



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYONDA MİKRO-RNA'LARIN ROLÜ VE VEGF İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. MİMBAY YAŞAR

DANIŞMAN

Doç. Dr. Harun ÇAKMAK

AYDIN – 2018

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYONDA MİKRO-RNA'LARIN ROLÜ VE VEGF İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. MİMBAY YAŞAR

DANIŞMAN

Doç. Dr. Harun ÇAKMAK

AYDIN – 2018

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi'nin 20.01.2017 tarihli TPF-17049 nolu kararı ile
desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bana her türlü imkânı ve desteği sağlayan; bilgi, fikir, cerrahi ve hayat tecrübeleriyle her zaman desteklerini hissettiğim, başta Göz Hastalıkları ABD Başkanı Prof. Dr. Sema DÜNDAR olmak üzere Anabilimdalımızdaki çok değerli hocalarım; Prof. Dr. Seyhan BAHAR ÖZKAN'a, Doç. Dr. Harun ÇAKMAK'a, Doç. Dr. Tolga KOCATÜRK'e ve Dr. Öğr. Üyesi İpek Ayşe AKYÜZ ÜNSAL'a sonsuz saygı, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Harun ÇAKMAK başta olmak üzere, Prof. Dr. Gökay BOZKURT, Prof. Dr. Kemal ERGİN ve çalışmamın tüm zorlu deneysel aşamalarında yanımda olan değerli Dr. Öğr. Üyesi Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitim süresince mesai saatini paylaştığım, hepsi birbirinden değerli asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma da ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Zorlu eğitim hayatım boyunca hep fedakar davranan, manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme; sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mimbay YAŞAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kornea Anatomisi.....	2
2.1.1. Epitel.....	6
2.1.2. Bowman Tabakası	7
2.1.3. Stroma.....	7
2.1.3. Dua Tabakası	7
2.1.4. Descemet Membranı.....	8
2.1.5. Endotel.....	8
2.2. Embriyoloji, Büyüme, Gelişme ve Yaşlanma	8
2.3. Kornea Fizyolojisi	10
2.3.1. Kornea Hücrelerinde Metabolizma	10
2.3.2. Oksijen Metabolizması	11
2.3.3. Stromal Hidrasyon ve Kornea Şeffaflığı	11
2.3.4. Korneanın Şeffaflığı	13
2.3.5. Epitel Fizyolojisi	14
2.3.6. Stroma Fizyolojisi	15
2.3.7. Endotel Fizyolojisi.....	15
2.4. Kornea Yara İyileşmesi	16

2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi	16
2.4.2. Stromal Yara İyileşmesi	17
2.4.3. Endotelyal İyileşme	18
2.5. Korneal Neovaskülarizasyon.....	18
2.5.1. Korneal Neovaskülarizasyon Nedenleri	19
2.5.2. Korneal Neovaskülarizasyonun Moleküler Temeli	20
2.5.2.1. Kornea Neovaskülarizasyonunda Rol Alan Anjiyogenik Moleküller.....	21
2.5.2.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	21
2.5.2.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü.....	22
2.5.2.1.3. Matris Metalloproteinazlar	23
2.5.2.1.4. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 α	23
2.5.2.1.5. Epidermal Büyüme Faktörü.....	24
2.5.2.1.6. Tümör Nekrozu Faktörü- α	24
2.5.2.2. Kornea Neovaskülarizasyonunda Rol Alan Anti-Anjiyogenik Moleküller	24
2.5.2.2.1. Anjiyostatin	24
2.5.2.2.2. Endostatin	24
2.5.2.2.3. Pigment Epiteli Derived Faktör	25
2.5.2.2.4. Trombospondin-1	25
2.6. miRNA	25
2.6.1. miRNA'ların biyogenez ve etki mekanizması.....	26
2.7. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu(qRT-PCR)	29
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. Hayvan Deneyi	31
3.2. VEGF ve miRNA Ekspresyonu.....	32
3.2.1. Dokudan Total RNA ve miRNA İzolasyonu.....	32

3.2.2. Total RNA'dan cDNA eldesi	33
3.2.3. miRNA'dan cDNA Eldesi	34
3.2.4. qRT-PCR (Quantative Real Time-PCR, Kantitatif Gerçek Zamanlı-PCR) ile VEGFA Gen Ekspresyon Analizi	34
3.2.5. qRT-PCR Array	35
3.2.6. qRT-PCR miRNA Ekspresyon Analizi	36
4. BULGULAR	38
4.1. Fotoğraflama Bulguları	38
4.2. Ekspresyon Bulguları	39
4.2.1. VEGFA Ekspresyon Bulguları	39
4.2.2. miRNA PCR Array Bulguları	39
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I: Korneal Neovaskülarizasyon Nedenleri	19
Tablo II: Korneada Tespit Edilen Anjiyojenik ve Anti-Anjiyojenik Faktörlerin Özeti	20
Tablo III: cDNA için Bileşenler ve Miktarları	34
Tablo IV: <i>Rat miFinder miRNA PCR Array</i> Plate İçeriğinde Araştırılan 84 Gen.....	36
Tablo V: qRT-PCR için Kullanılan Bileşenlerin Oranları	37
Tablo VI: qRT-PCR Tepkime Koşulları	37
Tablo VII: miRNA qRT-PCR Bulguları	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnsan kornea ve sklerasının anatomik ve histolojik görünümü	4
Şekil 2: Kornea anatomisi	6
Şekil 3: Korneada glukoz metabolizması	11
Şekil 4: Kornea endotelindeki iyon ve su geçişi	13
Şekil 5: Farklı hücre tiplerinde VEGF reseptörlerinin etkileri	22
Şekil 6: miRNA biyogenezi.....	28
Şekil 7: Under ve Over ekspresyon olan ve ekspresyonu değişmeyen miRNA'lar (Volcano Plot görüntüsü).....	41
Şekil 8: Under ve Over ekspresyonu olan ve ekspresyonu değişmeyen miRNA'lar (Clustergram Görüntüsü).....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AL	: Argon Lazer
AMT	: Amniyotik Membran Transplantasyonu
Anti-VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Karşıtı
ARPE	: İnsan Retina Pigment Epitelyal Hücre Dizisi
b-FGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CA	: Kalsiyum
CL	: Klor
CO ₂	: Karbondioksit
COX	: Siklo-oksijenaz
Cx43	: Konneksin-43
D	: Diyoptri
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DRP	: Diyabetik Retinopati
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDT	: Fotodinamik Tedavi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FOG2	: Friend of Gata 2
GİB	: Göz İçi Basınç
H	: Hidrojen

HCO ₃	: Bikarbonat
HGF-SF	: Hepatosit Büyüme Faktörü-Dağılım Faktörü
HIF-1 α	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 α
HMF	: Hekzoz Monfosfat
HSA	: Homo Sapiens
HSV	: Herpes Simpleks Virus
IGF	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	: İnterlökin-1
IL-10	: İnterlökin-10
IL-12	: İnterlökin-12
IL-13	: İnterlökin-13
IL-2	: İnterlökin-2
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
İSH	: İn Situ Hibridizasyon
K	: Potasyum
kDa	: Kilodalton
KDR	: Kinaz İnsert Domain Reseptör
KNV	: Korneal Neovaskülerizasyon
LR	: Lüsiferaz Raportör
LTGF	: Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MGUS	: Belirsiz Önemi Olan Monoklonal Gammopati
MIF	: Migrasyonu İnhibe Edici Faktör
miRNA	: micro RNA

MLP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
mm	: Milimetre
MM	: Multiple Myelom
mmHg	: Milimetre Civa
MMP	: Matris Metalloproteinaz
MMP-2	: Jelatinaz-A
MMP-3	: Stromelisin
MMP-7	: Matrilysin
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
mV	: milivolt
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
NSAİİ	: Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar
OIR	: Oksijen Kaynaklı Retinopati
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE-2	: Prostaglandin E-2
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PPAP2B	: Fosfatidik Asit Fosfataz 2b
qRT PCR	: Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	: RNA kaynaklı susturucu kompleks

RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
siRNA	: Small İnterfering RNA
sn	: Saniye
SP	: Şişme Basıncı
TCA	: Trikarboksilik Asit
TGF�-�	: Transforme Edici Büyüme Faktörü �-�
TIPM	: Matris Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
TNF-�	: Tümör Nekrozu Faktörü-�
TSP-1	: Trombospondin-1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
VPF	: Vasküler Geçirgenlik Faktörü
WB	: Western Blot
YBMD	: Yaş� Bağlı Makula Dejeneresansı
�g	: Mikrogram
�l	: Mikrolitre
�m	: Mikronmetre
�v	: Mikrovolt

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Deney grubundan bir sıçanın kornea görüntüsü.....	39
--	----



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kornea gözün en önemli refraktif komponentini oluşturan aynı zamanda mekanik bariyer görevi gören avasküler saydam bir dokudur. Korneal neovaskülarizasyon; inflamatuvar, enfeksiyöz, travmatik ya da dejeneratif hastalıklar sonucunda oluşabilmektedir. Korneal neovaskülarizasyon stromal ödem, lipid birikimi ve skar oluşumu ile görme keskinliğinde ciddi azalmalara yol açabilmektedir. Bu nedenle etkili bir şekilde önleyici ve tedavi edici yöntemlerin kullanılması gerekmektedir.

Korneada anjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasında bir denge söz konusudur. Korneal neovaskülarizasyon oluşumu sürecinde birçok moleküler faktör rol almaktadır. Bu faktörlerden en önemlisi daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi Vasküler Endotelyal Faktör (VEGF) 'dür.

Son yıllarda mikro-RNA(miRNA)'ların organizmalar ve biyolojik süreçler için önemli bir gen ekspresyon düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. miRNA'lar yaklaşık 22(17-24 baz çifti) nükleotid uzunluğunda tek iplikli Ribonükleik asit (RNA) moleküleridir. miRNA'lar gelişim, farklılaşma, apoptoz, embriyogenez, organogenez, anjiogenez, ve diğer fizyolojik olaylarda önemli rol aldığı gösterilmesine rağmen düzensiz ekspresyonu durumunda farklı patolojik olaylarla ilişkilendirilmiştir.

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde çok sayıda ajanın deneysel ve klinik kullanımı bildirmiş ancak ideal tedavi konusunda fikir birliği sağlanamamıştır. VEGF'ün patolojik neovaskülarizasyonda major rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle son zamanlarda patolojik neovaskülarizasyonun önlenmesi amacıyla anti-VEGF tedavi rejimlerine odaklanılmıştır. Son olarak ortaya çıkan deliller anti anjiogenetik tedavide, anjiogenetik yolların birden fazla bileşenle hedef alındığı tedavi yaklaşımlarının gerekliliği gösterilmiştir.

Çalışmamızda korneal neovaskülarizasyon oluşum sürecinde VEGF ilişkili miRNA düzeyindeki değişiklikler incelenecektir. Literatürde böyle bir çalışma bulunmamakla birlikte; çalışma sonrasında korneal neovaskülarizasyon oluşum sürecinin aydınlatılması, sonraki yapılacak klinik, deneysel çalışmalara ve ilaç tedavilerine zemin oluşturması hedeflenmektedir.

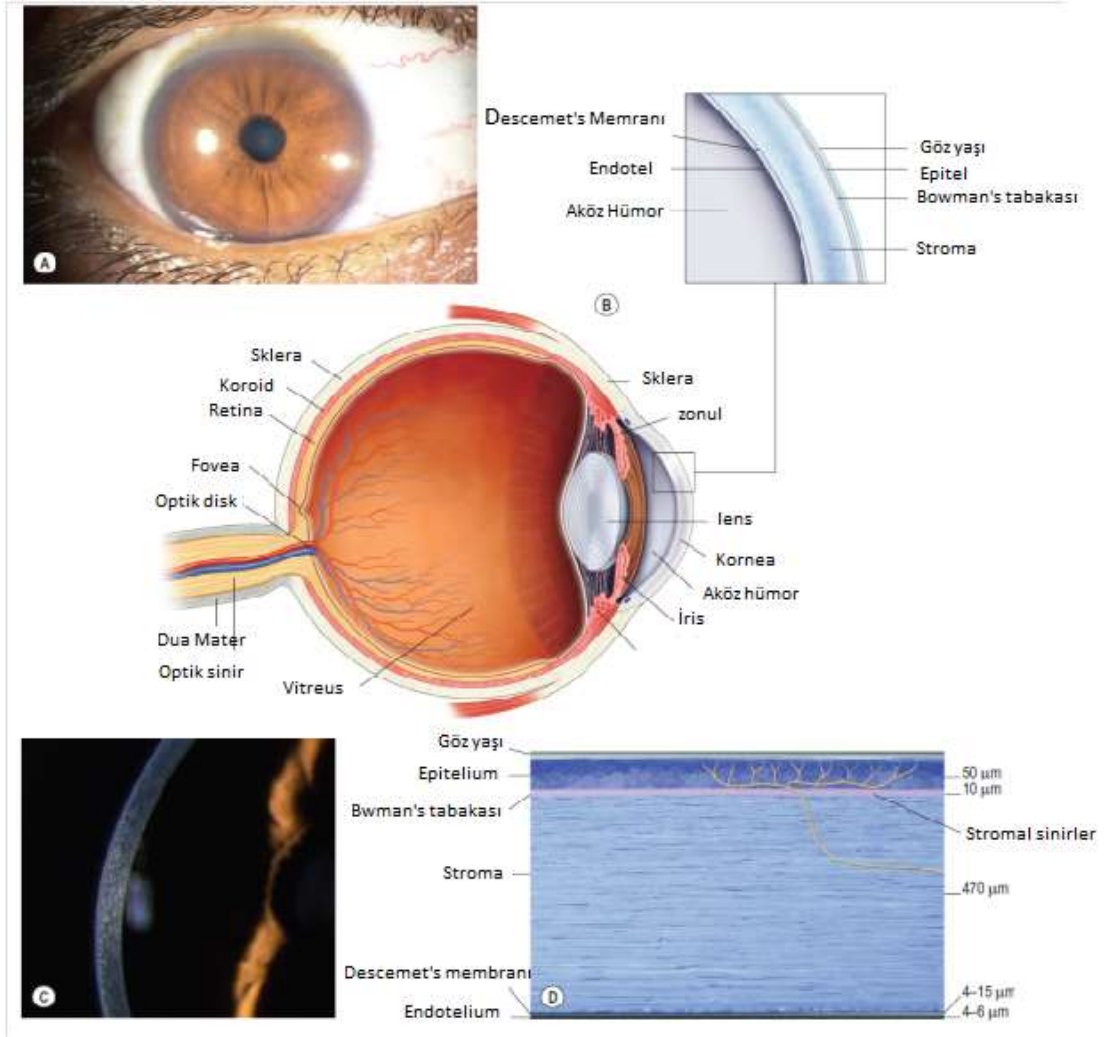
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea Anatomisi

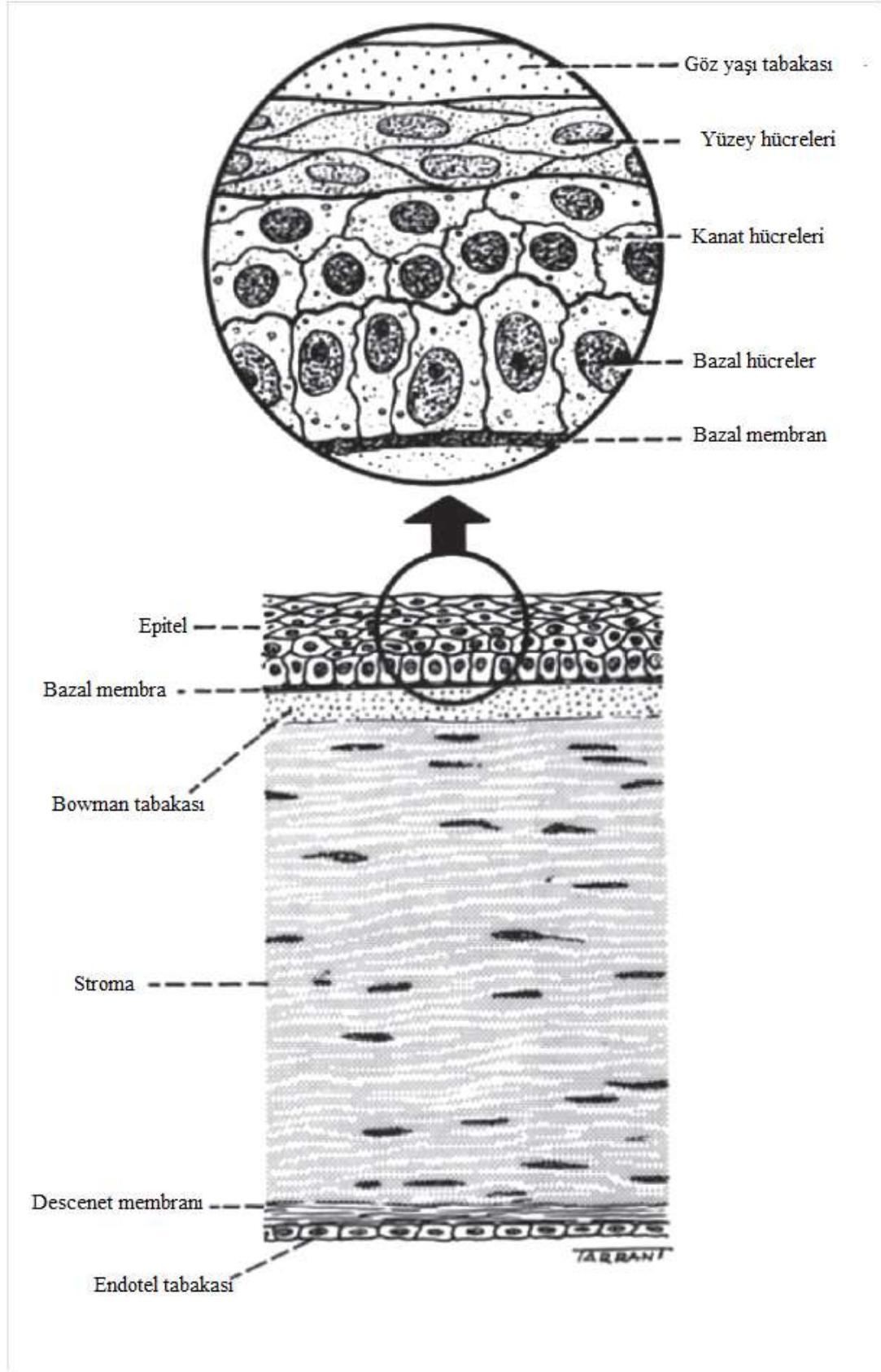
İnsan gözünün en dıştaki lifli tunik kısmı kornea ve skleradır (Şekil 1.1A, B). Her ikisi de globun yapısal bütünlüğünü sağlamak ve gözün iç bileşenlerini fiziksel yaralanmaya karşı korumak için tasarlanmış yumuşak bağ dokularıdır (1-5). Şeffaf, saydam kornea (Şekil 1.1A, C) globun toplam yüzey alanının $1/6$ 'sının önünü kaplarken beyaz, opak sklera (Şekil 1.1A) geri kalan $5/6$ 'yı kaplar. Kornea ve lens gözün primer refraktif yapılarıdır ve her ikisi de bu amaçla iki temel optik özelliğe sahiptir - refraktif güç (ışık kırılması) ve şeffaflık (ışık iletimi). Sağlıklı bir kornea varlığı, temelde gözün penceresi olduğu için, iyi görüş için gereklidir. Kornea, bileşik bir lens kamerasının dış lensine en çok benzemektedir. Buna kıyasla, sklera ağırlıklı olarak daha fazla biyomekanik bir işleve sahiptir ve kamera ve objektif muhafazasına benzemektedir.

Kornea 540 ila 700 μm arasında kalınlıktadır ve epitel, bowman tabakası, stroma, descemet membranı ve endotel gibi beş temel tabakada düzenlenmiştir (Şekil 1D); her biri belirgin olarak farklı yapısal ve işlevsel özelliklere sahiptir (6). Aynı zamanda, epitelial, stromal keratosit ve endotel hücreler olmak üzere üç ana hücre tipinden oluşur. Bunlardan ikisi, epitelyum ve endotel, stroma hücresel bariyer katmanlarını oluşturmaktadır.

Kornea dikey çapı ortalama 10.5 mm, yatay çapı ise ortalama 11.5 mm kadardır. Ön yüzeyi konveks ve asferik yapıdadır. Ortalama ön eğrilik yarıçapı ortalama 7.8 mm, arka eğrilik yarıçapı ise ortalama 6.8 mm kadardır. Korneal kalınlık, santralden perifer gittikçe artış gösterir. Santral korneal kalınlık ortalama 520 μm iken periferde 650 μm 'a kadar yükselebilir.(7) Kendine özgü saat camı benzeri eğimi ve yaklaşık +43 diyoptri (D) kırma gücü ile göz içerisinde ışığı en fazla kıran bölümdür (8,9).



Şekil 1: İnsan kornea ve sklerasının anatomik ve histolojik görünümü (A) İnsan kornea ve sklerasının diffüz aydınlatma ile görüntüsü. (B) Globun ana anatomik bileşenleri, korneal ve skleral komponentler üzerinde ayrıntılı bir vurgu ile. (C) İnsan korneanın yarık lamba aydınlatma ile görüntüsü.(D) Beş ana hücresel ve hücre dışı matris katmanların komine histolojik görünümü.



Şekil 2: Kornea anatomisi

2.1.1. Epitel

Kornea epiteli, korneanın en dış yüzeyinde bulunan, çok katlı non keratinize yapıda, yaklaşık beş ile yedi tabakadan oluşabilen yassı epitel yapısıdır. Kalınlığı ortalama 80 mikrometre olup sırasıyla; Yüzeysel hücre, Poligonal kanatsız hücre, Kolumnar bazal hücre tabakalarından oluşmaktadır (Şekil 2) (10). Santral korneal epitelyum beş ile yedi hücre tabakalarından oluşur ve şüphesiz insan vücudundaki en düzenli yassı epitelyumdur. Hücreler intersellüler boşluk olmayacak şekilde sıkı bir şekilde düzenlenmişlerdir. Bu hücre tabakası apekte gözyaşı matriksi ile ilişkide olacak ve tabanda yüzeyel bir iki tabaka hücresi yassılaştırmış, ve yüzeyde mikropilika olarak anlandırılan katlantılar yapan hücreler içerir. Bu mikropilikaları kaplayan glikokaliks yapı gözyaşının mukoz tabakası ile ilişkidir. Komşu yüzeyel epitelyal hücreler göreceli olarak su geçirgenliğine bariyer oluşturan zonula okludenslerle birbirine bağlıdır. Basal epitelyal hücrelerin sürekli proliferasyonu diğer tabakaların giderek süpersfial hücrelere differansiasyonunu sağlar. Bu hücrelerin matürasyonu ile dış yüzeyleri mikrovilluslarla kaplanır ki bu elektron mikroskopide koyu, ışık mikroskopide parlak görüntü verir. Daha sonra göz yaşı içinde deskuame olur (11,12) Bazal hücreler, epitel bazal membranına hemidesmozomlarla bağlanmış, mitotik aktivitesi olan tek katlı küboidal hücrelerdir. Bazal epitel hücreleri sürekli olarak proliferer, differansiasyon olarak kornea epitelinin yenilenmesini sağlar. Bazal hücreler kendileri tarafından sentezlenmiş ve yaklaşık 30 nm kalınlığındaki bir bazal membranın üzerine oturmuşlardır. Ön kısmı lamina lusida denen gevşek tabakadan oluşurken arka sıkı kısmı lamina densa olarak adlandırılır. Bazal membranın temel yapıtaşlarından tip IV kollajen lamina densa'da, fibronektin ve laminin ise her iki tabakada bulunur. Bazal membran, rejenerasyon yeteneği olmayıp, tamamen yapısal destek sağlar, böylece epitel hücrelerinin stromaya invaziv olmasını engellenir (13). Sağlıklı bir korneal yüzeyin korunması için vazgeçilmez olan epitel kök hücreleri esas olarak üst ve alt limbusta bulunur. Ayrıca, konjunktiva dokusunun korneada büyümesini önleyen, birleşmiş bariyer gibi davranırlar. Limbal kök hücrelerinin fonksiyon bozukluğu veya eksikliği, kronik epitel defekti, konjonktival epitelin korneanın üzerine aşırı büyümesi ve vaskülarizasyona neden olabilir (14).

2.1.2. Bowman Tabakası

Bowman zarı, kollajen liflerinden oluşan stromanın asellüler yüzeysel tabakasıdır. yapısında tip I, VI ve V kollajen filamanları ve proteoglikanlar bulunur. Rejenerasyon yeteneği olmadığı için travmatize olduğunda skar dokusu ile iyileşir (15).

2.1.3. Stroma

Stroma kornea kalınlığının % 90'ını veya korneanın 450 mikronluk kısmını oluşturur. Aralıkları, serpiştirilmiş modifiye fibroblastlar (keratosit) ile birlikte proteoglikan maddesi (kondroitin sülfat ve keratan sülfat) tarafından korunan düzenli sıralanmış kollajen lif tabakalarından düzenlenmiştir. Düzenli aranjman ve kollajen aralığının korunması optik berraklık için kritik öneme sahiptir (14).

Tip I kollajen yüksek oranda olmak üzere ve az miktarda Tip III, IV, V kollajenden oluşur. Ara madde mukoprotein ve glikoproteinlerden oluşur. Fibriller ve hücreler tarafından doldurulmayan tüm boşlukları doldurur. Keratositler korneal lameller arasında uzanır. İnsan korneasının çok az elastisitesi vardır ve normal intraoküler basınçta yalnızca %0,25 gerilir. Keratan sülfat, proteoglikan kornea şeffaflığında önemli rol oynar ve opak kornealarda azaldığı veya yok olduğu görülmüştür. Decorin kollajen fibril formasyonunu düzenler ve transforming growth faktörün(TGF) doğal regülatörüdür. Kollajen fibrillerin lattice şeklinde düzenlenmesi korneanın transparan olmasından kısmen sorumludur. Kornea şeffaftır, çünkü lattice elemanları görülebilen ışık dalga boyundan daha küçüktür. Transparanlık aynı zamanda korneal su içeriğinin %78'de tutulmasına da bağlıdır. Korneal hidrasyon büyük oranda intakt epitel ve endotel bariyerleri ve ısı bağımlı Na,K ATPase gibi enzim sistemleri ile kontrol edilebilen iyon transport sistemine bağlı endotelyal pompa fonksiyonu ile sağlanır (12).

2.1.3. Dua Tabakası

İlk kez 2013 yılında Harminder Singh Dua tarafından tanımlanan dua tabakasının; stroma ve descemet membranı arasında ve yaklaşık 15 µm kalınlığında olduğu tespit edilmiştir (16).

2.1.4. Descemet Membranı

Descemet membran, kornea endotel hücreleri tarafından senezlenen gerçek bir basal membran yapısıdır. Stromanın kollajeninden farklı, kafes şeklinde ince kollajen fibrillerinden oluşan ayrı bir tabakadır. Doğumda üç-dört mikrometre kalınlıktadır ve erişkinde 10-12 mikrometre kalınlığa ulaşır. İntrauterin gelişen anterior çizgili zon ve yaşam boyu endotel tarafından desteklenen posterior çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Endotel için modifiye bir bazal membran olarak görev yapar ve rejeneratif potansiyeline sahiptir (12).

2.1.5. Endotel

Kornea endoteli, yaklaşık dört-altı mikrometre kalınlığında, tek sıra hegzagonal hücrelerden oluşmaktadır. Endotel hücrelerinin arasında desmozom dışında; zonula okludens, makula okludens, makula adherens gibi bağlantı komplekslerine de rastlanır. Endotel hücreleri aşırı sıvıyı stroma dışına pompalayarak yaşam boyunca korneanın transparan kalmasını sağlar. Yetişkin bir bireyde hücre yoğunluğu yaklaşık 2500 hücre / mm²'dir. Hücrelerin sayısı yılda yaklaşık % 0.6 azalır ve komşu hücreler alanı doldurmak için büyür; hücreler yenilenemez. Yaklaşık 500 hücre / mm²'lik bir hücre yoğunluğu ve altında korneal ödem gelişir ve saydamlık azalır (14).

2.2. Embriyoloji, Büyüme, Gelişme ve Yaşlanma

Çağdaş kornea embriyolojisinin ve gelişiminin temelleri, embriyonik civciv çalışmalarının öncülerinden kaynaklanmaktadır. Primatlarda veya diğer memelilerde bu tür detaylı çalışmalar yapılmadığından, türden kaynaklı farklılıklar olabileceği için aşağıdaki bilgilerde bilgi boşlukları vardır. Dört ila beş haftalık gebeliklerde (27-36 gün) lens vezikül oluşumunu takiben, yüzey ektodermal hücreler, lens vezikül invajinasyonunun bıraktığı defekti kaplar ve başta iki hücre katmanından oluşan primitif undiferansiye korneal epitel haline gelir. Avian'a benzer şekilde kornea, primatların ve yüksek memelilerin primitif kornea epiteli hemen primer asellüler korneal stroma veya post-epitelyal tabakayı üretir (17,18). Primatlarda bu, çapraz ve daha sonra rastgele yönlendirilmiş fibriler elementlerin kademeli subepitelyal ilavesi olarak görülür ve bunlar daha sonra kollajen fibriller haline kalınlaşır ve çapları stromal kollajen fibrillerden biraz daha küçüktür(18). Bowman tabaka,

embriyolojik tabakanın belirgin, en yoğun ve en ön kalıntısı olarak düşünülür ve ilk kez 20 haftalık gebelik civarında ışık mikroskopisi ile saptanabilir (18-20). İnsanlara kıyasla, tavşanlar gibi daha düşük memeliler ve kemirgenler, gelişmemiş primer asellüler korneal stroma sahiptir ve kalıntısı olan Bowman tabakası belirgin değildir ve oldukça incedir (21). Gestasyonun sekizinci haftasında göz kapağı füzyonu ve gebeliğin 26. haftasında göz kapağı açılması arasındaki 12 haftalık gebelik haftasında epitel, epitelial bazal membran üreten tabakalaşmış, skuamoz bir epitel haline gelmek üzere dört hücre tabakası kalınlığına ayrılır. Doğumdan yaklaşık altı ay sonrasına kadar dört hücre tabakası kalınlığında kalır ve yetişkin düzeylerde dört-altı hücre tabakası kalınlığına ulaşır. Gebeliğin başlarında, epitelin bazal yüzeyi üzerindeki epitel bazal membran ve sıkı bağlantı kompleksleri yoktur. Rudimanter epitel bazal membran ve sıkı bağlantı kompleksleri yalnızca gebeliğin 17. haftasında saptanabilir hale gelir. Uterusta daha fazla gelişme ile bu yapıların kalınlığı ve sayısı kademeli olarak artar.

Nöral krest türevi mezenkimal hücrelerin ilk dalgası, limbustan korrea epitel hücreleri altında yaklaşık beşinci gebelik haftasında(33 gün) uzanmaya başlar; Bu hücreler ilkel endotel oluştururlar. İlkel endotel, başlangıçta iki hücreli tabakadan oluşur. Sekiz haftalık gebelikle, üç-dört aylık gebeliklerde ışık mikroskopisinde tanınabilen Descemet membranını üretmeye başlayan tek tabaka haline gelir. Stromanın arka üçte ikisinde kornea stroması esasen ortogonal tabakadan oluşur. Üç aylık gebelikle korneal sinirler stromaya girer ve nihayetinde epitelde sinir uçları gelişmesi için Bowman'ın katmanı boyunca nüfuz eder. Çalışmalar aynı zamanda gebeliğin beşinci ayında, tüm korneal endotel hücrelerinin etrafında sıkı kavşaklar oluşturduğunu ve işe yarayan endotel Na^+/K^+ -ATPaz metabolik pompa yerlerinin yoğunluğunun artmasıyla uterus korneasının şeffaf hale geldiğini göstermektedir (gebelik 5-7. ay) yetişkin seviyelere kadar (22,23).

Yedi aylık gebelikle, kornea boyut dışındaki çoğu yapısal özellikte yetişkinlere benzer. Tam doğmuş bebekte doğumda yatay kornea çapı yaklaşık 9.8 mm ve kornea yüzey alanı 102 mm^2 civarındadır. Yenidoğanın kornea yetişkin insan korneasının boyutunun yaklaşık yüzde 75-80'idir, ancak arka segment yetişkin boyutunun yüzde 50'sinden aşağıdır. Doğumda, dört hücreli katmanlı epitelin kesit kalınlığı ortalama 50 μm , Bowman katmanı ortalama 10 μm , orta stroma uygun ortalama 500 μm , Descemet

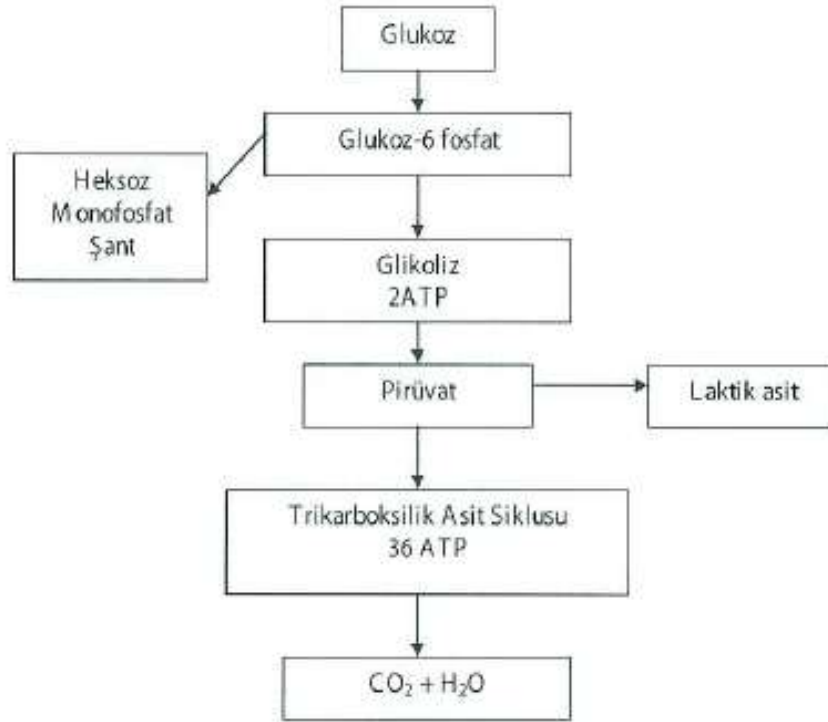
membran ortalaması dört μm ve endotelin ortalamaları altı μm 'dir (toplam orta kornea kalınlığı $\sim 570 \mu\text{m}$) (24-27).

2.3. Kornea Fizyolojisi

Kornea histolojik olarak epitel, bowman tabakası, stroma, descemet zarı ve endotel katlarından oluşur. Kornea ortalama +43 dioptrilik kırma gücü ile gözün en önemli kırıcı ortamıdır. Kornea'da bulunan hücrelerin ana görevi kornea şeffaflığını ve kırıcılık ortamının devamını sağlamaktadır.

2.3.1. Kornea Hücrelerinde Metabolizma

Korneanın epitel hücreleri, keratositler ve endotel hücreleri için ana enerji kaynağı glukozdur. Epitel hücreleri glukozu %90 oranında aköz hümordan alır, kalan %10 ise limbal damarlardan ve gözyaşından sağlanır. Kornea'da glukoz üç metabolik yolla kullanılır. Bunlar; trikarboksilik asit(TCA) silklusu, anaerobik glikoliz ve hekzoz monofosfat(HMF) şantıdır. Epitel hücreleri glukozu glukoz-6-fosfatı çevirir ve bunun %85'i anaerobik glikoliz ile pürivata çevrilir. Pürivatin çoğu laktata çevrilirken, bir kısmı da TCA siklusunda kullanılır ve daha fazla oranda ATP elde edilir. Laktat epitelden geçemez ancak stroma ve endotelden diffüzyonla geçerek aközze ulaşır. Hipoksik ortamda fazla miktarda laktoz oluşur. Bu durum bölgesel asidozai epitel ve stroma ödemeine neden olur. HMF şantı ile de glukozdan NADPH elde edilir ve serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılır. Endotel hücreleri epitel hücrelerinden metabolik olarak beş kat daha aktiftir. Enerji temel olarak anaerobik glikolizden ve TCA siklusundan sağlanır (12).



Şekil 3: Korneada glukoz metabolizması

2.3.2. Oksijen Metabolizması

Epitel oksijenini gözyaşı tabakasından, stroma ve endotel ise aközden sağlar. Gözler açık olduğunda korneadaki oksijen kısmi basıncı 155 mmHg'ya ulaşırken gözler kapalı olduğunda bu oran 55 mmHg'ya düşer. Aközdeki oksijen basıncı ise 30-40 mmHg arasındadır. Oksijen, glukoz TCA siklusunda metabolize olurken kullanılır ve her glukoz molekülü için 36-38 mol ATP elde edilir (12).

2.3.3. Stromal Hidrasyon ve Kornea Şeffaflığı

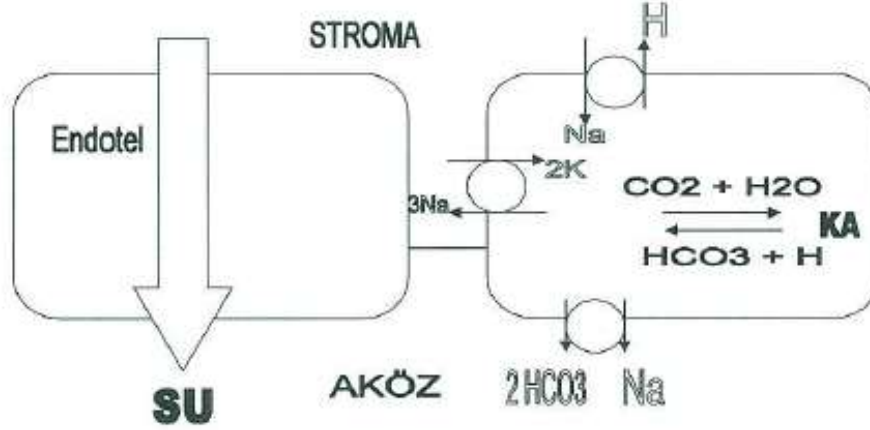
Korneanın ağırlığının % 78'ini su oluşturur. Korneanın şeffaflığını koruyabilmesi için suyun sürekli olarak stromadan epitel veya endotel yoluyla dışarıya pompalanması gerekmektedir. Endotel ve epitel işlev görmeyen bir kornea üç katına kadar genişleyebilir, ve opak bir görünüm kazanır. Korneanın hidrasyonunun kontrol edilmesinde başlıca beş faktör rol oynar. Bunlar sırasıyla; epitel ve endotelin bariyer fonksiyonu, stromanın şişme basıncı, epitel ve endoteldeki iyon transferleri, göziçi basıncı ve kornea yüzeyinden suyun buharlaşmasıdır. Korneanın epitel hücreleri birbirlerine sıkı bağlar (zonula okludens) ile

bağlanmışır. Hücre zarları birbirlerine adeta kaynaşmışır. Epitel hücrelerinin lipid yapısı ve hücreler arası sıkı bağlantılar bu katmandan iyon ve su geçişini engeller. Endotelde zonula okludens yerine makula okludens tarzı sıkı bağlar vardır. Bunlar hücreleri epiteldeki gibi çepeçevre sarmazlar. Normal şartlar altında epitel stroma ve endotelin elektrolit diffüzyonuna relatif dirençleri sırasıyla 2000:1:10'dur. Endotelin sıvılara daha geçirgen olması avasküler olan korneanın glukoz ve aminoasit gibi gerekli maddeleri korneanın iç katlarına taşıyabilmesi için gereklidir. Epitel ve endotel kaldırıldığında kornea stroması su emer ve şişer. Normal kornealarda korneanın şişme basıncı 55 mmHg'dır. Şişme basıncı kornea kalınlığı ile ters orantılıdır. Kornea su tutup kalınlaştıkça, şişme basıncı düşer. Korneanın su tutmasının nedeni negatif elektrik yükü taşıyan glikozaminoglikanların (keratan sülfat, kondriotin, kondroitin sülfat) birbirini itme gücüdür. Stromanın şişmesini engellemek için su emme basıncının, suyu stromadan çıkaran bir güçle dengelenmesi gerekmektedir (12).

Kornea göziçi basıncı 50 mmHg'ya ulaşınca kadar normal kornea kalınlığını korur. Bu yaklaşık stromanın şişme basıncı kadardır. Göziçi basıncı 50 mmHg'nın üzerine çıktığı zaman veya endotel fonksiyonu bozuk olduğunda, endotel pompası yetersiz kalır. Epitel ve stroma ödemi olur. Göziçi basıncı ve stromal şişme basıncı arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir: Su emme basıncı = GİB - stromanın şişme basıncı. Kornea kalınlığı arttıkça korneanın şişme basıncı düşer. Örneğin hafif kornea ödemi varlığında yani endotel pompa fonksiyonu korneayı dehidrate etmeye yetmiyorsa, 50 mmHg'den daha düşük göziçi basıncı stromada ve epitelde ödem yaratır. Çünkü stromal şişme basıncı azalmıştır. Endotel fonksiyon yetmezliğine bağlı kornea kalınlığı 0.60 mm'ye ulaştı ise, 30 mmHg'lık bir göziçi basıncı epitel ödemi yaratmak için yeterli olmaktadır (12).

Endotelde bulunan sıvı pompası endotelin aktif dehidratasyonundan sorumludur. Stromadan aköze doğru aktif iyon pompalanması söz konusudur. Su da pasif olarak iyonları takip eder. İyon transportu 2-3 mOsm'lük osmotik fark yaratır ve bu fark stromanın şişme basıncını dengeler. Endotel hücrelerindeki pompa sisteminin ana amacı sodyumu aköze aktif olarak pompalamak ve buna bağlı olarak su geçişini sağlamaktır. Bu sistemin çalışması için gereken diğer molekül bikarbonattır. Bikarbonatın endotelden aköze aktif olarak pompalanması, endotel ve aköz arasında -500 µvoltluk (aköz negatif) bir

elektrik potansiyel farkı yaratır. Bu durum sodyum iyonunun aköze geçişi için gerekmektedir (12).



Şekil 4: Kornea endotelindeki iyon ve su geçişi

Aközdeki sodyum konsantrasyonu 143 mEq/l'dir ve hepsi ozmotik olarak aktiftir. Kornea stromasındaki sodyum konsantrasyonu 160mEq/l'dir ve bu durumun stromaya doğru bir su hareketine neden olması beklenir. Ancak, sodyumun çoğu stromanın matriksine bağlıdır, ve ancak 134mEq/l sodyum miktarı ozmotik olarak aktiftir. Ayrıca ısının düşmesi, anaerobik glikolizin engellenmesi, korneanın oksijensiz veya glukozsuz kalması da kornea ödemeine neden olur. Korneanın hidrasyonunun sağlanmasında yer alan diğer bir iyon transportu da epiteldedir. Epitelde bulunan klor pompası epitelden gözyaşına su geçini sağlar. Epitelde adrenerjik ve seratonerjik reseptörler mevcuttur. Klor pompası korneadaki sempatik sinirlerden salgılanan katekolaminlere yanıt verir. Gözyaşındaki hipertonsiteyi sağlayan bir başka faktör de gözyaşının buharlaşmasıdır. Gözyaşının buharlaşması, gözyaşında hipertonsiteye ve stromal dehidratasyona yol açar. Bu etken normal kornealar için çok belirgin değildir, çünkü her göz kırpma ile gözyaşı tekrar izotonik olur. Ancak gözyaşı miktarının azaldığı kuru göz durumlarında korneada incelme görülebilir (12).

2.3.4. Korneanın Şeffaflığı

Korneanın şeffaflığı korneanın avasküler olmasına, hidrasyonunun sıkı bir şekilde kontrolüne, özel yapı ve dizilimindeki kollajen liflerine bağlıdır. Kornea dalga boyu 300 ve

2500 nm arasındaki elektromanyetik radyasyonu geçirir. Geçirgenlik 400 nm’de % 80, 500-1200 nm arasında 100 %’dür. Dalgaboyu 1000’nin üzerinde olan ışıklar retinayı uyarmaz ve ısı olarak ortaya çıkarlar. Stroma da bulunan tip 1 kollajenin (stromadaki kollajenin % 50-55’i) düzgün mazgal şeklindeki yerleşimi şeffaflık açısından önemlidir. Her bir fibrilden yansıyan ışık, komşu fibrillerden yansıyan ışık tarafından ‘yıkıcı interferans’ (destructive interference) sayesinde yok edilir. Kornea ödemlendiğinde fibriller arasındaki mesafe artacağından, yıkıcı interferans oluşmamakta ve kornea şeffaflığını kaybetmektedir. Ancak bu görüşü, kolajen fibrillerinin düzgün yerleşmediği Bowman tabakasına uygulamak mümkün değildir. Bu durum fibrillerin büyüklüğünün yerleşim tarzından daha önemli olduğunu göstermektedir. Kornea şeffaflığı konusundaki diğer görüşe göre, korneada ışık saçılımının fazla olmamasının nedeni fibril çaplarının 30 nm’yi geçmemesi ve interfibriller aralığının 55 nm’den fazla olmamasıdır. Değişik refraktif endekse sahip iki bölge arası uzaklık 200 nm’den fazla olursa ışık yansıması olmakta ve kornea daha opak görülmektedir (12).

2.3.5. Epitel Fizyolojisi

Çok katlı epitel, hücreler arası sıkı bağlantıları ve çok düşük iyon geçirgenliği nedeniyle kuvvetli bir bariyer oluşturmaktadır. Epitelin oluşturduğu direnç endotelden 200, stromadan 10 kat fazladır. Kornea saydamlığının korunmasında, sıvının stromadan gözyaşına atılımını sağlayarak endotelin stromal hidrasyonunun düzenlemesine katkıda bulunur (12).

Apikal ve bazal membrandaki iyon geçişleri asimetriktir ve transendotelial 25-35mV düzeylerinde bir elektrik potansiyeli oluşmasına neden olur. Bu potansiyelin oluşmasındaki temel iyonlardan biri sodyum (Na^+) dur. Apikal membrandan pasif olarak hücre içine giren Na^+ bazolateralde bulunan Ouabain duyarlı $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPaz}$ sistemiyle stromaya geçer. Tekrar stromadan epitele giriş ise $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ taşıyıcı sistemiyle elektrokimyasal gradiente uygun olarak gerçekleşir. Ancak bu sistemde Klor (Cl^-) elektrokimyasal gradiente ters olarak girer ve hızla apikal membrana doğru itilerek gözyaşına atılır. Sonuçta Cl^- ile aktive olan osmotik taşıma sisteminin, sıvıyı kornea dışına taşımasıyla dehidratasyon sağlanır. Cl^- epitelin pompa fonksiyonunda en önemli iyonlardanır ve stromadan gözyaşına atılan iyonların %50’sini oluşturur. Epinefrin, teofilin gibi maddeler bu geçişi %75’lere kadar çıkarabilmektedirler, Ouabain ile Na^+

kanalları bloke edildiğinde ise Cl^- sekresyonu da bloke olmaktadır. Potasyum (K^+) Na^+ - K^+ pompası ile hücre dışına atılır. Çok geçirgen olan K^+ kanallarının siklik guanosin monofosfat-karbakol ile stimüle olması parasempatik sistem kontrolünün hakim olduğunu göstermektedir. Potasyum kanalları epitel foriksyonlarının regülasyonunda oldukça önemlidir. Örneğin epitel iyileşmesi sırasında bu kanallarda azalma olur ve bu sekresyonunun azalmasına, hücrenin sıvı içeriğinin artması ile yüzey alanının genişlemesine ve sonuç olarak da defekt alanının küçülmesine katkıda bulunur (12).

2.3.6. Stroma Fizyolojisi

Stromada bulunan negatif yüklü glikozaminoglikanlar (keratan sülfat, kondroitin ve kondroitin sülfat) korneanın şişme basıncını 55 mmHg'da tutarlar. Stromal ödem sırasında ara madde (ground substance) sıvı tutar ve kollajen fibriller birbirinden uzaklaşır, kornea kalınlığı artar. Kornea kalınlığının artması ile şişme basıncı ters orantılıdır ve kalınlık arttıkça şişme basıncı azalarak ödeme karşı olan direnç azalır. Stromada Na^+ - K^+ konsantrasyonu 160mEq/lt dir. Aköz humörde ise 143mEq/lt olduğu düşünülürse stromanın su çekmesi beklenir. Ancak aközdeki Na^+ 'un tamamen serbest olmasına karşın stromada bulunan Na^+ glukozaminoglikanların anyonik bölgelerine bağlı bulunduğundan aktif Na^+ sadece 134mEq/lt dir. Bu fark 163.8 mmHg osmotik basınçla suyun aköze atılmasını sağlar. Endotel aracılığı ile stromadan aköze suyun geçişinin glukoz kanalları ile olduğu düşünülmektedir. Kornea ödemeine bağlı kornea kalınlaşmasını takiben stromal glukozaminoglikanlar azalabilir ve keratan sülfat ile düşük ağırlıklı glukozaminoglikan parçaları ödem sırasında korneaya sızabilir (12).

2.3.7. Endotel Fizyolojisi

Kornea endoteli hücre saydamlığının ve hidrasyonun korunmasında kritik bir rol alır. Endotelin hidrasyon kontrolünde iki temel fonksiyonu bariyer ve iyon pompasıdır. Endotel tabakası kaldırıldığında kornea 127 $\mu\text{m}/\text{sa}$ hızında şişer, sadece metabolik pompa inhibe edildiğinde ise 33 $\mu\text{m}/\text{sa}$ hızında şişme ortaya çıkar. Bu açıkça endotel bariyer fonksiyonunun önemini göstermektedir. Endotel bazolateral membranında Ouabain duyarlı Na^+ - K^+ pompası ile Na^+ hücre dışına çıkarken K^+ hücre içine girmektedir. Diğer yandan ameliorid duyarlı Na^+ -H değiştiricileri ile Na^+ hücre içine girerken H^+ hücre dışına çıkmaktadır. Bu aşamada Na^+ - K^+ -ATPaz pompası hidrasyonun sağlanmasında hayati önem

taşımaktadır. Ouabain ile inhibe olduğu durumlarda korneal ödem oluşur, ısı geri dönüş etkisi ve transendotelyal potansiyel farkı kaybolur. Bariyerin zayıflayarak sızıntısının arttığı kornea guttata benzeri durumlarda normalde 1.5×10^6 olan pompa sayısı artarak dengeleme sağlanmaya çalışılır . Ancak inflamasyona sekonder gelişen permeabilite artışında, pompa sayısının artmıyor olması, temel mekanizmanın araziidonik asit kaskadındaki siklooksijenaz (COX) aracılığıyla olduğunu göstermektedir (12).

Bikarbonat iyonu kornea kalınlığı kontrolünde temel taşlardan bir diğeridir. Hücre içine difüzyonla giren Karbondioksit (CO_2) su ile karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyona girer ve karbonik asit oluşur. Bu ise hemen hidrojen ve bikarbonat iyonlarına parçalanır. Oluşan HCO_3^- muhtemel bir Na-HCO_3 taşıma sistemiyle 2/1 oranında geçer. Böylece aköz humör stromadan negatif olacak şekilde endotel boyunca -500mVluk bir potansiyel oluşur. Sodyum, bikarbonat iyon geçişi ile elde edilen elektro-osmotik etki, suyun dışarı akımına neden olmaktadır. In vitro olarak karbonik anhidraz inhibitörleri bu reaksiyonu durdurarak sıvı akışını azaltmasıyla kornea ödemeine neden olabilir. Ancak sistemik kullanımda klinik olarak bu etkiye rastlanmamıştır (12).

2.4. Kornea Yara İyileşmesi

2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi

Bir epitelyal hücrenin herhangi bir kısmı bozulduğunda, epitelyal tabakada bir defekt bırakarak, tüm hücre genellikle kaybolur. Epitelin yaralanmasının en yaygın biçimi mekaniktir, ancak termal ve kimyasal yaralanmalar da mümkündür. Mekanik bir kuvvet, epitel bariyerinde bir kopukluk oluşturduğunda, aşınmanın kenarındaki hücreler birkaç dakika içinde defektin hücre göçü ve hücre yayılımı kombinasyonu ile örtülmeye başlar. Bu işlemin hemen öncesinde, hücre zarının uzantılarının oluşturulması, bazal hücrelerden hemidozom adezyonlarının kaybolması ve mitokondriyal enerji üretimindeki artış da dahil olmak üzere; anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal nitelikteki hazır hücre değişiklikleri başta gelir (28).

Yapılan hayvan çalışmalarında, epitel yara iyileşmesinin; latent, migrasyon ve proliferasyon olmak üzere üç aşamasının olduğu gösterilmiş (29). Ekstrasellüler matriks proteinleri (ECM) ve fibronektinin, hücre-substrat yapışması ve hücre göçünün

mediasyonunda önemli bir element olduğu düşünülmektedir. Yaralanmadan 24 ila 30 saat sonra, rejenerasyon için epitel hücrelerinde mitoz başlar. Bu yeniden yapılandırıcı mitoz sadece; bazal hücreler, geçici yükseltici hücreler ve limbal kök hücreler katılır (30).

2.4.2. Stromal Yara İyileşmesi

Stromal yara iyileşmesi; onarım, rejenerasyon ve remodeling olmak üzere üç aşamadan oluşur. Stromal yara iyileşmesi ve sitokin, büyüme faktörleri ve kemokinler arasında karmaşık bir etkilenme vardır. İyileşme süreci deri yaralarının iyileşme sürecine benzemekle birlikte buradaki temel fark, iyileşmenin yara komponentinin olmamasıdır (31). Stromal keratositlerin aktivasyonu ve migrasyonu stromal hasarın ilk cevabıdır ve birkaç saat içinde ortaya çıkabilir. Yaralanma bölgesindeki keratositler apoptoz geçirir ve ilk hakareten dört saat sonra zirveye çıkar. Apoptoz, bitişik keratositlerin aktivasyonunu etkileyerek yara iyileştirici cevabı modüle ettiği görülmektedir. Bir iki hafta sonra kontraktıl özellikleri olan miyofibroblastlar yara bölgesine gider ve stromal remodeling başlar. Bu hücreler ekstrasellüler matriks(ECM) remodeling'den sorumlu MMPs salınımını, hücre-matriks etkileşimini, inflamatuvar hücre toplanmasını ve sitokin aktivasyonunu artırır (32).

Bir skar protein olan Tip III kollojen, yara kontraksiyonundan sorumlu ekstrasellüler matriks tarafından üretilmekte ve yeterli seviyede kollajen sentezledikten sonra enflamatuvar hücreler tarafından üretilen kollajenaz enzimleri ile dengede tutulur. Tip III kollajen, stromanın normal yapısında bulunan tip I kollajen ile yer değiştirir. Ayrıca kondrotin sülfat, dermatan sülfat, GAG, konsantrasyonlarında artış olur. MMP, jelatinazlar ve kollejenazlar gibi proteolitik enzimler ile stromal iyileşme kontrollü bir şekilde gerçekleştirilir. Aktive keratositler yine Tip I kollajen üretir; ancak çapı değişken olan yeni kollajen lifleri ışığı iyi geçiremez ve korneanın saydamlığı bozulur. Yeni üretilen proteoglikanlar da değişken karakter ve miktardadır ve daha fazla su tutup doku hidrasyonuna ve değişken kollajen dizilişine neden olabilir, bu da doku opasifikasyonunu artırır. Yara iyileşmesinin geç döneminde stromal keratositler karakter değiştirip kas hücresi karakteri alır, intrasitoplazmik aktin-miyosin kontraktıl elemanları oluşturup, miyofibroblast veya fibromyoblastlara değişir. Bu değişim yara kontraksiyonunun nedenidir. Skar dokusunun hiperselüleritesi kalıcıdır. Bu doku asla normal gerilim

kuvvetini kazanamaz, en fazla normalin %70'ine kadar gerilim kuvveti geri elde edilebilir (12).

2.4.3. Endotelial İyileşme

Tam kat penetran yaralanmaların yanında, endotel hasarı, hücresel tabakanın hızlı fokal distorsiyonuna bağlı oluşabilir. Endotel hücrelerindeki bu hasar, ekstrakapsüler katarakt cerrahisi gibi büyük kesili ameliyatlarda aşırı kornea bükülmesine bağlı ve/veya yüksek sıvı tırbülansının neden olduğu katarakt cerrahisi sonrası ortaya çıkabilir (28).

Endotel cevabı sitolojik olarak çok daha az dramatiktir. İnsan endotel hücrelerinin ancak uygun mitojenik ve bağlanma faktörlerinin varlığında mitozla çoğalabildiği gösterilmiştir. Genellikle, endotel defektleri komşu sağlıklı endotel hücrelerinin inceli fibronektin matriks üzerinde yayılması ile kapatılır. Hasarlı endotel tabakasının kapatılması üç aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada, komşu endotel hücrelerin hızlı göçüyle, hasarlı alındaki defektin kaplanmasıyla başlar. İkinci aşamada bariyer ve pompa alanlarının sayısı ve kalitesi normal seviyeye döner. Kornea sonrasında normal kalınlığa döner ve şeffaflığı düzelir. Üçüncü aşama, birkaç ay boyunca devam edebilen daha düzenli altıgen oluşturmak üzere endotel hücrelerinin yeniden biçimlendirilmesini içerir. Defekt kapandıktan sonra Descemet membranı tekrardan salgılanır (33).

2.5. Korneal Neovaskülarizasyon

Dünya çapında, korneanın neovaskülarizasyonu (KNV), milyonlarca insanı etkileyen, ciddi bir durumdur. Kör edici KNV, çeşitli koşullara ikincil gelişir. Klamidyal enfeksiyonların 146 milyon aktif hastalık vakası ile altı milyon kişiyi (dünya körlüğünün% 15'i) kör ettiği tahmin edilmektedir. Onkoserkoz enfeksiyonlarının dünya çapında 120.000.000 kişinin risk altında olduğu, 270.000 kişiyi kör ettiği tahmin edilmektedir. Herpetik enfeksiyonların ABD'de 500.000 kişiyi etkilediği bildirilmiş. KNV, kontakt lenslerin aşınması, özellikle de yumuşak hidrojel lenslerin uzun süreli kullanımı ile ilişkilidir ve kontakt lens kullanan 120 milyon kişide dokuz milyon(% 1,3) oranında insan KNV'ye sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bildirilen KNV prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'ndeki genel oftalmik göz hizmetinin % 4.14'ü ve yılda 1.4 milyon Amerikalı olarak tahmin edilmektedir (34-37).

Anjiyogenez, mevcut vasküler yapılardan yeni kan damarı büyümesi sürecidir. Kornea anjiyogenezi, çeşitli patolojik koşullarda ortaya çıkar ve istenmeyen sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Perikorneal pleksusun kılcal damarlarından ve venüllerinden filizlenen yeni damarlar, ışığı bloke edebilir, görme keskinliğini tehlikeye atabilir, penetran keratoplasti prognozunu kötüleştirebilir ve inflamasyona, korneal skarlaşmaya ve ödeme neden olabilir (38).

Normal olarak avasküler kornea, anjiyojenik ve anti-anjiyojenik uyarıların arasında bir dengedir. Çeşitli patolojik süreçlerden sonra bu uyarıların anti-anjiyojenik faktörlerden (çözünabilir VEGF Reseptör-2 [sVEGFR-2 veya sflt-1], pigment epitelinden türetilmiş faktör, anjiyostatin ve endostatin gibi) stimulan anjiyojenik faktörlerin (VEGF, bazik fibroblast büyüme faktörü [bFGF] ve MMPs) lehine artmasıyla gerçekleşir (39).

2.5.1. Korneal Neovaskülarizasyon Nedenleri

KNV, nedenleri Tablo I de belirtildiği gibi çeşitli patolojik süreçlerden sonra ortaya çıkabilmektedir (40).

Tablo I: Korneal Neovaskülarizasyon Nedenleri

İnflamatuvar Bozukluklar	Oküler pemfigoid Atopik konjonktivit Rosacea Graft reddi Lyell sendromu Stevens-Johnson sendromu Graft versus host hastalığı
Enfeksiyöz Keratit	Viral Herpes simpleks Herpes zoster Bakteri Pseudomonas Klamidya enfeksiyonları Sifiliz Mantar Candida Fusarium Aspergillus Parazit Onkoserkoz Pterijyum Terrien marjinal dejenerasyonu Aniridi
Dejeneratif-Konjenital Hastalıklar	Kontakt Lens Alkali yanıkları Ülserleşme İatrojenik Kök hücre eksikliği
Travmatik-İatrojenik Bozukluklar ve Diğerleri	

2.5.2. Korneal Neovaskularizasyonun Moleküler Temeli

Anjiyogenez, anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki denge anjiyojenik moleküllerin doğru kaydığında dokuda oluşur. Buna göre, neovaskularizasyon(NV) sadece anjiyojenik faktörlerin up regülasyonu ile değil aynı zamanda anti-anjiyojenik faktörlerin down regülasyonunu da gerektirir. Kornea, tablo II 'de de özetlendiği gibi anjiyojenik ve anti-anjiyojenik molekülleri in vivo çalışmak için bir model olarak kullanılmıştır (40).

Tablo II: Korneada Tespit Edilen Anjiyojenik ve Anti-Anjiyojenik Faktörlerin Özeti

	Korneal mikro-cep testi	Korneal ifade
Anjiyogenik Faktörler		
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	EVET	+
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	EVET	+
Plasenta büyüme faktörü (PGF)	EVET	+
Transforme Edici Büyüme Faktörü- α	EVET	+
Transforme Edici Büyüme Faktörü- β	EVET	+
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)	EVET	HAYIR
Leptin	EVET	?
İntegrinler (VV3)	EVET	+
Trombosit kökenli büyüme faktörleri (PDGF)	EVET	+
Matris metalloproteinazlar (MMP'ler)	?	+
Anjiyojenin	EVET	+
Hepatosit büyüme faktörü-dağılım faktörü (HGF-SF)	?	+
Tümör nekroz faktörü α (TNF- α)	EVET	+
Bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF)	?	+
İnterlökin-8 (IL-8)	?	+
Monosit kemoatraktan protein -1 (MCP-1)	EVET	+
Anti-Anjiyogenik Faktörler		
Endostatin	EVET	+
Anjiyostatin	EVET	+
Prolaktin	EVET	
Matris metalloproteinazlar (MMP'ler)	?	RESEPTÖR
Matris metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP'ler)	?	+
thrombospondin	EVET	+
Arresten	?	α 1 TİP- IV
Canstatin	?	α 2 TİP- IV
Tumstatin	?	α 3 TİP- IV
Pigment epiteline türetilmiş faktör (PEDF)	EVET	+
Tümör nekroz faktörü α	EVET	+
İnterlökin-4 (IL-4)	?	+
İnterlökin-13 (IL-13)	?	+
HAYIR, ifade bildirilmedi. ?, belirlenmedi.		

2.5.2.1. Kornea Neovaskülarizasyonunda Rol Alan Anjiyogenik Moleküller

2.5.2.1.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

VEGF başlangıçta, tümör hücreleri tarafından salgılanan ve vasküler sızıntıyı arttıran vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak tanımlanmıştır (41). 1989'da bağımsız olarak iki grup, sırasıyla VEGF ve vaskülotropin olarak adlandırılan endotel hücreleri için karakteristik bir mitogeni arındırdı (42). Daha sonraki VPF ve VEGF moleküler klonlama ve ekspresyon çalışmaları iki proteinin aynı olduğunu göstermiştir (42,43).

İnsanlarda VEGF ailesi beş üyeden oluşur: VEGF-A, -B, -C, -D ve plasenta büyüme faktörü (PIGF). Alternatif ekleme ve proteolitik işleme, kan ve lenf damarı oluşumu ve homeostazda spesifik fonksiyonlara sahip farklı VEGF varyantlarına yol açar (44). VEGF-A geni, bu ailenin en önemli üyesi ve prototipidir. VEGF-A genininde alternatif bölünmeleri sonrası aminoasit sayısına göre izoformlar oluşmaktadır. VEGF-A'nın VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 olarak isimlendirilmiş altı adet izoformu vardır. VEGF165 dokuların çoğunda bulunan, en sık rastlanan moleküler türüdür (45). VEGF etkisini çoğunlukla endotel hücrelerinden daha az oranda monosit ve makrofajlardan eksprese edilen, tirozin kinaz reseptörlerine(RTK) bağlanarak gösterir. Memeli VEGF'leri VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR, Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4) olmak üzere üç RTK grubuna bağlanır. (46) VEGF-A VEGFR1 ve VEGFR2'ye bağlanır. VEGF'in bilinen etkilerini oluşturan esas reseptör VEGFR2'dir. VEGFR1 az bilinen ve VEGFR2 sinyalini regüle ettiği düşünülen reseptördür. VEGF-B ve PGF VEGFR1'e bağlanmaktadır. VEGF-E VEGFR2'ye bağlanmaktadır. VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR3 e bağlanır ve lenfanjiyogenezden sorumludur (46). Vasküler endotelial growth faktör -R1 ve -R2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salınır ve anjiogenez ile damar geçirgenliğinde görev alır.

kokültürünün tarafından düzenlenir. İlginçtir, bFGF, neovasküler kornealardaki normal kornea ve vasküler bazal membranlarda Bowman ve Descemet zarlarını bağlar. Yeni damarların olgunlaşma derecesine göre normal limbal ve yeni oluşan kornea damarlarında farklı bağlanma yoğunlukları tespit edildi. Bu muhtemelen heparan sülfat proteoglikanlara bağlanma, korneanın anjiogenezinin düzenlenmesinde hücre dışı matrisin (ECM) rolünü vurgular (49,50).

2.5.2.1.3. Matris Metalloproteinazlar

Yara iyileşmesi ile ilişkili ekstraselüler matriks turnovera genellikle granülasyon dokusunda anjiogenez eşlik eder. Korneal yara iyileşmesinin bir özelliği bu vasküler reaksiyonun olmamasıdır. Matris metalloproteinazlar (MMP'ler), ECM yeniden modelleme ve anjiogenezde yer alan çinko bağlayıcı proteolitik enzimlerin bir grubudur. Pro-enzimler olarak üretilirler ve ECM'de MMP'ler ve serin proteazlar dahil olmak üzere çeşitli proteinazlar tarafından aktive edilirler. Daha önce tarif edilen 24 MMP arasında, kolajenaz I ve III (MMP-1 ve -13), jelatinaz A ve B (MMP-2 ve -9), stromelisin (MMP-3), matrilysin (MMP-7) ve membran tipi MMP (MMP-14). Korneal anjiogenez sırasında up regülasyon düzenlenmeleri gösterilmiş olsa da, aynı molekül dönüşümlü olarak bir anti-anjiogenik faktör olarak görev yapabileceğinden, anjiogenezin düzenlenmesindeki rolleri belirsiz görünebilir. Buna göre, MMP-2'nin (jelatinaz A) aktivasyonu, anti-anjiogenik parçaları salabilir, güçlü anjiyostatik faktörlerin üretilmesine izin verebilir veya anjiogenez kolaylaştırabilir. Anjiogenez sırasında MMP'lerin ikili fonksiyonu, ECM'yi bozma, MMP'ye sahip endotel hücrelerinin doku istilasına izin vermeleri ve anjiogenik özelliklere sahip olmayan öncüllerinden anti-anjiogenik fragmanlar üretme veya serbest bırakma yetenekleri ile açıklanabilir (51-53).

2.5.2.1.4. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 α

Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 α (HIF-1 α), hipoksik ortamda salınan, heterodimerik yapıda, eritropoetin (EPO) transkripsiyonunu arttıran bir proteindir. HIF-1 α , hipoksik hücrelerden VEGF salınımını arttırarak neovaskülarizasyonu uyarabilmektedir (54).

2.5.2.1.5. Epidermal Büyüme Faktörü

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü(EGF) 53 amino asitten oluşan, 6045 Da ağırlığında, üçlü disülfid bağı içeren protein yapıda bir moleküldür. EGF, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'ne bağlanarak hücre büyümesi, proliferasyonu ve diferansiyasyonunda görev alır. EGFR'nin uyarılması sonrası anjiogenik faktörlerin salınımı artar (55,56).

2.5.2.1.6. Tümör Nekrozu Faktörü- α

Tümör Nekrozu Faktörü- α (TNF- α), T hücreleri, aktive doğal öldürücü hücreler ve mast hücreleri gibi birçok hücre tarafından salgılanır. TNF- α mononükleer fagositer hücreleri ve diğer hücre tiplerini uyararak, IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin ve kemokinlerin sentezini arttırabilir. TNF- α , adezyon moleküllerinin sentezinin arttırılması, nötrofil aktivasyonu, kemokin sekresyonunun indüksiyonu ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal iletim yolunun aktivasyonu gibi birçok proinflamatuvar süreçlerde görevlidir (57). TNF- α iyileşmekte olan kornea epiteli ve inflamatuvar hücrelerde tesbit edilmiştir. TNF- α ayrıca makrofaj migrasyon inhibe edici faktör (MIF) salınımını regüle ederken VEGF, FGF ve TGF üretimini arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırır (58).

2.5.2.2. Kornea Neovaskülarizasyonunda Rol Alan Anti-Anjiyogenik Moleküller

2.5.2.2.1. Anjiyostatin

Otuzsekiz kDa'lık plazminogen proteolitik bir parçası olan anjiyostatin, güçlü bir anti-anjiyogenik faktördür. İlk olarak Lewis akciğer karsinom hücre dizisinden izole edildi ve vasküler endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği bulundu. Gözde, anjiostatin ve anjiyostatin benzeri fragmanların implante edilmesi, bFGF veya anjiyogenin neden olduğu kornea NV'yi inhibe eder (59,60).

2.5.2.2.2. Endostatin

Başka bir anti-anjiyogenik faktör olan endostatin, XVIII kolajeninin 20 kDa'lık proteolitik bir fragmanıdır. Endotelin, faregiller hemangioendotelioma hücre çizgisinin kıvamlandırılmış ortamından izole edilmiştir ve in vitro FGF-2 ve VEGF ile indüklenen vasküler endotel hücre göçünü ve proliferasyonunu inhibe ettiği ve farelerde tümör

ilerlemesini azalttığı gösterilmiştir. XVIII tipi kollajen esasen vasküler ve epiteliyal bazal membrana lokalize olan fibriler olmayan bir kollajendir. Gözde, XVIII kolajen retina (iç sınırlayıcı membran ve pigment epiteli), lens kapsülüne ve korneaya yerleşmiştir. XVIII kolajen tiplerinin proteazlar (MMPlar, kathepsin L ve elastaz dahil) tarafından bölünmesi, anti-anjiyogenik özellikler gösterebilen endostatin benzeri fragmanlar üretir. Korneaya implante edilen endostatin, bFGF ile indüklenen neovaskülarizasyonun bir inhibisyonu gösterilmiştir. Buna ek olarak, bölme enzimleri ve substrat (kollajen XVIII) bu süreç boyunca bazal membran alanında mevcut olduğu için endostatin'in kornea yara iyileşmesi sırasında ortaya çıkabilir. Restin, arreten, canstatin ve tumstatin dahil olmak üzere kolajenlerden türetilen birkaç anti-anjiyojenik faktör de tarif edilmiştir, ancak kornea anjiyogenezindeki rolleri tam olarak karakterize edilmemiştir (59-64).

2.5.2.2.3. Pigment Epiteli Derived Faktör

Pigment epitelyum derived factor (PEDF), retinoblastoma hücrelerinde ilk kez tanımlanan ve daha sonra retinanın, irisin ve kornea pigmentli epitelinde karakterize edilen güçlü bir anti-anjiyojenik ve nörotrofik faktördür. PEDF, serin proteaz inhibitörü (serpin) ailesine ait olmakla birlikte, bilinen herhangi bir substrata sahip değildir. Son zamanlarda gelin anjiyogenezindeki rolü gösterilmiştir. PEDF'ye karşı antikorları bloke etmek, sıçan korneal stroma implante edildiğinde korneal vaskülarizasyona neden olur. Ek olarak, insan stromal ekstraktlarından PEDF'nin çıkarılması, bu ekstraktların neden olduğu vasküler endotel hücresi migrasyonunun inhibisyonunu baskılamaktadır. Dahası, rekombinant PEDF, bFGF peletlerinin implantasyonu ile indüklenen korneal NV'yi inhibe eder (65,66).

2.5.2.2.4. Trombospondin-1

Trombospondin(Tsp)-1 gözde kornea, iris, sklera ve retinada üretilir. Korneada Tsp-1 esas olarak kornea epitelinin bazal tabakasında üretilmektedir. Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklediği anjiyogenezin olduğu gözlenmiştir (67-69).

2.6. miRNA

Genomun % 80'inden fazlasının öncelikle protein kodlayan genlerin sentezlenmesinin düzenlenmesi ile ilişkili spesifik bir biyolojik fonksiyona sahip

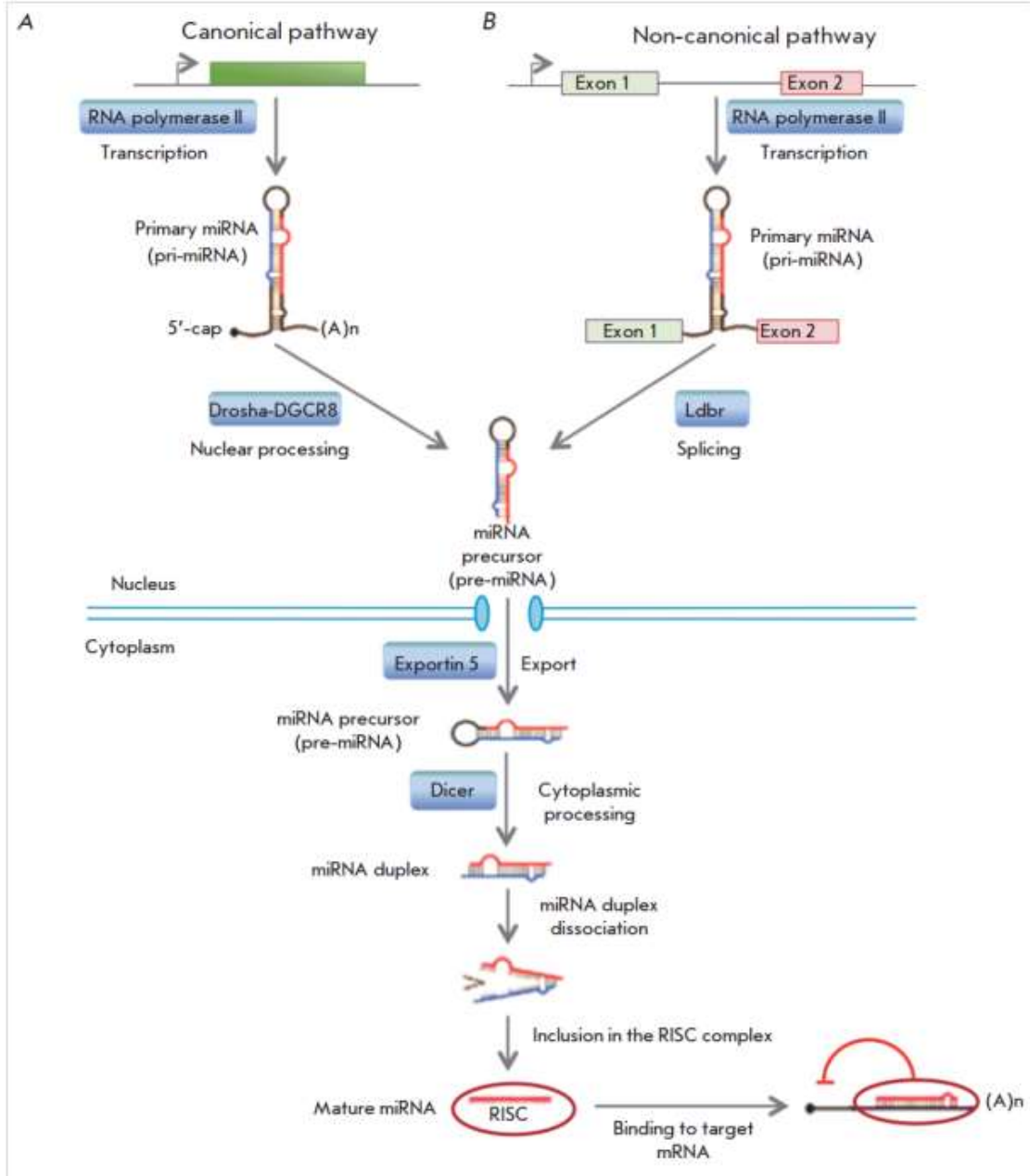
olduğunun bilinmesi, Deoksiribonükleik asit(DNA) Elementleri Ansiklopedisi(ENCODE) projesinin en önemli sonuçlarından biri olmuştur. En yaygın olarak tanımlanan fonksiyonel elemanlar, transkripsiyon sonrası seviyedeki çeşitli biyolojik işlemlerin kilit düzenleyicileri olan miRNA'ları (kısa, 19 ila 24 nükleotit, tek iplikli RNA molekülleri) içeren çeşitli düzenleyici RNA'ları kodlayan genlerdir.(70) İlk miRNA (lin-4) 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* nematodunda tanımlanmıştır, ancak 2000'de *C. elegans*'taki ikinci miRNA'nın(let-7) tanımlanması omurgalılarda miRNA'ların aktif olarak araştırılması için ivme sağlamıştır (71).

Bugüne kadar hayvanlar, bitkiler, protistler ve virüslerde miRNA'lar bulunmuştur (72). miRNA verileri miRBase, microRNA dahil olmak üzere bir dizi veritabanında saklanır. org, MicroRNAdb, miR2Disease, HMDD ve Phe-nomiR. En son miRBaz versiyonuna (v21) göre 223 tür içinde toplam 35.828 olgun miRNA tanımlanmıştır, insanlarda 2,588 olgun miRNA tanımlanmıştır. miRNAlar yüksek oranda korunmuş moleküllerdir. Evrimsel ilişkili miRNA üyeleri oldukça homolog sekanslara ve bazı ortak hedeflere sahip olan 239 farklı aileye birleştirilmiştir (73). Son çalışmalar, miRNA'ların, organizmalardaki çeşitli fizyolojik sistemlerin normal gelişimi için ve hücre homeostazının korunmasında esas olduğunu gösterirken, ekspresyon ve / veya fonksiyonlarındaki bir değişiklik, insanlarda onkolojik, enfeksiyöz nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar dahil birçok patolojik durumun gelişimi ile ilişkilidir (74).

2.6.1. miRNA'ların biyogenez ve etki mekanizması

Çoğu miRNA, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunan genler tarafından kodlanır; miRNA genleri ekzonlar, 5'- ve 3'-çevrilmemiş gen bölgelerinde veya intergenik bölgelerde de lokalize olabilir (75). miRNA genleri, esas olarak RNA polimeraz II ile, birincil bir miRNA (pri-miRNA) olarak, uzun bir transkript olan (birkaç yüz ila on binlerce nükleotitten) (Şekil 6) nükleusta transkribe edilir. Birincil miRNA daha sonra Drosha-DGCR8 mi-ürün işlemcisi kompleksi (kanonik yol) tarafından bir miRNA öncülüne (pre-miRNA) dönüştürülür (75). Pre-miRNA üretiminin başka kanonik olmayan diğer yolları da vardır, bunlardan biri, kısa hairpin intronlarının (mirtronlar) birleştirilmesi sırasında bir pre-miRNA'nın oluşması, ardından Ldbr proteini tarafından pre-miRNA'nın parçalanmasıdır.(76) Daha sonra, miRNA biyogenezi yolları birleşir ve pre-miRNA, bir miRNA dupleksini oluşturmak için Dicer enzimi (RNaz III) tarafından sitoplazmada

işlenir, dubleks zincirlerden biri, RNA kaynaklı susturucu kompleksin(RISC) oluşumunda rol oynar (Şekil 6).



Şekil 6: miRNA biyogenezi. **A.** Kanonik pre-miRNA yolu, Drosha-DGCR8 mikroişlemci kompleksi tarafından pri-miRNA transkriptlerinin parçalanması yoluyla pre-miRNA'lar üretir. **B.** Kanonik olmayan yol. Mirtronlar Ldbr enzimi tarafından eklenir ve ayrılır, daha sonra pre-miRNA hairpins içine katlanırlar. Sonra, yollar birleşir. Yeşil kutu bir miRNA genini belirtir; ekzonlar 1 ve 2, intronik miRNA'yı kodlayan konakçı genin ekzonlarıdır.

Bir küçük altı-sekiz nükleotit miRNA fragmanı, tohum bölgesi, RISC kompleksi içindeki hedef mRNA'ya miRNA bağlanması için kritiktir. Bu miRNA fragmanı ve hedef mRNA arasındaki tamamlayıcılık derecesi, gen ekspresyon regülasyonunun mekanizmasını büyük ölçüde belirler. miRNA ve mRNA arasındaki bağlanma tam tamamlayıcı bir mRNA'ya yarılmaması ve bozulmasına yol açar. miRNA ve bir hedef mRNA arasındaki eksik tamamlayıcılık durumunda, mRNA translasyonu, başlatma veya uzama aşamasında inhibe edilir ve mRNA, bir poliA dizisinin parçalanması nedeniyle destabilize edilir ve işleme gövdelerine aktarılır. miRNA kromatin yeniden düzenlenmesi aracılığıyla transkripsiyonel seviyede hareket edebilir (77). Çoğu durumda, miRNA'lar bir hedef mRNA'nın ekspresyon seviyesini yeniden düzenler; fakat bazı durumlarda miRNA'ların belirli protein komplekslerine bağlanması, doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla hedef genlerin ekspresyonunu artırabilir (78).

Günümüzde miRNA'ların sadece hücrelerin içinde değil, aynı zamanda kan dolaşımına salgılanmak ve diğer hayvan hücrelerini etkilemek için de etkili olduğu bilinmektedir. Kanda, hücre dışı olgun miRNA (% 90-99) öncelikle AGO ailesinin proteinleri ile ilişkilidir (79). Ek olarak, pre-miRNA eksozom ve / veya multiveziküler organlar içinde kan içine salgılanabilir. Eksozomlar, sırayla alıcı hücreler (diğer hücre tipleri dahil) tarafından yakalanabilir ve alıcı hücrelerin sitoplazmasında pre-miRNA olgun bir miRNA'ya işlenir. miRNA, apoptoz sırasında da hücrelerden salınabilir (80).

miRNA'yı, onun öncüsünü ve olgun bir miRNA molekülünü kodlayan geni belirtmek için özel bir isimlendirme vardır, ancak henüz geleneksel hale gelmemiştir. Örneğin miRNA'yı kodlayan gen, iki kısaltma ile gösterilir: mir veya MIR, örneğin mir142 veya MIR142. "Mir" kısaltması, aynı zamanda, bir miRNA ve pre-miRNA'yı belirtmek için kullanılırken, olgun bir miRNA'ya "miR" denir. Belirli bir miR menşeli tür, üç harfli bir önekle yok edilir: "hsa", bir insan (*Homo sapiens*) miR anlamına gelir ve "rno", bir sıçan (*Rattus norvegicus*) miR anlamına gelir; örneğin, hsa-miR-367 veya rno-miR-1'dir. Benzer bir diziye sahip olan yakından ilişkili miRNA'ların grupları, sayılarla (örn., MiR-33) belirlenmiş ailelere birleştirilir. Aynı aile içinde, münferit miRNA'lar ek bir tek harfli ek ile ek açıklmalıdır; ör., hsa-miR-451a ve hsa-miR-451b. Özdeş olgun miRNA'lara yol açan, ancak farklı genom bölgelerinde kodlanan ön-miRNA'lar, ek bir çizgi sayısı son ekiyle gösterilir; örneğin hsa-mir-121-1 ve hsa-mir-121-2 öncüleri aynı olgun miRNA hsa-

miR-121'i verir. Tercihen hedef mRNA'ya (kılavuz telini de denir) bağlanan miRNA dubleks şeridi, örneğin miR-56 olarak adlandırılır ve tamamlayıcı dengesiz (yolcu) zinciri bir yıldız işareti (örn., MiR-56t) ile gösterilir. MiRNA dubleks iplikçiklerinin fonksiyonel aktivitesi ile ilgili verilerin eksik olması durumunda, işlemde kaynaklanan miRNA dubleks dizisine bağlı olan pre-miRNA ucu, mesela, miR-142-5p (pre-miRNA'nın 5'-ucu) ve miR-142-3p (pre-miRNA'nın 3'-sonu).

Sitokin eylemi gibi miRNA fonksiyonu dejenerasyon (artıklık) ve pleiotropi ile karakterizedir; yani bir mRNA'nın ifade seviyesi, birçok miRNA tarafından düzenlenebilir ve bir miRNA, karmaşık bir düzenleyici ağına oluşumuyla sonuçlanan birçok hedef mRNA'ya bağlanır. Dolayısıyla, bir miRNA'nın ekspresyonundaki bir değişiklik, birçok hedef mRNA'nın ekspresyon profilinde değişikliklere yol açabilir. Bununla birlikte, her mRNA için bu etki, diğer miRNA'ların etkisine de bağlı olacaktır. miRNA sisteminin fazlalığı, toplamda, organizmadaki genlerin yaklaşık% 60'ını ifade edebilir (81). miRNA genlerinin ekspresyon düzeyinin, protein kodlayan genlerinki gibi olduğu gibi, transkripsiyon, işleme ve nükleer eport sırasında ve aynı zamanda miRNA bozunma seviyesi tarafından kontrol edilen epigenetik seviyede düzenlenebileceğine dikkat edilmelidir (82). Organizma miRNA'larının spektrumu doğrudan organizma yapısının karmaşıklığına bağlıdır. Ek olarak, miRNA ifadesi, dokuya özgüdür ve ontolojik olarak yönlendirilir. Bu nedenle, anlayışımız büyüdükçe, miRNA ağının gen ekspresyon regülasyon sisteminin temel ve evrimsel olarak eski bir bileşeni olduğunu giderek daha net bir şekilde ortaya koyuyor.

2.7. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu(qRT-PCR)

DNA veya RNA'nın sayısal değerlerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. "Real-Time PCR" ile "Reverse transkriptaz PCR" genelde aynı şekilde "RT-PCR" olarak kısaltılır. Bu nedenle genelde birbirine karıştırılır. "Real-Time PCR" yönteminde her bir DNA veya RNA kopyası oluştuğunda, bunu sistem ekranında eş zamanlı olarak izlemek olası olduğu için gerçek zamanlı terimi kullanılır. Oysa "Reverse transkriptaz PCR" yönteminde ise; hücreden izole edilen RNA molekülleri daha dayanıklı olan DNA (cDNA)'ya dönüştürülürken reverse transkriptaz enzimi kullanıldığı için PCR yöntemine bu isim verilmiştir. Ancak bazen yukarıda bildirilen her iki yöntemde aynı PCR reaksiyonu içinde gerçekleştirilebilir. "Real-Time PCR"da oluşan ampikon miktarı reaksiyon boyunca

oluşan ampikon miktarıyla orantılı olarak artan florokrom maddelerle işaretli problemlerin verdiği sinyalin monitörde izlenmesiyle belirlenir ve amplifikasyonun siklus sayısı belirli miktardaki DNA veya RNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. SYBRGreen I floresan boya DNA'ya bağlanabilme kapasitesine sahiptir ve oldukça iyi çalışan bir yöntemdir. Fakat PCR reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışımaya yapabilir. Bu yanlış pozitif sonuç oluşumuna neden olan primer-dimer oluşumuna neden olabilir. SYBR-Green I yerine güvenilir bir şekilde kullanılan floresan ışımaya yapabilen başka işaretli problemler de vardır. “TaqMan ® probe” veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemleridir. “Real-Time PCR”ın kullanımında birçok avantajlar vardır. “Real-Time PCR”ın tipik kullanım alanları mikrobiyolojik ajanların belirlenmesi, gen ekspresyon analizi, aberran kromozom anomalileri ve son zamanlarda “Real-Time immüno PCR” ile proteomik çalışmalardır. Çok farklı “Real-Time PCR” cihazları vardır. Aralarındaki en belirgin farklılıklar “eksitasyon” ve “emisyon” dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. “Real-Time PCR” teknolojisinin gen ekspresyonunda daha duyarlı, verimli, daha spesifik, hızlı ve daha üretken olması daha fazla tercih edilmesine neden olur.

3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları, Tıbbi Genetik, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalları'nın katkıları ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 64583101/2016/192 karar numaralı izni ile gerçekleştirilmiş olup, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 20/01/2017 tarihli TPF-17049 nolu kararı ile desteklenmiştir.

3.1. Hayvan Deneyi

Ağırlıkları yaklaşık 250-300 gram olan 12 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan çalışmaya alınmıştır. Çalışmada otuz sıçan randomize olarak altışarlı iki gruba ayrıldı ve çalışma süresince denekler Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde ayrı gruplar halinde, ayrı kafesler içerisinde, optimum nem ve sıcaklıkta, uygun şartlarda ve standart koşullar altında (12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, 22 ± 0.5 °C ortam sıcaklığına sahip odalarda) tutulmuştur ve standart besin ve suyla beslenmiştir. Hiçbir grupta çalışmayı tamamlayamayan sıçan olmamıştır. Deneysel KNV oluşturmak için sıçanların korneasında gümüş nitratlı çubuklar ile korneal yanık oluşturulmuştur. İlk kez 1985 yılında Mahoney ve arkadaşlarının tanımladığı gümüş nitratlı aplikatör çubuklar ile korneada neovaskülarizasyon oluşturmak günümüzde deneysel hayvan modellerinde en çok uygulanan yöntemdir.(83) Gümüş nitrat uygulaması, aynı kişi tarafından körlemesine yapılmıştır. Anestezi sonrası gümüş nitrat çubukları birkez ve on saniye süresince korneaya uygulanmıştır ve sonrasında hemen salin ile yıkanmıştır. Çalışma sonunda sıçanların korneaları makro çekim kalitesi yüksek bir cihazla (Leica S8APO) fotoğraflandıktan sonra sıçanlar anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir ve korneaları çıkarılmıştır. Kornealar kantitatif eş zamanlı PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerine bakılmak üzere kuru buz eşliğinde laboratuvara gönderilmiştir.

Ratlar iki gruba ayrılacak olup her bir grup altı rattan oluşacaktır.

1.grup (deney): Sağ göze gümüş nitrat uygulandıktan sonra hiçbir ilaç uygulaması yapılmayacaktır.

2.grup (kontrol): Herhangi bir uygulama yapılmayacak.

3.2. VEGF ve miRNA Ekspresyonu

3.2.1. Dokudan Total RNA ve miRNA İzolasyonu

miRNA izolasyonu için miRNeasy Kiti (Qiagen) kullanıldı. Kit fenol/ guanidinin tiyosiyanat'dan oluşan monofazik bir solüsyon(QIAzol Lysis Reagent) ile hücrelerin parçalanmasına ve total RNA'nın silikamembran kolonla saflaştırılması temeline dayanmaktadır.

- Rat korneal doku örnekleri 700 µl QIAzol Lizis Reaktifi içine yerleştirilerek bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve pipetajla homojenize edildi..
- Mikrosantrifüj tüp içersine alınan homojenatlar 5 dk. oda sıcaklığında (15–25°C) inkübe edildi. Üstlerine 140 µl kloroform eklenerek bir sonraki aşamadaki faz ayrımı için 15 sn. kuvvetlice çalkalandı.
- Homojenatların bulunduğu tüpler tekrar oda sıcaklığında (15–25°C) tezgah üstünde 2-3 dakika inkübe edildi. Daha sonra 4°C'de 15 dakika 12,000 x g hızda santrifüj edilerek örneklerin 3 faza ayrışması sağlandı: üstte RNA içeren renksiz sulu faz (hacmi yaklaşık 350 µl); ortada beyaz ara katman (interfaz), ve altta kırmızı organik faz.
- Sulu faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldıktan sonra hacminin 1,5 katı kadar %100'lük etanol (~525 µl) eklenir ve pipetaj ile tamamen karıştırıldı.
- Örnek karışımı (yaklaşık 700 µl), oluşabilecek herhangi bir çökelti de dahil olacak şekilde kit içeriğindeki 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolonlara aktararak ve oda sıcaklığında (15–25°C) $\geq 8000 \times g$ 15 sn. santrifüjlendi. Elüsyon döküldükten sonra filtre aynı toplama tüpüne yerleştirilerek ve kalan karışım tekrar filtrelerin üzerine eklenip tekrar oda sıcaklığında , $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) 'de 15 sn. santrifüjlendi.
- Elüsyon atılarak aynı toplama tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 700µl Buffer RWT tamponu eklendikten sonra 15 sn $\geq 8000 \times g$ 'de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi.

- Kolon üzerine 500 µl Buffer RPE yıkama tampon eklendikten sonra 15 sn $\geq 8000 \times g$ 'de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilerek yıkandı. Elüsyon atılırken kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildikten sonra yıkama işlemi aynı şekilde 500 µl Buffer RPE yıkama tampon ile aynı hızda 2 dk. santrifüj edilerek tekrarlandı.
- Elüsyon atılırken kolon elüsyonla temas etmeyecek şekilde yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Herhangi bir yıkama tampon veya elüsyon artığını elimine etmek için yeni toplama tüpü içine yerleşik kolon, en yüksek hızda 1 dk. santrifüj edildi.
- Total RNA'nın (mi RNA'ları da içeren) elüsyonu için kolon 1.5 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 40 µl RNase-free su direkt olarak membran üzerine eklenerek 1 dk. $\geq 8000 \times g$ 'de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi. Elüsyon miRNA gibi küçük RNA'ların da yer aldığı total RNA'yı içermektedir. Daha yüksek RNA konsantrasyonu elde etmek istendiğinde ilk elüsyonu kullanılarak tekrar ikinci bir elüsyon gerçekleştirildi.

RNA miktarlarının ölçümü ve kalite kontrolü:

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 / 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçümler her bir örnekten 1,5µl kullanılarak Nanodrop, Thermo Scientific aletinde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilerek, ideal saflıkta kaliteli RNA'nın A260/ A280 ve A260 /A230 absorbans oranının $\geq 1,8$ olması beklendi.

3.2.2. Total RNA'dan cDNA eldesi

- cDNA sentez için RT First Strand Kit(C-03) kiti kullanıldı. Bir PCR tüpüne 8 µl RNA örneği, 2 µl GE (5XgDNA Elimination buffer) konularak PCR cihazına yüklendi.
- 42 °C da 5 dk. inkübe edildi.
- Başka bir PCR tüpünde 4 µl BC3(5XRT Buffer 3), 1 µl P2 (Primer X External Control mix), 2 µl RE3(RT Enzyme Mix 3), 3 µl H2O den oluşan PCR kokteyli hazırlandı.

- PCR kokteyli ısı döngü cihazından çıkan PCR tüpüne eklendi ve PCR tüpü tekrar cihaza yüklendi.
- 42 °C da 15 dak, 95 °C da 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri dilue edildi.

3.2.3. miRNA'dan cDNA Eldesi

cDNA (kalıp, complementary DNA)'lar, Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Hilden, Almanya) kullanılarak sentezlendi. Tablo III'ye göre RT toplam karışımı buz üzerinde hazırlanıp, RNA'nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200ng/µl olacak şekilde ayarlandı. RNA, RT karışımı içeren her bir tüpe eklendi. Kısa bir santrifüj edilip, buz üzerine tekrar bırakıldı. 37 °C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk olan tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı. Sonrasında cDNA miktarları 50 ng/µl olacak şekilde ayarlanıp, qRT-PCR için kullanıma hazır hale getirildi. cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80 °C'de muhafaza edildi.

Tablo III: cDNA için Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript HiSpec tampon	2 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	1 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
RNaz içermeyen su	Değişken (ör: 6-x eklenir.)
Kalıp RNA	Değişken (ör: x hacmi bulunur.)
Toplam Hacim	10 µl

3.2.4. qRT-PCR (Quantative Real Time-PCR, Kantitatif Gerçek Zamanlı-PCR) ile VEGFA Gen Ekspresyon Analizi

- Total RNA dan sentezlenen cDNA örnekleri VEGFA ekspresyonu için qRT PCR çalışmasına alındı.
- VEGFA genine ait primer ve SYBR Green Master Mix ticari olarak karşılandı.
- Bunun için her bir örnek başına SYBR green Master Mix'den 12,5 µl, Primer (10 pmol)'den 1 µl alındı ve 2,2 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma toplam volüm 25 µl'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi. Tüm karışım

hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Her bir örnek için hazırlanan bu PCR karışımları amplifikasyon için Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Qiagen, Germany) cihazının platine yüklenerek amplifikasyon programı başlatıldı. Amplifikasyon programı 95°C’de 5 dakika, 94°C’de 1 dakika, 61°C’de 40 saniye, 72°C’de 1 dakika ve son üç sikusun 40 kere tekrarlanması ve son uzama 2°C’de 2 dakika olarak uygulandı. PCR şartları çalışmaya göre optimize edildi. Reaksiyonda Beta Aktin geni endojen kontrol ve RNase free su negatif kontrol olarak kullanıldı.

- Real-Time PCR reaksiyonu sonunda elde edilen CT değerleri REST 2009 (Relative Expression Software Tool V. 2.0.13) programında standart mod’da referans gen (Beta Aktin) normalizasyonu ile değerlendirildi ve sonuçlar bir excel dosyasında toplandı.
- VEGFA geninin CT değerlerinin data analizleri online <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> web sitesindeki yazılım kullanılarak yapıldı.

3.2.5. qRT-PCR Array

qRT- PCR array yükleme için toplam hacim 2700 µl olacak şekilde ; 102 µl dilue cDNA(İlk aşamada 2 cDNA örneği) , 1350 µl 2X SABİosciences RT qPCR Master miksi , 1248 µl H₂O den oluşan array kokteyli hazırlandı. Array kokteyli her bir kuyucuğa 25 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu *Rat miFindermiRNA PCR Array*’ne yüklendi. Arraylar Real-Time cihazına konuldu. 95 °C 10 dak, 45 döngü olacak şekilde 95 °C 15 sn ve 60°C 1 dak da inkübe edildi.

Human miFinder miRNA PCR Array plate içeriği: Araştırılacak 84 gen, 5 housekeeping gen, 1 genomik DNA kontrol, 3 reverse transkriptaz kontrol 3 pozitif PCR kontrol. (Tablo IV)

Table IV: Rat miFinder miRNA PCR Array Plate İçeriğinde Araştırılan 84 Gen

Array Layout											
mo-miR-142-5p A01	mo-miR-18-5p A02	mo-miR-142-3p A03	mo-miR-21-5p A04	mo-miR-29b-3p A05	mo-miR-7a-5p A06	mo-miR-126a-3p A07	mo-miR-143-3p A08	mo-miR-7b-5p A09	mo-miR-27a-3p A10	mo-miR-7f-5p A11	mo-miR-9a-5p A12
mo-miR-20a-5p B01	mo-miR-24-3p B02	mo-miR-30e-5p B03	mo-miR-181a-5p B04	mo-miR-29a-3p B05	mo-miR-124-3p B06	mo-miR-144-3p B07	mo-miR-30d-5p B08	mo-miR-19b-3p B09	mo-miR-22-3p B10	mo-miR-122-5p B11	mo-miR-150-5p B12
mo-miR-32-5p C01	mo-miR-140-5p C02	mo-miR-141-3p C03	mo-miR-92a-3p C04	mo-miR-322-5p C05	mo-miR-191a-5p C06	mo-miR-17-5p C07	mo-miR-130a-3p C08	mo-miR-20a-5p C09	mo-miR-27b-3p C10	mo-miR-26b-5p C11	mo-miR-146a-5p C12
mo-miR-200c-3p D01	mo-miR-99a-5p D02	mo-miR-19a-3p D03	mo-miR-23a-3p D04	mo-miR-30a-5p D05	mo-miR-71-5p D06	mo-miR-93-5p D07	mo-miR-7c-5p D08	mo-miR-106b-5p D09	mo-miR-101a-3p D10	mo-miR-423-5p D11	mo-miR-15b-5p D12
mo-miR-28-5p E01	mo-miR-18a-5p E02	mo-miR-25-3p E03	mo-miR-23b-3p E04	mo-miR-188-5p E05	mo-miR-29c-3p E06	mo-miR-7a-5p E07	mo-miR-7d-5p E08	mo-miR-30c-5p E09	mo-miR-181b-5p E10	mo-miR-223-3p E11	mo-miR-320-3p E12
mo-miR-374-5p F01	mo-miR-7e-5p F02	mo-miR-151-5p F03	mo-miR-196b-5p F04	mo-miR-140-3p F05	mo-miR-100-5p F06	mo-miR-103-3p F07	mo-miR-98-5p F08	mo-miR-154-5p F09	mo-miR-125a-5p F10	mo-miR-423-3p F11	mo-miR-376c-3p F12
mo-miR-198-5p G01	mo-miR-222-3p G02	mo-miR-128-3p G03	mo-miR-185-5p G04	mo-miR-210-3p G05	mo-miR-375-3p G06	mo-miR-182-5p G07	mo-miR-198a-5p G08	mo-miR-324-5p G09	mo-miR-137-3p G10	mo-miR-378a-3p G11	mo-miR-342-3p G12
cel-miR-39-3p H01	cel-miR-39-3p H02	SNORD61 H03	SNORD68 H04	SNORD72 H05	SNORD96 H06	SNORD96A H07	RNU6-6P H08	miRTC H09	miRTC H10	PPC H11	PPC H12
miRNA Mature Table											

Array Data Analiz

Array data analizleri online <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> web sitesindeki yazılım kullanılarak yapıldı. Under/over ekspresyon verilerine ve literatür taramasına göre qRT PCR yapılacak dokuz gen (mo-miR-21-2, mo-miR-24-1, mo-miR-31-1, mo-miR-126-1, mo-miR-146a-1, mo-miR-150-1, mo-miR-184-1, mo-miR-204-1, mo-miR-206-1) ve 1 housekeeping gen olarak mo-SNORD95 belirlendi.

3.2.6. qRT-PCR miRNA Ekspresyon Analizi

Kalan 10 cDNA örneğinde belirlenen dokuz gen qRT PCR ile valide edildi. qRT-PCR için tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti kullanılarak hazırlandı. Tablo V’de bileşenlerin tepkime hacimlerine göre kullanıldı.

Table V: qRT-PCR için Kullanılan Bileşenlerin Oranları

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Toplam Karışım	6.25 µl
10x miScript Universal Primer	1.25 µl
10x miScript Primer Assay (ilgili miRNA primer)	1.25 µl
RNaz içermeyen su	3,125 µl
Kalıp cDNA (50ng/µl’den alındı. Sonuç 5 ng/µl)	0,63 µl
Toplam hacim	12.5 µl

Buz üzerinde tepkime bileşenleri hazırlandı ve uygun tüplere cDNA'lar ile dağıtılıp, qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazına yüklendi. Tablo VI'de ki qRT-PCR tepkime koşullarına göre tespit işlemleri gerçekleştirildi.

Tablo VI: qRT-PCR Tepkime Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)	
95	15	} 40 döngü
94	15	
55	30	
70	30	

qRT-PCR Data Analiz

Veri analizi RT2 Profiler PCR data analizi ile <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> sitesinde online ve ücretsiz olarak yapıldı. Bu analizde her bir PCR verisi için Excell formatında tablo oluşturuldu. Bu veriler bahsedilen online sisteme yüklendi. Bu veriler ışığında her PCR reaksiyonu için ortalama Ct değerleri ve T test ile bir P değeri hesaplandı. Ct >33 olanlar hesaplama dahil edildi. Fold-change and fold-regulation değerleri 2 ve üzeri olan genler over regüle genler, Fold- change değeri 0.5'in altında ve Fold-regulation değeri -2'nin altında olan genler down regüle genler olarak değerlendirildi. P değeri otomatik olarak Student T Test kullanılarak hesaplanıp $p < 0.05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma sonlanıncaya kadar hayvan kaybı olmamıştır. Yine çalışma sonlanıncaya kadar hiçbir denekte antibiyotikler gibi ek medikasyona ihtiyaç duyulacak infiltrasyon ve inflamasyon görülmemiştir.

4.1. Fotoğraflama Bulguları

Çalışma sonunda makro çekim kalitesi yüksek bir cihazla (Leica S8APO mikroskobu) sıçanların korneaları fotoğraflanmıştır. Örnek resim aşağıdaki gibidir.



Resim 1: Deney grubundan bir sıçanın kornea görüntüsü.

4.2. Ekspresyon Bulguları

4.2.1. VEGFA Ekspresyon Bulguları

Korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol ratların korneal örnekleri karşılaştırıldığında qRT-PCR ile kantitatif olarak ölçülen VEGF düzeylerinde Fold- regulation değeri > 2 olan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p < 0.05$).

4.2.2. miRNA PCR Array Bulguları

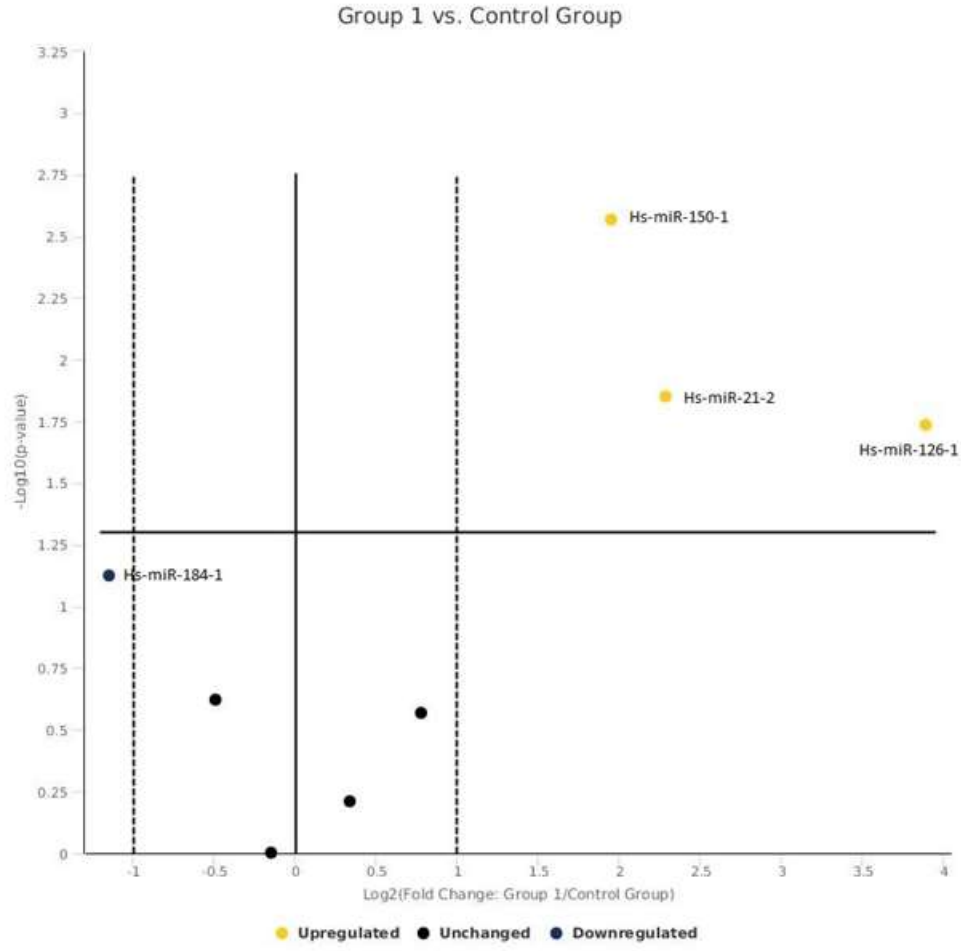
miRNA qRT-PCR Array bulgularında her iki grupta under ve over ekspresyon verilerine göre 9 gende (mo-miR-21-2, mo-miR-24-1, mo-miR-31-1, mo-miR-126-1, mo-miR-146a-1, mo-miR-150-1, mo-miR-184-1, mo-miR-204-1, mo-miR-206-1) Fold-regulation değeri < -2 ve Fold-regulation değeri > 2 olan istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$).

4.2.3. miRNA qRT PCR Bulguları

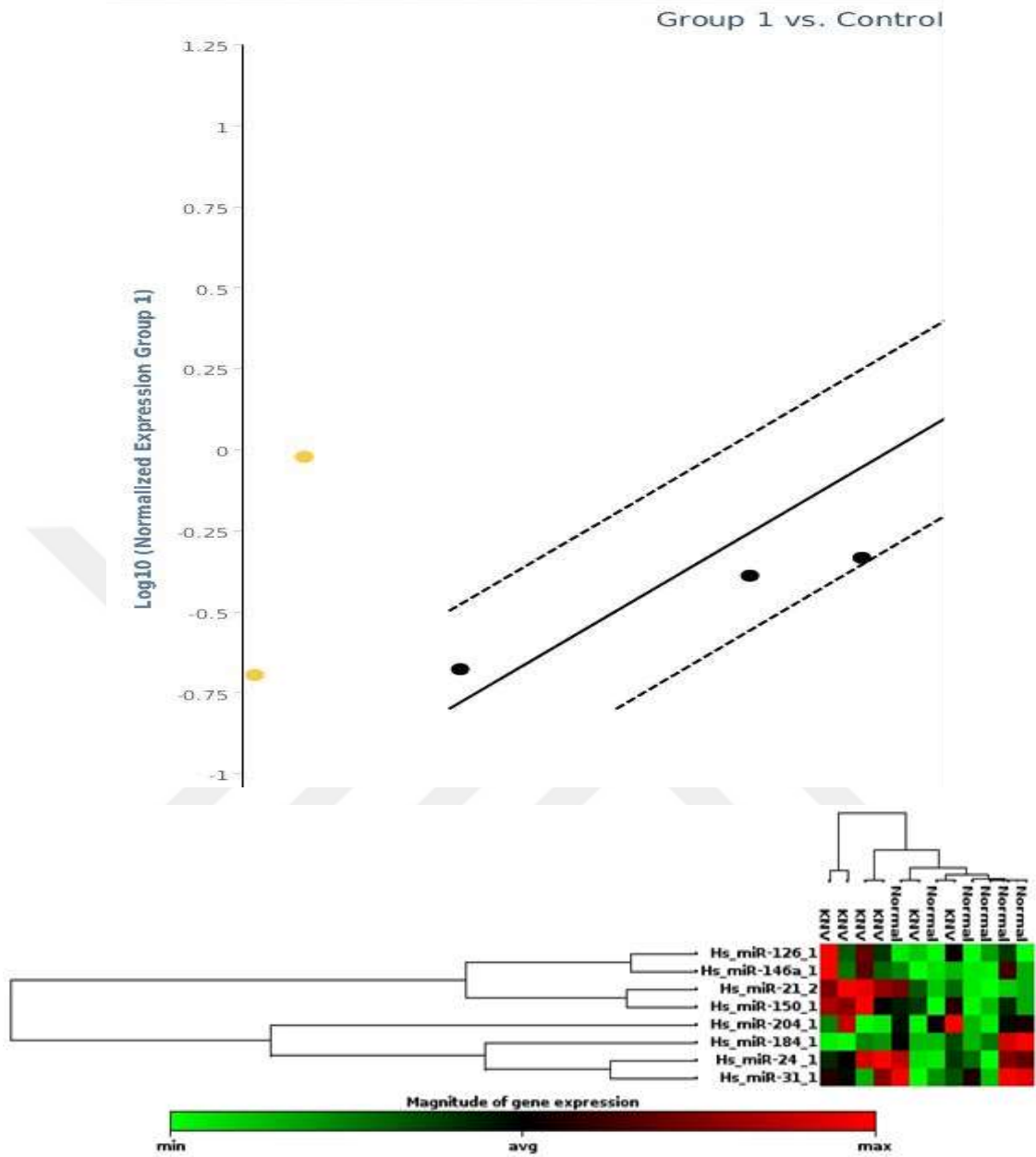
Korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol grubu ratların korneal örnekleri karşılaştırıldığında mo-miR-21_2, mo-miR-126_1 ve mo-miR-150_1 genlerinin istatistiksel düzeyde anlamlı over ekspresyonu (Fold-regulation değeri > 2) saptandı (sırasıyla $p = 0.002443$, $p = 0.030146$, $p = 0.000348$). Aynı karşılaştırmada mo-miR-184_1 geninin Fold-regulation değeri < -2 olan istatistiksel olarak anlamlı under ekspresyonu saptandı ($p = 0.006428$) (Tablo VII ve Şekil 7, 8). Ayrıca iki grubun karşılaştırılmasında mo-miR-31_1 geninin Fold regülasyon değeri -2 'ye yakın olan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde under ekspresyonu saptanmıştır ($p = 0.005082$).

Tablo VII: miRNA qRT-PCR Bulguları

Genler	AVG ΔC_t		$2^{-\Delta C_t}$		<u>p-değeri</u>	<u>Fold Up- veya Down- Regulation</u>
	Grup 1	Kontrol Grup	Grup 1	Kontrol Group	P Değeri	Grup 1/Kontrol
mo- miR-21_2	-2.33	-0.49	5.025876	1.405053	0.002443	3.58
mo-miR-24_1	-1.20	-1.30	2.291102	2.466203	0.682119	-1.08
mo-miR-31_1	1.11	0.18	0.462025	0.884106	0.005082	-1.91
mo-miR-126_1	0.08	3.52	0.946741	0.087008	0.030146	10.88
mo-miR-146a_1	2.26	2.59	0.209406	0.166350	0.354485	1.26
mo-miR-150_1	2.32	3.82	0.200876	0.070836	0.000348	2.84
mo-miR-184_1	-2.42	-4.01	5.343216	16.118270	0.006428	-3.02
mo-miR-204_1	-1.04	-1.63	2.055337	3.096471	0.266870	-1.51



Şekil 7: Under ve Over ekspresyon olan ve ekspresyonu değişmeyen miRNA'lar(Volcano Plot görüntüsü) KNV ve kontrol grubunda her bir ekspresyon yoğunluğu, log10 tabanlı Volcano Plot şekilde görünmektedir.



Şekil 8: Under ve Over ekspresyonu olan ve ekspresyonu değişmeyen miRNA'lar (Clustergram Görüntüsü). Clustergram, birlikte düzenlenmiş olan genleri göstermek için dendrogramlarla bir ısı haritası oluşturur. Renk doygunluğu, gen ifadesindeki değişimin büyüklüğünü yansıtır. Yeşil kareler deney numunelerinde düşük gen ekspresyonunu temsil eder (oranlar <1); siyah kareler eşit olarak ifade edilen genleri temsil eder (1 oranına yakın oranlar); kırmızı kareler, gen ekspresyonunun kontrol seviyelerinden daha yüksektir (oranlar > 1); gri kareler yetersiz veya eksik verileri gösterir. Under ve Over ekspresyonu olan ve ekspresyonu değişmeyen miRNA'lar (Clustergram Görüntüsü).

5. TARTIŞMA

Avasküler, saydam korneada neovaskülarizasyon gelişimi, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen, ciddi bir durumdur. Kör edici KNV, çeşitli koşullara ikincil gelişir (enjeksiyon, travma, kimyasal yanık vb.). KNV tedavisi zor ve problemli olabilir. KNV yönetimi için birçok tıbbi ve cerrahi seçenek mevcuttur ve bunlar ile çeşitli derecelerde başarı sağlanmıştır. KNV'ye terapötik yaklaşım, ya antianjiyogenez ya da anjioregresyon elde etmeyi amaçlamaktadır. Antianjiyogenik tedavi, anjiyojenik olarak uyarılmış bir korneada neoanjiyogenezin durdurulmasını amaçlamaktadır ve KNV'nin seyrinde erken uygulanması durumunda en etkilidir. Tedavi yöntemleri genel olarak medikal veya cerrahi olarak sınıflandırılabilir.

Medikal tedavi seçenekleri arasında steroidler, nonsteroidal antiinflatuvar ajanlar (NSAİİ), anti-VEGF ajanları, siklosporin ve KNV ve greft reddi bağlamında gen terapisi bulunmaktadır.

Topikal steroidlerin temel daynak noktası aktif olarak çoğalan korneal damarların baskılanmasıdır (84,85). Topikal kortikosteroidlerin antianjiyojenik etkisi ilk olarak 1950 yılında bildirilmiştir. Daha sonra, kortizon, deksametazon, hidrokortizon, metilprednizolon, prednizolon, medroksiprogesteron, triamsinolon ve ticabeson propionat dahil olmak üzere kortikosteroidler tarafından KNV'nin inhibisyonunu araştıran birkaç çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, tüm çalışmalarda, KNV'nin steroidlerle baskılanmadığı görülmüştür (86-91).

Klintworth, anjiyogenez baskılanmasında steroid kullanımının gözden geçirilmesinde, steroidlerin kornea hasarından önce veya hemen sonra uygulandıklarında en etkili olduklarına işaret etmektedir. 24 saat sonra yapılan uygulama, bu yanıtın kontrollerden daha az belirgin olmasına rağmen, NV ve lökositler tarafından korneanın bir dereceye kadar infiltrasyonuna neden olmuştur (92).

Literatürde genel kanı olarak, steroidlerin KNV'yi eksik bastırılmasını sağladığı gösterilmiştir. Stereoidler yeni damarlarla iltihabi iltihabı bastırırlar, ancak angioregresif değildirler. Bu nedenle ve bilinen yan etkilerle (glokom, katarakt, süperenfeksiyon ve herpes simpleks nüks), daha etkili tedaviler hala aranmaktadır (93).

NSAİİ'lerin steroidlere göre benzer veya daha fazla etkinliğe sahip olan fakat oküler yan etkilerini paylaşmayan ajanlar, terapötik olarak faydalı olacaktır. NSAİİ'lar prostoglandin(PG) sentezini hedefler. PG'ler (özellikle PG E2) korneal inflamasyonda ve yara iyileşmesinde üretilir ve proanjiyojendir. NSAİİ'ler, araşidonik asidi PG'lere dönüştüren enzim siklo-oksijenazını (COX) spesifik olarak inhibe eder. Normal kan damarları COX-1 enzimini yapısal izoform ifade eder; yeni anjiyojenik endotel hücreleri mitojen ile indüklenebilir bir COX-2 izoformu eksprese eder. İndüklenebilir COX-2 tarafından üretilen eikosanoidler, enflamasyonla ilişkili anjiyojenlerde VEGF ekspresyonunu bir uyarıcı olarak modüle eden çoklu medyatörler arasındadır (94-97).

NSAİİ'lerin klinik etkilerinin çok değişken olduğu kanıtlanmıştır. Ek olarak kullanımında kornea komplikasyonları, özellikle korneal ülserasyon ve melting bildirilmiştir. Bu nedenle KNV'yi baskılamak için birinci basamak ajanlar olarak kullanılmazlar (93,98,99).

Amano ve arkadaşları, sıçan korneasının enflamatuvar NV'sine VEGF'in fonksiyonel endojen korneal anjiyojenik faktör olarak gerekli olduğunu göstermiştir (100). O zamandan beri, VEGF anjiyogenik basamakta kritik bir unsur olarak doğrulanmıştır ve nedensel bir rolü destekleyen veriler kapsamlıdır. VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasenta büyüme faktörü içeren bir protein familyasının bir üyesidir. VEGF-A izoformları, patolojik NV'nin aracılığı olarak dikkat çekmişlerdir (101). VEGF-A'nın, endotel hücrelerin göçünü ve mitozunu arttırdığı, metan monooksijenaz aktivitesini arttırdığı ve kan damarı lümeni ve damar fenestrasyonlarının oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (41,102). VEGF sistemine müdahale etmek için çeşitli antianjiyojenik tedavi stratejileri kullanılmıştır: VEGF nötralize edici antikorlar, VEGF reseptör antikorları, rekombinant çözünebilir VEGF reseptör proteinleri, VEGF antisens nükleotitler, ribozimler ve reseptör tirozin kinaz inhibitörleri. Günümüzde KNV için klinik odak, VEGF'ye yönelik antikorların kullanımındadır (103-107).

Yatoh ve arkadaşları (108), 1998'de ve Cursiefen ve arkadaşları (109), 2004'te, nörotize edici VEGF'in, murin modelinde greft sağkalımını destekleyebileceğini göstermiştir. Bevacizumab(Avastin; Genentech, Roche, İsviçre) kullanan deneysel çalışmaların çoğunluğu NV'yi yansıtan parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (109-113). Etki, yerleşik damarlardan ziyade yeni oluşan damarlar için

en büyük olmuştur. Tüm çalışmalarda, Papathanassiou ve arkadaşları (114) tarafından yapılan çalışma dışında, etki yetersiz bulunmuştur. Hiçbir çalışmada önemli bir yan etki bildirmemiştir. KNV’de bevacizumab ile anti-VEGF tedavisi hakkında bir çok klinik raporlar yayınlanmıştır. Bevacizumab, tüm insan VEGF-A izoformlarının biyolojik aktivitesine bağlanan ve bunu inhibe eden tam uzunluklu bir rekombinant insanlaştırılmış murin monoklonal antivasküler endotelial büyüme faktörü antikorudur (% 93 insan kaynaklı ve % 7 murin kökenli) (115,116).

Ranibizumab (Lucentis; Genentech), fragmente insan monoklonal antikorudur. VEGF’nin tüm izoformlarına bağlanır ve inhibe eder. VEGF’ye afinitesi daha yüksektir. Dursun ve arkadaşları’nın yaptığı çalışmada gümüş nitratla korneal neovaskülarizasyon oluşturulduktan sonra Bevacuzimab ve Ranibizumab’ın ratlara subkonjonktival olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna göre korneal opasitenin ve neovaskülarizasyonun Bevacuzimab ve Ranibizumab enjekte edilen grupta daha az olduğu görülmüştür (117).

Bevasizumab ve ranibizumab kullanılarak yapılan klinik çalışmalar, olgu sunumları ve prospektif girişimsel vaka serileridir. Şu anda, birçok çalışma küçük, kontrolsüz ve az kanıt sağlamaktadır. Sonuç olarak, bevasizumab ve ranibizumab yukarıda bahsedilen yan etkilerden dolayı kortikosteroidlerden daha güvenli olabilir. Bununla birlikte, anti-VEGF ajanlarının yüksek oranda spesifik etkisinden dolayı, çoğu durumda, bir replasman yerine steroidlere yardımcı olarak kullanılması daha uygun olarak görünmekte.

Siklosporin T-hücre lenfositleri için yüksek bir özgüllüğe sahip ve muhtemelen IL-2’nin neden olduğu KNV’nin inhibisyonu yoluyla hücre aracılı immün yanıtı inhibe eder. Siklosporin steroid glokomu, herpetik kornea hastalığı ve topikal steroidlerin devam edilemeyeceği durumlarda rol oynar. Pillai ve arkadaşları, siklosporinin KNV tedavisi bağlamında yararlı olmadığını düşünmektedir (118). Bock ve arkadaşları, yüksek riskli penetran keratoplasti sonrası siklosporin tedavisinin kontrol grubuna göre KNV’yi düzeltmediğini bildirmişler ve siklosporinin insan korneasında hayvan modellerinden farklı sonuçlar verebileceğini düşünmüşlerdir (119). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda topikal siklosporin kullanımı sonrası KNV’de, klinik düzelme olduğu bildirilmiştir (120, 121).

Cerrahi tedavi seçenekleri arasında; amniyon membran transplantı (AMT), lazer, fotodinamik tedavi (FDT), yüzeysel keratektomi ve iğne diatermi yer almakta. AMT, konjonktival ve limbal kök hücre transplantasyonu gibi oküler yüzey rekonstrüksiyonu, KNV tedavisinde kullanılan cerrahi yöntemlerdir. Penetran keratoplastinin kontraendike olduğu limbal yetmezlik zemininde gelişen KNV’de , hücre kültürlerinden elde edilmiş kök hücreler ile yapılan transplantasyonun olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (122, 123).

Argon lazer (AL) klinik ortamlarda tanımlanmış bir prosedür. AL damarları ablate edebilmesi için ışık kaynaklı termal hasar kullanır ve daha çok retina NV tedavisinde kullanılır. Hemoglobinin, çok yüksek bir argon enerjisi emme oranına sahiptir ve bu nedenle hemoglobin dolu korneal damarları pıhtılaştırabilir. Komşu dokuya zarar vermemek amacıyla KNV tedavisi sırasında dikkate alınması gereken önemli parametreler, ışınlama başlangıcı, lazer gücü ve lazer süresinin zamanlamasını içerir (124). Literatürde penetran keratoplasti sonrası gelişen korneal neovaskülarizasyonda medikal tedavinin etkili olmadığı durumlarda AL ile başarı sağlandığını bildiren yayınlar mevcut (125, 126).

Fotodinamik tedavi (FDT), KNV için bir tedavi olarak tarif edilmiştir. FDT için üç bileşen gerektirir: Bir fotosensitivite oluşturan bileşik, ışık ve oksijen. Bireysel olarak, bu bileşenler zararsızdır, ancak kombinasyon halinde sitotoksiktirler. Fotosensitleştirici bileşik, neovasküler ve ilişkili perivasküler enflamatuvar dokular tarafından selektif olarak emilir ve tutulur. Çalışmalar, FDT cevabının mekanizmasının hem apoptoz hem de nekrozu içerebileceğini düşündürmektedir. Genellikle, hidrofilik fotosensitleştirici kan damarlarına zarar verir ve hidrofobik duyarlılaştırıcılar tümör hücrelerine doğrudan saldırır (127-129). Brook ve arkadaşları KNV’de FDT’yi ilk kez vaka bildirimi olarak sunmuşlardır. Penetran keratoplasti sonrası KNV’ye sekonder lipid keratopati gelişen bir olguda görme keskinliği 20/200’den 20/30’a yükselmiş ve altıncı hafta sonrasında keratopatide regresyon olduğu bildirilmiştir (130). Sheppard ve arkadaşları yedi olguluk bir seride FDT sonrası 72 saat içinde KNV’de hızlı bir düzelme olduğunu ve altı ay boyunca progresyon görülmediğini bildirmişlerdir (131).

Yüzeysel keratektomi, Qian ve arkadaşları tarafından Bevacuzimab kullanımı ile kombine edilerek yüzeysel KNV’si olan iki hastada tariflenmiştir. Yazarlar, kornea epitelini ve yüzeysel damarları sağlam bırakarak bir bıçakla kazımışlardır. Bunu, patolojik kan damarına bitişik subkonjonktivale Bevacuzimab enjeksiyonu takip etmiştir. Üç aylık

takipte nüks belirtisi olmamış ancak, etkinin yüzeyel damarlarla sınırlı olduğu belirtilmiştir (132).

miRNA'lar, transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonu düzenleyen kısa (-22 nükleotit) kodlamayan RNA molekülleridir. İfadeleri hücre ve dokulara özgüdür ve zamansal olarak düzenlenir. miRNA'ların gelişimsel ve fizyolojik süreçlere dahil olduğu bilinmektedir ve düzensizlikleri hastalıkların gelişimine yol açar. Profilleri patolojik süreçleri yansıttığından, miRNA'ların, tanılarının belirlenmesinde, başlangıç, prognoz ve hastalık riskinin biyobelirteçleri olarak ve aynı zamanda farklı kanser türlerinin sınıflandırılmasında yararlı olduğu ileri sürülmüştür (133, 134).

Literatüre bakıldığı zaman korneal neovaskülarizasyonda VEGF'in fonksiyonel endojen korneal anjiyojenik faktör olarak gerekli olduğunu göstermiştir (100). VEGF'in anjiyojenik basamakta kritik bir unsur olarak doğrulanmıştır ve nedensel bir rolü destekleyen bir çok veri elde edilmiştir (101). VEGF-A'nın, endotelial hücrelerin göçünü ve mitozunu arttırdığı, metan monooksijenaz aktivitesini arttırdığı ve kan damarı lümeni ve damar fenestrasyonlarının oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (102, 135, 136).

VEGF sistemine müdahale etmek için çeşitli antianjiyojenik tedavi stratejileri kullanılmıştır: Bunlar VEGF nötralize edici antikorlar, VEGF reseptör antikorları, rekombinant çözünebilir VEGF reseptör proteinleri, VEGF antisens nükleotitler, ribozimler ve reseptör tirozin kinaz inhibitörleridir. Günümüzde KNV için klinik odak, VEGF'ye yönelik antikorların kullanımıdır. Son zamanlarda VEGF sistemine müdahale etmek için kullanılan ajanlarla ilgili çalışmaya çok sık rastlanılmaktadır; ancak literatüre bakıldığı zaman, korneal neovaskülarizasyon patogenezi ve tedavisini miRNA düzeyince inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla çalışmamız korneal neovaskülarizasyon patogeneziyi aydınlatmak ve tedavi için daha spesifik bir strateji geliştirmek için dizayn edildi.

Çalışmamızın ilk etabında deney ve kontrol grubu rat kornealarında VEGF-A ekspresyon bulguları incelendi. Korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol ratların korneal örnekleri karşılaştırıldığında Real-Time PCR ile kantitatif olarak ölçülen VEGF düzeylerinde literatürle uyumlu olarak Fold-regulation değeri >2 olan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.05$). Deney grubunda korneal

neovaskularizasyonda kilit rol oynayan VEGF-A ekspresyonundaki artışı gösterdikten sonra, çalışmamızda ikinci aşamaya geçildi. Korneal neovaskülizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol ratların korneal örneklerinde, miRNA qRT-PCR array ve miRNA qRT-PCR bulguları incelendi.

miRNA qRT-PCR Array bulgularında her iki grupta under ve over ekspresyon verilerine göre 9 gende (mo-miR-21-2, mo-miR-24-1, mo-miR-31-1, mo-miR-126-1, mo-miR-146a-1, mo-miR-150-1, mo-miR-184-1, mo-miR-204-1, mo-miR-206-1) Fold-regulation değeri <-2 ve Fold-regulation değeri >2 olan istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

miRNA qRT-PCR bulgularında; korneal neovaskularizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol grubu ratların korneal örnekleri karşılaştırıldığında mo-miR-21_2, mo-miR-126_1 ve mo-miR-150_1 genlerinin istatistiksel düzeyde anlamlı over ekspresyonu (Fold-regulation değeri > 2) saptandı (sırasıyla $p= 0.002443$, $p= 0.030146$, $p= 0.000348$). Aynı karşılaştırmada mo-miR-184_1 geninin Fold-regulation değeri <-2 olan istatistiksel olarak anlamlı under ekspresyonu saptandı ($p= 0.006428$). Ayrıca iki grubun karşılaştırılmasında mo-miR-31_1 geninin Fold regülasyon değeri -2 'ye yakın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde under ekspresyonu saptanmıştır ($p= 0.005082$).

Chun-Yan ve arkadaşları'nın yaptığı, 37 yeni tanı alan multiple myelom(MM) olgusu ve belirsiz önemi olan monoklonal gammopatisi olan altı (MGUS) ve 18 sağlıklı kontrolden alınan kemik iliği örneklerinde, miR-15a ve miR-16'nın MM anjiogenezindeki VEGF'le ilişkili rolü araştırılmıştır. Bir stein-loop kantitatif ters transkripsiyonu kullanarak -PCR, yeni tanı konulan MM hastalarından ve bir MM hücre çizgisinden oluşan bir panelden kemik iliği numunelerindeki miR-15a / 16 ifadelerini analiz edilmiştir. miRNA transfeksiyonu, Western Blot analizi ve Lusiferaz aktivitesi analizi, VEGF'in miR-15a / 16'nın hedef olup olmadığını incelemek için kullanılmıştır. miR-15a / 16'nın tümör oluşumu ve anjiyogenez üzerindeki fonksiyonel rolleri in vitro anjiyogenez modelleri ve in vivo tümör ksenograft modeli ile incelenmiştir. Özellikle ileri evre MM'de miR-15a / 16'nın anormal ekspresyonu saptanmıştır. İnsan MM hücre dizileri ve normal plazma hücrelerinde, miR-15a / 16'nın ifadesi VEGF-A'nın ifadesi ile ters orantılı bulunmuştur. Lusiferaz raportör analizi ile kombine edilen Western blotting, VEGF-A'nın miR-15a /

16'nın doğrudan bir hedefi olduğunu gösterilmiştir. Son olarak, lentivirüs-miR-15a veya lentivirüs-miR-16'nın enfeksiyonu, çıplak farelerde tümör büyümesinin ve anjiyogenezin önemli ölçüde inhibe edilmesine neden olmuştur. Bu çalışma miR-15a / 16'nın, en azından kısmen VEGF-A'yı hedefleyerek anjiyogenezin modülasyonu yoluyla MM'nin tümörigenezinde rol oynayabileceğini düşünülmüştür (137).

Li ve arkadaşları'nın yaptığı deneysel fare çalışmasında; fare korneasında kimyasal yanıkların giderilmesinde miRNA 206'nın (miR-206) rolü araştırılmıştır. Kimyasal kornea hasarını indüklemek için deney farelerinde bir alkali yakma modeli oluşturulmuştur. 72 saat içinde alkali ile işlenmiş kornealarda geçici enflamatuar cevaplar, opaklık ve korneal neovaskülarizasyon (KNV) seviyeleri ile ve miR-206'nın gen ekspresyon profili niceliksel qRT PCR ile değerlendirilmiştir. miR-206 inhibitör oligonükleotidleri, miR-206-I, alkali olarak yanmış kornealara intrastromal yolla enjekte edilmiştir. Down-regüle miR-206'nın olası koruyucu etkileri hem enflamatuar cevapların in vivo ölçümleri hem de kornea epitel kesitlerinin in vitro histokimyasal incelemeleriyle değerlendirilmiştir. miR-206'nın moleküler hedefi olan connexin43 (Cx43) üzerindeki muhtemel bağlanması lusiferaz raportör (LR) ve western blot (WB) analizleri ile değerlendirilmiş, Cx43 alkali yanıklı kornea'da miR-206 modülasyonunun düzenlenmesi üzerindeki etkisini incelemek üzere siRNA ile susturulmuştur. Korneal opaklık ve KNV seviyeleri ve miR-206'nın gen ifadesi, alkali yanıklı fare korneasında 72 saat içinde geçici olarak yükselmiştir. Alkali yanıklı korneaya intrastromal miR-206-I enjeksiyonu miR-206'yı down regülasyona uğratmış ve enflamatuar yanıtları hem in vivo hem de in vitro olarak iyileştirmiştir. LR ve WB analizleri, Cx43'ün fare korneasında doğrudan miR-206 tarafından hedeflendiğini doğrulamıştır, Cx43'ün genetik olarak susturulması, alkali yanıklı korneadaki miR-206 down regülasyonunun koruyucu etkisini tersine çevirmiştir. Cx43 ile ilişkili olan miR-206'nın, alkali yanıklı fare korneasında yeni bir moleküler modülatör olduğu sonucuna varılmıştır. (138) Benzer bir metodla korneal neovaskülarizasyon oluşturan çalışmamızda, miRNA-206'ın incelediğimiz PCR Array profilinde bulunmaması farklı sonuçlar bulmamıza neden olmuştur.

Murata ve arkadaşları'nın yaptıkları çalışmada VEGF için hazırlanmış küçük engelleyici RNA'ların (small interfering RNAs(siRNAs)) insan retinal pigment epitelyal hücre dizisi ARPE-19 hücrelerinde VEGF düzeylerine etkisi (in vitro) ve korneal

neovaskularizasyona etkisi (in vivo) araştırılmıştır. siRNA uygulamasının ARPE-19 hücrelerinde minimal toksisite ile VEGF mRNA sentezini anlamlı bir şekilde azalttığı ve sütür ile indüklenen korneal neovaskularizasyon modelinde korneal neovaskularizasyonun şiddetini azalttığı gösterilmiştir (139).

İnsan gözünde diyabetik hastalarda korneal yara iyileşmesinde miRNA'ların etkisini değerlendirmek için Vincent ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmada bağımsız iki grupta santral korneadan alınan doku örnekleri incelenmiş, seçilmiş miRNA düzeyleri kantitatif qRT-PCR ve in situ hibridizasyon (ISH) ile doğrulanmıştır. Sinyal proteinlerinin ekspresyonu immün boyama ve Western blot ile tespit edilmiş. Mikroarray kullanarak, diyabetik örneklerde 29 miRNA farklı olarak eksprese edilmiştir. Diyabetik kornea içinde ekspresyonda en fazla artış gösteren iki miRNA aday, RT PCR ile teyit edilmiş. H-miR-146a veya h-miR-424 ile yapılan insan kornea epitel hücre transfeksiyonu, yara kapanmasını önemli ölçüde geciktirmiş, ancak kendi antagomirleri kontrollere karşı yara iyileşmesini önemli derecede arttırmıştır. miR-146a ve miR-424'ün korneal yara iyileşmesinde hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile ilgili genleri regüle ettiğini göstermiştir (140).

JiKui ve arkadaşları'nın yaptığı deneysel fare çalışmasında klinik olarak önemli bir hastalık sürecinde miRNA'ların olası rolünü araştırmak için bir model olarak iskemi kaynaklı retinal neovaskularizasyon kullanılmıştır. Mikroarray analizi, büyük oranda artmış üç tane miR-31, -150 ve -184 olmak üzere iskemik retinada azalma gösteren yedi miRNA, miR-106a, -146, -181, -199a, -214, -424 ve -451 gösterilmiştir. Upregülasyon gösteren miRNA'lar için potansiyel hedefler belirlenememiş, ancak biyoinformatik analiz, downregülasyon miRNA'lar için bir lusiferaz raportör testiyle teyit edilen hedef genleri gösterilmiştir. qRT-PCR, normal retinalarda iskemik retinalara göre önemli oranda azalma gösteren miR-31, -150 ve -184'i seviyelerini doğrulamış, Pre-miR-31, -150 veya -184'ün göz içi enjeksiyonun, iskeminin indüklediği retina neovaskularizasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve pre-miR-31 veya -150 enjeksiyonu koroidal neovaskularizasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu veriler, miRNA seviyelerinin değiştirilmesinin iki tür oküler neovaskularizasyona katkıda bulunduğunu ve miRNA'ların enjeksiyon veya ekspresyonunun potansiyel bir terapötik strateji olduğunu önermektedir. Bu çalışmada miRNA-31 ve miRNA-184 bizim çalışmamıza benzer şekilde proanjiojenik genlerin down

regülasyonuna rol aldığı gösterilmiştir; ancak miRNA-150 de, farklı olarak VEGF salınımında down regülatör olarak görev almıştır. miRNA-150 ekspresyonundaki farklılığı hedef doku ve deney metodunun farklı olmasına bağladık (141).

Yanyan ve arkadaşları'nın yaptığı deneysel fare çalışmasında tek bir miRNA'nın iskemik indüklü retinanın neovaskülarizasyonunda (NV) potansiyel transkripsiyonel regülasyon ve sinyal yolunu araştırmak için, retinanın NV modeli oluşturulmasında oksijen kaynaklı retinopati (OIR) kullanılmış ve daha önce anjiogenezle güçlü ilişkisi bulunmuş bir miRNA'nın (miR-126) değişikliği çalışmamıza benzer şekilde qRT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Fareler, kontrol olarak pCMV-MIR / lipozom karışımı kullanılarak plazma pCMV-MIR-126 / lipozom karışımı intravitreal enjeksiyon ile tedavi edilmiştir. VEGF, IGF-2 ve HIF-1 α 'nın ekspresyon seviyeleri ve OIR farelerinden gelen retinadaki toplam ve fosforile p38, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz(ERK) seviyesindeki değişimler Western Blot analizi ile belirlenmiştir. miR126'nın retinal neovaskülarizasyonda önemli bir rolü olduğu, f VEGF, IGF-2 ve HIF-1 α genlerini regüle ettiği gösterilmiştir. İntravitreal enjeksiyon sonrasında oksijen kaynaklı retinopatide neovaskülarizasyonu geriletmediği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde miRNA-126_1, VEGF salınımının up regülasyonu ve korneal neovaskülarizasyonla ilişkili bulunmuştur (142).

Hughes ve arkadaşları'nın yaptığı, ciddi anterior keratokonus ve erken başlangıçlı anterior polar kataraktın otozomal dominant formu olan Kuzey İrlandalı bir ailede hastalığın nedenini araştırılmıştır. Kornea vel ens epitelinde en yaygın bulunan miRNA'lar olan miRNA-184 ve miRNA-205 incelenmiştir. miR-184'ün (MIR184) çekirdek bölgesindeki mutasyonun, mutasyonu içerdiği bilinen bir bağlantı bölgesinin derin sekanslanması ile erken başlangıçlı ön polar katarakt ile kombine ailevi şiddetli keratokonustan sorumlu olduğunu bulunmuştur. Bu bulgular, bir miRNA tarafından düzenlenen bir gen ağının doku özgünlüğünü vurgulamaktadır. miRNA'ların önemli işlevlerinin bilinmesi, hem nadir hem de yaygın hastalıkların tedavisi için duyarlılık genlerinin ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır (143).

Mulik ve arkadaşları'nın, ratlarda oluşturduğu deneysel Herpes simpleks virüsü (HSV) enfeksiyonu sonrası oluşan stromal keratite bağlı korneal neovaskülarizasyonda; miR-132, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerine yanıt olarak

endotelial hücrelerde yüksek ölçüde indüklendiği bulunmuştur. Bu çalışmada, hem VEGF-A hem de IL-17 üretimini içeren bir olay olan HSV ile oküler enfeksiyondan sonra miR-132 ekspresyonunun yukarı doğru düzenlendiğini (10-25 kat) gösterilmiştir. Sonuç olarak, çözünür VEGF reseptörü 1 kullanılarak VEGF-A aktivitesinin bloke edilmesi, HSV enfeksiyonundan sonra önemli ölçüde daha düşük seviyelerde korneal miR-132 ile sonuçlanmıştır. HSV ile enfekte edilmiş farelere anti-miR-132 (antagomir-132) nanoparçacıklarının sağlanmasıyla miR-132'nin in vivo susturulması kornea neovaskülarizasyonunun azalmasına ve stromal keratit lezyonlarının azalmasına yol açmıştır. Manipüle edici miRNA ifadesi, insan körlüğünün önemli bir nedeni olan bir oküler lezyonu kontrol etmek için terapötik bir yaklaşım olarak ümit vaat edeceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada da bizim çalışmamızdaki gibi miRNA ekspresyon düzeylerine qRT-PCR yöntemiyle bakılmış ve daha önce vaskülogenezle güçlü ilişkisi olan miRNA-132 seviyeleri incelenmiştir. Çalışmamızda miRNA-132'nin incelenen PCR-Array profili arasında bulunmaması nedeniyle, miRNA-132 ekspresyonunda farklı sonuçlar bulamadık (144).

Park ve arkadaşları'nın yaptığı deneysel çalışmada, korneada en çok bulunan miR-184'ün anjiyogenezdeki rolü araştırılmıştır. Çalışmada deneysel olarak bir grupta miR-184'ün salınımı sitimüle edilip, kontrol grubuyla anjiyogenezle ilişkili gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bizim deneyimizde uyguladığımız gibi gen ifadeleri qRT-PCR kullanılarak incelenmiştir. miR-184'ün proanjiyogenik faktörleri; Friend of Gata 2 (FOG2), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) -13 ve Fosfatidik Asit Fosfataz 2b'yi (PPAP2B) doğrudan hedef aldığı ve bastırdığı bulunmuş. Hem VEGF hem Akt sinyalini azaltarak, miR-184 korneal anjiyogenezin geniş spektrumlu bir negatif regülatörü olarak işlev gördüğü sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde miR-184'ün VEGF salınımı down regüle ettiği ve anjiyogenezde negatif regülatör olarak işlev gördüğü bulundu (145).

qRT-PCR, DNA veya RNA'nın sayısal değerlerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. RT-PCR, mikrobiyolojik ajanların ve aberan kromozom anomalilerinin belirlenmesi ve gen ekspresyon analizi gibi tipik kullanım alanlarının dışında son zamanlarda proteomik çalışmalarda da kullanıma girmiştir. Bizde çalışmamızda miRNA

gen ekspresyonunu, literatürde en yaygın kullanılan qRT-PCR yöntemiyle değerlendirdik (137,138, 140-151).

Literatüre bakıldığında, miR-184, miR-31, miR-21, miR-126 ve miR-150'nin kornea, lens ve retinada yaygın olarak bulunduğu görülmekte. miR-184'ün katarakt oluşumu ve kornea anormallikleriyle ilişkili olduğu, lens ve kornea epitelinde en yaygın bulunan miRNA'ların başında olduğu görülmektedir (141, 143, 146). Güncel bir yayında miR-184'ün proanjiogenetik salınan faktörleri (VEGF, PDGF, MMPs) bizim çalışmamıza benzer olarak negatif olarak regüle ettiği gösterilmektedir (145). miR-31'in korneada yaygın olarak bulunduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (147). Pre-miR-31'in intravitreal uygulamasının retina ve koroidal iskemide anlamlı olarak azalmaya yol açtığı ve VEGF regülasyonundaki etkisi gösterilmiştir (141). Bizde çalışmamızda miRNA-31'i Fold-regulation değeri -2'ye yakın istatistiksel olarak anlamlı bulduk, bu da miRNA'nın muhtemel bir anti-anjiogenetik etkisiyle uyumlu görünmektedir. Sebastiani ve arkadaşları'nın yaptığı bir çalışmada miR-31 ekspresyonun tip iki diyabet hastalarında mikrovasküler komplikasyonlarla ilişkili olduğu ve klinik olarak önemli bir belirteç olduğu gösterilmiştir (148). miR-126'nın VEGF regülasyonu ile olan pozitif ilişkisi (149), proliferatif diyabetik retinopatideki up regülasyonu (142) önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Yine miR-126'nın deneysel bir modelde, VEGF-A, Kinaz insert domain reseptörü (KDR) ve Sprouty ile ilişkili EVH1 domeni içeren protein 1 (SPRED-1)'in salgılanmasını sitimüle ettiği gösterilmiştir (150). Bu bulgular bizim çalışmamızda da olduğu gibi miRNA-126'nın proanjigenetik salınan faktörleri up regüle ettiğini göstermektedir. Ayrı bir çalışmada miR-21 ve miR-150'nin yaşa bağlı maküla dejenerasansında(YBMD) anjiogeneze oluşumunda VEGF'i stimüle ettiği gösterilmiştir (151). Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak JiKui ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmada, miRNA-150'nin VEGF salınımında down regülatör olarak görev aldığı gösterilmiştir. Bu farklı sonucun elde edilmesinin hedef doku ve deney metodunun farklı olmasına bağladık (141).

İlk miRNA'ların keşfinden bir kaç yıl geçmiş olmasına rağmen, literatürde miRNA'larla ilgili oldukça geniş bir bilgi birikimi vardır. Ancak gözdeki miRNA süreçleriyle ilgili veriler oldukça azdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda neovaskülarizasyonda miRNA'ların önemli bir rolü olduğu, neovaskülarizasyonla ilgili bir

takım genleri de regüle ettiği gösterilmiştir. Ancak miRNA'ların korneal neovaskularizasyondaki rolleri ve özellikle VEGF gibi neovaskularizasyondan sorumlu diğer genlerle etkileşimi üzerine literatürdeki çalışmalar yetersizdir. Yapılan çeşitli moleküler düzeydeki çalışmalar, miRNA'ların göz hastalıklarındaki patolojik süreçlerde oldukça spesifik düzenleyici etkisinin olduğunu ve bu süreçlere etki eden agonist ve antagonist miRNA'ların verilmesinin gelecekteki farklı tedavi yöntemleri için umut vaat ettiğini göstermekte. Her ne kadar literatürde büyük bir bilgi birikimi olsa da göz hastalıklarında aydınlatılması gereken birçok nokta bulunmaktadır. Biz de çalışmamızda bu boşlukların doldurulmasında katkı sağlamayı amaçladık. Sonuç olarak normal hücrel ve patolojik süreçlere katılan miRNA'ların aydınlatılması, hem tanı hem de tedavi aşamasında önemli fırsatlar sunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda rat kornealarında deneysel korneal neovaskülarizasyon oluşturulduktan sonra VEGF-A düzeyindeki değişiklikler ve VEGF-A ile ilişkili miRNA'ların ekspresyon düzeylerini inceledik. Korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol ratların korneal örnekleri karşılaştırıldığında, qRT-PCR ile kantitatif olarak ölçülen VEGF düzeylerinde Fold-regulation değeri >2 olan istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik ($p<0.05$). Deney grubunda korneal neovaskülarizasyonda kilit rol oynayan VEGF-A ekspresyonundaki artışı gösterdikten sonra, korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol ratların korneal örneklerinde, miRNA qRT-PCR array ve miRNA qRT-PCR bulgularını inceledik.

miRNA PCR Array bulgularında her iki grupta under ve over ekspresyon verilerine göre dokuz gende (mo-miR-21-2, mo-miR-24-1, mo-miR-31-1, mo-miR-126-1, mo-miR-146a-1, mo-miR-150-1, mo-miR-184-1, mo-miR-204-1, mo-miR-206-1) Fold-regulation değeri <-2 ve Fold-regulation değeri >2 olan istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

miRNA qRT-PCR bulgularında; korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol grubu ratların korneal örnekleri karşılaştırıldığında mo-miR-21_2, mo-miR-126_1 ve mo-miR-150_1 genlerinin istatistiksel düzeyde anlamlı over ekspresyonu(Fold-regulation değeri >2) saptandı (sırasıyla $p= 0.002443$, $p= 0.030146$, $p= 0.000348$). Aynı karşılaştırmada mo-miR-184_1 geninin Fold-regulation değeri <-2 olarak istatistiksel anlamlı under ekspresyonu saptandı ($p= 0.006428$). Ayrıca iki grubun karşılaştırılmasında mo-miR-31_1 geninin Fold regülasyon değeri -2 'ye yakın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde under ekspresyonu saptanmıştır ($p= 0.005082$).

Yapılan çeşitli moleküler düzeydeki çalışmalar, miRNA'ların göz hastalıklarındaki patolojik süreçlerde oldukça spesifik düzenleyici etkisinin olduğunu ve bu süreçlere etki eden agonist ve antagonist miRNA'ların verilmesinin gelecekteki farklı tedavi yöntemleri için umut vaat ettiğini göstermektedir. Her ne kadar literatürde büyük bir bilgi birikimi olsa da göz hastalıklarında aydınlatılması gereken birçok nokta bulunmaktadır. Biz de çalışmamızda bu boşlukların doldurulmasında katkı sağlamayı

amaçladık. Sonuç olarak normal hücresel ve patolojik süreçlere katılan miRNA'ların aydınlatılması, hem tanı hem de tedavi aşamasında önemli fırsatlar sunmakta.



ÖZET

Korneal Neovaskülarizasyonda Mikro-RNA'ların Rolü ve VEGF ile İlişkisi

Amaç: Bu çalışmadaki amacımız, korneal neovaskülarizasyonda(KNV) Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü(VEGF) ilişkili miRNA düzeyindeki değişikliklerin araştırılarak; korneal neovaskülarizasyon oluşum sürecinin aydınlatılması, sonraki yapılacak deneysel, klinik çalışmalara ve ilaç tedavilerine zemin hazırlanmasının sağlanmasıdır.

Yöntem: On iki adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan randomize olarak altışarlı iki gruba ayrılmış ve her bir sıçanın iki korneası da kullanılmıştır. Bütün gruplarda KNV gümüş nitrat çubuklar ile oluşturulmuştur. Çalışma sonunda sıçanlar eterli anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek korneaları çıkarılmıştır. Kornealarda VEGF ve miRNA ekspresyon düzeylerine bakmak için qRT-PCR Array ve qRT-PCR metodları kullanılmıştır. Data analiz web bazlı olarak PCR Array data software kullanılarak yapılmıştır (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>).

Bulgular: Korneal neovaskülarizasyon oluşturulan ratların korneaları ile kontrol ratlarının korneal örnekleri karşılaştırıldığında, VEGF düzeylerinde; Fold-regulation değeri >2 olarak istatistiksel anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.05$). miRNA PCR Array bulgularında her iki grupta under ve over ekspresyon verilerine göre; 9 gende Fold-regulation değeri <-2 ve Fold-regulation değeri >2 olarak istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Korneal neovaskülarizasyon oluşturulan rat korneaları ile kontrol grubu ratlarının korneal örnekleri karşılaştırıldığında mo-miR-21_2, mo-miR-126_1 ve mo-miR-150_1 genlerinin istatistiksel düzeyde anlamlı over ekspresyonu (Fold-regulation değeri >2) saptandı (sırasıyla $p= 0.002443$, $p= 0.030146$, $p= 0.000348$). Aynı karşılaştırmada mo-miR-184_1 geninin Fold-regulation değeri <-2 olarak istatistiksel anlamlı under ekspresyonu saptandı ($p= 0.006428$). Ayrıca iki grubun karşılaştırılmasında mo-miR-31_1 geninin Fold regülasyon değeri -2 'ye yakın olarak istatistiksel anlamlı düzeyde under ekspresyonu saptanmıştır ($p= 0.005082$).

Sonuç: Çalışma sonunda, deneysel yanık oluşturulan korneal neovaskülarizasyon grubunda VEGF ekspresyonun istatistiksel olarak arttığı; mo-miR-21_2, mo-miR-126_1 ve

mo-miR-150_1 genlerinin VEGF ekspresyonunu up regüle ettiği ve mo-miR-184_1 geninin VEGF ekspresyonunu down regüle ettiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Korneal neovaskülarizasyon, vasküler endotelyal büyüme faktörü, micro-RNA, miRNA, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu. İletişim adresi: mimbayyasar@gmail.com



SUMMARY

The Role of MicroRNAs in Corneal Neovascularization and Its Relation to VEGF

Objective: Our aim in this study was to investigate changes in vascular endothelial growth factor(VEGF) associated miRNA levels during corneal neovascularization(CNV); to elucidate the process of corneal neovascularization, to prepare the ground for future experimental, clinical studies and drug treatments.

Method: Twelve Wistar-Albino male rats were randomly divided into two consecutive groups and two corneas of each rat were used. In all groups, CNV was formed with silver nitrate bars. At the end of the study, the rats were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia with ether to remove the cornea. qRT-PCR Array and qRT-PCR methods were used to look at VEGF and miRNA expression levels in corneas. Data analysis was done using web array based on PCR Array data software (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>).

Findings: When corneal specimens of control rats were compared between corneal neovascularized rats and VEGF levels quantitatively measured by qRT-PCR, statistically significant difference was observed between Fold-regulation value >2 ($p < 0.05$). In the result of miRNA PCR Array under and over expression in both groups; statistically significant difference was found between nine genes Fold-regulation values <-2 and Fold-Regulation >2 ($p < 0.05$). When corneals items of corneal neovascularized rats and control rats were compared, statistically significant over expression(Fold-regulation value >2) of mo-miR-21_2, mo-miR-126_1 and mo-miR-150_1 genes were detected (Respectively $p = 0.002443$, $p = 0.030146$, $p = 0.000348$). The identical comparison, a statistically significant under expression of Fold-regulation value <-2 mo-miR-184_1 gene was detected ($p = 0.006428$). In addition, in contrast to two groups, the under expression of the mo-miR-31_1 ($p = 0.005082$) gene was found to be statistically significant close to Fold regulation value -2.

Conclusion: At the end of the study, VEGF expression increased statistically in corneal neovascularization group in experimental burns; It has been observed that the mo-

miR-21_2, mo-miR-126_1 and mo-miR-150_1 genes up regulate VEGF expression and the mo-miR-184_1 gene down regulates VEGF expression.

Key words: Corneal neovascularization, vascular endothelial growth factor, microRNA, miRNA, co-polymerase chain reaction.

Contact address: mimbayyasar@gmail.com



KAYNAKLAR

1. Dawson DG, Watsky MA, Geroski DH, Edelhauser HF. Duane's Foundation of clinical ophthalmology on CD-ROM Vol. 2c. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:1-76.
2. Gipson I, Joyce N, Zieske J. The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva, and adnexa. In: Foster CS AD, Dohlman CH, eds. Smolin and Thoft's the cornea scientific foundations and clinical practice, 4th edn. Philadelphia: Lippin.
3. Klyce S. Corneal Physiology. In: Foster CS AD, Dohlman CH, eds. Smolin and Thoft's the cornea scientific foundations and clinical practice, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
4. Nishida T. Cornea. In: Krachmer JH, Holland EJ, eds. Cornea. Fundamental, diagnosis, and management, 2nd edn. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.
5. Rada J, Johnson J. Sclera. In: Krachmer JH, Holland EJ, eds. Cornea. Fundamental, diagnosis, and management, 2nd edn. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.
6. Hogan M, Alvarado J, Wedell J. Histology of the human eye. Philadelphia: WB Saunders, 1971.
7. Bron AB, Tripathi RC, Tripathi BJ. Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit, 8th edition. London: Chapman and Hall Medical, 1997: 46.
8. Günel İ. Göz Hastalıkları Temel Gözbilim, 1. baskı. Ankara: Antıp A.Ş Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları, 2003: 4.
9. Bengisu Ü. Göz Hastalıkları, 3. baskı. İstanbul: Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş, 1990:63-84.
10. Arffa, Robert C.; GRAYSON, Merrill. Grayson's Diseases of the Cornea. Mosby Incorporated, 1997.
11. Myron Yanoff, Jay S Duker. Ophthalmology. In: Ming XW, Carol LKarp, Robert P Selkin, Dimitri TA. Mosby edition. Chapter 5: 12.1-12.18.
12. Akyol F. Kornea Anatomisi. Türk Oftalmoloji Derneği. Kornea. İstanbul: Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11, 2009: 16.

13. Akyol N. Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi. Kontak Lensler ve Uygulanması. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları. İstanbul: Scala, 2005: 7-29.
14. Kanski, Jack J. ve BOWLING, Brad. Clinical ophthalmology: a systematic approach. Elsevier Health Sciences, 2011.
15. Özçetin H. Klinik Göz Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, 2003: 62-3.
16. Dua HS, Faraj LA, Branch M. The collagen matrix of the human trabecular meshwork is an extension of the novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). Br J Ophthalmol 2014 ve 691-97., 98.
17. Ozanics V, Rayborn M, Sagun D. Some aspects of corneal and scleral differentiation in the primate. Exp Eye Res 1976 ve 22:305–327.
18. Ozanics V, Rayborn M, Sagun D. Observations on the morphology of the developing primate cornea: epithelium, its innervation and anterior stroma. J Morphol 1977 ve 153:263–297.
19. Quantock AJ YR. Development of the corneal stroma, and the collagen–proteoglycan associations that help define its structure and function. Dev Dyn 2008:Epub ahead of print.
20. Hay, Elizabeth D. Development of the vertebrate cornea. In: International review of cytology. Academic Press, 1980. p. 263-322.
21. Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. J Morphol 2002 ve 254:247–258.
22. Stiemke MM, McCartney MD, Cantu-Crouch D, Edelhauser HF. Maturation of the corneal endothelial tight junction. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991 ve 32(10):2757–2765.
23. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH. The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. Curr Eye Res 1991 ve 10(2):145–156.
24. Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of the human eye. Arch Ophthalmol 1985 ve 103(6):785–789.

25. Ehlers N, Sorensen T, Bramsen T, Poulsen EH. Central corneal thickness in newborns and children. *Acta Ophthalmol* 1976 ve 54(3):285–290.
26. Doughty MJ, Laiquzzaman M, Muller A et al. Central corneal thickness in European (white) individuals, especially children and the elderly, and assessment of its possible importance in clinical measures of intra-ocular pressure. *Ophthal Physiol Optics*.
27. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol* 2000 ve 44(5):367–408.
28. DelMonte, Derek W., and Terry Kim. "Anatomy and physiology of the cornea." *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 37.3 (2011): 588-598.
29. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol*. 2003. 51: p. 5-15.
30. Wiley L, SundarRaj N, Sun T-T, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991 ve 32:594–602.
31. Netto MV, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hutcheon AEK, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea, 2005, a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* ve 24:509–522.
32. Gabison EE, Mourah S, Steinfeld E, Yan L, Hoang-Xuan T, Watsky MA, De Wever B, Calvo F, Mauviel A, Menashi S. Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas ve epithelio-stromal, role in.
33. Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res* 1989 ve 49:751–76.
34. Roodhooft JMJ. Leading causes of blindness worldwide. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. ve 283:19–25.
35. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol*. 1998 ve 43:245–269.

36. Roth, H. W. The Etiology of Ocular Irritation in Soft Lens Wearers: Distribution in a Large Clinical Sample. *Eye & Contact Lens*, 1978, 4.2: 38-47.
37. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GOH. Angiogenesis in corneal disease: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea*. 1998 ve 17:611–613.
38. Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001 ve 12:242--9.
39. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006 ve 443:993--7.
40. Chang, Jin-Hong, et al. "Corneal neovascularization." *Current opinion in ophthalmology* 12.4 (2001): 242-249.
41. Ferrara, N. (2009) History of discovery: vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 789–791, PMID: 19164810.
42. Ferrara, N. and Henzel, W. J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–858.
43. Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. and Connolly, D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309–1312.
44. Robinson, C. J. and Stringer, S. E. (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114, 853–865.
45. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cellular Biochem* 1991, 47 ve 211–218.
46. Shibuya, Masabumi. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell structure and function*, 2001, 26.1: 25-35.
47. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987 ve 442-444., 235.
48. Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak H, Brown LF. Correlation of vascular permeability factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996 ve 1210-1217., 114.

49. Hayashi N, Nakayasu K, Okisaka S: Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factor through corneal neovascularization in vivo and in vitro. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1996, 100:587–591.
50. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, et al.: Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990, 31:323–333.
51. Woessner J. The matrix metalloproteinase family. In: Parks W, Mecham RP, eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego, CA Academic Press ve 1998, 261–290.
52. Lu PC, Ye H, Maeda M, et al.: Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40:20–27.
53. Azar DT, Hahn TW, Jain S, et al.: Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea* 1996, 15:18–24.
54. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agan F, Leung S. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor-1. *Molecular and Cellular Biology* 1996 ve 4604-13., 16.
55. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1990 ve 7709-12., 265.
56. Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, McCarty MF, Takeda A, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Jung YD, Bucana CD, Mansfield PF, Hicklin DJ. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells.
57. Cogan, David G. Corneal vascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1962, 1.2: 253-261.
58. Hayahi T, Matsuoko K, Saitoh M, Takeda S, Kimura M. Influence of α -tumor necrosis factor and β -interleukin-1 on production of angiogenetic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J Obstet Gynae*.
59. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Corneal neovascularization Chang et al. 247 Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that

- mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994, 79:315–32.
60. Cao R, Wu HL, Veitonmaki N, et al.: Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1–5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:5728–5733.
 61. Halfter W, Dong S, Schurer B, et al.: Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998, 273:25404–25412.
 62. Lin HC, Chang JH, Jain S, et al.: Endostatin localization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41:S832.
 63. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, et al.: Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000, 486:247–251. Non collagenic NC1 fragment of type XVIII collagen may be processed by several enzymes including Cath.
 64. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, et al.: METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angioinhibitory activity. *J Biol Chem* 1999, 274:23349–23357.
 65. Ortego J, Escribano J, Becerra SP, et al.: Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium: synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, 37:2759–2767.
 66. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al.: Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999, 285:245–248.
 67. Hiscott P, Paraoan L, Choudhary A, Ordonez JL, Al-Khaier A, Armstrong DJ. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Prog Retin Eye Res* 2006 ve 1-18., 25:.
 68. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 ve 1352-1358., 47.

69. Cursiefen C, Masli S, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 ve 1117-1124., 45.
70. Rebane, Ana; AKDIS, Cezmi A. MicroRNAs: essential players in the regulation of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 132.1: 15-26.
71. Reinhart, Brenda J., et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 2000, 403.6772: 901.
72. Kamanu TK, Radovanovic A, Archer JA, Bajic VB (2013) Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Sci. Rep.* 3, 2940.
73. Meunier, Julien, et al. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome research*, 2013, 23.1: 34-45.
74. Eulalio, Ana; MANO, Miguel. MicroRNA screening and the quest for biologically relevant targets. *Journal of biomolecular screening*, 2015, 20.8: 1003-1017.
75. Zhuo, Yang, et al. miRNAs: biogenesis, origin and evolution, functions on virus-host interaction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013, 32.3: 499-510.
76. Westholm, Jakub O.; LAI, Eric C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 2011, 93.11: 1897-1904.
77. Valinezhad Orang, Ayla; Safaralizadeh, Reza; Kazemzadeh-Bavili, Mina. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International journal of genomics*, 2014, 2014.
78. Vasudevan, Shobha. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2012, 3.3: 311-330.
79. Turchinovich, Andrey; Cho, William. The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids. *Frontiers in genetics*, 2014, 5: 30.
80. Vickers, Kasey C., et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 2011, 13.4: 423.
81. Diao, Liyang, et al. MixMir: microRNA motif discovery from gene expression data using mixed linear models. *Nucleic acids research*, 2014, 42.17: e135-e135.

82. Aniding, Gulibahaer, et al. Interleukin 2 receptor α chain gene polymorphisms and risks of multiple sclerosis and neuromyelitis optica in southern Japanese. *Journal of the neurological sciences*, 2014, 337.1: 147-150.
83. Mahoney, Janette M. ve Waterbury, L. David. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Current eye research*, 1985, 4.5: 531-535.
84. Qazi Y, Wong G, Monson B, et al. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull.* 2009, 27 ve 198–210.
85. Niederkorn, Jerry Y. Immune privilege and immune regulation in the eye. In: *Advances in immunology*. Academic Press, 1990. p. 191-226.
86. Jones IS, Meyer K. Inhibition of vascularization of the rabbit cornea by local application of cortisone. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1950 ve 74:102–104.
87. Wybar KC, Campbell FW. The influence of cortisone on corneal vascularization in the guinea pig and rabbit. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1952 ve 72:105–117.
88. Nakao S, Hata Y, Miura M, et al. Dexamethasone inhibits interleukin-1 β -induced corneal neovascularization: role of nuclear factor- κ B-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol.* 2007 ve 171:1058–1065.
89. Chang CT, Chen YL, Lee SH, et al. The inhibition of prostaglandin E1- induced corneal neovascularization by steroid eye drops. *J Formos Med Assoc.* 1989 ve 88:707–711.
90. Lass JH, Berman MB, Campbell RC, et al. Treatment of experimental herpetic interstitial keratitis with medroxyprogesterone. *Arch Ophthalmol.* 1980 ve 98:520–527.
91. Athanasiadis Y, Novitskaya E, Nithyanandrajah GA, et al. Subconjunctival triamcinolone for the treatment of corneal graft rejection and new vessels. *Cont Lens Anterior Eye.* 2009 ve 32:31–32.
92. Klintworth GK. *Corneal Angiogenesis: A Comprehensive Critical Review*. New York, NY: Springer-Verlag ve 1991:16.
93. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1986 ve 1304–1309., 93:.

94. Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001 ve 12:242–249.
95. Ueda M, Sugatani J, Unezaki S, et al. Involvement of prostaglandin E2 in rabbit corneal injury by anterior segment ischaemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997 ve 57:285–291.
96. Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, et al. Topical nepafenac inhibits ocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 ve 44:409–415.
97. Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2004 ve 79:275–285.
98. Congdon NG, Schein OD, von Kulajta P, et al. Corneal complications associated with topical ophthalmic use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Cataract Refract Surg*. 2001 ve 27:622–631.
99. Guidera AC, Luchs JJ, Udell JJ. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ophthalmology*. 2001 ve 108:936–944.
100. Amano S, Rohan R, Kuroki M, et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 ve 39:18–22.
101. Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007 ve 502–508., 18:.
102. Bock F, Ko"nig Y, Kruse F, et al. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008 ve 246:281–284.
103. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*. 1997 ve 57:4593–4599.
104. Pytowski B, Goldman J, Persaud K, et al. Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst*. 2005 ve 97:14–21.

105. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 ve 92:10457–10461.
106. Singh N, Higgins E, Amin S, et al. Unique homologous siRNA blocks hypoxia-induced VEGF upregulation in human corneal cells and inhibits and regresses murine corneal neovascularization. *Cornea*. 2007 ve 65–72., 26.
107. Fong TA, Shawyer LK, Sun L, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Re*.
108. Yatch S, Kawakami Y, Imai M, et al. Effect of a topically applied neutralizing antibody against vascular endothelial growth factor on corneal allograft rejection of rat. *Transplantation*. 1998 ve 1519–1524., 66.
109. Cursiefen C, Cao J, Chen L, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 ve 45:2666–2673.
110. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, et al. Tu"bingen Bevacizumab Study Group. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol*. 2008 ve 86:322.
111. Bachmann BO, Bock F, Wiegand SJ, et al. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. *Arch Ophthalmol*. 2008 ve 126:71–77.
112. Habet-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, et al. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol*. 2010 ve 165., 88:862–867.
113. Han YS, Lee JE, Jung JW, et al. Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 ve 247:541–548.

114. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, et al. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol*. 2008 ve 145:424–431.
115. Che'vez-Barrios P. Are we getting closer to prevention and treatment of corneal neovascularization? *Clin Experiment Ophthalmol*. ve 689–690., 35.
116. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 ve 333:328–335.
117. Dursun, Ayhan, et al. "Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model." *Int J Ophthalmol* 5.4 (2012): 448-451.
118. Pillai, Chidambara T., DUA, Harminder S. ve HOSSAIN, Parwez. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2000, 41.8: 2148-2153.
119. Bock F, Matthaei M, Reinhard T. High dose subconjunctival cyclosporine A implants do not affect corneal neovascularization after high risk keratoplasty. *Ophthalmology* 2014 ve 1677-82., 121.
120. Benelli U, Ross JR, Nardi M, Klintworth GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery. Inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997 ve 274–82., 38.
121. Gottsch JD, Akpek EK. Topical cyclosporin stimulates neovascularization in resolving sterile rheumatoid central corneal ulcers. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000 ve 81-7., 98.
122. Anderson DF, Ellies P, Pires RT. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2001 ve 567-75., 85.
123. Gomez JP, Santos MS, Mascaro VL. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. *Ophthalmology* 2003 ve 466-73., 110.

124. Reed JW, Fromer C, Klintworth GK. Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. *Arch Ophthalmol*. 1975 ve 1017–1019., 93.
125. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1986 ve 1304–1309., 93.
126. Gerten, Georg. Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularization in corneal transplant surgery. *Cornea*, 2008, 27.10: 1195-1199.
127. Gomer CJ, Ferrario A, Hayashi N, et al. Molecular, cellular, and tissue responses following photodynamic therapy. *Laser SurgMed*. 1988 ve 8:450–463.
128. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992 ve 55:145–157.
129. Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1997, 39.1: 1-18.
130. Brooks BJ, Ambati BK, Marcus DM, Ratanasit A. Photodynamictherapy for corneal neovascularisation and lipid degeneration. *Br J Ophthalmol* 2004 ve 840., 88.
131. Sheppard JD Jr, Epstein RJ, Lattanzio FA Jr. Argon laserphotodynamic therapy of human corneal neovascularization after intravenous administration of dihematoporphyrin ether. *Am J Ophthalmol* 2006 ve 524-9., 141.
132. Leigh, A. G. Treatment of gross corneal opacification by lamellar and annular lamellar keratoplasty. *The British journal of ophthalmology*, 1955, 39.11: 641.
133. G.A. Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, C.M. Croce, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 15524–15529.
134. De Planell-Saguer, Mariàngels ve Rodicio, María Celina. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Analytica chimica acta*, 2011, 699.2: 134-152.
135. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 1997 ve 79:233–269.

136. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 ve 9:669–676.
137. Sun, Chun-Yan, et al. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*, 2012, 34.2: 426-435.
138. Li X, Zhou H, Tang W, Guo Q, Zhang Y. Transient downregulation of microRNA-206 protects alkali burn injury in mouse cornea by regulating connexin 43. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015 ve 8(3):2719-2727.
139. Murata, Masatoshi, et al. "Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 244.2 (2006): 205-209.
140. Mehrnoosh Saghizadeh, Vincent Funari, Jordan Brown, Jwalitha Shankardas, Slobodan D. Dimitrijevič, Alexander V. Ljubimov, 2012, Wound Healing Related microRNAs Differentially Expressed in Diabetic Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* ve 53(14):2210.
141. Shen, J., Yang, X., Xie, B., Chen, Y., Swaim, M., Hackett, S. F., & Campochiaro, P. A. (2008). MicroRNAs Regulate Ocular Neovascularization. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(7), 1208–1216.
142. Yanyan Bai, Xia Bai, Zhaoyue Wang, Xiaofeng Zhang, Changgeng Ruan, Jingcheng Miao, MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors, *Experimental and Molecular Pathology*, Volume 91, Issue 1, A.
143. Hughes, Anne E., et al. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. *The American Journal of Human Genetics*, 2011, 89.5: 628-633.
144. Mulik, Sachin, et al. Role of miR-132 in angiogenesis after ocular infection with herpes simplex virus. *The American journal of pathology*, 2012, 181.2: 525-534.
145. Park, Jong Kook, et al. miR-184 exhibits angiostatic properties via regulation of Akt and VEGF signaling pathways. *The FASEB Journal*, 2017, 31.1: 256-265.

146. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, Fuchs E. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet* 2006 ve 38:356-62.
147. Ryan, David G., et al. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Mol Vis*, 2006, 12.134: I175-I184.
148. Sebastiani, Guido, et al. MicroRNA profiling in sera of patients with type 2 diabetes mellitus reveals an upregulation of miR-31 expression in subjects with microvascular complications. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013, 6.05: 58.
149. Ye, Panpan, et al. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *International journal of medical sciences*, 2014, 11.1: 17.
150. Wang, Lei, et al. miR-126 regulation of angiogenesis in age-related macular degeneration in CNV mouse model. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17.6: 895.
151. Askou, Anne Louise, et al. Dissecting micro RNA dysregulation in age-related macular degeneration: new targets for eye gene therapy. *Acta ophthalmologica*, 2018, 96.1: 9-23.