

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

91312

**EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN JEL
TAŞIYICI İÇİNDE KORNEAL KESİ YARASI
OKSİDATİF DURUMUNA ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Murat Timur BUDAK

Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Bilge GÖNÜL

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ANKARA-2000

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1) Gözün Genel Yapısı	3
II.2) Korneanın Yapısı	6
II.2.1) Kornea'ya Anatomik ve Fizyolojik Bakış	7
II.2.1.1) Korneanın Makroskobik Anatomisi ve Fizyolojisi	7
II.2.1.2) Korneanın Mikroskobik Anatomi ve Fizyolojisi	10
II.3) Korneada Yara İyileşmesi	15
II.3.1) Çevre Rolü	15
II.3.2) Epiteliyal Hareket	16
II.3.3) Limbal Kök Hücreleri	17
II.3.4) Ekstrasellüler Matriks	18
II.3.5) Nöral Regülasyon.....	22
II.3.6) Hüморal Regülasyon.....	24
II.3.7) Hücreiçi Sinyal Transdüksiyonu	26
II.4) EGF ve EGF'nin Oküler Yara İyileşmesine Etkisi	26
II.5) Gözde Askorbik Asit	33
II.5.1) AA'in Genel Özellikleri	33
II.5.2) AA'in Diğer Etkileri.....	42

II.5.3) AA'in Gözdeki İlave Etkileri	44
II.6) Oksidatif Stress ve Bedendeki Antioksidan Korunma	
Mekanizmaları ve Gözdeki Oksidan Olaylar.....	45
II.7) Yapay Göz Yaşı Preperatları	47
III) MATERYAL - METOD	48
III.1) Araştırma Planı	48
III.2) Tayin Yöntemleri	49
III.2.1) Dokuda AA tayin yöntemi.....	49
III.2.2) Dokuda TBARs tayin yöntemi	52
III.2.3) Dokuda GSH tayin yöntemi	53
III.3) Kullanılan araç ve gereçler	54
IV) BULGULAR	56
V) TARTIŞMA ve SONUÇ	60
VI) ÖZET	66
VII) SUMMARY	67
VIII) KAYNAKLAR	68

KISALTMALAR :

AA	: Askorbik Asid
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
ATP	: Adenozin Trifosfat
BHT	: Bütil Hidroksi Toluen
CGRP	: Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid
DHA	: Dehidroaskorbik Asid
DNA	: Deoksiribonükleik Asid
DTNB	: Di-Tiyo-Bis Nitro Benzoik Asid
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asid
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
LP	: Lipid Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
PCA	: Perklorik Asid
PCR	: Çoklu zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PKC	: Protein Kinaz C
PMN	: Parçalı Nükleuslu Hücreler
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asidi
RNA	: Ribonükleik Asid
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Superoksid Dismutaz
SP	: P Maddesi
TBA	: Tiyobarbütirik Asid
TBARs	: Tiyobarbütirik Asid ile Reaksiyona Giren Maddeler
TCA	: Trikloro Asetik Asid
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
UDP	: Üridin Difosfat
UV	: Ultraviyole
YGY	: Yapay Göz Yaşı

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve doktora eğitimim sırasında engin bilgi ve deneyimleri ile bilgi birikimimi artırmada ve tezimin hazırlanmasında değerli emek ve zamanını esirgemeyen danışman hocam- Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bilge GÖNÜL'e,

Doktora derslerinde başarılı olmam için özverili yardımlarını gördüğüm ve her zaman yanımda hissettiğim değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Aydan BABÜL , Sayın Prof. Dr. Deniz ERBAŞ , Sayın Prof. Dr. Lamia PINAR, Sayın Doç. Dr. Sibel Dinçer'e

Cerrahi deneyim ve emekleri ile tezimin oluşmasına değerli katkılar sağlayan Göz Hastalıkları Anabilim Dalından Sayın Doç.Dr.Kamil BİLGİHAN ve Sayın Asistan Dr. Onur ÖZEN'e,

Ve

Yardımsever, dost canlısı ve iyi niyetli yaklaşımlarından dolayı tüm Anabilim Dalında bulunan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Murat Timur BUDAK

I) GİRİŞ VE AMAÇ :

Epidermal büyüme faktörü (EGF) nün deri, kornea, mide mukozası gibi farklı yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı yayınlanmıştır(112,123). EGF uygulamalarının yara gerilme kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir(36). Dermal fibroblast da dahil olmak üzere pek çok hücre tipi EGF yüzey reseptörlerine sahiptir ve hücre kültürlerinde EGF'ye yanıt olarak çoğalırlar (Ksander, 1989) . Ayrıca EGF'nin prokollajenaz sentezini indüklediğinde gösterilmiştir(22). Memeli kollajenazı, bağ dokusu komponentlerini yıkabilen hücre dışı metalloproteinazlar ailesine dahildir. Bu durumda EGF kollajen yapımı ve yıkımının kontrolünde dolaylı olarak rol almaktadır. Kollajen oluşumunda C vitamini anahtar rollerden birine sahiptir. Ayrıca doğal antioksidanlardan biridir ve göz dokularında da bulunur(22). Son çalışmalarda EGF'nin oksidan sistemle ilişkisi üzerine bazı bulgular yayınlanmıştır(123).

EGF'nin göz yaşı ile yıkanması veya deri üzerine solüsyon halinde uygulanması, daha büyük dozlarda ve sık kullanılmasını gerektirmektedir. Bu durumda reseptörlerde azalmaya (down regulation) neden olarak istenen etkinin gerçekleşmesini engellemektedir.

Bundan önceki çalışmalarda biyoadesyonla gözde bir yüzey oluşturan karbopol 940 jel ve bu jeli taşıyan ticari gözyaşı preparatları içinde EGF uygulamaları yapılmış ve yara alanı ölçümü ile yara iyileşmesinin hızlandığı gösterilmiştir (52). Yapılan literatür taramasında korneal yarada askorbik asid (AA), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) düzeyi saptayan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada jel içinde EGF uygulamasının yara dokusundaki C vitamini, Tiyo barbütirik Asid ile Reaksiyona Giren Maddeler(TBARs) ve GSH düzeyine etkisini izleyerek etki mekanizmasını tartışabilmede kriter elde edilmesi amaçlanmıştır.



II) GENEL BİLGİLER :

II.1) Gözün Genel Yapısı:

Göz küreleri (bulbus okülü), orbita boşluğu içinde bağ dokusundan zengin bir yağ yastığı içine yerleşmiş, görme fonksiyonu ile görevli, ön-arka uzunluğu 22-27 mm olan bir çift küresel organdır. Her göz küresi için dört rektus kası (iç-dış-üst-alt rektuslar) ve iki oblik kas (üst ve alt oblikler) ile tüm yönlerde bakış sürdürülür. Göz kapakları (palpebra oculi) kırpma refleksi ile koruyucu olarak görev yaparken, üst kapak temporal kısmın arkasında yerleşmiş gözyaşı bezi (glandula lacrimalis) de gözyaşı salgısı ile hem koruyucu, hem de saydamlığın sürdürülmesi ile ilgilidir. 12 kafa çiftinden altısı gözün duysal ve motor fonksiyonlarının devamını sağlar (II, III, IV, V, VI ve VII. kafa çiftleri) (144).

Anatomik olarak göz küresi dıştan içe doğru üç tabakadan oluşur:

1a. Tunica fibrosa: Göz küresinin en dışında yer alan bu koruyucu fibröz tabaka arkada gözün altıda beşini oluşturan sklera, önde altıda birini oluşturan kornea, ve bunları birleştiren halka, yani limbustan meydana gelir. Optik sinirin arkada gözden ayrıldığı yerde sklera, sinir lifleri paketlerinin geçebildiği lamina cribrosa adı verilen ağ şeklinde bir yapılanma gösterir(55).

Kornea, kesiti eliptik, saat camı şeklinde saydam bir tabaka olup önden arkaya doğru gözün ilk kırıcı dokusudur. Vertikal meridyeni 10.5 mm, horizontal meridyeni 11.5 mm civarında olup santraldaki kalınlığı 0.56 mm dir ve 1.376 refraktif indeksi ile 43 diyoptrilik kırıcılık gösterir. Epitel tabakasının mükemmel düzeni, damarsız olması,

stromadaki kollajen liflerin ve oluşturduğu lameller sistemin düzeni, ve endotelinin sıvı dinamiği üzerindeki belirgin etkisiyle intrastromal su düzeyinin sabit tutuluşu (% 76) korneanın saydamlığını sağlar(46). Trigeminal sinirin oftalmik dalı duyuşal innervasyonunu sürdürür. Epitel, gözyaşı ve limbus damarlarından, endotel yüzü ise ön kamara sıvısından beslenir.

1b. Tunica vasculosa (uvea): Yoğun pigmentli ve damarlı bu tabaka önden arkaya iris, corpus ciliare, ve koroid olarak ayrılır. İris, stromasındaki pigment granül miktarı gözün rengini belirleyen, ortada oluşturduğu pupilla açıklığı ile göze giren ışık yoğunluğunu etkileyen yapıdır. Pupil kenarına yakın sirküler sfinkter kas (parasempatik innervasyon), ve periferde radier yerleşimli dilatatör kas (sempatik innervasyon) yardımı ile pupil çapı düzenlenir(83,87).

Uveanın iris ile koroid arasında kalan kısmı olan corpus ciliare, bir yandan prosesuslarında ön kamara sıvısının yapımını sürdürürken, öte yandan bu çıkıntıların devamı olan Zinn lifleri ile kristalin lensi yerinde tutar, ve silier kasın yardımıyla akomodasyon dediğimiz yakına bakışta lensin kırıcılığını arttırma olayını yönetir. Aktif sekresyon ve ultrafiltrasyon ile plazmadan kaynaklanan ön kamara sıvısı, arka kamaradan pupil açıklığından ön kamaraya geçer, limbustaki ön kamara açısından (trabekulum) episkleral venlere drene olur. Ön kamara sıvısı bir yandan gözün tonüsünü sağlarken, diğer yandan komşu yapıların beslenmesini sürdürür(144).

Yakın komşuluğu nedeniyle burada lensten de söz etmek doğru olur. İris ve pupillanın arkasında vitreusun önünde yer alan kristalin lens, gözün ikinci önemli kırıcı dokusu olup, saydam, damarsız, bikonveks bir organdır. 10 mm çapında ve 4 mm kadar kalınlıktadır. 160-180 adet zonüler lif yardımıyla corpus ciliare çıkıntılarına tutunur. Ön kapsül altındaki tek sıra lens epiteli ömür boyu üretkendir, lens fibrillerini yenilerler. Yakına bakış sırasında silier kasın sirküler olarak kontraksiyonu ile zonüller gevşer, lens ön-arka kalınlığı artar, kırıcılığı artar, yani akomodasyon ile görüntünün yine retina üzerinde odaklanması sağlanmış olur. İnsanlarda 40 yaştan sonra lensin bu esnekliği azaldığı için akomodasyon da azalır ve presbiyopi denilen yakın görme bozukluğu ortaya çıkar(144).

Koroid retinanın dış katlarını besleyen, bol damarlı ve pigmentli bir doku tabakasıdır. Dışta sklera ile sınırlıdır ve dıştan içe doğru büyük damarlar, orta damarlar, ve koriokapillaris tabakalarından oluşur. Dolaşımını kısa ve uzun arka silier arterlerden sağlar.

1c. Tunica nervosa (retina): Görme olayı için adapte olmuş retina, gözün embriyolojik gelişimi sırasında optik vezikülün içe invaginasyonu ile ortaya çıkan iki katlı bir oluşumdur; dışta tek katlı retina pigment epiteli, içte de sensoriyel retina yer alır. Önde lens ve corpus ciliare ile arkada retina arasında, vitreus dediğimiz jel yapıda saydam bir sıvı vardır(144).

II.2) Korneanın Yapısı:

Görme belki de duyularımız en önemlisidir. Dış dünyayla ilgili aldığımız bilgilerin %80'inden fazlasını görme fonksiyonu sayesinde alırız. İyi bir görme durumu refraktif komponentlerden olan kornea ve lensten ışığın retina üstüne düşerek bunun kimyasal ve elektrik enerjisine çevrilmesi, optik sinirle de beyine görme sinyali şeklinde ulaşması ve son olarak da görsel kortekste son bulmasıyla olur.

Kornea dış imajların göze giriş kapısıdır. Temel gereklilik bunun berraklığının sağlanmasıdır. Kornea, skleranın dış yüzeyinin devamı olarak uzanır.

Kornea ayrıca oküler biyolojik savunma sisteminin bir parçası olarak iş görür. Hücre membranlarının interdigitalizasyonu ile oluşan intersellüler bağ gelişmesinin korneal epitelde olması ve hemidezmozom gibi bağlantı komplekslerinin oluşumu ile bir mekanik engel olarak iş görür. Bunun ötesinde, konjunktiva ve gözyaşı filminin hücresel ve kimyasal komponentleri de biyolojik savunma sistemi olarak yer alır(83).

Korneanın şekil ve berraklığının devamı refraksiyon için kritik öneme sahiptir. Kornea gözün refraksiyon gücünün 2/3 ünden fazlasını oluşturur. Bu nedenle korneal kenarda küçük bir değişiklik dahi kırma kusuru ile sonuçlanabilir. Ayrıca yüzey düzlüğünün değişimi veya kalınlık değişimi görüntü distorsiyonu ile sonuçlanabilir.

Korneal berraklık görme fonksiyonu için kritiktir ve bu dokunun açık olan en belirgin özelliğidir. Korneal berraklıktan başlıca sorumlu olan korneal stromanın yapısıdır. Ancak korneal hidrasyonun regülasyonu ile stromal berraklığın devamı için kritik olan, fonksiyonel olarak intakt bir endoteldir. Ayrıca korneal epitelin yüzeyi örtmesi

de önemli ölçüde görme berraklığına katkıda bulunur. Böylelikle korneanın optik fonksiyonun sağlanmasında birçok komponent bir arada çalışır.

Birçok medikal ve cerrahi kornea tedavileri, kornea şeffaflığının restorasyonuna yöneliktir. Refraksiyon kusurlarını düzeltmek için yapılan cerrahilerinde , kornea kurvatürleri laser veya insizyon ile modifiye edilir(144).

II.2.1) Kornea'ya Anatomik ve Fizyolojik Bakış :

II.2.1.1) Korneanın Makroskobik Anatomisi ve Fizyolojisi :

Optik özellikler-

Kornea dış yüzeyle temasta olan damarsız, şeffaf bir dokudur. Korneal ön yüzey göz yaşı filmi ile kaplıdır. Posterior yüzey ise doğrudan aköz hümör içindedir. Şeffaf kornea, opak sklera ve semitrasparant konjunktiva ile devam eder. Kornea ve sklera arasındaki geçiş zonu zengin damarlanmanın olduğu limbustur. Burası rezervuar pluripotansiyel kök hücreleri içerir. Anterior kornea yüzeyi konveks ve asferiktir. Anterior yüzey transvers kesitte superior ve inferior yönde sklerizasyondan dolayı oval görünümündedir.

Korneanın optik özellikleri şu faktörler tarafından belirlenir.

Şeffaflık

Yüzey düzgünlüğü

Kontür

Refraktif indeks

Kornea şeffağıına temel etki eden faktör stromadaki kollajen liflerinin düzenlenmesidir. Her bir kollajen lifinin uzunluğu ve kollajen lifleri arasındaki ortalama mesafe oldukça homojen ve görünür ışık dalga boyundan (400-700 nm) daha küçüktür. Bu sayede her bir liften yayılabilecek kaçak ışımalar, diğerinden olan kaçak ışımaya ile önlenmiş olur(83).

Korneal epitel ve gözyaşı filmi, kritik korneal düzgünlüğün devamının sağlanmasında yer alır.

Korneanın anterior ve posterior yüzlerinin her ikisi de korneanın optik fonksiyonunda yer alır. Hava, göz yaşı, kornea ve aköz hümör ün sırasıyla refraktif indeksleri 1.000, 1.336 ,1.376 ve 1.336'dır.

Innervasyon-

Kornea vücudun en yoğun innervasyon ve duyarlığı olan dokularından biridir. Kornea sinir sonlanma yoğunluğu ve hassasiyetine göre vücudun en yoğun yeridir. Kornea ayrıca otonomik sempatik sinir lifleri içerir. Histokimyasal çalışmalar Substance P (SP) (87,134), Kalsitonin geni ile ilişkili peptid(CGRP) (129,143), katekolaminler ve asetil kolin(78,136) gibi çeşitli nörotransmitterlerin varlığını göstermiştir.

Vasküler Sistem-

Kornea vücutta az sayıda damarsız dokulardan biridir. Normal sağlıklı korneanın damar içermemesine karşın kandan kaynaklanan faktörler korneal metabolizma ve yara iyileşmesinde çeşitli önemli roller oynar. Oftalmik arterin bir dalı olan anterior silier arter limbus bölgesinde vasküler bir ark oluşturur. Bu ark eksternal

karotid arterin fasial dalı ile anastomoz yapar. Bu nedenle, korneanın kanlanması internal ve eksternal karotid arterlerin her ikisinden de olur.

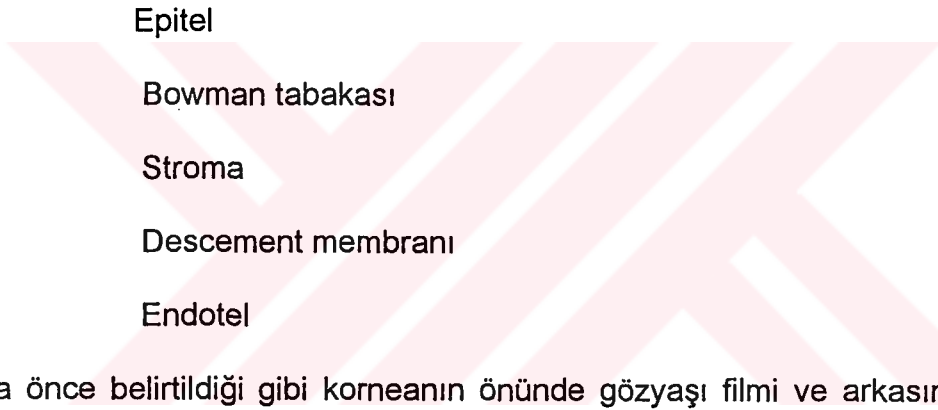
Oksijen ve Besin Sağlanması-

Korneal epitel ve endotel metabolik olarak aktiftirler. Hücresel aktivitenin sağlanması için Adenozin Trifosfat(ATP) enerji kaynağı olarak gereklidir. Genellikle oksidatif yolla glukozun parçalanması ile aerobik koşullarda ATP oluşur. Bu nedenle, korneanın normal fonksiyonu için glukoz ve oksijen gereklidir. Glukoz aköz hümörden difüzyon yolu ile sağlanır. Hatta korneal epitel hücreleri bile aköz hümörden gelen glukozu muhtaçtır.

Diğer taraftan oksijen başlıca göz yaşı sıvısından diffüzyon ile sağlanır. Ayrıca havadaki oksijende gözyaşı sıvısında erir. Gözyaşı sıvısının doğrudan atmosfere teması korneanın oksijen sağlanması açısından gereklidir. Kornea oksijen gereksiniminin sadece küçük bir kısmı aköz hümörden diffüzyon ve limbal sirkülasyonla sağlanır. Uyurken göz kapakları ile bu aerobik sistem engellendiğinden, korneal metabolizma uyurken aerobikten anaerobiğe döner ve laktat birikir. Korneal oksijenasyonu engellememesi için kontakt lens teknolojisi gaz permeabilitesini maksimize edecek şekilde hedeflenmiştir.

II.2.1.2) Korneanın Mikroskopik Anatomi ve Fizyolojisi:

Vücudun diğer kısımları ile karşılaştırıldığında korneanın yapısının daha basit olduğu görülür. Lens, vitröz hümör, ve eklem componentleri vücuttaki diğer damarsız dokulardır. Korneadaki hücreler epitelyal hücreler , keratinositler ve endotelial hücrelerdir. Sonuç olarak kornea 3 hücre tabakası ve 2 yüzeyden oluşur.



Daha önce belirtildiği gibi korneanın önünde gözyaşı filmi ve arkasında aköz hümör bulunur. Kornea kanın albumin ve globulinler gibi aköz componentlerini içerirken çok az hücresel elemanlarını içerir.

Gözyaşı Sıvısı-

Korneayı dehidratasyondan korur ve düz bir epitelyal yüzey sağlar. Gözyaşı filminin kalınlığı yaklaşık 0,7mm'dir. Hacmi ise $6,5 \pm 0,3 \mu\text{l}$ 'dir. Gözyaşı sıvısı 3 tabakadan oluşur. Superfisial lipid tabakası ($\approx 0,1 \mu\text{m}$), aköz tabaka ($\approx 7 \mu\text{m}$) ve musin tabakası ($0,02-0,05 \mu\text{m}$). Gözyaşı total volumünün %98'inden fazlası sudur. Gözyaşı filmi elektrolitler, glukoz, immunoglobulinler, laktoferrin, lizozom, albumin ve oksijen gibi bir çok biyolojik

önemli faktörleri içerir. Bunun ötesinde geniş bir aralıkla biyolojik olarak aktif histamin, prostaglandinler ve interlökinler gibi maddeleri de içerir(130).

Epitel-

Korneal epitel, keratinize olmayan çok katlı skuamöz epitelden oluşur. Korneal epitelin kalınlığı yaklaşık 50µm'dir(Korneanın %10'u). Bunun kalınlığı yalnız hücre tabakalarının sayısı ile değil altta yatan stromanın durumuyla da ilgilidir(58).

Korneal epitel 3 tip hücre içeren 5-6 tabakadan oluşur.

Süperfisial hücreler (2-3 kat)

"Wing" hücreleri (2-3 kat)

Bazal hücreler (Tek katlı kolumnar)

Yalnızca bazal hücreler proliferasyon özelliğine sahiptir. Yeni oluşan hücreler yüzeye doğru itilir. Süperfisial hücrelerin göz yaşı filmine dökülmesinden önce olan bu olgunlaşma süreci 7-14 gün içinde olur. Epitel hücreleri arasındaki bağlantılar bir biyolojik engel oluşturmanın yanı sıra stromaya gözyaşı sıvısının geçmesini önler.

Epitelin hücresel bileşenleri korneal immunolojide de rol oynar. Dendritik Langerhans hücreleri korneal limbus yakınında bol sayıda bulunur. Bu cins hücreler normal korneanın orta kısmında bulunmazlar (74,55,44). Langerhans hücreleri kemik iliğinden kaynaklanan özelleşmiş makrofajlardır. Bu dendritik hücreler korneal epitelin periferinde konsantre olmuştur ve antijen işlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Class II HLA'lar korneal epitelin Langerhans hücreleri tarafından eksprese edilir. Bu hücreler konakçıya antijen sunmada oküler immun cevabın afferent kolunda yer

almaktadır diye düşünülmektedir(120).Korneanın santral kısmı yaralandığında, periferel Langerhans hücrelerinin hızlı bir şekilde oraya doğru migrasyonu görülür.

Süperfisial hücreler; 2-3 katlı düz hücrelerdir. Bunların yüzeyi mikrovililer ile kaplıdır. Bu yapı yüzeyi arttırarak oksijenin aktif değişimine ve hücreler arası ve gözyaşı sıvısı arasında besin maddeleri değişimine izin verir.

Epitel hücre membranı bilayer lipid içerir ve hidrofobiktir. Hücre membranında çok sayıda glikoprotein ve glikolipid molekülleri yer alır. Bu yüzen kısımlar oligosakkaritler ile kaplıdır. Toplu halde bunlar glikokaliks olarak adlandırılır ve epitel hücrelerinin hidrofobik özelliğini sağlarlar. Glikokaliks gözyaşı filminin musinöz tabakası ile etkileşir. Normal gözyaşı filminin üç tabakalı yapısı korneanın onunla etkileşimi için glikokaliks ve musine bağlıdır. Korneal epitel hücrelerinin glikokaliks kaybı ve konjunktival epitel hücrelerinden goblet hücrelerinin kaybı gözyaşı film düzensizliğine neden olur. Eğer korneal epitel devamlılığı bozulursa, aköz materyal kolayca korneal stromaya penetre olur(144).

"Wing" hücreler; superfisial hücrelerin altında 2-3 tabaka halindedir. Kanat şeklindeki görünümünden dolayı bu isim verilmiştir. Hücre içi tonofilamanlardan, yani keratinlerden zengindirler. Keratinlerin ifadelenmesi, korneal epitel hücrelerinin farklılaşması gibi, farklılaşma ile düzenlenir (33,132).

Bazal hücreler ; kuboidal, kolumnar tek sıra şeklinde bazal membran üzerinde uzanır. Değişik tip korneal epitel hücreleri arasında sadece bazal hücreler mitotik aktiviteye sahiptirler. Bazal membrana hemidezmozomlar ile tutunurlar. Bu tutunmada tip VII

kollajenler yer alır (43). Stroma bağlayıcı plakları, altta tip I kollajenlerinden oluşur ve burada korneal stromanın majör komponenti olarak iş görür.

Bazal membran; vücudun diğer kısımlarında olduğu gibi, korneal epitelin bazal hücreleri sekresyonla bazal membranı oluşturur. Bazal membranın başlıca komponentleri tip IV kollajen ve Laminin'dir(10). Günümüzde stratifiye ve iyi organize korneal epitel devamlılığında bazal membranın önemli olduğuna inanılmaktadır. Epitel yara iyileşmesinde bazal membran önemli bir rol oynayabilir. Tip IV kollajen ve Laminin kararlı halin devamında esansiyel olmasına karşın, fibronektin akut yaralanma durumlarında rol alıyor görünmektedir(10).

Bowman tabakası; Işık mikroskobu ile insanda ve bazı memelilerde korneal epitel ile korneal stroma arasında görülen asellüler membran benzeri zona denir. Bowman tabakası bir membran değildir. Kollajen liflerinin ve proteoglikanların basit bir şekilde birikimiyle olmuştur. Bowman tabakasının başlıca kollajenleri tip I ve tip III kollajenlerden oluşur. Kollajen lifleri rastgele düzenlenmiştir. Yaralanmadan sonra Bowman tabakası rejenere olmaz. Bazı memelilerde Bowman tabakası hiç bulunmaz ve onlarda iyi organize epitel yapısına sahiptir. Bu nedenle Bowman tabakasının fizyolojik fonksiyonu daha ileri araştırmaları gerektirmektedir(130,144).

Stroma; Korneanın %90'dan fazlası stromadır. Korneal stroma, eksrasellüler matriks, keratinositler ve sinir liflerinden oluşur. Total stroma hacminin %2-3'ünü hücresel komponentler oluşturur. Gerisi çeşitli hücre dışı matriksler, çoğunlukla da kollajen ve glikozaminoglikanlardan oluşur. Kuru ağırlığın %70'ini kollajenler oluşturur. Başlıca

kollajen tipi ise tip I kollajendir. Korneal stromadaki kollajen liflerinin karakteristik özelliği büyüklük olarak son derece uniform olmalarıdır (22,5-35nm)(61,62). Ayrıca kollajen lifleri arası mesafe de uniform ve sabittir (41,4±0,5nm) (47). Stromadaki kollajen liflerinin düzenli olması korneal şeffaflığı sağlar. Korneal stromada, kollajen lifler yaklaşık 300 lamel oluşturur. Her bir lamel kornea yüzeyine paralel seyreder ve limbustan limbusa uzanır(47).

Korneada en çok bulunan glikozaminoglikan keratan sulfattır (%65). Glikozaminoglikanlar yüksek miktarda suyu absorbe etme ve tutma kapasitesine sahiptir. Korneal hidrasyon; epitelyal engel, yüzey havalanması, endotelial pompa, intraoküler basınç ve stromal şişme basıncı gibi birçok etki eden etkenin sonucunda olur. Hyaluran'ın morfogenezis ve doku onarımında esansiyel bir rol oynadığına inanılır.

Korneal stromanın hücresel komponentlerinin başlıcası keratinositlerdir(27).

Korneal stromada insizyon, keratektomi veya eksimer laserle oluşturulan fotoablasyon şeklinde yarada, yaralanma bölgesine yakın keratinositler birbirleri ile oluşturdukları network bağlantılarını yitirir ve bağımsız hareket etmeye başlarlar. Bu aktive olmuş keratinositler korneal stroma yara iyileşmesi ve korneal ülser patogenezinde esansiyel rol oynar.

Descement membranı; korneal endotelin bazal membranıdır. Başlıca tip IV kollajen ve laminin'den oluşur(130).

Endotel; Descement membranın arkasındaki tek sıra korneal endotel hücreler iyi organize mozaik paterndedir(130).

Endotel hücreler büyük nükleuslu, çok sayıda sitoplazmik organellidir (Mitokondri, Endoplazmik retikulum, Serbest ribozomlar ve Golgi aparatı). Bu hücrelerin özellikleri korneal endotel hücrelerinin aktif metabolizma ve sekresyonunun olduğunu gösterir(144).

Korneal epitel insan, maymun ve kedilerde proliferer olmazken tavşanlarda olur. Yaşla birlikte endotel hücre sayısı azalır. Kritik endotel kaybı olduğunda komşu hücreler genişleyerek kusurlu bölgeyi kaplar(130).

Korneal endotelin fizyolojik olarak en önemli fonksiyonu korneal stromanın su regülasyonunu sağlamaktır. Normalde bu %76'dır. Endotel hücreler, zıt akım sistemiyle çalışan iyon transport sistemleri ile korneal stroma su emer(144).

II.3) Korneada Yara İyileşmesi :

II.3.1) Çevre Rolü :

Kornea yapısının korunması biyolojik korunma sistemi ve refraktif sistem gibi fizyolojik fonksiyonları için gereklidir. Düz ve kesintisiz epitel, temiz stroma ve fonksiyonel endotel temiz görme için esansiyeldir. Kornea'nın dış çevre ile doğrudan karşılaşmasından dolayı, kimyasal, biyolojik, fiziksel olaylar gibi dış uyaranlarla bazen etkilenme olabilir. Her ne kadar kornea'nın göz kapakları, göz kırpması, gözyaşı ile korunması yapılıyorsa da bu yeterli değildir. Bu nedenle daha aktif olarak korunma sistemleri ile donatılmıştır.

Keratoplasti ve refraktif cerrahi gibi korneal cerrahinin gelişmesi korneal yara iyileşmesi mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını gerektirmektedir. Hücresel ve moleküler biyolojide olan son gelişmeler, normal yapı ve fonksiyonun korunması mekanizmalarında yeni bakış açıları getirmiştir. Vücudun hemen hemen her kısmında yara iyileşmesinde kan damarlarının kesintiye uğratılmasından sonra ekstrasvazasyon ile kan içeriğinin çıkması yara iyileşmesinde ilk basamaktır. Ancak, kornea damarsız bir dokudur. Bu nedenle yara iyileşmesi vücudun başka yerinde görülenlerden farklıdır.

Son on yılda, hücresel kontrolde yer alan faktörlere ait bilgi birikmiştir. Hücresel ve moleküler alanda bilgilerimizde olan bu hızlı artış bize korneal fizyolojiyi daha iyi anlama imkanı vermiştir.

II.3.2) Epiteliyal Hareket:

Epiteliyal yara iyileşmesinin çeşitli fazlarının arasında , epiteliyal migrasyon başarılı ve tam olarak kusurların örtülmesinde ilk adımdır. Normal bir korneada epitel hücreleri bazal hücrelerden superfisial hücrelere doğru sürekli yenilenirler. Ayrıca pluripotent limbal kök hücrelerden sentropedal bir hareket de vardır. XYZ teorisinde açıklandığı gibi normal kornea epitel hücrelerinde dinamik bir denge durumu söz konusudur(135).Korneal epitel travmaya uğradığında olan ilk olay, komşu sağlıklı epitel dokusundan kusurlu alana doğru bir hücre kayması migrasyondur. "Time-lapse cinematography" de rat korneasında faz kontrast mikroskobu kullanılarak mekanik debridmandan sonra dinamik epitel hareketi gözlenmiştir (90). Kornea da çıplak bölgeyi kaplamak için 2 tip epiteliyal hareket gözlenmiştir. Kayan tek tabaka epiteliyal hücrelerin ileri kümelenmesi ve takip eden 'toprak kaymasına' benzer şekilde kitle hareketi. Bu

gözlemler migrasyona uğrayan epitelyal monolayer hücrelerin kusuru örtmek üzere residüel epiteli yönlendirdiğidir. Bu gözlem daha önce gözlenen, tabaka benzeri hareketi ve monolayer epitel hücre hareketini açıklamaktadır. İki major mekanizma hücreleri komşu hücreler veya hücre dışı matriks'e bağlamaktadır.

- 1- Hücreler veya eksrasellüler matrikse reseptör aracılı adezyon.
- 2- Adezyon junctional kompleks oluşumu(46).

Epitelyal hücreler tabaka halinde hareketi , hücrelerde adezyon kompleksi ile sağlanabilir. Böylece kitle halinde hareket edebilirler.

II.3.3) Limbal Kök Hücreleri ;

Korneal epitel hücreleri tabakalı-stratifiye epitel yapısını korumak üzere hızlı şekilde yenilenirler. Korneal epitelyal hücreler de sentropedal hareketin varlığı kesin bir şekilde gösterilmiştir. Bunun ötesinde sadece bazal epitelyal hücreler de proliferasyon yeteneği vardır. Thoft ve ark, epitelyal hücrelerin sentropedal hareketi ile bazal hücrelerin superfisial hücrelere hareketi arasında ve kornea yüzeyindeki deskuamasyon miktarında bir denge olduğunu ortaya koymuştur (XYZ teori)(135). Korneada epitelyal kök hücrelerinin yerleşim yeri olarak limbus postüle edilmiştir(29,34,35,25,21,66).

Farklılaşan korneal epitel hücreleri, 64kD molekül ağırlıklı korneal keratine karşı monoklonal antikor (AE5) ile boyanmıştır. Yalnız limbal kök hücreleri bu monoklonal antikor ile boyanmamıştır. Bu da bize açıkça farklılaşmamış kök hücrelerinin limbal bazal hücreler olabileceğini düşündürmektedir (124). Tavşanda limbal epitel yokluğunda korneal yara iyileşmesi gecikir(61).Ancak spesifik hücre işaretleyici(leri) olmadığından, doğrudan limbal kök hücre varlığına dair kanıt yoktur. Rat korneasında sadece limbal

kök hücrelerine bağlanan monoklonal antikor(4G10.3) korneal epitel hücrelerinin 50kD proteini ile reaksiyona girer (150).

Rat da gelişim sırasında korneal epitel kök hücreleri lokalizasyonuna ait bir çalışmada , kök hücrelerinin 4G10.3 ile reaksiyona girmesi durumu doğumdan sonraki 1,5 haftaya kadar hem kornea bazal kat hücreleri , hem de limbal epitel bazal hücreleri ile olmuştur (26). Bu andan sonra ise sadece limbal epitel bazal hücrelerinin 4G10.3 ile immünreaksiyonu gösterilebilmiştir. Böylece yetişkin korneasında limbustaki bazal hücreler kök hücreleri olarak görülmektedir.

II.3.4) Ekstrasellüler Matriks;

Kornea birçok hücre dışı matriks içerir. Bunlar kornea devamı ve onarımında esansiyel roller oynarlar. Epitelyal yara iyileşmesinin de ilk faz ,geçici hücre dışı matriks üzerinde epitelyal hücrelerin tutunma ve migrasyonudur (17,57).

Fibronektin

Epitelyal yara iyileşmesinin ilk fazında geçici ekstrasellüler matriks olarak fibronektin önemli bir rol oynar. Yaralanmamış normal kornea da , laminin ve tip IV kollajen (Fakat fibronektin değil.) bazal membran majör komponentleridir. Epitelyal hasar sonrası aşınmış yüzeyde kısa bir sürede fibronektin belirir (130,40,41). Korneal epitel hücreleri fibronektin matriks üzerine tutunur ve yayılırlar (98,19,92).Tavşan korneası organ kültüründe fibronektin, epitelyal migrasyonu stimüle eder ve korneal epitel hücreleri için kemotaktik ve haptotaktik aktiviteye sahiptir(88). Daha önce söylendiği gibi tavşan korneal epitel hücrelerinde adezyonu yalnız Arginine-Glycine-Aspartate (RGD)

içeren fibronectinin 75 kD fragmanı değil ,aynı zamanda fibronectinin "adezyon/heparin bağlayan " fragmanı (33/66 kD) da yapmaktadır (88).

İntegrinler

Eksrasellüler fibronektine cevaben, korneal epitel hücrelerinin fibronektin için hücre yüzey reseptörleri eksprese etmesi gerekir. İntegrinler hücre dışı matriks proteinleri için bir hücre yüzeyi reseptörleri ailesidir(118). İntegrin α ve β alt ünitelerine sahip bir heterodimerdir. Son birkaç yıldır çeşitli α (11 tip) tipleri ile çeşitli β (6 tip) tipleri rapor edilmiştir. α ve β kombinasyonu eksrasellüler proteinlerinin bağlanma spesifikliğini belirler. $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha V \beta 1$, $\alpha IIb \beta 3$ 'ün günümüzde fibronektine bağlandığı bilinmektedir. Bunlarda ,fibronectinin bağlanmasını RGD dizini sağlar. Korneal epitel yara iyileşmesi sürecinde $\beta 1$ integrinlerin görülmesi ve kaybolması iyi bir şekilde koordine edilir (91). Bir insizyon sonrasında derhal stroma da "V" şeklinde bir yüzey kusurundan fibronektin görülebilirdi. $\beta 1$ integrin eksprese eden epitel hücresi kusuru doldurmak için üzerinden göçmeye başlar. İyileşme hemen hemen tamamlandığında ise epitel hücrelerin de $\beta 1$ integrin boyanması bazal hücreler hariç azalmıştır. Yeni epitel ve stroma arasındaki yüzeyde fibronektin boyanması azalmıştır. Fibronektin, hücre tutunması ve migrasyonu için yeterli bir eksrasellüler matriks temin eder ve epitelyal hücreler artmış integrin ifadenmesinde hücre dışı fibronektine daha hassas olurlar.

Korneal epitel yara iyileşmesi sırasında hücre dışı fibronektin ve hücre yüzey integrinleri ilişkisini daha iyi anlamada, korneal epitel hücrelerinde integrin ifadenmesinin düzenleyici mekanizmasını(larını) anlamak önemli olabilir. Tavşan korneal hücre kültüründe fibronektin matriks'e tutunma, sentetik fibronektin hücre

bağlama bölgesinin (GRGDS) varlığında inhibisyona uğrar(98). Sanki integrin bağlama kapasitesi dolmuş gibidir. Taze olarak normal-yaralanma olmadan hazırlanan epitel hücreler , in vitro olarak fibronektine adezyon göstermemiştir. Bu da sanki normal korneal epitel hücrelerin de azalmış veya hiç olmayan integrin ifadenmesi varmış gibidir. Ancak epitel hücreleri kültüre edildiğinde fibronektin matrikse bağlanan hücre sayısı artmıştır. Bu sonuçlar kültüre edilen epitel hücrelerinde integrin ifadenmesinin arttığını düşündürmektedir (92). Korneal epitelyal hücreler integrin salgılar ve hücrelerin fibronektin matrikse tutunması $\beta 1$ integrine karşı olan antikor ile inhibe edilir(39). Aktif olarak iyileşme sürecinde göçen epitelyal hücreler, normal yaralanmamış epitel hücreleri veya iyileşmiş epitel hücrelerinde daha fazla integrin eksprese eder (97). Bu nedenle integrinlerin up-regülasyonu korneal epitel yara iyileşmesinde önemli düzenleyici rol oynayabilir.

EGF ve interlökin-6 korneal epitel hücrelerinde integrin ifadenmesini düzenler ve , in vitro ve in vivo olarak korneal epitel migrasyonunu stimüle eder(101,96,102,53). EGF veya interlökin-6 ile kültüre edilmiş tavşan korneal epitel hücrelerinin preinkübasyonu , fibronektin matrikse tutunan hücre sayılarını önemli ölçüde artırır(96).

Günümüzde, korneal epitelin iyi organize olması, normal tabakalanmasının sağlanması için bazal membranın önemli olduğuna inanılmaktadır. Epitel hücreleri altında ki stroma hücreleri arasında bazal membran mevcudiyeti epitel hücrelerinin polaritesini belirler. Bunun ötesinde , bazal membran hücre migrasyonu için uygun bir matriks de sağlamış olur. Böylece bazal membran integrin fonksiyonunda bir rol oynayabilir.

Hyaluronan (Hyaluronik asit)

Hyaluronan kornea hücre dışı matriksinde önemli bir bileşendir. Hyaluronan hücre migrasyonunun yer aldığı yara iyileşmesi ve inflamasyonda önemli bir rol oynar. Bu nedenle hyaluronan günümüzde biyolojik bir sinyal olarak düşünülür.

Hyaluronan normal kornea da bulunmaz. Diğer keratan sülfat ve kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikanlar korneal stromanın majör bileşenleridir. Eksimer laser süperfisiyel keratotomiden sonra 8-60 günde hyaluronan miktarı artar(39). Korneanın alkali yanığından sonra hyaluronan da belirgin artış rapor edilmiştir(37). Bu bulgular hyaluronan'ın korneal yara iyileşmesinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Gerçekten de araştırılan çeşitli glikozaminoglikanlar arasında sadece hyaluronan ,organ kültür modellerinde korneal epitel migrasyonunu stimüle etmiştir. Diğer kondroitin sülfat, kondroitin ve keratan sülfat gibi glikozaminoglikanlar epitel migrasyonunu etkilememiştir. Hatta heparan sülfat inhibe etmiştir (99). İn vivo olarak epitelyal debridmandan sonra hyaluronanlı göz damlalarının uygulanması, korneal epitel yara kapanmasını artırır (131,93). Hyaluronan'ın korneal epitel yara kapanmasındaki stimülasyon etkileri konsantrasyona bağımlı fakat hyaluronan'ın moleküler ağırlığından bağımsızdır(93).

Proteolitik enzimler,

Proteolitik enzimler iyileşme sürecinde önemli bir rol oynar. Aktif hücresel motilite için, hücreler ve altındaki hücre dışı matriks arasındaki bağlantı çok katı olamaz. Hücre dışı matriks'in degradasyonu bu süreç için gereklidir. Böylelikle hücre motilitesi için siklik olarak hücrelerin hücre dışı matrikse yapışma ve ayrılması

gerekir. Plazminojen aktivatörleri gibi proteazların göz yaşında olduğu rapor edilmiştir (7). Serine proteaz inhibitör, aprotinin ve fenilmetilsulfonil gibi proteaz inhibitörler epitel migrasyonunu inhibe eder (151).Epitelyal migrasyon ve urokinaz tipinde plazminojen aktivatörleri arasında belirgin ve doğrudan bir korelasyon vardır.

II.3.5) Nöral Regülasyon;

Korneal epitelin normal bütünlüğünün sağlanmasında, yara iyileşme süreci boyunca sürekli yenileme gerekir. Epitel yara iyileşmesi sırasında ki çeşitli basamaklar arasında ,epitelyal migrasyon, başarılı ve komple olarak kusurların kapatılmasında başlangıç basamağıdır. Korneal epitel migrasyonda EGF ve fibronektin gibi hücre dışı matriks proteinlerinin önemli rolleri yayınlanmıştır. İnterlökin-6'nın korneal epitel migrasyonunu uyarması, korneal epitel hücrelerinde fibronektin reseptörlerinin up-regülasyonunu sağlamasıyla oluyor gözükmetedir (103). Fibronektin ve EGF'nin etki mekanizmaları değişiktir. Ancak her ikisi de korneal epitel migrasyonunu stimule eder(100). EGF'nin epitelyal migrasyon stimülatör etkisi fibronektine karşı antibodinin ortama eklenmesi ile inhibe edilir. EGF tarafından stimüle edilen kültür ortamında ki korneal epitel hücrelerinin fibronektin matrikse tutunması, fibronektin reseptörlerinin (belki de integrin $\alpha 5\beta 1$) up-regülasyonu şeklinde görünmektedir. Böylece EGF etkisinin görülmesinde fibronektin-integrin sistemi aracılık ediyor olabilir. Bunun ötesinde EGF hücre proliferasyonunu stimüle eder.

Korneada immunohistokimyasal arştırmalarla yoğun ağlar şeklinde substance-P (SP) pozitif sinir lifleri rapor edilmiştir(87). SP duyu sinir liflerinin bir bileşenidir ve plazma ekstravazasyonunu , damar vazodilatasyonu ve mast hücresel histami salınımı gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara aracılık ettiği ileri sürülür. Ayrıca SP'nin diğer dokularda ki gibi çeşitli stimuluslara gözle ilgili sinirsel yanıtlarda anahtar rol oynadığı düşünülür. Gözün trigeminal siniri denervasyonu ile erişkin fare korneasında SP düzeyi %40 azalır (23).Trigeminal sinirin kesilmesi ,korneada SP azalması yanında trofik veya dejeneratif değişikliklere neden olur.Yani, SP korneal epitel normal bütünlüğünün sağlanması düzenleyici mekanizmaları etkileyebilir. Gerçekten de herpetik keratitis gibi çeşitli tip korneal hastalıklardan sonra korneal sensitivite azalır ve bu hiperestetik ve anestetik kornealarda sıklıkla kusur gelişir. Topikal anestetiklerin bir organ kültür sisteminde epitel migrasyonunu bozması, korneal epitelin onarım ve devamı için aktif nöronal düzenlenme olasılığını düşündürür(12).

Korneaya invazyonun fizyolojik rolü hala kesin değildir. Ancak korneal hassasiyet kaybı, korneanın normal integrasyonunun bozulmasına yol açar. Herpes simpleks, herpes zoster gibi korneal hassasiyeti azalmış hastalarla , diabetes mellitus'da ,persistan korneal kusurlar veya gecikmiş epitelyal yara iyileşmesi sıklıkla olur. Ayrıca anestetik gözde , belirgin ülserasyon oluşabilir. Bu klinik bulgular ışığında korneanın normal bütünlüğünün sağlanması , korneal innervasyonun önemli olabileceği görülmektedir. Ancak kornea fizyolojisinde nöral fonksiyonun kesin rolü henüz tam ortaya konmamıştır.

II.3.6) Hümmoral Regölasyon;

Epidermal Büyüme Faktörü

Büyüme faktörleri ve hücredişı matriks korneal yara iyileşmesinin de içinde yer aldığı çeşitli fizyolojik hücre fonksiyonlarını regüle eder. Çeşitli büyüme faktörleri arasında EGF'nin epitelyal yara kapanmasını hızlandırdığı bilinmektedir. EGF 53 aa'lik bir polipeptid olup, birçok hücre tiplerinin proliferasyonunu stimüle eder. Ho ve arkadaşları tarafından ilk kez EGF'nin tavşanda korneal epitel yara kapanmasını stimüle ettiği rapor edilmiştir. Bu rapordan sonra, normal ve diabetik korneada EGF'nin stimülatör etkisinin korneal epitelyal yara iyileşmesine etkisi açık bir şekilde ortaya konmuştur. EGF'nin gözyaşı sıvısı ve , idrar, kan plazması ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında ki varlığı rapor edilmiştir. PCR(Çoklu zincir Reaksiyonu) tekniği ile korneal epitel hücrelerinin EGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) ve TGF- β 1(transforming growth factor- β 1) mRNA'ları ürettiğinin gösterilmesi ,gözyaşı sıvısındaki eksojen EGF etkisine ilave olarak korneal epitel hücrelerde otokrin ve parakrin yollarıda düşündürmektedir(148).

Korneal epitel hücrelerinde EGF reseptörlerinin varlığı, radyolojik olarak işaretli EGF'nin hücrelere bağlanmasının ölçülmesi ile rapor edilmiş ve radyolojik işaretli EGF'nin intraperitoneal uygulanmasından sonra da akümülyasyon gözlenmiştir. Korneal hücrelerde EGF reseptörlerinin araştırılmasında korneal hücreler de EGF için 2 tip reseptör varlığı tespit edilmiştir. Yüksek afinite reseptörleri (0,034nm) $2,79 \times 10^4$ /hücre

adet bulunurken, düşük afinite reseptörleri ($0,7\text{nm}$) $13,4 \times 10^4$ /hücre adet bulunurlar. EGF hücre proliferasyonu etkisini sadece artmış DNA sentezi ile stimüle etmekle kalmayıp diğer birçok foksiyonuda vardır. Örneğin, tavşan korneal epitel hücresinin fibronektin matrikse tutunmasını stimüle eder (96). EGF'nin gerçekten integrinler için mRNA'yı artırıp arttırmadığı kanıtlanmamıştır. Fakat EGF tarafından stimule edilen korneal reepitelizasyonun integrin veya fibronektin reseptör sistemi ifadenmesine bağlı olduğuna dair bulgular vardır.

EGF'nin gözyaşı sıvısında olmasından dolayı, korneal epitel sürekli EGF'ye maruz kalır. Eğer EGF epitel hücre proliferasyonunu uyarıyorsa, epitelin normal kalınlık ve fonksiyonlarında devamlılık için bu etkiye zıt etkide faktörler gerekir. Aksi halde EGF epitel hiperplazisi yapabilir. EGF ile uyarılan proliferasyon, fibronektine tutunma ve migrasyon TGF- β tarafından düzenlenir. TGF- β tek başına hücre proliferasyonunu inhibe eder ve proliferasyonda EGF'nin stimulatör etkisine ters çalışır. Aslında TGF- β 'nin fibronektin matriks'e hücre tutunmasına ve epitel migrasyonuna bir etkisi yoktur. TGF- β 'nin sadece EGF'nin stimulatör etkilerine karşı etkimesi , epitel hücreleri üzerinde EGF fonksiyonları için TGF- β 'nin negatif bir faktör olabileceğini ortaya koyar.

Diğer büyüme faktörleri

b-FGF (basic fibroblast growth factor) mezoderm ve nöroektoderm originli çeşitli hücrelerin proliferasyonunu stimule eden diğer bir polipeptid büyüme faktörüdür.

Korneal epitel hücreler PDGF-b reseptörler (Platelet derived growth factor b type) ve PDGF-a eksprese ederler. Gerçekten de PDGF-BB veya PDGF-AB ilavesi sitozol serbest konsantrasyonunu artırır(53).

II.3.7) Hücre içi Sinyal Transdüksiyonu ;

Hücre şekil ve fonksiyonu değişiklikleri için sinyalin hücreye aktarımı önemlidir. PKC (Protein kinaz C) fosfolipid bağımlı bir enzimdir ve PKA, PKG'de önemli bir sinyal dönüştürücü sistemdir.

Hücre içi PKC aktivitesi inhibe edildiğinde, korneal epitel göçün belirgin şekilde bozulması PKC transdüksiyon sinyal sisteminin epitel migrasyon ve epitel yara iyileşmesinde önemli rolü olduğunu düşündürür. PKC'nin birçok alt tipinden α -PKC korneal epitelde çoktur ve epitel yara iyileşmesinde artar.

II.4) EGF ve EGF'nin Oküler Yara İyileşmesine Etkisi :

Epidermal büyüme faktörü (EGF) bir çok memeli türünün değişik doku ve vücut sıvılarında bulunan(32), 53 aminoasitten oluşmuş mitojenik bir polipeptittir(31). Tek zincirden oluşan, molekül ağırlığı(114) 6000 olan bu polipeptit yapıda, 1-20, 14-31 ve 32-53, aminoasitler arasında disülfid bağları bulunmaktadır. EGF ilk kez 1962 yılında farelerin tükrük bezlerinden izole edilmiştir(70,38). Yara iyileşmesini hızlandırmak için potansiyel olarak incelenen büyüme faktörlerinden biridir. En fazla mezodermal hücreler tarafından salgılanan EGF, korneal endotelial hücreler, fibroblastlar ve sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahiptir. Aynı zamanda bir sitokin olan EGF, embriyogenezis, yeni kan damarlarının oluşması ile doku ve vasküler sistemin tamirinde önemli fonksiyonlara sahiptir(70). Sıçan ve farelerde erken dış çıkışı

ve göz kapağı açılışına, tavşan ve koyunlarda mide asit sekresyonu inhibisyonuna, akciğer gelişiminin hızlanmasına neden olur. EGF' nün amnion hücrelerinde, A 431 (insan vulvar epidermoid karsinoma) hücrelerinde ve yara iyileşmesi süresince PGE₂ (Prostaglandin E₂)sentezini arttırdığı bildirilmiştir(54). Ayrıca EGF' nün işlevleri arasında DNA sentezini ve hücre çoğalmasını başlatma, RNA ve protein sentezinin aktivasyonu ile hücre dışı makromoleküllerin sentezinin aktivasyonu da bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda insan ve fare kaynaklı EGF yapılarının aynı olmadığı, fakat biyolojik aktivitelerinin ise aynı olduğu bulunmuştur(20).

EGF'nün kanserle ilişkisi reseptör düzeyinde birçok tümör çeşidinde , hücre kültürlerinde deney hayvanlarında incelenmiştir. Hücre dışı, hücre zarı ve hücre içi kısımlar taşıyan EGF reseptörünün SRC onkojen ailesi ile birçok bölge açısından homoloji gösterdiği bilinmektedir.

EGF hücresel düzeyde etkisini gösterebilmek için reseptörüne bağlanarak hücre içi bazı olayların tetiklenmesini sağlar(Şekil.1.).

Günümüze kadar yapılan bu çalışmalara bakılarak EGF' nün etkisini üç ana başlıkta toplamak mümkündür(107). Bunlar :

- 1- Normal büyümeye olan etkisi
- 2- Neoplastik büyümedeki rolü
- 3- Yara iyileşmesindeki etkisi.

Yara İyileşme Süreci ;

Şekil 2' de görüldüğü gibi yara iyileşmesi başlıca üç fazla gerçekleşmektedir(75). Bunlar :

- a) Enflamasyon fazı (0-3 gün)
- b) Hücre üretim fazı (3-12 gün)
- c) Yeniden oluşum fazı (3 gün - 6 ay)

İyileşme olayı aslında birinin içinde öbürünün evrimleştiği süreçlerden oluşan bir bütündür(105).

a) Enflamasyon fazı

İyileşme yara civarındaki damarların dilate olması ve kanın yaralı bölgeye sızmasıyla başlar. Damar dışına çıkan trombositlerin, damar dışındaki dokulara ve kalıntılara yapışması sonucu pıhtılaşma görülür. Bunun sonucunda trombositlerden, trombosit kökenli büyüme faktörleri (Platelet Derived Growth Factor; PDGF), α ve β dönüştürücü büyüme faktörleri (Transforming Growth Factors; TGF- α , TGF- β) gibi faktörler salıverilir(75,67). Enflamasyon hücreleri, yara bölgelerindeki nötrofiller, bunları takip eden lenfositler, monositler ve makrofajlardır(75).

b) Hücre Üretim Fazı

Bu faz, yeni kan damarlarının ve granülasyon dokusu adı verilen yeni dokunun oluşmasıyla ilişkilidir. Hücre üretim fazı boyunca fibroblastlar, endotelial hücreler ve epitel hücreleri yaralı bölgeye doğru göç ederler. Hücrelerin bu hareketi, trombosit agregasyonu süresince kemotaktik faktörler tarafından da stimüle edilir. Diğer faktörler ise, plazminojen aktivatörü, limfokinazlar, iltihap sekresyon ürünleri (hiyaluronik asit), makrofaj sekresyon ürünleri(interlökin-1; IL-1) ve endotelial hücrelerin üretimine yardım ederler. Başlangıçta, hücre dışı matriksin granülasyon dokusu, küçük miktarda

kollajen iplikçikleri, büyük miktarda interfibriler matriks ve değişik sayıda enflamasyon hücrelerini içerir.

Başlangıçta granüler doku oldukça çok damar içermektedir. Bununla birlikte, yara dokusu sonradan damarsız hale dönüşür. Epitel hücreleri ve makrofajlardan salıverilen anjiyogenik faktörler ve hücre dışı matriksteki heparin, yeni kan damarlarının oluşumunda rol oynamaktadır. Yeniden epitel oluşumu erken saatler içinde başlar(75).

c) Yeniden Oluşum Fazı

Yara iyileşmesinin en son fazıdır. Bu faz süresince elastin ve kollajen iplikçiklerinin her ikisinin de dokuda yerleşmesi, granülasyon dokusunun damarsızlaşmasını etkiler. Eski kollajen ile aynı zamanda üretilen yeni kollajen, yara oluşumu süresince kollajenaz ve diğer enzimleri azaltıcı yönde etki gösterir. Yaralı doku bulunduğu yere ve koşullara bağlı olmak üzere en geç birkaç ay içinde tamir edilir(75).

Epitelizasyon tamamlandığında sürecin devamını sağlayan bu faktörün üretimi, şimdilik ayrıntısını bilmediğimiz bir mekanizmayla durur(105).

Epidermal Büyüme Faktörü'nün Yara İyileşmesinde Kullanılması ;

EGF' nün korneal endotelial hücreler, fibroblastlar, sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahip olması, gastrik asit sekresyonunu inhibe etmesi yanında embriyonun gelişmesi ve yeni kan damarlarının oluşması üzerinde etkili bulunması sonucu, üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır(70). Bu çalışmalar özellikle dermal yara(54) ve yanıkların(28), oküler(20) ve gastrointestinal sistem yaralarının iyileştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

EGF' nün Oküler Yara İyileşmesinde Etkisi ;

Bazı Avrupa ülkelerinde EGF' nün göz yaralarında yerel tedavi olarak uygulanmasına izin verilmiştir. ABD'de ise ilacın çok çeşitli yaralardaki kullanımı sınırlanmaktadır(105).

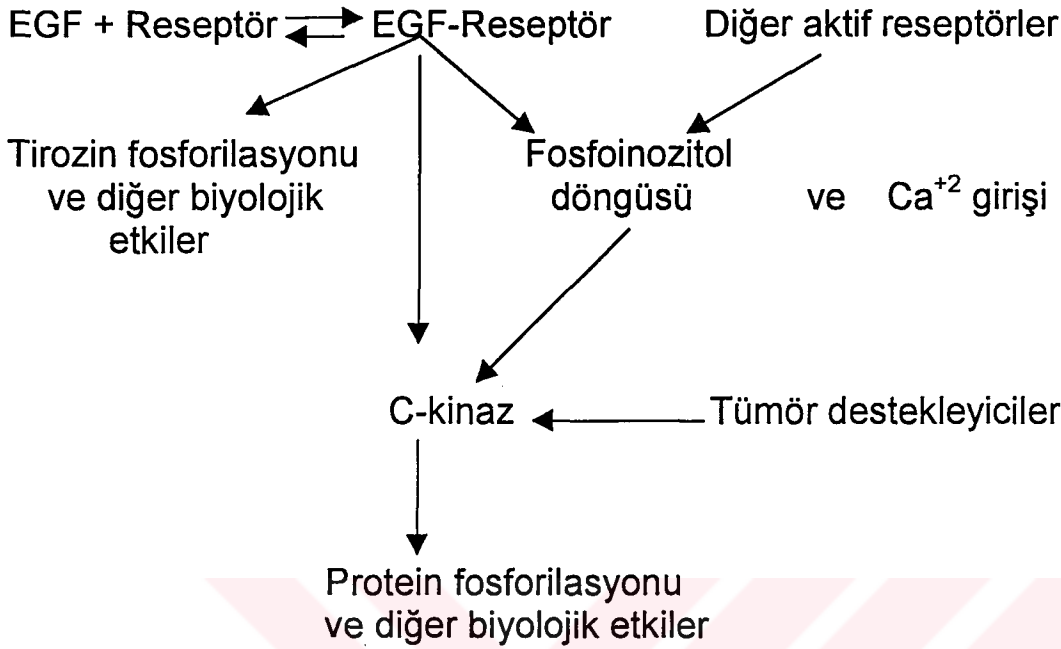
Cellini ve arkadaşları EGF içeren ticari bir preparatı herpetik korneal ülseri olan hastalara uygulamışlardır. Bu çalışma, iki grup toplam 40 hastada plasebo-kontrol grupları oluşturularak çift kör uygulamalar şeklinde yapılmıştır. Bu preparatın uygulanması ile epitel dokunun yenilenmesinin kontrol grubuna oranla daha hızlı olduğu, EGF' nün de iyi tolere edildiği gözlenmiştir. Sonuçta herpetik korneal ülseri olanlarda EGF' nün iyileşme süresini azalttığı gözlenmiştir(20).

EGF' nün korneal yara üzerindeki etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, fare-EGF (1mg/L) ve insan-EGF (1-100 mg/L) içeren tampon çözeltiler tavşanlarda oluşturulan korneal yaralara uygulanmasıdır. Kontrol grubuna sadece pH 7.4 tampon çözeltisinin uygulandığı bu çalışmada, çözeltiler günde 1,2 ya da 4 kez olacak şekilde uygulanmıştır. Topikal uygulamadan 9 gün sonra gerek fare, gerekse insan-EGF' nün korneal yara üzerinde etkili olduğu bulunmuş ve intraoküler basıncın anlamlı olacak şekilde arttığı gözlenmiştir. İnsan-EGF' nün 10 mg/L konsantrasyonda günde iki kez uygulanması neticesinde, maksimum etki sağlandığı görülmüştür(67).

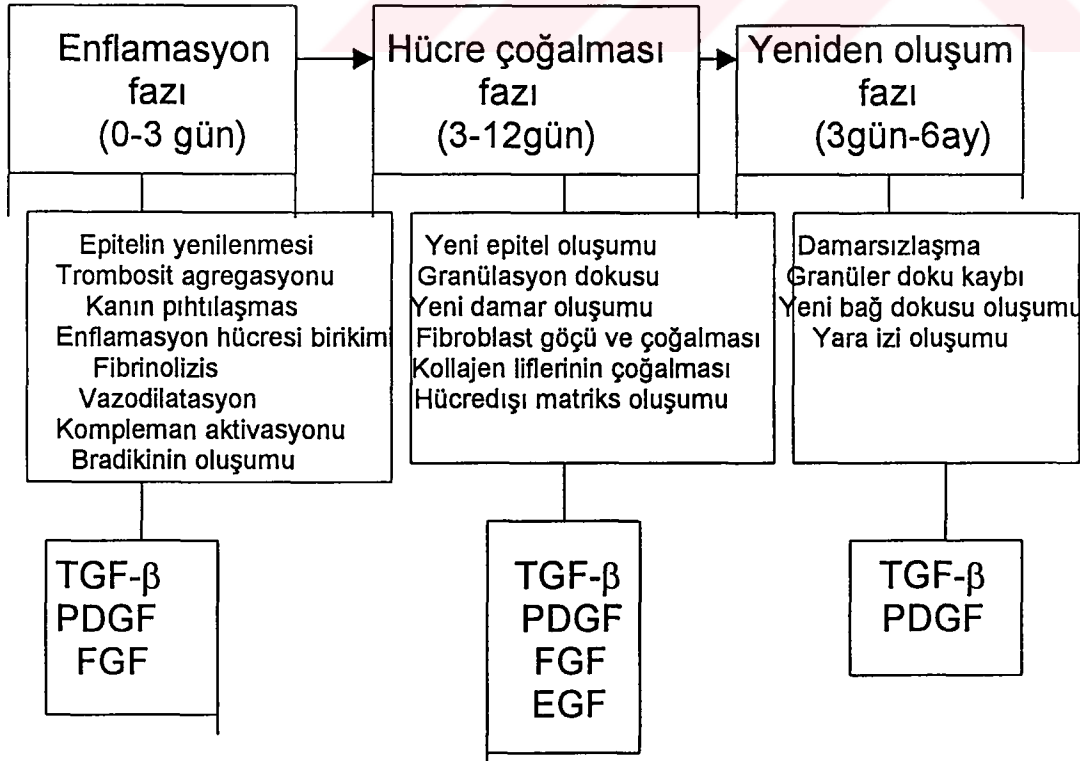
Farelerde oluşturulmuş korneal alkali yanıklarına EGF dozaj formlarının etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, araştırmacılar yaptıkları incelemeler sonucunda çözelti tipi preparatın yara çapında yapmış olduğu azalma karbopol 940 jeliyle hazırlanan preparata oranla fazla olmuştur. Korneal yara iyileşmesi sırasında bütün

gruPlarda histolojik çalışma yapılarak sonuçlar birbiriyle kıyaslanmıştır. Çalışmada, 15. Günün sonunda yapılan histolojik incelemeler sonunda, epitelyum tabakasının, kontrol grubunun ince, buna karşın % 0.9 NaCl zeltisi ile tedavi edilen grupta düzensiz, jel tipi preparatla tedavi edilen grupta ise diffüz vakuoller taşıdığı görülmüştür. EGF içeren jel uygulanmış fareler de atipik hücreler ve hücre içi vakuoller oluşmuştur. EGF zeltisi uygulanmış fareler ise, epitel hücrelerinin normal görünüşte ve tabakalı olduğu görülmüştür(68).





Şekil.1. EGF'nin reseptörüne bağlanması ile hücrede başlatılan olaylar. EGF reseptörüne bağlanınca tirozin kalıntıları üzerinde protein fosforilasyonu ve fosfoinozitol (PI) döngüsünün stimülasyonunu sağlar. PI döngüsü veya tümör oluşumunu destekleyen faktörler protein kinaz C 'yi aktive ederler, bu da geri dönüşümlü inhibisyon ile reseptörü inhibe eder.



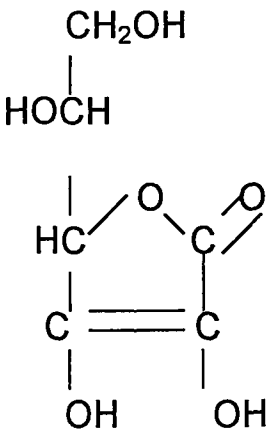
Şekil.2. Doku yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri için yollar(75).

II.5) Gözde Askorbik Asit :

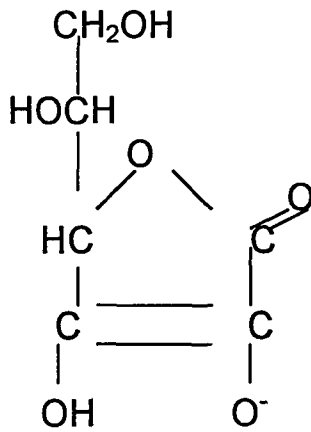
II.5.1) AA'in Genel Özellikleri(62) :

C vitamini olarak bilinen Askorbik asidin (AA) yaşam için gerekliliği 17.yy başından beri bilinmektedir. AA yetersizliğinin yol açtığı skorbüte benzer bir hastalık ilk olarak eski Mısırlılar tarafından bulunmuştur. Szent-Georgy ve King, 1932 yılında spesifik antiskorbutik faktör olarak AA' i tanımlamışlardır(76).

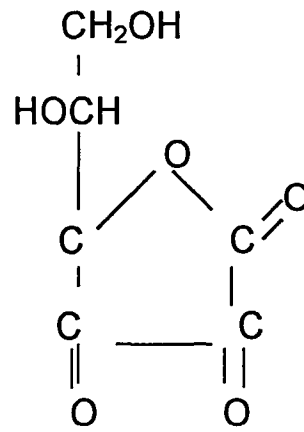
AA, $C_6H_8O_6$ formülünde moleküler ağırlığı 176.1 olan bir ketalaktondur. Zayıf dibazik bir asittir. Fiziksel koşullarda çoğunlukla askorbat anyonu şeklinde bulunur. Beyaz sarı kristaller ya da toz halindedir. Suda veya alkolde çözülebilir, kloroform, eter ve benzende çözülemez. Erime noktası $189-192^{\circ}C$ dir(126). Sulu solüsyonu polarize ışığı $+23^{\circ}C$ sağı çevirir, L(+)-AA ve D(+)-AA olmak üzere iki şekli vardır (2).



Askorbik Asit



Askorbik Asit Radikali

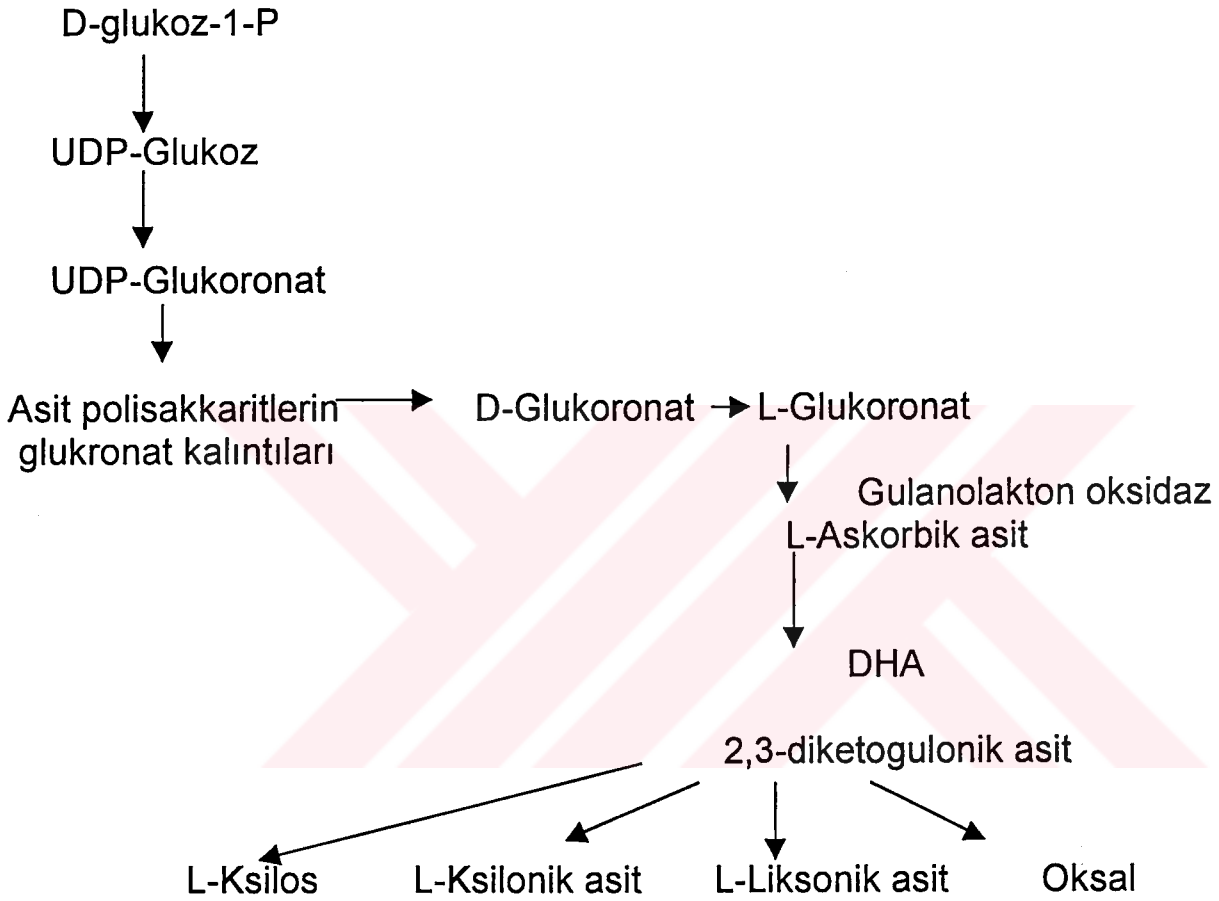


Dehidroaskorbik Asit

Şekil-3 Askorbik Asit(76)

AA'in kritik fonksiyonu elektron verme yeteneğinden kaynaklanır(79). AA, öncelikle $1e^-$, 2 proton kaybederek askorbat serbest radikali(Semidehidroaskorbik asit) birden fazla e- kaybettiğinde ise dehidroaskorbik asite (DHA) dönüşür(71). Dolayısıyla AA, reverizbl ve iki aşamalı bir reaksiyonla dehidroaskorbik asite çevrilmiş olur. DHA, serbest askorbat radikali için rezervdir(76).

AA'in oksidasyonunda ilk kimyasal olarak stabil ürün, DHA'dır. Ancak fizyolojik pH'da örneğin pH 7'de DHA'in yarılanma ömrü birkaç dakika gibi kısa bir süredir. Bu pH'da stabil olmadığı için hidrolize olarak 2-3 diketogulonik asite değişir ve antiskorbutik özelliğini kaybeder. pH 2-3'de ise aköz solüsyonlarda 24 saat süreyle stabil olduğu rapor edilmiştir(76,137). AA sentezinde üronik asit ara yolu kullanılmaktadır ve öncül madde Üridin difosfat(UDP)- glukozdur(14,13).



Şekil- 4 : AA Sentez ve Yıkım Şeması(104).

AA'in yarılanma ömrü, insanda 12.8-29.5 gün, kobayda 2.5-6 gün, ratda ise 2.9-3.6 gündür(77). Sentezi için gerekli olan gulanolakton oksidaz enzimi insan, kobay, maymun, bazı kuş ve balıklarda olmadığı için bu tür canlılar diyet ile AA almak zorundadırlar(18,76) .

AA güçlü bir indirgeyicidir ve dehidroaskorbik asit ile redoks sistemi oluştururlar. Standart şartlarda oksidan ve redüktan kapasite eşittir. Ancak fizyolojik şartlarda bu

eşitlik sağlanamadığı için, AA elektron donörü olarak görev yapar. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde AA'in en önemli fonksiyonu hidrojen taşıyıcısı olarak rol oynamasıdır(76).

AA konsantrasyona bağlı olarak potent zincirkıran bir antioksidandır, in vivo ve in vitro şartlarda görev alır.Aktif ve stabil oksijen radikal süpürücü olarak primer korunma oluşturur (95).

Belli şartlar altında özellikle metal iyonlarının varlığında AA prooksidan bir rol oynar. Güçlü redüksiyon özelliğinden dolayı ferrik iyonları(Fe^{+3}), daha aktif ferröz (Fe^{+2}) iyonlara indirger .

AA pekçok enzimin aktivitesinde etkilidir. Redükte edici ajanların bir kısmı veya tüm enzim aktiviteleri AA ile sağlanır.

Tablo.1. AA'in etkilediği enzimatik reaksiyonlar (77,106).

Kollajen sentezi	Prolinin hidroksilasyonu
	Lizinin hidroksilasyonu
Karnitin biyosentezi	Trimetil lizinin hidroksilasyonu
Noradrenalin biyosentezi	Dopaminin hidroksilasyonu
İnaktif Prekürsörlerin aktif amidasyonu	C Terminal Glisin ile peptitlerin amidasyonu
Tirozin Katabolizması	Homogentisatın 4-hidroksifenil piruvata çevrilmesi
Sefalosporin sentezi	

AA'in en iyi bilinen işlevi, prokollajenin hidroksilasyonunu sağlayan prolil ve lizil hidroksilazların inaktif ön maddelerinin aktivasyonudur. Bu nedenle AA eksikliğinde prolinden hidroksiprolin oluşamamaktadır. Çünkü yetersiz bir şekilde hidroksillenmiş ön maddeler kararlı bir sarmal yapıda kalamadıklarından ve yeterli çapraz bağları kuramadıklarından, fibroblastlardan çok az salgılanır. Bu tip kollajen elastik özellikten yoksundur. AA eksikliğinde oluşan skorbüt, kollajen proteininin kusurlu yapılmasına bağlıdır. Sonuçta damar duvarı yapısı osteoid doku sentezi ve yara iyileşmesinde bozukluklara neden olur(116). İn vitro çalışmalarda , askorbatın fibroblastlar aracılığı ile kollajen sentezini arttırdığı ve nonmitotik fibroblastlarda kollajen sentezini gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Doku kültürlerine AA eklenmesi, fibroblastların hidroksilaz aktivitesini harekete geçirmektedir(30).

α -Melanotropin, γ -melanotropin, kalsitonin,Kortikotropin serbestleştirici hormon(CRH) , pro-adrenokotrikotropik hormon(proACTH), vazopressin, oksitosin, substans P, gastrin gibi peptid hormonların aktif hale geçmesi için α amidasyona uğraması gereklidir. Bu işlemi yapan α amide edici monooksijenaz enzimi, tiroid, pituiter, submaksiller bezler ve beyin gibi nöroendokrin dokularda bulunmaktadır. Peptidlerin C terminalinde glisin ile amitlenmesi reaksiyonunda bir redüktan ve O_2 gereklidir. Bu işlem için askorbat en iyi indirgeyici maddedir (77,106).

İnsanlarda kornea, lens, kalp, beyin, karaciğer, dalak, timus, böbrek, pankreas AA yönünden zengin organlardır(60,76). Ancak AA'den zengin dokuların başında adrenal ve hipofiz bezi gelmektedir (76,122). Bazı dokularda vitamin alımına bağlı değişiklikler

gözlenirken, beyindeki AA bundan etkilenmemekte, gözde ise ancak çok yüksek vitamin düzeylerinde artış olmaktadır(139) .

Oral yolla alınan AA müköz membranlar yoluyla absorbe edilir. Sentez yapabilen hayvanlarda ince bağırsaklardan emilimi basit difüzyon ile olurken, insan kobay gibi türlerde aktif transport sistemlerine ihtiyaç duyulur. AA'in dokulara taşınması da aktif transport ile gerçekleşmektedir(141). 250 mg veya daha düşük dozlarda alındığı zaman yaklaşık %80 'i kana geçer 2gr veya daha yüksek dozlarda alındığı zaman absorpsiyon % 50 oranında düşer(48). AA'in absorpsiyonundan sonra çeşitli dokulara ve kompartmanlara dağılımı yapılır. Doygunluk halinde plazmadaki AA konsantrasyonu 1,4 mg/dl' dir. Glomerülden süzülen AA tübülüslerden reabsorbe edilir. AA'in böbrekten atılması için glukoz gibi eşik değerinin aşılması gereklidir(65).

AA, fare karaciğeri ve böbreğinde, glukoz metabolizmasından, glukuronik asit ve gulonik asit oluşumu aracılığı ile sentez edilir. Bu nedenle vitaminin dışarıdan alınmasına ihtiyaç yoktur (14,13). Sentezi gerçekleştiren L-gulono- γ laktonoksidaz enziminin aktivitesi türden türe değişir(140).

Tablo.2. Yetişkin insanda AA doku konsantrasyonları (mg/100 gr doku) (77).

Adrenal gland	30-40
Pitüiter	40-50
Karaciğer	10-16
Dalak	10-15
Akciğer	7
Böbrekler	5-15
Tiroid	2
Kalp kası	5-15
İskelet kası	3-4
Beyin	10-15
Pankreas	10-15
Göz lensi	25-31
Plazma	0.4-1.0

Tablo.3. Diğer memelilerin sentezlediği AA miktarları (mg/kg/gün) (77).

Fare	33.6-275
Tavşan	22.1-226
Rat	39.1-198
Köpek	5.0-40
Kedi	4.0-4.8

Diyetle alınan miktar, fare karaciğerindeki AA sentezini etkilemektedir. İn vitro çalışmalar, hücre kültür ortamındaki veya kandaki vitamin yoğunluğunun , perfüze edilen fare karaciğerinde veya hepatositinde, sentez miktarını ayarladığını göstermiştir (139,141).

Hayvanlarda dışarıdan çok miktarda AA verildiği zaman, AA katabolizması ve bunun sonucunda oluşan CO₂ miktarının arttığı görülmüştür(128,141). Bu değişiklikler, doku AA düzeyini dolayısı ile metabolizma hızını kontrol etmeyi amaçlamaktadır. AA verilmesini takiben, plazma AA döngüsü hızlanmakta ve beyaz kürelerdeki AA düzeyleri normalin altına düşmektedir. Uzun süreli AA alınımları , fare ve ratların belli organlarındaki AA düzeylerinde düşmeye neden olmaktadır. Eksojen AA'in aşırı miktarları atılmakta, ancak çok küçük bir miktarı vücut depolarında kalmaktadır (141).

Farklı askorbat düzeyleri (AA % 0.076, 0.5 ve 8 artırılmış) ile beslenen farelerde, yüksek doz vitamin verilen grupta plazma, kalp, böbrek, akciğer ve dalak AA seviyesi yüksek bulunmuştur. Fakat % 0.076 AA eklenen diyetle beslenen grupta, karaciğer, akciğer ve dalak ; %0.5 ekli diyetle ise karaciğer ve kas AA düzeyleri düşmektedir. (141)

Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki 50 mg'lık tek AA dozu, fare karaciğer ve böbrek AA düzeyini düşürebilme yeteneğindedir. 50 mg/gün verilen ratlarda ise vitaminin kesilmesinden 24 saat sonra adrenal bezlerde ve karaciğerde kontrol gruplarına göre, AA seviyesi düşmektedir. Fare ve ratlarda yapılan bu çalışmalar, eksojen AA alımının kendi biyosentez, metabolizma ve eliminasyon mekanizmaları ile etkileştiğini göstermektedir(45).

Farelerde diyetle %1 ve 5'lik AA ilavesi ile yapılan bir çalışmaya göre, portal kandaki AA düzeyi, kalp kasına oranla önemli ölçüde yükselmektedir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar, karaciğerdeki AA sentezinin özellikle portal kandaki vitamin konsantrasyonu ile ayarlanabileceğini ileri sürmektedirler(140).

Dehidroaskorbik asit, AA'nın major metaboliti olduğu için AA metabolizmasının artışı, ara ürünün doku düzeylerini dolayısıyla DHA/AA oranlarını değiştirebilmektedir. Bu değişiklikler büyük olasılıkla, mitotik indeks ve patolojik durumları içeren hücre fizyolojisinin de göstergesidir. Genel olarak kabul edilen doku konsantrasyonları;

AA>DHA>DHA/AA oranı şeklindedir.

AA'yi %1 ve 5 arttırılmış diyetle beslenen farelerin, doku DHA düzeyleri incelendiğinde, %1 ilaveli diyetle böbrek, akciğer ve dalak DHA miktarları kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. %5 AA ilaveli grupta ise bu organların yanı sıra beyin ve karaciğer de DHA seviyesi artmıştır. Böbrek ve akciğerde DHA konsantrasyonunun öncelikle artması, bu iki organın AA'nın eliminasyon ve katabolizmasında ayrıcalıklı bölgeler olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli hastalıklardan etkilenmiş kobay ve insanlarda kandaki düzeyi yükselmektedir. Diğer taraftan bu metabolitin fazla dozları ratlar için diyabetojenik ve toksiktir (141).

Son dönemlerde bazı yazarlar askorbatın, insan kan plazmasında aköz-faz antioksidan olarak çok etkili olduğu görüşündedir. Plazma aköz peroksil radikallerine maruz kalmışsa, askorbat lipid peroksidasyonunu önleme yeteneğine sahip olmaktadır. Oysa plazma diğer aköz antioksidanlar mevcut olduğu halde askorbattan yoksunsa, lipidlerde oksidatif hasar meydana gelmektedir. AA, aköz faz, E vit ise lipid

fazda etkili olarak hidroksil ve peroksil radikalleri gibi serbest radikallerle etkileşirler. Vitamin E , hücre membranında primer, lipide eriyen zincir kırıcı antioksidandır(48).

AA, E Vit'in yenilenmesinde görev almaktadır. Askorbat radikali (Semidehidroaskorbik asit) NAD^+ tarafından enzimatik olarak yeniden redüksiyona uğratılarak AA'e dönüşür. Bu mekanizmayla E vitamininin antioksidan fonksiyonları sürekli hale getirilir.

Glutasyon (GSH) , birçok hücreyel olayda önemli rol oynayan bir tripeptiddir. Hücrelerin serbest oksijen radikallerine karşı korunması hücreyi GSH sistemine bağıdır. AA, E Vit'i redükte forma çevirirken kendisi de oksitlenerek dehidroaskorbikasit şekline çevrilir. GSH dehidroaskorbik asidi rejenere eder. Bu nedenle GSH ile DHA arasında nonenzimatik bir etkileşim olduğu ileri sürülmekte ve bir redoks potansiyeli düşünülmektedir. Böylece GSH, AA ve E vit'nin sinerjistik etkilerine neden olan , sıralı oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları hücrelerde lipid peroksidasyonunu önlemeye hizmet etmektedir. GSH ve DHA arasındaki spontan, nonenzimatik reaksiyonlar AA'in hücreyel konsantrasyonunun sağlanmasında önemlidir ve olasılıkla antioksidan reaksiyonlara iştirak eden AA'in tüketimini engellemektedir(149).

II.5.2) AA'in Diğer Etkileri

AA metabolizması diabetes mellitusda anormaldir. Diabetik hayvan ve insanlarda hem doku hem de plazma AA konsantrasyonunun düştüğü rapor edilmiştir(84).

Bu vitaminin immunostimülatör, antienflamatuar ve antiallerjik özellikleri vardır. Günde 1gr'lık dozu serum IgM ve kompleman C3'ü belirgin olarak arttırdığı tesbit edilmiştir. İn vitro çalışmalarda AA'in lenfosit transformasyonunu ve polimorf nükleer lökosit motilitesini uyardığı görülmüştür(1,77).

Kolesterol metabolizması ve AA arasındaki ilişki ise çelişkilidir. AA yetmezliği olan hastalara, bu vitamin verildiği zaman serum kolesterol düzeylerinde belirgin artmalar veya düşmeler olmaktadır.

AA'in kimyasal karsinogenezlerle etkileşerek tümör büyümesini önlediği bilinmektedir. Özellikle nöroblastom ve malign melanom hücrelerinin normale dönmesini in vitro şartlarda stimüle etmektedir. Birçok kemoterapotik ajanın sitotoksitesini indüklemekte ve karsinojen nitrozamin oluşumunu bloke edebilmektedir.

Yüksek doz AA'in bazı ilaçların metabolizması ile etkileştiği, eritrosit 2,3 difosfogliserat üretimini stimüle ettiği, dekubitus ülserlerinin iyileşmesini hızlandığı, oksalat ve ürat tipinde üriner taşların oluşumuna neden olduğu yapılan çalışmalarla saptanmıştır(77). Katarakt oluşumunun önlenmesinde, periodontal hastalıkların ve romatoid artritin patogenezinde rolü bulunmaktadır(106).

Radyoaktif ışınları tarafından hasara uğramış memeli hücrelerindeki transformasyonlar üzerinde, askorbik asidin baskılayıcı etkilerini gösteren çalışmalar vardır. AA alınımlı, radyasyondan korunma ve tedavide ışın koruyucu bir etki yaratabilmektedir (87).

ABD'de ulusal araştırma konseyi tarafından günlük önerilen AA miktarı 60mg'dır. Sigara içenlerde 100mg/gün AA, laktasyonda ise 150mg/gün AA artan dozlarda alınması tavsiye edilmiştir.

II.5.3) AA'in Gözdeki İlave Etkileri:

Kornea da oksidan olaylarda etkili olan AA başlıca aköz hümör'den temin edilir. Korneal endotel hücrelerinden AA'in aktif salınımı söz konusudur. Göz yaşı sıvısında ki antioksidan maddeler ve AA aköz hümöre göre görecekleri olarak daha azdır(113).

Lazer doku teması sonucu olan doku reaksiyonunda serbest radikal oluşumu ve kornea da aberasyona uğrayan bölgeye PMN hücre infiltrasyonu olmaktadır(73,109,11,59). Doku hasarı derecesini serbest radikal oluşumu ile lokal antioksidan savunma sisteminin arasındaki denge belirler. Otooksidatif zincir reaksiyonunun durmasında yani lipid peroksidasyonun sonlandırılmasında serbest radikal süpürücüler rol alır. Bunlar arasında en sık çalışılanlardan biri de AA'dir. Williams ve arkadaşları, inflamasyonun oküler dokuda AA'in metaloperoksidazları etkileyerek PMN lökosit aktivitesini inhibe ettiğini ortaya koymuştur(145).

Brubaker ve arkadaşları 2000 Haziran'ındaki bir yayınlarında AA'in insan korneasındaki düzeyini 1.33 ± 0.48 mg/gr yaş doku olarak belirttiği çalışmada, AA'in özellikle fazla UV ışınını absorbe eden korneal epitel bazal hücrelerinde etkili olduğu belirtilmiştir(16).

II.6) Oksidatif Stress ve Bedendeki Antioksidan Korunma Mekanizmaları ve Gözdeki Oksidan Olaylar :

Bedendeki metabolik olaylar sırasında oksijen kökenli radikaller oluşabilir. Oksijenin çoğu mitokondride ATP üretimi için kullanılır, ancak oksidatif fosforilasyon sırasında oksijen her zaman tam olarak indirgenmez. Böylece bir miktar süperoksit , hidrojen ve hidroksil radikali oluşur. Bunların tümü reaktif oksijen türleri (ROS) olarak sınıflandırılır ve serbest radikal diyede tanımlanan bu oksidatif stress'den sorumludurlar. ROS özellikle biyolojik membranlarda ve kanda doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna (LP) neden olur. Sonuçta hücre işlevlerinde de değişmeye yol açar. Serbest radikaller, bir veya daha fazla bağımsız hareket eden çiftleşmemiş elektronlar içerir. Bu serbest radikaller hücre membranının lipid yağ asitlerinin peroksidasyonunu uyarırlar. Bu olayda lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Doku hasarının miktarı, oluşan serbest radikaller ile lokal antioksidan savunma sistemi arasındaki dengeyi yansıtır. Lipid peroksidasyonunun önlenmesi, serbest radikal süpürücüler tarafından sağlanır. Bu amaçla en çok çalışılan süpürücü AA'dir(64).

Lipid peroksidasyon son ürünlerinden biri de malondialdehit (MDA) tir. MDA tiyobabütirik asitle reaksiyona giren(TBARs) maddeler içinde en önemli yer tutan üründür(6).

Bedenin bu oksidatif yıkıma karşı korunma mekanizmaları vardır. Genelde normal koşullarda oksidatif reaksiyonlarla, antioksidan kapasite arasında fizyolojik bir denge söz konusudur. Fizyolojik antioksidan savunmada süperoksit dismutaz (SOD) ,

katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPX) önemli yer tutarlar. Bunlardan GPX redükte glutatyonu(GSH) okside formuna (GSSG) çevirir. Oksidatif stres sırasında GSSG artarken göreceli olarak GSH azalmış olur. Buda oksidatif stres için bir gösterge olarak kullanılabilir. Glutatyon memeli hücrelerinde yaygın olarak bulunduğundan total glutatyon değeri hücre içi oksidatif durum için bilgi verir(133). Ayrıca GSH korneal hidrasyon için önem taşır(49). Enzimlerin dışında düşük molekül ağırlıklı bazı maddeler biyolojik antioksidanlar olarak görev yaparlar. Bunlar arasında karotenoidler, bilirubin, ürik asid , askorbik asid(AA), α -tokoferol (Vitamin E), taurin sayılabilir. Melatoninde etkili bir radikal süpürücüsüdür(6).

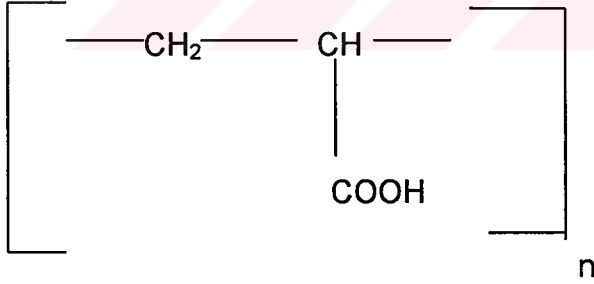
Kornea da ekzimer lazer gibi bir travmadan sonra o bölgede serbest radikal oluşumu ve hasara uğrayan bölgeye PMN hücre infiltrasyonu gösterilmiştir.

Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen tipleri korneal stromal makromolekülleri (Proteoglikan ve kollajen) parçalıyarak hasar meydana getirebilir ve buda yukardaki mekanizmaların devreye girmesi ile önlenmeye çalışılır.

II.7) Yapay Göz Yaşı Preperatları :

Karbapol ailesi aşağıdaki formülde olduğu gibi akrilik asit polimerlerinden oluşur(Şekil.5.). Bu aile içindeki karbapol 940 cilt kremleri, traş losyonları gibi güzellik preperatlarında kullanıldığı gibi yapay göz yaşı preperatlarında da yer alan jel yapılı bir maddedir(3). Ayrıca bilimsel araştırmalarda da taşıyıcı olarak önerildiği ve kullanıldığı örnekler vardır(80). Bu tip yapay göz yaşı(YGY) preperatları kornea yüzeyinde ince bir tabaka oluşturur. Normal göz yaşı ile seyrelir, fakat yüzeyde biyoadezyon ile bir süre kalırlar. Bu özellikleride taşıdıkları aktif madde için önem taşır(85).

Şekil.5. Akrilik asit polimeri.



III) MATERYAL - METOD :

III.1) Araştırma Planı:

Deney hayvanı olarak 5 aylık Yeni Zelanda tipi erkek tavşanlar kullanıldı. 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık/gün periyodunda denekler tek tek ayrı kafeslerde tutuldu. Operasyon öncesi ve sonrası yedişer gün serbest pelet yem+marul ve su ile beslendiler. Deneyler de 30 adet tavşan kullanıldı.

Rompun (Bayer, 1cc 23.32mg Xylazin HCl) 5mg/kg + Ketalar (Eczacıbaşı, Ketamin HCl 50mg/ml x10ml flakon) 35mg/kg anestezisi altında tüm tavşanların gözünde sağ korneada topikal anestetik olarak Alcaine %0.5 (Alcon, Proparacain HCl, 15ml) bir damla damlatıldıktan sonra 0.5cm'lik insizyon yarası yapılarak tek sütür konuldu. Operasyon sonrası bir kez opere göze 1 damla topikal antibiyotik (Bilim ilaç, Genta gut, gentamisin sulfat 3mg/ml) damlatıldı. Denekler 3'e ayrılarak,

1.grup; tedavi edilmeden 7 gün süre ile bırakıldı. (n=10)

2.grup; yapay göz yaşı(YGY) preparatı Thiloteers® (Dr Thilo-Co Combh, Alcon Couvreur, Belgium. 1g jel; 3mg karbopol-940, 50mg mannitol, 0.04mg tiomersal, 945.712mg distile su içermektedir.) ile tedavi edildi. (n=10 ; 0.5x2/24 st, 7 gün)

3.grup; EGF taşıyan yapay gözyaşı preparatı (n=10 ; EGF(Sigma E 7755 fare tükrük bezinden hazırlanmış.)1mg/L jel) 2.gruptaki doz, sıklık ve sürede uygulandı.

Operasyondan sonraki 7.gün tavşanlar anestezi (Rompun + Ketalar) fazlası ile feda edilerek dikişler alındıktan sonra yaralar eksize edilip AA, TBARs ve GSH düzeylerinin tayini için takibe alındılar.

III.2) Tayin Yöntemleri :

III.2.1) Dokuda AA tayin yöntemi:

Roe ve Kuether'in Berger arafından modifiye edilmiş metodu kullanıldı(9).

Kullanılan çözeltiler:

1) PCA/EDTA , 0.35M PCA'de (Perklorik asit) 0.1mg EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) çözülerek hazırlandı.

2) Renk ajanı

100ml 9N H_2SO_4 içerisinde 0.6gr Bakırsülfat çözüldü

100ml 9N H_2SO_4 içerisinde 5gr Tiyoüre çözüldü.

100ml 9N H_2SO_4 içerisinde 5gr 2,4-dinitrofenilhidrazin çözüldü. Her birinden sırasıyla 1:1:20 şeklinde V:V:V olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

3) %65 H_2SO_4 eklendi.

4) %5'lik TCA (Trikloro asetik asit)

5) AA stok solüsyonu , 1mg/100ml içeriyordu.

6) AA standart solüsyonu, AA stok solüsyonundan 50ml volümetrik tüp içerisine 10ml pipetlenir. %5'lik TCA ile volüm tamamlanır. 0.002mg/ml içerir.

Yöntem:

1) Korneal doku trepan yardımıyla standart çapta yara etrafından çıkarılıp tartıldı.

2) Doku ağırlığının 9 katı PCA/EDTA kondu.

3) Buz soğukluğunda homojenize edildi.

4) 15000 g devirde 3dk 4°C'de santrifüj edildi.

5) 200 µl standart alındı.

6) 200 µl süpernatant alındı.

7) 200 µl kör için 0.35M PCA alındı.

8) Her bir tüpe 50µl renk reaktifi eklenerek tüpler vortekslendi..

9) Tüpler 37°C'de 3 saat inkübe edildi..

10) Numune ısı 0°C'ye getirildi.

11) Her bir tüpe 300µl buz soğukluğunda %65'lik H₂SO₄ eklenildi.

12) Tüpler vortekslendi.

13) Oda sıcaklığında 30 dk beklendi.

14) Numuneler 515nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

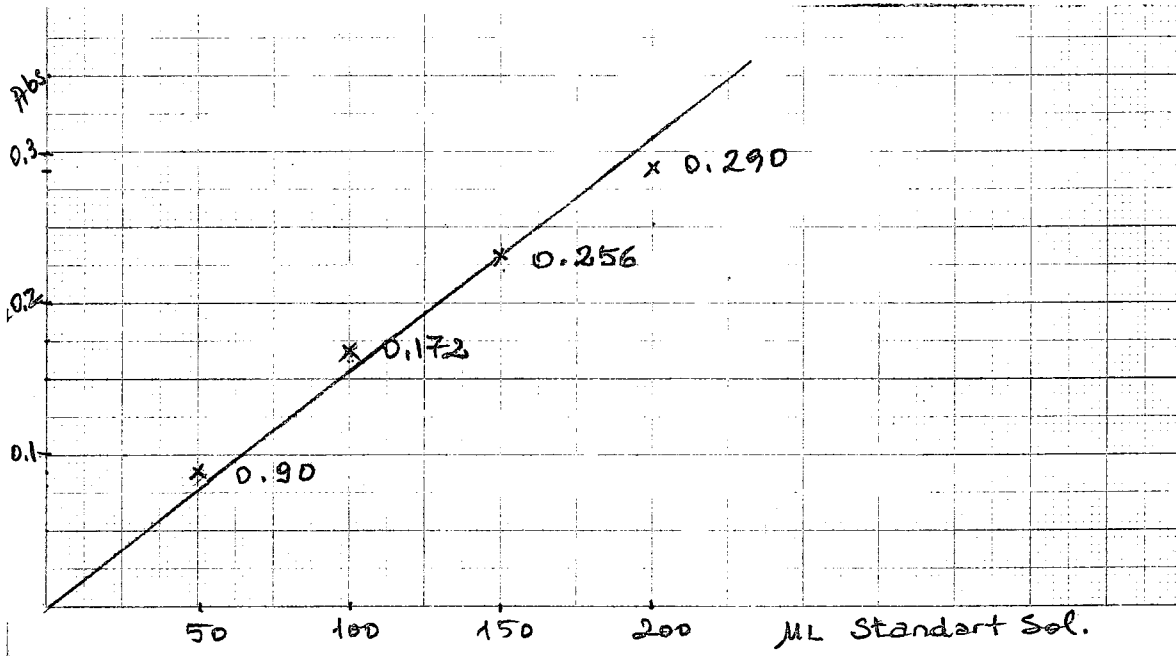
Sonuç : Numune optik dansitesi (abs) / standartın optik dansitesi (abs) x1
 =... $\mu\text{mol AA/g}$ yaş doku formülüne konarak hesaplandı. Değerler 1.76 ile çarpılarak
 mg/g olarak verilmiştir.

AA standart eğrisi

AA standart solüsyonu ve %5'lik TCA ile 4 değişik seyreltme hazırlandı.

1. 200 μl standart solüsyonu
2. 150 μl standart solüsyonu +50 μl TCA
3. 100 μl standart solüsyonu +100 μl TCA
4. 50 μl standart solüsyonu +150 μl TCA

Bunlara 50 μl renk reaktifi eklenerek vortekslendi. 37 °C de 3 saat inkübe edildikten sonra buz soğukluğuna getirilip 300 μl H_2SO_4 eklendi. Vortekslendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip 515nm dalga boyunda spektrofotometrede okunup, eğri çizildi.



Grafik 1 : AA standart eğrisi

III.2.2) Dokuda TBARs tayin yöntemi :

Korneal yara TBARs düzeyleri ölçülerek lipid peroksidasyon düzeyi hakkında bilgi edinildi (72).

Kullanılan çözeltiler:

- 1) %10'luk TCA (Trikloroasetik asit)
- 2) %1'lik BHT (Butil hidroksi tolue) %95'lik etanolde
- 3) %0.67 TBA (2-Tiobarbiturik asit)

Yöntem :

- 1) Korneal doku trepan yardımıyla standard çapta yara etrafından çıkarılıp tartıldı.
- 2) Doku ağırlığının 9 katı %10'luk TCA kondu.
- 3) Doku homojenize edildi.
- 4) Mikrosantrifüj tüpüne 1.5ml süpernatant alındı.
- 5) 3000 g devirde 15dk 18-20°C'de santrifüj edildi.
- 6) 3000 g devirde başka bir tüpe aktarılan süpernatant 18-20°C'de tekrar santrifüj edildi.
- 7) İkinci kez santrifüj edilen bu süpernatant'dan 750µl alındı. 10µl %1 BHT eklendi.

- 8) Bunların üstüne 750µl %0.67 TBA eklendi.
- 9) 15dk kaynatıldı. (Bulanıklık olması halinde 3000 g'de 8 dk tekrar santrifüj edildi.)
- 10) Numuneler 535nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu..

Sonuç: Numune optik dansitesi(abs)x128 / gr doku =... nmol TBARs /gr
yaş doku formülüne konarak hesaplandı.

III.2.3) Dokuda GSH tayin yöntemi :

Korneal yara GSH düzeyleri ölçülerek antioksidan sistem hakkında bilgi edinildi

(5).

Kullanılan çözeltiler:

- 1) %10'luk TCA (Trikloroasetik asit)
- 2) %1'lik BHT (Butil hidroksi toluen) %95'lik etanolde
- 3) %0.67 TBA (2-Tiobarbiturik asit)
- 4) 0.3M Na₂HPO₄
- 5) DTNB , (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoik asit)) %1'lik Na-sitrat'ın 100ml'sinde 40mg DTNB çözülerek hazırlandı.

Yöntem :

Korneal doku trepan yardımıyla standard çapta yara etrafından çıkarılıp tartıldı.

- 1) Doku ağırlığının 9 katı %10'luk TCA kondu.
- 2) Doku homojenize edildi.
- 3) Mikrosantrifüj tüpüne 1.5ml süpernatant alındı.
- 4) 3000 g devirde 15dk 18-20°C'de santrifüj edildi.
- 5) 3000 g devirde başka bir tüpe aktarılan süpernatant 18-20°C'de tekrar santrifüj edildi.
- 6) 250µl süpernatant 1000µl 0.3M Na₂HPO₄ eklendi.
- 7) 125µl DTNB eklendi.
- 8) Cam deney tüplerine numuneler Na₂HPO₄' den sonra eklendi.
- 9) 18-20 °C'de 5-10 dk beklendi.
- 11) Numuneler 412nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu..

Sonuç: Numune optik dansitesi(abs)x4.23 / gr doku = ..µmol GSH / gr yaş

doku formülüne konarak hesaplandı.

III.3) Kullanılan araç ve gereçler :

Tüm tayin yöntemlerinde kullanılan araç ve gereçler şunlardır.

- a) Heidolph, Diox 600,184 homojenizatör
- b) Olympus SZ-PT operasyon mikroskobu
- c) Shimadzu, UV-1208, UV-VIS spektrofotometre
- d) Hermle, Z-323K soğutmalı santrifüj
- e) Aygün, G7-154 trefan

Tayin yöntemlerinde kullanılan kimyasallar Merk'ten temin edilmiştir.

İstatistik yöntem; Anova varyans analizi ve Mann Whitney U testleri kullanılmıştır. $p < 0.05$ önemlilik sınırı olarak kabul edilmiştir.



IV) BULGULAR :

Deney süresince tavşanların beden ağırlığında anlamlı bir farklanma görülmemiştir. Diğer deney sonuçları Tablo.4.'de özetlenmiştir. Sonuçlar ayrıca grafik olarakta gösterilmiştir(Grafik 2,3,4).

Tablo.4.'de yapay göz yaşı içerisinde verilen EGF'nin korneal kesi yarası oksidatif durumu ile ilişkisi özetlenmiştir. Yara ortamında tedavi ile ilgili olarak askorbik asitte istatistik açıdan anlamlı artış gözlenirken oksidan ürün MDA'da düşme saptanmıştır. Glutasyon düzeylerinde tedavi sırasındaki değişimler istatistik anlam taşımamaktadır.

Tablo.4. Yapay göz yaşı (YGY) ve EGF ile tedavi edilmiş ve tedavi edilmemiş tavşan korneal yara dokusunda C vitamini, glutasyon ve TBARs düzeyleri (Tablo degerleri aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.)

Gruplar	AA(mg/g yaş doku)	GSH(μ mol/g yaş doku)	MDA(nmol/g yaş doku)
Tedavisiz	0.16 $\pm$ 0.05	13.66 $\pm$ 9.7	203 $\pm$ 73
YGY ile tedavi	0.46 $\pm$ 0.07**	7.8 $\pm$ 3	150 $\pm$ 50
YGY+EGF tedavi	1.35 $\pm$ 0.06*	10 $\pm$ 4.8	94 $\pm$ 30*

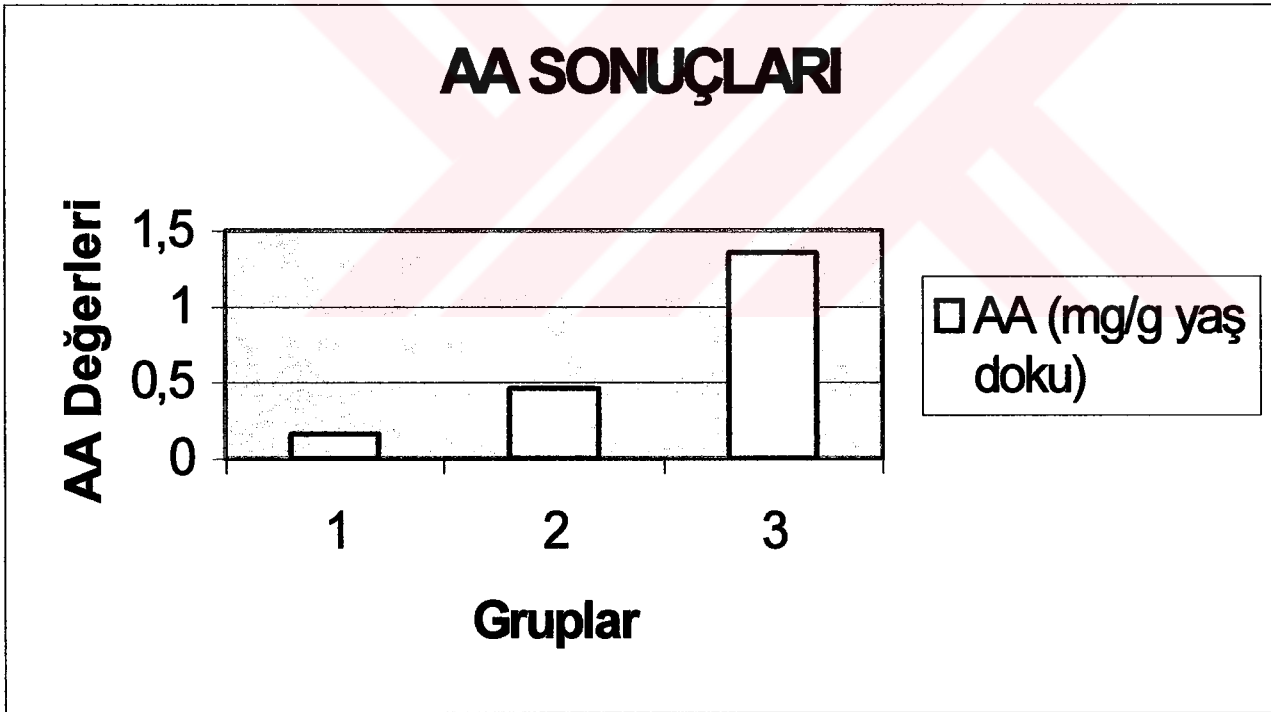
*p< 0.05 kontrol grubu ile karşılaştırma.

**p< 0.05 YGY grubu ile karşılaştırma.

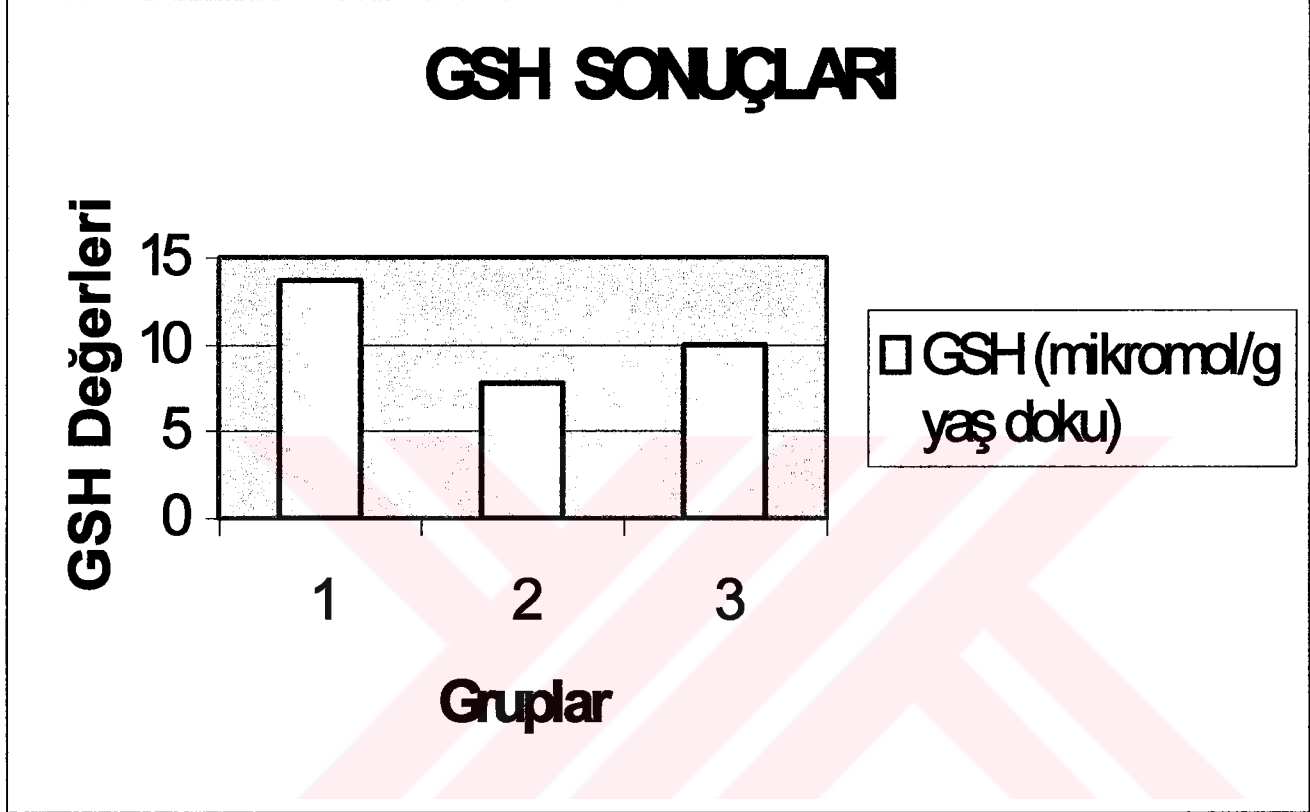
1.grup tedavi edilmeden 7 gün süre ile bakılmıştır (n=10).

2.gruba yapay göz yaşı preparatı (Thilotears®) ile tedavi yapılmıştır (n=10, 0.5µlx2/24st., 7 gün).

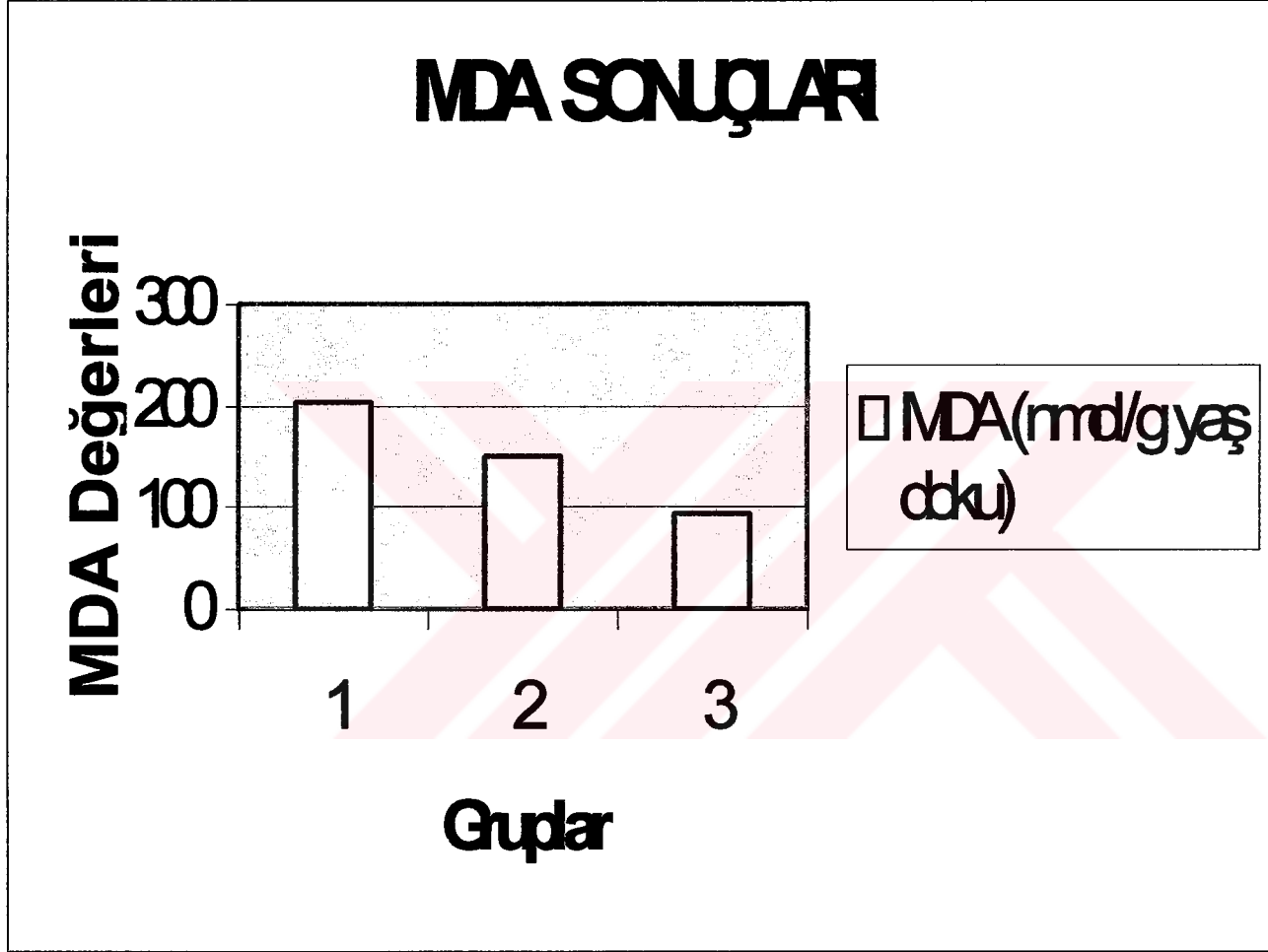
3.gruba EGF taşıyan yapay göz yaşı preparatı (n=10, 1mg/L) 2.gruptaki doz , sıklık ve sürede uygulanmıştır.



Grafik 2: Yapay göz yaşı (YGY) ve EGF ile tedavi edilmiş ve tedavi edilmemiş tavşan korneal yara dokusunda AA düzeyleri.



Grafik 3: . Yapay göz yaşı (YGY) ve EGF ile tedavi edilmiş ve tedavi edilmemiş tavşan korneal yara dokusunda GSH düzeyleri.



Grafik 4: . Yapay göz yaşı (YGY) ve EGF ile tedavi edilmiş ve tedavi edilmemiş tavşan korneal yara dokusunda MDA düzeyleri.

V) TARTIŞMA ve SONUÇ :

Korneanın yapısının korunması ,gözün diğer kısımlarının ve görüş berraklığının korunması için gereklidir. Günümüzde özellikle refraktif cerrahi ameliyatlarından sonra bu konunun daha ayrıntılı ve hassas bir şekilde incelenmesine hız verilmiştir. Gözde yara iyileşmesinde epiteliyal tamirin yanı sıra önemli olaylardan biride yaraya sağlamlığını veren kollajen sentezidir.Epiteliyal tamirde EGF desteği, kollajen sentezinde ise AA desteği konusunda yapılmış pekçok çalışma vardır(113,68,27). EGF nin solüsyon formu gözde, göz kapakları ile kısa sürede uzaklaştırılıp, göz yaşı ile seyreltiğinden, EGF jel formu uygulanması düşünülmüştür. Deride de benzeri kayıplar nedeniyle solüsyon yerine jeller yeğlenmektedir.

Bu konuda bölümümüzce yapılan bir çalışmada tavşan deri kesisinde tonisitesi ayarlanmış ve koruma amaçlı bir katkı maddesi de içeren , poliakrilik asit(Karbopol) preparatları denenmiştir. Bu çalışmada konsantrasyon ve tonisiteleri farklı da olsa karbapol jellerinin yara iyileşmesinde aktif materyal taşıyıcısı olarak kullanımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır(32). Bundan sonra bölümümüzde yapılan korneal insizyon yarasında karbopol içeren pH ve tonisitesi farklı 2 yapay gözyaşı preparatını karşılaştıran bir çalışma yapılmış ve bu preparatlardan Thilo-tears® adlı yapay göz yaşı preparatından daha iyi yara iyileşme cevabı alınmıştır(51). Bunun nedeni gözdeki hidrasyonun iyi sağlanması ve antibakterial ajan ile gerçekleşen koruma olabilir.Bu nedenle bu araştırmada da bu bilgi ışığında korneal kesi yarasında oksidatif durum tayini için "Karbopol-940" içeren ticari göz yaşı preparatı kullanılmasına karar verilmiştir. Birçok peptidde olduğu gibi EGF'nin de fizyolojik sıvılarda stabil olmaması ve kısa

yarılanma ömrü olduğu bilinmektedir(127). Yüksek dozlarda downregülasyonla etkisi azalan EGF ,ancak düşük dozda uzun süreli temasta korneal yara iyileşmesini artırıcı etkiye sahiptir(127). Bu yeterli temasında yapay gözyaşı preparatımızla sağlanabildiği ilgili yayınlardan anlaşılmaktadır(68,142).

EGF , yara iyileşmesi konusunda en çok çalışılan maddelerdendir. EGF birçok dokuda yara iyileşmesine etkileri yönünden incelenmiştir(108,112). Bölümümüzde yapılan dermal yara iyileşmesi ile ilgili çalışmalarda, EGF'nin yara iyileşmesine ait göstergelerden biri olan yara gerimini arttırdığı gösterilmiştir (27) .

EGF'nin korneal yara iyileştirici etkisinin temeli korneal epitelde proliferasyon, hücre göçü, fibronektin sentezi ve integrin aktivitesi göstermesidir(94). Yanısıra fibroblastik aktivite ve kollajen sentezine de etkileri gösterilmiştir. AA de kollajen yapımında rol oynadığından ayrıca antioksidan etki gösterdiğinden ve birçok araştırmada lokal uygulanan AA'nin gözde yara iyileşmesine etkisi araştırıldığından bu çalışmada EGF ve AA arasındaki ilişkiyi araştırmak için korneal AA düzeyi saptanmıştır.

Pek çok hücre EGF reseptörüne sahiptir ve hücre kültürlerinde EGF'ye yanıt olarak çoğalırlar. Ayrıca EGF'nin prokollajenaz sentezini indüklediği de gösterilmiştir. EGF hücrede diaçil gliserol, yağ asidi ve arakidonatların kaynağı olan fosfatidil inozitol döngüsünü stimüle eder (50). Metalloproteinaz ailesinin bir üyesi de kollajenazdır. EGF'de prokollajenaz sentezini indüklediğinden, dolaylı olarak kollajen yıkım ve yapımında yer alır(22).

Askorbik asit(AA)'de kollajen yapımında önemli bir role sahiptir. AA'in oküler dokudaki konsantrasyonu plazma seviyesinin birkaç katıdır. AA gözde iris-siliar body

aracılığı ile aktif olarak aköz hümör içine salgılanmaktadır. Bu nedenle aköz hümör gözün diğer dokuları için AA yönünden rezerv görevi görmektedir. İnsanda AA sentezlenmediğinden diyetle alınması gereklidir. Korneadaki askorbik asit göz yaşından korneal epitel transportu veya aköz hümörden endotel transportu ile sağlanır. EGF'de gözyaşında bol bulunur. Özellikle yaralanma sonrası artar(147). Normal gözde ışığa maruz kaldığında fotokimyasal olarak süperoksit ve deriveleri oluşur , ki bunların lens katyon pompası aktivitesini hasara uğrattıkları düşünülmektedir. Bu hasar AA ile engellenebilir(115). Aköz hümördeki AA düzeyi yüksekliği de buna bağlı olabilir(42). AA'ın koruyucu etkisi lipid peroksidasyonunu önleyici etkisi ile olur.

Lipid peroksidasyonu da daha çok hücre membranındaki serbest radikallerce enzimatik olmayan yolla uzun zincirli poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonu şeklinde tanımlanır. Bu oksidasyon neticesi büyük oranda son ürün ve lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kabul edilen MDA (Malondialdehit) 'nın da TBARs(Thiobarbutiric acid reactive substance) yani diğer yıkım ürünlerinin TBA ile ölçümünde reaksiyon veren maddelerden oluşur(111). Araştırmamızda TBARs tayin yöntemi ile bulunan değer büyük oranda doğruluk payından dolayı diğer araştırmalardaki gibi MDA değeri olarak kabul edilmiştir.Çalışmamızda MDA değeri YGY uygulanan ve YGY+EGF uygulanan kornealarda düştü. Ancak EGF'li gruptaki düşme istatistiksel açıdan anlamlı idi. Artola ve arkadaşları YGY preperatlarında kullanılan hyaluronat ve metilsellülozunun H₂O₂ enjekte edilen gözlerde iris lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiğini TBARs düzeylerinin düşmesiyle göstermiştir(4). Çalışmamızda da TBARs düzeyleri özellikle YGY+ EGF grubunda

anlamalı düşme gösterirken AA'nin artmış olması, EGF'nin AA artışıyla antioksidan savunmaya olumlu etki gösterdiğini düşündürmektedir. Kornealarına çok yüksek UV ışınlanması yapılan tavşanlarda aköz hümörde yapılan çalışma MDA, H_2O_2 ve GSSG(okside glutatyon) artışına karşılık AA ve GSH da düşme olduğunu göstermiştir(24). Burada AA düşüşü ile birlikte MDA artışı izlenirken, bizim çalışmamızda yine bir göz dokusu olan korneada MDA düşüşü ve AA artışı şeklindeki bu bulguyu destekleyen ters ilişki EGF uygulanan grupta izlenmektedir.

GSH, normalde fizyolojik olarak vücudun birçok yerinde olduğu gibi göz dokuları ve göz yaşında da bulunan tiol tripeptid yapısında birçok fonksiyonları olan bir maddedir. İlaç detoksifikasyonu, aktif oksijen moleküllerinin indirgenmesi gibi antioksidan, gama glutamil siklusunda amino asit transportu ve hücrelerde tioldisülfid bağlarının sağlanması gibi fonksiyonları vardır. GSH gama-glutamilsiklaz ve GSH sentetaz tarafından katalizlenen sitozolik 2 ATP enerjisi harcanarak oluşturulan önemli bir antioksidan maddedir. Çalışmamızda AA dışında GSH'ın korneal doku seviyesi korneal antioksidan durumun bir göstergesi olarak incelenmiştir. Literatürde GSH değerleri normal gözde ve daha çok aköz hümöde incelenmiştir (63,24). GSH'nın antioksidan özelliği yanısıra korneada hidrasyonu sağlaması büyük önem taşımaktadır (63). Çalışmamızda kontrol ve tedavili gruplarda GSH değerleri yaralı korneada incelenmiştir, tedavili gruplarda hafif düşme olmakla beraber istatistiksel anlam taşıyan fark bulunamamıştır. Bunun korneal hidrasyonun normal sürdürülmesi açısından önemi olabilir. Tavşan keratosit kültürlerinde yapılan bir araştırmada tek başına AA fosfat tuzunun, tek başına EGF'nin ve herikisinin birlikte uygulamasının hücre büyümesini

uyarması üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuçta birlikte daha fazla etki gösterdikleri saptanmıştır(121). Bizim sonuçlarımızda da EGF'li grupta yaranın iyileşmesinin hızlandırılması için iki faktörün birlikte etkileşme ortamı buldukları görülmektedir. Bu çalışmaya paralel olarak yürütülen bir diğer çalışmada korneal yarada tedavi sonrası ölçülen yara gerimleri jelle uygulanan EGF'nin olumlu etkisini ortaya koymuştur(142).

AA'nin güçlü redükte edici etkisinden dolayı, AA kolayca herhangi bir serbest radikalin serbest elektronu ile reaksiyona girebilir. Askorbat serbest radikali reaktif değildir. Biyolojik olarak bu madde inert bir ürün vermek üzere geri dönüşümsüz reaksiyona girebildiği gibi aynı zamanda tekrar AA'de çevrilebilir(119,110). Bu arada AA'nin hücredeki konsantrasyonunun belli düzeyde tutulabilmesinde, DHA'nın GSH aracılığıyla AA'ya döndürülebileceğine dair bir hipotez in vitro bulgu ile ortaya atılmıştır(149). Ribozomal kollajen sentezi esnasında hidroksilasyon sürecinde AA kofaktör olarak gereklidir. Bunun engellenmesi prolin ve lizin amino asitlerinden yola çıkan stabil üçlü helikal kollajen yapısının oluşmasını engeller ve assosiye olmayan Pro- α zincirleri oluşturur(119,8). Böylesi stabil olmayan kollajen molekülleri de proteolitik enzimlerin etkilerine açık olur. AA'nin kollajen sentezindeki bu eksikliği kollajen gelişmesi ve maturasyonu gibi kornea berraklığı ve sağlamlığını sağlayacak iyileşme sürecindeki olayları etkiler. Williams ve arkadaşları , AA'nin myeloperoksidazın(PMN lökositlerin lizozomlarındaki temel proteolitik enzim) fonksiyonel aktivitesini inhibe ettiğini yayınlamıştır(145).AA enzimin etkisini doğrudan inhibe edebilir ve/veya peroksidatif aktivite için gerekli serbest radikalleri süpürerek etki yapar.

AA değerlerinin hem YGY(Yapay göz yaşı) hemde YGY+EGF ile tedavi edilen grupta tedavisiz kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkması, ($p < 0.05$ YGY ve kontrol grubu ile karşılaştırma.; $p < 0.05$ YGY+EGF ve YGY grubu ile karşılaştırma.) opere korneaya AA uygulanan çalışmalarda alınan olumlu sonuçları(64) ve GSH'da görülen düşme(istatistiksel olarak anlam taşımıyor) Winkler'in in vitro bulgularını desteklemektedir(149).

Tüm grupların MDA, GSH ve AA düzeyleri birarada değerlendirildiğinde tedavili gruplarda özellikle yapay göz yaşı içinde EGF uygulanan grupta MDA düşerken AA'nin yüksek bulunması, GSH'daki düşmenin istatistiksel açıdan anlamsız olması yaralı kornea'da AA'nin önemli antioksidan etkisi olduğu ve bunun EGF tarafından desteklendiği izlenimini vermektedir. Bu çalışma yapay göz yaşı preparatının da hidrasyonu desteklemek ve taşıyıcı antimikrobial ajan nedeniyle iyileşmeye katkıda bulunduğu ve EGF nin yapay göz yaşı preparatı ile uygulamasında etkili olduğunu ve EGF'nin ayrıca epitelial ve fibroblastik proliferasyonu desteklemenin yanında lipid peroksidasyonunu doğrudan veya indirekt yollardan azaltıcı yönde etki yaparak , sonuç olarak antioksidan etkiye katkıda bulunduğunu gösterebilir. Bu arada yaralı korneada hidrasyon bakımından önem taşıyan GSH düzeyinin fazla değişmemesi dikkat çekicidir. Bundan sonraki basamakta korneal yarada GSH-hidrasyon ve GSH-AA ilişkisini aydınlatmak amacıyla daha ayrıntılı araştırmalar yapılması planlanmıştır.

VI) ÖZET :

Amaç: Bu çalışmada yapay göz yaşı preparatı içinde EGF uygulanmasının korneal tam kesi yara dokusundaki askorbik asit(AA) , Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon(GSH) düzeyine etkisinin izlenmesi amaçlanmıştır.

Metod: EGF'nin korneal yara dokusu AA, MDA ve GSH düzeylerine etkisi tavşanlarda korneal tam kesi yarası yapıldıktan 7 gün sonra incelenmiştir. Tavşanlar üç gruba ayrılmıştır.

1. Tedavisiz grup
2. Yapay göz yaşı (YGY) ile tedavi edilen grup
3. YGY içinde EGF uygulanan grup

Her grupta 10 denek vardır. Operasyonu takiben korneal yaralara YGY preparatı 5µlx2/24 st ve 3. Grupta % 0,3 karbopol içeren 940 içeren YGY içinde 1mg/L EGF preparatı 5µlx2/24 st olmak üzere uygulama yapılmıştır. İstatistik analiz Statview programı ile Anova ve Mann Whitney U testleri ile yapılmıştır.

Bulgular : Yara ortamında tedavi ile ilgili olarak askorbik asitte istatistik açıdan anlamlı artış gözlenirken, oksidan ürün MDA da düşme saptanmıştır. Glutasyon düzeylerinde tedavi sırasındaki düşmeler istatistik anlam taşımamaktadır.

Sonuç : EGF'nin korneal kesi yarasına gözyaşı preparatı ile uygulanmasının yara oksidan durumunda meydana gelen değişikliklere etkisi olabilir.

VII) SUMMARY :

Purpose: To investigate the effect of artificial tear solution and epidermal growth factor (EGF) treatment on ascorbic acid (AA) , malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels of full-thickness corneal wounds.

Methods: The effect of EGF on AA, MDA and GSH levels of corneal wound tissue was determined in rabbits' full-thickness corneal wounds on the 7th day of operation. There were three groups;

1. Untreated control group
2. Artificial tear (AT) treated control group
3. EGF + AT treated experimental group

Each group had 10 subjects. (n=10) Corneal wounded eyes were topically treated with 5 μ l AT or 5 ml EGF in AT (1mg/L EGF in artificial tear preparation which contains 0,3% carbopol 940) twice a day for 6 days after operation. Statistical analysis was carried out with the Anova and MannWhitney U test using the Statview program.

Results: AA levels of wound tissues, increased significantly with artificial tear and AT+EGF treatment ($p < 0,05$). MDA level of AT+EGF treated group was significantly decreased ($p < 0,05$). Glutathione levels were not changed.

Conclusion: There may be a relation between EGF treatment in artificial tear and oxidant status of corneal wound tissues.

VIII) KAYNAKLAR :

- 1) Anderson R : Ascorbic acid and immune functions ,in: Counsel JN, Horning DH, Eds , Vitamin C: Ascorbic acid. London. 249-272, 1981.
- 2) Aras K, Erşen G,: Vitamin C, Tıbbi Biyokimya Vitaminler; Vit C. Ankara Üniversitesi Basımevi, 119-134, 1967.
- 3) Arcon, Carbapol,High Performance Polymers for Pharmaceuticals, Final Report on the Safety assesment of Carbomers-934,-910,-934P,-940,-941 and -962 , 109-141, 1990.
- 4) Artola A, Alio JL, Bellot JL, Ruiz JM, Lipid peroxidation in the iris and its protection by means of viscoelastic substances, Ophthalmic Res, 25:172-176,1993.
- 5) Aykaç G, Uysal M , Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H: The effects of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats, Toxicology, 36: 71-76, 1985.
- 6) Babior BM, Superoxide: A two edged sword, Braz J Med Biol Res, 30(2): 141-155, 1997.
- 7) Barlati S : Analysis of fibronectin, plasminogen activators and plasminogen in tear fluid as markers of corneal damage and repair, Exp Eye Res 51: 1-9, 1990.
- 8) Barnes MJ, Function of ascorbic acid in collagen metabolism,Ann N Y Acad Sci, 258: 264-277, 1975.

- 9) Berger L, Shepard D, Morrow F, Taylor A: Relationship between dietary intake and tissue levels of reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guinea pig, *J Nutr* 119: 734-740, 1989.
- 10) Bertman M, Manseau E, Law M, Aiken D: Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1358-1366, 1983.
- 11) Bilgihan K, Bilgihan A, Akata F : Excimer laser corneal surgery and free oxygen radicals, *Jpn J Ophtal*, 40: 154-157, 1996.
- 12) Bisia K, Tanellan DL : Concentration dependent effects of lidocaine on corneal epithelial wound healing, *Invest Ophtalmo Vis Sci* 33: 3029-3033, 1992.
- 13) Braun L, Csala M, Poussu A, Garzo T, Mandl J, Baghegyi G: Glutathione depletion induces glycogenolysis dependent ascorbate synthesis in isolated murine hepatocytes. *FEBS Letters*. 386: 173-176, 1996.
- 14) Braun L, Garzo T, Mandl J, Banheg G : Ascorbic acid synthesis is stimulated by enhanced glycogenolysis in murine liver: *FEBS Letters*. 352: 4-6, 1994.
- 15) Brown, G.L., Curtsinger, L. Jurkiewicz, M.J., Nahas F., Schultz, G., "Stimulation of Healing of Chronic Wounds by Epidermal Growth Factor" , *Plast. Reconstr. Surg.*, 88: 189-194, 1991.
- 16) Brubaker RF, Baurne WM, Bachman LA, McLaren JM: Ascorbic acid content of human corneal epithelium , *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(7) : 1681-3, June 2000.
- 17) Buck RC: Cell migration in repair of mouse corneal epithelium, *Invest Ophtalmo Vis Sci* 18: 767-784, 1979.

- 18) Burns JJ, Fanter J, Dayton PG : Metabolism of L-ascorbic acid in rat kidney.
J.Biol.Chem 232: 107-115, 1958.
- 19) Cameron JD, Hagen ST, Waterfield RR : Effects of matrix proteins on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration, Curr Eye Res 7: 293-301, 1988.
- 20) Cellini, M., Baldi, A., Caramazza, N., De Felice, G.P., Gazzaniga, A., "Epidermal Growth Factor in the Topical Treatment of Herpetic Corneal Ulcers", Ophthalmologica 208: 37-40, 1994.
- 21) Chen JJ, Tseng CG: Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency, Invest Ophtalmol Vis Sci 31: 1301-1314, 1990.
- 22) Cohen I.K, Diedelman R.F, Lindbald W.J: Wound Healing, Biochemical and Clinical Aspects, W.B.Saunders Comp., USA, P.156,183,266, 1992.
- 23) Cook GA : Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni express an authentic substance P (NK-1) receptors, J Immunol 152: 1830-1835, 1994.
- 24) Costagliola C, Balestrieri P, Fioretti F, Frunzio S, Rinaldi M, Scibelli G, Sebastiani A, Rinaldi E, ArF.193nm excimer laser corneal surgery as a possible risk factor in cataractogenesis, Ex Eye Res, 58(4):453-457, 1994.
- 25) Cotsarells G : Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate implications on epithelial stem cells, Cell 57: 201-209, 1989.
- 26) Cung EH, Buküsoğlu C, Zieske JD: Localization of corneal epithelial stem cells in developing rat, Invest Ophtalmol Vis Sci 33: 2199-2211, 1992.

- 27) Çelebi N, Erden N, Gönül B, Koz M: Effects of epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strenght in mice, J Pharm. Pharmacol, 21(7): 7-10, 1995.
- 28)Çelebi, N., Erden, N., Gönül, B.,Koz, M., "Effects of Epidermal Growth Factor Dosage Forms on Dermal Wound Strength in Mice" , J. Pharm. Pharmacol., 46: 386-387, 1994.
- 29) Davanger M, Evensen A: Role of the pericorneal papillary structure in renewel of corneal epithelium, Nature 229: 560-561, 1971.
- 30) Dell'Orco RT, Nash JH : Effects of ascorbic acid on collagen synthesis in nonmitotic human diploid fibroblasts. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 144, 621-622, 1973.
- 31) Dibiase, M.D., Rhodes, C.T., "The Design of Analytical Methods for Use in Topical Epidermal Growth Factor Product Development", J. Pharm. Pharmacol.,43, 553-558, 1991.
- 32) Dinçer S, Gönül B, Gelir E, Dinçer F.N : Effects of topically applied bioadhesive carriers on zinc and hydroxyproline level of rabbit full-thickness skin wound, FABAD J Pharm. Sci , 25: 1-5, 2000.
- 33) Doran Tİ, Vildrich A, Sun T-T: Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiltion of skin, corneal and esophageal epithelial cells, Cell 22: 17-25, 1980 .
- 34) Ebato B, Friend J, Thoft RA: Comparison of central and peripheral human corneal epithelium, Invest Ophtalmo Vis Sci 29:1533-1537, 1988.
- 35)Ebato B, Friend J, Thoft RA: Comparison of central and peripheral epithelium in tissue culture, Invest Ophtalmol Vis Sci 28: 1450-1456, 1987.

- 36) Erden N, Çelebi N, Gönül B, Koz M: Effects of epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strenght in mice, *J.Pharm.Pharmacol.*, 16, 386-387, 1993.
- 37) Fagerholm P, Fitzsimmons T, Hafstrand A : Reactive formation of hyaluronic acid in the rabbit corneal alkali burn, *Acta Ophthalmol suppl* 202: 67-72, 1992.
- 38) Fisher, D.A., Lakshmanan, J., "Metabolism and Effects of Epidermal Growth Factor and Related Growth Factor in Mammals", *Endocr. Rev.*, 11(3):418-442, 1990.
- 39) Fitzsimmons TD, fagerholm P, Hafstrand A : Hyaluronic acid in the rabbit cornea after excimer laser superficial keratectomy, *Invest Ophtalmo Vis Sci* 33: 3011-3016, 1992.
- 40) Fuitkawa IS : Fibronectin in healing rabbit corneal wounds, *Lab Invest* 45: 120-129, 1981.
- 41) Fujikava LS, Foster CS, Gipson IK : Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: Immunofluorescence and ultrastructural studies, *J Cell Biol* 98: 128-138, 1984.
- 42) Gerald E, Kravets M&B, Ascorbic acid supply in aerobic exercise, *Journal of Applied Nutrition* volume 50 number 1&2 review, 1988.
- 43) Gibson IK, Suprr-Mihnid SJ, Tisdale AS : Anchorid fibrils from a complex network in human and rabbit cornea, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:212-220, 1987.
- 44) Gillere TE, Chandler JW, Grelner JV: Langerhans cells of the ocular surface , *Ophthalmology* 89: 700-710, 1982.
- 45) Ginger E, Bobek P: In Consell JN . Horning DH(eds) *Vitamin C*. Englewood. NY.Applied Science Publishers. 300-301, 1982.

- 46) Gipson YK, Adhesive mechanisms of the corneal epithelium, *Acta Ophthalmol. Suppl* 70:13-17, 1992.
- 47) Girand JP, Pouliquen Y, Offrer G, Payrau P: Statistical morphometric studies in normal human and rabbit corneal stroma, *Exp Eye Res* 21: 221-229, 1975.
- 48) Goldfard AH: Antioxidants: Role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med.Sci.Sports.Exerc.* 25-2: 232-236, 1993.
- 49) Gondhowiardjo TD, Haeringen JV, Corneal aldehyde dehydrogenase, glutathione reductase, and glutathione S-transferase in pathologic corneas, *Cornea*, 12(4):310-314, 1993.
- 50) Gönül B : Epidermal growth factor and prostaglandins: *FABAD J Pharm. Sci*, 25: 35-41, 2000.
- 51) Gönül B, Erdoğan D, Bilgihan K, Özoğul C : The effect of artificial tear solutions on wound healing in full thickness corneal incisions: *Acta Physiologica Hungarica*, 85(3): 251-258, 1998.
- 52) Gönül B, Erdoğan D, Özoğul C, Koz M, Babül A, Çelebi N : Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice, *Burns* 21(1): 7-10, 1995.
- 53) Gönül B, Koz M, Ersoz G : Effect of EGF on the corneal wound healing of alloxan diabetic mice, *Exp Eye Res* 54: 519-524, 1992.
- 54) Gönül, B., Söylemezoğlu, T., Yanıçoğlu, L., Güvendik, G., "Effects of Epidermal Growth Factor on Serum Zinc and Plasma PGE₂ Levels of Mice with Pressure Sores", *Prostaglandins*, 45(2): 153-157, 1993.

- 55) Hacker DJ, Bakos I: Langerhans cell in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species , Invest Ophthalmol Vis Sci 21:759-765, 1981.
- 56) Hamada R : Quantitative analysis on the ultrastucture of human fetal cornea. In yamada E, Mishima S, editors: The structure of eye, III, Jon Jo Ophthalmology 49-62, Tokyo, 1976.
- 57) Hanna C : Proliferation and migration of epithelial cells., Am J Ophthalmol 61: 55-63, 1966.
- 58) Hanna KD, Poutiquen Y, Waring GH: Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation, Arch Ophthalmol 107:895-901, 1989.
- 59) Hayasi S, Ishimoto S, Wu GS : Oxygen free radical damage in cornea after excimer laser therapy, Br J Ophtalmol, 81: 141-144, 1997.
- 60) Horning D : Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. Ann.NY.Acad.Sci. 238: 103-118, 1975.
- 61) Huang AJW, Tseng SCG: Corneal epithelial wound healing in absence of limbal epithelium, Invest Ophtalmo Vis Sci 32: 96-105, 1991.
- 62) Kanan B: Erken Yaşta değişik Sürelerle Yapılan Egzersize Bağlı Olarak Çizgili kas ve Kalp Kasında Glikojen ve Askorbik Asit İlişkisi, Gazi Üniversitesi Uzmanlık tezi, Ankara , 1997.

- 63) Kannan R, Tang D, Mackic JB, Zlokovic BV, Fernandez-Checa JC, A simple technique to determine glutathione(GSH) levels and synthesis in ocular tissue as GSH-bimade adduct: Application to normal and galactosemic guinea-pigs, *Exp Eye Res*, 56: 45-50, 1993.
- 64) Kasesuwan N, Wu FM, Hsieh F, Sanchez D, McDonnell J , Effect of Topical Ascorbic Acid on Free Radical Tissue Damage and Inflammatory Cell Influx in the Corneal Excimer Laser Corneal Surgery, *Arch Ophthalmol*, 117: 649-652; 1999.
- 65) Kayaalp O: C vitamini, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 3, Ankara, Ulucan Matbaası, 2653-2658, 1986.
- 66) Kenyon KR, Tseng SCG: Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders, *Ophthalmology* 96: 709-723, 1989.
- 67) Kingsnorth, A.N., Slavin, J., "Peptide Growth Factors and Wound Healing", *Br. J. Surg.*, 78:1286 -1290, 1991.
- 68) Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Fuwa, T., Okumura, K., "Systemic Effects of Epidermal Growth Factor (EGF) Ointment Containing Protease Inhibitor or Gelatin in Rats with Burns or Open Wounds", *Bio Pharm. Bull.* 16(1): 73-76, 1993.
- 69) Kiyohara, Y., Nishiguchi, K., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M., Okumura, K., "Cytoprotective Effects of Epidermal Growth Factor(EGF) Ointment containing Nafamostat, A Protease Inhibitor, on Tissue Damage at Burn Sites in Rats", *Biol. Pharm. Bull.*, 16(11):1146 - 1149, 1993.

- 70) Klegerman, M.E., Plotnikoff, N.P., "Proteins as Biological Response Modifiers", in Klegerman, M.E., Groves, M.J., (Eds), Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press, USA, 1992.
- 71) Komai Y, Ushiki T: The three dimensional organisation of collagen fibrils in human cornea and sclera , Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2244-2258, 1991.
- 72) Kurtel H, Granger D, Tso P, Grisham MB: Vulnerability of intestinal fluid the oxidant stress, Am J Physiol, 263: G573-G578, 1992.
- 73) Landry RJ, Pettit GH, Hanh DW, : Preliminary evidence of free radical for during argon fluoride excimer laser irradiation of corneal tissue: Lasers Light Ophthalmol, 18: 87-90, 1994.
- 74) Lang RM, Friedladder MH, Schocnrork BJ: A new morphologic manifestation of langerhans cells in guinea pig corneal transplants,Curr Eye Res ,1: 161-167, 1981.
- 75) Lenz, G.R., Mansson P.E., "Growth Factors as Pharmaceuticals", Pharm. Technol 4: 34-42, 1991.
- 76) Levine M, Morita K : Ascorbic acid in endocrine systems. Vitamins and Hormones, 42, 1-64, 1985.
- 77) Levine M: New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. New Engl.J.Med 314(14): 892-902, 1986.
- 78) Lind GJ. Cavanagh HD: Nuclear muscarinic acetylholine receptors in corneal cells from rabbit ,Invest Ophthalmol Vis Sci, 34:2943-2952, 1993.

- 79) Link GA, Pinson I, Kahane I, Hersko C : Iron loading modifies the fatty acid composition of ascorbate and alpha-tocopherol on myocardial lipid peroxidation. J.Lab.Clin.Med. 114:243-249,1987.
- 80) Ludwig A, Ünlü N, Doteghem MV; Evaluation of viscous ophthalmic vehicles containing carbomer by slit-lamp fluorophotometry in humans, Int J Pharmaceutic, 61: 15-25,1990.
- 81) Marks J : Vitamin C, The Vitamins in Health and Disease; a Modern Reoppraisal J & A. Churchill Ltd. London. 130-136, 1968.
- 82) Marti,U, Jo Burwen, S, Jones; A.L., "Biological Effects of Epidermal Growth Factor, with Emphasis on the Gastrointestinal Tract and Liver: An update", Hepatology, 9(1), 126-138, 1989.
- 83) Maurice DM: The cornea and sclera in Davison H, (Editor), The eye, 3 ed, Vol IB, Vegetative physiology and biochemistry ,Orlando, Academic Press,1984.
- 84) Mclennan S, Yue DK, Fisher E, Capogrecco C, Heffernan S : Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes , relationship with collagen and polyol pathway abnormalities. Diabetes, 37: 359-361, 1988.
- 85) Mengi S, Deshpande SG, Development and evaluation of flurbiprofen hydrogels on the breakdown of the blood/aqueous human barrier, STP Pharma Science, 2(1): 118-124, 1992.
- 86) Miller A. Costa M. Furness JB, Chubb IW: Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea, Neurosci Lett 23-243-249, 1981.

- 87) Mitznegg P, Sabel M : On the mechanism of radioprotection by cysteamine I relationship between cysteamine in livers of young and senile white mice. *Int.J.radiat.Biol.* 24: 329-337, 1973.
- 88) Mooradlan DI : Rabbit corneal epithelial cells adhere to distinct heparin-binding synthetic peptids derived from fibronectin, *Invest Ophtalmol Vis Sci* 33: 3034-3040, 1992.
- 89) Morimoto K, Mishima H, Nishida T, Otori T: Role of urokinase type plasminogen activators (u-PA) in corneal epithelial migration, *Thromb Haernost* 69: 387-391, 1993.
- 90) Murakami J, Morimoto K, Nishida T : Movement of corneal epithelium of rats in situ observed by timelapse cinematography. In Sgitnizu K, editor: *Current aspects in ophtalmology*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1992.
- 91) Murakami J, Nishida T , Otori T: Coordinated apperance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing, *J Lab Clin Med* 120: 86-93, 1992.
- 92) Nakagawa S, Nishida T, Kodama Y : Spreading of culturred corneal epithelial cells on fibronectin and other extracellular matrices, *Cornea* 9: 125-130, 1990.
- 93) Nakamura M, Hikida M, Nakano T: Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan, *Curr Eye Res* 11: 981-986, 1992.
- 94) Nakamura M, Nishida T: Differential effects of EGF and Interleukin-6 on corneal epithelial cells and vascular endotelial cells, *Cornea*, 18(4): 452-58, 1999.

- 95) Niki E : Vitamin C as an antioxidant: Selected Vitamins, Minerals and Functional Consequences of Maternal Malnutrition. Simopoulos AP(ed) World. Rev.Nutr.Diet.Basel, Karger 64: 1-30, 1991.
- 96) Nishida T : Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system, Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 2464-2469, 1992.
- 97) Nishida T , Nakagawa S: Expression fibronectin receptors in corneal epithelial cells, in Beurman EW, Crosson CE, Kaufman HE, editors: Healing processes in the cornea, The Woodlands, Texas , Porfolio Publishing Company, 1989.
- 98) Nishida T : A peptide from fibronectin cell binding domain inhibits attachments of epithelial cells, Invest Ophthalmol Vis Sci, 29: 1820-1825, 1988.
- 99) Nishida T, Nakamura M, Mishima H : Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration, Exp Eye Res 53: 753-758, 1991.
- 100) Nishida T, Nakamura M, Mishima H : Differential models of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration, J Cell Physiol 145: 549-554, 1990.
- 101) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T: Interleukin-6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism, J Cell Physiol 153:1-5, 1992.
- 102) Nishida T: Interleukin-6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo, Arch Ophthalmol 110: 1292-1294, 1992.
- 103) Ohashi H : Up-regulation of integrin alpha 5 beta 1 expression by interleukin-6 in rabbit corneal epithelial cells, Exp Cell Res 218: 418-423, 1995.

- 104) Onat T, Emerk K: karbonhidrat metabolizması: Temel Biyokimya, 1.baskı, Saray Medikal Yayıncılık. İzmir, S: 312-391, 1996.
- 105) Overmyer, R.H., Frochlich, E.D., "Yaraların Doğal Yoldan İyileşmesine Yardımcı Olmak", Modern Medicine, 1(5):59-63, 1993.
- 106) Padh H : Cellular function of ascorbic acid. Biochem. Cell.Biol 68: 1166-1173; 1990.
- 107) Patt LM, Houck JC: Role of Polypeptide Growth Factors in Normal and Abnormal Growth, Kidney Int, s3:603-610, 1983.
- 108) Pessa M.E, Bland K.I, Copeland E.M: Growth factors and detarminants of wound repair. J.Surg.Res, 42, 207, 1987.
- 109) Pettit GH, Ediger MN, Hahn DW : Electron paramagnetic resonance spectroscopy of free radicals in corneal tissue following excimer laser irradiation, Lasers Surg Med, 18: 367-372, 1996.
- 110) Pfister RR, Paterson CA, Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye , Ophtalmology, 87: 1050-1057,1980.
- 111) Pierro D, Tavazzi B,Lazzarino G,Giardina B: Malondialdehyde is a biochemical marker of peroxidative damage in the isolated reperfused rat heart, Molecular and Cellular Biochemistry,116: 193-196, 1992.
- 112) Poulsen S.S,: Epidermal growth factor in the gut lumen, The Lancet, 341, April,3,866, 1993.
- 113) Rajesh H, Stuard R, Richard CR: Tear fluid content of electrochemically active components including water soluble antioxidants, Curr Eye Res ,17: 257-263, 1998.

- 114) Rashidbaigi, A., "Growth factors: Characteristics and Applications", Pharm. Technol 38: 26-34, 1990.
- 115) Ringuold A, Andersen E, Kjonniksen I, Distribution of ascorbate in anterior bovine eye, Invest Ophtalmol Vis Sci, 41(1):20-23,2000.
- 116) Robbins SL, Kumar V : Beslenme ile ilgili hastalıklar : Basic Pathology, Dördüncü Baskı. Ömer Uluoğlu(Çev.ed) Güneş Kitabevi, Ankara, 300-324, 1990.
- 117) Rojans C,Cadenas S, Campo RP, Lopez-Torres M, Pomplona R, Prat J,Barga G: Relationship between lipid peroxidation, fatty carbohydrate and caloric restriction in mice. Arc.Biochem.Biophy. 306-1,October 59-64, 1993.
- 118) Rooslahti E: Integrins, J Clin Invest 87: 1-5,1991.
- 119) Rose RC,Bode AM: Ocular ascorbate transport and metabolism, Comp Biochem Physiol A Physiol,100: 273-247, 1991.
- 120) Rubsamen PE,McCulley J, Bergstresser PR, Streilein JW : The la immunogenecity of mouse corneal allografts infiltrated with Langerhans cells , Invest ophthalmol Vis Sci 25:519-524, 1984.
- 121) Saika S, Ascorbic asid and proliferation of cultured rabbit keratocytes, Cornea, 12(3):191-198,1993.
- 122) Salomon LL : Studies on adrenal ascorbic acid. Tex.Rep.Biol Med. 15: 925-939, 1957.

- 123) Sayan H, Gönül B, Türkyılmaz A, Çelebi N: Effects of microemulsion formulation of EGF on liver MDA and GSH in stress ulcer model, 9th Inter Phar. Technol. Symp. (IPTS-98), Sept. 7-9, 1998, Ankara-Turkey (This poster won the special poster award of IPTS-98), Proceed. Pp59-60.
- 124) Schermer A, Galvin S, Sun T-T: Differentiation-related expression of a major 64kD corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells, J Cell Biol 103:49-62, 1986.
- 125) Sclosser MJ, Verlangire AJ : Intimal permeability evaluated in a short-term organ culture of diabetic guinea pig aorta. Artery. 15(6): 304-315, 1988.
- 126) Sencer E: Vitaminler, Beslenme ve Diyet. 2. Basım. Güven matbaası İstanbul, 205-214, 1987.
- 127) Sheardown H, Wedge C, Chou L, Apen R, Rootman DS, Cheng YI : Continuous epidermal growth factor delivery in corneal epithelial wound healing, Invest Ophthalmol Vis Sci 34:3593-3600, 1993.
- 128) Singh VN: A current perspective on nutrition and exercise. J. Nutr. 122: 760-765, 1992.
- 129) Stone RA, Kuwayama Y, Terenghi G, Polak JM: Calcitonin gene-related peptide: occurrence in corneal sensory nerves, Exp Eye Res 43:279-283. 1986.
- 130) Suda T : Fibronectin appears at the side of corneal stromal wound in rabbits, Curr Eye Res 1: 553-556, 1981.
- 131) Sugiyama T : The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium, The effect of topical administration, J Ocul Pharmacol 7: 53-64, 1991.

- 132) Sun TT, Green H : Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin: Absence of marked intrinsic divergence of the their differentiated states, *Nature* ,269:489-495, 1976.
- 133) Teare JP, PUNCHARD NA, POWELL JJ, LUMB PJ, MITCHELL WD, THOMPSON RPH, Automated spectrophotometric method for determining oxidized and reduced glutathione in liver, *Clin Chem Vol*=39(4), 1993.
- 134) Tervo K, Tervo T, Eranko L: Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris, *Invest Ophthalmol Vis Sci* ,23: 671-674, 1982.
- 135) Thoft RA, Friend J: The X,Y,Z hypothesis of corneal epithelial maintenance, *Invest Ophtalmol Vis Sci* 24: 1442-1443, 1983.
- 136) Toivancu M. Tervo T. Partenen M. : Histochemical demonstration of adrenergic nerves in the stroma of human cornea , *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:398-400, 1987.
- 137) Tolbert BM, Downing M, Carlson RW, Knight MK, Baker EM,: Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 258: 48-69,1975.
- 138) Trinkaus-Randalf V, Newton AW, Franzblau C: The syntesis and role of integrin in corneal epithelial cells in culture, *Invest Ophtalmol Vis Sci* 31: 440-447, 1990.
- 139) Tsao CS, Leung PY, Young M: Effect of dietary ascorbic acid intake on Tissue vitamin C in mice . *J. Nutr.* 117: 291-297, 1987.
- 140) Tsao CS, Young M : Effects of exogenous ascorbic acid intake on biosynthesis of ascorbic acid in mice . *Life Sci.* 45: 1553-1557, 1989.

- 141) Tsao CS, Leung PY : Effect of ascorbic acid on tissue dehydroascorbic acid in mice . Nutr.Res. 9: 1371-1379, 1989.
- 142) Türkyılmaz A, Çelebi N, Gönül B; Epidermal büyüme faktörü(EGF)nün yara iyileşmesindeki rolü, Fabad J Pharm Sci, 21:61-69, 1996.
- 143) Uusitalo H, Kootila K, Palkerua A: Calcitonin gene-related peptide (GCRP) immunoreactive sensory nerves in the human and guinea pig uvea and cornea, Exp Eye Res 48:467-475, 1989.
- 144) Vaughan D, Asbury T, Riordan-Eva P: General Ophthalmology, 15th ed., Appleton&Lange, Stamford-Connecticut, 1999.
- 145) Williams RN, Paterson CA, Eakins KE, Bhattacharjee P: Ascorbic acid inhibits the activity of polymorphonuclear leukocytes in inflamed ocular tissue, Exp Eye Res, 39: 261-265, 1984.
- 146) Williams RN, Paterson CA, Eakis KE, Bhattacharjee P, Ascorbic acid inhibits the activity of polymorphonuclear leucocytes in inflamed ocular tissue, Exp Eye Res, 39: 261-265, 1984.
- 147) Wilson SE, Liang Q, Kim WJ, Lacrimial gland HGF, KGF and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding, Invest Ophthalmol Vis Sci, 40(10):2185-90, 1999.
- 148) Wilson SE, Lloyd SA, He YG: EGF, bFGF and TGF beta-1 messenger RNA production in rabbit corneal epithelial cells, Invest Ophtalmol Vis Sci 33: 1987-1995, 1992.

- 149) Winkler BS : In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention GSH. Bioch. Biophys. Acta. 925: 258-264, 1987.
- 150) Zieske JD, Bukusoglu G, Yankaukhas MA; Characterisation of a potential marker of corneal epithelial stem cells, Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 143-152, 1992.
- 151) Zieske JD, Büküşoğlu G,: Effect of protease inhibitors on corneal epithelial migration, Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2073-2078, 1991.



Dr. MURAT TİMUR BUDAK'IN ÖZGEÇMİŞİ

Eğitimi

Doğum yeri ve yılı: Muş/bulanık, 2.6.1967

İlkokul eğitimi : 1973-1978 Yücetepe İlkokulu, Ankara

Orta Okul eğitimi : 1978-1981 Namık Kemal Orta Okulu, Ankara

Lise eğitimi : 1981-1984 Anıttepe Lisesi, Ankara

Üniversite eğitimi: 1984-1991 H.Ü. Tıp Fakültesi, Ankara

Çalıştığı Yerler ve Akademik Kariyer:

1992- Dr.Sami Ulus Çocuk Hastanesi Kan Bankası Sorumlu Hekimi

1995 Eylül Dönemi - G.Ü.Sağlık bilimleri Enstitüsü Fizyoloji AbD.Doktora programı

1998 Eylül Dönemi- G.Ü.S.B.E.Fizyoloji AbD. doktora yeterlik sınavı

1999 : Mount Sinai Medical School, Ophthalmology Department, New York' ta 8 ay süreyle misafir araştırmacı

15 Mayıs-15 Haziran 2000: Kısa süreli askerlik

Dernek Üyelikleri:

Ankara Tabip Odası
Türk Fizyolojik Bilimler Derneği
İngiliz Kültür Derneği

Medeni hali: Bekar