

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER CERRAHİ PROGRAMI**



**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
KORNEA ALKALİ YANIKLARININ TEDAVİSİNDE
AMNİYON SIVISININ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kemal KARABULUT

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ali Said DURMUŞ

Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cihan GÜNAY

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nuh KILIÇ

Prof. Dr. Cihan GÜNAY

Doç. Dr. Aydın SAĞLIYAN



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.


Kemal KARABULUT

Prof. Dr. Cihan GÜNAY
Danışman
Cerrahi Anabilim Dalı
ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren ve tezimin tüm aşamalarında, sabırla her konuda desteğini gördüğüm, çalışmalarım da engin mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, üzerimde çok büyük katkıları olan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cihan GÜNAY' a sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını gördüğüm Cerrahi Anabilim Dalının tüm öğretim üyelerine, ayrıca çalışmanın patolojik değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA' ya ve çalışmanın biyokimyasal verilerinin değerlendirmesinde yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Seval YILMAZ' a teşekkür ediyorum.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) tarafından VF.16.11 numaralı destek programı tarafından desteklenmiştir. Bu destekten dolayı FÜBAP' a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	TABLO LİSTESİ	vii
	ŞEKİL LİSTESİ	vii
1.	ÖZET	viii
2.	ABSTRACT	x
3.	GİRİŞ	1
3.1.	Gözün Anatomisi	1
3.1.1.	Göz Küresinin Anatomik Yapısı Ve Özellikleri	1
3.2.	Kornea Ulkusu ve Sebepleri	4
3.2.1.	Ulkus Kornea'nın Medikal ve Operatif Sağaltımı	5
3.2.2.	Kornea Ulkusunun Sağaltımında Amniyon Zarı Ve Amniyon Sıvısı'nın Kullanımı	8
4.	GEREÇ VE YÖNTEM	11
4.1.	Grupların Oluşturulması	11
4.2.	Anestezi Protokolü	11
4.3.	Korneada Alakali Yanık Oluşturma	11
4.4.	Amnion Sıvısının Hazırlanışı	12
4.5.	Amniyon Sıvısının Kullanımı ve Klinik Verilerin Elde Edilmesi	12
4.6.	Klinik Bulguların Tespiti	13
4.6.1.	Schymer Testi	13
4.6.2.	Rose Bengal Boyama Testi	13
4.6.3.	Fluorescein Boyama Testi	14
4.6.4.	Gözyaşı Kırılma Zamanı (GYKZ)	14
4.6.5.	Gözİçi Basıncının Ölçümü	15
4.7.	İstatistiksel Analiz	15
4.8.	Ötenazi	15
4.9.1.	Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler	17
4.9.2.	Kornea Dokusunda MDA Düzeyinin Tayini	17
4.9.3.	Kornea Dokusunda GSH Düzeyinin Tayini	17
4.9.4.	Kornea Dokusunda GSH-Px Aktivitesinin Tayini	18
4.9.5.	Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini	18
4.9.6.	Patolojik Verilerin Elde Edilmesi	18
4.9.6.1.	İstatistiksel Analiz	19
5.	BULGULAR	25
5.1.	Klinik Gözlem	25
5.2.	Biyokimyasal Bulgular	28
5.3.	Patolojik Bulgular	30
6.	TARTIŞMA	45
7.	KAYNAKLAR	53
8.	ÖZGEÇMİŞ	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Schymer test değerlerinin istatistiksel analizi	27
Tablo 2. Rose bengal ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi	27
Tablo 3. Fluroscein ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi	27
Tablo 4. Gözyaşı kırılma zamanı ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi	28
Tablo 5. Göz içi basınç ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi	28
Tablo 6. Biyokimyasal ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi	28
Tablo 7. Histopatolojik ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi	30



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Bulbus oculi'nin anatomik yapısı	1
Şekil 2. Karbondioksit inhalasyonu ile ötenazi	16
Şekil 3. Korneada alkali yanık oluşturulması	20
Şekil 4. Sehirmen testinin yapılışı	20
Şekil 5. Göz içi basınç ölçümü	21
Şekil 6. Rose bengal boyama testinin yapılışı	21
Şekil 7. Fluroscein testinin yapılışı	22
Şekil 8. Endirekt oftalmoskop	22
Şekil 9. Fluroscein boyama ve mavi kobalt ışık uygulaması	23
Şekil 10. Kontrol grubunda serum fizyolojik uygulaması	23
Şekil 11. Deney grubunda amniyon sıvısının uygulanışı	24
Şekil 12. Birinci grup 5. Gün	31
Şekil 13. Birinci grup 5. Gün	31
Şekil 14. İkinci grup 5. Gün	32
Şekil 15. İkinci grup 5. Gün	32
Şekil 16. Üçüncü grup 5. Gün	33
Şekil 17. Üçüncü grup 5. Gün	33
Şekil 18. Birinci grup 10. Gün	34
Şekil 19. Birinci grup 10. Gün	34
Şekil 20. İkinci grup 10. Gün	35
Şekil 21. İkinci grup 10. Gün	35
Şekil 22. Üçüncü grup 10. Gün	36
Şekil 23. Üçüncü grup 10. Gün	36
Şekil 24. Birinci grup 15. Gün	37
Şekil 25. Birinci grup 15. Gün	37
Şekil 26. İkinci grup 15. Gün	38
Şekil 27. İkinci grup 15. Gün	38
Şekil 28. Üçüncü grup 15. Gün	39
Şekil 29. Üçüncü grup 15. Gün	39
Şekil 30. Birinci grup 20. Gün	40
Şekil 31. Birinci grup 20. Gün	40
Şekil 32. İkinci grup 20. Gün	41
Şekil 33. İkinci grup 20. Gün	41
Şekil 34. Üçüncü grup 20. Gün	42
Şekil 35. üçüncü grup 20. Gün	42
Şekil 36. Daha hafif düzeyde ödem (*). H&E (1.grup)	43
Şekil 37. Orta düzeyde ödem (*) ve neovaskülarizasyon (okbaşı). H&E (2. grup)	43
Şekil 38. Normal histolojik görünüm. H&E (3. grup)	44

1.ÖZET

Ratlarda deneysel olarak oluşturulan kornea alkali yanıklarının tedavisinde amniyon sıvısının etkinliğinin araştırılması

Korneanın epitel bütünlüğünü bozan direkt veya indirekt sebeplerden kaynaklanan bir yıkımlanma olduğu zaman, mikroorganizmaların gözün epitelden geçişine izin vererek korneada ülserasyon başlatabilir. Kornea alkali yanıkları da korneanın bütünlüğünü bozarak ülser hatta perforasyona yol açabilirler. Kornea alkali yanıklarında sağaltım uygulanırken şu hususlara dikkat edilir. Kimyasal ajan ortamdan uzaklaştırılır ve reepitelizasyon yeniden oluşması sağlanır. Bunun için çok sayıda medikal tedavi seçeneği mevcuttur. Bunlardan biride amniyon zarı ve amniyon sıvısı uygulamalarıdır. Amniyon zarı barındırdığı çok sayıdaki büyüme faktörü sayesinde epitelizasyonu hızlandırır, fibroblastik aktiviteyi artırır ve böylece kollajen sentezine katkıda bulunarak ağrı ve enflamasyonu azaltıcı etki gösterir. Bu çalışma korneada deneysel olarak oluşturulan alkali yanıklar üzerine amniyon sıvısının etkinliğini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada toplam 30 adet dişi albino rat kullanıldı. Ratlar rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. I. ve II. gruplarda anestezi altında sağ gözlerde alkali yanık oluşturuldu. Bu amaçla 3 mm'lik filtre kağıdına emdirilen 2 N NaOH solüsyonu 40 saniye süreyle kornea üzerinde bekletildi. III. Grupta ise herhangi bir işlem yapılmadı. Yirmi gün süreyle I. ve III. gruptaki ratlara sıgır amniyon sıvısı, II. gruptaki ratlara ise serum fizyolojik günde 3 kez ikişer damla damlatıldı. Bu süre içerisinde oküler bulgular indirekt oftalmoskop ile korneadaki klinik iyileşme fluroscein ve rose bengal boyama kullanılarak değerlendirildi. Yirminci günün

sonunda tüm gruplardaki ratlara ötenazi uygulandı. Korneadaki epitel iyileşme histopatolojik ve biyokimyasal olarak da incelendi.

Klinik muayeneler sonunda gözyaşı sekresyonu, gözyaşı kırılma zamanı (GYKZ), fluroscein ve rose bengal boyama sonucu ile elde edilen bulgular amniyon sıvısı uygulanan I. grupta daha tatmin ediciydi, kontrol grubundaki ratlarda elde edilen sonuçlar birinci gruba göre daha kötüydü. Yapılan biyokimyasal değerlendirmelerde ise I. gruptaki ratlarda korneadaki GSH-Px, MDA ve GSH düzeylerindeki artış biyokimyasal olarak ortaya konulmuştur. Histopatolojik muayenelerde ise II. gruptaki ratların kornealarında I. gruba göre ödem ve vaskülarizasyon oldukça yaygın bir durumdaydı.

Sonuç olarak amniyon sıvısının kornea alkali yanıklarında etkili olduğu, medikal ya da operatif tedaviye ek olarak kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: kornea, alkali yanık, amniyon

2. ABSTRACT

Investigation of the efficacy of amniotic fluid in the treatment of experimental alkaline burns generated experimentally in rats

It can initiate ulceration in the cornea by allowing epithelial passage through the eye of microorganisms when it is caused by direct or indirect causes of corneal epithelial integrity. Corneal alkaline burns may also cause perforation of the ulcer by disturbing the integrity of the cornea. When treating corneal alkaline burns, pay attention to the following points. The chemical agent is removed from the medium and the re-epithelialization is regenerated. There are many medical treatment options available for this. Some of them are amniotic membrane and amniotic fluid applications. Due to the numerous growth factors that amnion possesses, the epithelium accelerates, fibroblastic activity increases and thus it contributes to the collagen synthesis and has a pain and inflammation reducing effect. This study was conducted to investigate the efficacy of amniotic fluid on experimental burned alkaline burns in the cornea.

A total of 30 female albino rats were used in the study. The rats were randomly divided into 3 equal groups. In the first and second groups under anesthesia, alkaline burns were formed, waiting of the 2N OH solution, which was saturated on 3 mm filter paper, for 40 seconds on the cornea in the right eyes. No action was taken in the third group. 3 times a day for 20 days, two drops of the cow's amniotic fluid was dripped in the first group of rats, when two drops of saline was dripped in the second and third group of rats. During this time ocular findings were evaluated by using indirect ophthalmoscope and, clinical improvement in corneal was also evaluated by using fluorescein and rose bengal painting. At the end of the 20th day, rats in all groups were euthanized. The epithelial healing in cornea was also studied histopathologically and biochemically.

At the end of the clinical examinations, tear secretion, break time of tear (TBUT) and findings obtained from the result of fluorescein and rose bengal painting, were more satisfying in the second group where amniotic fluid applied,

the results obtained in the rats in the control group were worse than the first group. In the histopathological and biochemical evaluations, epithelial healing in cornea of the first group of rats was revealed histopathologically, while the increase in levels of GSH-Px, MDA and GSH in the cornea was revealed biochemically.

As a result, it has been concluded that amniotic fluid was effective in the corneal alkaline burns and therefore it would be useful to use it in addition to the medical or operative treatment.

Key words: cornea, alkaline burn, amnion.

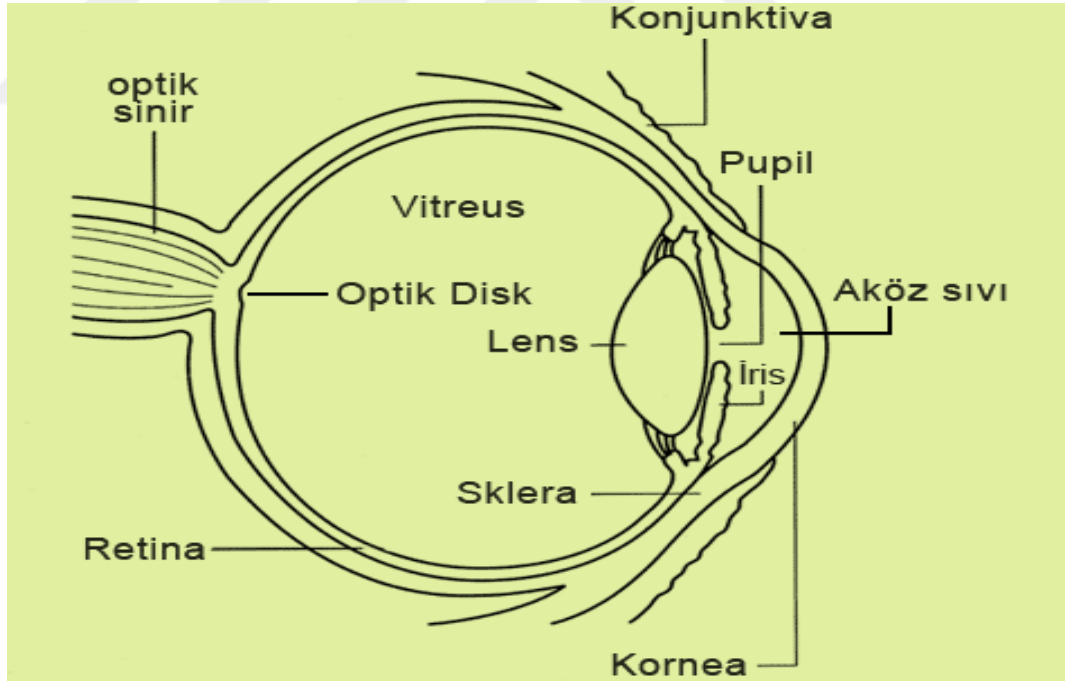


3. GİRİŞ

3.1. Gözün Anatomisi

3.1.1. Göz küresinin anatomik yapısı ve özellikleri

Orbita içinde bulunan göz, kemik duvarlar ile korunmaktadır. Gözün sadece ön bölümü dış ortam ile temas halindedir. Göz yuvarlağının öndeki en çıkıntılı noktası korneanın merkezi kısmını oluşturur. Bu kısma polus anterior denir. Göz yuvarlağının arkasındaki en çıkıntılı noktası ise polus posterior olarak adlandırılır. Bulbus oculi üç katmandan oluşur. Bunlar sırasıyla Tunica fibrosa bulbi, Tunica vasculosa bulbi, Tunica interna bulbi'dir. Bulbus oculinin içinde ise corpus vitreum, lens ve humor aquoeus yer alır (1-4).



Şekil 1. Bulbus oculi'nin anatomik yapısı

Kornea; humör aköz, lens ve korpus vitreum ile beraber bulunan ve gözün kırıcı ortamlarını oluşturan bir yapıdır. Kornea, avasküler yani damarsız ve

saydam yapıdadır, 43.25 diyoptri kırıcılığa sahip olup dış yüzünün vertikal ve horizontal çapı hayvan türlerine göre farklılık gösterir. Korneanın merkezi daha yuvarlak, periferik kısımları daha düzdür (1-5).

Kornea, tunica fibrosa bulbinin saydam ve damarsız bir dokusu olup oldukça büyük bir yapıya sahiptir ve tunica fibrosa bulbinin ön bölümünde bulunmaktadır. Sclera ile birleşme yerinde limbus adı verilen ve onu çevreleyen bir çukur vardır (3-8).

Korneanın katmanları önden arkaya doğru epithelium anterius cornea, bowman membranı (lamina limitans anterior), stroma (substantia propria cornea), descemet zarı (lamina limitans posterior), endotelium epitelyum (epithelium posterior cornea)'dır (1-4).

Korneal epitelyum keratinsiz ve 8-10 tabakası bulunan, ayrıca 3-6 hücre tabakasından oluşmuş bir yapıdır. Desmozomlar aracılığı ile hücreler birbirine bağlanırlar. Sürekli olarak çoğalan epitel hücreleri aşınma ve yırtılmaya karşı kendini yeniler. Nervus trigeminus'un ophthalmic kollarında fazla sayıda duyu sinir ağsı bulundurmasından dolayı dokunma ve ağrıya duyarlıdır. Ayrıca kornea'nın kırıcılık ve koruyuculuk gibi görevleri de vardır. Retinaya giden ışık demetleri buradan yani kornedan geçerler. Epitel, kornea enfeksiyonlarına karşı güvenilir bir engeldir. Bir enfeksiyon ajanının stromaya yerleşmesinden önce genellikle epitelin travmaya uğraması gerekir. Epitel mikroorganizmaların kornea içine girmelerine karşı güvenilir bir engeldir. Fakat epitel yaralandığında damarsız stroma ve bowman zarı, çeşitli organizmalar için ve özellikle Pseudomonas aeruginosa için uygun bir ortam hazırlar. Descemet zarı, mantarlar hariç bakterilerin çoğuna karşı koyar (3-5).

Korneanın katmanlarından olan Bowman zarı saydam ve hücresiz bir tabaka olup stromanın yüzeysel katlarının değişikliği sonucu oluşmuştur. Bowman membranı kalınlığı yaklaşık olarak 8-15 μm dir. Bowman tabakası şeffaftır ve rejenarasyon özelliği yoktur. Bowman tabakası gözü travma ve bakteriyel invazyonlardan koruyan tabakalardan biridir, ayrıca epitel tabakasını, alttaki bağ dokusuna bağlanmasını sağlar. Altta bulunan bağ dokusunun dış tabakasının parçası olup gerçek bir membran değildir (1-5).

Korneanın stroması kornea kalınlığının % 90 'nını oluşturur ve lamellerden oluşmuştur. Stroma lamelleri kornea yüzeyine paraleldir ve birbirilerine örgü gibi sarılmışlardır. Primer olarak keratin sülfat ve kondritin sülfat yapısında mukopolisakkarit bir ara madde içerisinde bulunmaktadır. Yapısında daha çok Tip I, az miktarda Tip III ve Tip V kollajen ve çok az keratosit ve kollajen içerir. Keratositler, kollajen lifleri ve ara maddeyi sentezler ve fagositoz ve onarım olaylarında da görev alırlar. Kollajen liflerin düzenli dizilimi, kan damarı bulunmaması ve keratositler dışında hücre bulunmaması korneanın saydamlığını sağlayan ana faktörlerdir (7-11).

Korneanın kan gereksinimi limbus damarlarıyla sağlanır. Besleyici maddeler damarsız kornea içinde limbustan geçerler bir miktar oksijende atmosferden alınır. Korneada kan ve lenf damarları bulunmaz. Beslenmesi lamellalar arasındaki aralıklarda bulunan doku sıvısı aracılığı ile yani difüzyon ile olur. Kornea su yönünden fakirdir. Endotel hücrelerinin tahribi kornea'nın belirli bir şekilde şişmesine ve saydamlığının kaybetmesine yol açar. Epiteldeki madde kaybı kornea stroma yapısında hafif ve geçici yerel bir şişmeye neden olur. Epitel

hücrelerinin hızla yenilenmesinden sonrada kornea stroması saydamlaştırır (11-13).

3.2. Kornea Ulkusu ve Sebepleri

Kendiliğinden iyileşmeyen kornea epitelyumu ve stroma ile birlikte bulunan, doku kayıpları ile karakterize yangısal olgulara keratitis ülseravita veya ulkus kornea denir. Kornea ulkusu kronik karakterlidir ve iyileşme olayları çok yavaş gözlenir. Ancak küçük çaplı ulkus kornea olgularında iyileşme daha hızlıdır. Ulkus kornea'nın nedenleri eksojen ve endojen olmak üzere iki guruba ayrılmaktadır. Genelde göz travmalarının evcil hayvanlarda ulkus kornea oluşumunda başlıca sebep olduğu kabul edilmekte olup bazen endojen nedenlerinde birlikte olduğu gözlenir. Eksojen sebepler olarak gözde travma oluşturan ve gözün epitel tabakasına kadar defekt oluşturabilen yabancı cisimler, ot başakları, tırmık yaraları gibi önemli etiyolojik sebepleri sayılabilir. Ayrıca kornea ulkus'u oluşumunda enfeksiyonların, viral hastalıkların, mantarların ve immunité bozukluklarının da etkileri oldukça fazla gözlenmektedir (14-18).

Veteriner oftalmolojide, gözde travmaya yol açan mekanizmanın etkili olmasında gözün anatomik yapısının büyük ölçüde önemi vardır. Brachiocephal kafa yapısına sahip bazı ırklarda buftalmik gözlerin kornea ülserine yakalanma riski oldukça fazladır. Kornea ulkus'undan sorumlu tutulan diğer bir durum ise göz kurumalarıdır. Göz kurumaları direkt ya da endirekt olarak epitelilum yıkımında rol aldığı düşünülmektedir. Ayrıca gözyaşı filminin yetersizliği kornea defektlerinin oluşmasında etkili olduğu ve precorneal tear fim (PTF) kompozisyonundaki eksikliğe bağlı olarakta ulkus olduğu bilinmektedir. Bakteriler kornea enfeksiyonlarında ender olarak primer bir etki ile kornea

ülserlerine neden olurlar. Entropiyon, ektropiyon, distişiasis, keratokonjunktivitis sikka, yabancı cisimlerin korneaya batması veya membrana niktians'ın altına yerleşmesi konjunktival litiasis, göz kapağı tümörleri, kimyasal yanıklar, ektopik siliya, köpek gençlik hastalığı, mikotik etkenler, immün sistem bozuklukları ve daha birçok bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar ulkus korneaya neden olabilirler. Yapılan araştırmalara göre; bakteriyel enfeksiyonların en çok streptokok ve stafilokoklardan ileri geldiği kaydedilmiştir. Pseudomonase'lar ise, proteolitik enzimlerin serbest hale gelmesi ile kornea epitelinde bir yıkımlanma oluşumundan sorumlu oldukları bilinmektedir (19-21).

Yapay olarak korneada kimyasal alkali yanık yani ulcus kornea yarası oluşturmak mümkündür. Korneada alkali yanık oluşturan bazı kimyasal maddeler; sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), amonyum hidroksit (NH₄OH), magnezyum hidroksit (MgOH₂), kalsiyum hidroksittir (CaOH₂) ve çinko klorür'dür. Bunlardan magnezyum hidroksit havai fişeklerin, diğerleri temizlik malzemelerinin yapısında bulunmaktadır. Bu kimyasal maddeleri kullanarak korneanın epitel tabakası üzerinde çeşitli yöntemlerle alkali yanık oluşturulması mümkündür (8-10, 15, 22, 23).

3.2.1. Ulkus Kornea'nın Medikal ve Operatif Sağaltımı

Gözün travmaya uğramadığı ve korneanın bütünlüğünün bozulmadığı durumlarda kornea epitelyumu, enfeksiyonlara karşı oldukça direnç gösterir. Epitelyumun bütünlüğünü bozan direk veya indirek sebeplerden kaynaklanan bir yıkımlanma olduğu zaman, mikroorganizmaların kornea epiteline geçişini kolaylaştırır ve sonuçta korneda ülserasyonla yol açabilir. Korneal hastalıklarda sıklıkla karşılaşılan ve dört aşamada değerlendirilen lezyonlar ortaya çıkar. Bu

lezyonları derinliğine göre sınıflandıracak olursak; epiteliyal defekt, epiteliyal ve ön stromal defekt, derin stromal defekt ve endotelle birlikte tüm katların defekti olarak sınıflandırabilir. Korneal defektler erken müdahale edilmediğinde ya da uygun bir sağıltım yapılmadığında çok kısa bir süre içerisinde ulkus kornea gelişebilir ve korneanın derin katlarına kadar inerek korneal damarlaşma, uveitis, panoftalmi hatta perforasyon gibi önemli komplikasyonlara yol açabilir. Normal olarak kornea epitelinin bazal hücre tabakası mitoz bölünme ile 7-10 günlük bir sürede düzenli olarak yenilenir ve tekrar eski haline geri dönebilir. Yüzeydeki epitel hücreleri prekorneal gözyaşı filmine dökülür. Bazal tabakadaki hücreler ise sürekli olarak çoğalıp kendilerini yenilerler ve bu hücrelerin yerine geçerler. Korneada yara iyileşmesi çevredeki sağlıklı epitel hücrelerinin defektli alanı kapatıp epitel hücrelerinin bu alana göç ederek defektli alanı kapatmaya yönelik rejenerasyonu ve stromal yara iyileşmesi olmak üzere üç ayrı aşamadan geçerek iyileşmeyi sağlarlar (7-10, 17, 18, 24, 25).

Sağıltımdaki temel prensip mevcut ağrıyı hafifletmek hatta ağrıyı tamamen ortadan kaldırarak, perforasyon oluşmasına engel olmak, oluşmuş olan enfeksiyon varsa bunu ortadan kaldırmak, sikatrizasyonu hızlandırmak ve sikatrize dokunun bırakacağı görünüş ve kalıcı hasarları en alt seviyeye indirmektir. Sağıltım, medikal ya da operatif olarak yapılabilir. Ağrıyı azaltmak ve enfeksiyonu ortadan kaldırmak için lokal ilaç uygulamaları, antikoagulanlar, medroksiprogesteron, sodyum askorbat, sodyum sitrat, penisillamin, tetrasiklin, tiol peptitler, aprotinin ve polisülfat glikozaminoglikan, heparin, kan serumu,) ile vitamin (A, B2, B12, C) uygulamaları kısa sürede etkili olabilen birer medikal

tedavi şekilleridir. Kronik olguların tedavisinde yapılacak olan ilk şey, altta yatan nedeni yok etmek veya belirli bir seviyeye kadar sınırlamaktır. Kronik kornea defekti bulunan gözde, göz kapaklarında bir anomali varsa ve özellikle göz kapağı konjunktivası hasara uğramışsa bu durumlarda korneadaki epitelizasyon kaybı daha da artar. Yapılan tedavi yöntemlerinde, kornea epitelinde gerçekleşen kornea epitel hücre hasarı küçük ise hücre hasarını takiben hücre göçü ile en kısa zamanda hasar kapatılmaya çalışılır. Epitel göçü, hücre hasarından hemen sonra başlar ve bu işlem dakikalar içerisinde oluşur. Daha büyük kornea epitelium hasarlarında saatler süren iyileşme gecikmeleri olabilir. İyileşme bazal tabakadaki hücreler filopodia, lamellopodia ve tırtıklı kenarlar gibi uzantılarla hareket yeteneği kazanarak bazal lamina üzerinden defektif alana doğru göç ederler. Defekt tamamen kapanıp ortadan kalkıncaya kadar hareket sürer ve iyileşme gerçekleşir (8-10, 13, 14, 17, 20, 26, 27).

Kimyasal kazadan sonra gözün epitel yapısında bir hasar şekillenir. Gözde kimyasal hasarın şiddeti; temasın olduğu yüzey alanına, temasın etkime süresine, etkileyen kimyasal ajana ve penetrasyonun derecesine bağlıdır. Kimyasal kazadan veya yapay olarak oluşturulan kornea epitel yıkımlanmasına bağlı olarak gözde şiddetli bir ağrı, blefarospazm, gözyaşı akıntısı, lökosit infiltrasyonu nedeni ile korneanın bulanıklaşması ve değişik derecelerde korneada damarlaşma gibi klinik belirtiler ortaya çıkabilir. Kimyasal kazaların medikal olarak sağaltımında genellikle 4 ana kriter mevcuttur. Bu kriterler; kimyasal ajanın ortamdan uzaklaştırılması, reepitelizasyonun yani epitel dokunun yeniden oluşumunun sağlanması, buda keratositler aracılığıyla kollajen dokunun yeniden oluşturulması ile olur (15, 20, 22).

Operatif tedavi ise; çizgi veya nokta keratotomi, penetran veya lamellar keratoplasti, konjunktival flap uygulamaları, koterizasyon ve yumuşak kontakt lens şeklinde sıralanabilir (9, 12).

3.2.2. Kornea Ulkusunun Sağaltımında Amniyon Zarı Ve Amniyon Sıvısı'nın Kullanımı

Amniyon zarı'nın oftalmolojide kullanımı yaygındır. Tıpta ilk olarak 1910 da Davis tarafından deri transplantasyonunda kullanılmıştır. Oftalmolojide kullanımı ise De Roth tarafından 1940 yılında yeni alınmış bir korion tabakası ile diğer konjunktiva epitelyum defektlerinin tedavisinde kullanılmış ama pek fazla başarı elde edilememiştir. Amniyon sıvısı ve amniyon membranının başlıca kullanıldığı yerler, konjunktiva da ptergium cerrahisi, kimyasal yanıklar, periokuler yüzey neoplazileri, bleb sızıntısı, filtran cerrahi, simblefaron tedavisi, konjunktival şelazyon, entropiyon, sikatrizan konjunktivit gibi olgularda kullanılmıştır. Kornea'da yaygın epitel bozuklukları, iyileşmeyen kornea ülseri, tam ya da kısmi limbal kök hücre yetmezliği, büllöz keratopati, sklera erimesi gibi olgularda da kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca persistan epitel defektlerinde amniyon zar transplantasyonu, desmatosel oluşumu ve kornea perforasyonunda da amniyon zar transplantasyonu kullanılmaktadır (23-32).

Amniyon zarı plasentanın en iç kısmında bulunan tabakasıdır ve 0.02- 0.05 mm kalınlığındadır. Amniyon zarı 3 tabakadan oluşmakta olup bunlar; tek katlı epitel tabakası, kalın bir bazal membran tabakası ve avasküler yapıdaki hiposellüler stromal matriksden oluşmaktadır. Bazal membran ile epitel tabakası arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Stroma kompakt, fibroblast ve süngerimsi olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Kompakt tabaka hücrelerden yoksun retiküler

ağlardan oluşan sıkı bir tabakadır. Fibroblast tabaka en kalın tabakadır ve stroma içine gömülmüş fibroblast hücrelerinden oluşur. En dıştaki süngerimsi tabaka ise amniyon ile koryon arasındaki tabaka olup musin içinde retikulum kolları içerir (33-36).

Amniyon sıvısı; amniyon zarındaki hücrelerden, desidual hücrelerden, desidual oluşumlardan ve fetusun deri, sindirim sistemi, solunum sistemi ve boşaltım sisteminden dökülen hücrelerin olduğu bir sıvıdır. %99 su, inorganik ve organik maddelerden, tuzlardan ve fetustan dökülen epitel hücrelerden oluşur. Organik bileşiklerin yarısı protein diğer yarısı da karbonhidrat, yağ, enzim, hormon ve pigmentlerden ibarettir (32-36).

Amniyotik membran ve amniyon sıvısı, hücre epitelizasyonunu hızlandırarak yara yüzeyinde protein ve sıvı kaybını önlerler böylece adhezyon oluşumunun azalmasını sağlarlar, bununla birlikte antibakteriyel ve non-immünolojik bir güce sahip olmakla beraber fibroblastik aktiviteyi artırır. Böylece kollajen sentezine katkıda bulunarak anjiyogenezis sayesinde ağrı ve enflamasyonu azaltıcı etki gösterirler. Ayrıca kolay ve çabuk elde edilebilen ve değeri giderek artan biyolojik bir üründür (37-47).

Amniyon zarı stromasında tip I, III, IV ve VII kollajenler, laminin, fibronektin ve hyaluronik asit bulundurur. Amniyon zarı stroması hyaluronik asitten zengindir, stromasında büyüme faktörleri, antianjiyogenik ve antienflamasyon proteinleri ve değişik proteazların inhibitörleri vardır bunlar enflamasyonu baskılar, nedbeleşmeyi önler, istenmeyen keratosit apoptozisini azaltır ve sentezlenen hücre dışı matriksi azaltır. Amniyon zarının stroması

damarsız olduğundan dolayı yeni damar oluşumunu önlediği düşünülmekte olup ayrıca amniyon membran hücrelerinin vasküler endotel hücrelerinde büyüme ve migrasyonu inhibe etmelerinden dolayı yeni damar oluşumunu baskıladığı ifade edilmiştir. Amniyon bazal membranının, epitel hücrelerinin göçünü hızlandırmak, epitelin farklılaşmasını desteklemek, hücreleri apoptozisten korumak gibi mekanizması tam açıklanamayan biyokimyasal özellikleri vardır. Amniyon zarının stromasında epidermal büyüme faktörleri, keratinosit, hepatosit ve fibroblast bulunmaktadır. Amniyotik membran, mat, pürüzlü, ve yapışkan bir özelliğe sahip olduğu için uygulandığı bölgeye iyi uyum sağlarken, yapışmayan dış yüzeyi sayesinde dokular arasında biyolojik bir bariyer gibi görev yaparak adezyon oluşumunu engellediği bildirmektedir (37-47).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Grupların Oluşturulması

Materyal olarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen toplam 30 adet dişi, erişkin, 250-300 gram ağırlığında Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışmaya Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri ve Etik Kurulu resmi onayı alındıktan sonra başlandı. Ratlar özel kafesler içerisinde tutuldu ve özel laboratuvar koşulları uygulandı ($24\pm3^{\circ}\text{C}$ %40-60 nem, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık). Beslenmesi standart pelet yem kullanılarak yapıldı. Ratlar rastgele 3 eşit gruba ayrıldı. I. grup uygulama grubu olarak seçildi bu gruptaki ratların sağ gözlerinde alkali yanık oluşturuldu ve 20 gün süreyle sıgır amniyon sıvısı uygulandı. II. Grup pozitif kontrol grubu olarak seçildi bu gruptaki ratların sağ gözlerinde alkali yanık oluşturuldu ve 20 gün süreyle serum fizyolojik uygulandı. III. Gruptaki ratlar negatif kontrol grubu olarak seçildi ve bu gruptaki ratlara da herhangi bir işlem yapılmadan 20 gün süreyle sıgır amniyon sıvısı uygulandı.

4.2. Anestezi Protokolü

Korneada alkali yanık oluşturulması için, ratlar genel anesteziye alındı. Bu amaçla intramusküler 4 mg/kg xylazine hidroklorür (Rompun®; 23.32mg/mL, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve yine intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®; 50 mg/mL, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) uygulandı.

4.3. Korneada alkalik yanık oluşturma

Anestezi ve asepti-antisepsi kurallarına uyularak ratlar anesteziye alındıktan sonra korneada alkali yanık oluşturulmadan önce % 0.5 lik proparakain (ALCAINE %0.5 Alcaine ophtalmic solusyon 0.5%, Alcon Laboratories, İstanbul,

Turkey) ile lokal anestezi oluşturuldu. Kornea alkali yanık I. ve II. gruptaki ratlar için uygulandı. Bunun için 3 mm çapında bir filtre kağıdına 2 N NaOH emdirilerek 40 sn kornea üzerinde bekletilerek oluşturuldu. Alkali yanık her iki grupta da yalnızca sağ gözlerde oluşturuldu. Alkali ajana maruz bırakıldıktan sonra gözler serum fizyolojik ile 2 dk boyunca yıkandı.

4.4. Amniyon sıvısının hazırlanışı

Sağlıklı gebe ineklerin yapılan sezeryan operasyonundan sonra elde edilen amnion sıvısı kullanıldı. Operasyondan hemen sonra steril şartlarda toplanan amniyon sıvısının laboratuvarda bakteriyolojik muayeneleri yapıldıktan sonra sağlıklı oldukları anlaşılan amnion sıvıları 2000 devirde 15 dakika süreyle santrüfjüj edilerek, santrüfjüj sonunda üstte kalan ve supernatant diye ifade edilen kısım alınarak steril tüplere yerleştirildi ve -20 °C sıcaklıkta bekletildi. Kullanıma başlamadan 1 gün önce +4 °C de bekletilen amnion sıvısı göze damlatma şeklinde kullanıldı (37).

4.5. Amniyon sıvısının kullanımı ve klinik verilerin elde edilmesi

I. ve III. gruptaki ratlara sığır amniyon sıvısı (günde 3 kez 2 damla 20 gün süreyle), II. grubundakilere ise yalnızca serum fizyolojik (günde 3 kez 2 damla 20 gün süreyle) uygulandı. Klinik muayeneler günlük olarak yapıldı ve korneadaki iyileşmeler makroskopik olarak tespit edildi. Bu amaçla sehirmer gözyaşı testi, gözyaşı kırılma zamanı (GYKZ), rose bengal boyama, fluorescein boyama ve göz içi basınç ölçümleri yapıldı.

4.6. Klinik bulguların tespiti

Tüm gruplarda 1, 5, 10, 15 ve 20. günlerde (schymer testi, rose bengal boyama, fluroscein boyama ve gözyaşı kırılma zamanı tayini yapıldı.

Bunun dışında çalışma süresince ratlarda görülmesi muhtemel fotofobi, gözyaşı akıntısı, kızarıklık, konjktivit, korneal ödem, korneal vaskülarizasyon gibi oküler değişiklikler ‘‘HEINE OMEGA®500 INDIREKTES BINOKULARES OPHTHALMOSKOP GERMANY’’ marka bir oftalmoskop ile kaydedi.

4.6.1. Sehirmer testi

Bu amaçla ZONE-QUICK (SHOMA YAKUHN KAKO CO. LTD. TOKYO/JAPAN) marka bir gözyaşı ölçüm ipliği kullanıldı. Bunun için herbir rat uzman kişilerce dikkatli bir şekilde tutularak iplikcik sağ alt göz kapağının konjktival boşluğuna yerleştirildi. Bir dakika sonra alınarak gözyaşı miktarı kendi ölçüm çubuğunda değerlendirildi.

4.6.2. Rose bengal boyama testi

Bu testte ratların sağ gözlerine bir mikro enjektör ile (901 N, Hamilton, A.B.D.) ile % 1 Rose bengal (Institut Pourquier, Montpellier France) boyasından 1 µl damlatıldı. Uygulamadan 5 dakika sonra boyanmış olan kornealar indirekt oftalmoskop ile ve 20 dioptrilik bir lup kullanılarak beyaz ışık altında muayene edildi. Bu parametre ile korneada saptanan değişimler şu şekilde derecelendirildi (5, 26).

0: hiç boyama yok

1: hafif boyama

2;orta derceli boyama

3; yaygın boyama

4.6.3. Fluroscein boyama testi

Bu testte ratların sağ gözlerine bir mikro enjektör ile (901 N, Hamilton, A.B.D.) ile % 1 lik sodyum fluroscein'den (Bereket Kimya Lab. İstanbul, Türkiye) boyasından 1 µl damlatıldı. Uygulamadan 5 dakika sonra boyanmış olan kornealar indirekt oftalmoskop ile ve 20 dioptrilik bir lup kullanılarak kobalt mavisi filtresi altında muayene edildi. Bu parametre ile korneada saptanan değişimler şu şekilde derecelendirildi (5-26).

0: tüm korneal yüzeyin hiç boyanmamış olması

1: tüm korneal yüzeyin 1/8 ya da daha az bir kısmının boyanması

2: tüm: tüm korneal yüzeyin ¼ ya da daha az bir kısmının boyanması

3: tüm korneal yüzeyin ½ ya da daha az bir kısmının boyanması

4: tüm korneal yüzeyin boyanması

4.6.4. Gözyaşı kırılma zamanı (GYKZ)

Ratların sağ gözlerine %1 lik sodyum floruscein'den 1 µl damladıldıktan sonra tam bir göz kırpma gerçekleşmesi bekletildi. Daha sonra indirekt oftalmoskop ve 20 dioptrilik bir lup kullanılarak beyaz ışık altında dikkatli bir

şekilde incelenerek ikinci bir göz kırpmasına müsaade edilmeksizin korneadaki kırılmanın ilk göstergesi olan ilk siyah kuru nokta görülmesine kadar geçen süre kaydedildi (5, 26).

4.6.5. Göz içi basıncının ölçümü

Ratlar anestezi edilmeden bir yardımcıya tutturularak REICHERT TECHNOLOGİES TONO-PEN marka bir tonopenle tüm gruplarda 1, 5, 10, 15, 20. Günlerde ölçümler yapıldı.

4.7. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizlerde SPSS Ms Windows Release 21.0 programı kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak tahmin edilmiş ve çoklu karşılaştırmalar Duncan testi kullanılmıştır. Sonuçlar $P<0.05$ 'de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.8. Ötenazi

Histopatolojik ve biyokimyasal verilerin elde edilmesi için 20. günün sonunda hayvanlar kapalı kutu içinde karbondioksit inhalasyonu ile ötenazi edildi (Resim 2). Ötenazi edilen hayvanların korneaları alınarak (GSH-Px, MDA, GSH) düzeyleri saptandı. Ayrıca alınan kornea örneklerinin yarısı % 5 lik formol içerisine konulduktan sonra hemotoksilen eosin boyası ile boyanarak korneanın epitel iyileşmesi ve damarlaşmalar histopatolojik olarak değerlendirildi.



Şekil 2: Karbondioksit inhalasyonu ile ötenazi

4.9 Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

Analizler öncesinde kornea dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra distile su ile 1/10 oranda sulandırılarak homojenizatörde homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde (NÜVE NF 800R) malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) analizleri için 3.500 rpm’de 15 dk, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) analizi için ise 14.000 rpm’de 55 dk santrifüj edilerek ve süpernatantlar alınmıştır.

4.9.1. Kornea Dokusunda MDA Düzeyinin Tayini

MDA tayini Placer ve ark. (48) tarafından modifiye edilen yönteme göre yapılmıştır. Bu yöntem lipidperoksidasyonu (LPO)’nun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)’in reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansı 532 nanometre (nm)’de spektrofotometrik olarak ölçülerek LPO’nun derecesi saptanmıştır.

4.9.2. Kornea Dokusunda GSH Düzeyinin Tayini

GSH tayini Ellman ve ark. (49) tarafından bildirilen metotla yapılmıştır. 5.5’-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve glutatyon redüktaz (GR) varlığında enzimatik döngü prosedürü ile ölçülmektedir. Bu metot DTNB eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir.

4.9.3. Kornea Dokusunda GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Kornea dokusu GSH-Px aktivite ölçümü için Beutler (50) metodu kullanılmıştır. GSH-Px, GSH'un okside glutatyon (GSSG)'a oksidasyonunu hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanarak katalizler. GSSG'nin oluşum hızı GR reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür.

Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksidin (t-BOOH) her bir molekülünün redüksiyonu için 1 mol GSSG oluşur. GSSG'nın GSH'a redüksiyonu ise GR enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşur. Bu reaksiyonda GSSG'nin her bir molünün redüksiyonu için 1 mol NADPH okside olur. GSH-Px aktivitesi NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'deki sistemin optik dansite (OD)'sindeki düşüşten hesaplanır.

4.9.4. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Homojenatlardaki protein miktarı modifiye Lowry (51) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptit bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom Cu bağlar. Fenol ayırıcı, Cu ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk şiddeti 650 nm dalga boyunda okunmuştur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapılmıştır.

4.10. Patolojik Verilerin Elde Edilmesi

Alınan doku örnekleri %10' luk nötral tamponlu formalinde tespit edildi. Rutin alkol ksilol serilerinden geçirilen örnekler parafin bloklara alındı. Bloklardan 5 µ kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyanarak ışık

mikroskobunda incelendi. Histopatolojik incelemede ödem, neovaskülarizasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları yönünden yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi (52).

4.10.1. İstatiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmede SPSS 16.0 programı kullanıldı. Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arası farklılığı Kruskal Wallis testi, farklılığı oluşturan grupların tespiti Mann Whitney U testi ile belirlendi. $P<0.05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3: Korneada alkali yanık oluşturulması



Sekil 4: Sehirmer testinin yapılışı



Şekil 5: Göz içi basınç ölçümü



Sekil 6: Rose bengal boyama testinin yapılışı



Şekil 7: Fluroscein boyama testinin uygulanişı



Şekil 8: Endirekt oftalmoskop



Şekil 9: Fluroscein boyama ve mavi kobalt ışık uygulanması



Şekil 10: Kontrol grubunda serum fizyolojik uygulanması



Şekil 11: Deney grubunda amniyon sıvısının uygulanması

4. BULGULAR

5.1. Klinik Gözlem

Korneada alkali yanık oluşturulduktan 24 saat sonra I. ve II. gruptaki tüm hayvanlarda korneal ödem, derin korneal opasite, gözlerde kuruma ve çok ağır bir konjunktivit tablosu hakimdi. III. grupta ise herhangi bir olumsuz durum söz konusu değildi.

Beşinci günde yapılan kontrollerde; I. ve II. gruptaki tüm hayvanlarda fotofobi, blefarospazm ve korneal opasite bulunmaktaydı. II. gruptaki 6 ratta korneal ülser, korneal ödem, gözlerde kuruma ve ağır bir konjunktivit tablosu hakimdi. I. grupta ise yalnızca 2 ratta korneal ülser oluşmuştu. III. grupta ise herhangi bir olumsuz durum söz konusu değildi.

Onuncu günde yapılan kontrollerde; I. gruptaki 3 ratta fotofobi, korneal opasite, ülserasyon ve konjiktivit mevcutken 7 tanesinde korneal opasitede azalma fotofobi ve çok hafif bir konjiktivit ile birlikte iyileşme belirtileri gösterdiği tespit edildi. II. grupta ise 6 ratta korneal ülserasyon, yaygın konjiktivit, ve blefarospazm görülürken 1 ratta ise korneal perforasyon tespit edildi. Bir ratta ise derin korneal opasite, yaygın konjunktivit, ve fotofobi mevcuttu. Bir ratta ise opasitede azalma ile birlikte genel durumda düzelme belirtileri gözlemlendi. Bu dönemde yapılan indirekt oftalmoskopide korneada derin damarlaşmaların olduğu görüldü. III. grupta ise herhangi bir olumsuz durum söz konusu değildi.

Onbeşinci günde yapılan kontrollerde; I. gruptaki 2 ratta korneal ülserasyon, fotofobi, gözlerde kuruma ve konjiktivit gözlenirken 7 ratta çok hafif

1 ratta ise orta düzeyde korneal opasite, konjktivit ve fotofobi mevcuttu. II. grupta ise 2 ratta korneal perforasyon, 8 ratta ise korneal ülserasyon, korneal ödem, fotofobi ve yaygın bir konjktivit mevcuttu, 1 ratta ise orta düzeyde korneal opasite ve gözlerde orta düzeyde bir kızarıklıkla beraber iyileşme belirtisi gözlendi. Bu dönemde yapılan endirekt oftalmoskopide II. gruptaki ratlarda orta ya da derin düzeyde görülen korneal damarlaşmalar mevcuttu. III. grupta ise herhangi bir olumsuz durum söz konusu değildi.

Yirminci günde yapılan kontrollerde; I. grupta 1 ratta korneal ülserasyon, fotofobi, korneal ödem ve konjktivit devam ederken 1 ratta orta düzeyde korneal opasite, fotofobi ve orta düzeyde bir konjktivit mevcuttu. 8 ratta ise klinik olarak tatmin edici bir iyileşme belirtisi gözlendi. Korneadaki bulanıklaşma tam anlamıyla ortadan kalkmış ancak bununla birlikte çok azda olsa bir fotofobi ve konjktivit devam etmekteydi. II. grupta ise önceki günlerde korneal perforasyon oluşan 2 rat dışında 6 ratta ileri düzeyde korneal ülserasyon, korneal ödem, fotofobi ve ileri düzeyde görülen konjunktivit mevcuttu. 1 ratta ise yaygın korneal opasite, fotofobi, gözlerde kuruma ve konjunktivit mevcuttu. Bir ratta ise orta düzeyde bir iyileşme belirtisi görüldü zira bu ratta korneal opasite orta düzeyde idi. Bu dönemde yapılan endirekt oftalmoskopide II. gruptaki ratların büyük çoğunda derin korneal damarlaşmalar mevcuttu. III. grupta ise herhangi bir olumsuz durum söz konusu değildi.

Çalışma süresince Sehirmer gözyaşı testi, Rose bengal boyama testi, fluroscein boyama testi gözyaş kırılma zamanı ve göz içi basınç ölçümleri 1 gün 5

gün 10 gün 15 gün ve 20 günlerde yapılmış ve elde edilen ölçüm değerleri ve bu değerlere yönelik istatistiksel analizler tablo 1, 2, 3, 4 ve 5 de gösterilmiştir.

Tablo 1: Schymer test değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. Gün	5. Gün	10. Gün	15. Gün	20.gün
Grup I	16.2±0.48Ca	12.9±0.67Ba	11.7±1.06ABa	9.5±1.17Aa	9.9±0.69Aa
Grup II	17.9±0.54Db	13.7±1.22Cab	9.3±0.74ABb	11.5±1.38BCa	7.2±0.66Ab
Grup III	17.1±0.64ab	16±0.59b	16.8±0.51c	17.4±0.56b	17.2±0.53c
P ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

ABCD Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

Tablo 2: Rose bengal ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. Gün	5. Gün	10. Gün	15. Gün	20.gün
Grup I	0A	4±0Da	2.8±0.29Ca	1.9±0.28Ba	1.5±0.22Ba
Grup II	0A	4±0Ba	3.7±0.15Bb	3.6±0.22Bb	3.7±0.21Bb
Grup III	0	0b	0c	0c	0c
P ²	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

ABCD Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

Tablo 3: Fluroscein ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. Gün	5. Gün	10. Gün	15. Gün	20.gün
Grup I	0A	3.9±0.1Bb	2.9±0.28Cc	2.1±0.31Dc	1.1±0.28Ec
Grup II	0A	4±0Db	3.8±0.2CDb	3.5±0.17BCb	3.3±0.21Bb
Grup III	0	0a	0a	0a	0a
P ²	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

ABCD Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

Tablo 4: Gözyaşı kırılma zamanı (GYKZ) ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. Gün	5. Gün	10. Gün	15. Gün	20.gün
Grup I	15.4±0.8A	5.7±0.66Bb	7.8±0.74Cb	9.9±0.62Db	9.9±0.62Da
Grup II	14.4±0.87A	5.7±0.63Ba	4.2±0.55Ba	4.5±0.56Ba	4.7±0.43Bb
Grup III	15.5±0.85	14.7±1.21b	15.6±0.96c	15.9±0.73c	16.2±0.91c
P ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a.b.c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

ABCD Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

Tablo 5: Göz içi basınç ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. Gün	5. Gün	10. Gün	15. Gün	20.gün
Grup I	28.1±2.28CDb	30.2±1.37Db	25.4±1.48BCb	23.4±0.89Bc	18.7±0.97Aab
Grup II	26.1±0.96Bb	32.0±2.02Cb	31.2±0.73Cc	32.6±0.1.18Cb	22.0±1.84Ab
Grup III	20.4±1.19a	24.5±1.6a	19.0±1.01a	19.7±0.92a	17.6±0.49a
P ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a.b.c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

ABCD Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

5.2. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 6: Biyokimyasal ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

GÖZ-KORNEA	Kontrol	Amniyon	Alkali Yanık	Alkali Yanık+Amniyon	P
MDA (nmol/g doku)	0,51±0,02 ^a	0,52±0,01 ^a	0,71±0,01 ^b	0,54±0,01 ^a	0,001
GSH (mikromol/ml)	4,62±0,12 ^a	4,34±0,12 ^a	3,24±0,14 ^b	4,39±0,24 ^a	0,001
GSH-Px (U/mg protein)	0,30±0,01 ^a	0,28±0,01 ^a	0,54±0,03 ^b	0,29±0,02 ^a	0,001

^{a.b.c} Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0.001).

Kornea dokusunda MDA düzeyi, kontrol grubuna göre alkali yanık uygulanan grupta daha yüksek olarak belirlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Yalnız amniyon sıvısı ve alkali yanık+amniyon sıvısı uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kornea dokusu MDA düzeylerinde, alkali yanık+amniyon sıvısı uygulanan grupta, yalnız alkali yanık uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiş olup ve değerler kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0.001$).

Kornea dokusunda GSH düzeyi, kontrol grubuna göre Alkali Yanık uygulanan grupta daha düşük olarak belirlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Yalnız Amniyon Sıvısı ve Alkali Yanık+Amniyon Sıvısı uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kornea dokusu GSH düzeylerinde, Alkali Yanık+Amniyon Sıvısı uygulanan grupta, yalnız Alkali Yanık uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiş olup ve değerler kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0.001$).

Kornea dokusunda GSH-Px aktivitesi, kontrol grubuna göre Alkali Yanık uygulanan grupta daha düşük olarak belirlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Yalnız Amniyon Sıvısı ve Alkali Yanık+Amniyon Sıvısı uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kornea dokusu GSH-Px aktivitelerinde, Alkali Yanık+Amniyon Sıvısı uygulanan grupta, yalnız Alkali Yanık uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiş olup ve değerler kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0.001$).

5.3. Patolojik Bulgular

Histopatolojik olarak ödem, neovaskülarizasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonuna 3. grupta (negatif kontrol) rastlanmadı. Ödem ve neovaskülarizasyon açısından 2. grup (pozitif kontrol) ve 1. gruplar (uygulama grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi ($p<0.05$).

Ödem ve neovaskülarizasyon 2. grupta orta düzeyde görülürken, 1. grupta daha hafif düzeyde olduğu görüldü (Şekil 1, Tablo 1, $p<0.05$).

Mononükleer hücre infiltrasyonları ise 2. grup ve 1. gruplarda eşit düzeyde tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo 11).

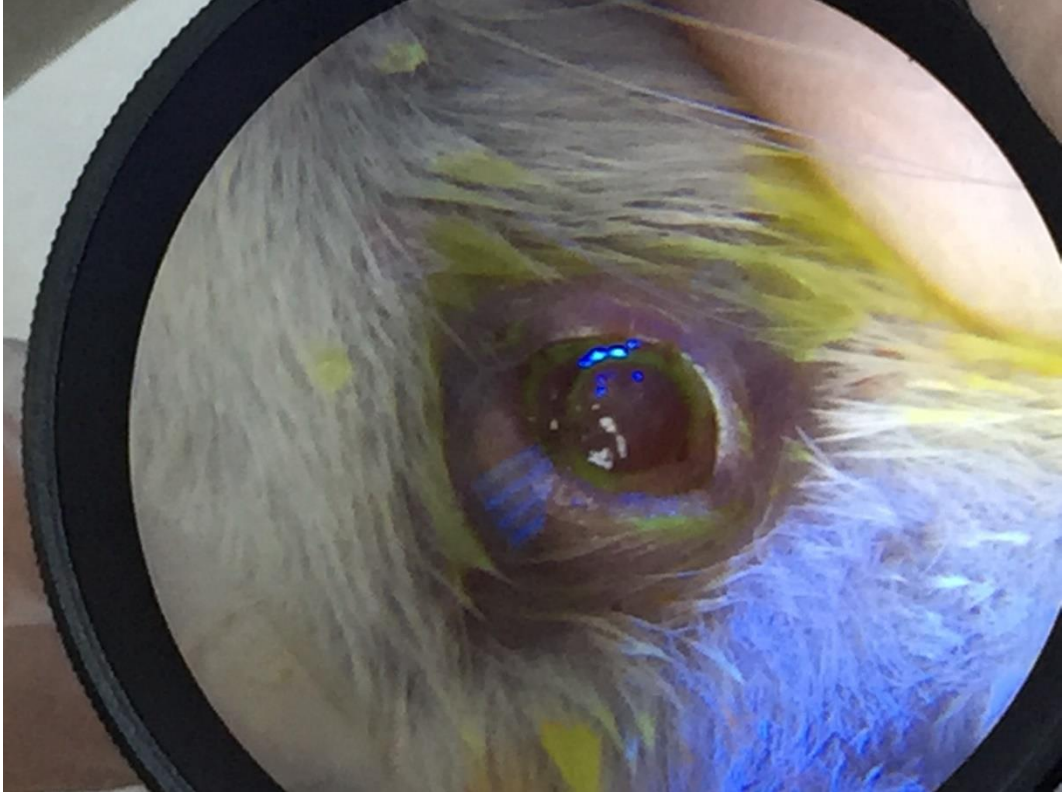
Tablo 7: Histopatolojik ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Ödem	Neovaskülarizasyon	Mononükleer hücre infiltrasyonu
1.grup	1.40±0.24 ^a	0.40±0.24 ^a	1.20±0.20 ^a
2.grup	2.20±0.20 ^b	1.80±0.20 ^b	0.80±0.20 ^b
3.grup	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^b

^{a,b,c} Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).



Şekil 12: Birinci grup 5. gün (derin kornea ülsetri)



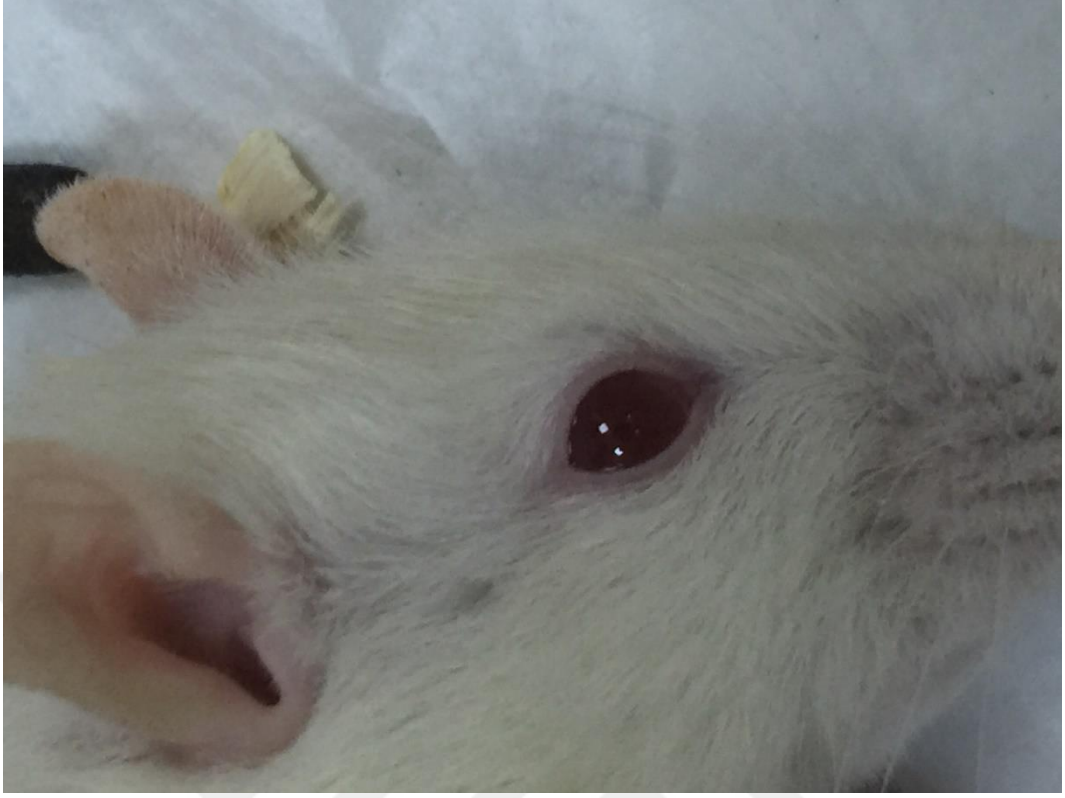
Şekil 13: Birinci grup 5. gün (fluoresein boyama ve mavi kobalt ışık)



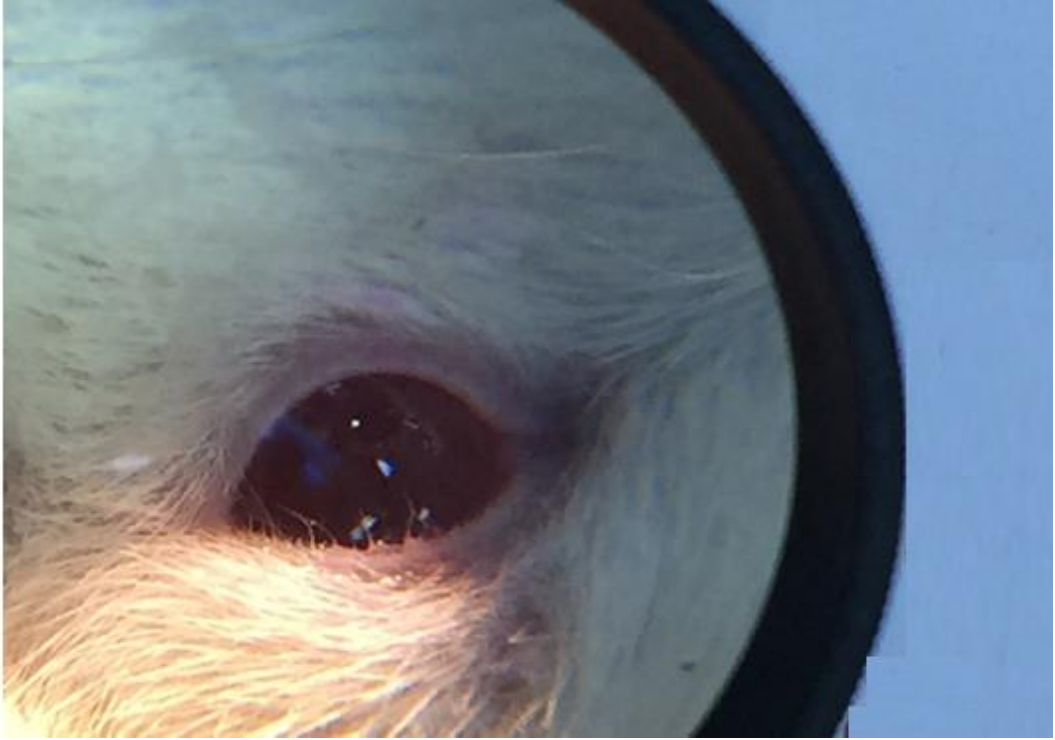
Şekil 14: İkinci grup 5. gün (derin kornea ülseri)



Şekil 15: İkinci grup 5. gün (derin kornea ülseri)



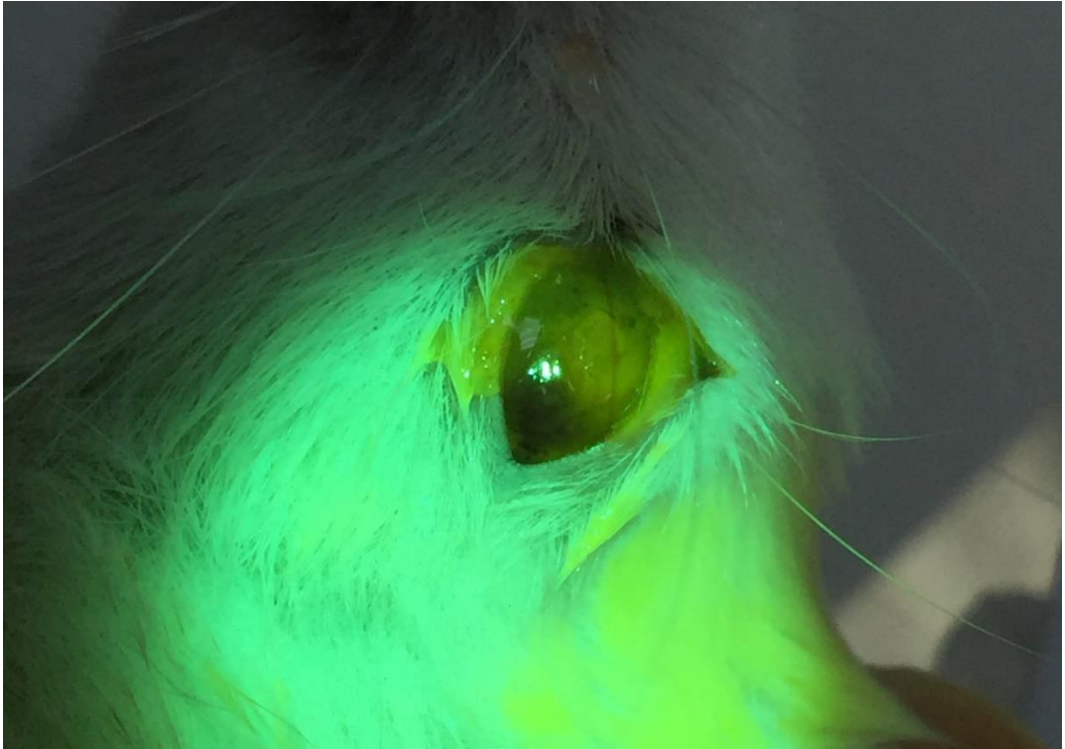
Şekil 16: Üçüncü grup 5. Gün (negatif kontrol grubu)



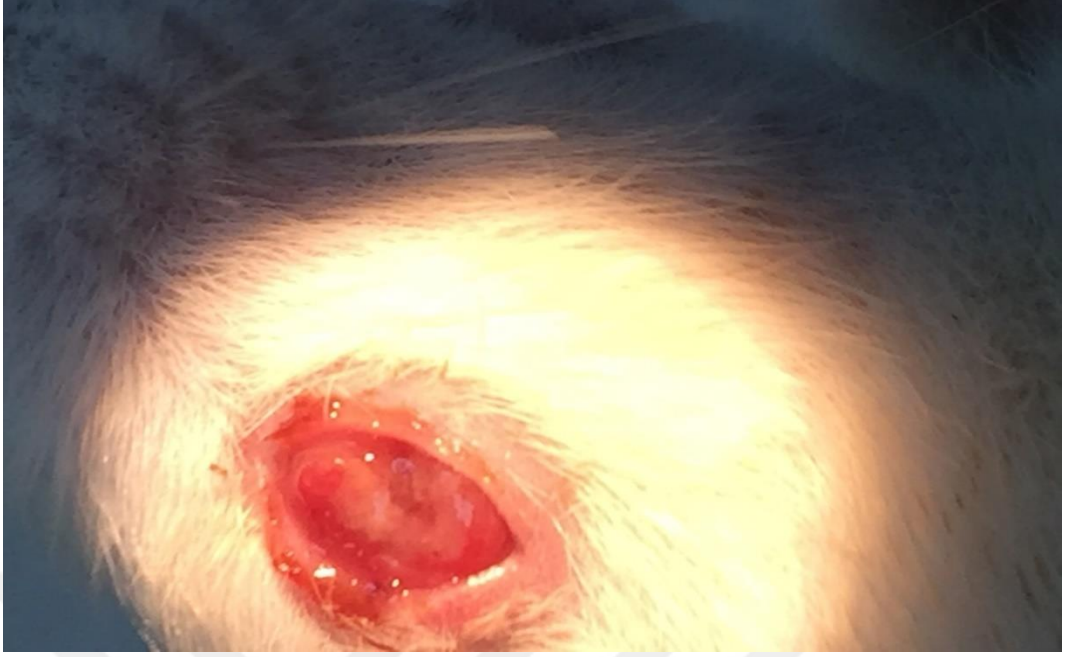
Şekil 17: Üçüncü grup 5. Gün (negatif kontrol grubu)



Şekil 18: Birinci grup 10. Gün (orta düzeyde kornea ülseri)



Şekil 19: Birinci grup 10. Gün (yeşil ışıkkta korneanın görünümü)



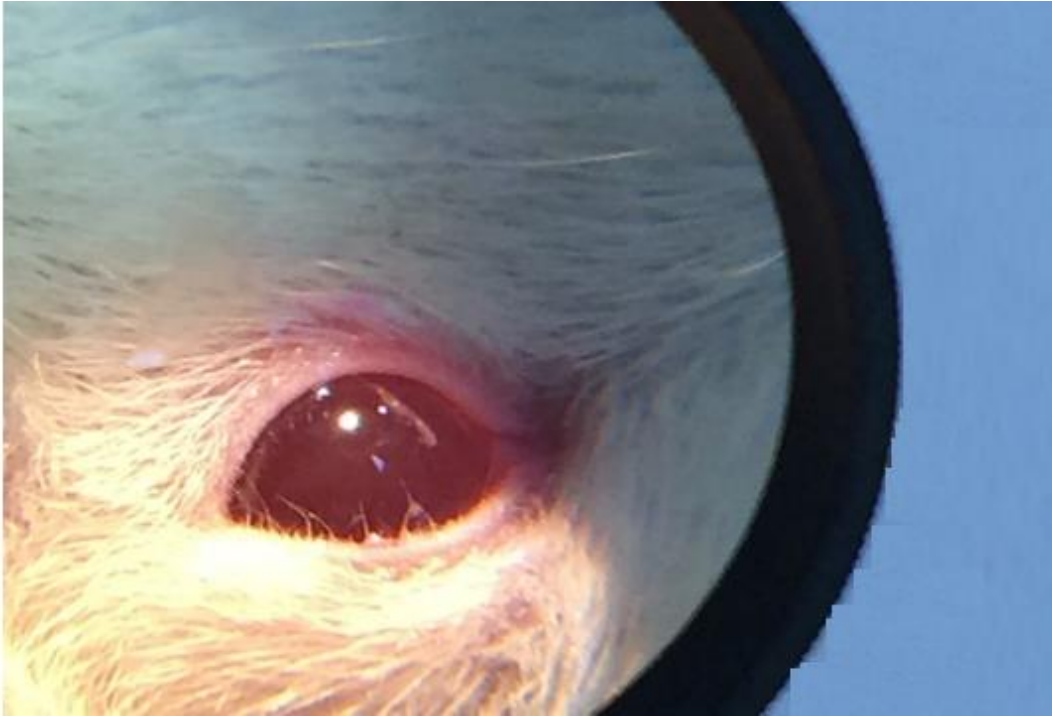
Şekil 20: İkinci grup 10. Gün (korneal perforasyon)



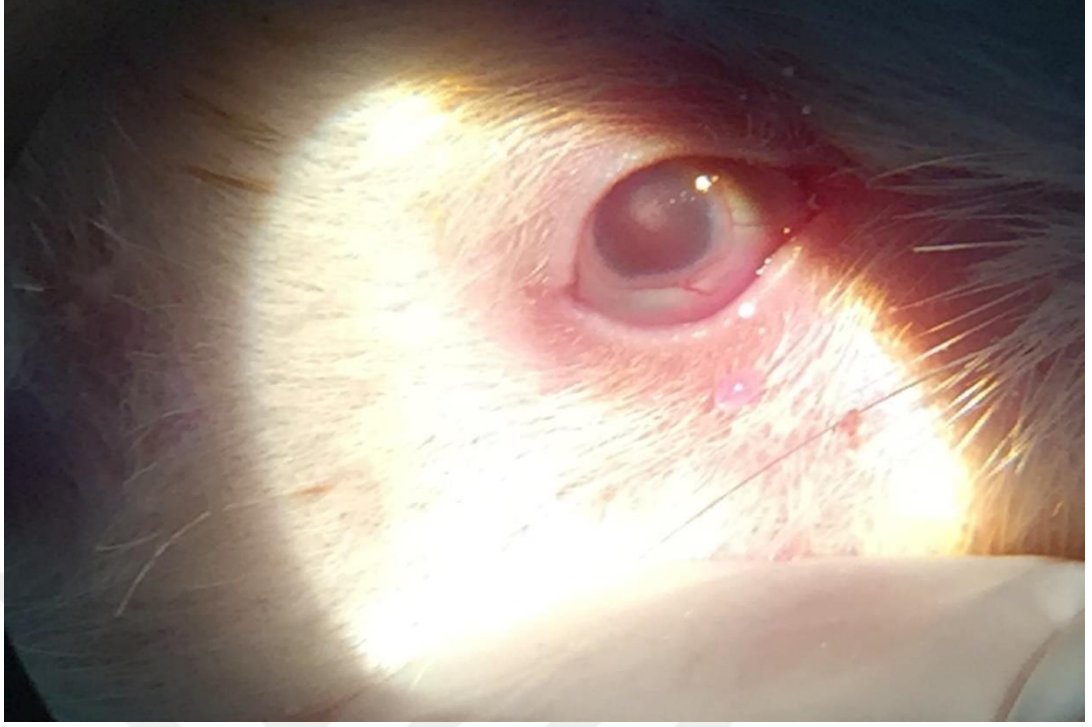
Şekil 21: İkinci grup 10. Gün (yeşil ışık, derin kornea ülseri)



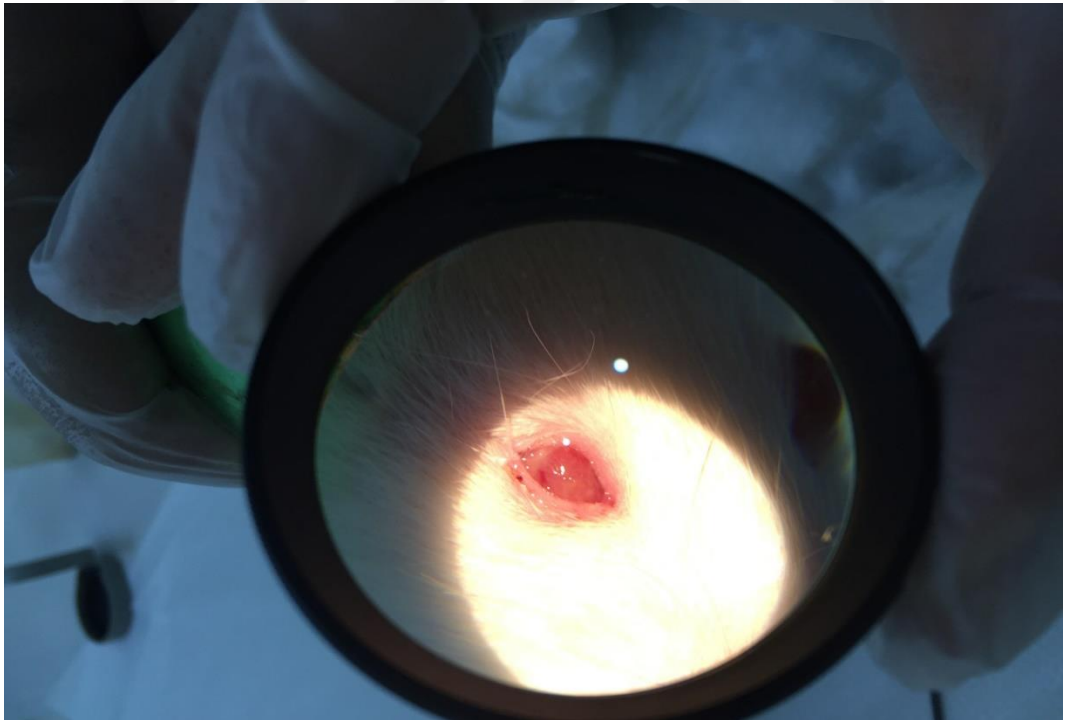
Şekil 22: Üçüncü grup 10. Gün (negatif kontrol grubu)



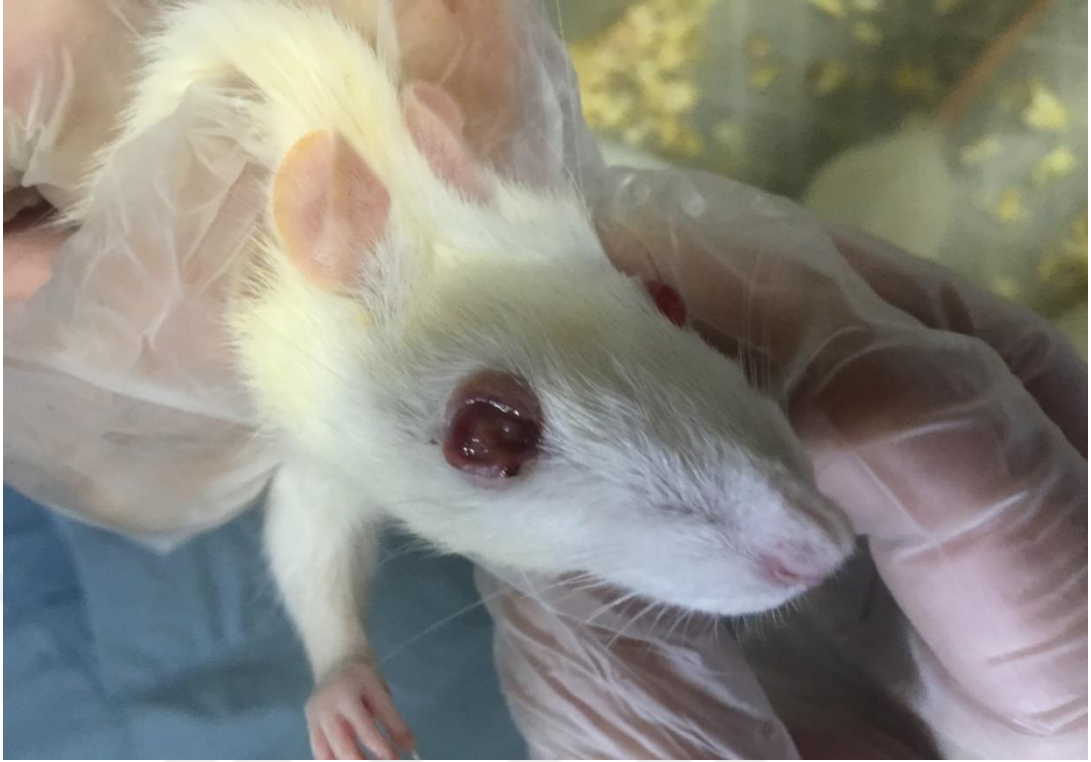
Şekil 23: Üçüncü grup 10. Gün (negatif kontrol grubu)



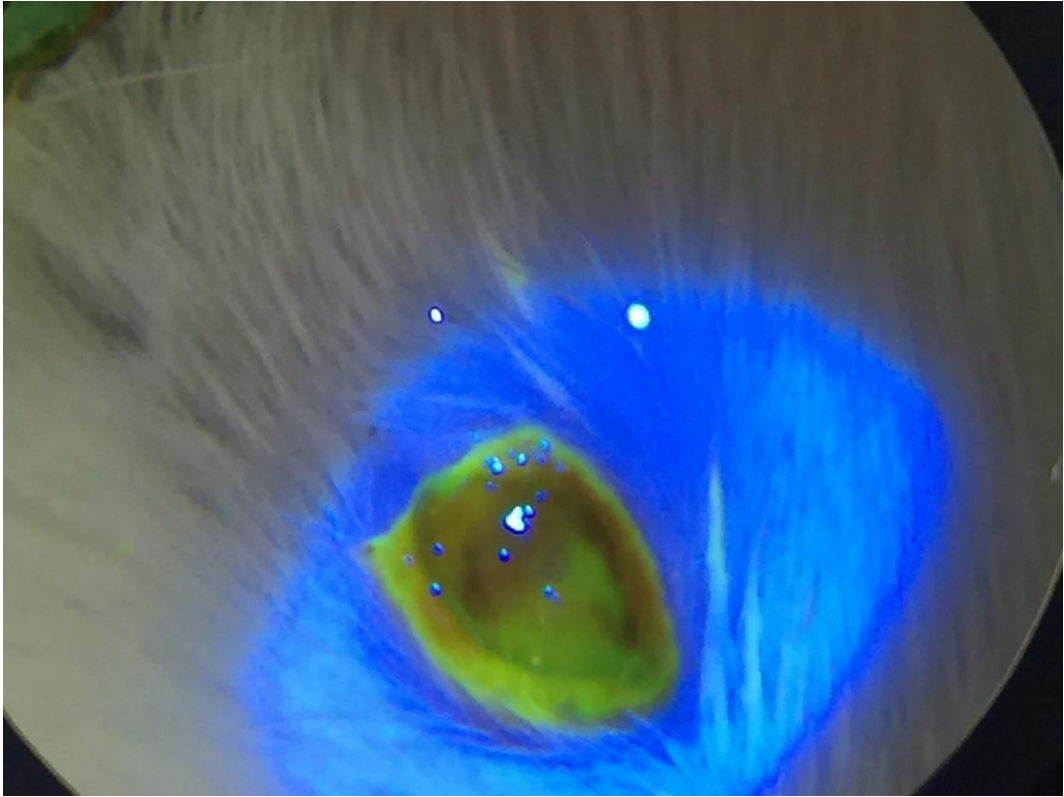
Şekil 24: Birinci grup 15. Gün (hafif düzeyde kornea ülseri ve neovaskülarizasyon)



Şekil 25: Birinci grup 15. Gün (beyaz ışık ve rose bengal boyama)



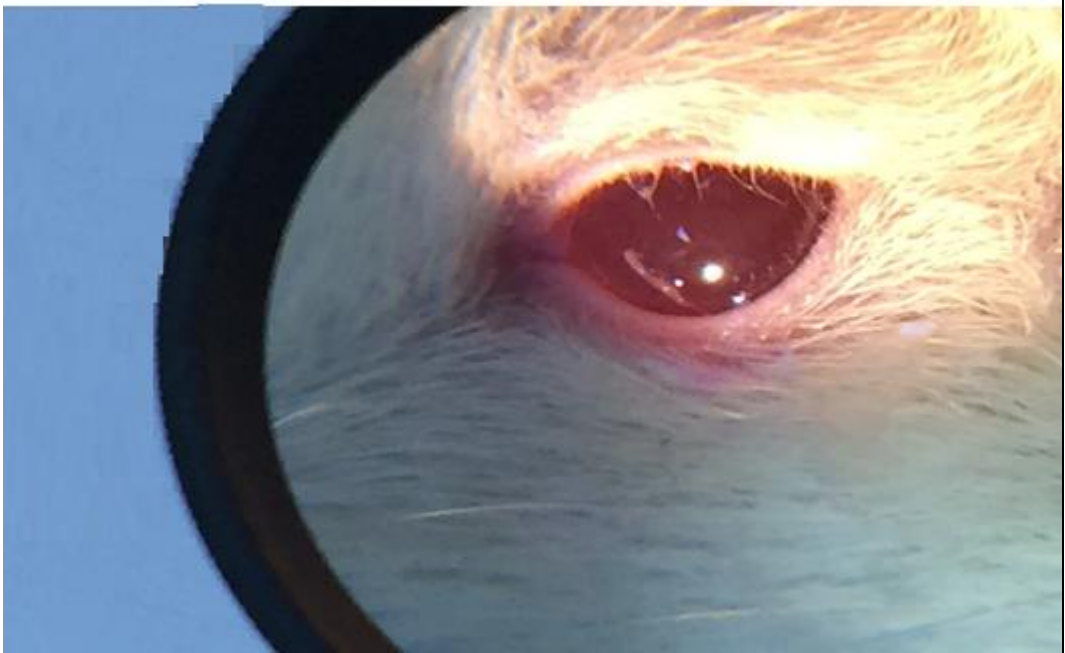
Şekil 26: İkinci grup 15. Gün (korneal perforasyon)



Şekil 27: İkinci grup 15. Gün (flurosein boyama, korneada yaygın boyanan bölge)



Şekil 28: Üçüncü grup 15. Gün (negatif kontrol grubu)



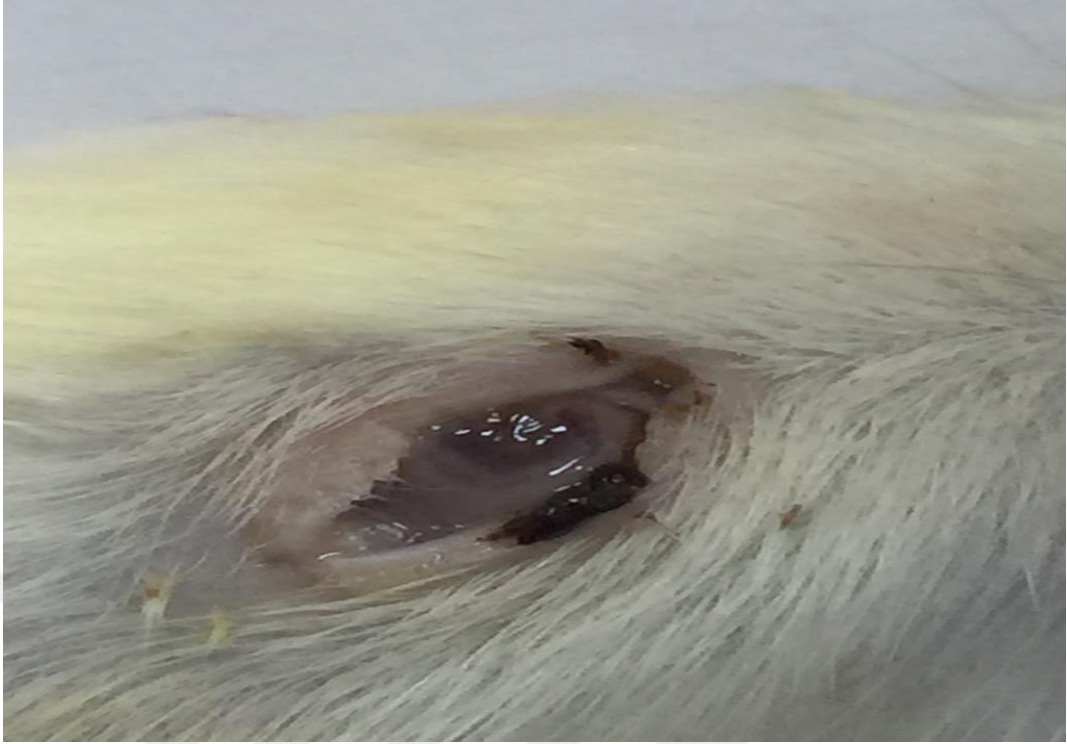
Şekil 29: Üçüncü grup 15. Gün (negatif kontrol grubu)



Şekil 30: Birinci grup 20. Gün (korneada epitel bütünlüğün sağlanması)



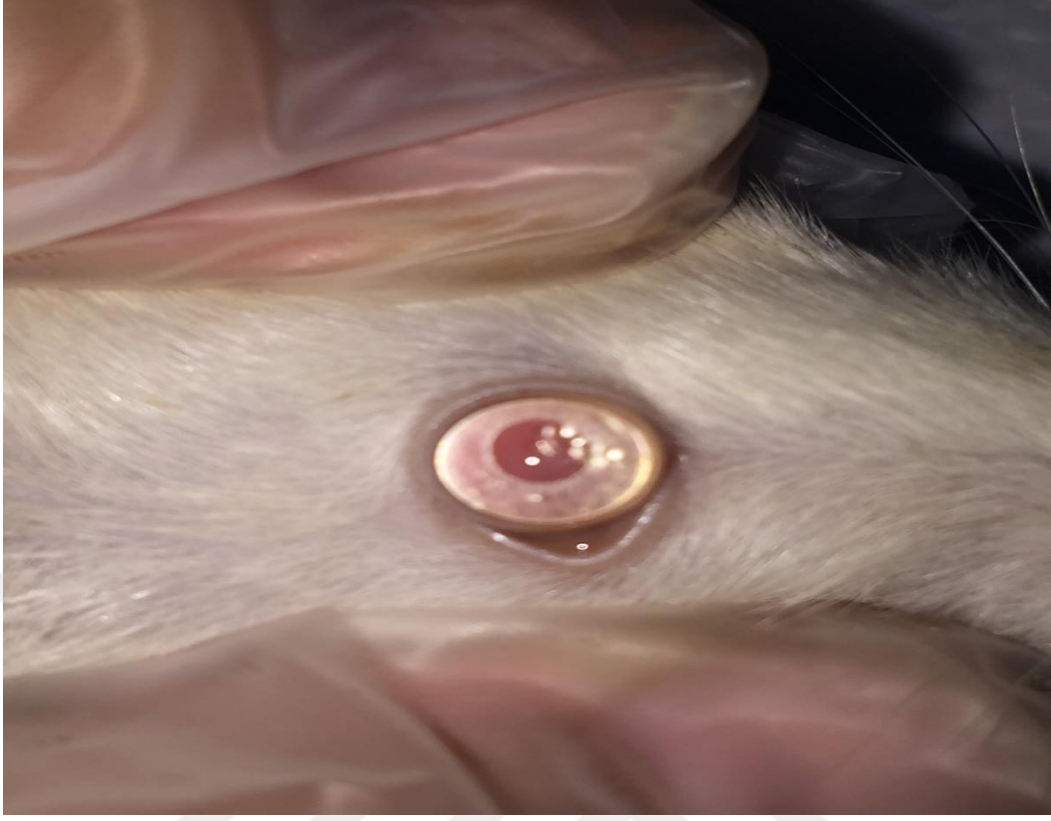
Şekil 31: Birinci grup 20. Gün (yeşil ışıpta korneanın görünümü)



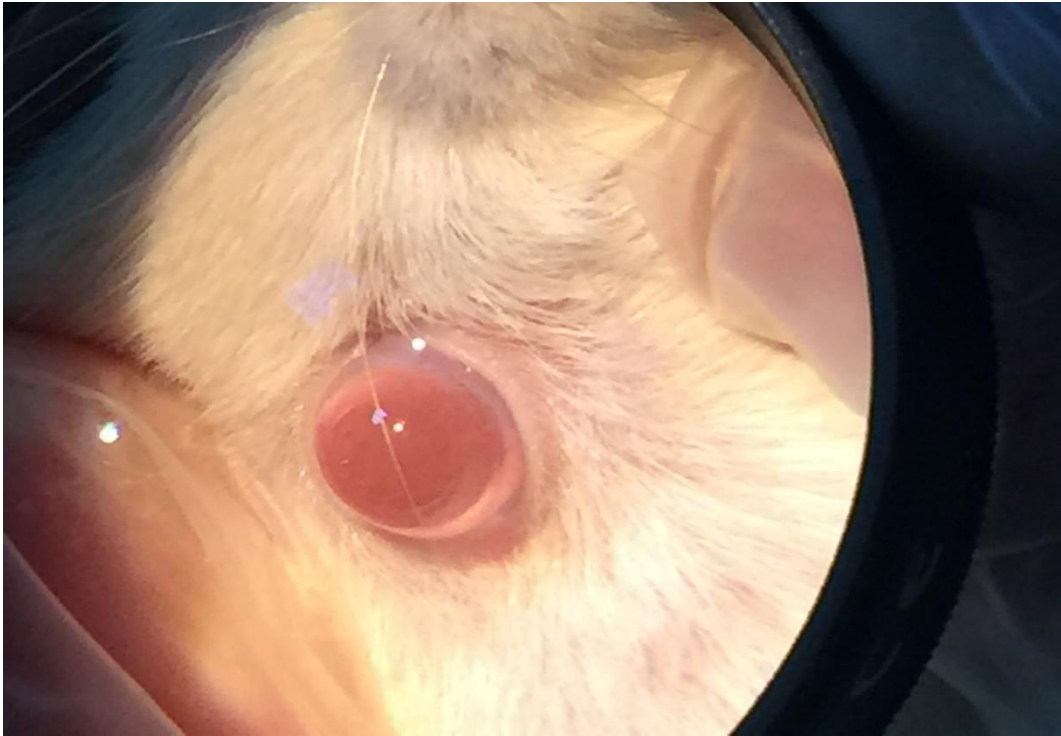
Şekil 32: İkinci grup 20. Gün (yaygın ve derin kornea ülseri)



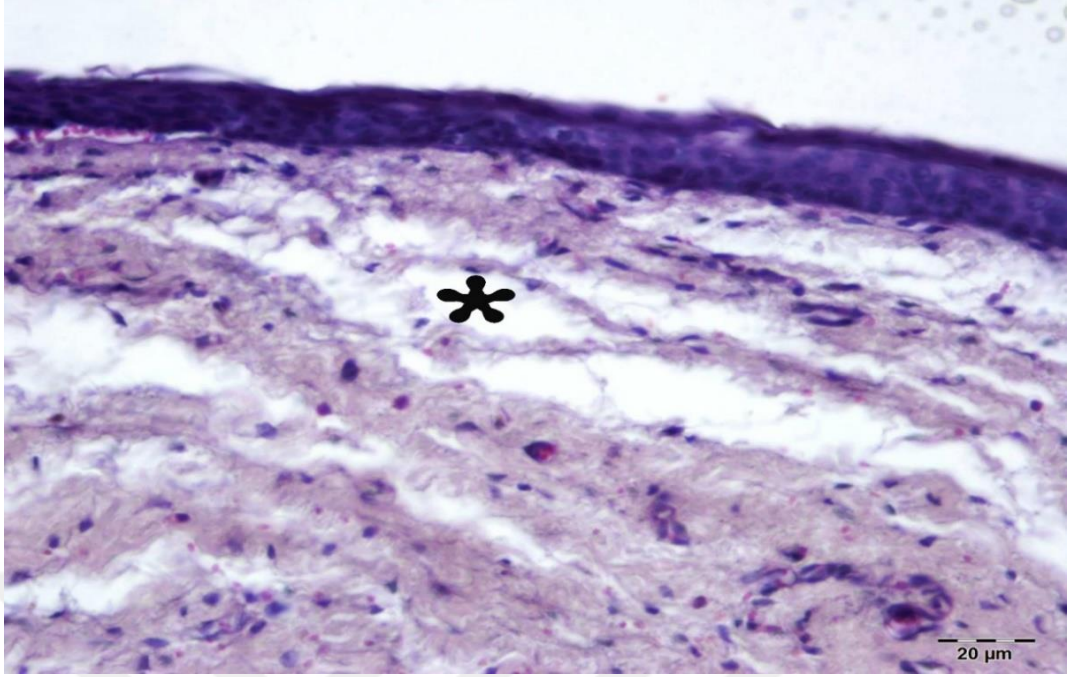
Şekil 33: İkinci grup 20. Gün (yaygın ve derin kornea ülseri)



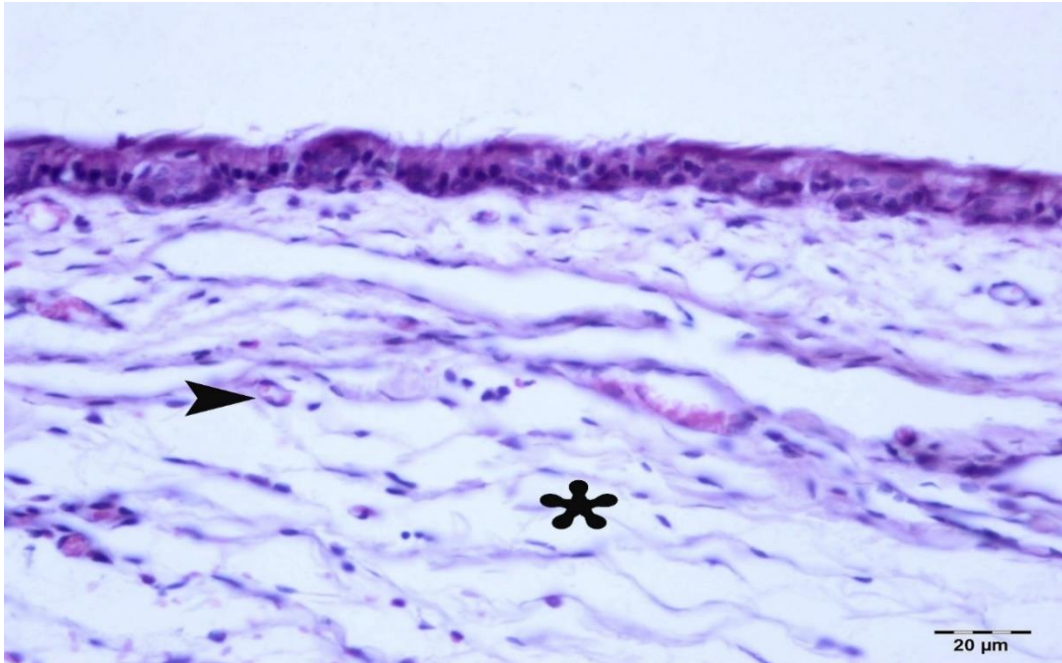
Şekil 34: Üçüncü grup 20. Gün (negatif kontrol grubu)



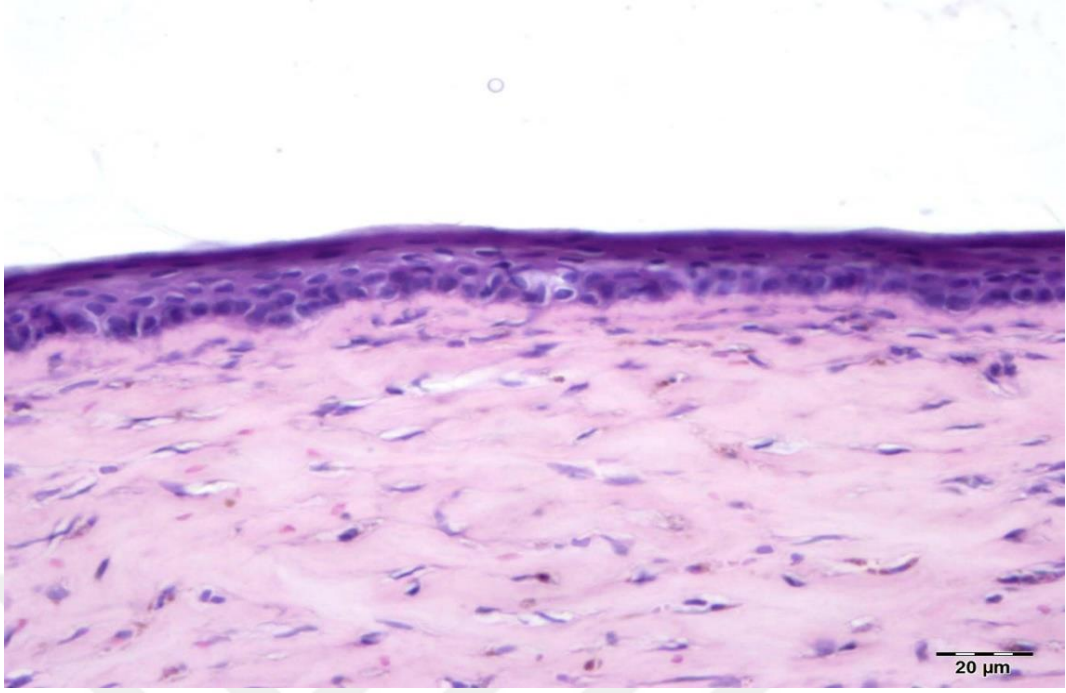
Şekil 35: Üçüncü grup 20. Gün (negatif kontrol grubu)



Şekil 36: Daha hafif düzeyde ödem (*). H&E (1.grup)



Şekil 37: Orta düzeyde ödem (*) ve neovaskülarizasyon (okbaşı). H&E (2. grup).



Şekil 38: Normal histolojik görünüm. H&E (3. grup).

6.TARTIŞMA

Korneada alkali yanıklar sonrasında şekillenen ve konjunktiva ile kornea epitelinde meydana gelen hasar ve enflamasyon bir müddet sonra kalıcı defektlere yol açabilir. Amniyon zar transplantasyonu ve amniyon sıvısı hasarın olduğu erken dönemde uygulandığında enflamasyon ve hasarı azaltır, epitelizasyonu hızlandırır, semblefaron gelişimini önler, limbal kök hücre hasarını ve damarlaşmayı azaltır, miyofibroblastların fibroblasta dönüşümünü azaltarak nedbe dokusu oluşumuna engel olur (19, 22, 24, 27, 32, 34, 38, 46). Amniyon zarı ve sıvısı bu etkisini içinde bulundurduğu çok sayıdaki büyüme faktörleri sayesinde gerçekleştirir (29, 32, 33, 40, 47).

Kornea ülseri görme sorunlarına yol açan en önemli oftalmik hastalıklardan biridir ve tedavi edilmesi oldukça zor ve uzun sürer. Ulkus korneadaki polimorfnükleer lökositler, hasara uğrayan kornea epitel hücreleri, keratositlerden salınan proteaz enzimi, kısa sürede korneanın derin katlarına doğru ilerlemesine ve ulkusun daha derin dokulara ilerlemesine neden olur (3, 4, 9, 11, 14). Amniyon sıvısındaki proteaz inhibitör etki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (7, 11-13, 15). Bu çalışmada amniyon sıvısının korneal epitel defektlerin dolmasını sağlayarak kornea ülserine bağlı olarak gelişen başta ağrı ve fotofobi olmak üzere gözyaşı miktarının artışına, kırılma zamanının uzamasına ve boyama testlerinde (furoscein ve rose bengal) tatmin edici sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Ayrıca amniyon sıvısı uygulanan grupta 1 rat hariç diğer ratların tümünde oküler bütünlüğün sağlandığı histopatolojik olarak ta tespit edilmiştir. Kim ve ark (32) yaptıkları çalışmada 21 enfektiv kornea ülseri bulunan hastalara

amniyon zarı uygulamış ve tüm hastalarda da başarılı bir epitelizasyon sağladığını bildirmiştir. Bu yönüyle de çalışmamızı destekler nitelikte görülmüştür.

Amniyon zarının geniş konjiktiva defekti bulunan hastalarda kullanımını içeren çalışmalar da mevcuttur (7, 9, 44). Bu gibi durumlarda konjiktival otogreft ve oral mukoza transplantasyonları önemli tedavi seçenekleri arasındadır. Ancak bu uygulamaların komplikasyonlara neden olduğu belirtilmiştir. Greftin uygulandığı yerde nedbe oluşumu bunlardan bir tanesidir. Bu çalışmada amniyon sıvısı uyguladığımız grupta 10. Günden itibaren hiperemik olan konjiktivalar normale döndüğü halde kontrol grubunda çalışma sonuna kadar hiperemik durumunu koruduğu ve herhangi bir iyileşme belirtisi göstermedi görülmüştür.

Kornea alkali yanıkları görme kaybına kadar giden ve ciddi sorunlara sebep olan patolojilere neden olurlar. Kimyasal yanıkların konjiktivalarda sikatrizasyon, limbal kök hücre yetmezliği, kornea bütünlüğünün bozulması, hatta korneal ülserasyon ve perforasyona neden olduğu ifade edilmektedir (15, 19, 20, 23, 24, 27, 28). Bu çalışmada amniyon sıvısı uygulanan ratlarda amniyon sıvısının epitelizasyonu hızlandırdığı, inflamasyonu, sikatrizasyonu ve neovaskülarizasyonu baskıladığı histopatolojik bulgularla da ortaya konulmuştur. Bu özellik amniyotik zarın antiproteaz etkisi ile enflamasyonu baskılamasına miyofibroblastların fibroblasta dönüşümünü azaltarak skar oluşumunu azaltmasına ve epitelyal hücrelerin yaşam sürelerini artırması ile gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (19, 29, 32, 33, 36, 38, 40).

Antioksidanlar hücre bütünlüğünü koruyabilmek amacıyla serbest radikallere karşı direnç gösterirler. Serbest radikallere karşı verilen bu savaşta

başarısız olurlarsa dokularda hasar oluşur. Oksidan ve antioksidan denge açısından bakıldığında travmaya uğramış hücrelerde hücre membranının bütünlüğünün bozulması sonucunda ortama çok sayıda süperoksit hidrojen peroksit gibi oksidan maddelerin salınımına bağlı olarak yaralı dokuda oksidatif stres tablosunun oluştuğu görülür (53-63). Oksidatif stres serbest oksijen radikali (SOR) miktarındaki artışla seyreden bir durumdur. Bu artış membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu organizmada moleküler hasarlara sebep olarak önemli hücresel yapıları ve fonksiyonları etkiler. SOR'leri ile lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan son ürün MDA'dır. Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması SOR'lerinin arttığını gösterir (56-58). Bu çalışmada da alkali yanık oluşturduğumuz gruplarda oksidatif stresin arttığı biyokimyasal verilerle tespit edilmiştir.

Hasarlı doku hücrelerindeki tahribatın giderilmesinde temel desteği antioksidanlar sağlar. Araştırmacılar (56, 57, 61, 62) oksidan maddelerin açığa çıkardığı olumsuzlukları ortadan kaldırmak ya da hastalığın prognozunu düzeltmek amacıyla yeni farmakolojik antioksidanlar üzerinde dururken bazı araştırmacılar ise (55, 58, 62) endojen kaynaklı antioksidan maddeler tükrük, otojen serum gibi maddelerin etkinliğini incelemişlerdir. Öner ve ark (53) lokal yanık oluşturulan yaralarda antioksidan düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını ancak bu yaralarda lokal antioksidan uygulamalarının doku hasarını ortadan kaldırdığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada dış kaynaklı sığır amniyon sıvısının kornea alkali yanıklarındaki etkili olduğu ve amniyon sıvısı kullanılan grupta MDA düzeyleri ve GSH-Px aktivitelerinde düşüş, GSH düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Hücre içi antoksidanlardan olan Glutatyon (GSH) doku hasarına karşı hasas olduğu ve bu özelliği sayesinde yara iyileşmesinin özellikle ilk devrelerinde regülatör bir görev aldığı ileri sürülmektedir. Otto ve arkadaşları (63) yaptıkları çalışmada yaralı bölge epitel hücrelerini GSH ile besleyerek hücre içi GSH miktarını artırmış ve sonuçta bu uygulamanın gerçekleştirildiği grupta yara iyileşmesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ifade etmişlerdir (56, 57, 59, 60, 61). Steling ve ark (54) yaptıkları çalışmada yara iyileşmesi sırasında yara dokusunda oksidatif stresle birlikte GSH-Px aktivitesini arttığını göstermiştir. Bu çalışmada da yanık grupta korneada GSH-Px aktivitesinin bu grupta daha yüksek olduğu görülmüştür. Yanık+amniyon sıvısı uygulanan grupta korneada epitel iyileşmeye bağlı olarak GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna yaklaşmıştır.

Alkali yanık lipid peroksidasyonunda ve endojen antioksidan bir bileşik olan GSH düzeyinde önemli artışa neden olmuştur. GSH'un okside glutatyon (GSSG)'a dönüşümünü katalizleyen, antioksidan bir enzim olan GSH-Px aktivitesindeki artma GSH'un GSSG'a dönüşümünü hızlandırmış olabilir. GSH, sayısız elektrofilik ve oksitleyici bileşiklerle etkileşim kurarak, hem nükleofil hem de etkili indirgeyici görevi gören başlıca hücresel -SH bileşiğidir. -SH grubunun SOR ile doğrudan etkileşimi ile nonenzimatik bir antioksidan görevi yapabilir veya bir koenzim olarak SOR için enzimatik detoksifikasyon reaksiyonunda yer alabilir.

Araştırmacılar (8-10, 14, 15, 20, 22, 26) kornea alkali yanıklarının ya da eksojen nedenlerle oluşan kornea ülserlerinin 3 haftadan uzun süreyle tıbbi tedavi sağlanamadığı takdirde kornea nakli yada konjiktivoplasti gibi cerrahi tekniklerin uygulanabileceğini ifade etmişlerdir. Ancak greftin reddi yada konjiktivoplastinin

birtakım komplikasyonları (enfeksiyon, simblefaron, tedavi sonrası konjktival dokunun korneada kalması) gözden kaçırmamak gerekir. Ancak amniyon sıvısı uygulamalarının göz yüzeyi enfeksiyonlarını azalttığı, limbal kök hücrelerin korunmasına ve yayılmasına yardımcı olduğu ve bu sayede iyileşme sürecini kısalttığı (1-4 hafa) araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Duschense (55) kornea hasarının büyük olduğu hatta perforasyon şekillenen bir olguda insan fibrin yapıştırıcı ile birlikte amniyon zar kullanarak iki haftadan daha uzun bir sürede kornea bütünlüğünün sağlandığını ifade etmiştir. Sridhar ve ark (23) akut dönemdeki kimyasal yanıklarda 2 haftalık bir uygulamadan sonra oküler hasarın ortada kalktığını ancak tam bir iyileşmenin sağlanması için dört aylık bir sürenin geçmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da 20 günlük bir tedavinin ardından oküler bulguların (gözyaşı miktarında azalma, kızarıklık, ağrı, fotofobi) büyük oranda ortadan kalktığı ve kornea bütünlüğünün sağlandığı gerek boyama testleri ve gerekse histopatolojik bulgularla ortaya konmuştur. Bu yönüyle araştırmacıların ifade ettiği sağaltım süreci içinde tatmin edici bir iyileşme sağlandığı görülmüştür.

Adds ve ark. (39) amniyon zarı kullanımında mutlaka taze hazırlanmış olmasına dikkat edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Zira dondurma ve çözülme işlemi ile amniyon zarındaki epitel hücrelerin öldüğünü, ancak sitokinlerin aktif olarak kaldığını, bununla birlikte asıl yararlı etkilerinde bir miktar azalma görülebileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan amniyon sıvısı dondurup çözdürme olmadan taze olarak hazırlanmakta ve buzdolabı ısısında bekletilerek kullanılmıştır. Araştırmacılar (38, 45, 46) amniyon sıvısının antimikrobiyal etkisinin bulunduğunu ve mikroorganizmaların üremesini

engelleyici bir etkiye sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Marangon ve ark (47) yaptıkları çalışmada amniyotik membran tansplantasyonu sonrası 326 olgunun 11'inde enfeksiyon geliştiğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada amniyon sıvısı uygulanan grupta enfeksiyon gelişmediği ve zamanla oküler bulgular da tatmin edici bir düzelme sağladığı görülmüştür. Ayrıca amniyotik membran gibi sürekli göz üzerinde kalmaması önemli bir avantaj olarak kabul edilebilir.

Amniyon zarı transplantasyonu ve amniyon sıvısı ile yapılan tedavilerde komplikasyonlar çok nadir görülmektedir. Araştırmacılar (18, 36, 39, 41, 43) amniyon zar transplantasyonu sonrası görülmesi muhtemel komplikasyonlar arasında enfeksiyon oluşumu, hemoraji oluşumu, amniyon zarının erken ayrılması, zarın immunolojik veya toksik etkisine bağlı olarak gelişen hipopiyon olarak bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise (15, 18, 36, 39, 41) amniyotik sıvının mezenkimal kök hücreler içerdiğini ve kolay elde edilip çoğaltılabileceğini, tümör oluşturmadığını, düşük immuniteye sahip olduğunu ve bu nedenle allogreft olarak kullanılabileceği, kullanıldığı bölgede morbidite sorunu yaratmadığı ve dondurularak saklanabilme kolaylığı sağlandığından dolayı gerek oftalmolojide gerekse diğer alanlarda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile araştırmacıların ifade ettiği bu yararlı etkileri; klinik, biyokimyasal ve histopatolojik bulgularla bir kez daha teyit edilmiştir.

Korneada alkali yanık oluşturulurken korneanın tamamının hasara uğramaması için 3 mm lik bir filtre kağıdı kullanılmıştır. Özellikle kornea dış kenarında bulunan limbal kök hücrelerin bulunduğu sahanın korunmasına özen gösterilmiştir. Araştırmacılar (12, 25, 28-32) limbus ve daha geniş bir alana yayılan yanıklarda korneal hasarın daha şiddetli olduğunu belirtmişlerdir. Brown

ve ark (30) yaptıkları çalışmada bir grupta alkali yanığı kornea ile limbus arasında oluşturulurken diğer grupta tüm kornea katları limbusuda içine alacak şekilde alkali yanığa maruz bırakmışlardır. Sonuçta perforasyon görülme oranı I. grupta %28 iken II. grupta bu oran %90 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada da limbal bölge korunmuş sadece 3 mm lik bir alanda yanık oluşturuldu. Kontrol grubunda zamanla limbal bölgeye kadar ilerleyen derin bir ülserin geliştiği ve 2 ratta da perforasyon olduğu görüldü. Amniyon sıvısı uygulanan grupta hiçbir ratta korneal perforasyon görülmedi. Ayrıca alkali ajana maruz kalan korneada oluşan hasarın büyüklüğü etkiyen kimyasal ajanın konsatrasyonu ve etkime süresi ile ilgili olduğunu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

Araştırmacılar (3, 4, 8, 10, 22, 26) kornea alkali yanıklarında göz önünde bulundurulması gereken temel hedefin yangısel bulguların (konjiktivit, gözyaşı sekresyonunun azalması, blefarospasmus, fotofobi) ortadan kaldırılması, limbak yetmezliğin belirlenmesi, korneal saydamlığın sağlanması, korneal damarlaşmanın önlenmesi olarak belirlemişlerdir. Alkali yanıktan hemen sonra kimyasal ajanın acil olarak bölgeden uzaklaştırılması ve bunu takiben sekunder kontaminasyonun önüne geçilmesi amacıyla antibakteriyel ajanların kullanılması, ağrıyı azaltmak için sikloplejiklerin verilmesini, kolojen üretimini düzene sokmak amacıyla antikolagenazların ve korneal damarlaşmanın önüne geçmek içinde kortikosteroidlerin kullanması gerektiği ifade edilmiştir (10, 13). Bu çalışmada uygulama grubuna 20 gün süreyle günde 3 kez 2 damla amniyon sıvısı, kontrol grubuna ise aynı oranda serum fizyolojik kullanılmış, bunun dışında herhangi bir destek tedavi uygulanmamıştır. Buna rağmen 20. günün sonunda ötenazi edilen

ratların yapılan histopatolojik ve biyokimyasal sonuçlarına dayanarak amniyon sıvısı uygulanan grubun daha etili olduğu görölmüştür.

Sonuç olarak; kornea alkali yanık ve yanığa bağlı olarak gelişen korneal opasite, ülser, vaskülarizasyon ve yangısel bulguların giderilmesi için birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Bu tedavi seçenekleri arasında konjiktival greft, limbal kök hücre transplantasyonu ve kornea tarsplantasyonu gibi birçok cerrahi teknik mevcut olduğu gibi medikal tedaviye alternatif daha çok sayıda tedavi yöntemleri de tanımlanmıştır. Mevcut çalışmada amniyon sıvısının kontrol grubuna göre korneadaki oluşan komplikasyonları büyük oranda giderdiği klinik, histopatolojik ve biyokimyasal bulgularla desteklenmiştir. Ayrıca kullanılan amniyon sıvısının elde edilmesi, kullanması ve saklanması kolay olması yönüyle de araştırmacıların ifade ettiği tedavi yöntemlerinden daha avantajlı bir hale getirildiği kanısına varılmıştır.

7.KAYNAKLAR

1. Kozma, C, Macklin W, Cummins LM, Mauer R. (1974). Anatomy, Physiology and Biochemistry of the Rabbit. In: The Biology of the Laboratory Rabbit, Ed.: S.H. Weisbroth, London: Academic Press Limited, 1992: 50-56.
2. Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: Veterinary Ophthalmology. Ed: K.N. Gelatt, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 1991; 45-150.
3. Akın, F, Samsar E. Göz Hastalıkları. 1. Baskı, Malatya: Medipress Matbacılık Yayıncılık, 2005
4. Kirk KN. Temel Veteriner Oftalmoloji. Avki S, Sancak İR. (Çeviren) 1. Baskı, Malatya: Medipress Matbacılık Yayıncılık, 2012
5. Slatter D. Basic Diagnostic Techniques. In: Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, Ed.: D. Slatter, W.B. Saunders Company, 1990b; 84- 146.
6. Cindarik T. Oküler Yüzey Hastalıklarında Amniyon Zar Transplantasyonu Sonuçlarımız. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
7. Aykut V. Göz Yüzeyi Patolojilerinin Tedavisinde Amniyon Zarı İmplantasyonunun Klinik ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Göz Hastalıkları Kliniği, 2008.
8. Gülsancal İ. Tavşanlarda Deneysel Kornea Alkali Yanıklarının Sağaltımında Kornea-Konjunktival Transpozisyon İle Limbal Kök Hücre Transplantasyon Tekniklerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
9. Bilgehan SE. Tavşanlarda Deneysel Ulkus Korneanın Sağaltımında Kornea-Konjunktival Transpozisyon ile Konjunktival Pedikül Greft Tekniklerinin Karşılaştırılması. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
10. Şaroğlu M. Tavşanlarda Deneysel Oluşturulan Kornea Alkali Yanıklarının Sağaltımında Bazı Antikollajenazik İlaçların Karşılaştırılması Üzerine Araştırmalar. Doktora tezi. _İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1999.
11. Tsai RJF, Tseng SC. Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction. Cornea 1995; 14: 439-449.
12. Santos MS, Gomes JA, Hofling-Lima AL, Rizzo LV, Romano AC, Belfort R Jr. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. Am J Ophthalmol 40(2): 305-306: 2005.
13. Hos D, Saban DR, Bock F, Regenfuss B, Onderka J, Masli S, Cursiefen C. Suppression of inflammatory corneal lymphangiogenesis by application of topical corticosteroids. Arch Ophthalmol 2011; 129:445-452
14. Kabaoğlu D, Eren ZK, Koytak E, Özertürk Y. Kornea ülserinin tedavisinde çok katlı amniyon zar transplantasyonu. T. Oft. Gaz 2005; 35: 4-10.
15. Meller D, Pires RTF, Marc RJS. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. Ophthalmology 2000; 107: 980-990.

16. Kruse FE, Rohrschneider K, Völeker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106: 1504-1511.
17. Kenyon K. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. *Tr Am ophth Soc* 1985; 83: 610-63.
18. Kim JS, Kim JC, Park WC. Amniotic membrane transplantation in Infectious Corneal Ulcers. *Cornea*. 2001;20: 720-726.
19. Shahriari HA, Tokhmechi F, Reza M, Hashemi NF. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea* 2008; 27: 1148-1150.
20. Christmas, R. Management of chemical burns of the canine cornea *Can. Vet. J* 1991; 32: 608-612.
21. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: Current Concepts in Pathophysiology and Therapy. *Survey of Ophthalmology* 1997; 41: 275-313.
22. Volkan H, Aksu G. Çinko klorürün kornea üzerindeki hasarı, bunun amonyun tartarat ve disodyum-edta ile mukayeseli olarak tedavisi ile ilgili deneysel bir çalışma. *Ankara Üniversitesi Tıp Bülteni* 1977; 2: 203-207.
23. Stridar MS, Bansal AK, Sanqvan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in akute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmolgy* 2000; 130: 134-137.
24. Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye (Lond)*. 2005; 19: 273-278.
25. Kozak I, Trbolova A, Sevcikova Z, Juhas T, Ledecy V. Superficial keratectomy, limbal autotransplantation and amniotic membrane transplantation in the treatment of severe chemical burns of the eye. *Acta. Vet. Brno* 2002; 71: 85-91.
26. Gunay C, Sagliyan A, Yilmaz S ve ark. Evaluation of autologous serum eyedrops for the treatment of experimentally induced corneal alkali burns. *Revue Méd. Vét* 2015; 166: 63-71.
27. Choi Ja, Choi Js, Joo Ck. Effects of amniotic membrane suspension in the rat alkali burn model. *Mol Vis*. 2011; 17: 404-412.
28. Ayyala RS, Leibowitz HM. Disorders of the corneal limbus. In: *Corneal Disorders*. In: Leibowitz, Waring, ed. WB Saunders Co., Philadelphia 1998; 394-431.
29. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325-335.
30. Brown SI, Wassermann HE, Dunn MW. Cell orgine of collogenase in corneal ulcerations. *Arch Ophthal* 1970; 83: 74-77.
31. Dua, H.S., Azuaro-Blanco, A. Autologous Limbal Transplantation in Patients with Unilateral Corneal Stem Cell Deficiency. *Br. J. Ophthalmol* 2006; 84: 273-278.
32. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000; 70: 329-337.

33. Sato H, Shimazaki J, Shimazaki N, et al: Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39: 428.
34. Azuara BA, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 399-402.
35. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Eng J Med* 2000;343: 86-93.
36. Park JH, Jeoung JW, Wee WR, Lee JH, Kim MK, Lee JL. Clinical efficacy of amniotic membrane transplantation in the treatment of various ocular surface diseases. *Cont Lens Anterior Eye*. 2008;31: 73-80.
37. Gönenci R, Altuğ ME, Koç A, Yalçın A. Effect of amniotic fluid on acute corneal alkali burns in the rat. *JAVA* 2009; 8: 817-823.
38. Thalmi YP, Sigler I, Ingle E et al. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1994; 12: 285-288.
39. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts fresh or frozen ? A clinical and invitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 905-907.
40. Sato H, Shimazaki J, Shinozaki N. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39: 428.
41. Güneş A, Tök L, Tök Ö. Amniyon membran transplantasyonu endikasyonlarımız ve sonuçlarımız. *TJO* 2014; 44: 123-127.
42. Saw V P J, Minassian D, Dart J K G. Amniotic membrane transplantation for ocular disease: a review of the first 233 cases from UK user group *Br J Ophthalmol*. 2007;91:1042-7.
43. Özçel KA, Yavuz, E. Biyolojik greft materyalleri: amnion membran grefti. *Veteriner Cerrahi Dergisi* 2006; 12: 68-72.
44. Meller D, Tseng SCG. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40: 878-886.
45. Park WC, Tseng SCG. Muculation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Viis Sci*, 2000; 41: 2906-2914.
46. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*. 2001; 20: 408-413.
47. Marangon Fb, Alfonso Ec, Miler D, Remonda Nm, Muallem Ms, Tseng Sc. Incidence of microbial infection after amniotic membrane. *Cornea*. Apr 2004; 22: 204-207.
48. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation in biological fluids. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
49. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
50. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune and Starton (Editors) 2nd Edition, New York 1984: 160.
51. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-257.

52. Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology. USA: Mc Grow Hill Book Company, 1968.
53. Oner M, Dulgeroglu TC, Karaman I, Guney A, Kafadar IH, Erdem S. The effects of human amniotic fluid and different bone grafts on vertebral fusion in an experimental rat model. *Curr Ther Res Clin Exp* 2015;77: 35–9.
54. Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. Different types of ROS scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 1999; 247:484-94.
55. Duchesne B, Tahi H, Galand A, Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation *Cornea* 2001; 20: 230-232.
56. Aslan R, Dündar Y. Serbest radikal giderici maddelerin yara iyileşmesi üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Cerrahi Tıp Bilim Derg* 2000; 2: 74-79.
57. Aksoy Halil, Özakpınar ÖB. Yara iyileşmesi ve oksidatif stres 2014; 18: 153-158.
58. Gakhramanov FS. Effect of natural antioxidants on antioxidant activity and lipid peroxidation in eye tissue of rabbits with chemical burns. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140: 289-291.
59. Salman IA, Kızıltunc A, Baykal O. The effect of alkali burn on corneal glutathione peroxidase activities in rabbits. *Turk. J. Med. Sci* 2011; 41: 483-486.
60. Sun Y, Oberley LW, Li YA. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem* 1988; 34: 497–500.
61. Williams DL. Oxidative stress and the eye. *Vet. Clin. Small Anim* 2007; 38: 179-192.
62. Yuan HP, Lu SR, Wang BI. An experimental study of treatment with superoxide dismutase for alkali burn in the anterior segment of the rabbit eye. *Zhonghua Yan. Ke. Za. Zhi.*, 1994, 30, 50-52.
63. Otto WR, Rao J, Cox HM. Effects of pancreatic spasmolytic polypeptide on epithelial cell function. *Eur J Biochem*, 1996; 235: 64.

8. ÖZGEÇMİŞ

11 Ağustos 1989 Tarihinde Şanlıurfa'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitim hayatımı 1996-2006 yılları arasında Şanlıurfa'da tamamladım. 2008 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine başladım ve 2014 yılında Veteriner Hekim ünvanı ile mezun oldum, ardından 2015 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine Cerrahi Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım. Eğitimime devam ederken iş hayatımda farklı alanlarda çalışma fırsatı buldum, 2014 yılında kısa süreli suni tohumlama üzerine özel sektörde çalıştım ardından yine aynı yıl kendi kliniğimi açtım ve 2018 yılına kadar Klinisyen olarak çalıştım. 2018 yılında kliniğimi başka bir meslektaşımıza devrederek kamuya geçtim ve halen kamuda çalışmaya devam etmekteyim.