldü. Kornea endotelinde nötrofil adezyonu ayırt edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Kontrol grubu ışık mikroskopi kesitleri

A.Kontrol grubu Toluidin Mavisi X400; ➔: Çok katlı yassı epitel, ⇌: Hücreler arası boşluk, STR: Stroma,+ : Ödem, →: Kollagen lif demeti, DSCM: Descemet membran, ⇨: Kornea endotelini, ➤: kapiller görülmektedir. **B.** Kontrol grubu Toluidin Mavisi X1000; ➔: Çok katlı yassı epitel, ⇌: Hücreler arası boşluk, ‡: Bowman membranında silinme, STR: Stroma,+ : Ödem, →: Kollagen lif demeti, ➤: kapiller görülmektedir. **C.** Kontrol grubu Toluidin MavisiX1000; STR: Stroma, Fb: Fibroblast, →: Kollagen lif demeti, ⚡: Nötrofil görülmektedir. **D.** Kontrol grubu Toluidin MavisiX1000; STR: Stroma, →: Kollagen lif demeti, ⚡: Nötrofil, DSCM: Descemet membran, ⇨ ; Kornea endotelinde nötrofil adezyonu

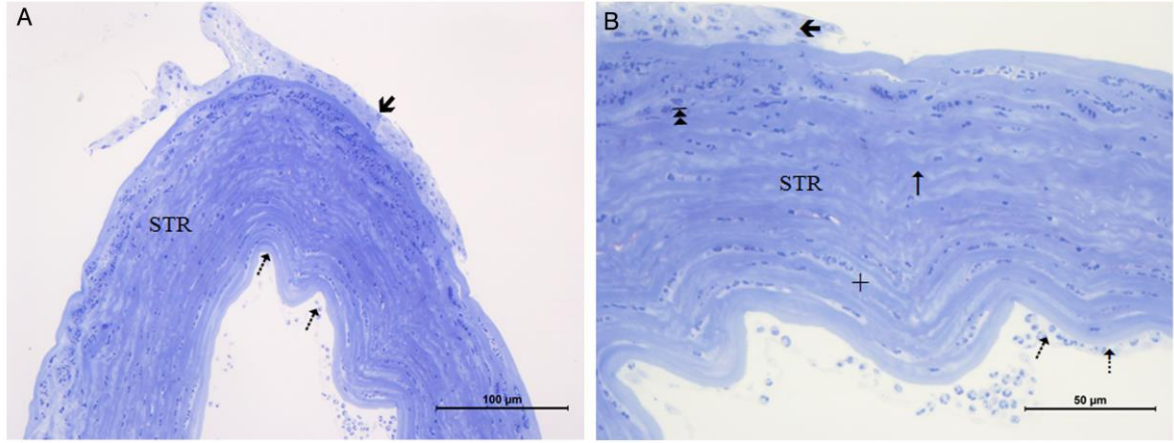
Deneysel olarak oluşturulan kornea hasarı sonrasında suni gözyaşı uygulanan grupta korneanın tabakalarının kontrol grubuna göre korunmuş olduğu saptandı. Yüzey epitel hücrelerinin kontrol grubuna göre daha iyi bir yapısal dizilim gösterdiği ve hücreler arası boşluğun daha az olduğu izlendi. Stromada kollagen lifler yer yer ondulasyon gösterse de doku genelinde düzenli yerleşim gösterdikleri ve aralarında yassı çekirdekleri ile fibroblastların varlığı görüldü. Descemet membran homojen görümlü olarak ayırt edildi. Bu grupta kornea endotelinde bazı bölgelerde nötrofil adezyonu izlendi (şekil 4.18).



Şekil 4.18. Suni gözyaşı damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri

A. Suni gözyaşı damlatılan grup Toluidin MavisiX400; ➔: Çok katlı yassı epitel, STR: Stroma, →: Kollagen lif demeti, DSCM: Descement membran, ⇨: Kornea endoteli görülmektedir. **B.** Suni gözyaşı damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; ➔: Çok katlı yassı epitel, STR: Stroma, Fb: Fibroblast, →: Kollagen lif demeti görülmektedir. **C.** Suni gözyaşı damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; STR: Stroma, Fb: Fibroblast, →: Kollagen lif demeti, DSCM: Descement membran, ⇨; Kornea endotelinde nötrofil adezyonu görülmektedir.

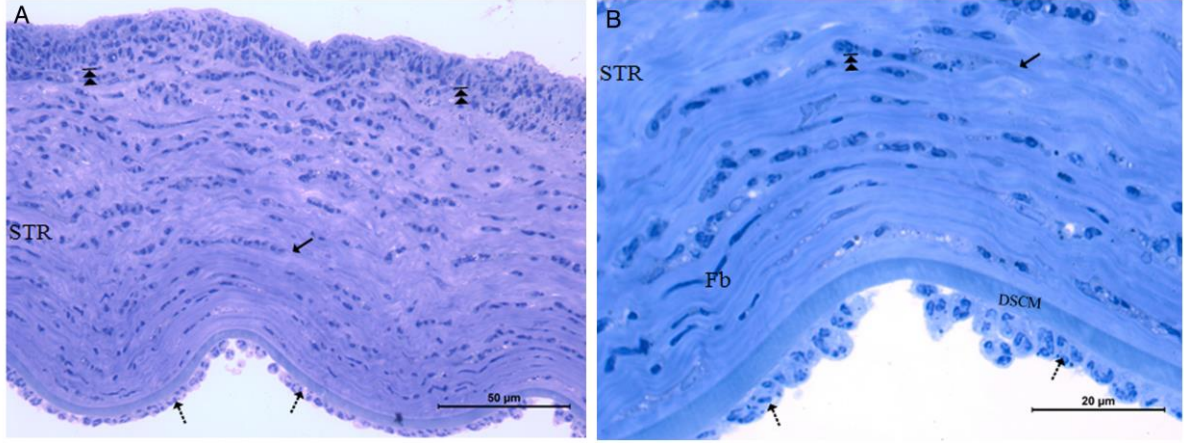
Kornea hasarı sonrasında insan serumunun tedavi edici etkisinin değerlendirildiği deney grubunda kornea yüzey epiteli hasarı oldukça belirgindi. Yüzey epiteli hasarının izlendiği bölgelerde stromada nötrofil infiltrasyonu ayırt edildi. Stromada ondulalı düzenlenim gösteren kollagen lifler arasında birlikte yüzey epiteline yakın alanda ve kornea endotelinde diğer gruplarda olduğu gibi nötrofil adezyonu görüldü (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. İnsan serumu damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri

A. İnsan serumu damlatılan grup Toluidin MavisiX400; ➔: Çok katlı yassı epitel, STR: Stroma, →: Kollagen lif demeti, ⇝ ; Kornea endoteli görülmektedir. **B.** İnsan serumu damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; ➔: Çok katlı yassı epitel, +: ödem, STR: Stroma, ⇨; Nötrofil infiltrasyonu, ⇝ ; Kornea endotelinde nötrofil adezyonu görülmektedir.

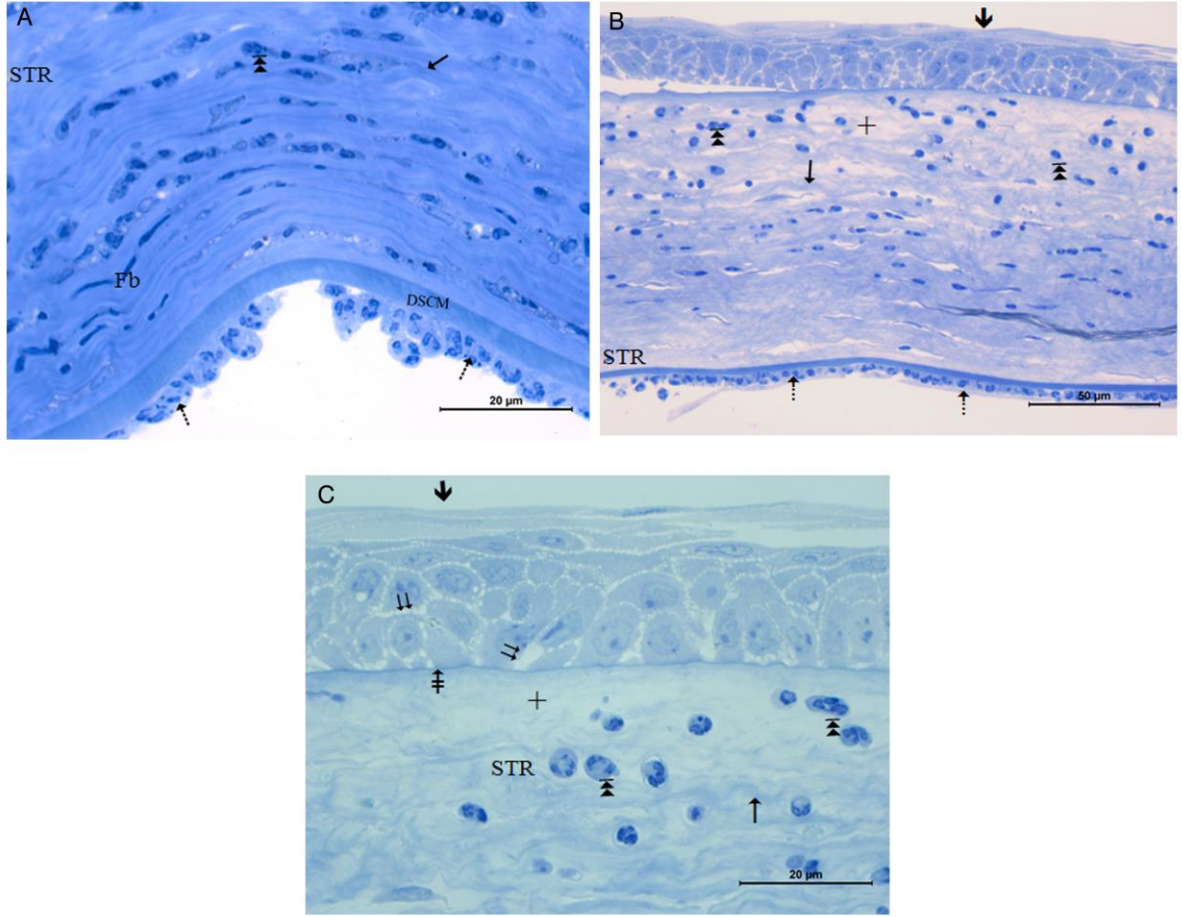
Umbilikal kord serumu uygulamasının kornea hasarı üzerindeki etkinliğinin denendiği grupta yüzey epitelin bazı alanlarda döküldüğü ve bu bölgelerde stromada nötrofil infiltrasyonu olduğu görüldü. Kornea endotel hücre çekirdeği ayırt edilemezken bunun yerine endotel sitoplazmasına tutunan nötrofil hücreleri izlendi. Büyük büyültmede yer yer çok katlı yassı epitelin korunduğu ancak yüzeye yakın hücreler arasındaki açıklığın belirgin olduğu görüldü. Bu bölgede Bowman zarının normal yapısını koruduğu izlendi. Kollagen lifler arasına dağılmış nötrofiller belirgindi. Descement membranın diğer gruplarda olduğu gibi homojen görünümünü koruduğu izlendi. Bu grupta da nötrofillerin kornea endoteline adezyon gösterdiği görüldü (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Umblikal kord serumu damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri

A. Umblikal kord serumu damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; STR: Stroma, **▶▶**; Nötrofil infiltrasyonu, **→**: Kollagen lif demeti, **↔**; Kornea endotelinde nötrofil adezyonu görülmektedir. **B.** Umblikal kord serumu damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; STR: Stroma, Fb: Fibroblast, **▶▶**: Nötrofil, **→**: Kollagen lif demeti, DSCM: Descemet membran, **↔**; Kornea endotelinde nötrofil adezyonu görülmektedir.

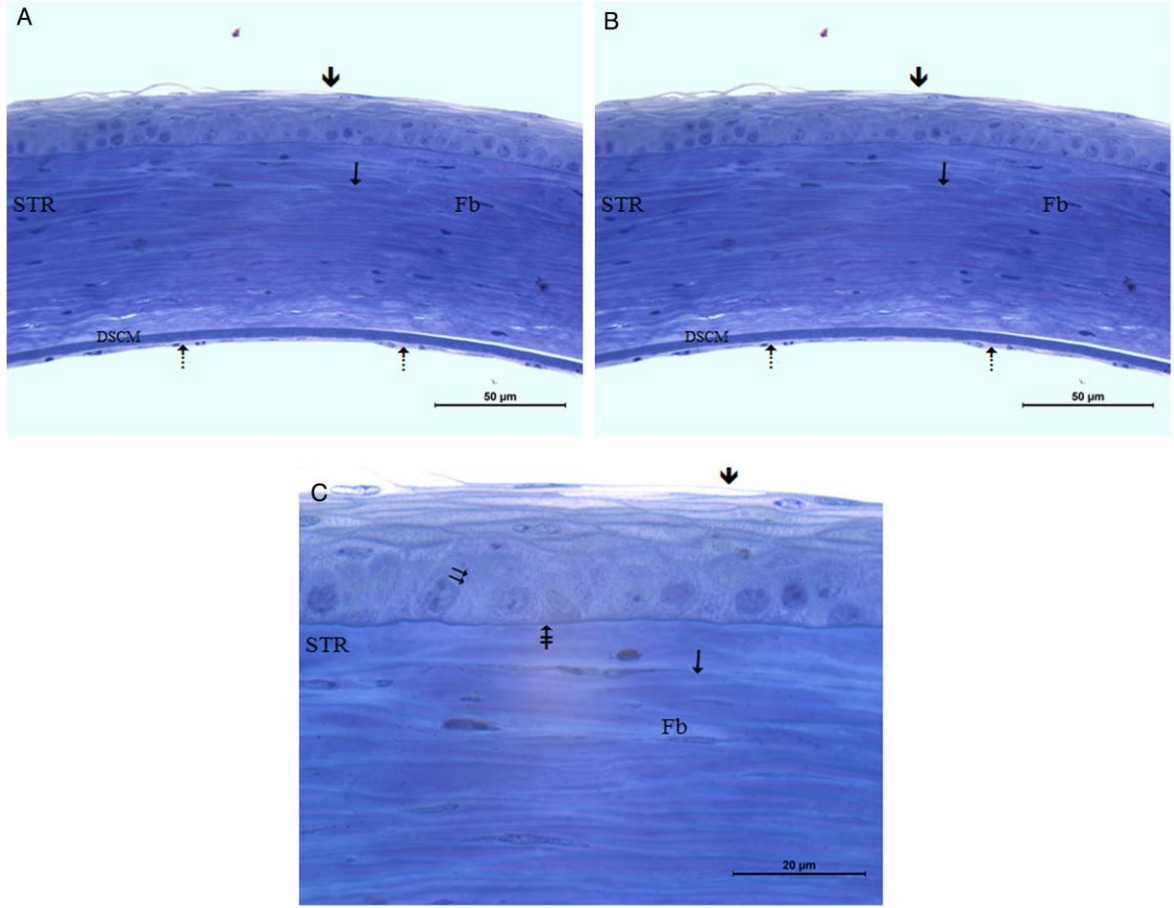
Amnion sıvısı uygulanan grupta diğer gruplarda olduğu gibi kornea kesitlerinde küçük büyütmede kornea hasarı oluşturulan bölgede çok katlı yassı epitel ile stroma bağlantısının büyük oranda koptuğu görüldü. Bu alanda stromada nötrofil infiltrasyonu izlendi. Yüzey epitelinin çok katlı yapısını koruduğu dar alanda epitel hücrelerin arasında açılmalar görüldü. Stromada tek tek dağılım gösteren nötrofiller ve ödem izlendi. Descemet membranının homojen yapısını koruduğu, kornea endotelinde nötrofil adezyonu bu grupta da görüldü (Şekil 4.21)



Şekil 4.21. Amnion sıvısı damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri

A. Amnion sıvısı damlatılan grup Toluidin MavisıX1000; STR: Stroma, Fb: Fibroblast, →: Kollagen lif demeti, ⇨: Nötrofil görülmektedir. **B.** Amnion sıvısı damlatılan grup Toluidin MavisıX1000; ⇨: Çok katlı yassı epitel, STR: Stroma, Fb: Fibroblast, →: Kollagen lif demeti, +: ödem, DSCM: Descemet membran, ⇨; Kornea endotelinde nötrofil adezyonu görülmektedir. **C.** Amnion sıvısı damlatılan grup Toluidin Mavisı X1000; ⇨: Çok katlı yassı epitel, ⇨: Hücreler arası boşluk, STR: Stroma, Fb: Fibroblast, →: Kollagen lif demeti, +: ödem, ⇨: Nötrofil görülmektedir.

Kornea hasarı sonrası anne sütü uygulanan deney grubunda küçük ve büyük büyütmelelerde kornea katmanlarının normal düzenlenim sergilediği ayırt edildi. Çok katlı yassı epitel hücreler arasında hücreler arası boşluk görülmedi. Bowman membranı kesintisiz ve düzgün yapısı ile ayırt edildi. Stromada kollagen lif demetleri arasında yassı çekirdekli fibroblastlar görüldü. Descemet membran ve kornea endoteli doğal yapıları ile izlendi (şekil 4.22).



Şekil 4.22. Anne sütü damlatılan grup ışık mikroskopi kesitleri

A. Anne sütü damlatılan grup Toluidin MavisiX400; →: Çok katlı yassı epitel, ⇌: Hücreler arası boşluk, STR: Stroma, →: Kollagen lif demeti, Fb; Fibroblast, ⇌ ; Kornea endoteli görülmektedir. **B.** Anne sütü damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; →: Çok katlı yassı epitel, ⇌: Hücreler arası boşluk, ‡: Bowman membranı, STR: Stroma, →: Kollagen lif demeti, Fb; Fibroblast görülmektedir. **C.** Anne sütü damlatılan grup Toluidin MavisiX1000; STR: Stroma, →: Kollagen lif demeti, Fb; Fibroblast, ⇌ ; Kornea endoteli görülmektedir.

Sonuç olarak kornea hasarı sonrasında iyileştirici etkisi denenen gruplar karşılaştırıldığında anne sütünün korneanın yeniden yapılanma sürecinde daha etkili olduğu izlendi.

5. TARTIŞMA

Gözyaşı tabakası büyüme faktörleri, vitaminler, elektrolitler ve nöropeptitler için kaynak oluşturarak kornea epitel hücrelerinin integrasyonunda ve epitel iyileşmesinde büyük rol oynar. EGF; kornea epitel, stroma ve endotel hücrelerinden salınarak epitel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu artırarak epitel iyileşmesinde önemli rol oynar. PDGF, TGF- β , TNF- α , KGF, NGF, IGF, HGF yine gözyaşında bulunan ve yara iyileşmesi sırasında etkin rol oynayan büyüme faktörleridir [217]. Fibronektin, korneal defekt oluşumu ile yara yerinde görülen ve iyileşme tamamlanınca kaybolan epitel hücre migrasyonunu, adhezyonunu ve diferansiasyonunu arttıran bir metabolik hormondur [108].

Epitel yara iyileşmesinde gözyaşının fonksiyonu göz önüne alındığında oftalmologlar benzer içerikteki biyolojik ürünlerin epitel defektlerinin tedavisinde kullanımına yönelmişlerdir. Biyolojik sıvılar 1984 yılından beri oküler yüzey hastalıklarında kullanılmaktadır [144]. Bu ürünlerin başında da anne sütü, kan ürünleri ve oküler yüzey hastalıklarında geniş bir kullanım alanına sahip amnion membranı ile benzer protein içeriğine sahip amnion sıvısı gelmektedir. Biyolojik olarak aktif moleküllerin konsantrasyonu ve çeşitliliği bu biyolojik sıvılar arasında farklılık gösterse de gözyaşı temel bileşenlerinin çoğunu içerdiklerinden oküler yüzey bakımı için gözyaşı yerine kullanılmaları mümkün gibi görünmektedir.

Bu biyolojik ajanlar içinde en sık kullanılanların başında otolog serum gelmektedir. Otolog serum göz damlaları biyokimyasal (osmolalite, pH) özellikleri bakımından doğal gözyaşına benzerdir. Oküler yüzey beslenmesi için gerekli büyüme faktörlerini ve vitaminleri, oküler yüzeyin enfeksiyonlara karşı savunmasında rol oynayan lizozim, IgG ve komplemanlar gibi bakteriyostatik bileşenleri içerir [5, 156]. Kişinin kendi kanından hazırlandığı için allerjik reaksiyon riski de azalmaktadır.

Otolog serum, oftalmolojide kuru göz, persistan epitel defekti, rekürren korneal erozyonu, superior limbik keratokonjonktivit, kimyasal korneal hasar, GVHD, limbal kök hücre yetmezliği, nörotrofik keratopati, Stevens-Johnson Sendromu, oküler sikatrisyel pemfigoid gibi birçok oküler yüzey hastalığında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, periferik insan serumu kullanılan grup ile diğer gruplar arasında defekt kapanma hızında ve histopatolojik bulgularda anlamlı fark olmayıp 72. saatte kontrol grubuna göre daha iyi kapanma oranına sahip olduğu görülmüştür. Bu durum istatistiksel anlamlı olmayıp klinik olarak anlamlıdır. Stromal lökosit infiltrasyonu değerlendirildiğinde çalışmadaki diğer bir kan ürünü olan umbilikal kord serumu kullanılan

grup ile beraber suni gözyaşı ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olmasa da klinikte anlamlı olabilecek skor düşüklüğü mevcuttur. Diğer ürünlerde olduğu gibi periferik kan serumunda da hazırlama, konsantrasyon ve kullanım sıklığında standardizasyonun olmaması çalışmalar arasındaki uyumsuzlukları açıklayabilir.

Jirsova ve arkadaşları 3 ay boyunca %20 otolog serum kullanan konvansiyonel tedavilere yanıtız 17 kuru göz hastasında semptomlarda, Schirmer değereleri ve impresyon sitolojisinde belirgin iyileşme saptamışlardır [218]. Yapılan çalışmada GVHD bağı konvansiyonel tedavilere yanıtız ciddi kuru göz olgularında %20 dilüe otolog serum kullanımı ile subjektif ve objektif bulgularda belirgin düzelme gözlemlenmiştir [150].

Tananuvat ve arkadaşları 12 kuru göz hastasında bir göze %20 dilüe otolog serum, diğer göze ise suni gözyaşı (konvansiyonel tedavi) tedavisi uygulamış ve otolog serum kullanımı ile semptomlarda, gözyaşı kırılma zamanında, fluorescein ve rose bengal boyanmada, konjonktival impresyon sitolojisinde belirgin düzelme görmüş ancak iki grup arasında bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel fark saptamamıştır [219].

Bir başka çalışmada kuru göz hastalarında konvansiyonel tedaviye (suni gözyaşı) göre 3 ay %50 dilüe otolog serum kullanan hastalarda semptomlarda, gözyaşı kırılma zamanında, fluorescein ve rose bengal boyanmada, konjonktival impresyon sitolojisinde belirgin bir düzelme görülmüştür [147]. Yine kuru göz hastalarında konvansiyonel tedavi ile otolog serum tedavi etkinliklerinin karşılaştırıldığı 2005 yılında yayınlanan çalışmada otolog serum gözyaşı kırılma zamanında, fluorescein ve rose bengal boyanmada ve objektif semptomlarda belirgin bir iyileşme sağlamıştır [220].

2006 yılında Noda ve arkadaşları 27 hastada LASIK sonrası gelişen kuru göz tedavisi için otolog serum (%20 konsantrasyonda günde 5 kere) ve suni gözyaşı etkinliğini karşılaştırmışlardır. Otolog serum kullanan hastalarda rose bengal boyanma ve gözyaşı kırılma zamanında suni gözyaşı kullanan gruba kıyasla belirgin bir düzelme görülmüş ancak semptom skorlarında iki grup arasında fark saptanmamıştır [221].

2012 yılında Urzua ve arkadaşları, 2014 yılında Çelebi ve arkadaşları tarafından yapılan randomize prospektif iki çalışmada kuru göz hastalarında standardizasyonu daha iyi sağlayabilmek için Okuler Surface Disease Index (OSDI) skorları kullanılmıştır [222, 223]. Urzua ve ark %20 dilüe otolog serum ve konvansiyonel tedavi uygulanan 12 kuru göz hastasında OSDI skorlarında otolog serum kullanımında anlamlı düşüş olduğunu ancak gözyaşı kırılma zamanı ve fluorescein boyanmada anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir [222]. Yine Çelebi ve ark 20 kuru göz hastası ile yaptıkları randomize kontrollü çalışmada

%20 dilüe otolog serum günde 4 kere kullanımında 1 ay sonunda OSDI skorlarında %55,18; koruyucusuz suni gözyaşı kullanımında ise %19,50 düşüş saptamışlardır [223].

Literatürde persistan epitel defektlerinde otolog serum kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edildiğini gösteren birçok yayın bulunmaktadır. Lekhanont ve arkadaşları farklı göz cerrahileri sonrası oluşan persistan epitel defekti olan ve konvansiyonel tedavilere yanıtızsız 181 hastada 2 saatte 1 sıklıkta %100 serum kullanılmış ve yaklaşık %93'ünde 4 gün içerisinde herhangi bir komplikasyon olmadan defektte tam kapanma görmüştür [137].

Persistan epitel defekti olan 14 hastanın 17 gözünün dahil edildiği bir prospektif çalışmada hastalar %20 otolog serum kullanmıştır. Altı gözde 2 haftada, 8 gözde 2-4 hafta arasında defekt kapanmış olup 3 gözde ise 4 hafta sonunda tam kapanma olmamıştır [224].

Bir başka prospektif çalışmada farklı etyolojilere bağlı persistan korneal epitel defekti olan 15 hastanın 16 gözü dahil edilmiş ve hastalar %20 otolog serum kullanmışlardır. Yedi hastada 2 haftada, 3 hastada 4 haftada epitel kapanması gerçekleşmiş ancak 6 hastada 4 hafta sonunda defekt kapanmamıştır [145].

Poon ve arkadaşları çalışmalarında ortalama 48.2 gün süresince konvansiyonel tedaviyle yanıt alınamayan nörotrofik ülser, DM, postenfeksiyöz keratopati, oküler skatrisyel keratopati ve romatoid artrit gibi farklı etyolojilere sahip persistan epitel defekti olan 13 hastanın 15 gözüne %50 ve %100 (6 göze %100 konsantrasyonda) konsantrasyonlarda otolog serumu günde 8 kere uygulamışlardır. Dokuz hastada ortalama 29 günde tam kapanma gerçekleşmiş ancak 6 hastada tam kapanma sağlanmamıştır [154].

Jeng ve arkadaşları farklı etyolojilere bağlı persistan epitel defekti olan 25 hastada 2 saatte bir %50 otolog serum kullanımı ile 23 vakada (%92) ortalama 22,4 günde tam kapanma olduğunu görmüşlerdir [160].

2010 yılında Chen ve arkadaşları tarafından yayınlanan prospektif randomize olmayan geniş çaplı çalışmada penetran keratoplasti sonrası 165 hastanın 83'ü koruyucusuz suni gözyaşı 82 'si %20 konsantrasyonda otolog serum kullanmıştır. Otolog serumun özellikle diyabetes mellitusu olan olgularda belirgin bir şekilde greft re-epitelizasyonu desteklediği gösterilmiştir [225].

Hondur ve arkadaşlarının çalışmasında lazer epitelyal keratektomi sonrası epitel iyileşmesi otolog serum kullanan hastalarda konvansiyonel tedavi uygulananlardan yaklaşık 1 gün önce tamamlanmıştır [226].

Ziakas ve arkadaşları konvansiyonel tedavilere yanıt vermeyen 33 rekürren korneal erozyonu olan hastada otolog serum tedavisi ile korneal defektlerde tam kapanma sağlamış ek olarak %85'inde 12 aylık takip süresinde nüksle karşılaşmamışlardır [227].

Matsumoto ve arkadaşları nörotrofik keratiti olan 11 hastanın 14 gözünde tam iyileşme ve %64.2'sinde korneal duyarlılıkta artış olduğunu gözlemlemişlerdir [228].

Aniridisi ve limbal kök hücre yetmezliği olan 13 hastada %20 konsantrasyonda günde 8 kere otolog serum kullanımı ile 2 ay sonunda semptomlarda azalma, korneal epitelizasyon ve epitel hücre metaplazisi görülmüştür [229].

Goto ve arkadaşları 2001 yılında konvansiyonel tedavilerle (suni gözyaşı, A vitamini, topikal steroid) yanıt alınamayan 11 süperior limbik keratokonjoktivit hastasında %20 konsantrasyonda otolog serum kullanımı ile 9 hastada subjektif düzelme , tüm hastalarda da fluorescein ve rose bengal boyanmada belirgin düzelme saptanmıştır [148].

Shulze ve arkadaşları vitrektomi uygulanan diyabetik hastalarda korneal epitelyal abrazyon tedavisinde otolog serum damlası ile hyaluronik asiti karşılaştırdıkları çalışmalarında %50 konsantrasyonda otolog serum damlası ile daha hızlı re-epitelizasyon sağlandığını göstermişlerdir [230].

Otolog serum kullanımı ile allerjik reaksiyon ve kan yoluyla bulaşan hastalık riski azalsa da anemi, kan diskrazileri, genel durum bozukluğu, GVHD, Sjögren sendromu gibi serumunda zengin pro-inflamatuar sitokinler bulunan hastalarda kullanımı uygun değildir. Böyle durumlarda diğer kan ürünlerinin kullanımı daha etkin olabilmektedir [231].

Chiang ve arkadaşları 2007 yılında 2 GVHD hastasında allojenik serum tedavisi ile semptomlarda, gözyaşı kırılma zamanında, fluorescein ve rose bengal boyanmada, konjonktival impresyon sitolojisinde belirgin iyileşme görmüşlerdir [232]. Aynı grubun 2009 yılında yayınlanan çalışmasında keratoplasti, nörotrofik keratit, oküler GVHD ve ekspozur keratopatiye sekonder persistan epitel defekti olan ve konvansiyonel tedavilere yanıt vermeyen 36 hastada akrabalarından hazırlanan %100 konsantrasyonda allojenik serum tedavisi uygulanmışlardır. Olguların %41.7'sinde 2 hafta içinde %63.9'unda 4 hafta içinde tam kapanma görmüşlerdir [233].

2012 yılında yapılan başka bir çalışmada GVHD ye sekonder kuru gözü olan 16 hastaya %20 dilüe allojenik serum tedavisi uygulanmış olup OSDI skorlarında belirgin bir düzelme görülmüştür [234].

%20 dilüe edilerek hazırlanan allojenik serum kullanan 20 kuru göz ve 14 persistan epitel defekti olan hasta grubunda yapılan çalışmada kuru göz hastalarında belirgin

semptom rahatlama ve bulgularda düzelme görülürken persitan epitel defekti olan hasta grubunda objektif ve subjektif düzelme olmamıştır [235].

Yapılan çalışmalarda allojenik serum kullanımı ile bildirilmiş bir komplikasyon yoktur.

Otolog serum tedavisi için uygun olmayan genel durumu düşük olan ve kan diskrazileri, GVHD gibi kanda proinflamatuvar sitokin açısından zengin hastalarda bir başka kan ürünü tedavisi seçeneği umblikal kord serumudur [8, 166]. EGF, TGF- β , NGF ve VEGF'ü daha yüksek konsantrasyonlarda içermesi diğer kan ürünlerine göre avantajıdır. IGF-1, A vitaminin içeriği ise periferik kan serumundan daha az ancak doğal gözyaşından daha fazladır [236, 237]. Umblikal kord serumunun bir başka avantajı da hazırlanırken bir kerede çok sayıda hasta için ürün temin edilebilmesidir. Ancak kan yoluyla taşınan enfeksiyonlar açısından risk taşıdığı unutulmamalıdır. Ayrıca mediko-legal sorunlarla karşılaşılabilineceği de akılda kalmalıdır.

Çalışmamızda kapanma hızı olarak umblikal kord serumu kullanılan grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel fark olmayıp 72. saatte periferik insan serumuna göre ve tüm saatlerde kontrol ve suni gözyaşı grubuna göre klinik olarak anlamlı olabilecek daha iyi bir kapanma yüzdesi göstermektedir. P değerleri karşılaştırıldığında ise anne sütü ve amnion sıvısının ardından 12. saatte kapanma yüzdesi olarak 3. sırada yer almaktadır. Bu da özellikle periferik insan serumuna kıyasla literatürde birçok çalışmada gösterildiği gibi daha hızlı bir re-epitelizasyonun sağladığını destekleyebilir. Üçüncü gün ise yine p değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamsız olsa da anne sütünden sonra 2. en iyi kapanma yüzdesine sahip gruptur.

Sjögren olan ve olmayan ciddi kuru göz hastalarında umblikal kord serumu ve otolog serum kullanımı ile semptomlarda, keratoepitelyopati skorlarında, impresyon sitolojisi bulgularında, gözyaşı kırılma zamanı, rose bengal ve fluorescein boyanma skorlarında azalma gösterilmiştir. Semptom ve keratoepitelyopati skorlarında umblikal kord serumu kullanım ile otolog seruma göre daha anlamlı bir düşüş sağlanmıştır. Goblet hücre sayısı artışı da umblikal kord kullanan Sjögren hastalarında otolog seruma göre daha yüksek bulunmuştur. Otolog serum kullanan Sjögren hastalarında bulgular non Sjögren hastalara kıyasla daha şiddetli olup umblikal kord serumu kullanan hastalarda non-Sjögren ve Sjögren grubu arasında fark yoktur [166]. Bu çalışma ile Sjögren gibi pro-inflamatuar sitokinler açısından zengin hasta grubunda otolog serum yerine diğer kan ürünlerinin daha etkin olabileceği desteklenmektedir.

Aynı grubun aynı yıl yayınlanan bir başka çalışmasında GVHD'e sekonder ciddi kuru gözü olan olgularda umblikal kord serumu ile 2. ayda korneal boyanma, gözyaşı kırılma zamanı, kornea sensitivitesi ve semptom skorlarında etkin bir iyileşme görülmüştür. Bu iyilik hali 6. ayda da devam etmiştir [238].

Sharma ve arkadaşları oküler kimyasal yanığı olan 33 gözün tedavisinde 12'sine umblikal kord serumu, 11'inde otolog serum, 10'una suni gözyaşı kullanmıştır. Umblikal kord serumu ile daha hızlı re-epitelizasyon, daha az korneal vaskülarizasyon, daha az korneal haze oluşumu ve limbal iskemi de daha iyi düşüş sağlanmıştır[174]. Bu sonuç çalışmamızda umblikal kord kanı kullanılan grupta 12. saatte defekt alanındaki azalmanın suni gözyaşı, periferik insan serumu kullanılan gruplar ve kontrol grubuna kıyasla daha fazla olarak gözlenmesi ile uyumludur.

2012 yılında Oh ve arkadaşları farelerde oküler kimyadal yanık modelinde %20 periferik kan serumu, %20 umblikal kord serumu ve suni gözyaşı kullanımının etkilerini karşılaştırmışlardır. Defekt kapanma hızı umblikal kord serumunda 1. ve 2. günlerde periferik kan serumundan ,1.-2.-3.-5. günlerde ise suni gözyaşından daha yüksektir. Periferik kan serumunda ise suni gözyaşına kıyasla sadece 3. gün kapanma miktarı daha yüksektir. Tam kapanma sürelerine bakılınca en erken umblikal kord serumu, ardından periferik kan serumu gelmektedir. Korneal haze skorları ise umblikal kordda en düşüktür. Pro-inflamatuar sitokin olan IL-1 β düzeyleri umblikal kord serumu kullanan farelerde belirgin düşük olup periferik kan serumu ve suni gözyaşı kullananlarda belirgin fark saptanmamıştır. Histolojik incelemede epitel integrasyonu umblikal kord serumu kullanılan grupta belirgin daha iyi ve stromal infiltrasyon ve ödem daha azdır[167].

Yoon ve arkadaşları umblikal kord serumunun suni gözyaşına göre rekürren korneal erozyon tedavisinde daha etkin olduğunu ve rekürrensi azalttığını göstermişlerdir [170].

Yapılan diğer bir çalışmada NGF, SP, IGF-1 gibi nörotrofik faktörler içeren umblikal kord serumunun nörotrofik keratitlerde de etkili olduğu gösterilmiştir [8].

Lazer epitelyal keratomileusis sonrası konvansiyonel tedaviye ek olarak kullanılan umblikal kord serumu ile erken dönem postoperative haze de azalma, oküler yüzey parametrelerinde iyileşme saptamışlardır [171].

Vajpayee ve arkadaşları, 2003 yılında yayınlanan randomize prospektif kontrollü çalışmalarında, otolog serum ve umblikal kord serumu kullanılan medikal tedaviye dirençli persitan epitel defekti olan hastalarda umblikal kord serumu ile daha hızlı reepitelizasyon meydana geldiğini göstermişlerdir. Elli dokuz hastanın 60 gözü çalışmaya dahil edilmiş ve

31 göze umbilikal kord serumu, 29 göze ise otolog serum (ikisi de %20 konsantrasyonda) günde 6 kere uygulanmıştır. Yedinci, 14. ve 21. günlerde umbilikal kord ile daha iyi bir kapanma hızı olup tam kapanma umbilikal kord kullanımı ile 18 gözde, otolog serum kullanımında ise 11 gözde olmuştur [9].

Yoon ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada 14 persistan epitel defekti olan hastada günde 6 kere %20 konsantrasyonda umbilikal kord serumu uygulanması ile 6 hastada 2 haftada, 6 hastada 2-4 hafta arısında, 2 hastada ise 8 haftada kapandığını göstermişlerdir [168]. Benzer bir şekilde 2014 yılında Erdem ve ark konvansiyonel tedavilerle yanıt alınamayan persistan epitel efekti olan 14 hastanın 16 gözünde %20 konsantrasyonda ilk iki hafta günde 10 kere, takibinde ise günde 5 kere umbilikal kord serumu tedavisi uygulamışlardır. Umbilikal kord serumu tedavisi ile 12 gözde (%75) tam kapanma olmuş ancak 4 gözde (%25) epitel kapanması gerçekleşmemiştir. Tam kapanma hızı ilk 7 günde %12,5; ikinci haftada %25, 3. haftada ise %75 'tir [239].

IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonisti ve IL-10 hem amnion membranı hem de amnion sıvısında bulunan sitokinlerdir [240, 241]. Özellikle IL-1 reseptör antagonistin ve IL-10' unun belirgin antiinflamatuvar etkisi bulunmaktadır [241, 242]. Amnion membranındaki birçok protein amnion sıvısında da bulunmaktadır [11]. Bu nedenle korneal yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin de benzer olması beklenmektedir.

Fetal yara iyileşmesinde etkin olan amnion sıvısının nörocerrahi işlemleri sonrasında sinir rejenerasyonunu arttırdığı ve el cerrahisi sonrası fibrozisi azalttığı gösterilmiştir [243, 244].

Çalışmamızda amnion sıvısı kullanılan grup istatistiksel anlamlı olmasa da her saatte suni gözyaşı ve kontrol grubuna göre daha iyi kapanma yüzdesine sahiptir. Aynı şekilde umbilikal kord serumundan ise 12.-24.-48. saatlerde daha iyi bir kapanma yüzdesine sahiptir. Sonuçlar değerlendirildiğinde p değerlerine bakıldığında anlamlı olarak görünmese de klinik olarak anlamlı sayılabilecek şekilde, anne sütünden sonra 12. ve 24. saatte kapanma oranı 2. en iyi olan gruptur. Patolojik incelemede limbal inflamasyonu anne sütü ile birlikte diğer gruplara kıyasla görece daha az gözlenmiş olup bazal hücre dizilimi kontrol grubundan anlamlı bir şekilde daha iyidir. Amnion sıvısının, reepitelizasyon hızında kan ürünlerine kıyasla klinik kullanımda anlamlı farklılık yaratabilecek bir artış yaptığı sonucuna ulaşılmaktadır. Bu durum amnion sıvısının fetal gelişim için kritik olan büyüme faktörü içeriğinin ve belirgin antiinflamatuvar özelliğinin bir sonucu olarak görülebilir.

Lee ve Kim yaptıkları çalışmada tavşanlarda fotorefraktif keratektomi sonrasında korneal sinir rejenerasyonunun ve korneal duyarlılığın geri kazanımının topikal insan amnion sıvısı kullanımı ile daha hızlı olduğunu göstermişlerdir [13].

Herretes ve arkadaşları çalışmalarında farelerde korneal alkali yanık modelinde topikal insan amnion sıvısı kullanımı ile korneal opasite, skar oluşumunun azaldığını ve re-epitelizasyonun desteklendiğini gözlemlemişlerdir [12].

Castro-combs ve arkadaşları farelerde ex vivo organ kültüründe korneal epitel defekti modeli oluşturmuş ve epitel defekti üzerinde fetal inek serumu, insan amnion sıvısı, at amnion sıvısının etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Defekt kapanma hızında kontrol grubu ile fetal inek serumu arasında fark yok iken, insan amnion sıvısı ve at amnion sıvısı kullanılan gruplarda kontrol grubuna göre daha hızlı bir re-epitelizasyon görülmüştür. İki grubun re-epitelizasyonu fetal inek serumu grubuna göre de daha hızlı olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildir [194]. Bu çalışmada farklı türlerden kaynaklı biyolojik sıvılar karşılaştırılsa da sonucunda bizim çalışmamızla uyumlu olarak amnion sıvısı daha hızlı bir re-epitelizasyon için kan ürününe göre daha etkin bulunmuştur.

Quinto ve arkadaşları farelerde kuru göz modelinde %100 insan amnion sıvısı, %20 insan serumu ve suni gözyaşı (kontrol) kullandıkları çalışmalarında insan serumu ve amnion sıvısı kullanılan grupların kontrol grubuna göre gözyaşı üretimini belirgin bir şekilde arttırdığı ancak birbirleri arasında fark olmadığını görmüşlerdir. Goblet hücre sayısında amnion sıvısı ve serum kullanılan grup kontrole göre daha yüksek sonuçlar verse de iki grup arasında fark saptanmamıştır [195]. Bu çalışmada amnion sıvısı ile 2. haftadaki belirgin boyanma azalması çalışmamızı destekleyerek klinik semptomların daha erken rahatlayabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Kan ürünlerinde olduğu gibi amnion sıvısı hazırlanışı, konsantrasyonu ve kullanım sıklığı açısından bir standardizasyon bulunmamaktadır. Aynı grubun bir başka çalışmasında farelerde kuru göz modelinde insan amnion sıvısının farklı konsantrasyonları arasındaki etki farkı araştırılmıştır. Topikal %20-50-100 amnion sıvısı ve serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu sonuçları karşılaştırılmıştır. Gözyaşı üretiminde, korneal boyanmada ve goblet hücre sayısında amnion sıvısı kullanan gruplar kontrol grubuna göre daha üstün olmakla beraber konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ancak p değerleri kıyaslandığında %20 lik konsantrasyonda %50 ve %100 lük konsantrasyon uygulanan gruplara göre gözyaşı üretiminde ve korneal boyanmada daha az iyileşme gözlemlenmiştir [245]. Bu da hasta kliniğine göre farklı konsantrasyonlarda amnion sıvısı kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anne sütü, infantların büyüme ve gelişiminde görevli, immün sistem matüritesi tamamlanana kadar onları enfeksiyonlardan koruyan birçok antimikrobiyal ve immünmodulator komponent içeren kompleks biyolojik bir sıvıdır. İçeriğindeki fibronektin, IL-6, EGF, TNF- α , TGF- β , IGF-1, fibronektin, lipitler ve vitaminler ile epitelial ve stromal yara iyileşmesinde görev almaktayken, laktoperoksidaz, laktoferrin, Ig A, lizozim bakteriosidal etki gösterir. Bu yapısı ile tıpkı serum gibi kornea epitel çoğalması, farklılaşması ve migrasyonu için gerekli büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren doğal gözyaşı ile benzer bir komponent sunmaktadır.

Farelerde oluşturulan kuru göz modelinde topikal anne sütü uygulanması ile kornea epitel kalınlığının korunduğu gözlemlenmiştir [246].

Laktoferrin anne sütünün önemli bir komponenti olup inflamasyonu azaltan, immün cevabı düzenleyen ve antibakteriyel etkisi olan bir glikoproteindir [247]. Rekombinant insan laktoferrin glikoproteini (talaktoferrin) ve yine insan laktoferrini ile yüksek homoloji gösteren inek laktoferrini ile çalışmalar yapılmıştır [248]. Yapılan bir çalışmada laktoferrin uygulamasının kornea epitel hücrelerini UV-B hasarından koruduğu gösterilmiştir [249]. Bir başka çalışmada ise $\geq 2,5$ mg/ml inek laktoferrini uygulanmasının in vitro insan korneal epitel iyileşmesini fibronektin varlığında IL-6 veya PDGF artışı yaparak hızlandırdığı gösterilmiştir [250]. Yine aynı grubun farelerde korneal alkali yanık modelinde inek laktoferrininin IL-1 baskılayarak yara iyileşmesini hızlandırdığı gözlemlenmiştir [251]. Anne sütü ayrıca bakteri çoğalmasının inhibe eden ve oksijen varlığında nitritten güçlü bir bakteriosidal olan peroksinitrit oluşumunu katalize eden ksantin oksidaz içerir [252]. Bu antimikrobiyal özelliklerinin bir sonucu olarak yenidoğan konjonktivitinde ve nazolakrimal kanal tıkanıklıklarına bağlı enfeksiyonlarda geleneksel tedavi yöntemi olarak kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiştir [253]. Verd S. 2007 yılında yayınlanan çalışmasında 1999-2006 yılları arasında infantil epifora ile takip edilmiş 65 hastanın bilgilerini retrospektif olarak incelemiş ve enfekte olduğunda antibiyotik damla damlatılan ve anne sütü damlatılan bebeklerdeki nazolakrimal kanal tıkanıklığının açılma zamanını karşılaştırıldığında 1.ay sonundaki kontrolde %15 ‘e karşılık %57, 3. ay sonundaki kontrolde % 50‘ye karşılık %90, 6. ay kontrolünde ise %90 ‘a karşılık %100 açılma oranı saptayarak , anne sütü damlatılan grubun obstrüksiyonunun daha erken açıldığını göstermiştir [253].

Bizim de anne sütünün bu zengin içeriğinden ve literatürdeki verilerden yola çıkarak yaptığımız çalışmamızda anne sütünün 12., 24. ve 72. saat kapanma yüzdesinin kontrol grubundan istatistiksel anlamlı daha yüksek olduğu görülmüştür. Suni gözyaşı

kullanılan gruba göre 24. ve 72. saatte kapanma yüzdesinin daha iyi bulunmuştur. Çalışmamızda en hızlı ve en fazla re-epitelizasyonun anne sütü kullanımı ile sağlandığı görülmüştür.. Patolojik skorlamada stromal lökosit infiltrasyonu en az olan grup olup kontrol grubu ve suni gözyaşını kullanılan grupla aralarında anlamlı fark bulunmuştur. Limbal inflamasyon değerlendirmesinde anne sütü ile amnion sıvısı kullanılan gruplar arasında fark görülmemiştir. Ancak diğer gruplara göre daha az inflamasyon bulgusu olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Histopatolojik incelemede kornea katmanlarının normal düzenlenim sergilediği ve normal kornea yapısına en yakın grubun bu grup olduğu görülmüştür.

Kimyasal ve biyolojik açıdan doğal gözyaşına benzer içerikte olan bu biyolojik sıvıların hazırlanışı, saklanması, konsantrasyonu ve dozlamında ek olarak objektif ve subjektif etkinlik değerlendirilmesinde bir standardizasyon olmaması literatürdeki çalışmalar arasındaki uyumsuzlukların temel nedenidir. Bizim çalışmamızda da aynı nedenlere ek olarak gruplardaki denek sayısının azlığı kısıtlayıcı faktördür.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, farelerde kornea epitel defekti modelinde insan periferik kan serumu, umblikal kord serumu, amnion sıvısı, anne sütü, suni gözyaşının defekt kapanma hızı ve etkinliklerini karşılaştırdığımız çalışmamızda ikili karşılaştırmalarda epitel defekti kapanma oranı sadece anne sütünde kontrol grubuna göre 12., 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p \leq 0,05$). Yine anne sütü suni gözyaşına göre 24. ve 72. saatte daha fazla kapanma sağlamıştır ($p \leq 0,05$). İstatistiksel anlamlı olmamakla beraber 12. saatte anne sütünden sonra en hızlı kapanma amnion sıvısında 72. saatte ise umblikal kord serumunda olmuştur.

Histopatolojik incelemede gruplar arasında limbal inflamasyon açısından anlamlı fark saptanmış iken, stromal lökosit sayısı ikili karşılatırmalarda anne sütünde kontrol grubu ve suni gözyaşı grubuna göre anlamlı olarak daha az saptanmıştır. Yine yüzeysel hücre dizilimi anne sütünde kontrole göre daha iyi olduğu görülmüştür. Bazal hücre diziliminde ise amnion sıvısı kullanılan grup kontrole göre daha üstündür. üç gün sonunda normal kornea histolojisine en yakın görünüm anne sütü kullanan grupta olmuştur.

Anne sütünün farelerde kornea epitel yara iyileşmesinde diğer biyolojik sıvılara göre daha etkin olduğu görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Eghrari, A.O., S.A. Riazuddin, and J.D. Gottsch, *Chapter two-overview of the cornea: structure, function, and development*. Progress in molecular biology and translational science, 2015. **134**: p. 7-23.
2. Ljubimov, A.V. and M. Saghizadeh, *Progress in corneal wound healing*. Progress in retinal and eye research, 2015. **49**: p. 17-45.
3. Liu, C.-Y. and W.W.-Y. Kao, *Chapter Five-Corneal Epithelial Wound Healing*. Progress in molecular biology and translational science, 2015. **134**: p. 61-71.
4. Nishida, T., et al., *Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ*. The Journal of cell biology, 1983. **97**(5): p. 1653-1657.
5. Geerling, G., S. MacLennan, and D. Hartwig, *Autologous serum eye drops for ocular surface disorders*. British Journal of Ophthalmology, 2004. **88**(11): p. 1467-1474.
6. Rauz, S. and V.P. Saw, *Serum eye drops, amniotic membrane and limbal epithelial stem cells—tools in the treatment of ocular surface disease*. Cell and tissue banking, 2010. **11**(1): p. 13-27.
7. Liu, L., et al., *Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations*. Investigative ophthalmology & visual science, 2006. **47**(6): p. 2438-2444.
8. Yoon, K.-C., et al., *Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis*. Ophthalmology, 2007. **114**(9): p. 1637-1642. e2.
9. Vajpayee, R., et al., *Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects*. British Journal of Ophthalmology, 2003. **87**(11): p. 1312-1316.
10. KIM, J.S., et al., *Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn*. Experimental eye research, 2000. **70**(3): p. 329-337.
11. Zhang, Q., et al., *Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid*. Molecular human reproduction, 2001. **7**(6): p. 573-579.
12. Herretes, S., et al., *Use of topical human amniotic fluid in the treatment of acute ocular alkali injuries in mice*. American journal of ophthalmology, 2006. **142**(2): p. 271-278. e1.
13. Lee, H.S. and J.C. Kim, *Effect of amniotic fluid in corneal sensitivity and nerve regeneration after excimer laser ablation*. Cornea, 1996. **15**(5): p. 517-524.
14. Asena, L., et al., *Human Breast Milk Drops Promote Corneal Epithelial Wound Healing*. Current eye research, 2017. **42**(4): p. 506-512.
15. Duke-Elder, S.C., *System of ophthalmology vol111: normal and abnormal development part 1: embryology*. 1963.
16. 1. Bengisu Ü. Göz hastalıkları, b.K.A.v.F.A., Palme yayıncılık, 1998; 69-72., *Göz hastalıkları*. 4. baskı ed. Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi 1998, ankara: Palme yayıncılık. 69-72.

17. DelMonte, D.W. and T. Kim, *Anatomy and physiology of the cornea*. Journal of Cataract & Refractive Surgery, 2011. **37**(3): p. 588-598.
18. Rüfer, F., A. Schröder, and C. Erb, *White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system*. Cornea, 2005. **24**(3): p. 259-261.
19. Arffa, R.C. and M. Grayson, *Grayson's Diseases of the Cornea* 1997: Mosby Incorporated.
20. Hart, W.M. and F.H. Adler, *Adler's physiology of the eye: clinical application* 1992: Mosby Inc.
21. Yapısı, O.M.K., *İşlevi ve Muayene Yöntemleri*. Medikal Network Oftalmoloji Dergisi, 1994. **4**: p. 306-311.
22. Duke-Elder, S. and C. Cook, *System of Ophthalmology. Vol. III: Normal and Abnormal Development*. Academic Medicine, 1964. **39**(4): p. 425.
23. Tucker, S.M., et al., *Corneal diameter, axial length, and intraocular pressure in premature infants*. Ophthalmology, 1992. **99**(8): p. 1296-1300.
24. Cameron, J.D., *Corneal reaction to injury*. Cornea, 2005. **1**: p. 115-128.
25. Tiffany, J.M., *The lipid secretion of the meibomian glands*. Adv Lipid Res, 1987. **22**(1): p. 1-62.
26. Tomlinson, A., G.R. Trees, and J.R. Occhipinti, *Tear production and evaporation in the normal eye*. Ophthalmic and Physiological Optics, 1991. **11**(1): p. 44-47.
27. Cibis, G., H. Beaver, and K. Johns, *Fundamentals and Principles of Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology*, 2007, Basic and Clinical Science Course.
28. Nguyen, D.H., et al., *Sensory denervation leads to deregulated protein synthesis in the lacrimal gland*. Advances in experimental medicine and biology, 1998. **438**: p. 55-62.
29. Sullivan, D.A., et al., *Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency?* Investigative ophthalmology & visual science, 1999. **40**(6): p. 1261-1265.
30. Gipson, I., et al., *Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx*. Investigative ophthalmology & visual science, 1992. **33**(1): p. 218-227.
31. Farjo, A., M. McDermott, and H. Soong, *Corneal anatomy, physiology, and wound healing*. Ophthalmology, 3rd ed. St. Louis, MO, Mosby, 2008: p. 203-208.
32. Yanoff, M. and J.S. Duker, *Ophthalmology*, Mosby. Inc. St. Louis, 2004: p. 729-742.
33. Hanna, C., D.S. Bicknell, and J.E. O'BRIEN, *Cell turnover in the adult human eye*. Archives of ophthalmology, 1961. **65**(5): p. 695-698.
34. Li, W., et al., *Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus*. Cell research, 2007. **17**(1): p. 26.
35. JACOBSEN, I.E., O. Jensen, and J. Prause, *Structure and composition of Bowman's membrane*. Acta ophthalmologica, 1984. **62**(1): p. 39-53.
36. Boote, C., et al., *Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications*. Investigative ophthalmology & visual science, 2003. **44**(7): p. 2941-2948.

37. Maurice, D., *The transparency of the corneal stroma*. Vision research, 1970. **10**(1): p. 107-108.
38. Fini, M.E. and B.M. Stramer, *How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes*. Cornea, 2005. **24**(8): p. S2-S11.
39. Gipson, I. and N. Joyce, *Anatomy and cell biology of the cornea, superficial limbus, and conjunctiva*. Principles and Practice of Ophthalmology. Philadelphia: WB Saunders, 2000: p. 612-629.
40. Jester, J.V., et al., *The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'*. Journal of cell science, 1999. **112**(5): p. 613-622.
41. Dua, H.S., et al., *Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)*. Ophthalmology, 2013. **120**(9): p. 1778-1785.
42. Murphy, C., J. Alvarado, and R. Juster, *Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane*. Investigative ophthalmology & visual science, 1984. **25**(12): p. 1402-1415.
43. Johnson, D.H., W.M. Bourne, and R.J. Campbell, *The ultrastructure of Descemet's membrane: I. Changes with age in normal corneas*. Archives of ophthalmology, 1982. **100**(12): p. 1942-1947.
44. Cogan, D., *Growth and regenerative potential of Descemet's membrane*. Trans Ophthalmol Soc UK, 1971. **91**: p. 875-894.
45. Stiemke, M.M., H.F. Edelhauser, and D.H. Geroski, *The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density*. Current eye research, 1991. **10**(2): p. 145-156.
46. Geroski, D.H., et al., *Pump function of the human corneal endothelium: effects of age and cornea guttata*. Ophthalmology, 1985. **92**(6): p. 759-763.
47. Watsky, M.A., M.L. McDermott, and H.F. Edelhauser, *In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes*. Experimental eye research, 1989. **49**(5): p. 751-767.
48. Bourne, W.M., L.R. Nelson, and D.O. Hodge, *Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period*. Investigative ophthalmology & visual science, 1997. **38**(3): p. 779-782.
49. Polse, K., et al., *Hypoxic effects on corneal morphology and function*. Investigative ophthalmology & visual science, 1990. **31**(8): p. 1542-1554.
50. Oliveira-Soto, L. and N. Efron, *Morphology of corneal nerves using confocal microscopy*. Cornea, 2001. **20**(4): p. 374-384.
51. Krachmer, J.H., M.J. Mannis, and E.J. Holland, *Cornea 2010*: Elsevier Health Sciences
52. Snell, R.S. and M.A. Lemp, *Development of the eye and the ocular appendages*. Clinical Anatomy of the Eye, Second Edition, 1998: p. 1-20.
53. Kaufman, P. and B. Gabelt, *Adler's Physiology of the Eye*, 2011, New York: Elsevier Health Sciences.
54. Di Girolamo, N., et al., *Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea*. Stem cells, 2015. **33**(1): p. 157-169.

55. West, J.D., N.J. Dorà, and J.M. Collinson, *Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance*. World journal of stem cells, 2015. **7**(2): p. 281.
56. Kuwabara, T., D.G. Perkins, and D.G. Cogan, *Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds*. Investigative ophthalmology & visual science, 1976. **15**(1): p. 4-14.
57. Crosson, C., S. Klyce, and R. Beuerman, *Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process*. Investigative ophthalmology & visual science, 1986. **27**(4): p. 464-473.
58. Matsuda, M., J. Ubels, and H. Edelhauser, *A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate*. Investigative ophthalmology & visual science, 1985. **26**(6): p. 897-900.
59. Zieske, J.D., G. Bukusoglu, and I.K. Gipson, *Enhancement of vinculin synthesis by migrating stratified squamous epithelium*. The Journal of cell biology, 1989. **109**(2): p. 571-576.
60. Soong, H.K., *Vinculin in focal cell-to-substrate attachments of spreading corneal epithelial cells*. Archives of ophthalmology, 1987. **105**(8): p. 1129-1132.
61. Arey, L. and W. Covode, *The method of repair in epithelial wounds of the cornea*. The Anatomical Record, 1943. **86**(1): p. 75-86.
62. Wiley, L., et al., *Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation*. Investigative ophthalmology & visual science, 1991. **32**(3): p. 594-602.
63. Lu, L., P.S. Reinach, and W.W.-Y. Kao, *Corneal epithelial wound healing*. Experimental biology and medicine, 2001. **226**(7): p. 653-664.
64. Klenkler, B. and H. Sheardown, *Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology*. Experimental eye research, 2004. **79**(5): p. 677-688.
65. Zieske, J.D., et al., *Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration*. Investigative ophthalmology & visual science, 2000. **41**(6): p. 1346-1355.
66. Nakamura, Y., C. Sotozono, and S. Kinoshita, *The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis*. Experimental eye research, 2001. **72**(5): p. 511-517.
67. Jorissen, R., et al., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling*. Exp Cell Res, 2003. **284**: p. 31-53.
68. Ohashi, Y., et al., *Presence of epidermal growth factor in human tears*. Investigative ophthalmology & visual science, 1989. **30**(8): p. 1879-1882.
69. Maldonado, B.A. and L.T. Furcht, *Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide*. Investigative ophthalmology & visual science, 1995. **36**(10): p. 2120-2126.
70. Li, T. and L. Lu, *Epidermal growth factor-induced proliferation requires down-regulation of Pax6 in corneal epithelial cells*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(13): p. 12988-12995.

71. Lu, L., et al., *NF- κ B subtypes regulate CCCTC binding factor affecting corneal epithelial cell fate*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(13): p. 9373-9382.
72. Wang, J., A. Lin, and L. Lu, *Effect of EGF-induced HDAC6 activation on corneal epithelial wound healing*. Investigative ophthalmology & visual science, 2010. **51**(6): p. 2943-2948.
73. Imanishi, J., et al., *Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea*. Progress in retinal and eye research, 2000. **19**(1): p. 113-129.
74. Wang, L., et al., *Epidermal growth factor (EGF)-induced corneal epithelial wound healing through nuclear factor κ B subtype-regulated CCCTC binding factor (CTCF) activation*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(34): p. 24363-24371.
75. Chung, J.-H. and P. Fagerholm, *Treatment of rabbit corneal alkali wounds with human epidermal growth factor*. Cornea, 1988. **8**(2): p. 122-128.
76. Taniguchi, E., et al., *The effect of recombinant epidermal growth factor in corneal angiogenesis*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1991. **95**(1): p. 52-58.
77. Nezu, E., et al., *Recombinant human epidermal growth factor and corneal neovascularization*. Japanese journal of ophthalmology, 1992. **36**(4): p. 401-406.
78. Bottaro, D.P. and J.S. Rubin, *Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the c-met Proto-Oncogene Product*. Science, 1991. **251**(4995): p. 802.
79. Rosen, E.M., S.K. Nigam, and I.D. Goldberg, *Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction*. The Journal of cell biology, 1994. **127**(6): p. 1783-1787.
80. Wilson, S.E., et al., *Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea*. Investigative ophthalmology & visual science, 1993. **34**(8): p. 2544-2561.
81. Daniels, J.T., et al., *Human corneal epithelial cells require MMP-1 for HGF-mediated migration on collagen I*. Investigative ophthalmology & visual science, 2003. **44**(3): p. 1048-1055.
82. Saghizadeh, M., et al., *Normalization of wound healing and diabetic markers in organ cultured human diabetic corneas by adenoviral delivery of c-Met gene*. Investigative ophthalmology & visual science, 2010. **51**(4): p. 1970-1980.
83. Saghizadeh, M., et al., *Alterations of epithelial stem cell marker patterns in human diabetic corneas and effects of c-met gene therapy*. Molecular vision, 2011. **17**: p. 2177.
84. Kakazu, A., G. Chandrasekher, and H.E. Bazan, *HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad-but not the ERK1/2-mediated signaling pathway*. Investigative ophthalmology & visual science, 2004. **45**(10): p. 3485-3492.
85. Li, Q., et al., *Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea*. Investigative ophthalmology & visual science, 1996. **37**(5): p. 727-739.
86. Kakazu, A., G. Sharma, and H.E. Bazan, *Association of protein tyrosine phosphatases (PTPs)-1B with c-Met receptor and modulation of corneal epithelial wound healing*. Investigative ophthalmology & visual science, 2008. **49**(7): p. 2927-2935.

87. Wilson, S.E., J.J. Liu, and R.R. Mohan, *Stromal-epithelial interactions in the cornea*. Progress in retinal and eye research, 1999. **18**(3): p. 293-309.
88. Rubin, J.S., et al., *Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(3): p. 802-806.
89. Sotozono, C., et al., *Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth*. Experimental eye research, 1994. **59**(4): p. 385-392.
90. Wilson, S.E., et al., *Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding*. Experimental eye research, 1999. **68**(4): p. 377-397.
91. Roberts, A.B., *The ever-increasing complexity of TGF- β signaling*. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2002. **13**(1): p. 3-5.
92. Song, Q., et al., *TGF- β 1 regulates TGF- β 1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing*. Molecular Pathology, 2002. **55**(3): p. 164.
93. Welge-Lüen, U., et al., *Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis*. Current opinion in ophthalmology, 2001. **12**(2): p. 94-99.
94. Heldin, C.-H., *Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment*. Cell Communication and Signaling, 2013. **11**(1): p. 97.
95. Denk, P.O. and M. Knorr, *The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density*. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 1997. **235**(8): p. 530-534.
96. Wilson, S.E., et al., *The Corneal Wound Healing Response:: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells*. Progress in retinal and eye research, 2001. **20**(5): p. 625-637.
97. Jester, J.V., et al., *TGF β induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF β , PDGF and integrin signaling*. Experimental eye research, 2002. **75**(6): p. 645-657.
98. Dinbergs, I.D., L. Brown, and E.R. Edelman, *Cellular response to transforming growth factor- β 1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(47): p. 29822-29829.
99. Saghizadeh, M., et al., *Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas*. Experimental eye research, 2001. **73**(2): p. 179-189.
100. You, L., F.E. Kruse, and H.E. Völcker, *Neurotrophic factors in the human cornea*. Investigative ophthalmology & visual science, 2000. **41**(3): p. 692-702.
101. Rios, J.D., et al., *Role of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat conjunctival goblet cell secretion and proliferation*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2007. **48**(4): p. 1543.
102. Göbbels, M., M. Spitznas, and J. Oldendoerp, *Impairment of corneal epithelial barrier function in diabetics*. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 1989. **227**(2): p. 142-144.

103. Kruse, F.E. and S. Tseng, *Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium*. Investigative ophthalmology & visual science, 1993. **34**(6): p. 1963-1976.
104. Lambiase, A., et al., *Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory diseases*. Investigative ophthalmology & visual science, 1998. **39**(7): p. 1272-1275.
105. Bonini, S., et al., *Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis*. Ophthalmology, 2000. **107**(7): p. 1347-1351.
106. Blanco-Mezquita, T., et al., *Nerve Growth Factor Promotes Corneal Epithelial Migration by Enhancing Expression of Matrix Metalloprotease-9* NGF Promotes Epithelial Migration. Investigative ophthalmology & visual science, 2013. **54**(6): p. 3880-3890.
107. Anitua, E., et al., *Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery*. Experimental eye research, 2013. **115**: p. 153-161.
108. Fukuda, M., et al., *Fibronectin in the tear film*. Investigative ophthalmology & visual science, 1996. **37**(2): p. 459-467.
109. Nishida, T., *The role of fibronectin in corneal wound healing explored by a physician–scientist*. Japanese journal of ophthalmology, 2012. **56**(5): p. 417-431.
110. Lee, H.K., et al., *Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells*. Investigative ophthalmology & visual science, 2006. **47**(3): p. 873-882.
111. Trosan, P., et al., *The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process*. Stem cells and development, 2012. **21**(18): p. 3341-3350.
112. Yanai, R., et al., *Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells*. Experimental eye research, 2006. **83**(1): p. 76-83.
113. Li, D.Q. and S.C. Tseng, *Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial- fibroblast interactions of human ocular surface*. Journal of cellular physiology, 1995. **163**(1): p. 61-79.
114. Nakamura, M., et al., *Promotion of corneal epithelial wound healing in diabetic rats by the combination of a substance P-derived peptide (FGLM-NH2) and insulin-like growth factor-1*. Diabetologia, 2003. **46**(6): p. 839-842.
115. Zagon, I., J.W. Sassani, and P.J. McLaughlin, *Opioid growth factor modulates corneal epithelial outgrowth in tissue culture*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1995. **268**(4): p. R942-R950.
116. Zagon, I.S., et al., *Homeostasis of ocular surface epithelium in the rat is regulated by opioid growth factor*. Brain research, 1997. **759**(1): p. 92-102.
117. McLaughlin, P.J., et al., *Diabetic keratopathy and treatment by modulation of the opioid growth factor (OGF)–OGF receptor (OGFr) axis with naltrexone: a review*. Brain research bulletin, 2010. **81**(2): p. 236-247.

118. Zagon, I.S., J.W. Sassani, and P.J. McLaughlin, *Reepithelialization of the human cornea is regulated by endogenous opioids*. Investigative ophthalmology & visual science, 2000. **41**(1): p. 73-81.
119. Matsubara, M., J. Zieske, and M. Fini, *Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration*. Investigative ophthalmology & visual science, 1991. **32**(13): p. 3221-3237.
120. Ye, H.Q. and D.T. Azar, *Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing*. Investigative ophthalmology & visual science, 1998. **39**(6): p. 913-921.
121. Fini, M.E., et al., *Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury*. The American journal of pathology, 1996. **149**(4): p. 1287.
122. Dursun, D., et al., *Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids*. American journal of ophthalmology, 2001. **132**(1): p. 8-13.
123. Amemiya, T., *The eye and nutrition*. Japanese journal of ophthalmology, 2000. **44**(3): p. 320.
124. Sommer, A., *Effects of vitamin A deficiency on the ocular surface*. Ophthalmology, 1983. **90**(6): p. 592-600.
125. Peponis, V., et al., *Protective role of oral antioxidant supplementation in ocular surface of diabetic patients*. British Journal of Ophthalmology, 2002. **86**(12): p. 1369-1373.
126. Bilgihan, K., et al., *Effects of topical vitamin E on keratocyte apoptosis after traditional photorefractive keratectomy*. Ophthalmologica, 2001. **215**(3): p. 192-196.
127. Sotozono, C., et al., *Cytokine expression in the alkali-burned cornea*. Current eye research, 1997. **16**(7): p. 670-676.
128. Nishida, T., et al., *Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin- dependent mechanism*. Journal of cellular physiology, 1992. **153**(1): p. 1-5.
129. Boisjoly, H.M., et al., *Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis*. Experimental eye research, 1993. **57**(3): p. 293-300.
130. Malecaze, F., et al., *Interleukin-6 in tear fluid after photorefractive keratectomy and its effects on keratocytes in culture*. Cornea, 1997. **16**(5): p. 580-587.
131. Li, D.Q. and S.C. Tseng, *Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts*. Journal of cellular physiology, 1997. **172**(3): p. 361-372.
132. Girard, M.T., M. Matsubara, and M.E. Fini, *Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells*. Investigative ophthalmology & visual science, 1991. **32**(9): p. 2441-2454.
133. Soni, N.G. and B.H. Jeng, *Blood-derived topical therapy for ocular surface diseases*. British Journal of Ophthalmology, 2015: p. bjophthalmol-2015-306842.

134. Yamada, C., K.E. King, and P.M. Ness, *Autologous serum eyedrops: literature review and implications for transfusion medicine specialists*. Transfusion, 2008. **48**(6): p. 1245-1255.
135. Ralph, R.A., M.G. Doane, and C.H. Dohlman, *Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump*. Archives of ophthalmology, 1975. **93**(10): p. 1039-1043.
136. Jeng, B.H., *Use of autologous serum in the treatment of ocular surface disorders*. Archives of ophthalmology, 2011. **129**(12): p. 1610-1612.
137. Lekhanont, K., et al., *Topical 100% serum eye drops for treating corneal epithelial defect after ocular surgery*. BioMed research international, 2013. **2013**.
138. Pflugfelder, S.C., R.M. Corrales, and C.S. de Paiva, *T helper cytokines in dry eye disease*. Experimental eye research, 2013. **117**: p. 118-125.
139. Tsubota, K. and A. Higuchi, *Serum application for the treatment of ocular surface disorders*. International ophthalmology clinics, 2000. **40**(4): p. 113-122.
140. Quinto, G.G., M. Campos, and A. Behrens, *Autologous serum for ocular surface diseases*. Arquivos brasileiros de oftalmologia, 2008. **71**(6): p. 47-54.
141. Higuchi, A., et al., *Albumin rescues ocular epithelial cells from cell death in dry eye*. Current eye research, 2007. **32**(2): p. 83-88.
142. Kim, E.C., J.-S. Choi, and C.-K. Joo, *A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome*. American journal of ophthalmology, 2009. **147**(2): p. 206-213. e3.
143. Berman, M.B., *Collagenase inhibitors: rationale for their use in treating corneal ulceration*. International ophthalmology clinics, 1975. **15**(4): p. 49-66.
144. Fox, R.I., et al., *Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca*. Arthritis & Rheumatology, 1984. **27**(4): p. 459-461.
145. Tsubota, K., et al., *Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome*. British Journal of Ophthalmology, 1999. **83**(4): p. 390-395.
146. Tsubota, K., et al., *Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application*. Ophthalmology, 1999. **106**(10): p. 1984-1989.
147. Noble, B.A., et al., *Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease*. British Journal of Ophthalmology, 2004. **88**(5): p. 647-652.
148. Goto, E., et al., *Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum*. Cornea, 2001. **20**(8): p. 807-810.
149. del Castillo, J.M.B., et al., *Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum*. Cornea, 2002. **21**(8): p. 781-783.
150. Ogawa, Y., et al., *Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease*. Bone marrow transplantation, 2003. **31**(7): p. 579.
151. Azari, A.A. and C.J. Rapuano, *Autologous serum eye drops for the treatment of ocular surface disease*. Eye & contact lens, 2015. **41**(3): p. 133-140.

152. Phasukkijwatana, N., et al., *Stability of epitheliotropic factors in autologous serum eye drops from chronic Stevens-Johnson syndrome dry eye compared to non-autoimmune dry eye*. Current eye research, 2011. **36**(9): p. 775-781.
153. Fischer, K.R., et al., *Stability of serum eye drops after storage of 6 months*. Cornea, 2012. **31**(11): p. 1313-1318.
154. Poon, A.C., et al., *Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies*. British Journal of Ophthalmology, 2001. **85**(10): p. 1188-1197.
155. Kaya, F.S. and Y.A. Akova, *Çeşitli nedenlere Bağlı Göz Yüzeyi Sorunlarında Topikal Otolog Serum Damla Uygulamasının Epitelizasyona Etkisi ve Güvenilirliği*.
156. Liu, L., et al., *An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops*. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 2005. **243**(7): p. 706-714.
157. Pan, Q., et al., *Autologous serum eye drops for dry eye*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **8**.
158. Partal, A. and E. Scott, *Low- cost protocol for the production of autologous serum eye drops by blood collection and processing centres for the treatment of ocular surface diseases*. Transfusion Medicine, 2011. **21**(4): p. 271-277.
159. Botella, A.J., et al., *Effectiveness of 100% autologous serum drops in ocular surface disorders*. Farmacia Hospitalaria (English Edition), 2011. **35**(1): p. 8-13.
160. Jeng, B.H. and W.J. Dupps Jr, *Autologous serum 50% eyedrops in the treatment of persistent corneal epithelial defects*. Cornea, 2009. **28**(10): p. 1104-1108.
161. Takamura, E., et al., *Efficacy of autologous serum treatment in patients with severe dry eye*, in *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 32002*, Springer. p. 1247-1250.
162. Lagnado, R., et al., *A protocol for low contamination risk of autologous serum drops in the management of ocular surface disorders*. British Journal of Ophthalmology, 2004. **88**(4): p. 464-465.
163. S, E., *Kan ürünü gözyaşı takviyeleri*, ed. Y. A. Vol. Kuru Göz Hastalığı – Güncel Gelişmeler Işığında. 2010: Güneş Tıp Kitapevleri. 91-98.
164. Chiang, C., et al., *Allogeneic serum eye drops for the treatment of persistent corneal epithelial defect*. Eye, 2009. **23**(2): p. 290.
165. Yoon, K.-C., et al., *Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye syndrome*. Cornea, 2006. **25**(3): p. 268-272.
166. Yoon, K.-C., et al., *Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome*. American journal of ophthalmology, 2007. **144**(1): p. 86-92. e2.
167. Oh, H.-J., et al., *Effects of umbilical cord serum eye drops in a mouse model of ocular chemical burn*. Current eye research, 2012. **37**(12): p. 1084-1090.
168. Yoon, K.-C., et al., *Therapeutic effect of umbilical cord serum eyedrops for persistent corneal epithelial defect*. Korean Journal of Ophthalmology, 2005. **19**(3): p. 174-178.

169. Yoon, K., et al., *Therapeutic effect of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye associated with graft-versus-host disease*. Bone marrow transplantation, 2007. **39**(4): p. 231.
170. Yoon, K.-C., et al., *Application of umbilical cord serum eyedrops for recurrent corneal erosions*. Cornea, 2011. **30**(7): p. 744-748.
171. Yoon, K.C., et al., *Application of umbilical cord serum eyedrops after laser epithelial keratomileusis*. Acta ophthalmologica, 2013. **91**(1).
172. Yoon, K.C., *Use of umbilical cord serum in ophthalmology*. Chonnam medical journal, 2014. **50**(3): p. 82-85.
173. Katzman, L.R. and B.H. Jeng, *Management strategies for persistent epithelial defects of the cornea*. Saudi Journal of Ophthalmology, 2014. **28**(3): p. 168-172.
174. Sharma, N., et al., *Evaluation of umbilical cord serum therapy in acute ocular chemical burns*. Investigative ophthalmology & visual science, 2011. **52**(2): p. 1087-1092.
175. Zimmermann, R., et al., *Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application*. Transfusion, 2001. **41**(10): p. 1217-1224.
176. Anitua, E., *Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants*. International journal of Oral and maxillofacial Implants, 1999. **14**(4): p. 529-535.
177. Anitua, E., et al., *Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture*. Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(2): p. 281-286.
178. De Rötth, A., *Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes*. Archives of ophthalmology, 1940. **23**(3): p. 522-525.
179. Shukla, I., *Amniotic membrane grafts in corneal ulcer*. Indian Journal of Ophthalmology, 1962. **10**(3): p. 55.
180. Batmanov, I., K. Egorova, and L. Kolesnikova, *Use of fresh amnion in the treatment of corneal diseases*. Vestnik oftalmologii, 1990. **106**(5): p. 17-19.
181. Kruse, F.E., K. Rohrschneider, and H.E. Völcker, *Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers*. Ophthalmology, 1999. **106**(8): p. 1504-1511.
182. Lee, S.-H. and S.C. Tseng, *Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration*. American journal of ophthalmology, 1997. **123**(3): p. 303-312.
183. Sorsby, A. and H. Symons, *Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye:(Burns of the second degree)*. The British journal of ophthalmology, 1946. **30**(6): p. 337.
184. Sorsby, A., J. Haythorne, and H. Reed, *Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye*. The British journal of ophthalmology, 1947. **31**(7): p. 409.

185. Kim, J.C. and S.C. Tseng, *Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas*. *Cornea*, 1995. **14**(5): p. 473-484.
186. Meller, D. and S. Tseng, *Reconstruction of the conjunctival and corneal surface. Transplantation of amniotic membrane*. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 1998. **95**(12): p. 805-813.
187. Drøhse, H., et al., *Characterisation of non-maternal serum proteins in amniotic fluid at weeks 16 to 18 of gestation*. *Clinica chimica acta*, 1998. **276**(2): p. 109-120.
188. Johnson, A.M., et al., *Amniotic fluid proteins: maternal and fetal contributions*. *The Journal of pediatrics*, 1974. **84**(4): p. 588-593.
189. Galdhar, N., P. Ghaswala, and R. Miranda, *Protein profile of amniotic fluid in normal pregnancy*. *Indian journal of medical research*, 1987.
190. Haddow, J.E., et al., *Second trimester amniotic fluid protein values from normal, neural tube defect, and fetal demise pregnancies after exclusion of maternal blood contamination by testing for pregnancy-associated macroglobulin*. *Pediatric research*, 1978. **12**(3): p. 243-248.
191. Liberatori, S., et al., *A two- dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(15): p. 2816-2822.
192. Tisi, D.K., et al., *Insulin-like growth factor II and binding proteins 1 and 3 from second trimester human amniotic fluid are associated with infant birth weight*. *The Journal of nutrition*, 2005. **135**(7): p. 1667-1672.
193. Longaker, M.T., et al., *Studies in fetal wound healing, VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid*. *Journal of pediatric surgery*, 1990. **25**(4): p. 430-433.
194. Castro-Combs, J., et al., *Corneal wound healing is modulated by topical application of amniotic fluid in an ex vivo organ culture model*. *Experimental eye research*, 2008. **87**(1): p. 56-63.
195. Quinto, G.G., et al., *Effects of topical human amniotic fluid and human serum in a mouse model of keratoconjunctivitis sicca*. *Cornea*, 2012. **31**(4): p. 424-430.
196. Fujita, M., et al., *In poor families, mothers' milk is richer for daughters than sons: A test of Trivers–Willard hypothesis in agropastoral settlements in Northern Kenya*. *American journal of physical anthropology*, 2012. **149**(1): p. 52-59.
197. Michaelsen, K.F., et al., *Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk banking*. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 1990. **11**(2): p. 229-239.
198. Xiao, X., et al., *Therapeutic Effects of Epidermal Growth Factor on Benzalkonium Chloride–Induced Dry Eye in a Mouse Model*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2012. **53**(1): p. 191-197.
199. Pflugfelder, S.C., *Antiinflammatory therapy for dry eye*, 2004, Elsevier.
200. Bucolo, C., et al., *Effects of Topical Fucosyl-Lactose, a Milk Oligosaccharide, on Dry Eye Model: An Example of Nutraceutical Candidate*. *Frontiers in pharmacology*, 2015. **6**.

201. Rashid, S., et al., *Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye*. Archives of ophthalmology, 2008. **126**(2): p. 219-225.
202. Tseng, S., M. Farazdaghi, and A. Rider, *Conjunctival transdifferentiation induced by systemic vitamin A deficiency in vascularized rabbit corneas*. Investigative ophthalmology & visual science, 1987. **28**(9): p. 1497-1504.
203. El-Ghorab, M., et al., *Response of ocular surface epithelium to corneal wounding in retinol-deficient rabbits*. Investigative ophthalmology & visual science, 1988. **29**(11): p. 1671-1676.
204. McCollum, C.J., et al., *Rapid assay of lactoferrin in keratoconjunctivitis sicca*. Cornea, 1994. **13**(6): p. 505-508.
205. Goldman, A.S., *The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties*. The Pediatric infectious disease journal, 1993. **12**(8): p. 664-672.
206. Goldman, A.S. and C.W. Smith, *Host resistance factors in human milk*. The Journal of pediatrics, 1973. **82**(6): p. 1082-1090.
207. Garofalo, R., et al., *Interleukin-10 in human milk*. Pediatric research, 1995. **37**(4): p. 444-449.
208. Baricelli, J., et al., *β -defensin-2 in breast milk displays a broad antimicrobial activity against pathogenic bacteria*. Jornal de pediatria, 2015. **91**(1): p. 36-43.
209. Calhoun, D.A., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor serum and urine concentrations in neutropenic neonates before and after intravenous administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor*. Pediatrics, 2000. **105**(2): p. 392-397.
210. Kelleher, S.L. and B. Lönnerdal, *Immunological activities associated with milk*, in *Advances in nutritional research* 2001, Springer. p. 39-65.
211. Spear, H.J., *Breastfeeding & support*. Nursing for Women's Health, 2005. **9**(2): p. 181-184.
212. American, A., *Work Group on Breastfeeding: Breastfeeding and the Use of Human Milk*. Pediatrics, 1997. **100**.
213. Oechsner, M. and S. Keipert, *Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 1999. **47**(2): p. 113-118.
214. Calonge, M., *The treatment of dry eye*. Survey of ophthalmology, 2001. **45**: p. S227-S239.
215. Albietz, J.M. and A.S. Bruce, *The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments*. Current eye research, 2001. **22**(1): p. 8-18.
216. Ubels, J.L., et al., *Effects of preservative-free artificial tear solutions on corneal epithelial structure and function*. Archives of ophthalmology, 1995. **113**(3): p. 371-378.

217. Wilson, S.E., Q. Liang, and W.J. Kim, *Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding*. Investigative ophthalmology & visual science, 1999. **40**(10): p. 2185-2190.
218. Jirsova, K., et al., *The application of autologous serum eye drops in severe dry eye patients; subjective and objective parameters before and after treatment*. Current eye research, 2014. **39**(1): p. 21-30.
219. Tananuvat, N., et al., *Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients*. Cornea, 2001. **20**(8): p. 802-806.
220. Kojima, T., et al., *The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study*. American journal of ophthalmology, 2005. **139**(2): p. 242-246.
221. Noda-Tsuruya, T., et al., *Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK*. Journal of refractive surgery, 2006. **22**(1): p. 61-66.
222. Urzua, C.A., et al., *Randomized double-blind clinical trial of autologous serum versus artificial tears in dry eye syndrome*. Current eye research, 2012. **37**(8): p. 684-688.
223. Celebi, A.R.C., C. Ulusoy, and G.E. Mirza, *The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye syndrome: a randomized double-blind crossover study*. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology, 2014. **252**(4): p. 619-626.
224. Alvarado, V.M., et al., *Treatment of persistent epithelial defects using autologous serum application*. Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia, 2004. **79**(11): p. 537-542.
225. Chen, Y.-M., et al., *The effect of topical autologous serum on graft re-epithelialization after penetrating keratoplasty*. American journal of ophthalmology, 2010. **150**(3): p. 352-359. e2.
226. Hondur, A.M., et al., *Autologous serum eye drops accelerate epithelial healing after LASEK*. Current eye research, 2016. **41**(1): p. 15-19.
227. Ziakas, N.G., et al., *Long- term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions*. Clinical & experimental ophthalmology, 2010. **38**(7): p. 683-687.
228. Matsumoto, Y., et al., *Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy*. Ophthalmology, 2004. **111**(6): p. 1115-1120.
229. López-García, J., et al., *Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy*. Ophthalmology, 2008. **115**(2): p. 262-267.
230. Schulze, S.D., W. Sekundo, and P. Kroll, *Autologous serum for the treatment of corneal epithelial abrasions in diabetic patients undergoing vitrectomy*. American journal of ophthalmology, 2006. **142**(2): p. 207-211.
231. Stenwall, P.A., et al., *Improving the anti- inflammatory effect of serum eye drops using allogeneic serum permissive for regulatory T cell induction*. Acta ophthalmologica, 2015. **93**(7): p. 654-657.
232. Chiang, C.-C., et al., *Allogeneic serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease*. Cornea, 2007. **26**(7): p. 861-863.

233. Chiang, C., et al., *Allogeneic serum eye drops for the treatment of persistent corneal epithelial defect*. Eye, 2009. **23**(2): p. 290-293.
234. Na, K.-S. and M.S. Kim, *Allogeneic serum eye drops for the treatment of dry eye patients with chronic graft-versus-host disease*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2012. **28**(5): p. 479-483.
235. Harritshøj, L.H., et al., *Ready-made allogeneic ABO-specific serum eye drops: production from regular male blood donors, clinical routine, safety and efficacy*. Acta ophthalmologica, 2014. **92**(8): p. 783-786.
236. Versura, P., et al., *Efficacy of standardized and quality-controlled cord blood serum eye drop therapy in the healing of severe corneal epithelial damage in dry eye*. Cornea, 2013. **32**(4): p. 412-418.
237. Versura, P., et al., *Targeting growth factor supply in keratopathy treatment: comparison between maternal peripheral blood and cord blood as sources for the preparation of topical eye drops*. Blood Transfusion, 2016. **14**(2): p. 145.
238. Yoon, K., et al., *Therapeutic effect of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye associated with graft-versus-host disease*. Bone marrow transplantation, 2007. **39**(4): p. 231-235.
239. Erdem, E., et al., *Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects*. International journal of ophthalmology, 2014. **7**(5): p. 807.
240. Keelan, J.A., T. Sato, and M.D. Mitchell, *Interleukin (IL)-6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacterial lipopolysaccharide*. Biology of reproduction, 1997. **57**(6): p. 1438-1444.
241. Dudley, D.J., et al., *Amniotic fluid interleukin-10 (IL-10) concentrations during pregnancy and with labor*. Journal of reproductive immunology, 1997. **33**(2): p. 147-156.
242. Fukuda, H., H. Masuzaki, and T. Ishimaru, *Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in amniotic fluid and cord blood in patients with pre-term, premature rupture of the membranes*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2002. **77**(2): p. 123-129.
243. Özgenel, G.Y. and G. Filiz, *Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats*. Journal of neurosurgery, 2003. **98**(2): p. 371-377.
244. Al-Qattan, M., J. Posnick, and K. Lin, *The in vivo response of foetal tendons to sutures*. The Journal of Hand Surgery: British & European Volume, 1995. **20**(3): p. 314-318.
245. Quinto, G.G., et al., *Outcomes of different concentrations of human amniotic fluid in a keratoconjunctivitis sicca-induced mouse model*. International ophthalmology, 2016. **36**(5): p. 643-650.
246. Diego, J.L., et al., *Effect of human milk as a treatment for dry eye syndrome in a mouse model*. Molecular vision, 2016. **22**: p. 1095.
247. Ward, P., E. Paz, and O. Conneely, *Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview*. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2005. **62**(22): p. 2540-2548.

248. Andersen, J., *Technology evaluation: rh lactoferrin, Agennix*. Current opinion in molecular therapeutics, 2004. **6**(3): p. 344-349.
249. Fujihara, T., et al., *Lactoferrin Protects Against UV-B Irradiation–Induced Corneal Epithelial Damage in Rats*. Cornea, 2000. **19**(2): p. 207-211.
250. Pattamatta, U., et al., *Bovine lactoferrin stimulates human corneal epithelial alkali wound healing in vitro*. Investigative ophthalmology & visual science, 2009. **50**(4): p. 1636-1643.
251. Pattamatta, U., et al., *Bovine lactoferrin promotes corneal wound healing and suppresses IL-1 expression in alkali wounded mouse cornea*. Current eye research, 2013. **38**(11): p. 1110-1117.
252. Hancock, J.T., et al., *Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2002. **46**(10): p. 3308-3310.
253. Verd, S., *Switch from antibiotic eye drops to instillation of mother's milk drops as a treatment of infant epiphora*. Journal of tropical pediatrics, 2006. **53**(1): p. 68-69.