

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

138619

**TAVŞANLARDA ALKALİ YANIĞA BAĞLI
KORNEA DAMARLANMASINA NİTRİK OKSİT
SENTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mutlu Cihan Dağlıoğlu

138619

TEZ YÖNETİCİSİ

Yrd. Doç. Dr. Yüksel Totan

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
KONULANLARI MERKEZİ**

MALATYA - 2001

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Teşekkür.....	1
Giriş ve Amaç.....	2
Genel Bilgiler.....	5
Materyal ve Metod.....	25
Bulgular.....	28
Tartışma.....	34
Özet.....	39
Kaynaklar.....	43

TEŞEKKÜR

Tezimin konusunu belirlemede yardımcı olan ve tez çalışmamın danışman hocalığını yürüten, ayrıca tezimin her aşamasında katkılarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Yüksel Totan'a, çalışmamın hayvanlarla yapılan laboratuvar kısmında büyük yardımları olan ağabeyim Vet. Dr.Y. Kenan Dağlıoğlu ve eşim Dr. Gülçin Dağlıoğlu'na teőekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık eğitimim sırasında teorik ve pratik birikimlerini benimle paylaşan, klasik hocalıktan daha çok her zaman arkadaşça tavırlar sergileyen değerli hocalarım Doç. Dr. Hamdi Er, Doç. Dr. Hüseyin Bayramlar, Yrd. Doç. Dr. İbrahim F. Hepşen ve Yrd. Doç. Dr. Selim Doğanay'a, biyokimyasal çalışmada yardımcı olan Doç. Dr. Ömer Akyol, Dr. Sadık Söğüt, Dr. Mukaddes Güleç'e, histolojik preparat değerlendirilmesinde yardımda bulunan Dr. Ufuk Usta'ya ve preparatların mikroskop ile fotoğrafının çekilmesine katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Feral Öztürk'e şükranlarımı ifade etmeliyim.

Ayrıca uzman ve asistan doktor arkadaşlarımın hepsine ayrı ayrı teşekkür ediyorum.

Dr. Mutlu Cihan Dağlıoğlu

GİRİŞ VE AMAÇ

Kornea dokusunun damarsız olması kendisinin özgün bir özelliği olup, kornea saydamlığı ve immün korunmuşluğuna katkıda bulunur. Alkali yanığa bağlı kornea doku hasarının onarımında damarlanmanın önemli bir rolü vardır. Şiddetli alkali yanık sonrası iyileşmenin geç döneminde epitelizasyonun tamamlanmasına rağmen meydana gelen kan damarları, patolojik sonuçlara neden olabilir. Bu durum lipid sızması, tekrarlayan inflamasyon ve ülserasyon nedeniyle kornea saydamlığını bozabilir. Kornea damarlanması, normalde bulunmayan lenfositlerin kornea dokusuna geçmesine yol açar. Yeni oluşan lenfatikler, immün cevabı kuvvetlendirerek korneal ve diğer antijenlere karşı duyarlılık oluşmasına neden olur. Kornea damarlanması korneanın immün korunmuşluk durumunu bozarak, görmeyi artırmak amacıyla yapılan keratoplastide korneal greft rejeksiyonu riskini artırır. Damarlanma, korneal greft reddi ve yetmezliği açısından önemli bir risk faktörüdür. Şiddetli kimyasal kornea yanığına bağlı olarak limbal kök hücrelerinin hasarlanması sonucu oluşan konjunktivalizasyonun tedavisinde, yeni damarların tıkanması önemli bir tedavi seçeneğidir.

Kornea damarlanmasının tedavisi için kullanılan çeşitli invaziv ve noninvaziv metodlar vardır. Bunlar; steroidler, radyasyon, sistin, kriyoterapi, sülfirik asit, dextran ve konjunktival geriletmedir. Kornea damarlanmasının önlenmesi veya geriletilmesi için sıklıkla topikal ve perioküler steroidler kullanılır. Fakat steroidler; katarakt, glokom, süperinfeksiyon gibi risklerinin dışında, damarlanmayı ancak kısmi olarak baskılayabilir. Diğer metodların klinik değeri ise oldukça sınırlıdır. Kornea damarlanmasının lazer fotokoagülasyonu ile tedavisi, yukarıdaki metodlara alternatif etkin bir yöntem olup sarı dye lazerin en iyi seçenek olduğu bilinmektedir. Bununla beraber lazer tedavisi; iris atrofisi, pupiller ektazi gibi sık karşılaşılan

komplasyonlarının yanında, pahalı bir araç olması gibi dezavantaja da sahiptir. Günümüzde kornea damarlanmasına yönelik tamamen güvenli ve etkin bir tedavi yolu olmadığından, alkali yanık sonrası yeni damar oluşumunu önleyici yöntemlerin önemi artmaktadır. Koruyucu tedavi ile kornea saydamlığının sürdürülmesi ve greft ömrünün uzatılarak görmenin artırılması gibi avantajlar elde edilebilir. Kornea damarlanması, sıklıkla iltihabi durumlarla birlikte olduğundan, topikal steroidler başlıca koruyucu tedavi seçeneği olmuştur. Bununla beraber iltihap ve yeni damar oluşumu, birbirinden bağımsız ve farklı süreçlerdir. Yeni damar oluşumu; büyüme faktörleri, trombin, trombospondin ve anjiostatin gibi anjiogenik uyarıcı ve baskılayıcıların kontrolü altında oldukça iyi düzenlenmiş kompleks bir süreçtir.

Bu faktörlerin aksine nitrik oksit (NO)'in, damar gelişimini uyarıcı ya da baskılayıcı olduğu konusu tartışılmıştır. Bununla ilgili olarak indüklenebilir NO sentaz (iNOS) aracılığıyla üretilen yüksek miktarda NO'nun yeni damarlanmayı önlediği, yapısal NOS (cNOS) tarafından düşük miktarda üretilen NO'nun ise uyarıcı olduğu düşünülebilir. Farklı NOS izoformlarının varlığı dışında, hayvan modellerindeki farklılık da NO'nun yeni damar oluşumundaki rolü hakkındaki çelişkili sonuçları açıklayabilir. Farklı NOS izoformlarının, özellikle endotelial NOS (eNOS) ve iNOS'un özgün ve özgün olmayan ajanlarla inhibisyonu, klinik durumlara benzeyen standart bir kornea alkali yanık modelinde doku NO düzeylerindeki farklılığın kornea damarlanmasına etkisini daha iyi anlamamızı sağlayarak koruyucu ve tedavi edici yeni uygulamaların gelişmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle çalışmamızda alkali yanıkla oluşturulan standart bir kornea damarlanma modelinde, her iki NOS izoformunun aminoguanidin ve N-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME) özgün ve özgün olmayan inhibisyonunun yanık

sonrası kornea damarlanmasına etkisini inceledik. Bu modeli seçmemizin nedeni, klinikte sık karşılaşılan ve önemli görsel komplikasyonlara yol açan kornea alkali yanıklarının, modelimiz ile patofizyolojik olarak yakından ilgili olmasındandır.



GENEL BİLGİLER

I. TANIM

Anjiogenez, intrauterin (embriyonal ve ftal gelişim) ve extrauterin hayatta, fizyolojik ve patolojik olarak yeni kan damarlarının oluşması olayıdır. Erişkinde anjiogenez, fizyolojik (follikül ve korpus luteumda menstrüel sıklste, uterus ve plasentada gebelikte) ve patolojik durumlarda (yara iyileşmesi, kronik inflamasyon, diyabetik retinopati, keratite sekonder, romatoid artrit, neoplazi vb.) oluşabilir.

II. ANJİOGENEZ HİSTOPATOLOJİSİ

Embriyogenez esnasında endodermal hücreler, mezodermal kan adalarından farklılaşarak hızlı bir şekilde çoğalıp yeni kan damarlarını oluştururlar (1). Adaların periferal bileşeni olan anjioblastlar endoteli oluştururken, kanın şekilli elemanları ise adanın merkezinden köken alır. Endotelyal hücreler bölünerek ilkel bir damarsal ağ oluşturur. Bu ağ, kan dolaşımı başladığında arteriovenöz sistemin kaynağını teşkil eder. Gelişen organda kan damarı büyümesi, birincil olarak kapiller ağdan kaynaklanan tomurcukların invazyonu sonucu gerçekleşir (2).

Bir anjiogenik uyarı, post-kapiller venül ve kapillerlerin endotel hücrelerini kalınlaştırır, onların granüler endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve serbest ribozomlarını artırarak bunların içerdikleri kollajenaz ve plazminojen aktivatrlerini (proteolitik enzimler) serbestleştirerek alttaki bazal membranın yıkımına yol açar (3). Tümör hücreleri, bu enzimler yardımıyla çevrelerine kontrolsüz bir şekilde yayılırlar. Belirgin migratuvar etkisi olan makrofaj ve granositler, plazminojen aktivatörlerinin büyük kısmını salabilirler. Bunu takiben endotel hücreleri, perivasküler aralığa gç eder ve kendi kendine dizilerek "filiz" oluşturur. Bu filizin ortasındaki hücreler bölünür

ve uzar (4). Böylece intra ve intersellüler mekanizma ile lümen formasyonu oluşur. Intersellüler mekanizma, endotel hücrelerinin solid kordonları ile ona komşu plazma membranları arasında boşluklar oluşturur. İntrasellüler kanalizasyon sonucu, endotel hücrelerinin vakuolizasyonu ile damar ve plazma membranlarının füzyonunu takiben, endotel hücreleri arasında bir kord ve bundan bir lümen segmenti oluşur (5). Bu şekilde gelişen kapiller damarların, elektron mikroskobu ile incelendiğinde yanındaki ile bağlantı oluşturmayan tek sıra endotel hücrelerinden oluştuğu görülür (6). Filizin uç sonlanmasının bölünmesi ve gelişmesi ile kapiller ağ meydana gelir ve sonrasında yeni oluşan damarlarda kan akımı başlar. Son basamaklar, subendotelyal bazal membranın oluşması ve kapiller duvarın dış kısmı ile perisit bağlantısının kurulmasıdır (7). Hemodinamik kuvvetlerin yani damar içindeki kan volümünün de, bir damarın farklılaşmasını belirlemede (arter veya ven olarak) rolü olabileceği düşünülmektedir (8).

III. ANJİOGENİK FAKTÖRLER

Organ büyümesi, organın kendinden salınan anjiogenik faktörlerin uyarmasıyla oluşan damarlanmaya bağlıdır.

a. Anjiogenin : İlk olarak insan adenokarsinom hücre kültüründen izole edilmiş bir polipeptiddir (9). Molekül ağırlığı (MW) 14.4 KiloDalton (KD)'dur ve geni klonlanmıştır. İn vivo olarak koryoallantoik membran ve korneada etkilidir. Amino asit dizisinin %35'i pankreatik ribonükleaz ile benzerlik gösterir fakat bu tipin enzimatik aktivitesi yoktur. Karaciğer gibi bazı organlarda normalde de bulunur. İn vitro endotelyal hücre çoğalması ve migrasyonunda etkisinin yokluğunun ispatı, indirekt olarak in vivo ortamda diğer hücrelerin aktivasyonu ve diğer anjiogenik faktörleri serbestleştirilmesi sayesinde etkili olduğunu düşündürür.

b. Fibroblast Growth Factor (FGF) : Bazik (bFGF) ve asidik (aFGF) FGF, heparin-affinite kromatografisiyle birbirinden ayrılır. Genleri klonlanmıştır. Sırasıyla 146 ve 140 amino asit içerirler ve dizilim olarak % 53 oranında benzerlik gösterirler (10). Bazik FGF, endotelyal büyüme faktörleri ile birlikte vücudun birçok organı ile beraber gözde de bulunur (11). Endotelyal hücreler bFGF'yi sentezleyip serbestleştirerek otokrin büyüme etkisi yapabilirler. aFGF de retinadan izole edilen endotel büyüme faktörü ile ilişkilidir (11). Bu faktörler diğer hücre tiplerinin bölünmesini uyararak akson büyümesi ve embriyonal hayatta mezodermal farklılaşmayı indükler. Bazik FGF'nin amino asit dizilimi ile bazı onkogenler arasında benzerlik olduğu son zamanlarda gösterilmiştir. FGF'lerin tümör gelişiminde iki farklı rol oynayabileceği, birincisi dönüştürücü ajan olarak, ikincisi ise anjiogenik faktörlere benzer bir etki şeklinde olduğu düşünülmektedir. Tavşan korneasında yapılan bir çalışmada, bFGF emdirilmiş hidrojelin korneaya yerleştirilmesinden 2 gün sonra damarlanma başlamış ve 7. günde en üst düzeye ulaşmıştır (12).

c. Transforming Growth Factor (TGF) : Bu polipeptidler alfa ve beta formunda bulunurlar. Amino asit dizileri belirlenmiş ve genleri klonlanmıştır. TGF alfa, neoplastik hücrelerden izole edilmiştir. Epidermal growth faktörle %35 oranında benzerlik gösterir ve etkisi bu faktörün reseptörüne bağlanarak gerçekleşir (13). TGF beta, tümör hücreleri ve normal dokularda bulunabilir. Endotelyal hücre proliferasyonunu in vivo olarak uyarır (14) fakat in vitro inhibe eder (15). Bu paradoks nedeniyle in vivo koşullarda makrofaj gibi bir başka hücre aracılığı ile etki ettiği düşünülmektedir. Bu yolda makrofajların, çeşitli anjiogenik faktörlerin salınımını uyardığı ileri sürülmektedir (16).

d. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF alfa) : Başlangıçta nekroza neden olarak, bazı solid tümörlerde gerilemeye yol açan bir faktör olarak izole edilmiştir. TGF beta gibi in vivo durumda anjiogenezi uyarır, in vitro endotel hücre büyümesini inhibe eder (17). Anjiogenezde TNF'nin büyük bir kısmı indüklenmiş makrofajlardan salınır.

e. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) : VEGF, birçok tümör hücresi ve normal hücreden salınan, çözünebilir bir anjiogenik faktördür ve 46 kD dimerik glikoprotein yapısı nedeniyle platelet kaynaklı büyüme faktörüne benzer (18). İnsan VEGF'sinin 121, 165, 187 ve 207 amino asitlik izoformları vardır. Bu dört tipten in vivo olarak en fazla VEGF165 mevcuttur ve biyolojik etkilerin araştırılmasında en çok bu tip kullanılır (18). VEGF, endotel hücrelerinin alttaki matrikse yayılmasını sağlayarak tüp benzeri yapı oluşturur (19). Bu etkisini diğer büyüme faktörleri, özellikle FGF-2 ile birlikte yapar. Ekzojen VEGF, çok az ya da hiç iltihabi cevap oluşturmadan tavşan kornealarında anjiogenezi güçlü bir şekilde uyarmıştır (20). Patolojik kornea damarlanması, korneal travma ve transplantasyon sonrası, inflamatuvar durumlar ve kontakt lense bağlı yeni damar oluşumundaki rolü belirsizdir. Normal damarsız kornea epitelinin ürettiği VEGF düzeyi, damarlı kornea ve konjunktivadan salınandan daha az miktarda bulunmuştur (21).

f. İnflamatuvar Mediatörler : Araşidonik asit 20 karbonlu, biyolojik olarak aktif eikosanoidlere metabolize olan poliinsatüre yağ asididir. Siklooksijenaz yolunun ürünleri prostaglandinler (PG), prostasiklin ve tromboksandır. Lipoksijenaz yolağı araşidonik asidi hidroksieikosatetraenoik asit (HETE), lökotrien ve lipoksinlere dönüştürür, bunlar da lökosit kemotaksisini uyarır. PGE1 ve PGE2'nin anjiogenezi in vivo durumda uyardığı (22,23), tümör hücreleri ve makrofajda yüksek

konsantrasyonda bulunması nedeniyle de in vivo ve in vitro olarak anjiogenezi uyardığı gösterilmiştir (24). Hümorale faktörlerden PG'ler, diğer yerlerde olduğu gibi korneadaki damarlanma durumunda da rol oynarlar. Benazra, kornea stromasına yerleştirilen implantların damarlanmayı başlattığını göstermiştir (22). Alessandri ve arkadaşları PGE1'in belirgin olarak, PGE2'nin daha az olarak kornea damarlanmasını uyardığını bildirmişlerdir (25). PG'e atfedilen fonksiyonlardan biri de bakır iyonunu aktive etmesidir, çünkü bakırdan yoksun diyet alındığında anjiogenik etkisi engellenmiş olur (23). Ayrıca seruloplazminin korneaya implantasyonundan sonra kapiller endotel hücre göçünün hızlandığı da bildirilmiştir (25).

Histamin, serotonin ve bradikinin gibi diğer solubl iltihabi mediyatörlerinin korneal damarlanmayı arttırdığı gösterilmiş fakat bu etkilerini indirekt olarak doku hasarı yapmak suretiyle oluşturdukları bildirilmiştir (26).

Plazminojen aktivatörü olan ürokinaz korneaya damlatıldığında damarlanmayı uyarır. Rifkin ve arkadaşları, anjiogeneizde endotel hücrelerinden plazminojen aktivatörü salındığını ve bunun da komşu stromayı yıkarak vasküler göçü kolaylaştırdığını ileri sürmüşlerdir (27).

g. Heparin : Heparinden zengin olan mast hücreleri, tümöre bağlı oluşan damarlanma cevabında önemli rol oynar. Koryoallantoik membrana (CAM) tümör dokusu parçacıklarının implantasyonundan sonra heparinin yoğunluğu 40 kat artar (28). Heparin içeren mast hücre granülleri sayesinde mast hücre kültürleri endotel hücrelerinin göçünü uyarır (29). In vivo heparin, CAM' a implante edilmiş tümör hücrelerinin anjiogenezi artırır (30) ve in vitro insan endotel hücrelerinde aFGF'yi aktive eder (31), heparin bu işlevi muhtemelen hücre proteazlarınca FGF yıkımını yavaşlatarak yapar. Heparinin endotel hücre göçü için potent mediyatör

olduğuna ilişkin genel kabul vardır (29). Weiss ve arkadaşları heparinin prokollajenaz aktivasyonunu başlattığını göstermişlerdir (32). Taylor ve Folkman heparinin antikoagölan özelliklerini inhibe ettiği bilinen protaminin anjiogenezi önleyeceğini ileri sürmüştür (30). Kessler ve arkadaşları heparinin majör kaynağı olarak bilinen mast hücrelerinin damarlanmaya sıklıkla eşlik ettiğini bildirmişlerdir (28).

h. Bakır : İn vitro durumda endotel hücre göçünü kolaylaştırır. PGE1 gibi bir anjiogenik faktör, tavşan korneasına uygulandığında kapiller penetrasyondan önce bakır düzeyi artar. Ratlara bakırdan eksik diyet verildiğinde kandaki bakır düzeyi %50 azalmış ve PGE1' e cevap gerçekleşmemiştir (23). Bakır sülfat içeren Elvax pelletlerle tavşan kornealarında 3. günden sonra damar oluşumunun indüklendiğı gösterilmiştir (33). Plazmada bakır taşıyıcı protein olan serüloplazmin, sadece bakır varlığında tavşan korneasında damarlanmayı uyarır (34).

i. Adezyon Molekülleri : Koch ve arkadaşları, E-selectin ve VCAM-1 gibi solubl adezyon moleküllerinin, anjiogenik büyüme faktörleri gibi damarlanmayı indüklediklerini kanıtlamışlardır (35). İntegrin tip hücre adezyon moleküllerinin korneal anjiogeneizde önemli rol oynadıkları son zamanlarda aydınlatılmıştır. İki adet integrin bağımlı yol bulunmaktadır. Bazik FGF ve TNF-alfa integrin avBeta3, VEGF ve TGF alfa ise avBeta5 reseptörleri üzerinden etkili olur. Son zamanlarda etkinliğı IGFII üzerinden olan proliferin ile endotel göçünün aktive edilebileceğı gösterilmiştir (36). Stoltz ve arkadaşları kornea kaynaklı bir eikosanoidin, limbal mikrovasküler hücreleri belirgin bir şekilde uyardığını göstermiş, bu nedenle kornea epitelinin anjiogenik uyarı kaynağı gibi rol oynadığını saptamışlardır (37).

j. Nitrik Oksit (NO)

Biyosentezi

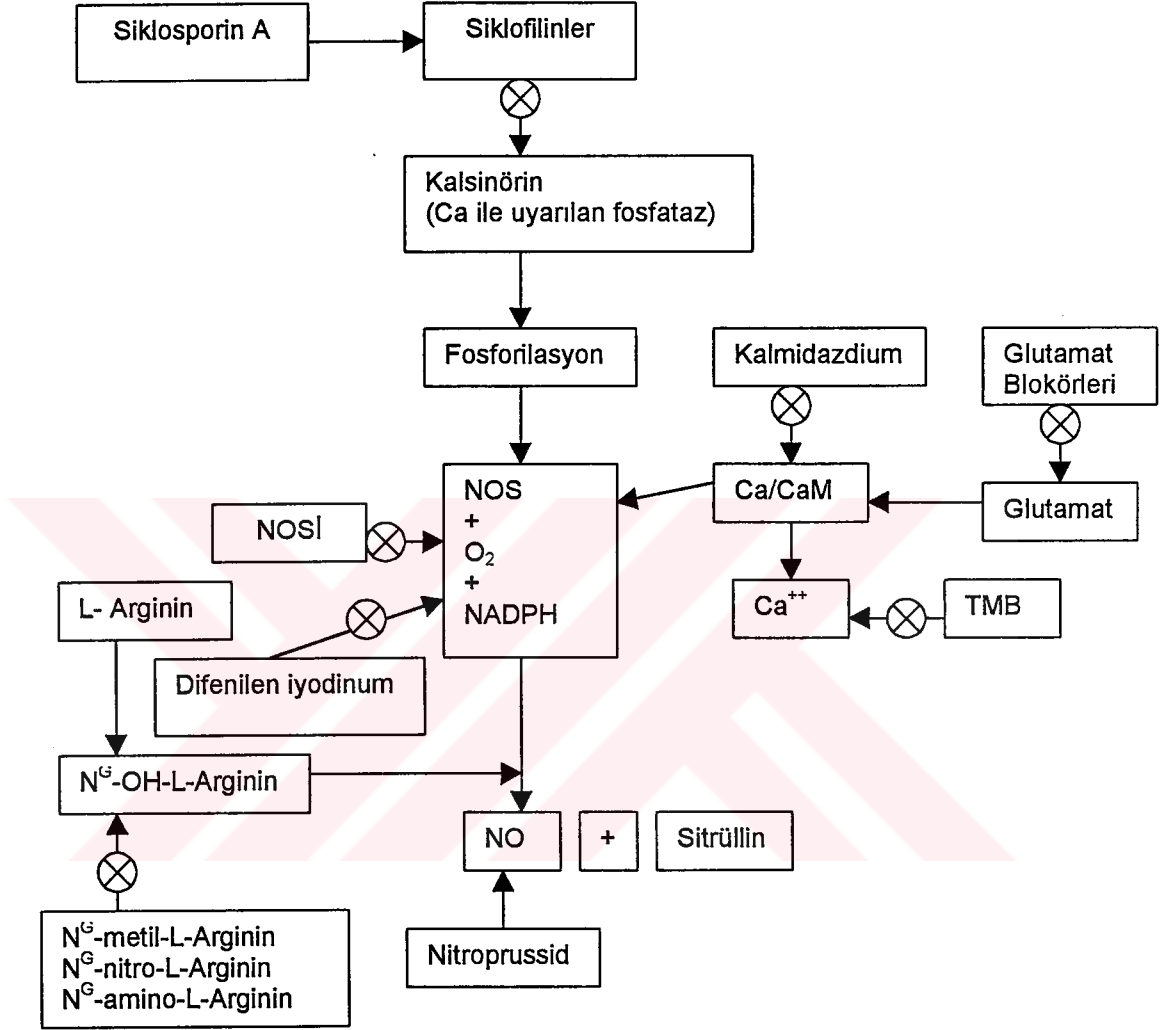
NO ilk olarak Furchgott ve Zawadzki tarafından endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak tanımlanmış ve vazomotor düzenleyici etkiye sahip bir molekül olduğu bildirilmiştir (38). NO, NOS için bir substrat olan L-argininin strülline dönüşmesi esnasında meydana gelen, yarılanma ömrü çok kısa olan atmosferik bir gazdır. Reaksiyonda O₂, NADPH, flavinler ve Ca/Kalmodulin sistemi de rol oynamaktadır (39) (Şekil 1). NO dokularda çözünür halde bulunduğundan hücre membranlarından kolaylıkla geçebilme özelliğine sahiptir. Damar tonusu üzerinde, immün sitotoksik durumlarda, nöron iletiminde ve daha birçok olayda görev almaktadır. NO biyosentezini önemli kılan husus, diğer nörotransmitterlerden farklı olarak NO'nun depolanamaması ve gerektiğinde klasik düzenleyici mekanizmalar tarafından salınamamasıdır (40).

Etkileri

NO, pikomol ile ölçülebilecek kadar düşük seviyelerde bulunduğu normal durumlarda fizyolojik etkiler gösterir. Bunlar; vazodilatasyon, oküler kan akımının artması, göz içi basıncının azalması, platelet agregasyonunun önlenmesi, polimorfonükleer lökosit (PMNL) kemotaksisinin azalması, merkezi ve periferik sinir sisteminde mesaj iletimi gibi görevlerdir. Tersine, NO'nun nanomol miktarındaki düzeylerinde bile hücrelerin biyolojik fonksiyonlarının değişmesi, DNA hasarı, apoptosis, nörotoksisite, optik sinir dejenerasyonu gibi patolojik olaylar oluşabilir (41). NO'nun bu istenmeyen etkilere neden olmasına iNOS ile üretilen aşırı miktardaki NO miktarı sebep olmaktadır. Trimetoksibenzoat (TMB), kalmidazdium, siklosporin A, difenilen iyodinum ve glutamat blokörleri ile NO üretimi durdurulabilir (Şekil 1). NO'nun kornea üzerindeki etkisine dair literatürde

herhangi bir veri bulunmamaktadır. Fakat konjunktiva gibi damarlı yapılarda vazodilatasyon, retinada ise nöron iletimi ve fotoreseptör dış segmentlerinin fagositozu gibi olaylarda rol oynadığı bilinmektedir. Üveitte ise iNOS tarafından fazla miktarda üretilen NO inflamasyonun artmasına neden olur (40).

Anjiogenezdeki rolü ise tartışmalıdır. Endotel bağımlı vazodilatasyona neden olduğu açıkça gösterilmiştir (42). NO bu etkisini hücrel cGMP düzeyini artırarak gerçekleştirmektedir. NO'nun yeni damarlanmayı uyardığını bildiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (43-46). Bununla beraber yakın zamanda yapılan çalışma sonuçları NO'nun, yeni damar oluşumunu engellediğini düşündürmektedir. Ratlarda yapılan çalışmada oral verilen NO'nun, bFGF ile indüklenen anjiogenezini inhibe ettiği, VEGF165 ile uyarılmış olanı ise etkilemediği bildirilmiştir (47). Tavuk koryoallantoik membranında IL-2 ile NO'nun düzeyinin arttığı ve bunun da anjiogenezini önlediği öne sürülmüştür (48). Yine NO'nun koryoallantoik membranda anjiogenezini, tümör büyümesini ve metastazını önlediği ifade edilmiştir (49).

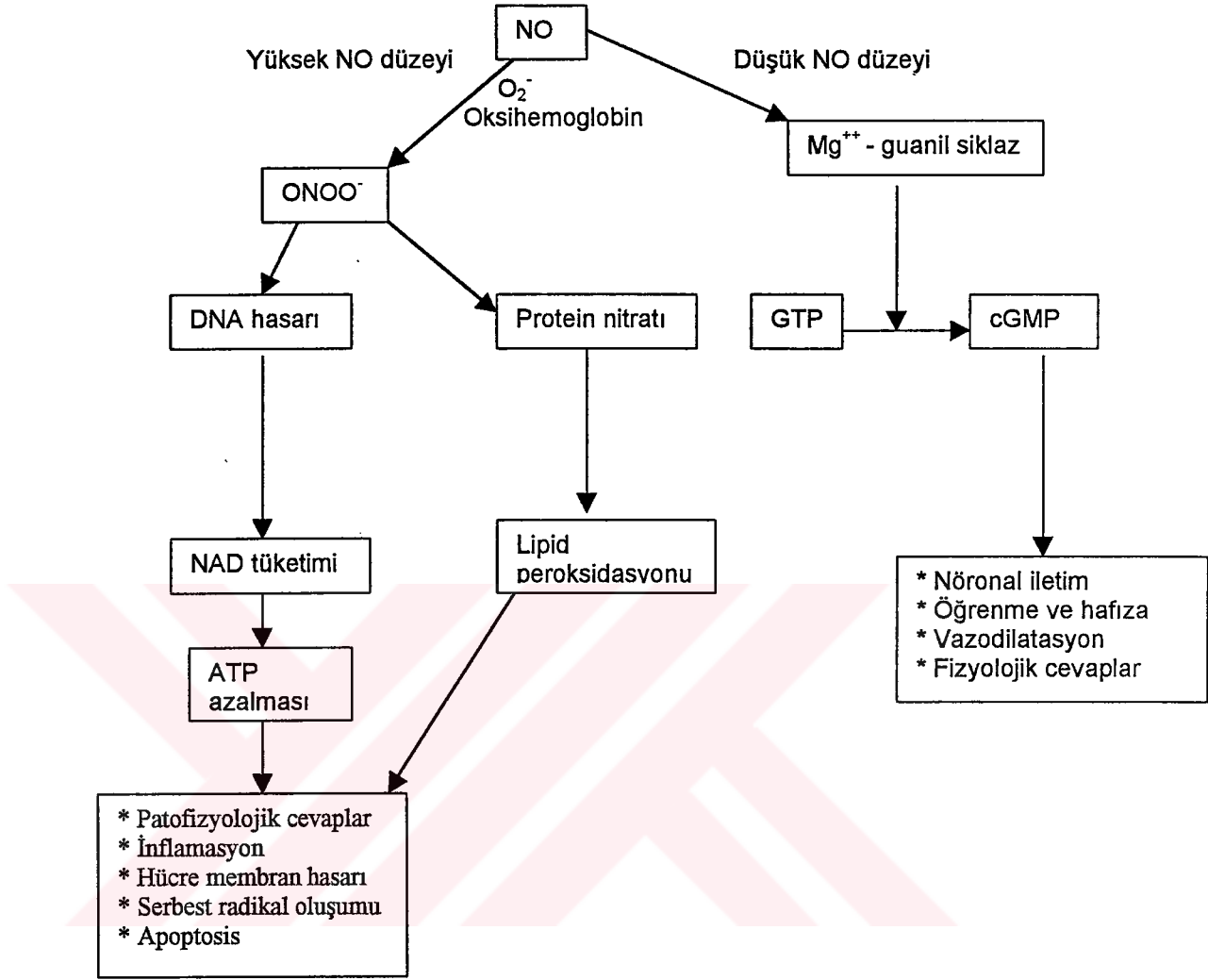


Şekil 1. Nitrik Oksit üretimi ve üretimi engelleyen maddeler

TMB : N,N- dietilamino alkil trimetoksi benzoat

NOSİ : NOS inhibitörleri

Ca/CaM: Kalsiyum/kalmodulin



Şekil 2. NO'nun düşük düzeyde fizyolojik ve yüksek düzeyde patolojik etkileri
ONOO⁻ : Peroksinitrit

NOS İzofomları

i. **Yapısal NOS (cNOS)** : Dokularda sürekli bulunan ve NO'nun temel etkilerinden sorumlu olan bir enzimdir. Etkisini Ca/kalmodulin kompleksinin yardımı ile gösterir. Özellikle merkezi ve periferik sinir sistemi ile gözde kornea (epitel, endotel) uvea, retina ve damar endotelinde (eNOS) bulunmaktadır (40).

ii. **İndüklenebilir NOS (iNOS)** : Fazla miktarda NO üreterek dokularda harabiyete neden olan bu enzim, monosit, makrofaj, PMNL, retina Müller hücrelerinde ve damar endotel hücrelerinde bulunur. Lipopolisakkarit, endotoksin, IL-1, IL-6 ve interferon γ tarafından güçlü bir şekilde uyarılır (41).

NOS İnhibisyonu

Genel olarak NOS aktivitesini inhibe eden ajanlar L-arginin analogları olan; dimetil arginin, N^G-metil-L-Arginin, N^G-nitro-L-Arginin, N^G-amino-L-Arginin, L-NAME vb. Bunlar, kompetitif inhibisyon şeklinde etki gösterirler. Ayrıca aminoguanidin ve S-metil izotioüre de NOS inhibisyonu yapar (41). İnhibitörler, direkt olarak NOS aktivitesini bloke ederek veya ihtiyaç duyulan kofaktörleri engelleyerek etkisini gösterirler.

V. DENEYSEL ANJİOGENEZ MODELLERİ

A. İn Vitro Modeller

İn vitro anjiogenez araştırmaları kapiller endotel hücrelerinin kültürlerinin uzun ömürlü klonlanmasının mümkün olduğunu göstermiştir (50). Test edilen maddelerin hücre çoğalması ve göçünü kolaylaştırabilmesi, anjiogenik uyarıya cevap olarak artan proteolitik enzimlerde (plazminojen aktivatörü ve kollajenaz gibi) artma miktarının değerlendirilmesi ile mümkün olabilir (3). İn vitro olarak endotel hücre göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran çeşitli faktörler

gösterilmiştir. Ancak, gerçekten damar oluşmasını sağlamada in vitro modeller yeterli değildir. Örneğin anjiogenin, anjiogenezi sadece in vivo olarak uyarır (9).

B. İn Vivo Modeller

1. Transparan bölme: Uygulanmış en eski metoddur. Algire ve arkadaşları farede ciltaltı bölmede, iki tane miliporlu filtre arasına tümör parçaları yerleştirmiş ve fareden implanta doğru, yeni damarların filtreden geçerek ulaştığını göstermiştir. Tiroid ve kalp parçalarına ise aynı cevap oluşmamıştır (51).

Bu metod, hayvanların anestezi uygulanmadan uzun süre gözlenebilmesine izin verir. En büyük dezavantajı ise bölme implantasyonunun neden olduğu, yara iyileşmesinden doğan damarlanmada maddenin veya dokunun indükleyici etkisinin üstüste binmesidir.

2. Koryoallantoik Membran (CAM) : Bu ekstraembriyonik membran, inkübasyonun 4. gününde koryon ve allantoisin birleşmesinden oluşur. Tümör fragmanları membrana yerleştirildiğinde damar oluşumu cevabını uyarır, 48-72 saat içinde kapiller ağ konak damarları ile tümör arasını doldurur (52). İnert polimerler emdirilmiş maddeler, membranın yüzeyine yerleştirilerek damarlanma ve damar oluşumu önlenmesi değerlendirilebilir (53).

3. Korneal Modeller

a. Mikrocep

b. Alkali Yanık

c. İpek Sütür

a. Korneal mikrocep tekniği : Korneanın damarsız olduğu anlaşıldıktan sonra bu teknik, tümörle indüklenen damarlanma çalışmalarında kullanılmıştır. Tavşanda

kornea kenarına, damarlardan 1-6 mm uzakta kornea cebi oluşturularak içine bir milimetreküp tümör doku parçası yerleştirilmiş ve anjiogenik faktör salan tümöre cevap olarak limbustan başlayan damarlanmanın, tümöre ulaşana kadar günde 0.2 mm hızla ilerlemiştir (54). Bakır sülfat pelleti korneal cebe yerleştirilerek damarlanma uyarılabilir. Bu modelde 10-75 µg bakır sülfat (CuSO₄) içeren Elvax pelletleri tavşan kornealarına yerleştirilerek oluşan anjiogenik uyarı ile kornea damarlanması elde edilmiştir. Yazarlar, oluşan bu damarları görüntüleme yöntemleriyle değerlendirmişlerdir. Uygulamadan 3 gün sonra damarlar korneaya girmiş, 7 günde pellete ulaşmış ve 14 gün sonra pellet, yeni damarlarla tamamen çevrelenmiştir (33). Elvax pelletlerdeki irritasyon yapan ajanlar biyolojik aktivite ve anjiogenik cevabı değiştirebilir. Ek olarak Elvax tan büyüme faktörleri salınım hızı tam olarak bilinemez ve bir örnekten diğerine değişiklik gösterir, bu nedenle özgün çalışmalar yapmak zordur

Bu teknik ile antianjiogenik faktörler salgılayan kıkırdak gibi dokular, tümör ile limbal damarlar arasına yerleştirilerek anjiogenez-antianjiogenez çalışması yapılabilir. Mikrocep tekniğindeki gelişme ile, çözünebilir tümör ekstreleri emdirilmiş polimerler implante edilmiş ve bunların sürekli olarak nanogramdan mikrograma kadar hassas miktarda salınım yapılması sağlanmıştır (53).

b. Alkali Yanık Modeli : David Ormerod ve arkadaşları, tavşan korneasında alkali emdirilmiş disk şeklindeki filtre kağıdı ile yanık oluşturarak damarlanmayı uyarılmışlardır. Bunun için Whatman # 3 filtre kağıdından 7 mm çapında 4N NaOH ile 25 µl emdirilmiş diskler, tavşan korneasının merkezine 2 dakika süreyle uygulanmıştır. Daha sonra limbustan kornea yanığına doğru ilerleyen yeni damarlar saat kadranlarına göre günlük olarak değerlendirilmiştir (55). Bir alkali olan gümüş nitrat ile de korneada yanık oluşturulabilir. Bu modelde ratların her iki

korneasının merkezi, limbustan 2,5 mm uzakta olacak şekilde, %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat içeren çubukla 5 saniye süreyle uygulamaya tabii tutulmuştur. Koterizasyondan 4 gün sonra maksimum düzeyde yeni damar oluşumu gözlenmiştir (56) . Benzer şekilde gümüş nitrat kalemi rat korneasının merkezine 8 saniye uygulandığında 5 gün sonra damarlanmanın maksimum olduğu saptanmıştır (57).

c. İpek Sütür Modeli : Bu yöntem ile genel anestezi verilen ve topikal anestezi uygulanan tavşanların kornealarına, limbustan 3 mm uzakta saat 3 ve 9'da olacak şekilde derin 7/0 ipek sütür konularak damarlanma cevabı uyarılabilir.

V. KORNEA DAMARLANMASI

A. Epidemiyoloji

Genelde kaza sonucu olan kimyasal kornea yanıklarına bağlı kornea damarlanması, diğer etyolojik faktörlerden oran olarak daha az görünse de, şiddeti ve korneaya verdiği ağır hasar nedeniyle çok ciddidir. Alkali maddelerin pH'ları, kornea ve ön kamaraya oldukça hızlı bir şekilde penetre olup hasar vermesine neden olur. Bu tip bir travma, asit ve diğer solventlerle olandan daha kötüdür. Alkalilerin sebep olduğu şiddetli hasarı, yeni damar oluşumu tamir eder. Limbal kök hücrelerinin destrüksiyonu nedeniyle reepitelizasyon ya yavaş gelişir veya hiç gelişmeyebilir. Aşırı damarlanma ile iyileşme olduğunda geride fibrovasküler bir pannüs kalabilir. Aşırı vaskülarize ve zedelenebilir bir durumda olan kornea, yara ve ülser oluşmasına eğilim gösterir.

ABD'de 1977'de tüm kimyasallara (alkali, asit, boya, vernik çözücü, vb) bağlı 37.011 göz yaralanması bildirilmiş ve bunların 2632'sini alkaliler teşkil etmiştir (58).

B. Etyoloji-Histopatoloji

Sağlıklı bir kornea, hemen tüm hayvan türlerinde damarsız yapıya sahiptir. Kornea damar oluşumuna neden olan belli başlı durumlar sırasıyla; kontakt lens kullanımı, travma ve geçirilmiş cerrahi, enfeksiyonlar (bakteriler: klamidya, stafilokok, streptokok, psödomonas, virüsler: herpes sipleks ve zoster, protozoalar: onkoserka volvulus, layşmanya brasiliensis) alkali yanıklar, immünolojik hastalıklar (Stevens-Johnson Sendromu, greft rejeksiyonu, sikatrisyel pemfigoid), piterjium ve Terrien's marjinal dejenerasyonu gibi patolojilerdir (tablo1)(59).

Tablo 1. Korneal damarlanma ile ilişkili hastalıklar (Klintworth'dan uyarlanmıştır (59)).

Kontakt lens kullanımı
Travma ve geçirilmiş cerrahi
Enfeksiyonlar
Bakteri ve diğer mikroorganizmalar; <i>Klamidya, Stafilokoklar, Streptokoklar, P.Auriginosa</i>
Virüsler ; <i>herpes simpleks, herpes zoster</i>
Protozoa; <i>Onkoserka volvulus, Layşmanya Brasiliensis</i>
Alkali yanıklar
İmmünolojik hastalıklar
<i>Stevens-Johnson sendromu</i>
<i>Greft rejeksiyonu</i>
<i>Sikatrisyel Pemfigoid</i>
Dejeneratif hastalıklar ; <i>piterjium, Terrien's marjinal dejenerasyonu.</i>

Çeşitli nedenlere bağlı damarlanma iki seviyede gelişebilir. Birincisi yüzeysel olarak stroma ve epitel ile sınırlanmış potansiyel aralıkta gerçekleşir. Gelişen damarlar fibroblast ile birliktedir ve fibrovasküler doku sonunda pannüsü oluşturur. Diğer tip vaskülarizasyon, substantiada lamellalar arasındadır, olası fiziksel sınırlama nedeniyle damarların düzenliliği bozulur ve tipik olarak yılankavi şekil almaya meyleder. Stromal damarlanma, fibrozise daha az neden olur.

İmmün olarak korunmuş korneada değişik nedenlerle oluşan damarlar, sıvısal ve hücrel elementlerin taşınmasını sağlayarak yarayı iyileştirir. Antibiyotikler ve diğer ilaçları enfeksiyon bölgesine ulaştırır ve ayrıca toksik maddelerin eliminasyonuna katkıda bulunur. Kornea damarlanmasının olumsuz yanları ise, damarlardan lipid sızması ve tekrarlayan inflamasyona bağlı şeffaflık kaybı, immün korunmuşluğun bozulması sonucu greft rejeksiyonunun tetiklenmesi gibi risklerdir (60).

Korneada damar oluşumu oldukça kompleks bir olaydır ve çeşitli hücrel sistemler ve ekstrasellüler çevrenin koordine etkileşimini gerektirir. Kornea damarlanması, uzun süredir çalışılan ve hakkında geniş bir bilgi birikimi olan güncel bir konudur (59).

Diğer anjiogenik olaylara benzeyerek, kornea kan damarları indüksiyonu farklı fazlara ayrılabilir. 1) limbal damarların dilatasyonu, damarsal geçirgenlik artışı ve takip eden ödem, 2) endotel hücrelerin aktivasyonu, 3) ekstrasellüler matriksin azalması, 4) endotel hücrelerinin göçü ve takip eden çoğalması, 5) kapillerlerde üç boyutlu organizasyon. İlk faz lökosit adezyonu ve diapedezi ile karakterizedir.

Kimyasal kornea koterizasyonunu takiben işlemde bir saat sonra perikorneal kan damarlarının dilate olduğu görülür. Bu olayı takiben birkaç saat içinde PMNL diapedezi ve sonra yara yakınına doğru hareketi olur. Yeni damarlanmanın hissedilir ilk kanıtı, 18 saat sonra endotel hücre oluşumu ve perisit şişmesidir. Yirmi yedi saat sonra tomurcuklanma gözlenebilir. Elektron mikroskopisinde ise endotel hücre göçü ve uzamasıyla başlangıç filizlenme olduğu gösterilmiştir (4). DNA'nın sentez edilirken bozulduğu bulunmuş ve koterizasyon, çok az bir miktarda damarsal büyümeye neden olabilmektedir. Bununla beraber

radyasyon uygulanan gözlerde deneyin dördüncü gününden sonra büyüme görülmemiş ve proliferatif aktivitenin baskılandığı açığa çıkmıştır.

Anjiogenezde hücre sel cevap olarak Fromer ve Klinworth (61), kimyasal ve fiziksel yaralanmada PMNL varlığını ve etkin rolü olduğunu göstermiştir. Bazı çalışmacılarsa, PMNL'nin anjiogenik olaydaki önceliğinden emin olamamışlardır (62). Suvarnamani ve arkadaşları, rat kornealarını gümüş/potasyum nitrat ile koterize ettikten sonra γ radyasyon ile total lenfoid irradyasyon yapmış ve lökosit, lenfosit, PMNL ve platelet sayısındaki belirgin düşüşün kornea damarlanmasını azaltmasına rağmen tümüyle engellemediğini göstermiştir (63).

Sholley ve arkadaşları X ışını ve antinötrofilik serum uygulanan şiddetli nötropeni durumunda yaralanmaya cevap olarak, sağlıklı kontrollerdekinden daha kısa damar oluşumu cevabı gözlemişlerdir (62). Bu nedenle lökosit infiltrasyonu olmadan da kan damarının kornea içine uzanabileceğini belirlemişlerdir. Lenfositlerin de kornea damarlanmasında rolleri vardır. Lutty ve arkadaşları allojenik lökositleri Concanavalin-A ile aktive ederek tavşan korneası stromasına enjekte ettiğinde damarlanma olduğunu, aktivasyon yokluğunda ise kayda değer bir cevap olmadığını göstermişlerdir (64).

C. Kornea Damarlanmasının Önlenmesi ve Tedavisi

Polipeptidlerin genel olarak korneadaki proteaz aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Tümör büyümesinin anjiogeneze bağlı olduğu bilindikten sonra potansiyel tedavi silahları geliştirilmiştir. İlk anjiogenez inhibitörü, avasküler olan kıkırdaktan izole edilmiştir (65). Protamin, embriyogenez ve inflamasyon sırasında indüklenen endotel hücre göçünü ve anjiogenezi inhibe eder (30).

1. Antiinflamatuvarlar

Bu grupta genel anlamda steroid ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİD) bulunmaktadır. Bunların etkinliklerini değerlendirmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bakırla indüklenen deneysel anjiogenez modelinde, 50µg günde 3 defa uygulanan topikal Dexametazon ve 100µg günde 3 defa uygulanan flurbiprofen ile yaklaşık olarak %50 damar büyümesi önlenmiştir (33). Gümüş nitratla indüklenen korneal damarlanmada dexametazon, prednizolon, flurbiprofen, indometazin ve ketorolakın topikal olarak yeni damarlanmanın önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiş, fakat bunlardan steroidlerin diğerlerine göre daha etkin olduğu belirtilmiştir (56).

Ratların korneasında kimyasal yanık ile neovaskularizasyon oluşturulduktan sonra topikal dexametazon, prednizolon, ketorolak ve phenidoinin inhibitör etkileri denenmiştir. Tümünün de kornea damarlanmasını önlemede etkili olduğu görülmüştür (57). Ketorolak siklooksijenazı, phenidoinin siklooksijenaz ve lipoksijenazı inhibe ederek etki eder.

Tabii balırsı ürünü olan propolisin ve biyolojik aktif bileşeni olan caffeic acid phenethyl ester (CAPE)'in muhtemelen antiinflamatuvar ve antioksidan etkileriyle korneadaki damarlanmayı steroidlere yakın ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (66,67).

Sıklıkla tercih edilen topikal steroidlerin uzun süreli kullanım sonucunda, glokom, katarakt ve süperinfeksiyon oluşturma gibi potansiyel riskleri göz ardı edilmemelidir.

Sodyum salisilatın insan plateletlerinde PG üretimini engellemesi ve araşidonik asidi antagonize etmesi düşünülerek, 0,1 M konsantrasyonda termal yanık oluşturulan tavşan korneasına uygulanmıştır. İlk 6 saatte ekstravasküler

nötrofil miktarını azaltmış, 48 saatte ise artırmış. Sonuç olarak kornea damarlanmasını önlemede etkisiz kaldığı gösterilmiştir (68).

Bazı deneysel modellerde, son zamanlarda yeni sınıf glukokortikoid yapıda olmayan steroidlerin bulunması ve heparinin antikoagulan olmayan kısımları (sentetik penta veya hekzasakkarid) ile kombinasyonu en büyük anjiostatik etkiyi göstermiştir (Tablo 2) (69).

Tablo 2. Steroidlerin anjiostatik aktiviteleri

	Skor *
Hydrocortisone	3
Cortexolone	1
Corticosterone	1
Deoxycorticosterone	1
17-Hydroxyprogesterone	4
Estrone	1
Testosterone	1
Progesterone	0
Tetrahydro S	7

* Skorlama, anjiostatik etkiye göre 0'dan 7'ye kadar yapılmıştır.

2. İnterferon

Endotel hücre proliferasyonunu inhibe eden diğer faktörler de vardır. Onların arasında alfa-interferon ve insan platelet faktör 4 (PF4) anjiogenezi in vivo (30) ve endotel hücre çoğalması ve göçünü in vitro (70) inhibe eder. İnterferon, periferik kan lenfositleri, lenfoblastoid hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenen bir grup düzenleyici proteinlerdir. Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada alfa-interferonun topikal ve ciltaltı kullanımı ile kornea damarlanmasını baskılamada etkili olmadığı ortaya konmuştur (71).

3. Prolin Analogları ve Diğerleri

Prolin analogları (1-azetidine-2-karboksilik asit, cis-hidroksiprolen) ve prolin hidroksilaz inhibitörleri (alfa,alfa-dipyridil) yeni damar gelişimi için gerekli kollajen birikimini engeller. İnsanda amebiazis tedavisinde kullanılan bir antibiyotik olan fumagilin, anjiogenezi ve tümör büyümesini önler (72).

4. Tedavi

Yeni oluşan damarların tedavisi birçok seçenek içinden, en etkin olarak argon lazer fotokoagulasyon yöntemi ile yapılır. Cherry, insanda argon lazer ile korneal damarların tedavi edileceğini ilk olarak bildirmiştir (73). Baer ve arkadaşları, 23 hastanın 25 gözüne, 577 nm yellow dye lazer kullanarak korneal argon lazer fotokoagulasyon yaptığında greft rejeksiyonunu geri çevirdiğini ve vaskülarize alanda %68 azalma olduğunu bildirmişlerdir (74). Chidambara ve arkadaşları, kolay uygulanan ve ucuz bir teknik olan ince iğne diatermi ile kornea damarlanmasında başarılı sonuçlar bildirmiş ve bunu argon lazer fotokoagulasyona alternatif olarak önermişlerdir (60).

MATERYAL VE METOD

Hayvanlar

Deneyle, ARVO'nun belirttiği deneysel hayvan kullanımı beyanatına uygun olarak yapıldı. Çalışmada ağırlıkları 2.5-3.5 Kg arasında değişen Yeni Zelanda erkek beyaz tavşanları kullanıldı. Kırk beş tavşan rastgele üç gruba ayrıldı. Her grupta 15 hayvan vardı. Bunlar izotonik salin kontrol grubu, L- NAME ve aminoguanidin tedavi gruplarından oluşmakta idi.

İlaçlar

Tavşanlarda şiddetli kornea alkali yanığına bağlı damarlanma cevabında özđün ve özđün olmayan NOS inhibitörlerinin etkisini değerlendirmek için L- NAME ve aminoguanidin (spesifik iNOS inhibitörü) solüsyonları (100mM) taze olarak hazırlandı. Her alışma grubundaki tavşanlara ilgili ajanlar günlük 0.1 ml olarak perilimbal subkonjunktival enjeksiyon şeklinde uygulandı. L-NAME ve aminoguanidin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) konsantrasyonu (100mM), tavşan korneasında mikrocep tekniği ile yapılan damarlanma çalışmalarında (42-44) L-NAME için bildirilen oral dozdan (0.5 g/l \approx 2mM) ok daha yüksektir. Kontrol grubundaki tavşanlara aynı volüm izotonik salin subkonjunktival olarak verildi. Hayvanlara alkali yanıktan 1 hafta önce başlayarak yanık sonrası 14 gün ilgili ajanlar, subkonjunktival olarak hergün uygulandı.

Kornea Alkali Yanığı Oluşturulması

Tavşanlarda genel anestezi, ketamin hidroklorid (50 mg/Kg) ile xylazine (Rompun®)(5mg/Kg) karışımının intramuskuler enjeksiyonu ile sağlandı. Topikal anestezi için %0.5'lik proparakain hidroklorid(HCl) (Alcaine®) uygulandı ve sağ göze tel kapak spekulumu yerleştirildi. Kornea yüzeyindeki fazla ıslaklık ince pamuk tampon ile giderildi. Standart kornea alkali yanığı, Ormerod ve arkadaşları

tarafından tanımlanan model (55), modifiye edilerek uygulandı. 7 mm çaplı Whatman # 3 filtre kağıdı diskleri, standart kağıt kesici ile oluşturulup, 25 µl 4N NaOH solüsyonu diske damlatıldı ve disk, pupil ortalanarak kornea santraline yerleştirildi. Whatman # 3 filtre kağıdı, ıslanırken kolayca kornea şeklini alması nedeniyle seçildi. Şiddetli korneal yanık oluşturmak için alkali emdirilmiş diskler 2 dakika süreyle merkezi kornea alanında tutuldu. İşlem sonunda kornea yüzeyi 15 ml izotonik solüsyonla 60 saniye yıkandı. Yanık sonrası topikal antibiyotik kullanılmadı.

Kornea Damarlanmasının Değerlendirilmesi

Hayvanlara uygulanan korneal yanığı takiben 15 gün sonra korneal damarlanma cevabı, biyomikroskopla değerlendirildi ve bulgular kaydedildi. Limbustan üst ve alt kısımdan santral yanığa ulaşan en büyük damarlar belirlendi. Majör damarların radyal uzunluğu, limbustan slit-lamp illüminasyon yardımıyla ölçüldü. Alt yarı damarlanmasının ölçümü en uzun üç damar ortalama uzunluğu ve üst kadran için ikisinin ortalaması esas alınarak hesaplandı. Her iki ortalamanın toplamı ortalama neovasküler indeks (NI) olarak hesaplandı. NI'in yanısıra invazyon, derece olarak (saat kadranı) damarlanmanın yaygınlığı ve ortalama damarlanmanın uzunluğu tüm kadrandaki ortalama yeni damar uzunluğunun belirlenmesi ile değerlendirildi.

Kornea NO Düzeyinin Ölçülmesi

On beşinci günde her gruptan 10 tavşan öldürülerek sağ korneaları limbustan eksize edildi. Alınan kornealar, iki defa soğuk salin solüsyonla yıkandı, cam şişelere konulup işaretlendi ve analiz yapılana kadar (2 hafta) derin dondurucuda (-70°C) saklandı. Plasebo kontrol grubunda sol kornealar, şeffaf kornea dokusundaki bazal NO üretimini belirlemek için eksize edilip aynı işleme

tabii tutuldu. Herbir kornea küçük küçük parçalara bölünerek Triton X-100 içeren Tris-HCl buffer ile 4 kat sulandırılıp dakikada 1500 devirli standart homojenizatörle 2 dakika homojenize edildi. Tüm işlemler +4 °C'de uygulandı. NO'nun stabil oksidatif metabolitleri olan doku nitrit (NO₂) ve nitrat (NO) düzeyleri homojenizatta tespit edilip, Gries reaksiyonu kullanılarak Cortas ve Wakid'in tarif ettiği şekilde belirlendi (75). Örneklerdeki proteinin uzaklaştırılmasında Somogyi reajanı kullanılarak deproteinizasyon sağlandı (76). Homojenattaki protein konsantrasyonları Lowry's metoduna göre ölçüldü (77). Sonuçlar, nM/g protein olarak ifade edildi.

İltihabi Hücre İnfiltrasyonunun İncelenmesi

Her gruptan kendi özelliğini yansıtan beş kornea, ışık mikroskopisi için standart yöntemle hazırlandı. Makrofaj, PMNL ve keratosit popülasyonları daha önce bildirilen şekilde yara santralinde semikantitatif olarak değerlendirildi (53). Her korneada yanık yerinden 6 kesit alınarak H&E ile boyandı. Her kesitten rastgele altı küçük büyütme alanı (X100) seçilerek, bu alanlardaki inflamatuvar hücreler belirlendi ve büyük büyütmede sayıldı (X1000). Sayım sırasında tipi kesin olarak seçilemeyen hücreler dikkate alınmadı. Böylece her hücre tipi için yanık bölgesinden elde edilen 36 alandaki toplam hücre sayısı hesaplanıp, o kornea için geçerli iltihabi hücre indeksleri olarak kaydedildi. Bu indekslerin her gruptaki ortalama değerleri, iltihabi hücre infiltrasyonunun göstergesi olarak değerlendirildi.,

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar, ortalama \pm standart ortalama hata şeklinde (SEM) ifade edildi. Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı ve $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS istatistik programı ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

Kornea merkezinde oluşturulan standart alkali yanığa bağı damarlanma cevabı, işlemde 4 gün sonrasına kadar klinik olarak izlenmedi. Şiddetli alkali yanığa bağı yeni damarların yüzeyel ve derin kornea stromasında yer aldığı görüldü. Erken dönemde santral yanık görünümü hemen hemen aynı iken, 14 gün sonra izlenen damarlanma cevabı, aynı gruptaki tavşanlar arasında da kısmi farklılıklar gösteriyordu. Santral kornea yanığı çevresinde oluşan damarlar tüm kadrarlarda farklı uzunlukta olduğundan, kornea damarlanmasının sayısal karşılaştırması için birbirini tamamlayan üç farklı metod kullanıldı. Bu metodlarla değerlendirilen yeni damarlanma cevabının gruplar arasındaki dağılımı ve karşılaştırması Tablo 3'te özetlenmiştir. On beşinci günde ortalama Nİ, gruplar arasında farklılık göstermezken ($P>0.05$), yeni damarlanma cevabının saat kadranı olarak derecesinin, L-NAME ve aminoguanidin çalışma gruplarında plasebo kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterildi (sırasıyla $P<0.001$ ve $P<0.001$). L-NAME ve aminoguanidin grupları arasında ise damarlanma derecesi (saat kadranı) açısından farklılık saptanmadı ($P = 0.616$) (Şekil 3 ve Şekil 7). Buna paralel olarak L-NAME ve aminoguanidin gruplarında saat kadranı başına düşen ortalama damar uzunluğunun, kontrol grubuna göre belirgin olarak fazla olduğu ($P<0.001$ ve $P<0.001$, sırasıyla) saptandı. Heriki çalışma grubu arasında ise anlamlı farklılık gözlenmedi ($P = 0.724$) (Şekil 4).

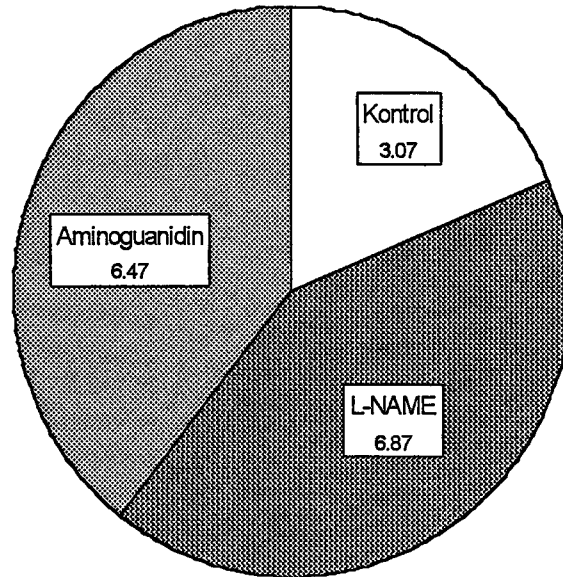
NO, yarılanma ömrü birkaç saniye ile sınırlı gaz formunda bir serbest radikal olduğundan, plazma ve doku NO düzeylerinin değerlendirilmesinde stabil oksidatif son ürün olan nitrit ve nitrat miktarı ölçülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda NOS inhibitörleri olan L-NAME ve aminoguanidinin subkonjunktival

uygulama sonrası tavşan kornealarında oluşturduğu damarlanma cevabındaki belirgin değişimlerin, kornea dokusundaki nitrit-nitrat konsantrasyonlarında değişimlerle paralellik ya da birliktelik göstermesi de değerlendirildi. Kornea dokusunda oluşan NO'nun göstergesi olarak ölçülen nitrit düzeylerinin, kontrol ve çalışma gruplarında belirgin olarak farklı bulunduğu gösterildi ($P < 0.001$). Ortalama kornea nitrit konsantrasyonu L-NAME ve aminoguanidin gruplarında, kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $P < 0.001$ ve $P = 0.001$). Heriki çalışma grubu arasında ise farklılık saptanmadı ($P = 0.705$) (Şekil 5).

Tablo 3. Gruplardaki ortalama nitrit üretimi ve korneal neovaskülarizasyon sonuçları (Ortalama \pm SEM).

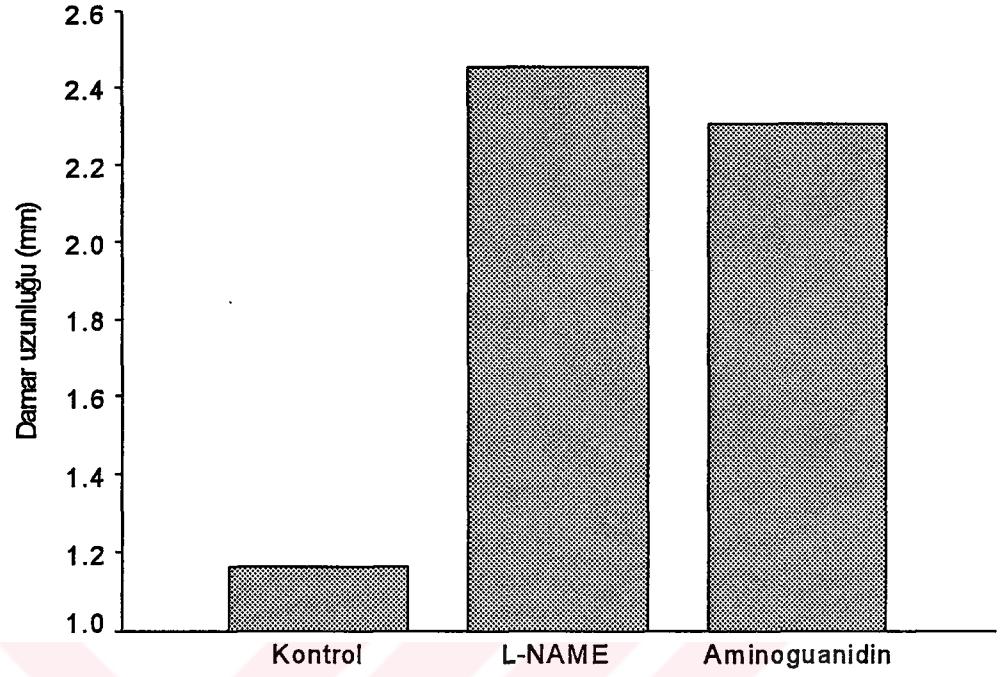
	Saydam kornea	Kontrol	L-NAME	Aminoguanidin	P
Neovasküler indeks (mm)		9.32 \pm 0.23	9.14 \pm 0.24	8.93 \pm 0.32	0.775
Ort. damar uzunluğu (mm)		1.15 \pm 0.10	2.45 \pm 0.25	2.30 \pm 0.21	< 0.001
Saat kadranı şeklinde yeni damarlanma yaygınlığı		3.06 \pm 0.22	6.86 \pm 0.63	6.46 \pm 0.67	< 0.001
Doku nitrit düzeyleri (nmol/mg protein)	454.40 \pm 47.81	983.45 \pm 72.21	506.05 \pm 46.56	533.24 \pm 50.87	< 0.001

SEM: Standart ortalama hata

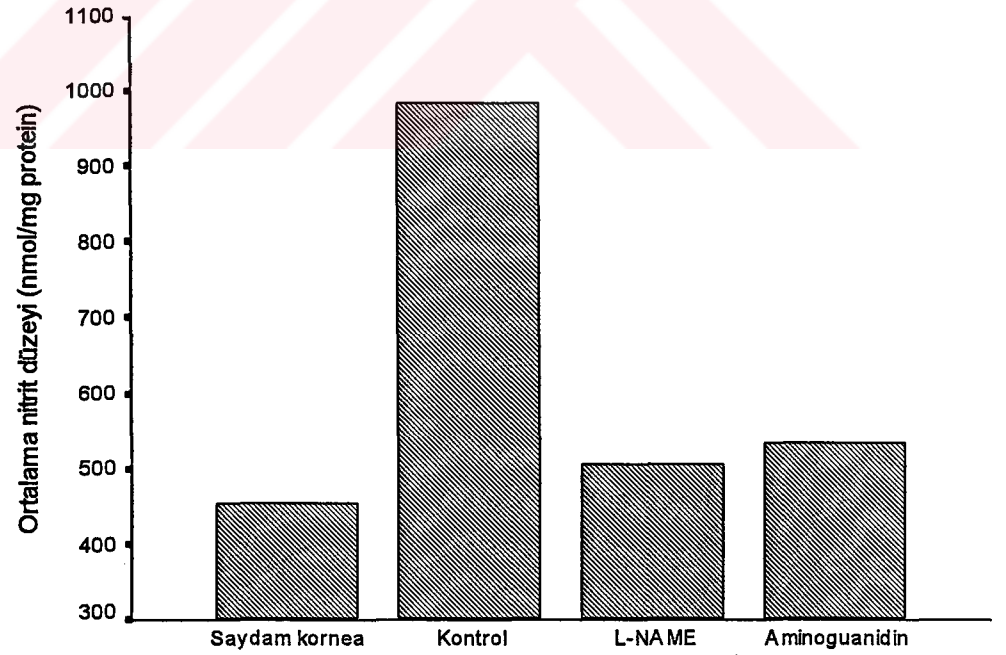


ŞİŞİTİFİK İNŞAAT VE MİMARLIK
M.Ş. 2017

Şekil 3. Gruplarda saat kadranı cinsinden kornea damarlanmasının yaygınlığı



Şekil 4. Gruplarda, her saat kadranındaki en uzun damarın ortalaması alınarak hesaplanan ortalama kornea damar uzunlukları



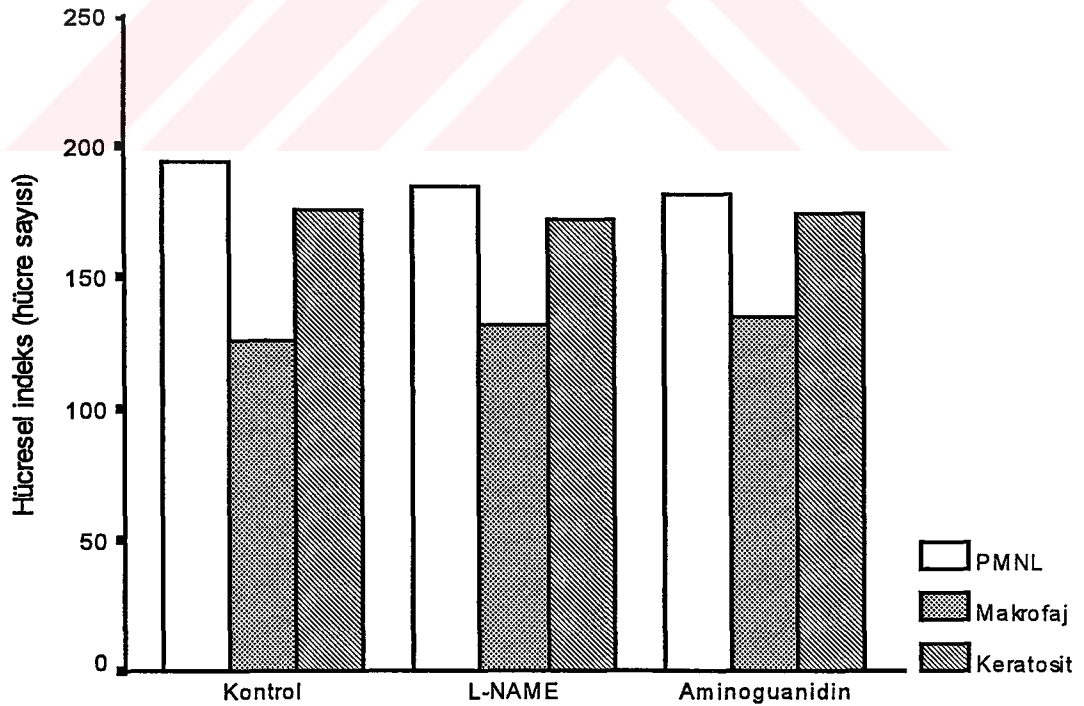
Şekil 5. Gruplarda alkali yanıktan 15 gün sonra korneadaki nitrit oksit yapımının göstergesi olarak ortalama nitrit düzeyleri

Merkezi yanık bölgesinin semikantitatif histolojik incelemesinde ise, iltihabi hücre indekslerinin gruplar arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($P > 0.05$) (Tablo 4, Şekil 6). On beşinci günde kornea merkezindeki yanık bölgesinde iltihabi hücre göçü, yüzeysel ve orta stroma tabakalarında yaygın olarak izlenmekteydi (Şekil 8).

Tablo 4. Santral korneada iltihabi hücre infiltrasyonu hücre indeksi (ortalama \pm SEM).

	Kontrol	L-NAME	Aminoguanidin	P
PMNL	193.60 \pm 16.95	184.00 \pm 12.36	181.40 \pm 12.70	0.878
Makrofajlar	125.20 \pm 7.24	131.00 \pm 7.90	134.40 \pm 7.50	0.651
Keratositler	175.40 \pm 15.60	171.20 \pm 12.47	173.40 \pm 11.32	0.932

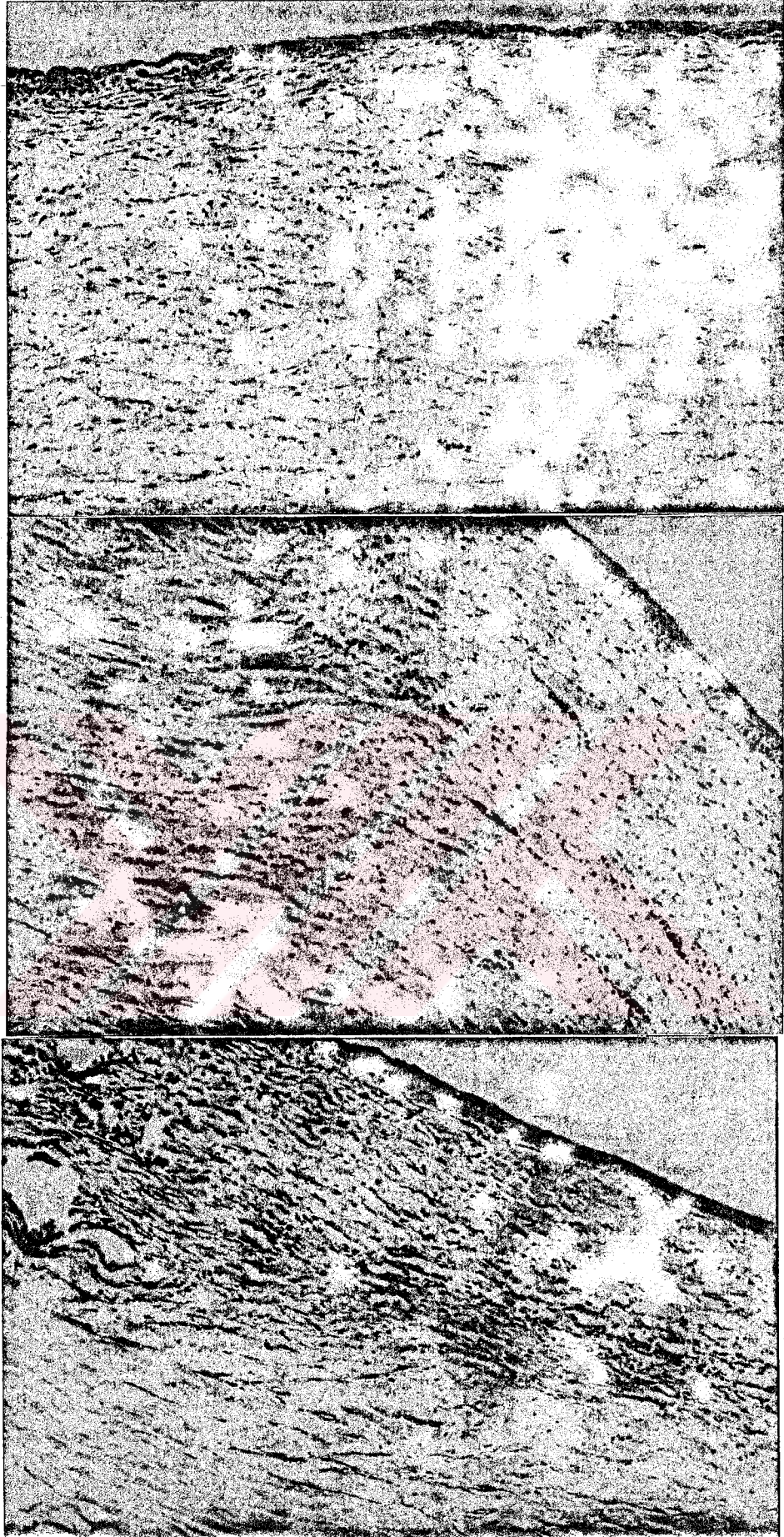
PMNL: Polimorf nükleer lökosit, SEM: Standart ortalama hata



Şekil 6. Alkali yanıktan 15 gün sonra kornea merkezindeki yanık alanında hesaplanan iltihabi hücre indeksi



Şekil 7. Alkali kornea yanığıını takiben 15. günde plasebo kontrol grubuna (üst) göre, L-NAME (orta) ve aminoguanidin (alt) gruplarındaki tavşan kornealarında damarlanmanın daha yaygın olduğu gözlenmektedir.



Şekil 8. 15. günde kornea merkezindeki alkali yanık bölgesinden alınan histolojik kesitlerde kontrol (üst), L-NAME (orta) ve aminoguanidin (alt) gruplarında benzer derecede iltihabi hücre infiltrasyonu izlenmektedir (H&E, X100).

TARTIŞMA

NO, yarı ömrü birkaç saniye ile sınırlı gaz formunda serbest bir radikal olup, NOS enzimlerince L-arginin'den sentezlenir (78). NO, nöronal iletim, vazodilatasyon, immün sistem ve inflamasyon gibi değişik olaylarda önemli rol oynamaktadır (79-81). Kornea damarlanması; inflamasyon, enfeksiyonlar ve travma sonrası yaygın olarak oluşabilen bir komplikasyondur. NO'nun genel olarak anjiogenez ve özel olarak da kornea damarlanmasındaki rolünü belirlemeyi amaçlayan farklı çalışmalar bulunmaktadır. Kornea damarlanması üzerine NO'nun anjiogenezisi uyarıcı (43,46,82-84) ya da baskılayıcı (48,49,85,86) olabileceği bildirilmektedir. Tavşan kornealarında damar oluşumunu inceleyen çalışmalarda, NO'nun damarlanmayı uyarabileceği düşünülmüştür (43,44,87). Bunun yanısıra koroner endotel hücre kültüründe NO'nun endotel hücre çoğalmasını uyardığı (45,82,88,89) ve insan endotel hücre kültüründe de VEGF'ye bağlı endotel hücre çoğalmasında aracılık ettiği görülmüştür (83,90). NO'nun anjiogenezisi indükleyici etkisinin ortaya çıkmasında cNOS ile oluşan bazal NO düzeyinin etkili olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan NO'nun vücutta yeni damar oluşumunu engelleyici rolünü gösteren çok sayıda çalışma vardır. NO'nun civciv koryoallantoik membranında normal ve uyarılmış damarlanmayı inhibe ettiği (48,49,91,92) ve değişik tip endotel hücre kültürlerinde (43,93) endotel hücre çoğalmasını azalttığı görülmüştür.

NO'nun yeni damarlanmayı önleyici etkisinin, uyarılabilen NOS (iNOS) yoluyla olduğu düşünülmektedir (48,93). Ayrıca iNOS geni baskılanmış farelerde yapılan bir çalışmada, iNOS enzimince yapılan yüksek miktarda NO'nun gümüş nitratla yakılarak uyarılan kornea damarlanmasını kısmen inhibe ettiği

gösterilmiştir (94). NO'nun yeni damarlanma üzerine etkisi konusunda yapılan çalışmaların sonuçlarının farklı olmasının bir nedeni, bu çalışmalarda kullanılan değişik deneysel modellerde farklı NOS tiplerinin aktive olabilmesi ile açıklanabilir (özellikle iNOS ve eNOS). Ancak bu çalışmalarda farklı NOS tipleri aktive olmuş olabilir. Zira her bir çalışmada değişik NOS inhibitörleri kullanılmıştır.

Muhtemelen iNOS tarafından üretilen yüksek miktardaki NO yeni damar oluşumunu engellerken, cNOS tarafından oluşturulan bazal NO düzeyi yeni damarlanmayı kolaylaştırıcı ve aktive edici rol oynuyor olabilir. Çalışmamızda özgün iNOS inhibitörü olan aminoguanidin ve iNOS ve eNOS'u inhibe eden L-NAME'in ciddi alkali yanık oluşturulan tavşan korneasında damarlanma üzerine olan etkisi araştırıldı. Çalışmada klinik olarak karşılaşılan kimyasal yanık patolojilerine benzerlik gösteren standart bir tavşan modeli kullanıldı (55). Çalışma sonuçlarımız her iki NOS inhibitörünün de (aminoguanidin ve L-NAME) tavşanda alkali yanıkla oluşturulan kornea damarlanmasını artırdığını göstermektedir. Bu sonucun tavşan korneasında korneal cep yöntemi ile gerçekleştirilen ve NO'nun damarlanmayı aktive edici rolünü destekleyen diğer çalışmalardan farklılık arz etmektedir (43-45). Korneal cep tekniğini kullanan bu çalışmalar ve bizim çalışmamız arasındaki farklı sonuçları açıklamak için değişik hipotezler öne sürülebilir. Öncelikle kimyasal yanıkla oluşturulan kornea damarlanması, tek bir ajan kullanılarak damarlanma oluşturulan korneal cep tekniği ile kıyaslandığında çok daha karmaşık bir süreç olup, yeni damarlanma üzerine etkili sayısız miktarda ajanı içermektedir. İkinci olarak Ziche'nin tavşanlarda korneal cep yöntemini kullanarak yaptığı çalışmalarda (43-45), bizim çalışmamıza göre farklı bir NOS tipinin aktive olduğu düşünülebilir. Ancak Ziche'nin çalışmalarında özgün olmayan NOS inhibitörleri (L-NAME gibi) kullanıldığı için hangi NOS tipinin aktive olduğunu

tespit etmek zordur. Son olarak, çalışma sonuçları arasında görülen bu farklılığın NO ile NOS enzimlerinin aktivitelerini düzenleyen (82,90) ve kornea damarlanmasında etkili olduğu bilinen VEGF ve FGF gibi (95,96) büyüme faktörleri arasındaki etkileşime bağlı olduğu ileri sürülebilir. Buna karşın in vitro ve in vivo çalışmalarda (85,97-99) NO'nun esas olarak VEGF ile ilgili büyüme fonksiyonları ve diğer fonksiyonları negatif feed back etki ile inhibe ettiği görülmektedir. Muhtemelen tavşanlarda alkali yanığa bağlı oluşan yeni damarlanma, çalışmamızda benzer negatif kontrol mekanizması harekete geçerek, yanığa bağlı artmış NO yapımı yeni damar cevabını kısmen baskılamış olabilir. Benzer negatif kontrol mekanizması, NOS aktivitesinin tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu (100) malignitelerdeki yeni damar oluşumunda da görülmektedir. Çalışmamızda kontrol grubu ve NOS inhibitörleri uygulanan gruptaki tavşanlar arasındaki kornea damarlanma farklılığının, kimyasal yanığı takiben bu iki grupta oluşan kornea inflamasyonunun seyriindeki farklılıkları yansıttığı düşünülebilir. Çünkü kontrol grubunda tedavi grubuna göre daha fazla miktarda üretilen NO, apoptozis yoluyla (101) inflamatuvar hücre sayısını azaltarak inflamasyon sürecini kısaltmış olacağı düşünülebilir. Dolaşımdaki lenfosit ve nötrofil sayısındaki belirgin azalmanın gümüş nitrat ile oluşturulan yanığa bağlı kornea damarlanma cevabını azalttığı gösterilmiştir (63). Çalışmamızda, histolojik kesitlerde iltihabi hücrelerin görünüm ve sayıları açısından gruplar arasında farklılık tespit edilemeyiş, NOS inhibitörlerine bağlı olarak doku NO düzeyindeki değişimlerin kornea alkali yanığındaki iltihabi hücre göçüne ve dolayısıyla iltihabi sürece doğrudan etki etmediğini düşündürmektedir.

Kimyasal kornea yanığı sırasında üretilen NO kaynağı ile ilgili olarak immünohistokimyasal boyama ile yapılan bir çalışmada (94) yanık olan merkezi

kornea kısmında iNOS enzimine ait boyanmanın belirgin olduğu izlenmektedir. Çalışmamızda, daha önce de gösterildiği gibi (55) yanık olan merkezi kornea alanı histolojik olarak inflamatuvar hücre göçünün en yoğun izlendiği bölge olarak dikkati çekmektedir. Histopatolojik çalışma sonuçlarımız, daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde (55,94,102) merkezi kornea yanık bölgesindeki inflamatuvar hücrelerin başlıca PMNL, monosit ve makrofaj olduğunu doğrulamaktadır. Tüm bu bilgiler, kornea alkali yanığı sırasında oluşan NO kaynağının bu inflamatuvar hücreler olduğunu düşündürmektedir. Yanık sırasındaki NO üretimine katkıda bulunan bir diğer kaynak, çalışmamızdaki histolojik kesitlerde yoğun olarak dikkati çeken keratositler olabilir (103). Bu ön çalışmada NOS inhibitörlerinin kornea dokusuna geçişi kornea dokusunda etkin inhibitör konsantrasyonuna ulaşması için gerekli olan minimal doz gibi farmakokinetik parametreleri incelemeyi amaçlamadık. Bununla birlikte tercih edilen subkonjunktival ilaç dozu, Ziche ve arkadaşlarının (43-45) tavşanlarla yaptığı çalışmada hayvanların içme suyuna karıştırarak oral yolla uyguladıkları L-NAME dozundan çok daha fazla olduğu görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız L-NAME ve aminoguanidin dozlarının intravitreal uygulandığı zaman tavşanlarda oluşturulan endotoksik üveitine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (104). Dahası, çalışmamızda kontrol grubundaki tavşanlarla karşılaştırıldığında L-NAME ve aminoguanidin gruplarında kornea nitrat düzeylerinde anlamlı bir azalma ile beraber damarlanma derecesinde belirgin bir artma olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ile literatürde ilk kez saydam, kontrol ve çalışma grubundaki kornealarda doku NO yapımının göstergesi olarak nitrit düzeylerinin ölçümü yapılarak, bu yanık modelinde kornea damarlanmasının derecesi ile doku nitrit düzeylerinin ters orantılı olduğunu ortaya koyduk. Doku nitrit düzeyi ile

damarlanma ilişkisi bizden önce yapılan koryoallantoik membran modeliyle de (105) desteklenmiş olup, koryoallantoik membrandaki iNOS gen ve enzim aktivitesi ve nitrit düzeyinin birbiri ile paralellik gösterdiği ve her üçünün damarlanma ile ters orantılı olduğu NO inhibitörü L-NAME kullanılarak doğrulanmaktadır. Bununla birlikte alkali yanığa bağlı kornea damarlanmasında NOS gen ve enzim aktiviteleri ile birlikte nitrit üretiminin damarlanma cevabı ile olan ilişkisinin inceleneceği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda L-NAME ve aminoguanidin grupları arasında damarlanma ve doku nitrit düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığından, kimyasal yanığa bağlı damarlanma sırasında oluşan NO'nun bazal NOS aktivitesinden çok iNOS yoluyla olduğu düşünülebilir. Bu düşüncemiz, farelerde oluşturulan kimyasal yanığa bağlı kornea damarlanmasında iNOS aktivitesini değerlendiren çalışma (94) ile de desteklenmektedir.

Çalışmamızda ilk kez NOS inhibitörlerinin subkonjunktival uygulama sonrası kornea dokusundaki uyarılmış NO yapımını azalttığı ve buna paralel olarak kimyasal yanığa bağlı damarlanma cevabını artırdığını gösterdik. Bu sonuç, NO'nun şiddetli alkali yanığa bağlı kornea damarlanmasında damarlanmayı azaltan endojen bir mediyatör olarak etki ettiğini ortaya koymaktadır. Bu konuda standart kornea alkali yanık modelleri üzerinde doku NO düzeyleri ve NOS aktivitesinin yanısıra NOS inhibitörlerinin lokal ve sistemik uygulama sonrası korneaya geçişinin de değerlendirileceği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

AMAÇ : Tavşanlarda şiddetli alkali yanığa bağlı kornea damarlanmasına, özgün ve özgün olmayan NOS inhibitörleri aminoguanidin ve N-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME)'in etkisini incelemek.

YÖNTEM : Kırk beş adet Yeni Zelanda beyaz erkek tavşanı rastgele yöntemle, herbiri 15 hayvandan oluşan plasebo kontrol (izotonik salin), L-NAME ve aminoguanidin şeklinde üç gruba ayrıldı. Standart alkali kornea yanığı, 4 N sodyum hidroksit (NaOH) emdirilmiş 7 mm çaplı, disk şeklindeki Whatman # 3 filtre kağıdının merkezi kornea bölgesinde 2 dakika tutulması ile sağlandı. Kontrol ve çalışma gruplarındaki gözlere, alkali yanıktan 1 hafta önce başlayarak 14 gün sonrasına kadar hergün, izotonik salin, L-NAME (100mM) veya aminoguanidin (100mM) solüsyonundan 0,1 ml subkonjunktival olarak uygulandı.

Kornea damarlanması alkali yanıktan 15 gün sonra biyomikroskopi ile değerlendirildi. Alt yarıdaki en uzun üç damar ve üst yarıdaki en uzun iki damara ait ortalama uzunluk değerleri, alt ve üst kadrana ait ortalama damarlanma cevabı olarak belirlenip, bu iki ortalamanın toplamı neovasküler indeks (Nİ) olarak hesaplandı. Yeni damarlanma cevabı saat kadranı olarak damarlanmanın yaygınlığı ve tüm saat kadrانlarındaki en büyük damar uzunluklarının ortalaması alınarak hesaplanan ortalama damar uzunluğu olarak da değerlendirildi. Korneadaki nitrik oksit (NO) üretiminin göstergesi olarak doku nitrit düzeyi ölçüldü. Seçilmiş kornealarda yapılan histopatolojik incelemede, yanık bölgesindeki iltihabi hücrelerin görünüm ve sayıları değerlendirildi.

BULGULAR : Nİ gruplar arasında 14 gün sonra benzer olarak bulundu ($p > 0.05$). Bununla birlikte, damarlanmanın saat kadranı olarak ifade edilen yaygınlığının, L-NAME ve aminoguanidin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı

gözlendi (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.001$). Benzer şekilde saat kadranı başına düşen ortalama damar uzunluğunun, L-NAME ve aminoguanidin ile tedavi edilen hayvanlarda kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artmış olduğu izlendi (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.001$). L-NAME ve aminoguanidin grupları arasında, damarlanma yaygınlığı ($p = 0.616$) ve ortalama damar uzunluğu ($p = 0.724$) açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Merkezi bölgesinin histolojik incelemesinde, iltihabi hücrelerin görünüşleri ve sayıları açısından belirgin bir farklılık izlenmedi ($p > 0.05$).

SONUÇLAR : Çalışma sonuçlarımız, özgün ve özgün olmayan NOS inhibitörlerinin şiddetli korneal alkali yanığa bağlı damarlanma cevabını arttırdığını göstermekte olup, NO'nun kornea damarlanmasında olduğu gibi artmış damarlanma durumlarında endojen bir inhibitör olarak etki ettiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : Nitrik oksit, Nitrik oksit sentaz inhibitörleri, Kornea damarlanması, Kornea alkali yanığı.

ABSTRACT

PURPOSE : To evaluate the effects of specific and nonspecific NOS inhibitors, aminoguanidine and L-NAME on corneal neovascular response to severe alkali burn in rabbits.

METHODS : Forty-five male New Zealand white rabbits were randomly divided into three subgroups, each consisting of 15 animals; placebo (isotonic saline) control group, L-NAME and aminoguanidine treatment groups. A standard corneal alkali burn was produced in the right eyes using 7 millimeter alkali-immersed filter discs applied to the central cornea for 2 minutes. Control and study eyes were given daily subconjunctival dose of 0.1 mL of isotonic saline, L-NAME (100mM) and aminoguanidine (100 mM) from 1 week before surgery to 14 days after alkali burn.

CNV response were examined by slit lamp biomicroscopy at 15 days after corneal alkali injury. Neovascular Index (NI) was calculated as sum of the mean inferior and superior quadrant vascularities, the mean lengths of three and two longest vascular tufts in inferior and superior halves of the cornea respectively. Neovascularization was also assessed by degree (clock-hours) of neovascular invasion and average radial vessel length by measuring length of the longest vascular tuft at every clock hour using the height of the slit-lamp illumination beam. Tissue nitrite level was measured as an index of nitric oxide production in the cornea. Histopathologic examination of the representative corneas including semiquantitative assessment of the inflammatory cell infiltration in the central injury site was also performed.

RESULTS : The mean NI after 14 days was found similar among the groups ($P > 0.05$). However, clock-hour involvement of CNV as a measure of degree of

neovascularization significantly increased in L-NAME and aminoguanidine study groups compared to the control group ($P < 0.001$ and $P < 0.001$ respectively). Consistently, the average vessel length per clock-hour was also found to increase significantly in corneas from L-NAME and aminoguanidine treated animals compared to their corresponding controls ($P < 0.001$ and $P < 0.001$ respectively). No significant difference was detected in degree of CNV ($P = 0.616$) and average vessel length ($P = 0.724$) between L-NAME and aminoguanidine groups. Histological examinations of the central injury site revealed no marked difference in terms of histological appearance and the number of inflammatory cells between control and study corneas ($P > 0.05$).

CONCLUSIONS : Our results conclusively show that specific and nonspecific NOS inhibitors increase neovascular response to severe corneal alkali burn, suggesting that NO may act as an endogenous inhibitor of the increased angiogenic processes such as CNV.

Key Words : Nitric oxide, Nitric oxide synthase inhibitors, Corneal neovascularization, Corneal alkali burn.

KAYNAKLAR

1. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
2. Wagner RG. Endothelial cell embryology and growth. *Adv Microcirc* 1980;9:45-75.
3. Gross JL, Moscatelli D, Rifkin DB. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2623-2627.
4. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977;14:53-65.
5. Clark ER, Clark EL. Observation on living mammalian lymphatic capillaries, their relation to the blood vessels. *Am J Anat* 1937;60:253-298.
6. Wolff JR, Bar Th. "Seamless" endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. *Brain Res* 1972;41:17-24.
7. Caley DW, Maxwell DS. Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 1970;138:31-48.
8. Girard H. Arterial pressure in the chick embryo. *Am J Physiol* 1973;224:454-459.
9. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985;24:5480-5486.
10. Gimenez-Gallego G, Rodkey J, Bennet C, et al. Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* 1985;230:1385-1388.
11. D'Amore PA, Klagsbrun M. Endothelial cell mitogens derived from retina and hypothalamus: biochemical and biological similarities. *J Cell Biol* 1984;99:1545-1549.

12. Gaudric A, N'Guyen T, Moenner M, Bernard AG, Barritault D. Quantification of angiogenesis due to basic fibroblast growth factor in modified rabbit corneal model. *Ophthalmic Res* 1992;24:181-188.
13. Marquadt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ. Rat transforming growth factor type I: structure and relationship to epidermal growth factor. *Science* 1984;223:1079-1082.
14. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4167-4171.
15. Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM. Inhibition of endothelial regeneration by type beta-transforming growth factor from platelets. *Science* 1986;233:1078-1080.
16. Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem* 1978;253:3736-3743.
17. Frater-Schroeder MF, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type-alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5277-5281.
18. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413-2422.
19. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993;69:508-517.
20. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR, et al. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In vivo* 1994; 8: 961-965.
21. Li CH, McConnel A, Garcia J, Hernandez E, Huang AJW. Expression of vascular endothelial growth factor in rabbit ocular surface epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:S863.
22. Benazra D. Neovasclogenetic ability of prostaglandin growth factors and synthetic chemoattractants. *Am J Ophthalmol* 1978;86:455-461.

23. Ziche M, Jones J, Gullino P. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 475-482.
24. Dobson DE, Castellot JJ, Spiegelman BM. Angiogenesis stimulated by 3T3 adipocytes is mediated by prostanoid lipids. *J Cell Biol* 1985;101:109a.
25. Alessandri G, Raju K, and Gullino P.M. Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 1983;43:1790-1797.
26. Zauberman H, Michaelson IC, Bergmann F, and Maurice DM. Stimulation of neovascularization of the cornea by biogenic amines. *Exp Eye Res* 1969;8:77-83.
27. Rifkin DB, Gross JL, Moscatelli D, and Jaffe E. (1982). In " Pathobiology of the Endothelial Cell" (H.L. Nossel and H.J. Vogel, eds.), p. 191. Academic Press, New York.
28. Kesler DA, Langer RS, Pless NA, Folkman J. Mast cells and tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 1976; 18: 703-709.
29. Azizkhan RG, Azizkhan JC, Zetter BR, Folkman J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *J Exp Med* 1980;152:931-934.
30. Taylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982;297:307-317.
31. Thornton SC, Mueller SN, Levine EM. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 1983;222:623-625.
32. Weiss JB, Hill CR, Davis RJ, McLaughlin B, Sedowofia KA, and Brown RA. Activation of a procollagenase by low-molecular-weight angiogenesis factor. *Biosci Rep* 1983;3:171-177.
33. Parke A, Bhattacharjee P, et al. Characterization and quantification of copper sulphate-induced vascularization of the rabbit cornea. *Am J Path* 1988;130:173-78.
34. Raju KS, Alessandri G, Ziche M, Gullino P. Ceruloplasmin, copper ions and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982;69:1183-1188.

35. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ : Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 1995;376:517-519.
36. Volpert O, Jackson D, Bouck N, Linzer DI: The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is required for proliferin induced angiogenesis. *Endocrinology* 1996;137:3871-3876.
37. Stoltz RA, Connors MS, Gerritsen ME, Abraham NG, Laniado-Schwartzman M: Direct stimulation of limbal microvessel endothelial cell proliferation and capillary formation in vitro by a corneal-derived eicosanoid. *Am J Pathol* 1996;148:129-139.
38. Furchgott RF, and JV Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
39. Chiou GCY. Review: Effects of nitric oxide on eye disease and their treatment. *J Ocular Pharm and Therapeutics* 2001;17:189-198.
40. Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric Oxide in the eye: Multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol* 1997;42:71-82.
41. Ignarro LJ. Nitric oxide as a communication signal in vascular and neuronal cells. In *Nitric Oxide, Principles and actions*, Lancaster J, ed. Academic Press, New York , 1996:111-137.
42. Palmer RMJ, AG Ferridge, and S Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
43. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994;94:2036-2044.
44. Ziche M, Morbidelli L, Parenti A, Ledda F. Nitric oxide modulates angiogenesis elicited by prostaglandin E1 in rabbit cornea. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* 1995;23:495-497.
45. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang H-T, Dominni S, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997;99:2625-2634.

46. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997;100:3131-3139.
47. Naslund I, Norrby K. NO and de novo mammalian angiogenesis: Further evidence that NO inhibits bFGF-induced angiogenesis while not influencing VEGF165-induced angiogenesis. *APMIS* 2000;108:29-37.
48. Sakkoula E, Pipili-Synetos E, Maragoudakis M.E. Involvement of nitric oxide in the inhibition of angiogenesis by interleukin-2. *Br J Pharmacol* 1997;122:793-798.
49. Pipili-Synetos E, Papageorgiou A, Sakkoula E, Sotiropoulou G, et al. Inhibition of angiogenesis, tumour growth and metastasis by the NO-releasing vasodilators, isosorbide mononitrate and dinitrate. *Br J Pharm* 1995;116:1829-1834.
50. Folkman J, Haudenschild C, Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5217-5221.
51. Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1946;46:73-85.
52. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Brit J Cancer* 1977;35:347-356.
53. Langer R, Folkman J. Polymer for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 1976;263:797-800.
54. Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:413-427.
55. Ormerod LD, Abelson MB, Kenyon KR. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter disc. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:2148-2153.
56. Haynes WL., Proia AD., et al. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1588-1593.

57. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Current Eye Research* 1985;4:531-535.
58. National Society to Prevent Blindness: Vision problems in the US. Data Analysis, Definitions, Data Sources, Detailed Data Tables, Analyses. Interpretation. New York National Society to Prevent Blindness, 1980.
59. Klintworth GK: Corneal Angiogenesis: A Comprehensive Critical Review. New York: Springer-Verlag. 1991.
60. Chidambara TP, Harminder SD, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2148-2153.
61. Fromer CH, and Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. *Am J Pathol* 1975;79:537-554.
62. Sholley M M, Gimbrone MA, and Cotran RS. Cellular migration and replication in endothelial regeneration: a study using irradiated endothelial cultures. *Lab Invest* 1977;36:18-25.
63. Suvarnamani C, Halperin EC, Proia AD, et al. The effects of total lymphoid irradiation upon corneal vascularization in the rat following chemical cautery. *Radiation Research* 1989;117:259-272.
64. Litty GA, Liu SH, and Prendergast RA. Angiogenic lymphokines of activated T-cell origin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;24:1595-1601.
65. Eisenstein R, Sorgente N, Soble LW, Miller A, Kuettner KE. The resistance of certain tissues to invasion: penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme. *Am J Pathol* 1973;73:765-774.
66. Hepşen İF, Er H, Çekiç O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalmic Res* 1999;31:426-431.
67. Totan Y, Aydın E, Çekiç O, Dağlıoğlu MC, Borazan M, Dağlıoğlu YK, Gültek A. Effect of caffeic acid phenetylester on corneal neovascularization in rats. *Current Eye Res* (Baskıda).

68. Hoban BP, Collin HB. Effects of salicylate and steroid on neutrophil migration and corneal blood vessel growth. *Am J of Optometry & Physiological Optics* 1986;63:271-276.
69. Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985;230:1375-1378.
70. Maione TE, Gray GS, Petro J, et al. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet-factor 4 and related peptides. *Science* 1990;247:77-79.
71. Nguyen N, Goldberg M, et al. Topical and subcutaneous α -interferon fails to suppress corneal neovascularization. *Cornea* 1995;14:147-151.
72. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagilin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990;348:555-557.
73. Cherry PMH, Faulkner JD, Shaver PP, et al. Argon laser treatment of corneal neovascularisation. *Ann Ophthalmol* 1973;5:911-920.
74. Baer CJ, Stephen Foster C. Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularisation. *Ophthalmology* 1992;99:173-179.
75. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-1443
76. Somogyi M. A method for the prepraition of blood filtrates for the determination of sugar. *J Biol Chem* 1930;86:655
77. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;183:265
78. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-258.
79. Christophersen KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues physiological roles and diseases. *J Clin Invest* 1997;100:2424- 2429.
80. MacMicking JD, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-350.
81. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997;100:2417-2423.
82. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JC, et al. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor induced axtracellular signal

- regulated kinase 1/2 activation in post capillary endothelium. *J Biol Chem* 1998;273:4220-4226.
83. Papapetropoulos A, Desai MK, Rudic RD, Mayer B, et al. Nitric synthase inhibitors attenuate transforming growth factor-B1-stimulated capillary organisation in vitro. *Am J Pathol* 1997;150:1835-1844.
84. Leibovich SJ, Polverini PJ, Fong TW, Harlow LA, Koch AE. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4190-4194.
85. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 1997;3:879-886.
86. Joshi M. The importance of L-arginine metabolism in melanoma: an hypothesis for the role of nitric oxide and polyamines in tumour angiogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:573-578.
87. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumour progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-596.
88. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Granger HJ, et al. Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from postcapillary venules. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:1198-1203.
89. Morbidelli V, Chang C-H, Douglas JG, Granger HJ, et al. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996;270:411-415.
90. Hood J, Granger HJ. Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:23504-23508.
91. Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol* 1993;108:855-857.
92. Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Haralabopoulos G, Andriopoulou P, et al. Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator. *Br J Pharmacol* 1994;11:894-902.

93. Raychaudhury A, Frischer H, Malik AB. Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *J Cell Biochem* 1996;63:125-134.
94. Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide synthase-II is expressed in severe corneal alkali burns and inhibits neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2773-2779.
95. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:18-22.
96. Sunderkotter C, Roth J, Sorg C. Immunohistochemical detection of bFGF and TNF-alpha in the course of inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. *Am J Pathol* 1990;137:511-515.
97. Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, et al. Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* 1998;273:15257-15262.
98. Shen B-Q, Lee DY, Gerber H-P, Keyt BA, et al. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem* 1998;273:29979-29985.
99. Ahmed A, Dunk C, Kniss D, Wilkes M. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest* 1997;76:779-791.
100. Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:91-106.
101. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric Oxide synthase induces macrophage apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:503-508.
102. Sunderkotter C, Beil W, Roth J, Sorg C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. *Am J Pathol* 1991;138:931-939.
103. Dighiero P, Behar-Cohen F, Courtois Y, Goureau O. Expression of inducible nitric oxide synthase in bovine corneal endothelial cells and keratocytes in vitro after lipopolysaccharide and cytokines stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2045-2052.

104. Allen JB, McGahan MC, Ferrell JB, Adler KB, Fleisher LN. Nitric oxide synthase inhibitors exert differential time-dependent effects on LPS-induced uveitis. *Exp Eye Res* 1996;62:21-28.
105. Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, Athanassiadou A, et al. Nitric oxide synthase expression, enzym activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Br J Pharm* 2000;129:207-213.



Y.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI