



## Alkali Kornea Yanıklarının Tedavisinde Amniyon Sıvısının Etkinliğinin Araştırılması: Klinik ve Histopatolojik Bulgular \*

Cihan GÜNAY <sup>1, a</sup>  
Aydın SAĞLIYAN <sup>1, b</sup>  
Mustafa ÖZKARACA <sup>2, c</sup>  
Eren POLAT <sup>1, d</sup>  
Mehmet Cengiz HAN <sup>1, e</sup>  
Kemal Kenan KARABULUT <sup>1, f</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Cerrahi Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Atatürk Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Patoloji Anabilim Dalı,  
Erzurum, TÜRKİYE

<sup>a</sup> ORCID: 0000-0002-0476-6164

<sup>b</sup> ORCID: 0000-0002-8226-0740

<sup>c</sup> ORCID: 0000-0002-6359-6249

<sup>d</sup> ORCID: 0000-0002-3999-1310

<sup>e</sup> ORCID: 0000-0001-9178-6261

<sup>f</sup> ORCID: 0000-0002-2934-964X

Korneadaki epitel bütünlüğünün bozulması mikroorganizmaların kornea epitelini rahat bir şekilde geçmesine ve korneal ülserasyonlara sebep olabilir. Korneada oluşan alkali yanıklar kornea epitel bütünlüğünü bozarak ülserasyonlara hatta perforasyonlara sebep olabilir. Alkali kornea yanıklarının tedavisi için çok sayıda medikal tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bu çalışmada korneanın alkali yanıkları üzerine amniyon sıvısının etkinliğinin klinik ve histopatolojik sonuçlarının araştırılması amaçlandı. Amniyon sıvısı içerisinde büyüme faktörleri ile IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  ekspresyonunu baskılayarak inflamasyonu azaltan faktörlerin bulunması çalışmanın hipotezinin kurulmasında önemli bir dayanak oluşturdu.

Çalışmada 30 adet dişi cinsiyete sahip, Wistar Albino ırkı rat kullanıldı. Ratlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Alkali yanık oluşturmak amacıyla ratların sağ gözlerinde kornea üzerinde 2N yoğunluğunda NaOH solüsyonu 40 saniye bekletildi. Birinci gruptaki (AS) ratlarda alkali kornea yanığı oluşturulup 20 gün boyunca günde üç kez ikişer damla siğir amniyon sıvısı göze damlatıldı. İkinci gruptaki (PK) ratlarda alkali kornea yanığı oluşturulup 20 gün boyunca üç kez ikişer damla serum fizyolojik uygulandı. Üçüncü gruptaki (NK) ratlarda alkali kornea yanığı oluşturulmayıp 20 gün boyunca günde üç kez ikişer damla siğir amniyotik sıvısı göze damlatıldı. Çalışma boyunca klinik bulgular indirekt oftalmoskop, fluorescein testi ve Rose Bengal testi ile değerlendirildi. Çalışma sonunda ise, kornea epitelindeki değişiklikleri değerlendirmek için histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Klinik değerlendirmeler sonucunda amniyon sıvısı uygulanan gruptaki (AS) ratlarda deneysel alkali yanığın neden olduğu korneal hasar, konjunktivitis, blefarospazm ve fotofobi gibi klinik belirtilerin hafiflediği tespit edilmiştir. Serum fizyolojik uygulanan ikinci gruptaki (PK) ratlarda ise, korneal perforasyon, şiddetli konjunktivitis, blefarospazm ve fotofobi oluştuğu tespit edildi. Histopatolojik incelemeler sonucunda, ödem ve neovaskülarizasyon şiddeti açısından PK ve AS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu tespit edildi ( $P<0.05$ ).

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

**Anahtar Kelimeler:** Alkali yanık, amniyon, kornea

### Investigation of the Effectiveness of Amniotic Fluid on the Treatment of Alkaline Corneal Burns: Clinical and Histopathological Findings

Disruption of the epithelial integrity of the cornea may cause microorganisms to pass easily through the corneal epithelium and cause corneal ulcerations. Alkaline burns in the cornea may disrupt the integrity of the corneal epithelium and cause ulcerations or even perforations. There are many medical treatment options for the treatment of alkaline corneal burns. One of these medical treatment options is amniotic membrane and amniotic fluid. In this study, it was aimed to investigate the effectiveness of amniotic fluid on alkaline burns of the cornea.

Thirty Wistar Albino rats were used in the study. Rats were randomly divided into 3 groups. In order to cause an alkaline burn, a filter paper absorbed with 2N NaOH solution was kept on the cornea of the right eyes of the rats for 40 seconds. Alkaline corneal burn was created in rats in the first group and two drops of bovine amniotic fluid were dripped into the eye three times a day for 20 days. In the second group, an alkaline corneal burn was created and two drops of saline was instilled into the eye three times a day for 20 days. In the third group, no alkaline corneal burn was created and two drops of bovine amniotic fluid were dripped into the eye three times a day for 20 days. Throughout the study, clinical findings were evaluated by indirect ophthalmoscope, fluorescein test and Rose Bengal test. At the end of the study, histopathological evaluations were made to evaluate the changes in the corneal epithelium.

As a result of the clinical evaluations, it was found that corneal damage, conjunctivitis, blepharospasm and photophobia were reduced in the rats in the amniotic fluid group. Corneal perforation, severe conjunctivitis, blepharospasm and photophobia were found in rats in the second group. As a result of histopathological examinations, a statistically significant difference was found between the PK and AS groups in terms of the severity of edema and neovascularization ( $P<0.05$ ).

As a result, it was concluded that amniotic fluid is effective in corneal alkaline burns and it would be beneficial to use it in addition to medical or operative treatments.

**Key Words:** Alkaline burn, amnion, cornea

Geliş Tarihi : 27.02.2021  
Kabul Tarihi : 20.04.2021

#### Yazışma Adresi Correspondence

Eren POLAT  
Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Cerrahi Anabilim Dalı,  
Elazığ – TÜRKİYE

erenpolat@firat.edu.tr

\* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) tarafından VF.16.11 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

## Giriş

Kornea, gözün tunica fibroza bulbi katmanının avasküler yapıdaki saydam tabakasıdır. Lens ile birlikte dış ortamdan gelen ışığı kırarak retinaya odaklanmasını sağlar. Tunica fibrosa bulbinin sklera katmanı ile arasında kendisini çevreleyen limbus adı verilen bir çukur vardır. Kan ve lenf damarları bulunmayan kornea dokusunun beslenmesi limbus damarları aracılığıyla olur (1-11).

Kornea önden arkaya doğru epitelium anterior kornea, Bowman membranı, stroma, descemet zarı ve epitelium posterior kornea adı verilen beş katmandan oluşur (1, 6, 7, 9). Epitelium anterior kornea katmanı, korneayı dış etkenler ve mikroorganizmalara karşı koruyan önemli bir bariyerdir. Epitel katmanında oluşan yaralanmalar sonucunda, avasküler yapıdaki stroma katı ve Bowman membranı çeşitli mikroorganizmalara (özellikle Pseudomonas) karşı savunmasız duruma geçer (1, 6, 8).

Kornea ülserleri, korneanın epitel ve stroma katmanlarında doku kayıplarına yol açan ciddi inflamatuvar ve enfeksiyöz göz problemleridir. Ulkus kornea eksojen veya endojen kaynaklı olarak şekillenebilir. Travmatik lezyonlar ve kornea ile temas eden kimyasallar kornea ülserlerine sebep olan eksojen nedenlerdir. Kornea ülserlerinden sorumlu olan endojen sebeplerden en önemlileri ise, gözyaşı filminin yetersizliğinden kaynaklanan göz kurumaları ve immünolojik bozukluklardır. Yine entropiyon, ektropiyon, dişişiazis gibi hastalıklar ile mikotik ve bakteriyel enfeksiyonlarda korneal ülserlere sebep olabilmektedir (12-15).

Korneal ülserlerin sağaltımındaki temel prensip mevcut ağrıyı hafifletmek, perforasyon oluşmasını engellemek, enfeksiyon varsa bunu ortadan kaldırmak, sikatrizeasyonu hızlandırmak, sikatrize dokunun bırakacağı görüş kaybı ve hasarı en alt seviyeye indirmektir (16). Ağrıyı azaltmak ve enfeksiyonu gidermek için medikal olarak lokal antiinflamatuvarlar (diklofenak sodyum vs.), lokal antibiyotikler (gentamisin, tobramisin, moksifloksasin vs.), antikoljenazik ilaçlar (asetilsistein vs.) ve vitamin (A, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C) uygulamaları etkili olabilmektedir. Kimyasal bir maddeden kaynaklı bir korneal ülser oluştuğunda ise tedavinin temelinde kimyasal maddenin hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerekir (4, 5, 12, 13, 15, 17-20).

Korneal ülserlerin operatif tedavilerinde ise, çizgi ya da nokta keratotomi, penetran veya lamellar keratoplasti, konjunktival flap, koterizasyon ve yumuşak kontakt lens uygulamaları en çok kullanılan tekniklerdir (10, 21).

Amniyon sıvısı ve zarı oftalmolojik problemlerde sıklıkla kullanılan maddelerdir. Oftalmolojide ilk kez 1940 yılında De Rotth konjunktival epitelium defektlerinde kullanılmasına rağmen pek başarı elde edememişlerdir. Amniyon zarı ve sıvısı korneal epitel bozuklukları, iyileşmeyen korneal ülserler, limbal kök hücre yetmezlikleri, skleral erimeler gibi oftalmoloji problemlerde kullanılabilir (17, 19, 22-28). 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 (25, 29-31).

Amniyotik membran ve amniyon sıvısı, hücre epitelizasyonunu hızlandırır. Antibakteriyel etkileri olmasının yanında fibroblastik aktiviteyi de 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 (30, 32-41).

Bu çalışmada, sığır amniyotik sıvısının deneysel olarak oluşturulan alkali kornea yanıkları üzerindeki etkinliğinin klinik ve histopatolojik sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**Araştırma ve Yayın Etiği:** Çalışmaya Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının resmi onayı alındıktan sonra başlanmıştır (20.04.2016, Karar no: 82).

**Grupların Oluşturulması:** Materyal olarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden elde edilen 30 adet dişi, erişkin, 250-300 ağırlığındaki Wistar Albino rat kullanıldı. Ratlara özel kafesler içerisinde, özel laboratuvar koşulları uygulanarak bakıldı (24±3°C %40-60 nem, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık). Beslenmesi standart pelet yem kullanılarak yapıldı. Çalışma için ratlar rastgele üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki ratların sağ gözlerinde alkali yanık oluşturulduktan sonra 20 gün sığır amniyon sıvısı damlatıldı (AS). İkinci gruptaki ratların sağ gözlerinde alkali yanık oluşturulduktan sonra 20 gün serum fizyolojik damlatıldı (PK). Üçüncü gruptaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadan 20 gün boyunca sığır amniyotik sıvısı uygulandı (NK).

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

**Korneada Alkali Yanık Oluşturulması:** Anesteziye alınan ratlara, korneda alkali yanık oluşturulmadan önce %0.5 lik proparakain HCl (Alcain %0.5, Alcon, İstanbul, Turkey) uygulanarak lokal anestezi sağlandı. AS ve PK gruplarındaki ratların sağ gözlerinde alkali kornea yanığı oluşturuldu. Bunun için 3 mm çapında bir filtre kağıdına 2N yoğunluğundaki NaOH emdirilerek 40 saniye kornea üzerinde bekletildi. Alkali yanık oluşturulduktan sonra AS ve PK grubundaki ratların sağ gözleri serum fizyolojik ile 2 dk boyunca yıkandı. NK grubundaki ratların gözlerinde alkali yanık oluşturulmadı.

**Amniyon Sıvısının Hazırlanması:** Çalışmada sağlıklı gebe ineklerden sezeryan operasyonu sırasında elde edilen amniyon sıvısı kullanıldı. Operasyondan hemen sonra steril şartlarda toplanan amniyon sıvısının laboratuvarında bakteriyolojik muayeneleri yapıldı. Sağlıklı oldukları anlaşılan amniyon sıvıları 2000 devirde 15 dakika süreyle santrüfuj edildi. Santrüfuj işlemi sonunda supernatant olarak ifade edilen kısım alınarak steril tüplere yerleştirildi ve denature olmaması için dondurularak -20 °C sıcaklıkta saklandı. Kullanıma başlamadan 1 gün önce +4 °C de bekletilen amniyon sıvısı göze damlatma şeklinde kullanıldı (33).

**Amniyon Sıvısının Kullanımı:** AS ve NK gruplarındaki ratların sağ gözlerine 20 gün boyunca, günde üç kez 2'şer damla sığır amniyon sıvısı damlatıldı. PK grubundaki ratların ise sağ gözlerine 20 gün boyunca, günde üç kez 2'şer damla serum fizyolojik damlatıldı.

**Klinik Bulguların Tespiti:** Bütün gruplardaki ratlara 1, 5, 10, 15 ve 20. günlerde Schirmer testi, rose bengal boyama, fluorescein boyama, gözyaşı kırılma zamanı tayini ve göz içi basınç ölçümü yapıldı.

Çalışma süresince ratlarda görülmesi muhtemel fotofobi, blefarospazm, konjunktivitis, korneal hasarlar (korneal vaskülarizasyon, ödem, perforasyon vs.) gibi oküler değişikliklerin takibi ise oftalmoskop (Heine Omega®500 Indirect Binocular Oftalmoskop, Almanya) ile yapıldı.

**Schirmer Testi:** Bu amaçla Zone-Quick (Shoma Yakuhin Kako Co Ltd. Tokyo/Japonya) marka bir gözyaşı ölçüm ipliği kullanıldı. Bunun için her bir rat uzman kişilerce dikkatli bir şekilde tutularak iplikçik sağ alt göz kapağının konjunktival boşluğuna yerleştirildi. Bir dakika sonra alınarak gözyaşı miktarı kendi ölçüm çubuğunda değerlendirildi.

**Rose-Bengal Boyama:** Bu testte ratların sağ gözlerine bir mikro enjektör (901 N, Hamilton, Amerika Birleşik Devletleri) ile %1'lik Rose bengal (Institut Pourquier, Montpellier Fransa) boyasından 1 µl damlatıldı. Uygulamadan 5 dakika sonra boyanmış olan kornealar indirekt oftalmoskop ile 20 dioptrilik bir lup kullanılarak beyaz ışık altında muayene edildi. Bu parametre ile korneada saptanan değişimler Tablo 1'de gösterildiği şekilde derecelendirildi (8, 19).

**Fluorescein Boyama:** Bu testte ratların sağ gözlerine bir mikro enjektör (901 N, Hamilton, ABD) ile %1'lik sodyum fluorescein (Bereket Kimya Lab. İstanbul, Türkiye) boyasından 1 µL damlatıldı. Uygulamadan 5 dakika sonra boyanmış olan kornealar indirekt oftalmoskop ile 20 dioptrilik bir lup kullanılarak kobalt mavisi filtresi altında muayene edildi. Bu parametre ile korneada saptanan değişimler Tablo 2'de gösterildiği şekilde derecelendirildi (8, 19).

**Gözyaşı Kırılma Zamanı:** Ratların sağ gözlerine %1'lik sodyum fluorescein solüsyonundan 1 µL damlatıldıktan sonra tam bir göz kırpmaya gerçekleşmesi beklendi. Daha sonra indirekt oftalmoskop ile 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 (8, 19).

**Göz içi Basıncın Ölçülmesi:** Ratlar anestezide alınmadan bir yardımcıya tutturularak Reichert Technologies Tono-Pen marka bir tonometre tüm gruplarda göz içi basınç ölçümü yapıldı.

**Ötenazi Protokolü:** Histopatolojik verilerin elde edilmesi için 20. günün sonunda hayvanlar kapalı kutu içerisinde karbondioksit inhalasyonu ile ötenazi edildi. Ötenazi işleminden sonra histopatolojik değerlendirmeler için ratların sağ gözlerinden örnekler kullanıldı.

**Histopatolojik Değerlendirmeler:** Alınan korneal 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 mikroskopunda incelendi. Histopatolojik incelemelerde ödem, neovaskülarizasyon ve polimorf nükleer hücre infiltrasyonlarının varlığı yönünden değerlendirmeler Tablo 3'deki gibi yapıldı.

**Tablo 1.** Rose-bengal boyanma testinin değerlendirme kriterleri

Skor	Korneadaki boyanma şiddeti
0	Hiç boyanma yok
1	Hafif boyanma
2	Orta dereceli boyanma
3	Yaygın boyanma

**Tablo 2.** Fluorescein boyanma testinin değerlendirme kriterleri

Skor	Korneanın boyanma miktarı
0	Korneal yüzeyin hiç boyanmamış olması
1	Korneal yüzeyin 1/8 ya da daha az bir kısmının boyanması
2	Korneal yüzeyin 1/4 ya da daha az bir kısmının boyanması
3	Korneal yüzeyin 1/2 ya da daha az bir kısmının boyanması
4	Korneal yüzeyin tamamının boyanması

**Tablo 3.** Histopatolojik inceleme kriterlerini değerlendirilmesi için skorlama

Histopatolojik lezyon	Skor	Derece
	0	Yok
Polimorf nükleer hücre infiltrasyonu	1	5'den az polimorf nükleer hücre
	2	5-20 arası polimorf nükleer hücre
	3	20'den fazla polimorf nükleer hücre
	0	Yok
Ödem	1	%5'inden az ödem
	2	%5-20 arası ödem
	3	%20'den fazlası ödem
	0	Yok
Neovaskülarizasyon	1	1-3 arası damar oluşumu
	2	4-6 arası damar oluşumu
	3	7 ve yukarısı damar oluşumu

**İstatistiksel Analiz:** Klinik bulguların istatistiksel analizlerinde SPSS Ms Windows Release 16.0 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. 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 (42).

## Bulgular

**Klinik Bulgular:** Çalışma süresince ratlarda görülmesi muhtemel fotofobi, blefarospazm, konjunktivitis, korneal hasarlar (korneal vaskülarizasyon, ödem, perforasyon vs.) gibi oküler değişiklikler Tablo 4'de sunuldu. Oküler değişikliklerin zamanla değişimi de Şekil 1, 2, 3 ve 4'deki gibidir.

Çalışma süresince 1, 5, 10, 15 ve 20. günlerde yapılan muayeneler sırasında schirmer gözyaşı testi, rose bengal boyama, fluorescein boyama, gözyaşı kırılma zamanını tayini ve göz içi basınç ölçümleri yapıldı. Elde edilen ölçüm değerlerine yönelik istatistiksel analizler Tablo 5, 6, 7, 8 ve 9'da gösterildi.

**Tablo 4.** 1, 5, 10, 15 ve 20. günlerde AS, PK ve NK gruplarındaki ratların oftalmolojik muayenelerinde tespit edilen klinik belirtilerin (konjunktivitis, korneal hasar, fotofobi, blefarospazm gibi) grup içi ortalama şiddetleri

Klinik Belirtilerin Şiddeti	AS					PK					NK				
	1.gün	5.gün	10.gün	15.gün	20.gün	1.gün	5.gün	10.gün	15.gün	20.gün	1.gün	5.gün	10.gün	15.gün	20.gün
Konjunktivitis	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Korneal hasar	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Fotofobi	+++	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Blefarospazm	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-

-:Belirti yok + : Hafif şiddetli ++ : Orta şiddetli +++: Şiddetli

**Tablo 5.** Schirmer test değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. gün	5. gün	10. gün	15. gün	20. gün
AS	16.2 $\pm$ 0.48 <sup>A,b</sup>	12.9 $\pm$ 0.67 <sup>B,b</sup>	11.7 $\pm$ 1.06 <sup>BC,b</sup>	9.5 $\pm$ 1.17 <sup>C,b</sup>	9.9 $\pm$ 0.69 <sup>A,b</sup>
PK	17.9 $\pm$ 0.54 <sup>A,a</sup>	13.7 $\pm$ 1.22 <sup>B,ab</sup>	9.3 $\pm$ 0.74 <sup>BC,c</sup>	11.5 $\pm$ 1.38 <sup>BC,b</sup>	7.2 $\pm$ 0.66 <sup>C,c</sup>
NK	17.1 $\pm$ 0.64 <sup>ab</sup>	16 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	16.8 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	17.4 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	17.2 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
<b>P</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ( $P < 0.001$ ).

<sup>A,B,C,D</sup> Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ( $P < 0.001$ ).

**Tablo 6.** Rose bengal ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. gün	5. gün	10. gün	15. gün	20. gün
AS	0.0 <sup>D</sup>	4.0 $\pm$ 0.1 <sup>A,a</sup>	2.8 $\pm$ 0.29 <sup>B,b</sup>	1.9 $\pm$ 0.28 <sup>B,b</sup>	1.5 $\pm$ 0.22 <sup>C,b</sup>
PK	0.0 <sup>B</sup>	4.0 $\pm$ 0.1 <sup>A,a</sup>	3.7 $\pm$ 0.15 <sup>A,a</sup>	3.6 $\pm$ 0.22 <sup>A,a</sup>	3.7 $\pm$ 0.21 <sup>A,a</sup>
NK	0.0	0.0 <sup>D</sup>	0.0 <sup>C</sup>	0.0 <sup>C</sup>	0.0 <sup>C</sup>
<b>P</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ( $P < 0.001$ ).

<sup>A,B,C,D</sup> Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ( $P < 0.001$ ).

**Tablo 7.** Fluorescein boyama değerlendirmelerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. gün	5. gün	10. gün	15. gün	20. gün
AS	0.0 <sup>E</sup>	3.9 $\pm$ 0.1 <sup>A,a</sup>	2.9 $\pm$ 0.28 <sup>B,b</sup>	2.1 $\pm$ 0.31 <sup>C,b</sup>	1.1 $\pm$ 0.28 <sup>D,b</sup>
PK	0.0 <sup>C</sup>	4.0 $\pm$ 0.1 <sup>A,a</sup>	3.8 $\pm$ 0.2 <sup>AB,a</sup>	3.5 $\pm$ 0.17 <sup>AB,a</sup>	3.3 $\pm$ 0.21 <sup>B,a</sup>
NK	0.0	0.0 <sup>D</sup>	0.0 <sup>C</sup>	0.0 <sup>C</sup>	0.0 <sup>C</sup>
<b>P</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ( $P < 0.001$ ).

<sup>A,B,C,D</sup> Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ( $P < 0.001$ ).

**Tablo 8.** Gözyaşı kırılma zamanı ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. gün	5. gün	10. gün	15. gün	20. gün
AS	15.4±0.8 <sup>A</sup>	5.7±0.66 <sup>D,b</sup>	7.8±0.74 <sup>C,b</sup>	9.9±0.62 <sup>B,b</sup>	9.9±0.62 <sup>B,b</sup>
PK	14.4±0.87 <sup>A</sup>	5.7±0.63 <sup>B,b</sup>	4.2±0.55 <sup>B,c</sup>	4.5±0.56 <sup>B,c</sup>	4.7±0.43 <sup>B,c</sup>
NK	15.5±0.85	14.7±1.21 <sup>a</sup>	15.6±0.96 <sup>a</sup>	15.9±0.73 <sup>a</sup>	16.2±0.91 <sup>a</sup>
<b>P</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.001).

<sup>A,B,C,D</sup> Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.001).

**Tablo 9.** Göz içi basınç ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Zaman				
	1. gün	5. gün	10. gün	15. gün	20. gün
AS	28.1±2.28 <sup>AB,a</sup>	30.2±1.37 <sup>A,a</sup>	25.4±1.48 <sup>AB,b</sup>	23.4±0.89 <sup>B,b</sup>	18.7±0.97 <sup>C,ab</sup>
PK	26.1±0.96 <sup>B,a</sup>	32.0±2.02 <sup>A,a</sup>	31.2±0.73 <sup>A,a</sup>	32.6±0.118 <sup>A,a</sup>	22.0±1.84 <sup>C,a</sup>
NK	20.4±1.19 <sup>b</sup>	24.5±1.6 <sup>b</sup>	19.0±1.01 <sup>c</sup>	19.7±0.92 <sup>c</sup>	17.6±0.49 <sup>b</sup>
<b>P</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.001).

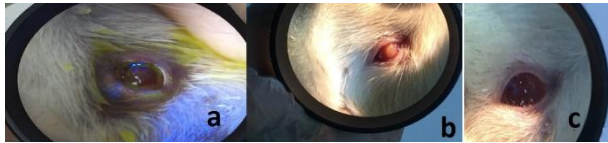
<sup>A,B,C,D</sup> Aynı satırda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.001).

**Tablo 10.** Histopatolojik ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi

Gruplar	Ödem	Neovaskülarizasyon	Polimorf nükleer hücre infiltrasyonu
AS	1.40±0.24 <sup>b</sup>	0.40±0.24 <sup>b</sup>	1.20±0.20 <sup>a</sup>
PK	2.20±0.20 <sup>a</sup>	1.80±0.20 <sup>a</sup>	0.80±0.20 <sup>b</sup>
NK	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.001).

**Histopatolojik Bulgular:** NK grubundaki ratlarda histopatolojik olarak ödem, neovaskülarizasyon ve polimorf nükleer hücre infiltrasyonuna rastlanmadı. Ödem ve neovaskülarizasyon şiddeti açısından PK ve AS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi (P<0.05, Şekil 5). Ödem ve neovaskülarizasyon PK grubundaki ratlarda orta düzeydeyken, AS grubundaki ratlarda daha hafif düzeyde olduğu tespit edildi (P<0.05). Polimorf nükleer hücre infiltrasyonlarının ise PK ve AS gruplarındaki ratlarda eşit düzeyde olduğu tespit edilip, istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi (Tablo 10).



**Şekil 1.** Çalışmanın 5. gününde AS (a), PK (b) ve NK (c) gruplarındaki ratlarda oluşan oküler değişiklikler



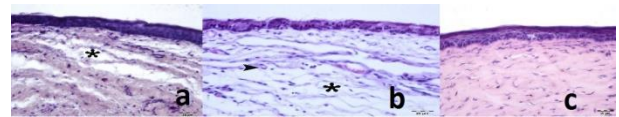
**Şekil 2.** Çalışmanın 10. gününde AS (a), PK (b) ve NK (c) gruplarındaki ratlarda oluşan oküler değişiklikler



**Şekil 3.** Çalışmanın 15. gününde AS (a), PK (b) ve NK (c) gruplarındaki ratlarda oluşan oküler değişiklikler



**Şekil 4.** Çalışmanın 20. gününde AS (a), PK (b) ve NK (c) gruplarındaki ratlarda oluşan oküler değişiklikler



**Şekil 5.** AS (a) grubu. Orta düzeyde ödem (\*) ve şiddetli düzeyde PMN hücre infiltrasyonu (okbaşı), PK (b) grubu. Şiddetli düzeyde ödem, orta düzeyde neovaskülarizasyon (ok) ve hafif düzeyde PMN hücre infiltrasyonu (okbaşı), NK (c) grubu. Normal histolojik görünüm. (H&E)

## Tartışma

Korneada oluşan alkali yanıkların kornea ve konjunktiva epitelinde meydana getirdiği hasarlar kalıcı defektlere yol açabilir. Kornea ve konjunktivada oluşan hasarların ilk dönemlerinde amniyon sıvısının kullanılması inflamasyon ve hasarı azaltmasının yanında epitelizasyonu hızlandırır, simblefaron oluşumunu engeller, limbal kök hücre hasarı ve damarlaşmayı azaltır, miyofibroblastların fibroblastlara dönüşümünü azaltarak nedbe dokusu oluşumunu engeller (17, 22, 25, 29, 40, 41, 43, 44). Amniyon sıvısının içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörü bu etkinliği göstermesinin sebebidir (25, 28, 30, 35). Bu çalışmada da amniyon sıvısının alkali kornea yanıkları üzerindeki etkinliğini klinik ve histopatolojik bulgular ışığında değerlendirmek amaçlandı.

Korneal ülserler görüş kaybına sebep olabilen, tedavisi oldukça zor ve uzun süren oftalmolojik problemlerdir. Korneal ülserler sırasında polimorf nükleer lökositler, hasar görmüş epitel hücreleri ve keratositlerden salınan proteazlar hasarın derin katmanlara doğru hızla ilerlemesine sebep olmaktadır (1, 6, 11, 12, 21). Amniyon sıvısını proteaz enzim inhibitörü olarak etkinlik gösterdiğini belirten çalışmalar literatürlerde mevcuttur (2, 5, 10, 11, 16). Kim ve ark. (25), yaptıkları çalışmada enfekte kornea ülseri bulunan 21 hastaya amniyon zarı uygulamış ve tüm hastalarda da başarılı bir epitelizasyon sağladığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da, AS grubundaki ratların korneal epitel defektlerinin iyileştiği, kornea ülserine bağlı olarak gelişen başta ağrı ve fotofobi olmak üzere gözyaşı miktarının artışı, gözyaşı kırılma zamanının uzaması ve boyama testlerinde (flouroscein ve rose bengal) PK grubundaki ratlara göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar elde edildi ( $P<0.001$ ). AS grubundaki bir rat haricinde bütün ratlarda oküler bütünlüğün sağlandığı histopatolojik bulgularla ortaya konuldu.

Bazı araştırmacılar (4, 12, 16, 18-21, 44), alkali kornea yanıkları ya da eksojen nedenlerle oluşan kornea ülserlerinin üç haftadan uzun süre tıbbi tedavi sağlanamadığında kornea nakli ya da konjunktivoplasti gibi cerrahi tekniklerin uygulanabileceğini ifade etmişlerdir. Ancak korneal greftin reddi yada konjunktivoplastinin bir takım komplikasyonlarını da (enfeksiyon, simblefaron, tedavi sonrası konjiktival dokunun korneada kalması) göz önünde bulundurmamak gerekir. Amniyon sıvısı uygulamalarının gözdeki enfeksiyonları azaltması ve limbal kök hücrelerinin korunmasını sağlaması iyileşme sürecini kısaltmaktadır (1-4 hafta). Duschense ve ark. (45), kornea hasarının büyük olduğu hatta perforasyon şekillenen bir olguda insan fibrin yapıştırıcı (insan fibrinojeni ya da trombini

içeren paketlenmiş yapıştırıcı) ile birlikte amniyon zarı kullanarak iki haftadan biraz daha uzun bir sürede kornea bütünlüğünün sağlandığını ifade etmiştir. Stridar ve ark. (27), akut dönemdeki kimyasal yanıklarda 2 haftalık bir uygulamadan sonra oküler hasarın ortadan 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 ile gerekse histopatolojik bulgularla ortaya konmuştur.

Bazı araştırmacılar (38, 40, 41), amniyon sıvısının antimikrobiyal etkisinin bulunduğunu ve mikroorganizmaların üremesini engelleyici bir etkiye sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Marangon ve ark. (35), yaptıkları çalışmada, amniyotik membran tansplantasyonu sonrası 326 olgunun 11 tanesinde enfeksiyon geliştiğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, AS grubundaki ratların hiç birinde enfeksiyon gelişmediği ve oküler bulgularda iyi bir düzelme sağladığı tespit edildi.

Adds ve ark. (32), amniyon zarı kullanımında mutlaka taze hazırlanmış olmasına dikkat edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Zira dondurma ve çözme işlemi ile amniyon zarındaki epitel hücrelerin öldüğünü, ancak sitokinlerin aktif olarak kaldığını, bununla birlikte asıl yararlı etkilerinde bir miktar azalma görülebileceğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada gebe ineklerden sezeryan operasyonu sırasında alınarak hazırlanan amniyon sıvılarına dondurma işlemi uygulanmasına rağmen alkali kornea yanıklarının sebep olduğu klinik yangısal bulguların nerdeyse tamamen ortadan kalktığı tespit edildi. Fakat bu durumun değerlendirilebilmesi için dondurulan ve taze olarak kullanılan amniyotik membran ve sıvısının bir örnek defekt üzerinde değerlendirilmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; alkali kornea yanıkları ve yanığa bağlı olarak gelişen korneal opasite, ülser, vaskülarizasyon ve yangısal bulguların giderilmesi için birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Bu tedavi seçenekleri arasında konjunktival greft, limbal kök hücre transplantasyonu ve kornea transplantasyonu gibi birçok cerrahi teknik mevcut olduğu gibi medikal tedaviye alternatif daha çok sayıda tedavi yöntemleri de tanımlanmıştır. Bu çalışmada AS grubundaki ratlarda PK grubundaki ratlara göre korneada oluşan komplikasyonların büyük oranda giderildiği klinik ve histopatolojik bulgularla desteklenmiştir. Ayrıca kullanılan amniyon sıvısının elde edilmesi, kullanması ve saklanması kolay olması yönüyle uygulanabilirliğinin yüksek olabileceği kanısına varıldı.

## Kaynaklar

1. Akın F, Samsar E. Göz Hastalıkları. 1. Baskı, Malatya: Medipress Matbaacılık Yayıncılık, 2005.
2. Aykut V. Göz Yüzeysel Patolojilerinin Tedavisinde Amniyon Zarı İmplantasyonunun Klinik ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık

3. Bakanlık Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008.
3. Cindarık T. Oküler yüzey hastalıklarında amniyon zarı transplantasyonu sonuçlarımız. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.

4. Gülsançal İ. Tavşanlarda Deneysel Kornea Alkali Yanıklarının Sağaltımında Kornea-Konjunktival Transpozisyon ile Limbal Kök Hücre Transplantasyon Tekniklerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
5. Hos D, Saban DR, Bock F, et al. Suppression of inflammatory corneal lymphangiogenesis by application of topical corticosteroids. *Arch Ophthalmol* 2011; 129: 445-452.
6. Kirk KN. *Essentials of Veterinary Ophthalmology*. Avki S, Sancak İR. (Çeviren) 1. Baskı, Malatya: Medipress Matbacılık Yayıncılık, 2012.
7. Kozma C, Macklin W, Cummins LM, Mauer R. Anatomy, physiology and biochemistry of the rabbit. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*, 1 Ed.: S.H. Weisbroth, London: Academic Press Limited, 1974; 50-56.
8. Slatter D. Basic diagnostic techniques. In: Slatter D, (Editor). *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 1 Edition, Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 1990; 84-146.
9. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: Samuel DA, (Editor). *Veterinary Ophthalmology*. 1st Edition, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1991; 45-150.
10. Santos MS, Gomes JA, Hofling-Lima AL, et al. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 2005; 40: 305-306.
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. Kabaođlu D, Eren ZK, Koytak E, Özertürk Y. Kornea ülserinin tedavisinde çok katlı amniyon zar transplantasyonu. *T Oft Gaz* 2005; 35: 4-10.
13. Kenyon K. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. *Tr Am ophth Soc* 1985; 83: 610-663.
14. Kim JS, Kim JC, Park WC. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcers. *Cornea* 2001; 20: 720-726.
15. Kruse FE, Rohrschneider K, Völeker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106: 1504-1511.
16. Meller D, Pires RTF, Marc RJS. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000; 54: 980-990.
17. Choi JA, Choi JS, Joo CK. Effects of amniotic membrane suspension in the rat alkali burn model. *Mol Vis* 2011; 17: 404-412.
18. Christmas R. Management of chemical burns of the canine cornea. *Can Vet J* 1991; 32: 608-612.
19. Günay C, Sağlıyan A, Yılmaz S, ve ark. Evaluation of autologous serum eyedrops for the treatment of experimentally induced corneal alkali burns. *Revue Méd Vét* 2015; 166: 63-71.
20. Şaroğlu M. Tavşanlarda Deneysel Oluşturulan Kornea Alkali Yanıklarının Sağaltımında Bazı Antikollajenazik İlaçların Karşılaştırılması Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1999.
21. Bilgehan SE. Tavşanlarda Deneysel Ulkus Korneanın Sağaltımında Kornea-Konjunktival Transpozisyon ile Konjunktival Pedikül Greft Tekniklerinin Karşılaştırılması. Doktora tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
22. Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye* 2005; 19: 273-278.
23. Brown SI, Wassermann HE, Dunn MW. Cell orgine of collagenase in corneal ulcerations. *Arch Ophthal* 1970; 83: 74-77.
24. Dua HS, Azuaro-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2006; 84: 273-278.
25. 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* 200; 70: 329-337.
26. 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.
27. Stridar MS, Bansal AK, Sanqvan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in akute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmolgy* 2000; 130: 134-137.
28. 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.
29. Azuara BA, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 399-402.
30. 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.
31. Tsai RJF, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Eng J Med* 2000; 343: 86-93.
32. Addis PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts fresh or freeze? A clinical and invitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 905-907.
33. Gönenci R, Altuđ ME, Koç A, Yalçın A. Effect of amniotic fluid on acute corneal alkali burns in the rat. *JAVA* 2009; 8: 817-823.
34. Güneş A, Tök L, Tök Ö. Amniyon membran transplantasyonu endikasyonlarımız ve sonuçlarımız. *TJO* 2014; 44: 123-127.
35. Marangon FB, Alfonso EC, Miler D, Remonda NM, Muallem MS, Tseng SC. Incidence of microbial infection after amniotic membrane. *Cornea* 2004; 22: 204-207.
36. Meller D, Tseng SCG. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 40: 878-886.
37. Özçel KA, Yavuz E. Biyolojik greft materyalleri: Amnion membran grefti. *Veteriner Cerrahi Dergisi* 2006; 12: 68-72.

38. Park WC, Tseng SCG. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2906-2914.
39. Saw VPJ, Minassian D, Dart JKG. Amniotic membrane transplantation for ocular disease: A review of the first 233 cases from UK user group. *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 1042-1047.
40. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20: 408-413.
41. Thalmi YP, Sigler I, Ingle E, et al. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1994; 12: 285-288.
42. Karagöz Y. SPSS 22 Uygulamalı Biyoistatistik. Güncellenmiş 2. Basım, Ankara: Nobel 2015.
43. Shahriari HA, Tokhmechi F, Reza M, Hashermi 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.
44. Volkan H, Aksu G. Çinko klorürün kornea üzerindeki hasarı, bunun amonyum tartarat ve disodyum-EDTA ile mukayeseli olarak tedavisi ile ilgili deneysel bir çalışma. *Ankara Üniversitesi Tıp Bülteni* 1977; 2: 203-207.
45. Duchesne B, Tahi H, Galand A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. *Cornea* 2001; 20: 230-232.