



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2019; 33 (1): 37 - 45
http://www.fusabil.org

Kadri KULUALP^{1, a}
Servet KILIÇ^{2, b}
Yesari ERÖKSÜZ^{3, c}
Hatice ERÖKSÜZ^{3, d}
Abdullah ASLAN^{4, e}

¹ Fırat Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu,
Elazığ, TÜRKİYE

² Namık Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Anabilim Dalı,
Tekirdağ, TÜRKİYE

³ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

⁴ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-5877-0054

^b ORCID: 0000-0002-0310-5014

^c ORCID: 0000-0001-5962-8810

^d ORCID: 0000-0002-8407-5792

^e ORCID: 0000-0002-6243-4221

Geliş Tarihi : 22.03.2019
Kabul Tarihi : 23.05.2019

Yazışma Adresi Correspondence

Kadri KULUALP
Fırat Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu,
Elazığ – TÜRKİYE

kkualp@firat.edu.tr

Kuru Göz Fare Modelinde Sığır Amniyotik Sıvısının Terapötik Etkisinin Bazı Klinik ve Histopatolojik Parametreler Yönünden Değerlendirilmesi *

Bu çalışmada, kuru göz (KG) fare modelinde sığır amniyotik sıvısının (SAS) 4 farklı konsantrasyonunun terapötik etkisinin bazı klinik ve histopatolojik parametreler yönünden araştırılması amaçlandı. Çalışmanın materyalini rastgele ve eşit sayıda 6 gruba ayrılan 60 adet BALB/c ırkı dişi fare oluşturdu. Kontrol grubu hariç diğer 5 grubu oluşturan deneklerin her iki gözüne KG modeli oluşturmak amacıyla 14 gün süreyle günde 2 defa %0.2'lik BEK (benzalkonyum klorid)'den 5 µL damlatıldı. 15 ile 30. günler arasında ise II. gruba (KG grubu) %0.9'luk izotonik serum fizyolojik, III. gruba %20 SAS, IV. gruba %35 SAS, V. gruba %50 SAS, VI. gruba ise %100'lük SAS'tan günde 3 defa 5 µL damlatıldı. Tüm gruplar, çalışma boyunca göz kırpması ve konjunktival goblet hücre sayısı; çalışma sonunda ise histopatolojik olarak korneal epitelyal kalınlık, korneal damarlaşma ve yangısal hücre sayısı parametreleri yönünden değerlendirildi. Çalışma sonunda en etkili sonuçlar, göz kırpması için %35, %50 ve %100 SAS, konjunktival goblet hücre sayısı için %35 SAS gruplarında alındı. KG grubu deneklerin korneal epitelyal tabakalarının kontrol grubuna göre belirgin şekilde incelendiği, korneal damarlaşma ve yangısal hücre sayılarının ise arttığı saptandı. Bu parametrelere göre en etkili sonuçlar %35 ve %50 SAS gruplarında alındı. Bu sonuçlar, SAS'ın orta ve yüksek konsantrasyonlarının KG'nin klinik ve hücresel belirtileri üzerine faydalı etkileri olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kuru göz, tedavi, sığır amniyotik sıvısı, fare

Evaluation of the Therapeutic Effect of Bovine Amniotic Fluid in Dry Eye Mouse Model in Terms of Some Clinical and Histopathological Parameters

In this study, we aimed to investigate the therapeutic effect of 4 different concentrations of bovine amniotic fluid (BAF) in a dry eye (DE) mouse model in terms of some clinical and histological parameters. The material of the study consisted of 60 BALB/c female mice that were randomly divided into 6 groups with equal numbers. In both eyes of the other 5 groups except the control were instilled 5 µL 0.2% BAC BAC (benzalkonium chloride), twice a day for 14 days in order to form a DE model. Between 15th and 30th days, group 2 (DE group) received 5 µL 0.9% isotonic saline, group 3 20% BAF, group 4 35% BAF, group 5 50% BAF and group 6 100% BAF, three times a day. All groups were evaluated regarding blink rate and conjunctival goblet cell count during the study. Corneal epithelial thickness, corneal vascularization and inflammatory cells count were assessed by histopathological examination in all groups at the end of study. At the end of the study, the most effective results were obtained in 35%, 50% and 100% BAF for the blink rate; and in 35% BAF groups for conjunctival goblet cell count. It was determined that the corneal epithelial layers of the DE group subjects were significantly thinner and corneal vascularization and inflammatory cell count were increased. According to these parameters, the most effective results were obtained in 35% and 50% BAF groups. These results suggest that moderate and high concentrations of BAF have beneficial effects on clinical and cellular symptoms of DE.

Key Words: Dry eye, treatment, bovine amniotic fluid, mice

Giriş

Lakrimal bezler, kornea, konjunktiva, göz kapakları, meibomian bezleri, oküler sinirler ve goblet hücreleriyle birlikte lakrimal fonksiyonel ünitenin temel yapı taşlarından biri olan prekorneal gözyaşı filmi (PGF), içte müsin, ortada aköz, dışta ise lipid tabakadan oluşmaktadır (1, 2). Bu tabakalarda meydana gelen kalitatif veya kantitatif yetersizliklerin, gözyaşı osmolaritesini artırarak, oküler yüzeyde hasar oluşturabileceği, bu durumun da yangısal süreci tetikleyerek kuru göz (KG) adı verilen kronik seyirli ve multifaktöriyel bir hastalığa neden olabileceği belirtilmektedir (3, 4). KG'nin güncel tedavi stratejileri, hastalığın klinik belirtilerini elemeye ziyade bu belirtilerin oluşmasına zemin hazırlayan ve hastalığın patogenezesinde anahtar rol oynayan gözyaşı hiperosmolaritesi ve yangı gibi faktörleri ortadan kaldırmaya ve bu sayede PGF'nin stabilizasyonunu yeniden sağlamaya yöneliktir (5, 6). Son dönemlerde yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, piyasadaki antiinflamatuvar ajanlara alternatif olması amacıyla içerik bakımından doğal gözyaşına benzer karakterde olan, herhangi bir

* Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 116O927 proje numarası ile TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Projesi olarak desteklenmiştir.

kimyasal ve katkı maddesi içermeyen otolog ve umbilikal kord serum ile insan amniyotik sıvısı gibi biyolojik sıvıların KG'deki terapötik etkileri araştırılmaktadır (7, 8, 9). Bunlardan otolog ve umbilikal kord serumun progresif KG vakalarında sitolojik ve klinik belirtiler yönünden iyileştirici etkiler gösterdiği rapor edilmesine rağmen (2, 8, 10), elde edilmiş şekilleri ile saklanma koşullarındaki zorlukların kullanım alanını kısıtladığı da bildirilmiştir (9). Bir diğer biyolojik sıvı olan insan amniyon sıvısının, korneal epitelyumun korunmasında, PGF'nin stabilizasyonunda (11) ve yangısal sitokin üretiminin baskılanmasında (12, 13) pozitif etkileri olan birçok büyüme faktörü ile antiinflamatuvar özellikteki hyaluronik asit (HA) bakımından zengin (14, 15) bir içeriğe sahip olduğu belirtilmektedir. Bir KG modeli çalışmasında (7), insan amniyon sıvısının yapay gözyaşı preparatlarına ve insan serumuna göre korneal fluorescein boyanma ve goblet hücre dansitesi yönünden daha iyi sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Benzer modelin kullanıldığı bir başka çalışmada (9) ise insan amniyon sıvısının orta ve yüksek konsantrasyonlarının 2 hafta içinde korneal fluorescein boyanma skorunu azalttığı ve gözyaşı üretim miktarını arttırdığı, 4 haftanın sonunda ise goblet hücre dansitesinde önemli artışlar meydana getirdiği saptanmıştır. Belirtilen biyolojik sıvılarla içerik bakımından benzer karakterde olan ve onlara göre daha ucuz olup, kolay temin edilebilen siğir amniyotik sıvısının (SAS), akut korneal alkali yanıkların tedavisinde denendiği ve oftalmoloji alanında alternatif bir terapötik ajan olabileceği belirtilmesine (16) rağmen KG'deki terapötik etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Mevcut çalışmanın amacı, farelerde benzalkonyum klorid (BEK) kullanılarak oluşturulan kuru göz modelinde, SAS'ın 4 farklı konsantrasyonunun terapötik etkilerini klinik olarak göz kırpma ve konjunktival goblet hücre sayısı, histopatolojik olarak ise korneal epitelyal kalınlık, korneal damarlaşıma ve yangısal hücre sayısı gibi parametreler yönünden araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada materyal olarak yaşları 6–8 hafta arasında değişen, ortalama ağırlıkları 18-20 g olan 60 adet BALB/c ırkı dişi fare kullanılmıştır. Çalışma süresince denekler, ortam sıcaklığı 24°C±1°C, relatif nemi %60±%10, aydınlık-karanlık siklusu 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık şeklinde olan, ses ve diğer çevresel faktörlerden izole edilmiş odada tutulmuştur. Deneklerin yem ve su alımlarında herhangi bir kısıtlamaya gidilmemiştir. Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (Toplantı sayısı: 2016/4, Karar No: 34) onayı alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Klinik ve oftalmolojik muayenelerden geçirilen ve sağlıklı oldukları belirlenen 60 denek, rasgele ve eşit sayıda 6 gruba ayrılmıştır (n=10x6 grup). I. grup, herhangi bir ajan uygulamasının yapılmadığı kontrol grubunu oluşturmuştur. Geri kalan 5 grubu oluşturan tüm deneklerin her iki gözüne KG modeli oluşturmak

amacıyla 14 gün süreyle %0.2'lik benzalkonyum klorid (BEK) solüsyonundan günde 2 kez (sabah 09:00 ve akşam 21:00) 5 µL damlatılmıştır. Bu gruplardan ilkinde (KG grubu, II. grup) ikinci 15 günlük süreyi kapsayan terapötik ajan uygulaması aşamasında günde 3 kez (sabah 09:00, öğleden sonra 15:00, akşam 21:00) sadece %0.9'luk izotonik serum fizyolojik (SF), kalan 4 grubu oluşturan deneklere 15 gün süreyle günde 3 kez ve aynı zaman diliminde, III. gruba %20'lik SAS, IV. gruba %35'lik SAS, V. gruba %50'lik SAS ve VI. gruba %100'lük SAS'tan 5 µL damlatılmıştır.

SAS, gebe olan sağlıklı bir inekten sezaryen operasyonu esnasında steril koşullarda temin edilmiştir. Sıvı 15 dakika boyunca 3000 rpmde santrifüj edildikten sonra çalışmaya başlayana kadar –20°C'de saklanmıştır. Çalışma süresince bakteriyel kontaminasyon riskine karşı 4°C'de muhafaza edilmiştir (16, 17). SAS'ın %20, %35 ve %50'lik dilüsyonları izotonik serum fizyolojik ile yapılmıştır.

Klinik Parametrik Testler: Tüm gruplar, çalışmanın başında (0. gün) ve KG oluşumundan sonra 15., 18., 22., 25., 28. ve 30. günlerde birer defa olmak üzere toplamda 7 kez ve aynı zaman diliminde (saat 13:00–15:00 arasında) sırasıyla göz kırpma sayısı ve impresyon sitolojisi (konjunktival goblet hücre sayısı) testleri yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışma boyunca deneklerde muhtemel oküler değişiklikler (fotofobi, gözyaşı akıntısı, konjunktival kızarıklık, konjunktivitis, keratit) ve diğer anormal durumlar düzenli olarak kaydedilmiştir.

Göz Kırpma Sayısının Ölçümü: İki araştırmacı tarafından eş zamanlı olarak deneklerin her iki gözündeki kırpma sayıları 30 saniye süreyle sayılmıştır. Bu süre sonunda iki araştırmacının verilerinin ortalaması alınarak kaydedilmiştir (7, 9, 18). Göz kırpma izlenmesi esnasında araştırmacıların ani hareketlerden kaçınmalarına, ortamda deneklerin dikkatini çekecek ve göz kırpma sayılarını etkileyebilecek herhangi bir uygulama yapılmamasına dikkat edilmiştir.

İmpresyon Sitolojisi Testi (Konjunktival Goblet Hücre Sayısı Testi): Bu teknikte doku örnekleri, deneklerin her iki gözünün inferior konjunktival fornikslerine yerleştirilen 0.45 µm por çapına sahip nitrosellüloz filtre kağıtlarıyla (Nitrocellulose/Filter Paper Sandwich, İnvitrogen, USA) alındı. Filtre kağıtları uygun boyutlarda kesildikten sonra 2–3 saniye boyunca belirtilen bölgeye hafif bir şekilde bastırılıp yüzey epitelyumuna tamamen yapıştıktan sonra kaldırıldı. Alınan örnekler, içinde %95'lik etanolden 1 mL olan 1.5 mL'lik ependorf tüplerine konuldu ve en az 10 dakika boyunca bu solüsyonda bekletildi. Filtre kağıtları 5 dakika süreyle distile su banyosunda, buradan 3–5 dakika boyunca %0.5'lik periyodik asit solüsyonunda, sonra 5'er dakika sürelerle sırasıyla distile su, Schiff, musluk suyu banyolarında bekletildi. Hematoksilin solüsyonunda 1 dakika süreyle bekletilen kağıtlar, akar vaziyetteki musluk suyunda durulandı. Asid alkol solüsyonuna 1 kez hızlı bir şekilde daldırılan örnekler birkaç kez musluk suyu banyosundan geçirilip 1 dakika süreyle %95'lik etanol, absolut etanol ve ksilol

solüsyonlarına daldırıldı. Son olarak örnekler entallen yapıştırıcısı kullanılarak lam ile lamel arasına tespit edildi. Hazırlanan preparatlardan 20x objektif altında rastgele seçilen 4 alandan goblet hücreleri sayıldı ve iki gözden elde edilen verilerin ortalaması alınarak kaydedildi (18).

Histopatolojik İncelemeler: Çalışmanın sonunda tüm denekler ötenazi edilerek gözler, konjunktivalar ve lakrimal bezler diseke edildikten sonra %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edilerek dorso-ventral pozisyonda optik sinire yakın olarak kesildi. Rutin işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan 3–5 µ kalınlığında hazırlanan kesitler, hematoksilin-eosin ve Periyodik Asit Shift (PAS) yöntemiyle boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Histopatolojik değerlendirmede, 40x objektifte morfometrik olarak korneal epiteli kalınlığı, her bir korneadaki damar sayısı ve herbir korneadaki yangısal hücrelerin sayısı saptandı.

İstatistiksel Analiz: Çalışmada örneklem sayısı, etki büyüklüğü 0.50 ile alfa hata 0.05 ve %80 güçte G*Power paket programı (Versiyon 3.1.9.2) yardımı ile toplamda 60 sıçan (n=10; 6 grup) olacak şekilde belirlendi (19, 20). Verilerin değerlendirilmesinde SPSS istatistik paket programı (IBM SPSS Versiyon 22.0) kullanılmıştır (21). Veriler için parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği "Levene" testi ile kontrol edilirken, normallik varsayımına ise "Shapiro-Wilk" testi ile bakıldı. Gruplar arası farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve grupların ikili karşılaştırmalarında *post-hoc* analizi olarak "Tukey" testi kullanıldı. Grupların ölçüm zamanına göre değişimlerinin incelenmesinde Genel Lineer Model (GLM)

prosedüründe tekrarlı ölçümler "Repeated Measures" yöntemi kullanıldı. Ölçüm zamanına göre değişimin belirlenmesinde Mauchly'nin küresellik testi "Mauchly's Test of Sphericity" yöntemi kullanıldı. Küresellik varsayımının sağlanmadığı durumlar için ise Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt ve Lower Bound testleri dikkate alındı. Grup içi ölçüm zamanlarının ikili karşılaştırmalarında Bağımlı Örnek t–testi "Paired Samples–t" kullanıldı. Veriler, gruplar için ortalama ve standart hata olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık düzeyi P<0.05 olarak kabul edildi.

Bulgular

KG Modelinin Değerlendirilmesi: Göz kırpa sayısı ve impresyon sitolojisi testlerine göre; KG grubunun başlangıç ölçümü ortalamalarının 14 günlük BEK uygulanmasından sonraki ilk ölçüm zamanında (15. gün) belirgin bir şekilde azaldığı (P<0.05, Şekil 1) ve bu ölçüm zamanından çalışma sonuna kadar anlamlı bir değişiklik göstermediği (P>0.05) saptandı (Tablo 1, 2). Kontrol grubu deneklerin belirtilen parametreler açısından tüm ölçüm zamanlarında anlamlı değişiklikler göstermediği (P>0.05), kontrol grubu hariç diğer tüm grupların başlangıç ölçümü ortalamaları ile 15. günde elde edilen ortalamaları arasındaki farkın istatistiki açıdan anlamlı olduğu belirlendi (P<0.05, Tablo 1, 2). Histopatolojik incelemede KG grubu deneklerin korneal epitelyal kalınlığının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde incelendiği (Tablo 3, Şekil 2), korneal damarlaşma ile yangısal hücre sayısının ise arttığı saptandı (P<0.05, Tablo 3, Şekil 3).

Tablo 1. Göz kırpa sayısı test verilerinin grup ve ölçüm zamanlarına göre istatistiki analizi

Gruplar	Ölçüm Zamanları							---P---
	Başlangıç* (30 saniye)	15. gün (30 saniye)	18. gün (30 saniye)	22. gün (30 saniye)	25. gün (30 saniye)	28. gün (30 saniye)	30. gün (30 saniye)	
Kontrol	5.44+0.53	5.94+0.58 ^a	5.89+0.65 ^a	5.28+0.62 ^a	5.78+0.44 ^a	5.89+0.78 ^a	5.28+0.44 ^a	0.065
KG	5.55+0.37 ^A	2.45+0.37 ^{Bb}	2.20+0.54 ^{Bc}	2.10+0.52 ^{Bd}	2.30+0.48 ^{Bd}	2.20+0.48 ^{Bd}	2.05+0.55 ^{Bd}	0.0001
%20 SAS	5.95+0.55 ^A	2.30+0.35 ^{BCb}	2.35+0.53 ^{BCc}	2.30+0.35 ^{BCd}	2.20+0.48 ^{Cd}	2.65+0.34 ^{Bd}	2.40+0.21 ^{BCd}	0.0001
%35 SAS	5.65+0.53 ^A	2.25+0.63 ^{Eb}	3.30+0.54 ^{Db}	3.75+0.35 ^{Cb}	4.10+0.52 ^{Cb}	4.55+0.28 ^{Bb}	4.55+0.28 ^{Bbc}	0.001
%50 SAS	5.55+0.50 ^A	2.10+0.39 ^{Gb}	2.70+0.54 ^{Fbc}	3.25+0.63 ^{Ebc}	3.80+0.67 ^{Dbc}	4.15+0.47 ^{Cbc}	4.90+0.57 ^{Bab}	0.0001
%100 SAS	5.70+0.75 ^A	2.10+0.46 ^{Fb}	2.60+0.57 ^{Ebc}	2.75+0.49 ^{Ecd}	3.35+0.47 ^{Dc}	3.80+0.54 ^{Cc}	4.20+0.35 ^{Bc}	0.001
---P---	0.430	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	

a-e: Aynı sütunda farklı harfleri içeren gruplar arasında fark vardır (P<0.05), ANOVA- Posthoc, Tukey testi uygulanmıştır. **A-E:** Aynı satırda farklı harfleri içeren gruplar arasında fark vardır (P<0.05).

Gruplar için zamana göre değişim Mauchly'nin küresellik analizi (Mauchly's Test of Sphericity) yöntemiyle belirlenmiştir. Küresellik varsayımının sağlanamadığı durumlarda Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt ve Lower Bound testleri kullanılmıştır. Grup içi zamanlar arası değişimlerin karşılaştırılmasında bağımlı örnek t–testi (Paired Samples–t) uygulanmıştır (P<0.05). *Çalışmanın başlangıç ölçüm değerleri (baseline). Veriler gruplar için ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur.

Tablo 2. İmpresyon sitolojisi test verilerinin grup ve ölçüm zamanlarına göre istatistiki analizi

Gruplar	Ölçüm Zamanları							---P---
	Başlangıç*	15. Gün	18. Gün	22. Gün	25. Gün	28. Gün	30. Gün	
Kontrol	27.00±3.06	25.67±1.66 ^a	25.78±2.98 ^a	26.72±2.75 ^a	26.11±1.52 ^a	26.72±1.97 ^a	26.44±2.08 ^a	0.845
KG	27.45±1.95 ^A	11.15±1.90 ^{BCb}	11.10±1.54 ^{Cc}	11.60±2.07 ^{BCe}	11.50±1.67 ^{BCd}	12.45±1.30 ^{BCd}	12.90±1.41 ^{Bd}	0.0001
%20 SAS	24.90±1.70 ^A	12.50±1.65 ^{Eb}	14.85±1.27 ^{Db}	17.50±1.39 ^{Cd}	19.90±1.07 ^{Bc}	19.85±0.88 ^{Bc}	19.90±1.07 ^{Bc}	0.0001
%35 SAS	27.55±1.74 ^A	12.45±1.80 ^{Db}	16.50±1.39 ^{Cb}	22.85±1.89 ^{Bb}	23.05±1.38 ^{Bb}	23.25±1.16 ^{Bb}	23.50±1.29 ^{Bb}	0.0001
%50 SAS	28.00±2.01 ^A	11.55±1.62 ^{Eb}	15.75±1.38 ^{Db}	20.75±1.48 ^{BCbc}	20.70±0.86 ^{BCc}	20.25±0.82 ^{Cc}	21.40±0.84 ^{Bc}	0.0001
%100 SAS	27.00±2.69 ^A	12.50±2.09 ^{Db}	15.80±1.53 ^{Cb}	19.80±1.40 ^{Bcd}	19.75±0.68 ^{Bc}	20.20±1.36 ^{Bc}	20.30±0.92 ^{Bc}	0.0001
---P---	0.051	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	

a-e: Aynı sütunda farklı harfleri içeren gruplar arasında fark vardır ($P<0.05$), ANOVA- Posthoc, Tukey testi uygulanmıştır.

A-E: Aynı satırda farklı harfleri içeren gruplar arasında fark vardır ($P<0.05$).

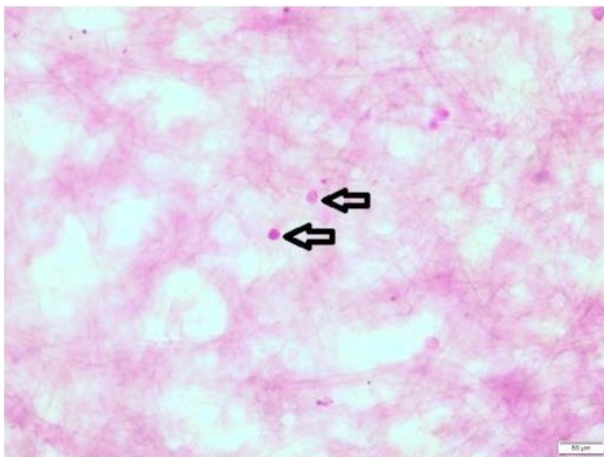
Gruplar için zamana göre değişim Mauchly'nin küresellik analizi (Mauchly's Test of Sphericity) yöntemiyle belirlenmiştir. Küresellik varsayımının sağlanamadığı durumlarda Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt ve Lower Bound testleri kullanılmıştır.

Grup içi zamanlar arası değişimlerin karşılaştırılmasında bağımlı örnek t-testi (Paired Samples-t) uygulanmıştır ($P<0.05$). *Çalışmanın başlangıç ölçüm değerleri (baseline). Veriler gruplar için ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur.

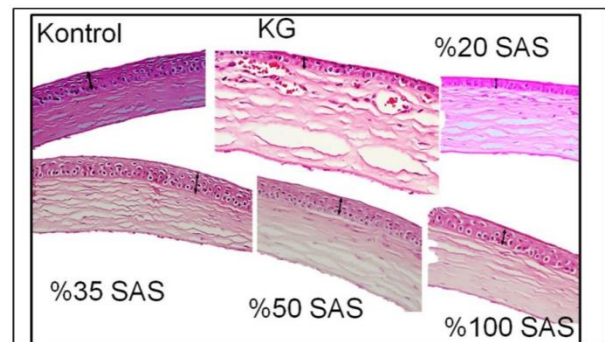
Tablo 3. Tüm grupların korneal epitelyal kalınlık, korneal damarlaşma ve yangısal hücre sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Korneal epitelyal kalınlık (μ)	Korneal damarlaşma sayısı	Yangısal hücre sayısı
Kontrol grubu	39.96±1.40 ^a	0.00±0.00 ^c	0.67±0.67 ^a
KG grubu	24.77±2.42 ^{bc}	21.20±2.93 ^a	17.56±3.69 ^c
%20 SAS	21.06±1.71 ^c	13.50±2.38 ^{ab}	15.00±5.43 ^c
%35 SAS	33.76±13.62 ^{ab}	2.50±1.82 ^c	3.60±0.96 ^b
%50 SAS	31.33±3.62 ^{abc}	3.30±1.25 ^c	7.40±2.21 ^b
%100 SAS	25.68±3.14 ^{bc}	5.80±1.67 ^{bc}	10.22±1.06 ^c
--P--	0.001	0.0001	0.0001

a-c: Aynı sütunda farklı harfleri içeren gruplar arasında fark vardır ($P<0.05$), ANOVA- Posthoc, Tukey testi uygulanmıştır. Veriler gruplar için ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur.



Şekil 1. KG grubundaki bir deneğin impresyon sitolojik kesit görüntüsü (Oklar: Konjunktival goblet hücreleri, 50 μ m).



Şekil 2. Çalışma sonunda tüm gruplardan rasgele seçilen bir deneğin tüm gruplardan rasgele seçilen bir deneğin korneal epitelyal kalınlıklarının histopatolojik kesit fotoğrafları (Oklar: Kalınlık aralıkları). KG grubu deneğin korneal epitelyal kalınlığının diğer gruplara göre belirgin şekilde incelendiği görülmektedir ($P<0.05$).

Göz Kırpma Sayısının Ölçümü: Bu teste göre çalışmanın başlangıç ölçümlerinde tüm gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz (Tablo 1); diğer ölçüm zamanlarında ise önemli olduğu ($P<0.001$, Tablo 1) belirlendi. 14 günlük BEK uygulamasından sonraki ilk ölçüm zamanı olan 15. günde kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli ($P<0.05$, Tablo 1), diğer grupların kendi aralarındaki ölçüm ortalamaları arasındaki farkın ise önemsiz olduğu kaydedildi (Tablo 1). Çalışmanın son ölçüm zamanı olan 30. günde tedavi grupları içinde göz kırpma sayısı ortalamasının en yüksek olduğu grup %50 SAS'tır. Bu grubu sırasıyla %35 SAS, %100 SAS ve %20 SAS grupları takip etmektedir. %50 SAS grubu, %35 SAS hariç ($P>0.05$, Tablo 1) diğer tüm gruplardan istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterdi ($P<0.05$, Tablo 1). Tedavi grupları içinde en düşük ortalamasının ölçüldüğü %20 SAS grubu ile tüm tedavi grupları arasındaki farklar ise önemli bulundu ($P<0.05$, Tablo 1).

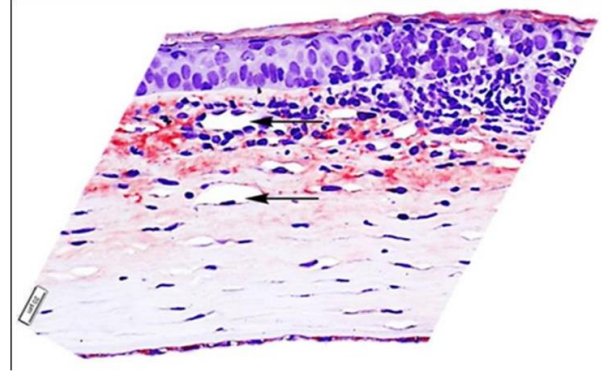
İmpresyon Sitolojisi Testi (Konjunktival Goblet Hücre Sayısı Testi): Bu parametreye göre çalışmanın başlangıç ölçümünde tüm grupların ortalamaları arasındaki fark istatistiki açıdan önemsiz (Tablo 2), diğer ölçüm zamanlarında ise önemli ($P<0.001$, Tablo 2) olarak kaydedildi. BEK uygulandıktan sonraki ilk ölçüm zamanı olan 15. günde kontrol grubu ile diğer tüm grupların ortalamaları arasındaki fark anlamlı ($P<0.05$, Tablo 2), diğer grupların kendi aralarındaki farklar ise anlamsız bulundu ($P>0.05$, Tablo 2). Çalışmanın son ölçüm zamanı olan 30. günde tedavi grupları içinde en yüksek konjunktival goblet hücre sayısı ortalaması diğer tüm gruplardan farklı olarak % 35 SAS grubunda ölçüldü (Şekil 4). Bu grubu, aralarında istatistiki açıdan fark bulunmayan %20, %50 ve %100 SAS grupları takip etti.

Histopatolojik Parametreler: Çalışma sonunda tüm gruplar korneal epitelyal kalınlık parametresine göre değerlendirildiğinde, kontrol grubu deneklerin kalınlık ortalamasının %35 SAS ve %50 SAS hariç diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde farklı olduğu ($P<0.05$) göze çarpmaktadır. %20 SAS, %100 SAS ve KG gruplarının korneal epitelyal kalınlık ortalamalarının kontrol, %35 SAS ve %50 SAS gruplarına göre belirgin şekilde incelendiği saptandı (Tablo 3, Şekil 2).

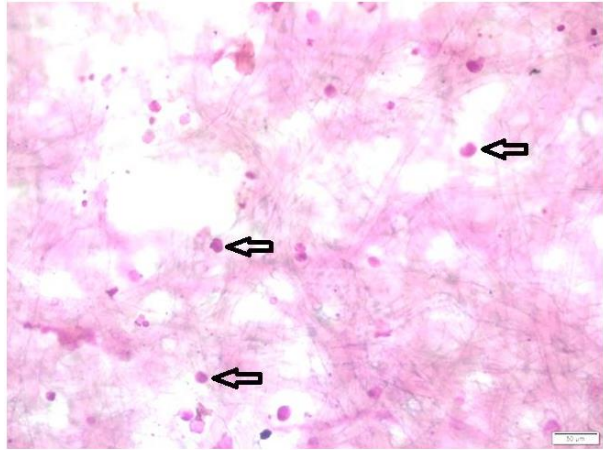
Korneal damarlaşma sayısı parametresine göre, kontrol grubu denekler ile %35 SAS, %50 SAS ve %100 SAS gruplarının damarlaşma sayısı ortalamaları arasındaki farkın istatistiki açıdan anlamlı olmadığı belirlendi ($P>0.05$, Tablo 3). En fazla damarlaşmanın KG ile %20 SAS gruplarında tespit edildiği ve aralarındaki farkın bu açıdan anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 3, Şekil 3).

Yangısal hücre sayısı parametresine göre, kontrol grubu ortalamasının diğer tüm gruplardan belirgin şekilde az ve istatistiki açıdan anlamlı olduğu bulundu ($P<0.05$, Tablo 3). %35 SAS ve %50 SAS gruplarının istatistiki olarak anlamlı bir fark göstermediği ($P>0.05$, Tablo 3) ve kontrol grubundan sonra en az yangısal hücre sayısına sahip olan gruplar olduğu belirlendi. En düşük yangısal hücre sayısına sahip olan KG, %100

SAS ve %20 SAS grupları arasındaki farkların da yine anlamlı olmadığı belirlendi ($P>0.05$, Tablo 3).



Şekil 3. Çalışma sonunda KG grubu bir deneğin korneal damarlaşma alanlarını gösteren bir kesit görüntü (Oklar: Damarlaşmalar, 20 µm).



Şekil 4. %35 SAS grubundaki bir deneğin impresyon sitolojik kesit görüntüsü (Oklar: Konjunktival goblet hücreleri, 50 µm)

Tartışma

Geçmişten günümüze KG'nin patogenezi içinde rol oynayan birçok faktörün ve farklı sağaltım seçeneklerinin araştırılması amacıyla lakrimal sekresyonun mekaniksel (22, 23), hormonal (24), sinirsel (25, 26) ve evaporatif (18, 27, 28) olarak inhibe edildiği çok sayıda hayvan modeli araştırmaları yapılmıştır. Xiong ve ark. (29) ile Lin ve ark. (30); bu modellerin KG ile ilgili aydınlatıcı veriler sağlamasına rağmen, her birinin kendine özgü özelliklerinin ve sınırlamalarının olduğunu, dolayısıyla KG'nin etiopatogenezi içindeki karmaşıklığı ve hastalığın kronik formunu tam olarak yansıtamadıklarını ileri sürmüşlerdir. Bu görüşten yola çıkan aynı araştırmacılar, oftalmik preparatların bileşimine katılan BEK gibi kuvarterner amonyum prezervatiflerinin uzun süreli kullanıldıklarında PGF'nin lipid fazını değiştirerek epitelyal hücre hasarına neden olduğunu ve bu sayede PGF stabilitesinin hızlı ve progresif bir şekilde bozulduğunu belirterek, KG modellerinde BEK'i kullanmışlardır. Tavşanlarda %0.1'lik BEK'i 14 gün

süreyle günde 2 kez topikal olarak uygulayan Xiong ve ark. (29), bu süre sonunda deneklerde klinik olarak KG'ye benzer belirtiler oluştuğunu saptamışlardır. Lin ve ark. (30), BEK'in bu defa %0.2'lik solüsyonunu farelerde 7 gün süreyle günde 2 kez topikal olarak uygulamışlar ve Xiong ve ark. (29)'nın elde ettiği klinik belirtilere ek olarak deneklerin gözyaşı kırılma zamanlarının kıaldığını, oküler dokularda yangısal hücre infiltrasyonunun arttığını ve konjunktival fornikslerinde goblet hücre sayısının azaldığını saptamışlardır. BEK'in oküler yüzeyde oluşturduğu bu olumsuz etkilerden yola çıkan birçok araştırmacı, son yıllarda farklı hayvan türlerini kullandıkları KG modeli çalışmalarında BEK'e yönelmişlerdir (31-33). Mevcut çalışmada KG modeli oluşturmak amacıyla deneklere topikal olarak 14 gün süreyle %0.2'lik BEK'den 5 µL uygulanmıştır. Bu süre sonunda yapılan klinik parametrik ölçümlerde (15. gün), BEK uygulanmayan kontrol grubu hariç diğer tüm grup deneklerin başlangıç ölçümlerine göre göz kırpmaya ile konjunktival goblet hücre sayısı ortalamalarının belirgin bir şekilde azaldığı belirlenmiş ve bu ortalamaların KG grubunda çalışma sonuna kadar belli bir seviyede devam ettiği gözlenmiştir. Histopatolojik verilere bakıldığında, diğer tüm gruplardan farklı olarak KG grubunun korneal epitelyal tabakasının incelendiği, korneal damarlaşma ile yangısal hücre sayısının anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmektedir. Tüm bu parametreler birlikte değerlendirildiğinde, BEK'in deneklerde birçok araştırmacının da belirttiği gibi (29-32) hem klinik hem de hücresel düzeyde KG'ye benzer bir etki oluşturduğu sonucu çıkmaktadır.

Prekorneal gözyaşı filminin oküler yüzeye düzgün bir şekilde yayılmasında, lipid tabakanın yeterli düzeyde salgılanmasında ve yabancı cisimlerin temizlenmesinde güçlü ve hızlı göz kırpmaya refleksinin önemine dikkat çekilmiştir (34, 35). PGF'nin lipid katmanındaki incelmelerin gözyaşının aşırı buharlaşmasına neden olarak osmolaritesini arttırdığı ve gözyaşı kırılma zamanını kısalttığı belirtilmektedir. Oküler yüzeydeki bu değişikliklerin KG'nin patogeneziinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir (36). Mevcut çalışmada, BEK uygulamasını takip eden ilk ölçüm zamanı olan 15. günde kontrol grubu hariç diğer tüm grupların göz kırpmaya sayısı ortalamalarının başlangıç ölçümüne göre belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır. BEK uygulanmayan kontrol grubu deneklerde ise başlangıç ölçümünde 5.44 ± 0.53 /dk. olarak kaydedilen göz kırpmaya sayısı ortalamasının çalışma boyunca tüm ölçüm zamanlarında anlamlı bir değişiklik göstermediği görülmektedir. Bu veriler, göz kırpmaya sayısı parametresine göre BEK uygulanan tüm gruplarda KG modelinin amacına ulaştığını göstermektedir. Çalışma sonunda tedavi gruplarının genel bir değerlendirilmesi yapıldığında, en yüksek göz kırpmaya sayı ortalamasının %50 SAS grubunda ölçüldüğü, belirtilen parametre yönünden bu grup ile sadece %35 SAS grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. İkinci en yüksek göz kırpmaya sayı ortalamasına sahip olan %35 SAS grubunun ise %100 SAS grubu hariç diğer tüm grupların ortalamalarından belirgin şekilde farklı olduğu bulunmuştur. Farelerde Botulinum-B toksini kullanılarak oluşturulan KG

modelinde farklı dozlardaki insan amniyon sıvısının terapötik etkileri karşılaştırılmış ve gruplar arasında göz kırpmaya sayısı parametresine göre önemli bir farklılık saptanmamıştır (9). Aynı modelin kullanıldığı ve farklı antiinflamatuvar ajanların etkilerinin araştırıldığı diğer iki çalışmada da kontrol ve deney grupları arasında göz kırpmaya sayıları yönünden anlamlı değişimler saptanmamıştır (37, 38). Bu sonuçlar, BEK ile oluşturduğumuz KG modeli ile Botulinum-B toksini kullanılarak oluşturulan diğeryen deney çalışmaları arasında belirtilen parametre yönünden farklılıklar olduğunu göstermektedir. Xiong ve ark. (29), BEK'in PGF'nin direkt olarak lipid ve müsin tabakalarında bozulmaya yol açtığını ve böylelikle PGF'nin stabilitesinin hızlı ve progresif bir şekilde bozulduğunu belirtirken, ana lakrimal beze enjekte edilen Botulinum-B toksininin ise aköz gözyaşı üretim miktarının azalmasına neden olarak PGF'nin aköz katmanını bozduğu ve bu sayede KG'nin aköz yetersizlik formunu yansıttığı bildirilmiştir (38). Bilindiği üzere, bazı KG olgularında hastalığa işaret eden klinik belirtiler bulunmasına rağmen aköz gözyaşı üretim miktarları normal çıkabilmektedir (39). Dolayısıyla KG oluşturmak amacıyla kullanılan modeller arasındaki farklılıklar, hastalığın farklı formlarını yansıtarak, çalışmanın klinik parametrelerinde farklı sonuçların alınmasına neden olabilir. Mevcut çalışmada BEK uygulanan deney gruplarında göz kırpmaya sayısı ortalamasının model oluştuktan sonraki ilk ölçüm zamanı olan 15. günde belirgin bir şekilde düşmesi, BEK'in gözyaşının aşırı evaporasyonuna neden olup, PGF stabilitesini bozmasına bağlanabilir. %35, %50 ve %100 SAS grubu deneklerin göz kırpmaya sayılarında çalışma sonunda gözlenen belirgin artışlar, SAS'ın orta ve yüksek yoğunluklarının PGF'nin lipid katmanı üzerine pozitif etki oluşturabileceğine işaret etmektedir. Nitekim göz kırpmaya sayısındaki artışların oküler yüzeyde kurumaya bağlı gelişen korneal hasara karşı koruyucu bir etki oluşturduğu ve bu durumun PGF'nin stabilitesinin devamında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (40).

Prekorneal gözyaşı filminin en iç katmanı olan müsin tabaka, konjunktival goblet hücreleri tarafından üretilmektedir. İnsan ve hayvanlarda goblet hücre yoğunluğundaki azalmaların müsin tabakanın yapısını ve kalınlığını bozarak, oküler yüzey bütünlüğüne zarar verdiği bilinmektedir (26, 41). Goblet hücre yoğunluğundaki değişiklikler, PGF'nin stabilitesini direkt olarak etkilediğinden, gerek klinik gerekse deneysel KG çalışmalarında bu parametrenin ortaya konulması hastalığın ve seyrinin belirlenmesi açısından önemli bulunmaktadır (42). BEK'in, lipid tabakayı bozup, müsin üretiminde azalmalara yola açarak, PGF'nin instabilitesine ve gözyaşının aşırı buharlaşmasına neden olduğu bildirilmiştir (29, 43). Xiong ve ark. (29), tavşanlarda KG oluşturmak amacıyla %0.1'lik BEK'i topikal olarak 14 gün süreyle kullanmışlar ve BEK'in olgularında konjunktival goblet hücre sayısını azalttığını saptamışlardır. Lin ve ark. (30) ise farelerde BEK'in bu kez %0.2'lik dozunu 7 gün süreyle kullanmışlar ve bu süre sonunda deneklerin konjunktival goblet hücre sayısında benzer şekilde belirgin azalmalar saptamışlardır. Aynı bulgular, Yang ve ark. (43)'nin

BALB/c ve C57BL/6 ırkı farelerde BEK ile oluşturulan karşılaştırmalı KG modeli çalışmasında da alınmıştır. Mevcut çalışmada 14 günlük BEK uygulamasından sonraki ilk ölçüm zamanında kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda impresyon sitolojisi parametresine göre goblet hücre sayısında istatistiki açıdan önemli azalmalar belirlenmiştir. Bu azalmaların KG grubunda çalışma sonuna kadar anlamlı bir değişiklik göstermediği izlenmiştir. BEK uygulaması yapılmayan kontrol grubunda ise başlangıç ile çalışma sonunda kaydedilen ortalamalar arasındaki fark anlamsız bulunmuştur. Bu veriler, %0.2'lik BEK'in 14 gün süreyle günde 2 kez topikal olarak uygulanmasının deneklerde KG'nin klinik belirtilerinden biri olan konjunktival goblet hücre sayısında belirgin azalmalara neden olduğunu göstermektedir. Model oluştuktan sonraki aşamada, goblet hücre sayısının tüm tedavi gruplarında arttığı, çalışma sonundaki en yüksek artışın ise %35 SAS grubunda olduğu, %20, %50 ve %100 SAS gruplarındaki artışların ise istatistiki açıdan anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır. Quinto ve ark. (7), Botulinum-B toksini kullanarak oluşturdukları KG modelinde, insan amniyon sıvısının deneklerin inferior ve superior konjunktivalarındaki goblet hücrelerinin yoğunluğunda artışlara neden olduğunu kaydetmişlerdir. Model çalışmalarında %0.1'lik BEK'i 10 gün süreyle günde 2 kez topikal olarak uygulayan ve konjunktival goblet hücre sayısını çalışma sonunda yapmış oldukları PAS boyama ile belirleyen Xiao ve ark. (31), amniyotik membran ekstraktı ile tedavi edilen gruplarda, BEK uygulaması sonunda azalan goblet hücre sayısında artış olduğunu saptamışlardır. 3 farklı konsantrasyondaki insan amniyon sıvısının terapötik etkilerinin karşılaştırıldığı bir başka KG modelinde de, deneklerin inferior ve superior bulbar konjunktival dokularındaki goblet hücre sayılarının tüm tedavi gruplarında arttığı belirlenmiştir (9). Araştırmacılar, insan amniyon sıvısının goblet hücre sayısında meydana getirdiği bu artışların, goblet hücrelerinin oküler yüzeyi koruyan ve yağlayan mürin tabakanın ana kaynağı olmasından ötürü önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda siğir amniyon sıvısının tüm konsantrasyonlarının goblet hücre sayısını arttırması, SAS'ın PGF stabilitesinin ve oküler yüzey sağlığının korunmasına pozitif etki yaptığını göstermektedir.

Lakrimal fonksiyonel üniteyi oluşturan yapılardan biri olan kornea, oküler yüzey sağlığının devamında önemli bir parçadır (1, 2). Korneal saydamlık ve optimal görme fonksiyonu için avasküler bir korneanın önemine dikkat çekilmiştir (44). Korneal enfeksiyonlar, kimyasal yaralanmalar, limbal kök hücre eksiklikleri gibi durumlar ile yangısal kökenli hastalıkların korneal damarlaşma sayısını arttırdığı belirtilmektedir (45). Mevcut çalışmada korneal damarlaşma ve yangısal hücre sayısı en düşük kontrol, en yüksek ise KG grubunda ölçülmüştür. Bu sonuçlar, 14 günlük BEK uygulamasının hem yangısal hücre sayısını hem de buna bağlı olarak korneal damarlaşmayı arttırdığını göstermektedir. Tedavi grupları içinde en düşük korneal damarlaşmanın ve yangısal

hücre sayısının %35 ve %50 SAS gruplarında ölçülmesi ise SAS'ın orta yoğunluklarının yangısal süreci ve korneal vaskülariteyi baskıladığına işaret etmektedir. Korneadaki epitelyal hasar, bu katmanın morfolojik açıdan bozulmasına ve incelmesine neden olmaktadır (46). Dolayısıyla korneal kalınlığın korunması, sağlam bir bariyer fonksiyonu ile sağlıklı bir endotele bağlıdır (47). Korneal epitelyal kalınlığın değerlendirilmesi, korneanın durumu ve fizyolojisi hakkında aydınlatıcı bilgiler verdiğinden geçmişten beri birçok KG çalışmasında teşhis metodlarından biri olarak tercih edilmektedir (48-51). Bu çalışmaların bazılarında KG'li hastaların korneal epitelyumlarında belirgin bir değişiklik olmadığı (48, 49) bazılarında ise sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında incelleme saptandığı rapor edilmiştir (50, 51). KG ile korneal epitelyal kalınlık arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamasa da gözyaşı osmolaritesindeki artış ve PGF evaporasyonunun korneal epitelyumda incelmeye yol açabileceği hakim bir görüş olarak karşımıza çıkmaktadır (47). Mevcut çalışmada korneal epitelyal tabakanın en ince olduğu grup KG'dir. Bu sonuç, BEK'in oküler yüzeyin epitelyal hücre membranına zarar verdiği görüşlerini desteklemektedir (29). Nitelim Lin ve ark. (30) de %0.2'lik BEK'in farelerin korneal epitelyumunda incelmelere yol açtığını rapor etmişlerdir. Tedavi grupları içinde korneal epitelyal tabakanın en kalın olduğu grubun %35 SAS olduğu saptanmıştır. Çalışmanın diğer parametrelerine de bakıldığında %35 SAS grubunun en etkili sonuçları veren grupların başında geldiği görülmektedir. Multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanan KG'nin tedavisinde bir ajana etkili diyebilmek için bu faktörlerin önemli bir kısmını elemine etmesi ve patogenezi destekleyen kısır döngüyü kırması beklenmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde SAS'ın %35'lik konsantrasyonunun korneal epitelyal kalınlık dâhil birçok yönden güçlü etki gösterdiği görülmektedir.

Çalışma boyunca yapılan klinik parametrik ölçümlere göre 14 günlük BEK uygulamasının tüm gruplarda göz kırpması ve konjunktival goblet hücre sayısını azalttığı, çalışma sonunda yapılan histopatolojik değerlendirmede ise korneal epitelyal tabakayı incelttiği, korneal damarlaşma ve yangısal hücre sayılarını ise belirgin şekilde arttırdığı saptanmıştır. Tedavi grupları içinde en etkili terapötik sonuçlar, göz kırpması sayısına göre %35, %50 ve %100 SAS; konjunktival goblet hücre sayısına göre %35 SAS; korneal damarlaşma, yangısal hücre sayısı ve korneal epitelyal kalınlık parametrelerine göre ise %35 ve %50 SAS gruplarında alınmıştır. Bu verilerden hareketle BEK'in deneklerde KG'deki klinik ve hücresele belirtilere benzer etkiler oluşturduğu, SAS'ın orta ve yüksek yoğunluklarının ise bu belirtiler üzerine pozitif etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Çalışmanın istatistik aşamasında büyük katkısı olan Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim üyesi Doç. Dr. Cemal ORHAN'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Perry HD. Dry eye disease: pathophysiology, classification, and diagnosis. *Am J Manag Care* 2008; 14: 79-87.
2. Tavares Fde P, Fernandes RS, Bernardes TF, et al. Dry eye disease. *Semin Ophthalmol* 2010; 25: 84-93.
3. Almeida DED, Mamede FV, Ortiz JP, et al. Iatrogenic keratoconjunctivitis sicca in a dog. *Ciencia Rural* 2004; 34: 921-924.
4. Berdoulay A, English RV, Nadelstein B. Effect of topical %0.02 tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratokonjunktivitis sicca. *Vet Ophthalmol* 2005; 8, 225-226.
5. Foulks GN. Pharmacological management of dry eye in the elderly patient. *Drugs Aging* 2008; 25: 105-118.
6. Gayton JL. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol* 2009; 3: 405-412.
7. Quinto GG, Camacho W, Castro-Combs J, et al. Effects of topical human amniotic fluid and human serum in a mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 2012; 31: 424-430.
8. Urzua CA, Vasquez DH, Huidobro A, et al. Randomized double-blind clinical trial of autologous serum versus artificial tears in dry eye syndrome. *Curr Eye Res* 2012; 37: 684-888.
9. Quinto GG, Castro-Combs J, Li L, et al. Outcomes of different concentrations of human amniotic fluid in a keratoconjunctivitis sicca-induced mouse model. *Int Ophthalmol* 2016; 36: 643-650.
10. Yoon KC, Heo H, Im SK, et al. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 86-92.
11. Xiao X, He H, Lin Z, et al. Therapeutic effects of epidermal growth factor on benzalkonium chloride-induced dry eye in a mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 191-197.
12. Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, et al. IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2684-2690.
13. Kumar A, Chandra RV, Reddy AA, et al. Evaluation of clinical, antiinflammatory and antiinfective properties of amniotic membrane used for guided tissue regeneration: A randomized controlled trial. *Dent Res J (Isfahan)* 2015; 12: 127-135.
14. Aydin H, Saraçoęlu M, Kerimoęlu G, et al. Effects of human amniotic fluid on posterolateral spinal fusion: An experimental preliminary study. *Ekleml Hastalık Cerrahisi* 2011; 22: 166-171.
15. Karaçal N, Koşucu P, Cobanoęlu U, et al. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res* 2005; 129: 283-287.
16. Gonenci R, Altug ME, Koc A, et al. Effects of Bovine Amniotic Fluid on Acute Corneal Alkali Burns in the Rat. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 8: 617-623.
17. Esmaili A, Abbasian B, Kazemini H, et al. Effect of bovine amniotic fluid on intra-abdominal adhesion in male rats. *Int J Surg* 2010; 8: 639-642.
18. Kilic S, Kulualp K. Efficacy of several therapeutic agents in a murine model of dry eye syndrome. *Comp Med* 2016; 66: 112-118.
19. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd Edition, Hillsdale, NJ: Erlbaum, 1988.
20. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007; 39: 175-191.
21. IBM SPSS, IBM Corp. Released 2013. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0*. Armonk, NY: USA.
22. Maitchouk DY, Beuerman RW, Ohta T, et al. Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 246-252.
23. Barabino S, Dana MR. Animal Models of dry eye: A critical Assessment of Opportunities and Limitations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1641-1646.
24. Sullivan DA, Allansmith MR. Hormonal modulation of tear volume in the rat. *Exp Eye Res* 1986; 42: 131-139.
25. Buralassi S, Panichi L, Chetoni P, et al. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Res* 1999; 31: 229-235.
26. Altinors DD, Bozbeyoęlu S, Karabay G, et al. Evaluation of ocular surface changes in a rabbit dry eye model using a modified impression cytology technique. *Curr Eye Res* 2007; 32: 301-307.
27. Barabino S, Shen L, Chen L, et al. The controlled-environment chamber: A new mouse model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 2766-2771.
28. Chen W, Zhang X, Zhang J, et al. A murine model of dry eye induced by an intelligently controlled environmental system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 1386-1391.
29. Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 1850-1856.
30. Lin Z, Liu X, Zhou T, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis* 2011; 17: 257-264.
31. Xiao X, Luo P, Zhao H, et al. Amniotic membrane extract ameliorates benzalkonium chloride-induced dry eye in a murine model. *Exp Eye Res* 2013; 115: 31-40.
32. Zhang Z, Yang WZ, Zhu ZZ, et al. Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 2963-2974.
33. Kang SW, Kim KA, Lee CH, et al. A standardized extract of *Rhynchosia volubilis* Lour. exerts a protective effect on benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model. *J Ethnopharmacol* 2018; 215: 91-100.
34. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001; 2: 203-210.
35. Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112: 71-81.

36. Davidson HJ, Kuonen VJ. Tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol* 2004; 7: 71-77.
37. Suwan-apichon O, Rizen M, Rangsin R, et al. Botulinum toxin B-induced mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 133-139.
38. Lekhanont K, Park CY, Smith JA, et al. Effects of Topical Anti-inflammatory Agents in a Botulinum Toxin B-Induced Mouse Model of Keratoconjunctivitis Sicca. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007; 23: 27-34.
39. Yagci A, Gurdal C. The role and treatment of inflammation in dry eye disease. *Int Ophthalmol* 2014; 34: 1291-1301.
40. Choy EP, Cho P, Benzie IF, et al. Dry eye and blink rate simulation with a pig eye model. *Optom Vis Sci* 2008; 85: 129-134.
41. Lopin E, Deveney T, Asbell PA. Impression cytology: recent advances and applications in dry eye disease. *Ocul Surf* 2009; 7: 93-110.
42. Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: Uses and limitations. *Exp Eye Res* 2004; 79: 613-621.
43. Yang Q, Zhang Y, Liu X, et al. A Comparison of the Effects of Benzalkonium Chloride on Ocular Surfaces between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 3. pii: E509.
44. Voiculescu OB, Voinea LM, Alexandrescu C. Corneal neovascularization and biological therapy. *J Med Life* 2015; 8: 444-448.
45. Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, et al. Current and emerging therapies for corneal neovascularization. *Ocul Surf* 2018; 16: 398-414.
46. Cui X, Hong J, Wang F, et al. Assessment of corneal epithelial thickness in dry eye patients. *Optom Vis Sci* 2014; 91: 1446-1454.
47. Akyol-Salman I, Azizi S, Mumcu U, et al. Central corneal thickness in patients with meibomian gland dysfunction. *Clin Exp Optom* 2011; 94: 464-467.
48. Pole JJ, Batzer JK. Central corneal thickness of patients with dry eyes *J Am Optom Assoc* 1985; 56: 220-221.
49. Van Bijsterveld OP, Baardman J. Measurements of corneal thickness in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Klin Monbl Augenheilkd* 1990; 197: 240-243.
50. Liu Z, Pflugfelder SC. Corneal thickness is reduced in dry eye. *Cornea* 1999; 18: 403-407.
51. Sanchis-Gimeno JA, Lleo-Perez A, Alonso L, et al. Reduced corneal thickness values in postmenopausal women with dry eye. *Cornea* 2005; 24: 39-44.