

T.C.
Kırıkkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Ultraviyole B Işınına Maruz Bırakılan Rat Gözlerinde
Retinol Palmitatın Fotokeratit Oluşumunu Önleyici
Etkisinin Değerlendirilmesi

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET CANER FİLİZAY

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Nesrin BÜYÜKTORTOP

2013-KIRIKKALE

ONAY SAYFASI

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan Araştırma Görevlisi Dr.Mehmet Caner FİLİZAY'ın "Ultraviyole B ışımına maruz bırakılan rat gözlerinde retinol palmitatın fotokeratit oluşumunu önleyici etkisinin değerlendirilmesi" konulu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.11,2013

Yrd Doç. Dr. Nesrin BÜYÜKTORTOP
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları A.D.
Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Reyhan OĞUREL
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları A.D.
Üye

Yrd. Doç. Dr. Zafer ONARAN
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları A.D.
Üye

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım Sayın Doç. Dr. Kemal ÖRNEK'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Zafer ONARAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Reyhan OĞUREL'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurgül ÖRNEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Klinikte bulunduğum süre zarfında hem eğitim sorumlum hem de tez danışmanım olarak bana ve tezime bilimsel tecrübeleriyle katkıda bulunan; akademisyen kimliğinin yanı sıra kişiliğiyle de bana örnek olan tez danışmanı hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nesrin BÜYÜKTORTOP'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamız sırasında bizden desteklerini esirgemeyen Veteriner Hekim Cengiz YALÇIN'a ve tüm Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi hayvan laboratuvarı personeline sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deney modelimizi oluşturmak için gerekli olan ultraviyole cihazını ve fototerapi ünitesini kullanımımıza sunan ve yardımlarını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Mukadder KOÇAK'a ve Araştırma Görevlisi Dr. Esra ÖCAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama katkılarını esirgemeyen ESOGÜ Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi sayın hocam Prof Dr. Varol Şahintürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmama katkılarını esirgemeyen ESOGÜ Biyoistatistik öğretim üyesi sayın hocam Doç. Dr. Setenay Öner'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tıp eğitim ve öğrenim hayatımda desteklerini yanımda hissettiğim aileme sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Filizay C, Ultraviyole B ışımına maruz bırakılan rat gözlerinde retinol palmitatın fotokeratit oluşumunu önleyici etkisinin değerlendirilmesi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2013

Fototoksik keratit, kar körlüğü, kaynakçı keratiti, fotokeratit, ultraviyole keratiti, fazla süre veya dozda ultraviyole (UV) ışımına maruz kalmakla ortaya çıkan akut kornea hasarına verilen isimlerdir. Sıklıkla koruyucu gözlük takmadan kaynak yapan veya kış sporları ile uğraşan kişilerde görülmektedir. Ultraviyole hasarına bağlı belirtiler genellikle 6-12 saat içerisinde ortaya çıkmaktadır. Hastada yüzeysel punktat keratit, total epitel deskuamasyonu ve buna bağlı şiddetli ağrı ve görme kaybı görülmektedir. Göz kapama, siliyer spazmı çözücü, ağrı kesici damla ve suni gözyaşı damla gibi semptomatik tedavi ile 36-72 saat içinde kornea yeniden epitelize olmaktadır. Ancak bu iyileşme sürecinde hasta ağrılı ve iş göremez haldedir.

Ultraviyole ışını epitelde mitozu inhibe etmekte, nükleer fragmantasyon yapmakta, stroma keratositlerinde geri dönüşümlü hasara ve endotelde pleomorfik değişikliklere sebep olmaktadır. Bu hasarda serbest radikallerin rol oynadığı ve bazı antioksidan ilaçların hasarın ortaya çıkmasını önlemede veya tedavide etkili olduğu deneysel olarak gösterilmektedir. A vitamini (Vit-A, retinol palmitat) antioksidan etkisi olduğu bilinen bir maddedir ve literatürde farklı mekanizmalarla oluşturulan kornea epitel hasarının tedavisinde faydalı olduğu bildirilmektedir. Retinol palmitat içeren Vit-A posTM göz kremi; A vitamini eksikliğine bağlı keratokonjonktivit, atopik keratokonjonktivit, kseroftalmi gibi kornea bozuklukları için terapötik endikasyonu olan bir ilaçtır. Ancak ultraviyole hasarı önlemeye veya tedavi etmeye yönelik etkisi olup olmadığı bilinmemektedir.

Çalışmamızda ratlarda fototoksik keratit modelinde retinol palmitatın hasarı önleyici etkisini incelemeyi amaçladık. 15 adet Wistar cinsi erkek rata UV cihazı ile 311 nm dalga boyunda UV-B ışını vererek totalde 1 J/cm² enerji ile fototoksik keratit modeli

oluşturduktan sonra 14 rat iki çalışma grubuna ayrıldı. Birinci gruba 5. dakikada, ikinci gruba 120. dakikada olmak üzere sağ gözlere 250 IU/ml Vit-A pos kremTM sol gözlere sadece taşıyıcı madde (Vit-A pos kremdeki taşıyıcı madde olan vazelin, parafin, lanolin karışımı) uygulandı. Retinol palmitatın serbest radikal hasarını olası durdurucu etkisi dokusal düzeyde Hematoksilin&Eozin boyama ve hücresel düzeyde TUNEL apoptosis immunohistokimyasal kit sistemi ile çalışılarak değerlendirildi.

Bu sayede etken maddenin kornea epiteli dışındaki korneal hücrelere olası etkileri incelendi. İstatistiksel olarak retinol palmitat uygulanan sağ gözler ve retinol palmitat uygulanmayan sol gözler morfoloji ve apoptotik hücre sayıları açısından karşılaştırıldı. Ayrıca 5. ve 120. dakikada ilaç uygulanan gruplarda aynı parametreler karşılaştırılarak ilacın zamanlamasının sonuçlara etkisi olup olmadığını saptanmaya çalışıldı.

Elde edilen histopatolojik ve immunhistokimyasal bulguların istatistiksel analiz sonuçları ışığında retinol palmitat etken maddesi içeren krem uygulanan gözler ile sadece taşıyıcı madde içeren krem uygulanan gözler arasında anlamlı fark bulunamadı. Retinol palmitatın istatistiksel anlamlı olarak fotokeratit oluşumunu engelleyici etkisi saptanamadı. Ayrıca ilacın 5. veya 120. dakikada uygulandığı iki grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Ancak 120. dakikada sağ göze Vit-A pos kremTM uygulanan grupta hasarın diğer gruplara göre biraz daha az hasar görüldüğü kanaatine varıldı.

Çalışmamızda sonuç olarak retinol palmitatın literatürde belirtilen diğer A vitamini türevi antioksidanlar gibi ultraviyole keratitinin ortaya çıkmasını önleyici etkisi olmadığı gösterildi. Ancak epitel iyileşmesi üzerine bilinen olumlu etkileri nedeniyle ultraviyole keratitinin tedavisinde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda tedavi sürecine olan etkilerinin araştırılmasının yol gösterici olduğuna inanmaktayız.

Anahtar Sözcükler: A vitamini, fototoksik keratit, kaynakçı keratiti, kar körlüğü, kornea, rat, retinol palmitat, ultraviyole.

ABSTRACT

Phototoxic keratitis, snow blindness, welders keratitis, photokeratitis, ultraviolet keratitis are the names given to acute corneal injury due to excess dose or duration of ultraviolet (UV) radiation. It is generally seen in welders working without protective glasses or the ones dealing with winter sports. Symptoms of ultraviolet injury starts in 6-12 hours, there is superficial punctate keratitis, total epithelial desquamation causing severe pain and visual loss. Cornea is reepithelized within 36-72 hours with symptomatic treatment such as eye patching, pain killer and ciliary spasmolytic eye drops and artificial tears. But during this healing period patient is painful and unable to work.

Ultraviolet radiation inhibits mitosis in epithelium, produces nuclear fragmentation, causes reversible injury in stromal keratocytes and pleomorphic changes in the endothelium. Experimentally, it is shown that free radicals play role in this injury and some antioxidant drugs prevent the damage or are effective in treatment. Vitamin A (Vit-A, retinol palmitate) is a known antioxidant and it is shown to be effective in treatment of corneal epithelium injuries of other mechanisms. Vit-A posTM eye ointment (trade mark of retinol palmitate) has indication for corneal disorders such as keratokonjunctivitis due to vitamin A deficiency, atopic keratokonjunctivitis, xerophthalmia. But it is not known that this drug has an effect on ultraviolet injury.

In our study we aimed to evaluate whether retinol palmitate had a preventive effect on phototoxic keratitis model in rats. After creating an phototoxic keratitis model on 15 rats with a UV equipment producing a UV radiation of 311 nm wavelength and 1 J/cm² of energy 14 rats were recruited into 2 study groups. One group received 250 IU/ml vit-A-posTM ointment to right eyes and vehicle (vaseline, paraffin and lanolin) to left eyes in 5th minute and second group received the same in 120th minute. The possible preventive effect of retinol palmitate against free radical injury was evaluated by hematoxyline&eosin staining on tissue basis and by TUNEL apoptosis immunohistochemistry method on cellular basis. By this way we also observed other possible positive effects of this active ingredient on corneal tissues other than epithelium. Statistically morphology and apoptotic cell counts were compared between right eyes receiving retinol palmitate and left eyes not receiving retinol palmitate, Also

same parameters were compared between the eyes which received drug in 5th and 120th minutes, in order to evaluate the timing on results. According to the results of histopathologic and immunohistochemical findings there was no statistically significant difference between the eyes that received retinol palmitate and the eyes received only vehicle. It couldn't be detected that retinol palmitate had significantly preventive effect on the onset of phototoxic keratitis. Besides there was no statistically significant difference between the groups where the drug was applied on 5th or 120th minutes. However the damage was seemed to be less in the eyes that received Vit-A pos krem™ on 120th minutes.

In conclusion, in our study retinol palmitate was shown to have no preventive effect on the onset of ultraviolet keratitis as other vitamin A derivatives on the literature. However we think that retinol palmitate can be useful in treatment of ultraviolet keratitis on the basis of it's known positive effects on epithelial healing. Therefore we believe that it will be helpful to evaluate it's effects on treatment process in further studies.

Key Words: Vitamin A, snow blindness, welders flash, phototoxic keratitis, cornea, keratitis, rat, retinol palmitate, ultraviolet.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ark	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin Trifosfat
C	: Kompleman
Ca+2	: Kalsiyum İyonu
COX-2	:Siklooksijenaz-2
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGF	: Epidermal Growth Faktör
Fe	: Demir
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
H%E	: Hemotoksilen Eosin Boyama
HB	: Hemotoksilen Boyama
HMF	: Heksoz Monofosfat Şantı
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
ICAM-1	: İntraselüler Adezyon Molekülü
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IM	: İntramusküler
Ig A	: İmmunglobulin A
i-NOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
J:cm'	: Joule/Santimetrekare
LDL	: Low Dansiteli Lipoprotein
LH	: Yağ Asidi
LT	: Lökotrien
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleks
mm	: Milimetre
mm²	: Milimetrekare
μ	: Mikron
MDA	: Malonil Dialdehit
MIP	: Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör
MPO	: Nötrofil Myeloperoksidaz
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
NAD	: Nikotin Amid Dinükleotid
NADPH	: Nikotin Amid Dinükleotid Fosfat
NCAM	: Nörosellüler Adezyon Molekülü
Nm	: Nanometre
NF- κB	:Nükleer faktör-κB (NOS)
O₂	: Oksijen
O₂-	: Süperoksit Radikali
OH-	: Hidroksil Radikali

PAS	: Periodic acid Schiff
PG	: Prostaglandin
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
RO	: Alkoksi Radikali
ROO.	: Peroksi Radikali
ROOH.	: Hidroperoksit Radikali
Sens	: Duyarlılaştırıcı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Subs	: Substrat
TCA	: Trikarboksilik Asit Siklusu
TGF	: Transforming Growth Faktör
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TUNEL	:Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin – Dntp Nick End Labeling Yöntemi
UV	: Ultraviyole
X .	: Radikal
XOD	: Ksantin Oksidaz
X-Ray	: X Işını
VApal	: Vitamin A Palmitat
Vb	: Ve Benzeri
Vit	: Vitamin
VCAM	: Vaskülo Selüler Adezyon Molekülü
Zn	: Çinko

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
RESİM LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KORNEA EMBRİYOLOJİSİ	3
2.3. GÖZYAŞI FİLM TABAKASI	7
2.4. KORNEA FİZYOLOJİSİ	8
2.4.1. Kornea Hücrelerinde Metabolizma	8
2.4.1.1. Glukoz Metabolizması	8
2.4.1.2. Oksijen Metabolizması	8
2.4.1.3. Stromal Hidrasyon ve Korneanın Şeffaflığı	9
2.5. KORNEANIN PATOLOJİK CEVAPLARI	10
2.5.1. Kornea'nın İmmunolojik Cevapları	10
2.5.2. İmmunopatolojik Cevaplar	11
2.5.3. Kornea'nın Yaralanmaya Cevabı	12
2.6. APOPTOZİS ve GÖZDEKİ YERİ	14
2.6.1. Hücre Zedelenmesinin Nedenleri	15
2.6.2. Hücre Ölümü	15
2.6.3. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler (57)	18
2.6.3.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri:	18
2.6.3.2. Histokimyasal yöntemler:	19
2.6.3.3. Biyokimyasal yöntemler:	20
2.6.3.4. İmmunolojik yöntemler:	20
2.6.3.5. Moleküler biyoloji yöntemleri:	20
2.6.4. Apoptozis İle Göz İlişkisi	21
2.6.5. Kornea Yara İyileşmesinde Apoptozisin Yeri	21

2.6.6.	UV Işını ile ilgili Teknik Özellikler.....	23
2.6.7.	Apoptozisin UV–B Maruziyetinde Modülasyonu	25
2.6.8.	UV Işınından Korunma.....	26
2.7.	ULTRAVİYOLE KERATİTİ.....	26
2.8.	SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLARIN APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ.....	28
2.8.1.	A. Serbest Radikallere Giriş.....	28
2.8.2.	Serbest Radikal Oluşumundaki Başlıca Mekanizmalar	30
2.8.2.1.	B.1 .Otooksidasyon Reaksiyonu.....	30
2.8.2.2.	B.2. Geçiş Metal İyonlarının Etki Reaksiyonu.....	30
2.8.2.3.	Fotooksidasyon Reaksiyonu	31
2.8.2.4.	Enzimatik Oksidasyonlar.....	32
2.8.2.4.1.	Ksantin oksidaz (XOD).....	33
2.8.2.4.2.	NADPH oksidaz	33
2.8.2.4.3.	Nötrofil miyeloperoksidaz (MPO)	33
2.8.2.5.	Halojenlenmiş Hidrokarbonlar	33
2.8.3.	Doğal Enzimatik Ve Peptid Yapılı Antioksidan Savunma Sistemleri	34
2.8.3.1.	Birincil Antioksidanlar	34
2.8.3.1.1.	Katalaz ve Peroksidaz	34
2.8.3.1.2.	C.2. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD).....	34
2.8.3.1.3.	Glutatiyon ve Glutatiyon Peroksidaz (GSHPx).....	35
2.8.3.2.	İkincil Antioksidanlar	35
2.8.3.2.1.	C Vitamini	35
2.8.3.2.2.	E Vitamini	35
2.8.3.2.3.	Karotenoidler.....	37
2.8.3.2.3.1	A Vitaminleri ve Türevleri	38
2.8.3.2.3.1.1	Retinol Palmitat.....	42
3.	AMAÇ.....	43
4.	YÖNTEM VE GEREÇ	47
4.1.	DENEY HAYVANLARI.....	47
4.2.	İLAÇ :	48
4.3.	DENEY PROTOKOLÜ	48
4.4.	HİSTOPATOLOJİK VE IMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME:.....	51
5.	BULGULAR.....	53
5.1.	HİSTOPATOLOJİK VE IMMUNHİSTOKİMYASAL ANALİZ SONUÇ BULGULARI.....	53

5.2. İSTATİKSEL ANALİZ SONUÇ BULGULARI	64
5.3. İSTATİKSEL ANALİZ SONUÇLARI	64
6. TARTIŞMA	67
7. SONUÇ	78
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	90

RESİM LİSTESİ

Resim 1.	Apoptosis.....	17
Resim 2.	Görme Siklusu.....	40
Resim 3.	Waldmann UV 181 BL cihazı üzerinde temas mesafesinden gözlerine UV-B ışını alan ratlar görülmekte.....	49
Resim 4.	Uv ışınlama sonrasında sağ gözlerine lokal retinol palmitat ve sol gözlerine taşıyıcı preparat uygulanmış ratlar görülmekte.....	50
Resim 5.	Işınlamadan 24 saat sonra enükle edilmiş bir rat gözküresi görülmekte....	50
Resim 6.	5. dakika sağ göz kesiti (H&E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	55
Resim 7.	5. dakika sol göz kesiti (H&E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	55
Resim 8.	120. dakika sağ göz kesiti (H&E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	56
Resim 9.	120. dakika sol göz kesiti (H&E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	56
Resim 10.	Kontrol sağ göz kesiti (UV-B verilmiş, taşıyıcı veya ilaç uygulanmamış, H&E ile boya ile hazırlanmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)	57
Resim 11.	Kontrol sol göz kesiti (UV-B verilmiş, taşıyıcı veya ilaç uygulanmamış, H&E ile boya ile hazırlanmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)	58
Resim 12.	5. dakikada Vit-A pos krem TM uygulanmış sağ göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	59
Resim 13.	5. dakikada taşıyıcı madde uygulanmış sol göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)	60
Resim 14.	120. dakikada Vit-A pos krem TM uygulanmış sağ göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	61
Resim 15.	120. dakikada taşıyıcı madde uygulanmış sol göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)	62
Resim 16.	Kontrol sağ göz kesiti (UV-B verilmiş, taşıyıcı veya ilaç uygulanmamış, TUNEL ile boyama ile hazırlanan 5 mikrometre kalınlıktaki kesit).....	63

Resim 17. Kontrol sol göz kesiti (UV-B verilmiş, taşıyıcı veya ilaç uygulanmamış,
TUNEL ile boyama ile hazırlanmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)..... 64

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Zararlı Uyarana Karşı Hücresel Yanıt	15
Tablo 2. Deney hayvanlarının gruplara [grup 1 (5') ve grup 2 (120')] göre sayıca dağılımı; etken madde(250 IU/g retinol palmitat), taşıyıcı maddelerin (beyaz vazelin, sıvı parafin, lanolin) sağ -sol rat gözlerine uygulanması	48
Tablo 3. Gruplara Göre Apoptotik Hücre Skorları.....	53
Tablo 4. 5. ve 120.dakikalarda semi-kantitatif apoptozis skorlarının istatistiksel gösterimi	65
Tablo 5. Retinol palmitat ve vehicle uygulanmış gözlerde semi-kantitatif apoptotik skorların gruplara göre değişiminin istatistiksel gösterimi	65
Tablo 6. Retinol palmitat (etken madde) ve taşıyıcı madde uygulanmış tüm gözlerde semi-kantitatif apoptotik skorların değişiminin istatistiksel gösterimi	66

1. GİRİŞ

Fototoksik keratit belli doz veya dalgaboyunda ultraviyole ışımına maruz kalmak ile ortaya çıkan kornea hasarına verilen isimdir. Ultraviyole keratiti, kaynakçı keratiti, kar körlüğü gibi başka isimlerle de anılan fototoksik keratit kornea epitelinde eksfoliasyon, azalmış görme keskinliği, inflamasyon, ödem, kızarıklık ve ağrı ile karakterizedir. Ultraviyole ışını sadece kornea epiteline hasar vermekle kalmayıp tüm kornea katlarında hatta lens ve retinada inflamatuvar değişiklikler ortaya çıkarabilmektedir.

Ultraviyole keratiti korunmasız kaynak yapan kaynak işçilerinde, gerekli koruyucu donanımı kullanmayan kış sporcularında ve ozon tabakası defekti bulunan enlem kuşaklarında korunmasız güneş banyosu yapan kişilerde görülebilmektedir. Işın maruziyetinden 6 ila 12 saat sonra şiddetli ağrı ve görme azlığı başlamaktadır. Muayenede yüzeysel punktat keratit, epitel deskuamasyonu, konjonktiva kemozisi, lakrimasyon, blefarospazm görülmektedir. Bu klinik tablonun iyi bir yönü silier spazm çözücü damlalar, ağrı kesici damlalar, suni gözyaşı gibi ilaçlara cevap vererek tablonun 36-72 saat içinde kornea reepitelize olarak normale dönmesidir. Hastalarda tedavi sonrası bir sekel gözlenmemektedir. Ancak reepitelizasyon tamamlanana kadar hasta çok ağrılı ve iş göremez haldedir. Erken dönemde olaya müdahale edilmesi işgücü kaybının önlenmesi açısından önemlidir.

Ultraviyole ışının meydana getirdiği hasara bağlı epitelde mitoz inhibe olmakta, nükleer fragmantasyon oluşmakta, stroma keratositlerinde geri dönüşümlü hasar ve endotelde pleomorfik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu hasarda interlökinler, sitokinler, matriks metalloproteinazları ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) gibi çeşitli proinflamatuvar ajanların rol oynadığı gösterilmektedir. NF- κ B aktivasyonu ile inflamatuvar hücreleri toplayan indüklenbilir nitrik oksit sentaz (i-NOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi anahtar inflamatuvar medyatörlerin transkripsiyonu hız kazanmaktadır. Deneysel çalışmalarda fototoksik keratitin patogenezinde serbest radikallerin rol oynadığı ve topikal astazantin, laktoferrin, intravenöz C vitamini, diyetle zerumbon, diyetle C vitamini, intraperitoneal okreotid gibi çeşitli anti oksidan maddelerin hasarın ortaya çıkmasını önlemede veya tedavide etkili olduğu gösterilmektedir (1-5).

Çalışmamızda antioksidan etkisi bilinen ancak fototoksik keratit üzerine etkisi daha önce bildirilmemiş bir A vitamini türevi olan retinol palmitatın fototoksik hasarın önlenmesine yönelik etkisi UV-B ışını ile oluşturulan deneysel keratit modelinde araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KORNEA EMBRİYOLOJİSİ

Göz küresinin embriyolojik gelişiminde nöral ektoderm, yüzeyel ektoderm ve mezenşim olmak üzere üç dokunun katkısı bulunmaktadır. Embriyogenezis döneminde kornea stroması ve endotelin oluşumunu sağlayacak nöral krest hücreleri, nöral plağın dorsalindeki nöroepitelyal hücrelerden köken alır. Kornea endoteli ve stromasının kökeni hakkında bazı farklı görüşler mevcut olup kornea endotel hücrelerin ve keratositlerin nöral krest hücresi kökenli olduğu, sonradan mezenşimal hücrelere farklılaştığı sonucuna varılmıştır. Kornea epitelini intrauterin hayatın 5. haftasında yüzey ektoderminden gelişmeye başlar. Bowman membranı ise gestasyonel hayatın 5. ayında kornea epitelinin altında eozinofilik bir membran şeklinde izlenebilen bir yapı olup korneal stromanın mezenşimal hücreleri tarafından üretiliyor gibi görünmektedir. Descement membranının ise gestasyonel 8. haftada endotel hücrelerince oluşum süreci başlatılmıştır. (6)

2.2. KORNEA ANATOMİSİ

Kornea göz küresinin ön kısmında yer alır. Göz küresinin dış tabakasının 1/6'lık kısmını oluşturan saydam ve damarsız bir yapı şeklinde organize olmuştur (7). Kornea skleraya saat camı misali yerleşmiş ve 40-45 Dioptri (D) kırma gücü olan konveks bir yüzeye sahiptir. Optik görevi dışında dış etkenlere karşı koruyuculuk görevini de üstlenmiştir. Normal kalınlığı merkezde 520 μ , periferde 650 μ 'dir. Erişkinde horizontal çapı 12,6 mm, vertikal çapı 11,7 mm, ön eğrilik yarıçapı 7,8 mm ve arka eğrilik yarıçapı 6,5 mm'dir (8,9). Ön yüzey kırma gücü +48,6 D, arka yüzeyinin kırma gücü -6,8 D olmak üzere toplam kırıcılık gücü +42 D'dir. Refraktif indeksi 1.376'dır. Kornea gözün toplam kırma gücünün %70'ini oluşturmaktadır (8,9,10).

Yenidoğan döneminde vertikal kornea çapı 10 mm'dir. Kırıcılık gücü yaklaşık 51 D'dir. Kornea çapı 1 yaşında erişkin seviyeye ulaşırken kornea gelişimi ise 6 yaş civarında tamamlanmaktadır (11-13).

Santral kornea normalde antijen üreten ve sunan hücrelerden yoksunken ancak enfeksiyon, immunolojik red ve yaralanma gibi durumlarda, limbal periferden göçen langerhans hücreleri ve T lenfositleri bulundurulabilir. Sinir yönünden çok zengin bir doku olan kornea Nervus Trigemini'nin oftalmik dalından gelen uzun posteriyör siliyer sinirlerin 70–80 adet dalının sklera, episklara ve konjonktivadan girmesiyle innerve olmaktadır. Bu sinir lifleri limbusu geçtikten 1–2 mm sonra myelin kılıflarını kaybederler. Bowman katının arkasında pleksuslar oluşturularak epitele innervasyon dalları gönderirler (7,14).

Kornea mikroskopik olarak 6 anatomik katmandan oluşmaktadır.

- 1- Epitel tabakası
- 2- Bowman tabakası
- 3- Stroma
- 4- Dua tabakası
- 5- Descemet membranı
- 6- Endotel tabakası

Epitel tabaka: Kornea epiteli 40-50 mikrometre kalınlığındadır ve korneal kalınlığın %10'unu oluşturmaktadır. 5-7 sıra tabaka hücreden oluşmuştur. Üç çeşit hücre içermektedir:

- 1-Yüzeyel hücre
- 2-Poligonal kanatsız hücre
- 3-Kolumnar bazal hücre

Yüzeyel hücrelerin elektron mikroskopik incelemesinde çok sayıda mikrovillus ve plika içerdikleri görülmüştür. Yüzeyel hücrelerin yüzeyi epitelin gözyaşı filmine yapışmasını sağlayan mikrokalik ile örtülmüştür. Mikrovillus yapıları hücrelerarası sıkı bağlantı yapıları ile birlikte hücreler arasında anatomik bariyer oluştururlar (13).

Kolumnar hücreler, bazal membran üzerine tek sıra dizilmiş halde bulunan hücrelerdir. Bu hücreler mitotik aktivite içerirler ve bazal hücreler olarak da bilinmektedir. Çoğalarak öne doğru ilerleyip kanatsız yapıda hücreleri oluştururlar. Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunmaktadır. Tonofilamanlar hücre

iskeletini korurken; aktin filamanlar yara iyileşmesi safhasında hücre göçünde rol alırlar (13). Hemidesmozomlar, epitel hücrelerinin arasında ve epitelle bazal lamina arasında bulunup epitel hücrelerini birbirine ve bazal laminaya bağlama görevini üstlenen yapılardır. 'Gap junction' adı verilen sıkı bağlantı noktaları ise sadece hücreler arasındaki küçük molekül alışverişine izin verecek şekilde organize olmuş yapılardır.

Epitel hücreleri, korneada periferden merkeze doğru ilerleyen bir morfolojiye sahiptirler. Bazal ve kanatsız hücreler, arka taraftan öne doğru ilerler ve dökülürler. Bu, X-Y-Z hipotezi olarak adlandırılan bir fenomendir (13,15).

Kök hücreler ise limbusun yüzeyinde bulunan ve epitel yenilenmesinde yardımcı bir role sahip olan epitel tabakada bulunan bir hücre grubudur.

Kornea epitel tabakası gözyaşı, aköz hümör ve limbal kapillerden beslenir. Rejenerasyon yeteneği çok yüksek olan bu hücreler oksijen ihtiyacını, atmosfer, konjonktiva, kapak damarları ve aközden temin ederken metabolik glukoz ihtiyacını hümör aközden temin etmektedir.

Epitel hücrelerinde metabolik yıkım sonrası oluşan laktik asit birikimi; epitel hücre membranını harap ederek bazal hücrelerin bazal membrana yapışmasıyla kornea ödemi, kistik değişiklikler, erozyon ve neovaskülarizasyon meydana getirebilmektedir. Ödem ışık yansımaları ve düzensiz astigmatizmaya yol açarak görmeyi bozmaktadır. Epitel tabakası olmadığında ise stromal iyileşme gecikmektedir.

Bowman tabakası: Embriyonel hayatta stromanın ön yüzeyine yerleşmiş olan keratositler tarafından oluşturulur. 8 – 14µm kalınlıktadır (16). Kısa rastgele dizilmiş kollajen liflerinden oluşur. Asellülerdir. Arka sınırı korneal stroma ile birleşerek sonlanır. Travmaya karşı dirençlidir. Mikroorganizma ve tümör hücrelerinin korneaya invazyonuna karşı bariyer oluşturur. Yenilenme yeteneği yoktur. Travma sonucu skar dokusu olarak iyileşir; eski haline geri dönemez.

Stroma: Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur. %78'i sudur. 500 µm kalınlığındadır (16,17). Kuru ağırlığının %80'i kollajen, %15'i glikozaminoglikan (GAG), %5'ni

keratositler oluşturur. Stromanın başlıca kollajeni kollajen tip I'dir; ayrıca tip III, V, VI kollajen bulunabilir. Kollajen lif demetleri mukopolisakkaritlerle lameller tarzda ayrılmıştır. Kollajen fibriller birbirlerine paralel olarak uzanırken fibril dizilişlerindeki anormallik şeffaflığı etkiler. Travma, enfeksiyon ve distrofiler stromal fibrillere etki ederek ödem ve skar dokusuna neden olur.

Stroma içerisinde seyrek olarak dağılmış keratosit adı verilen fibroblast kökenli hücreler bulunmaktadır. Sayıları 200 milyon ile 1,5 milyar arasında değişmektedir. Keratositler glikozaminoglikan yapımına aktif olarak katılırlar. Stromal yaralanmada keratositler yaralanan bölgeye göç edip fibroblastlara dönür ve kollajen üreterek skara sebep olurlar (18,19). Glikozaminoglikanlar; fibriller arası mesafeleri doldurmakta ve anyonik bir ortam oluşturarak katyon ve su bağlamaktadır. Bu ara maddenin su tutulumunu artırmasının fibriller arası açıklığı artırarak kornea kalınlığını artırarak kornea ödeminde rol oynadığı düşünülmektedir. (18).

Stromada 3 tip glikozaminoglikan bulunur; keratan sülfat (%50), kondroitin sülfat (%25) ve kondroitin sülfat A (%25).

Dua tabakası (Pre-Descement): Lameller kornea cerrahisi üzerine çalışmaları olan Harminder Dua tarafından yakın zamanda keşfedilen bir tabakadır. Kornea'nın stroma ve descement katları arasında $10.15_{\pm}3,6\mu\text{m}$ kalınlığında oldukça sert bir yapıdır. 1-1.5 barlık bir basınca dayanabilecek güçte bir membransı yapı şeklinde organize olmuştur. Asellüler bir tabaka olup tip 1 kollajen demetlerinin uzunlamasına, transvers ve oblik planda yerleşmesiyle oluşan lamellalar içermektedir. Derin anterior lameller keratoplasti cerrahisinde yöntem hava enjekte ederek stroma ile descement membranını birbirinden ayırmaktır, Dua ve arkadaşlarına göre çoğu vakada ayrılma stroma ile bu yeni tanımlanan tabaka arasında olmaktadır, böylece geriye descement membranı yerine çok daha sağlam bir yapı kalmaktadır (20).

Descement membranı: Stromanın arka sınırı ile endotel arasında uzanan bir tür basal laminadır. İntrauterin hayatta gelişen önde yer alan bantlı bölge ile yaşam boyunca endotel tarafından salgılanan arkada yer alan bantsız bölge olmak üzere 2 tabakadan oluşur. İnce kollajen fibriller içerir. Yaşla beraber kalınlık artışı gözlenir. Elastiki

özelliğe sahiptir. Kalınlığı 10 µm düzeyindedir (16). Korneanın endotelyal hastalıklarında karakteristik değışiklikler görülür. İridokorneal açıya 2 mm uzaklıkta olup burada son bularak Schwalbe çizgisini oluşturur.

Endotel tabakası: Endotel hücreleri doğumda yaklaşık 3500-4000 hücre/ mm², erişkin bireylerde 2500-3000 hücre/mm² civarındadır. Endotel tabakasında yaklaşık 350-400 bin hücre bulunmaktadır (8). Yeni doğanda endotel hücreleri büyük çekirdekli, küçük sitoplazmalı ve yuvarlak görümlü iken yaş ilerledikçe hücrelerin şekli değışerek düzenli altıgen poligonal bir dizilim gösterirler. Bu poligonal dizilim geometrik ve termodinamik avantajlar sağlayan en stabil ve yüzey gerilimi en düşük olan hücre dizilimidir (21,22). Bu poligonal hücreler 4-5 µm kalınlıkta ve 18-20 µm genişliktedir. Aköz hümörle direkt temas ederler. Korneanın beslenmesini üstlenmişlerdir.

Endotel metabolik pompa mekanizması içermektedir. Bu pompanın çalışma mekanizması ısıdan etkilenmektedir (17).

Endotelyal hücreler çocuklukta bölünebilirken bu olay yetişkinlerde nadirdir. Yaşla beraber hücre sayısında azalma, hücre büyüklüğünde artış görülür. Hücre sayısı 300-400 mm²'nin altında düşerse ödem gelişir. Aşırı stres ve travma sonucu endotel hücreleri fibroblast benzeri hücrelere dönüşebilirler. Kornea endotel hücre kaybı durumunda çoğalamayan endotel hücreleri sitoplazmalarını genişleterek kayıp olan yerleri doldururlar (23,24).

2.3. GÖZYAŞI FİLM TABAKASI

Kornea ön yüzeyini saran tabakadır. Göz kırıldığında kalınlaşır ve ikinci kırpma hareketine kadar giderek inceler. Kornea ve konjonktiva epitel sağlığı için nemlendirme özelliğiyle önemi yanısıra düzgün bir optik yüzey sağlaması ve kırıcılık özelliğinin bulunması bakımından da önemlidir. Yaklaşık 7 µm kalınlığındaki gözyaşı film tabakası kornea için gerekli besin ve oksijeni sağlar. İçerdiği laktoferrin, lizozim, betalizin ve immunglobulinler sayesinde bakterisitik etkiyle koruyucu role sahiptir (11,25,26).

Gözyaşı filmi 3 tabakadan oluşur:

1-Lipid tabaka: En dış tabakadır. 0,5 µm kalınlığındadır, kolesterol esterleri ve yağ içerir. Meibomian, Zeiss ve Moll bezleri tarafından salgılanır. Gözyaşının buharlaşmasını geciktirir.

2-Aköz tabaka: 6,5 µm kalınlıktadır. NaCl, glukoz, üre, değişik enzim ve proteinler, Ig, kompleman ve albumin içerir. Lakrimal gland, Krause ve Wolfring bezlerinden salgılanır.

3-Musin tabaka: 0,2 – 0,5 µm kalınlıktadır. Goblet hücrelerinden salgılanır. Epitel ile gözyaşı film tabakası arasında yüzey gerilimini ayarlar.

2.4. KORNEA FİZYOLOJİSİ

Korneada bulunan hücrelerin ana görevi kornea şeffaflığını sağlamak ve optik kırıcılık sağlamaktır. Korneada bulunan epitelyum, keratosit ve endotel hücreleri metabolik olarak aktif olan hücrelerdir.

2.4.1. Kornea Hücrelerinde Metabolizma

2.4.1.1.Glukoz Metabolizması

Korneanın epitel hücreleri, keratositleri ve endotel hücreleri için başlıca enerji kaynağı glukozdur. Epitel hücreleri glukozun %90'ını aközden; geri kalan %10'unu ise limbal damar ve gözyaşından sağlarlar. Korneada glukoz üç metabolik yol: TCA siklusu, anaerobik glikoliz ve heksoz monofosfat yolu ile metabolize edilir. HMF şantı ile glukozdan elde edilen NADPH ortamdan serbest radikallerin uzaklaştırılması için gerekli antioksidan sistemlerle birlikte kullanılır (27).

2.4.1.2.Oksijen Metabolizması

Oksijen epitel tarafından gözyaşı tabakasından alınırken, stroma ve endotel oksijeni aköz sıvısından almaktadır. Oksijen; glukoz TCA siklusunda metabolize olurken

kullanılır. Oksijen metabolize olurken süperoksite ve ondan sonra da hidrojen peroksite çevrildiğinde organizma için son derece hasar yaratıcı hale gelebilmektedir. Epitel ve endotel hücrelerinde serbest radikallerin inaktive hale getirilmesinde görev alan glutatyon redüktaz ve peroksidaz enzimlerinin işlevleri için de glukoz ve oksijene ihtiyaç duyulur. Antioksidan enzimlerin faaliyeti için hücre içi glutatyonun 1:3 oranında azalması durumunda endotelin pompa fonksiyonu etkilenerek kornea şeffaflığının belirgin olarak azaldığı gözlemlenmiştir (28).

Pentoz fosfat yolunda heksoz pentoza çevrilirken, glukozun yıkımı sırasında oluşan ürünler nükleik asit ve lipid sentezinde kullanılmaktadır. Mitotik faaliyet için gerekli NADPH oluşumunu da bu yolla sağlar. Bu yıkım yolunun ürünü olan NADPH askorbat ve glutatyon desteği ile serbest radikallerin oksidatif etkilerinden hücreyi korur (30).

Oksijen, süperoksite ve ondan sonra da hidrojen peroksit radikallerine çevrildiğinde organizma için zararlı hale gelmektedir. Antioksidan sistemler bu bileşikler üzerine etki ederek hücreyi oksidan etkiden korumayı amaçlarlar (28).

2.4.1.3. Stromal Hidrasyon ve Korneanın Şeffaflığı

Kornea ağırlığının %78'i sudan oluşur. Korneanın şeffaflığını idame edebilmesi için suyun sürekli stromadan epitelyum ve endotel yoluyla dışarı pompalanması gereklidir. Endotel ve epiteli fonksiyon göstermeyen bir kornea 3 katına kadar genişleyebilir ve opak bir görünüm kazanır. Korneal hidrasyon kontrolünde 5 faktör etkin rol oynar:

- 1-Epitel ve endotelin bariyer fonksiyonu
- 2-Stromanın şişme basıncı
- 3-Epitel ve endotel iyon pompaları
- 4-Göz içi basıncı
- 5-Kornea yüzeyindeki suyun buharlaşması (28)

Endotelde bulunan iyon pompası endotelin aktif dehidratasyonundan sorumludur. Stromadan aköze doğru aktif iyon pompalanması söz konusudur. Su da pasif olarak

iyonları takip eder. Bu pompanın esas görevi aköze aktif sodyum pompalayarak buna bağlı su geçişini sağlamaktır (29).

Ultraviyole ışınına maruz kalmak glukozun hareketini inhibe eder, korneal metabolizmanın bozulması ile endotel pompa fonksiyonu etkilenir, sonuçta kornea ödemi ortaya çıkar (32).

2.5. KORNEANIN PATOLOJİK CEVAPLARI

Korneanın, çeşitli immünolojik, travmatik ve infeksiyöz uyaranlara karşı vermiş olduğu patolojik cevaplar kornea morfolojisi ve fonksiyonunda ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Korneadaki hasar ve yenilenme süreci optik saydamlık nedeniyle daha hassastır. Ödem, fibrozis, skar, neovaskülarizasyon ve düzensiz astigmatizmaya bağlı kalıcı görme kayıpları gelişebilir.

2.5.1. Kornea'nın İmmunolojik Cevapları

Kornea hücreleri, immünolojik, travmatik ve inflamatuvar gibi olaylarda aktif rol oynamaktadır (33). Epitel, keratosit hücreleri ve endotel, hücreler arası ilişkiler ve sitokinler gibi mediyatörlerin salınımı ile immün cevapta yer alabilmektedir.

Kornea Epiteli

Oküler yüzey üzerinde pek çok yüzey reseptörü ve proteinin bulunmaktadır. Bu moleküller ayrıca inflamatuvar mediyatörlerin uyarılması ile sentezlenir veya sayıları artırılabilir. Epitel hücre yüzeyinde bulunan MHC sınıf 1 antijeni kornea transplantasyonu sonucunda immün cevabı uyarırken, MHC sınıf 2 antijenleri interferon-gamma (IFN- γ) ile inkübasyonu sonucunda allojenik lenfositleri uyarır. Epitel hücrelerinin, interlökin (IL) 1, 6,8, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), IFN- γ , TGF- β kompleman (C) 5a, lökotrien (LT) B4 gibi eriyebilen sitokin ve prostaglandinleri sentezleyip salgıladıkları gösterilmiştir (33).

Fare korneası ile yapılan çalışmalar travmayı takiben 6.saatte IL-1a'nın, 18 saatte ise IL-6'nın kornea tarafından sentezlenerek maximum konsantrasyona ulaştığını

göstermektedir. Kuvvetli bir kemotaktik ajan olan ve inflamasyonda önemli bir rol oynayan IL-8 de kornea tarafından travmaya yanıt olarak sentezlenmektedir (31).

Yapılan çalışmalarda normal göz yüzey epitelinde özellikle limbusda langerhans hücrelerinin (LH) varlığı gösterilmiştir (34,35). Langerhans hücreleri inflamasyon sırasında santral korneaya göç eder. Bu göç substance P, IL-1, TNF-alfa gibi birçok primer ve sekonder kemotaktik faktörün kontrolü altındadır ve steroid, rapamisin, TGF- β ile durdurulabilir. Langerhans hücreleri aktif inflamasyon bitiminden sonra bile allogreft reddi olan kornealarda herpetik stromal keratoüveitte veya belirgin neovaskülarizasyonu olan kornealarda epitel ve stromada yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir (36,37).

Kornea Stroması

Keratositler inflamatuvar ve immün cevaplarda önemli görev alırlar. Genel olarak MHC sınıf 1 yüzey reseptörü bulundurur. ICAM-1 yüzey proteini sentezlerler. IL-1a, IL-6, IL-8 ve TNF- α salgısı yaparlar (38,39).

Kornea Endoteli

Kornea endoteli üzerinde birçok yüzey reseptörü ve proteini bulundurur. Bu yüzey reseptörü ve proteini uygun uyaranlara karşı sentezlenebilir. ICAM-1, NCAM ve düşük ağırlıklı lipoprotein reseptörleri kornea endoteli üzerinde doğal olarak bulunur (39,40). MHC sınıf 2 antijenleri, VCAM, ELAM, CD44 vb. adhezyon molekülleri ise IL-1, TNF-alfa ve IFN-gamma gibi sitokinlerin etkisiyle sentezlenirler (33,34). Kornea endoteli IL-8 salınımı yaparken, IL-2 yapımını engeller ve böylece T-hücre proliferasyonunu engelleyebilmektedir (41-43).

2.5.2. İmmunopatolojik Cevaplar

Effektör ve regülatuar hücreler inflamasyon varlığında gözyaşı, limbal damarlar, neovaskülarizasyonlar ve aközden gelir (44,45). Lökositler vasküler endotelden kornea içine geçerek kornea matrikse ulaşırlar. Burada kemotaktik bir göç yolu boyunca geçeder. Bu göç hareketinin her safhasında vasküler endotel, kornea hücreleri ve inflamatuvar hücreler üzerindeki adhezyon molekülleri etkin rol oynar. Adhezyon

moleküllerinin bir kısmı makrofaj kökenli IFN-gamma tarafından modüle edilirler. Adhezyon molekülleri; integrinler, selektinler ve immunoglobulin moleküllerinden oluşan immün inflamatuvar olaylarda ve lenfositlerin bazı dokularda yerleşik olmasında önemli rol oynayan yüzey reseptörleridir.

2.5.3. Kornea'nın Yaralanmaya Cevabı

Korneanın yaralanmaya cevabı, yaralanmanın türüne, derecesine ve yaralanan dokunun özelliklerine bağlıdır. Epitel ile ilgili yaralanmalar dışında çoğu kornea hasarı rejenerasyonlanmamakta, dokunun organizasyon yoluyla tamiri ile sonuçlanabilmektedir. Düzelmiş doku; hasara uğramamış kornea dokusuna histolojik ve fizyolojik olarak eş değildir ve düzelen doku hiçbir zaman yaralanmamış kornea dokusunun saydamlığına veya gerilim kuvvetine erişemez. Yaralanmalar genelde hücre membranı hasarına bağlı olarak hücre ölümü ile sonuçlanan tarzda meydana gelmektedir. Hücre komşuluğundaki sağlam hücre cevabının başlaması için gerekli sinyaller ancak hücre ölümü ile oluşur. Korneada en fazla hücre epitelde bulunmaktadır, yalnız epitel ile ilgilendiren bir yaralanma durumunda limbal kök hücre havuzunda mitozis, göç ve differensiasyon ile iyileşme meydana gelmektedir. Hasarlı epitel hücrelerinin, epitel bazal membranının gözyaşına veya dolaşımına teması nedeniyle meydana gelen sinyaller çevredeki sağlam epitel hücrelerine gönderilir (46). Hücre iskeleti, hücreler arası bağların modüle edilmesi, bazal hücrelerden hemidesmosomlar kaybolması ve viskulin gibi spesifik proteinlerin sentezi yapılması gibi bir hazırlık döneminden sonra gözyaşından gelen bazal membran ve çıplak stromada biriken fibronektin üzerinden hücre göçü başlar (47). Göç eden epitelde; mikropilika, glikokaliks gibi yapılar özelliklerini kaybeder. Yara yeri iyileşerek kapandığında epitel 1-2 hücre katı kalınlığındadır. Göç kontakt inhibisyon olana kadar sürer. Göç sona erdiğinde ve defekt tamiri sonrası epitel normal kalınlığına döner. Glikokaliks, mikrovillus, mikropilikalılar ve bazal bağlantıların tekrar oluşur. Epitel kalınlığındaki değişimlerle kornea yüzeyindeki küçük düzensizlikler minimize edilir. Epitelyal bazal bağlantıların eski kuvvetine dönmesi haftalar gerektirir. Bu süreçte epitel hafif travmalara çok hassastır ve tekrarlayan kornea erozyonları gibi problemler ortaya çıkabilir (48).

Bowman membranı, Descement membranı gibi başlıca tip IV kollajenden oluşur ve yenilenme özelliği yoktur. Stromada reaksiyon hücre ölümü ile başlamaktadır. Çok az sayıda keratosit kaybında örneğin küçük yabancı bir cismin epitel tabakasını geçerek ön stromaya kadar saplanması durumunda keratosit cevabı ya çok azdır ya da hiç yoktur. Epitel defekti fokal iyileşme ile doldurulur.

Epitel kaybı meydana gelen durumlarda yüzeysel keratositler özellikle gelişen ozmotik değişikliklere karşı çok hassastır. Keratositler fizyolojik olarak minimal mitotik aktivitesi olan, yavaş reaksiyon veren aktif hücrelerdir. Yaralanma durumunda keratosit uyarımı ve yaralanma yerine göçün EGF, bazik FGF ve FGF-beta uyarıları ile olduğu düşünülmektedir (49). Keratosit göçü ancak yüzeysel epitel kapandıktan sonra başlayabilmekte ve aktive olan keratositler tip 1 kollajen sentezlemektedirler. Fakat çapı değişken olan kollejen lifleri ışığı iyi geçirmez ve sonuç olarak korneanın saydamlığı bozulur (50). Yeni sentezlenen proteoliglikanlar değişik miktarda, değişken karakterdedir ve daha fazla su tutup değişken kollajen dizilimine ve doku hidrasyonuna neden olabilir. Bunun sonucu korneada opasifikasyonu artar (50). Yara geç iyileştiği takdirde stromal keratositler karakter değiştirip kas hücresi karakteri alır, intrasitoplazmik aktin-miyozin kontraktıl elemanları meydana getirerek myofibroblast veya fibromyoblastlara dönüşür. Yara kontraksiyonunun nedeni bu dönüşümdür (51). Oluşan skar dokusunun hipersellülaritesi kalıcıdır. Bu doku asla normal gerilim kuvvetini kazanamaz, en fazla% 70'ine kadar tekrar gerilim kazanılabilir. Zedelenen kornea sinirleri aylar yıllar içinde zedelenmemiş periferik sinirlerden rejenerer olur. Rejenerasyonda sinirlerin uyumu değişkendir ve kornea hassasiyeti hiçbir zaman hasar öncesi durumuna tekrar dönmeyebilir. Denervasyon, tekrarlayan epitel defektlerine ve artmış epitel geçirgenliğine yol açar. Sitolojik olarak endotel cevabı daha az dramatiktir. İnsan endotel hücrelerinin ancak uygun mitojenik ve bağlanma faktörlerinin varlığında mitoz ile çoğalabileceği gösterilmiştir (52). Genellikle endotel defektleri sağlıklı komşu endotel hücrelerinin incelerek fibronektin matriks üzerinde yayılması ile kapanır. Defekt kapandıktan sonra Descement membranı salgılanır (53).

Kornea; yara iyileşmesinde bilhassa limbal bölgedeki kan damarları aktif rol oynar. Bu damarlar sayesinde doku debrilerinin atılması ve sonrasında yapısal rejenerasyon için gerekli polimorf lökositler, monositler, makrofaj gibi hücreler; koagülasyon ve büyüme

faktörleri yaralanma bölgesine taşınır. Adhezyon moleküllerindeki artışla beraber damar endotelinde ve ekstraselüler alanda lökositler damar dışına taşınır. Bu sırada salınan proteolitik enzimlerin etkisiyle hücrel ve hücrel olmayan atıklar fagosite edilirler. Bölgeye gelmiş bulunan makrofajlar da debriyi temizleyip sitokin salgırlarlar. Bu sayede inflamatuvar hücre göçü ile doku tamiri için gerekli inflamasyonu başlamış olur. Komplike kornea yaralanmalarında kollajen, küçük çaplı damarlar, proteoglikan matriks, akut ve kronik inflamatuvar hücrelerden oluşan granülasyon dokusu gelişebilir.

Korneal yara iyileşmesi sırasında bazal membran glikoproteinlerinden laminin, ve proteoglikanlarından heparan sülfat poliformonükleer lokositlerin göçü üzerine olumsuz etki göstererek durdurucu özellik göstermektedir.

Yaralanma bölgesinde görev alan metalloproteinazlar gibi diğer protein mediyatörleri kornea skarlarının rezorbsiyonu ve yeniden şekillenmesinde rol oynar (54).

Sonraki bölümde çalışmamızın konusu ile ilgili olarak apoptosis ve gözdeki yeri, UV ışığı ve teknik özellikleri, UV-B maruziyetinde apoptozisin modülasyonu, UV keratiti serbest radikaller ve serbest radikal hasar mekanizmaları; antioksidanlar ve etki mekanizmaları, eksojen ikincil antioksidan etkili tedavi edici moleküllerden karetenoidler ve vitamin A türevi maddelerden bahsedilecektir.

2.6. APOPTOZİS ve GÖZDEKİ YERİ

Aşırı bir fizyolojik strese maruziyet ve bazı patolojik uyarılar, fizyolojik ve morfolojik hücrel adaptasyonların nedenidir. Bu sırada uyarıcı faktöre cevap olarak hücre yaşamını devam ettirirken, fonksiyonunu ve özelliklerini düzenleyerek değişmiş olan mevcut yeni duruma uyum gösterir. Bu adaptasyon mekanizmaları atrofi, hipertrofi, hiperplazi ve metaplazi olarak sınıflandırılabilir. Eğer adaptasyon sınırlarını aşan bir uyarıcı meydana gelir veya adaptasyon başarılmazsa hücre zedelenmesi olarak adlandırılan olaylar zinciri gelişir. Hücre zedelenmesi belli bir noktaya kadar geri dönüşümlüdür, uyarıcı şiddetli yeterli ise geri dönüşümsüz zedelenme oluşur ve hücre ölür (55). (Tablo-1)

Tablo 1. Zararlı Uyarın Karşı Hücresel Yanıt

Zararlı uyarın doğası ve şiddeti	Hücresel yanıt
Değişmiş fizyolojik uyarın	Hücresel adaptasyon
• Artmış ihtiyaç veya trofik uyarım(Büyüme faktörü, hormon)	• Hiperplazi Hipertrofi
• Azalmış besi maddesi, uyarın	• Atrofi
• Kronik irritasyon (Kimyasal ve fiziksel)	• Metoplazi
Azalmış oksijen kaynağı, kimyasal hasar, enfeksiyon	Hücre hasarı
• Akut ve sınırlı	• Akut geridönüşümlü
• İlerleyici ve şiddetli (DNA hasarı içeren)	• Geri dönüşümsüz hücre ölümü Nekroz Apopitoz
• Hafif kronik hasar	• Çeşitli organellerde subcellüler değişiklikler
Metabolik değişiklikler genetik veya edinsel	Hücre içi birikimler ve kalsifikasyon
Biriken öldürücü olmayan hasarla birlikte uzamış hayat süresi	Hücresel yaşlanma

2.6.1. Hücre Zedelenmesinin Nedenleri

- 1-Oksijen yetersizliği
- 2-Fiziksel ajanlar: UV ışığa maruziyet gibi
- 3-Kimyasal ajanlar veya ilaçlar
- 4-Enfeksiyöz ajanlar
- 5-İmmunolojik reaksiyonlar
- 6-Genetik bozukluklar

2.6.2. Hücre Ölümü

Şuan sahip olunan bilgiler canlı olan hücrelerin iki farklı mekanizma ile öldüğünü göstermektedir. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozisdir. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişimleri, toksinler gibi hücre dışı faktörlerle oluşabilen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanarak ömrünü tamamlamış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için belirli güvenlik sınırlarında yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilebilen programlanmış hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü

literatürde apoptozis ile eş anlamda kullanılan ifadelerdir. Nekroz her zaman patolojikken apoptozis fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilmektedir.

Fizyolojik hücre ölümü eskiden beri bilinmesine rağmen ‘apoptozis’ terimi ilk kez 1972 yılında İskoçyalı Kerr, Wyllie ve Currie gibi bilimadamları tarafından kullanılmıştır (55). Kerr fizyolojik olarak ölen hücre çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını incelemiş ve organellerin iyi korunduğunu gözlemlemiş ve bu olaya büzüşme nekrozu ismini vermiştir. Yunan dilinde ‘apo’= ayrı, ‘ptosis’= düşen kelimeleridir. Bundan esinle Horner tarafından ağaçların sonbaharda yaprak dökümünü misali, hücre ölümünü anlatmak maksadı ile kullanılmıştır (55).

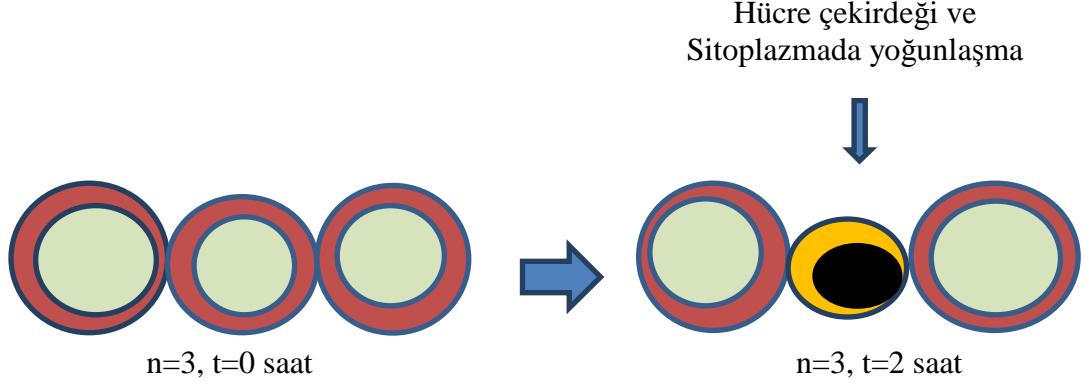
Apoptozis programlı hücre ölümü normal dokuların homeostazı açısından önem arzeder. Normal embriyogenezde hücrelerin fokal delesyonunda önemli bir işleve sahip olan apoptozisin başta kanser, AIDS, sinirsel dejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalıklarda rolü vardır.

Apoptozis; diğer ismiyle programlı hücre ölümü uzun süre bilim insanlarınınca yeteri kadar önemsemeyen bir alandı. Apoptozisin gelişimsel biyoloji, fizyolojik doku dinamiği ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli süreçlere katılımı fark edildikçe önemi de hızla artmıştır (55).

Hücre morfolojisi

Nekrotik ölüm ve apoptotik hücre ölümü denilen hücre ölümleri birbirlerinden farklı süreçler izlemektedirler. Apoptotik ölümün ilk basamağı olan başlangıç basamağında, ölmek üzere emir almış hücreyi normal hücreden morfolojik olarak ayırt etmek mümkün değildir. Uyarı sonrası ikinci saatte, emri almış hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar ve belli bölgelerde sıkışmaya başlar. Takiben sitoplazma yoğunlaşmaya ve hücrenin boyutları küçülmeye başlamıştır. İki saatin sonunda apoptozise uğrayan hücrelerde yeni değişiklikler meydana gelir ve hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçaların en belirgin özelliği, fragmente olmuş nükleusların ve parçalanan hücreye ait tüm yapıların plazma zarı ile kaplanarak immun sistemi uyarmamasıdır. Apoptotik cisimcikler yüzeylerinde ortaya çıkardıkları yeni sinyal molekülleri ile komşu hücreler ve lokal makrofajlar tarafından

fagositoz yoluyla elimine edilirler. Bu süreç ortalama 5 saatlik zaman diliminde tamamlanmıştır (55).



Resim 1. Apoptosis

Apoptotik hücre ölümlerinde enflamasyona ait klinik semptomlar yoktur, immun sistemi uyarmadığı için otoimmün sistem uyarımı ortaya çıkmaz, apoptotik hücre ölümleri ATP harcanan enerji bağımlı süreçlerdir (55).

Normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan fosfolipitlerden fosfatidilserinin erken apoptozis döneminde membranın dış yüzüne transloke olması apoptotik hücrede görülen önemli erken bir değişimdir. Bu sayede apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilebilir (55,56).

Apoptozis enerji gerektiren bir tepkime olması nedeniyle hücrede bir ATP yetmezliği mevcutsa ölüm şekli nekrozise kaymaktadır. Bir mitokondrial ATP sentez blokeri olan Oligomisin ile yapılan çalışmalarda, hem oligomisin hem de Fas reseptörleri uyarılan hücrelerde ölüm şeklinin nekrozise kaydığı gözlemlenmiştir (55,56).

Apoptozis Basamakları:

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salınımı
- Apoptozom oluşumu
- Mitokondriyal transmembran potansiyeli değişimi

- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olması
- DNaz'ın aktivasyonu ile DNA'nın fragmantasyonu
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin oluşması

2.6.3. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler (57)

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler(57)

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmunolojik yöntemler
5. Moleküler biyolojik yöntemler

Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler apoptozise özgü herhangi bir hücresel olay veya aktivitenin belirlenmesi esas alınarak birçok şekilde yapılabilmektedir. Örneğin, apoptozis DNA fragmantasyonu esas alınarak saptanacaksa o zaman sıralanan yöntemlerden teki veya birçoğu birlikte kullanılabilir. DNA fragmantasyonu histokimyasal olarak gösterilebileceği gibi, biyokimyasal olarak da gösterilebilir. Ayrım yapılırken önemli olan çalışılacak numunenin türüdür. Biyokimyasal bir yöntem olan agaroz jel elektroforezi hücre kültürü ile elde edilen bir numunede uygun iken şayet bir dokudaki DNA fragmantasyonları araştırılacaksa histokimyasal bir yöntem olan TUNEL yöntemi uygun yöntem olacaktır.

2.6.3.1.Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

Işık mikroskopisinde Hematoksilen ve Giemsa boyama yöntemleri uygun yöntemlerdir. Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay uygulanabileni Hematoksilen ile boyamadır (HB). HB; hem hücre kültürü hem de doku boyamalarında rahatlıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk tercih olarak

başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (ilk değerlendirme, maliyet) diğer metotlara karşı avantajlıdır.

Hematoksilen boyası ile hücre nükleus kromatini boyanarak için apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilebilir. Bu değerlendirme deneyimli çalışıcılara gereksinim gösterir. Bunun nedeni bazı durumlarda mitotik hücreler ile apoptotik hücreler karıştırılabilmektedir. Bu yöntemle saptanabilen hücresel değişimler; hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve nükleus zarının kenarında toplanması, nükleus küçülmesi veya bölünmesi şeklindedir.

Apoptozis de en değerli yöntem Elektron mikroskopisi ile değerlendirme metodudur. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği, subsellüler detayların (mitokondri, hücre zarı ve nükleus zarının bütünlüğü) değerlendirilebildiği bir yöntemdir.

Faz kontrast mikroskopisi sadece kültür ortamında büyütülen hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu yöntem ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen ceps yapıları izlenebilir.

2.6.3.2.Histokimyasal yöntemler:

Anneksin V yöntemi: Bu yöntemde normal hücrelerin hücre membranının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidilserinin (PS) apoptotik hücrelerde, hücre zarının dış yüzüne transloke olmasından yararlanarak dış yüze transloke olan PS'lerin, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünebilir hale getirilmesinden yararlanır. Bu sayede apoptotik hücreler saptanabilmektedir.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin dUTP Nick End Labeling) yöntemi: DNA kırıklarının in situ olarak saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Hücre kültürleri ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Yapılmış çalışmalarda testin sensitivitesi % 60–90, spesifitesi %87 civarında olarak bildirilmiştir. Nekrotik hücre ölümünün indüklendiği durumlarda test spesifitesi %70'lere kadar düşebilmektedir (58).

Kaspaz-3 yöntemi: İmmunohistokimyasal bir yöntem olup sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3'in belirlenmesi prensibine dayanır.

2.6.3.3.Biyokimyasal yöntemler:

Agaroz jel elektroforezi: DNA kırıklarını gösterebilen başka bir yöntemdir. Jel elektroforezde tipik merdiven imajını oluşturmaktadır Apoptozisin karakteristik özelliği olan bu bulgu nekroziste görülmez. Bu nedenle apoptozisi nekrozdan ayırmada önemli bir metot olarak öne çıkar.

Western blotting: Bazı özgül apoptotik proteinlerin eksprese olup olmadıklarını (bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarını (kaspaz-3) saptamakta kullanılmaktadır. Mitokondriden Sitokrom c'nin ayrılıp ayrılmadığının belirlenmesi de bu metot ile saptanabilmektedir.

Flow sitometri: Floresan madde ile işaretli antikorların kullanılarak apoptozisde eksprese olan hücre yüzey proteinlerinin saptandığı bir yöntemdir. Kolay uygulanabilirlik, kısa sürede ve kantitatif sonuç alabilme açısından klinikte pratikte kullanışlıdır.

2.6.3.4.İmmunolojik yöntemler:

ELISA: Hücre kültürlerinde ve insan plazmasında DNA fragmentasyonunun tespitinin mümkün olduğu bir yöntemdir.

Fluorimetrik yöntem: Hücre kültürlerinde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir.

2.6.3.5.Moleküler biyoloji yöntemleri:

DNA microarray: Binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) ve apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı sunan bu yöntem yeni ve maliyeti yüksek bir yöntemdir. M30 fare monoklonal antikorları ile yapılan immun enzim köprü ile apoptozise gidecek hücreyi

erken evrede gösterebilmektedir. DNA parçalanmadan önce apoptozisi saptayabilmesi ile fevkalade bir yöntemdir.

2.6.4. Apoptozis İle Göz İlişkisi

Gözün gestasyonel dönemde şekillenmesinde, korneanın rejenerasyon fazında, retinal distrofi ve dejenerasyonlar, katarakt, glokom ve kornea distrofileri gibi birçok durumda apoptotik süreçler önem taşımaktadır.

2.6.5. Kornea Yara İyileşmesinde Apoptosisin Yeri

Kornea epitel hasarı ile keratositlerde apoptozisin meydana geldiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Verilen bu yanıt ile virüsler gibi patojenlerin yayılımını önlenmiş olmaktadır. Kronik apoptotik uyarı sonrası, total keratosit sayısını azalmakta, otolitik enzimlerin salınması sonucu korneada stromal kayıp meydana gelmektedir (59).

Gözün immun seçicilik mekanizması; fizyolojik şartlar altında kornea epiteli ve endotelinin FasL sentezlemesi ve Fas reseptör içeren inflamatuvar hücrelerle Fas-FasL aracılığıyla apoptozis indüklenmesine bağlı olarak devam eder (60).

Kornea epitel hasarıyla meydana gelen keratosit apoptozisi, iki türlü açıklanabilir: birincisi, hasarlı epitelden açığa çıkan FasL, keratositlerde Fas reseptörüne bağlanarak hücreyi ölüme sürükler, ikincisi, hasar sonrası epitelden salınan bölgesel sitokinlerden özellikle IL-1 keratositlerde FasL yapımını indükler, bu sayede hücrelerde otokrin düzeyde ölüm kontrol edilmiş olur.

Mekanik epitel hasarında izlenen keratosit apoptozisi önemli kılan ön stromadaki keratositlerin apoptozisi nedeniyle enfeksiyon etkenlerinin stroma ve diğer göz yapılarına yayılımı sınırlandırılmasıdır.(61) Epitelyum altı dokuda apoptozise uğrayan hücreler, 3-4 günlük süre zarfında sağlam komşu keratositlerin proliferasyonu ve migrasyonu ile yenilenirler (62).

1. Apoptozisi tetikleyen sitokinler kornea epitelinin yapısında fizyolojik olarak bulunurlar ve epitel hasarına ilk cevap olarak salınırlar. Fizyolojik olarak sağlam kornea epiteli yüksek miktarda IL-1 α , IL-1 β yanı sıra FasL bulundurmaktadır.
2. Epitel hücreleri tarafından apoptozisin modölatör molekülleri yalnızca hasar olan alanlarda aktive olabilmek üzere kontrol altında tutulur. Hücre zarına bağlı formda olan FasL, hasarın bulunduğu bölgelerde zardan ayrılarak aktif çözünebilir formata dönüşmekte, serbest FasL anterior stromadaki keratositler üzerindeki reseptörlerine bağlanarak apoptozisi tetiklemektedir.

Keratosit apoptozisinin düzenlenmesi kornea epiteli tarafından sentezlenen sitokinler yardımıyla yürütülmektedir.

Korneada epitel yaralanması hangi nedenle ne surette olursa olsun yaralanmanın altındaki keratositlerde apoptozis oluşturur. Benzer surette kornea epitelinin mekanik olarak kazınması bu sistemleri aktive edebilir. Korneal cerrahi işlemler de kornea tarafından bir patojen olarak algılanmakta ve neticede keratosit apoptozisi indüklenmektedir (62).

Keratosit apoptozisi; epitel yaralanması ile seyreden herhangi bir cerrahinin korneada izlenen en erken bulgusudur. Hasarlanma sonrası apoptozis 4. saatte en yüksek seviyededir.

Keratosit hücrelerinin ölümü ile yara iyileşmesi yanıtı başlar.

Bu yanıtta:

1. Çevresel ve arka yerleşimli keratositlerin proliferasyon ve göçü ile anterior keratositlerin alanı tekrar doldurulur.
2. Stromal hücreleri myofibroblast hücrelerine dönüşür.
3. Myofibroblastlar tarafından kollajen, glikozaminoglikanlar ve diğer matriks yapıları sentezlenir.
4. Hepatosit büyüme faktörü ve keratosit büyüme faktörü vb. sitokinlerin üretilmesi ile epitel iyileşmesi sağlanır.
5. Epitel hiperplazisi meydana gelir.

6. Stromal hücrelerin keratositlere dönüşümü ile korneanın normal anatomik yapısı sağlanmış olur.

Yara iyileşmesinin kronik döneminde çeşitli sitokin ve modülatörlerin, bu kaskad daha olaya katılmasıyla karmaşık hal alan bu iyileşme sürecinde apoptozisin erken dönemde engellenmesi daha sonradan ortaya çıkan olayların şiddetini azaltmaktadır. Neticede apoptoziste meydana getirilebilecek değişimlerle yara iyileşme sürecine etki etmek mümkün gözükmemektedir.

2.6.6. UV Işını ile ilgili Teknik Özellikler

Güneş ışığı çeşitli dalga boylarında birçok elektromanyetik spektrum'dan meydana gelmektedir. Bunlar 1 nm dalgaboyunun altındaki dalga türü olan X-Ray (iyonize), 200-290 nm arası UV-C, 290-320 nm arası UV-B, 320- 400 nm arası UV-A, 400-800 nm arası görünür ışınlar, 800-100.000 nm arası infrared, >100.000 nm radyo dalgaları ve mikrodalga spektrumlarıdır. Güneş ışığının ancak 1/20'lik kısmı ultraviyole ışınlarından meydana gelmektedir. Ultraviyole radyasyon, görünmeyen iyonize olmayan radyasyon şekli olup solar radyasyonun doğal düşük yoğunluklu bir bileşenidir. Ultraviyole ışının solar yanık, fotoallerjik ve fototoksik reaksiyonlar, fotoimmünolojik değişiklikler, mutasyona neden olma, deri yaşlanması ve deri kanserleri, göz ve çevre dokular için sağlık açısından potansiyel zararlı etkileri vardır. UV radyasyonun penetrasyon yeteneği olmadığı için UV'den etkilenen organlar göz ve deri gibi ışın maruziyetine açık yüzeysel organlardır. Ultraviyole ışınları, dalga boylarına göre 200-290 nm UV-C, 290-320 nm UV-B, 320- 400 nm UV-A olmak üzere 3 grupta incelenir. Yerküreye ulaşan UV ışınlarının %90-95'i UV-A, %5-10'u UV-B'den oluşur. UV-B'nin büyük kısmı ozon tabakası tarafından tutulmakta, UV-C ise hem ozon tabakası hem de nem tarafından tutulduğu için yerkürede maruz kalınan güneş ışığında genellikle yoktur (63).

UV-A (320-400): Yeryüzüne ulaşan ışıktaki en yaygın izgedir (spektrum). Pencere camından geçer. UV-B ışınlarına oranla dokuya olan penetrasyonu fazladır UV radyasyonunun en az zararlı şeklidir ve dünyaya büyük miktarlarda erişir. Bazı kimyasal maddelerin daha etkin hale gelmelerine yol açarak, duyarlılık reaksiyonlarının

tetiklenmelerinde rol oynar. UV-A, deri hastalıklarının tedavisi amacı ile de (PUVA tedavisi gibi) kullanılmaktadır (63).

UV-C (200-290): Ozon tabakası tarafından tutulduğu için, normal atmosfer şartlarında yeryüzüne ulaşamayan ışıdır. Son yıllarda ozon tabakasında oluşan incelmeler ve delikler nedeni ile yeryüzüne doğrudan ulaştığı için önemi artmıştır. Havanın sterilizasyonu gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Güçlü karsinojendir. Konjonktiva ve kornea için potansiyel zararlı bir ışıdır. Yapay lambalarla oluşturabilen UV-C ışınının germisidal (mikrop kırıcı) etkisi mevcuttur.(63).

UV-B (290-320): UV-B radyasyon potansiyel olarak çok zararlıdır. UV-B ışınları pencere camından geçmez (63).Vücutta D vitamini yapımını başlatan ışınlardır. UVB ışınları, orta miktarlarda epidermal dehidrokolesterolü, provitamin D3'e dönüştürmektedir. Provitamin D3 günler içinde çoğalarak plazma D vitamini bağlayıcı protein ile dolaşıma katılmaktadır (64). UVB ve UVC'nin DNA yapısında mutasyon, hücre yıkımı ve transformasyona neden olmaktadır. Ayrıca UV B ile tümör supresor gen (P53 geni) aktivasyonu da olmaktadır (65). İnsanda apoptozun düzenlenmesi, P53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Hücre yaşamının uzaması P53 tümör supresör geninin bulunmaması yada mutasyona uğraması sayesinde mümkün olabilmektedir. Hücrede meydana gelen gen hasarı P53'ü aktive etmekte, P53 gen ürünü protein yapı DNA'ya bağlanarak hasarlı hücreyi G1 siklusunda durdurmaktadır. Bu sayede hasarlı genin tamiri için gerekli zaman kazanılmış olur.Eğer hasar fazlaysa olay bu genetik komutlarla apoptozise kaymaktadır. P53'ün bununla birlikte Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gen gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir. P53 apoptozisi indüklemesi, P53'ün Bax'ın ekspresyonunu artırması bu sayede Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla meydana gelir.Sonuç olarak apoptozisin regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanmış olur.. Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bcl-bax gen ailesinin 20 üyesi mevcut olup; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyaran (proapoptotik)genler olarak tanımlanır. Bu aile üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluşturarak etki gösterirler (Bcl-2, Bax ile heterodimer oluşturduğunda Bcl-2 etkisini antagonize ederler). Bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlı olarak hücre yaşamaya devam etmekte yada apoptozise

yönlendirilmektedir. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar (66).

Korneaya akut UV-B maruziyeti sonucu fototoksik keratit ve korneal hücrelerde apoptozis meydana gelir (1). Akut maruz kalınan UV-B ışını kornea epitelinden daha derine nüfuz ederek tüm korneal hücrelere hasar vermekte ve tüm aşağı katman göz hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir (2,67). Göz dokuları UV radyasyonu kolaylıkla emmekte ve kornea temel olarak 300 nm altındaki radyasyonu emerken, lens 370 nm altındaki (UV-A) dalga boylarını emmektedir. Radyasyonun emildiği noktada enerjisi dokuya aktarılır (68,69).

2.6.7. Apoptozisin UV-B Maruziyetinde Modülasyonu

UV-B ve UV-C ışınları DNA yapısında mutasyon, hücre yıkımı ve transformasyona neden olmaktadır. Ayrıca UV-B ile tümör supresor gen (P53 geni) aktivasyonu da olmaktadır (65).

P53, hücre genomunda DNA düzeyinde bir hasar meydana geldiğinde, eğer hasar onarılabilecek durumda ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını onarabilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar ciddi ise bu vaziyette P53 apoptozisi indüklenir. P53'ün apoptozisi indüklemesi Bax geninin ekspresyonunu artırması, böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi sayesinde vuku bulmaktadır.

Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle oluşturulan ağır DNA hasarına yanıt olarak başlar. P53 geninin indüksiyonuyla başlayan süreçte P53, bir proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan bax geninin indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatmaktadır. P53, bax genini indüklemenin dışında ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin sentezlenmesine neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif serbest oksijen radikallerinin hem mitokondri hem hücre membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlayabilmektedir (55).

2.6.8. UV Işınından Korunma

UV radyasyonu ve göz hakkında yapılmış çalışmalar UV radyasyonun göz üzerindeki etkilerine ve yeterli koruma sağlamanın zorluklarına genel bir bakış sağlamıştır (70).

UV'ye maruz kalmanın cilt üzerindeki etkileri halk tarafından iyi anlaşılmış ve cilt melanomu riskinin hayli yüksek (%85) olduğu bilinirken göz konusunda anlayış düzeyi çok düşüktür ve %7'lik bir halk kesimi UV'yi göz problemleri ile ilişkilendirmektedir (71).

UV'nin etkisinden tüm gözün korunması için güneş gözlüğü UV-B'nin etkisinin en fazla %1'nin geçişine olanak vermelidir (72,73).

Kardan yansıyan ışın ve kaynak ışınlarından korunmada polikarbonatlı lenslerle destekli gözlük tercih edilmeli ve yanları korumalı olmalıdır. Vücudunun ışına karşı hassasiyeti fazla olan kişiler titanyum dioksitle güçlendirilmiş gözlük kullanabilirler. Gerekli şartları taşımayan gözlükleri kullananlarda göz bebeğinin büyümesi nedeniyle UV ışınları hasar yapabilir (72).

2.7. ULTRAVİYOLE KERATİTİ

Kronik UV maruziyeti gerektirip uzun dönem sellüler değişimlerle seyreden gözü tutan diğer fototoksik sendromların aksine UV keratiti rölatif olarak hem başlangıç hem rezolusyon olarak hızlı bir süreç göstermektedir. Işına maruziyet sonrası 6 ve 12 saatler arasında anlamlı göz ağrısı ve azalmış görme keskinliği ile karakterize bir klinik durumdur. Etyolojide kaynakçı kaynağından çıkan veya brozlaşma amacıyla kullanılan yapay bir UV kaynağı söz konusudur. Yüzeysel punktat keratit tipik olarak bilateral ve erken gelişirken; ciddi vakalarda total epitel deskuamasyonu görülmektedir. Konjonktival kemosis, sulanma ve blefarospazm genellikle tabloya eşlik etmektedir. Korneal reepitelizasyonun suni gözyaşları, göz kapama ve bandaj kontakt lens uygulaması yardımıyla 36 ile 72 saat arasında normale dönmektedir. Ancak bu iyileşme sürecinde hasta ağrılı ve iş göremez haldedir. Uzun dönem sekel ise nadirdir. Bu durum alkali ve güçlü asitler gibi kimyasal maddelerle temasla meydana gelen epitel yaralanmalarında geç kazanılan reepitelizasyona zıt bir durum teşkil eder. Semptomlarla

maruziyet arasında geçen gecikme zamanı karakteristik olup; bu oluşan durumun termal bir yanıtın ziyade fotokimyasal bir süreç olduğunu kanıtlamaktadır. Bu periyod boyunca ağrının yokluğu hem klinisyen hem de hasta grubu için kafa karıştırıcıdır. Bu fenomen insanlarda deneysel olarak çalışılmıştır (74). Odaklanmış elektrik kaynağı ışınına subklinik dozda maruz bırakılan insan deneklerde korneal hassasiyet temas eşiği ölçümleri alınmıştır. Tüm deneklerde sensitivite kaybında anlamlı artış meydana gelmiş olup bununla beraber duyu kaybı zirve noktasına ulaşım ortalama zamanı 1 saat 45 dakikadır. Deneklerde korneal sensitivite 4 saatte ortalama hassasiyet eşiğine geri dönüş göstermiştir. Bu his kaybının oluşma ve geri dönüş paterni; klinik olarak belirtilerdeki gecikmeyi açıklamaktadır.

UV radyasyonu uygulanması yoluyla keratit modeli oluşturulması ilk defa 1946 yılında Cogan ve Kinsey tarafından belirli test koşullarında çeşitli hayvan deneyleri yapılması ve tekrarlanması yoluyla çalışılmıştır (75,76). Belli bir seviyede keratitin oluşumu için gerekli eşik düzey; enerji ve dalga boyuyla ilgili eğriler; oluşum spektrumunu yansıtmaktadır. Zirve duyarlılık 270 nm dalga boyunda olmakta; bu dalga boyunda 0.005 J/cm^2 'lik düşük bir enerji keratit oluşturmak için yeterli olmaktadır. Daha uzun dalga boylarında keratit oluşturma eşiğine ulaşmak için daha yüksek enerjiler gerekmektedir (320 nm için 10 J/cm^2). UV ışığın doğal kaynakları kısa süreli maruziyetle UV keratiti meydana getirmezler. Çünkü ozon tabakası 290 nm'den kısa UV dalga boyuna geçirgen değildir ve ışınları aktif olarak bloke etmektedir. Bu yüzden insan yapımı UV kaynağı aletler UV keratitin ana nedenidir (77).

Akut UV keratiti bazı özel durumlarda doğal kaynaklardan köken alabilir. Güneş tutulması yanıkları (78). Ek olarak güneş kaynaklı keratit, yüksek rakımlar ve karla kaplı bölgelerde (kar körlüğü) yüksek güneş ışınımına maruziyet sonucu gelişebilmektedir. Keratit oluşması için etkili parlama; ozon tabakasının yapısı, bölgenin karla kaplanmışlık oranı ve irtifa etkin faktörlerdir.

Fototoksik etkilerden tüm kornea katmanları etkilenmektedir. UV ışını epitelde mitozu inhibe ederken nükleer yapıda fragmantasyon oluşturmakta bununla birlikte epitel katmanının bir kısmının kaybına neden olmaktadır (79). Ayrıca stroma keratositlerinde geri dönüşümlü hasara ve endotelde pleomorfik değişikliklere sebep olmaktadır. Bu

durum akut maruz kalınan UV-B ışınının kornea epitelinden daha derine nüfuz ederek, nükleik asitler, proteinler ve lipidleri yıkararak serbest radikal hasar zincirini tetiklemesi ve apoptozisi uyarması ile açıklanabilmektedir. Literatürde fototoksik keratitin ortaya çıkmasından serbest radikal hasarı sorumlu tutulmaktadır (80-83).

Bu hasarda serbest radikallerin rol oynadığı ve bazı antioksidan ilaçların hasarın ortaya çıkmasını önlemede veya tedavide etkili olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Bu etkiler klinik tabloyla uyumlu olup korneanın hızlı yenilenme kapasitesi göz önüne alındığında beklenen hızlı bir iyileşme ile sonuçlanmaktadır. UV ışığının stroma üzerindeki etkileri tavşanlar üzerinde çalışılmış olup stromal keratositler üzerindeki geri dönüşümlü hasar gösterilmiştir (84). Çalışmalarda kornea endotelinde hasar oluşturmak için gerekli UV dalga boyu eşik aralığı standart UV lambaları ile sağlanabilmektedir (85). Japonya'da yapay UV ışınına maruz kalan kaynakçılarda yapılan bir vaka kontrol çalışmasında speküler mikroskopla yapılan ölçümlerde endotel tabakasındaki mozaik yapıda anlamlı pleomorfik değişim ve hegzagonal hücre popülasyonunda anlamlı azalma olduğu bildirilmiştir (86). Çalışmaya katılanlarda sonuç olarak kalıcı bir fonksiyonel görme kaybı meydana gelmemiştir.

2.8. SERBEST RADİKALLER VE ANTIOKSİDANLARIN APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Apoptozis reaktif oksijen radikallerinin mitokondri, hücre membranı ve genom üzerinde oluşturabileceği hasara bağlı olarak da başlayabilmektedir (87). Bu nedenle öncelikle serbest radikallere ve oluşum mekanizmalarından bahsedilecektir.

2.8.1. A. Serbest Radikallere Giriş

Serbest radikaller, dış atom orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verebilecek bir potansiyel kazandırmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; tekli oksijen ($1O_2$), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksi (OH), peroksi (ROO) ve alkoksi (RO) radikalleridir (88). Bu serbest

radikaller UV ışınları, ilaçlar, radyasyon, stres, sigara, alkol maruziyeti ve yağ oksidasyon reaksiyonları, immunolojik reaksiyonlar ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi birçok durumda meydana gelebilmektedir.

Oksijen insan yaşamı için mutlak bir gereklilik olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı serbest reaktif oksijen radikallerinin vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Serbest radikallerin reaktifliği ve vücut içindeki devinimleri düşünüldüğünde bu radikallerle mücadele edilmesi önemli bir konu haline gelmektedir.

Normal metabolizma sırasındaki oluşumun yanı sıra dokulardaki patolojik koşullar altında da oluşabilen serbest oksijen radikallerinin kontrolünde görev alan vücutta gelişmiş farklı doğal savunma mekanizmaları şeklinde ve bunun yanı sıra eksojen alınan mücadeleciler bileşiklerin de önemi bulunmaktadır. Serbest radikallerin neden olduğu bu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere 'antioksidan' adı verilmektedir (88).

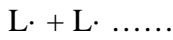
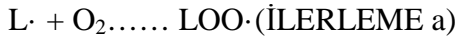
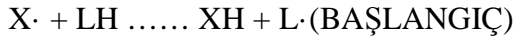
Aerobik organizmaların serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere organize olmuş antioksidan savunma mekanizmalarında bazı durumlarda maruz kalınan serbest radikaller dolayısıyla antioksidan savunma sisteminin sınırı aşılabilmekte, dış kaynaklı antioksidanların da yetersiz alınması durumunda serbest radikallerin etkisi tamamen önlememekte ve sonuç olarak oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkmaktadır. Bu reaktif serbest radikalleri ile oluşan oksidatif stres durumunun yaşlanmada ve ayrıca kalp damar hastalıkları, birçok kanser türü, katarakt, bağışıklık sistemi hastalıkları, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (89). Serbest radikallerin ve etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için serbest radikal oluşturan başlıca mekanizmalara ve vücudun bu moleküllerle mücadele veren doğal antioksidan sistemlerine göz atılmasında yarar bulunmaktadır.

2.8.2. Serbest Radikal Oluşumundaki Başlıca Mekanizmalar

2.8.2.1.B.1 .Otooksidasyon Reaksiyonu

Atmosferik oksijenle spontan meydana gelen bir serbest radikal reaksiyonudur (90). Lipidlerden çoklu doymamış yağ asitleri ve fosfolipidler bu reaksiyonu göstermeye eğilimlidir. Bu reaksiyon sonucu ilk oluşan ana ürünler hidroperoksit (ROOH) ürünleridir (91).

Otooksidasyon reaksiyonunda lipid oksidasyonu başlangıç, ilerleme ve sonuç olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Başlangıç aşamasında, başlatıcı bir radikal (X) ile yağ asidi substratı reaksiyona girer. Bu reaksiyonda substrata bir atom H transferi ile bir lipid radikali (L) oluşur. İlerleme aşamasında lipid radikali (L) ile oksijenin tepkimesi sonucu bir peroksi (LOO) radikali meydana gelmekte ve meydana gelen peroksi radikali ile diğer bir yağ asidinden ayrılan bir atom H tekrar birleşerek hidroperoksitlere ve yeni lipid radikaline çevrilmektedir. Sonuç aşaması ise radikallerin birbiriyle reaksiyon vererek radikal olmayan kimyasal bozunma ürünlerine (ester, eter, aldehit, keton ve alkol) dönüşmesidir (91).



2.8.2.2. B.2. Geçiş Metal İyonlarının Etki Reaksiyonu

Canlı organizma sistemlerinde demir ve bakır gibi metal iyonları oksidatif katalizör olarak görev alabilirler. Demir oksidasyon reaksiyonlarında güçlü bir katalizörken, bakır aracılı reaksiyonlar ise net olarak anlaşılammıştır (13).

Serbest demir formları canlı hücreler için toksiktir. Toksik etki sonucu aktif oksijen radikalleri meydana gelmekte ve bu radikaller hücrelerin genetik materyaline zarar verebilmektedir. Organizma demirin bu toksik etkilerinden korunabilmek için demiri kelat şeklinde depolamaktadır (93). Ferritin, hemoglobin, myoglobin gibi bileşikler demirin depo formlarından bazılarıdır (94).

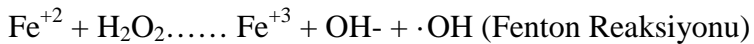
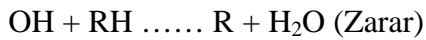
Organik sistemlerde travma ve strese yanıt olarak açığa çıkarılan serbest metal iyonları da oksidan etki gösterebilmektedir. Aterosklerozis ve stroke gibi bazı hastalıkların patogeneğinde bu hasar etkin görünmektedir (95).

Superoksit anyonunun (O_2^-) Fe^{+2} varlığında H_2O ile verdiği reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu adını alır ve sonuçta hidroksil anyonu (OH^-) meydana gelir.

Hidroperoksitlerin Fe^{+2} varlığında hidroksi radikale dönüştüğü reaksiyonlarda Fenton reaksiyonu adını almaktadır. OH^- radikali çok potent olup hızlı bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir.



(Haber-Weiss reaksiyonu)



2.8.2.3.Fotooksidasyon Reaksiyonu

Fotooksidasyon reaksiyonları, oksidasyonlarda başlatıcı rolü bulunan peroksitlerin oluşumu için önemli bir basamak teşkil etmektedir.

Bir ışık ışınının doğrudan moleküler absorpsiyonu sonrası meydana gelen elektron transferleriyle süperoksit anyonları üretilebilmekteyken, bunun yanısıra duyarlılaştırıcı (sens) denilen moleküllerin ışığı absorbe ederek diğer bazı moleküllerin oksidasyonuna indirek olarak sebep olduğu sens aracılı reaksiyonlar da vuku bulabilmektedir. Duyarlılaştırıcı reaksiyon veren maddelere örnek olarak klorofil-a, feofitin-a, hemoglobin ve miyoglobin örnek verilebilir (90). Sens maddelerle meydana gelen iki çeşit tip 1 ve tip 2 reaksiyon bulunmaktadır. Tip 1 reaksiyonda aktif hale geçen sensitizer substrata H atomu veya elektron vermek suretiyle serbest radikaller üretirken, tip 2 reaksiyonda aktif sensitizer O ile direkt reaksiyon vererek tekil oksijen üretmektedir. Meydana gelen tekil oksijende oksijene ürünleri meydana getirmek üzere substratla reaksiyona girmektedir

. H₂Sens Sens*(duyarlılaştırıcı)

O₂Sens-duyarlılaştırıcı* + Subs Radikaller Ürünler (Tip 1)

.

Subs (substrat)

Sens* + O₂..... Sens + 1O₂.....Subs- O₂ (Tip 2)

Histidin, metiyonin, triptofan, tirozin ve sistein içeren proteinler ve guanidin içeren nükleik asitler fotooksidasyondan etkilenen başlıca yapılardır. Bunun yanısıra yağ asitleri ve kolesterol lipidleri de zarar gören hedef yapılar arasındadır ve ultraviyole keratinin ortaya çıkmasından bu mekanizma sorumlu tutulmaktadır(92).

2.8.2.4. Enzimatik Oksidasyonlar

Serbest radikaller, canlı organizmada birçok enzim sisteminin aktivitesi sonucunda da üretilebilmektedirler. Lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi birçok enzim sistemi serbest radikal oluşumuyla ilişkilidir (97).

2.8.2.4.1. Ksantin oksidaz (XOD)

Bu enzimin faaliyeti sonucu süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri meydana gelmektedir. Ksantin oksidaz, purin metabolizmasında görev alarak bir ara bileşen olan hipoksantini ksantine sonra da ürik aside okside etmektedir. Normal şartlar altında NAD'e elektron transferi yapan bu enzim stres koşulları altında tiyol gruplarını okside eden ve proteolize neden olan bir enzim yapısı kazanmaktadır. Stres altında bu enzimin aktivitesi sonucu süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri meydana gelmektedir (98).

2.8.2.4.2. NADPH oksidaz

Nötrofillerin plasma zarında bulunan bir enzimdir. Süperoksit anyonu üretiminde görev yapmaktadır. Makrofaj ve monositlerde aktivitesi arttığında, oksijen süperoksit anyonuna dönüşerek ekstrasellüler sıvıda süperoksit anyon miktarı artmaktadır (99).

2.8.2.4.3. Nötrofil miyeloperoksidaz (MPO)

Bu enzim canlı sistemlerde hidroperoksit aracılı klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini sağlar. Üretilen hipoklorik asit immun sistemde bakterilerin öldürülmesine yardım etmekle birlikte, neden olduğu α 1- antiproteinaz inhibisyonu nedeniyle sağlıklı dokulara zarar verebilmektedir (98)

2.8.2.5. Halojenlenmiş Hidrokarbonlar

Su kirleticilerden halojenlenmiş hidrokarbonlara, hava kirleticilerden azot oksitlere maruziyet serbest radikal oluşumunda önem arz etmektedir.

Karbontetraklorür (CCl_4) ve bromotriklorometan ($CBrCl_3$) vb hidrokarbonlar biyolojik sistemlerde oksidatif hasarın başlamasında rol oynayabilmektedir. CCl_4 'ün sitokrom P-450 monooksijenaz aracılı metabolizması sırasında meydana gelen Triklorometil, triklorometil peroksil radikalleri gibi potent radikaller, protein denatürasyonları ve lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedir (99).

2.8.3. Doğal Enzimatik Ve Peptid Yapılı Antioksidan Savunma Sistemleri

Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (89).

Mevcut mekanizmalarına göre antioksidanlar ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; ortamda mevcut serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların daha potent formlara dönüşmelerini durduran bileşiklerdir. İkincil antioksidanlar ise meydana gelmiş reaktif radikal ile reaksiyona girerek onun etkisini nötralize eden bileşiklerdir. Katalaz ve peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi enzim sistemleri birincil antioksidan kategorisinde yer alırken, C vitamini, E vitamini, karetonoid ve polifenoller gibi bileşikler ikincil antioksidanlar olarak adlandırılır (100).

2.8.3.1. Birincil Antioksidanlar

2.8.3.1.1. Katalaz ve Peroksidaz

Katalaz enzimi; SOD enzim aktivitesi sonrası meydana gelen H₂O₂'yi su ve oksijene çevirmektedir (96).



H₂O₂, biyolojik sistemlerde önem arzeden çoğu molekül ile özel bir reaksiyon vermeyen bir moleküldür. Zararlı etkisi OH[·] radikali gibi potent oksidanların oluşumunda bir ön madde olması nedeniyledir. Peroksidazlar da katalaz enzimiyle benzer özelliklere sahiptir (101).

2.8.3.1.2. C.2. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)

SOD, çalışmak için Zn kofaktörüne ihtiyaç gösteren bir enzim sistemidir. Süperoksit anyonunu (O₂^{·-}) hidrojen perokside (H₂O₂) ve oksijene çevirerek antioksidan etkisini göstermektedir. Fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı işlev görmekte olan bu enzim sistemi yüksek pH değerlerinde dahi stabil çalışabilmektedir.

Tüm aerob canlı organizmalar SOD enzim sistemini içerirler.

Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit gibi organik bileşiklerle direk reaksiyon vermektten ziyade daha potent oksidan bileşiklerin oluşumu için öncül bir bileşendir. Lipid bileşiklerinin indirekt ve direkt yolla oksidasyondan korunmasında önem arz etmektedir (101).

$2H^+$

$O_2^- + O_2^- \dots\dots H_2O_2 + O_2$

SOD

2.8.3.1.3. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)

Glutasyon tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olup oksidan hasarın önlenmesi ve düzeltilmesinde görev alan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzim sisteminin substratı olarak işlev görmektedir.

Hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma işlevi ağırlıklı olarak glutation peroksidaz ile enzimatik düzeyde gerçekleşmektedir (102). Enzim kofaktör olarak selenyum mineralini kullanmaktadır. Bu enzim yardımıyla glutasyon indirgenmiş formundan oksitlenmiş formuna dönüşüm gösterir. Ayrıca glutation hücre içindeki süperoksit anyonu, hidroksi radikalleri ve tekil oksijen ile moleküler düzeyde enzimatik olmayan şekilde reaksiyon gösterebilmektedir

GSHPx

$2 GSH + H_2O_2 \dots\dots GSSG + 2 H_2O$

2.8.3.2. İkincil Antioksidanlar

2.8.3.2.1. C Vitamini

C vitamini vücudun hücre dışı sıvılarında bulunan, suda çözünebilir çok önemli bir antioksidan olup insan vücudunda sentezlenemediğinden bu vitaminin besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir (89).

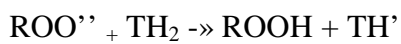
C vitamini esansiyel bir besin ögesi olmasına ek olarak, indirgen ve antioksidatif özellikleri nedeniyle de önem taşımaktadır (103). Kollagen doku sentezinde, metal iyonları metabolizmasında, antihistamin reaksiyonlarında ve bağışıklık sisteminin geliştirilmesinde gerekli bir vitamindir (104). Ayrıca, kalp-damar hastalıkları, kanserler ve nöronal rahatsızlıklar gibi hastalıkların riskini azaltmada, serbest radikallerin indüklediği DNA hasarlarını önlemede etkin role sahiptir (104).

2.8.3.2.2. E Vitamini

Yağda çözünebilir antioksidanların en yaygını olan E vitamini, başta hücre membranları olmak üzere hücrenin lipid kısımlarını korumaktadır. Tokoferoller ve tokotrienollerin bitkiler tarafından sentezlendiği bildirilmektedir (87). Bitkisel dokularda bulunan bileşiklerdir. E vitamini aktivitesine sahip 8 farklı tokol bileşiği vardır (105). A tokoferol, diğer tokollere oranla daha fazla E vitamini aktivitesine sahiptir (105).

Tokoferollerin lipid peroksidasyonu sonucu oluşan peroksil radikallerini etkisizleştirilmesinde büyük önemi vardır (106). Organizmada hücre membranlarında bulunan E vitamini bileşikleri, membran lipidlerini hidroksi, peroksi, alkoksi radikalleri, tekli oksijen, oksijen-metal kompleksi gibi oksidan bileşiklere karşı korumaktadır. Bu zararlı bileşikler sadece lipitlere zarar vermekle kalmayıp lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu oluşturan ikincil ara ürünlere dönüşebileme potansiyelinde oldukları için bu peroksidasyon zincirinin ilerleme basamağı tokoferollerce durdurulmuş olur (102).

Tokoferoller hidroperoksil radikale bir hidrojen atomu vermek suretiyle serbest radikal zincir reaksiyonunu durdurmakta ve lipid peroksidasyonunu engellemektedir. Oluşan tokoferol radikali (TH') nispeten daha stabil olup zincir reaksiyonuna devam edememektedir. Tokoferoller (TH₂), peroksi radikalleri (ROO") ile şu mekanizma ile reaksiyona girmektedir.



Yüksek konsantrasyonlarda ise prooksidan etki göstermektedir (90).

E vitamininin yüksek dozlarda diyetle ilavesinin LDL oksidasyonunu engellediği ve oksidatif strese karşı koruyucu olduğu bildirilmektedir (107). Yapılan çalışmalarda, hafıza performansının zayıflaması ile düşük antioksidan düzeyleri arasında bir ilişki olduğu, özellikle E vitamini gibi zincir kırıcı antioksidanların hayvanlarda sinirsel hasarı azalttığı ve insanlarda da Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimini engellediği bildirilmektedir (97). E vitamini ve Selenyum (Se) takviyeli bir diyet, karaciğerdeki heme pigmentlerinin oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna karşı önemli ölçüde koruyucu etki göstermektedir (99). E vitamini; C vitamini ve koenzim Q₁₀ (Ubikinon) ile birlikte hücre membranlarının korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (87).

Tokoferoller hücre çoğalmasının ve trombozis denilen pıhtılaşmanın önlenmesi kadar bağışıklık sistemini koruyucu özelliğe de sahiptir (104). Ayrıca E vitaminince zengin diyet katarakt ve kalp-damar hastalıkları riskini de azaltmaktadır.

E vitamininin en iyi kaynakları; bitkisel yağlar, sebzeler, et ve balıktır (89). A-tokoferol, daha çok hayvansal ürünlerde, diğer tokoferoller ve tokotrienoller ise bitkisel ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır (103).

2.8.3.2.3. Karotenoidler

Karotenoidler eksojen ikincil bir antioksidan grubudur. Karotenoid bileşiklerinin doğada 600 kadar çeşidi saptanmıştır (108). Bunlardan 20 kadarı insan doku ve kanında ölçülebilmektedir. Ölçülebilenlerden %90'a yakın kısmının, 3-karoten, likopen, lutein ve kriptoksantinden oluştuğu in-vivo çalışmalarla belirlenmiştir (108,109).

Karotenoidler, insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenemeyen, mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından sentezlenebilen pigment ailesine ait bileşiklerdir (108,111). Memelilerde %10'dan az kısmı provitamin A olarak iş görmekte ve retinole metabolize edilmektedir (109). Karotenoidler, provitamin A olarak işlev görmesinin yanı sıra antioksidan olarak da kalp-damar hastalıklarının engellenmesinde önem arz etmekte ve son yıllarda bu bağlamda yoğun araştırmaların yapıldığı rapor edilmektedir (108,109,113). Lutein, zeaksantin, likopen, kriptoksantin ve α - β karoten en iyi bilinen karotenoidlerdir. Koyu yeşil yapraklı bitkiler lutein, yumurta sarısı lutein ve zeaksantin,

domates ve domates ürünleri likopen (108,110) turunçgiller kriptoksantin (114,116) yeşil veya kırmızı renkli sebze ve meyveler, mısır, brokoli ve şalgam yüksek oranda α ve β karoten içeren oldukça zengin kaynaklardır (110,112). Karotenoidler içerisinde yer alan β -karoten likopen, lutein ve zeaksantin non-enzimatik membran antioksidanları grubuna dahildir (109,115). Karotenoidler antioksidan etkileriyle bilinen genelde lipofilik formda bileşiklerdir (118). Karotenoidler oksidatif stresin DNA hasarını engelleyen bitkisel antioksidanlar olup, hasarlı hücrelerin gelişimini, tümoral yapı kazanmalarını ve metastazını da engellemektedir (128-130). Retinol palmitat: retinol ve palmitik asitten oluşan bir ester form karotenoiddir.

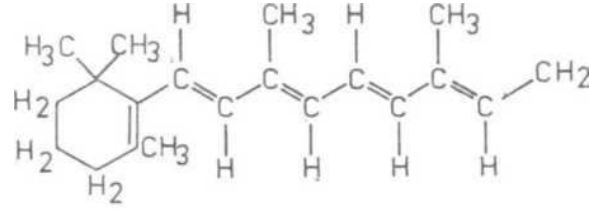
Karotenoidler, bitkilerde fitoen desaturaz adıyla bilinen ve izomeraz, saturaz gibi demir içermeyen enzimler tarafından sentezlenmekte, insanlarda membranlarda antioksidan olarak C ve E vitaminleriyle sinerjistik etki göstermektedirler. Yüksek dansitelerde antioksidan önceliklerini kaybederek aktif prooksidan özellik gösterebilirler. Karotenoidler insanlarda %5-50 oranında emilir. Bu oran öteki vitamin ön maddelerinden daha azdır. Emilimlerinde gıda kitlesinin yağ ve protein (110) içeriği ile safra tuzları etkilidir. Diyetteki karotenoid fazlalığı Emilimlerini azaltır. Emilme sonrasında mukoza hücreleri tarafından paylaşılan kısmı retinale ve daha sonra da retinole metabolize edilir (120).

2.8.3.2.3.1 A Vitaminleri ve Türevleri

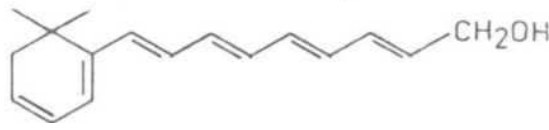
Bilinen 2 çeşit A vitamini (A1,A2) vardır. Hayvansal besinlerden karaciğer, yumurta sarısı ve sütte, bitkisel besinlerden ise özellikle sarı renkli olanlarında beta-karoten (öncül A vitamini) veya direkt A vitamini şeklinde bulunmaktadır. Başlıca üç tür karotenden (α , β , γ) parçalanarak A vitamini sentezi yapılmaktadır. Beta karotenin izoprenoid zincirinin parçalanmasıyla iki mol A vitamini aldehidi meydana gelmekte, meydana gelen bu aldehid retinal olarak isimlendirilmektedir. Retinalin alkol formuna indirgenmesi sonucu retinol yani asıl A vitamini sentezlenmiş olur.

A2 vitaminin etkisi zayıf olduğu için A1 vitamini esas A vitamini olarak ele alınmaktadır. A2 vitamini ancak A1 vitaminin %40'ı kadar etki gösterebilmektedir.

A vitamini yapısal olarak incelendiğinde bünyesinde bulundurduğu yan zincir değişik konfigürasyonlar gösterebilmektedir. Bu değişen zincir yapısına göre 7-cis, 9-cis, 11-cis, 13-cis retinen şeklinde formları mevcuttur. Burada önemli olan form biyolojik sistemlerde görme prosesinde rol oynayan A1 vitamini 11 –cis retinendir.

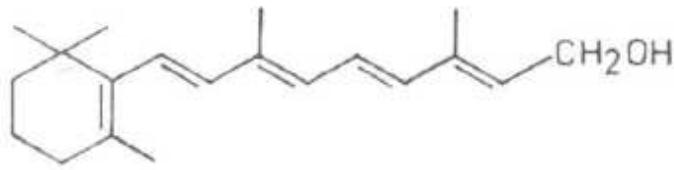


Vitamin A1



Vitamin A2

Δ^{11} – cis – retinal



Tüm trans retinol

A Vitaminin Etki Şekli:

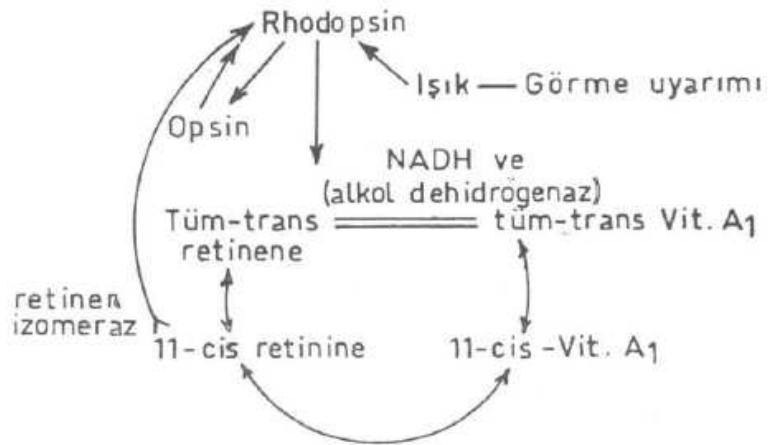
A vitamini; omurgalı canlılarda görme siklusu denen olayda önemli bir rol oynamaktadır. Demiri kofaktör olarak kullanan dioksijenaz enzimi aracılığıyla 3-karotenden meydana gelen A1 vitamini bu sıklusta görev almaktadır. Görme olayı, göz retinasında bulunan çomak ve kon hücrelerin ihtiva ettiği görme pigmentleri (rodopsin, iodopsin) yardımıyla meydana gelen fotokimyasal bir hadisedir. Kon hücreleri iodopsin, çomak hücreler ise rodopsin pigmentine sahiptir. Bu pigmentler, protein bir yapı olan opsin ile bir karotenoid olan 11-cis retinen'den oluşurlar. 11-cis retinen, 11-cis A1 vitaminin aldehid formudur.

Görme olayı sırasında ışık retina üzerine düşünce rodopsin yapısındaki 11-cis retinen izomerizasyona uğrayarak tüm-trans retinen meydana gelmektedir. Tüm-trans retinenin meydana gelmesiyle opsin tüm-trans retinenden ayrılmaktadır. Açığa çıkan serbest tüm-trans retinen rod hücreleri üzerinde ve kendi içinde bulunduğu vezikul zarlarında değişikliğe yol açarak Ca^{+2} iyonlarının zar dışına çıkmasına olanak sağlar. Ca^{+2} iyonları ile uyarılan reseptör sistemleri aracılığıyla görme mesajı artık sinirlere iletilmiştir.

NADH etkisi ile tüm-trans-Vitamin A1'e dönüşen tüm-trans retinen, izomerizasyona uğrayarak 11 cis-Vitamin A1 ve NAD ve alkol dehidrogenaz etkisi ile 11-cis retinene dönüşebilir. Bu sayede rodopsinin parçalanması ile oluşan opsin ile 11-cis retinen karanlık ortamda birleşerek yeniden rodopsin oluşturulur. Bu sayede döngü sağlanmış olur. (Resim-2)

Kon hücreleri, gün ışığında görme ve renkli görmeden sorumlu pigmentleri kapsarlar. Bu pigmentler bünyesinde 11-cis retinal ihtiva ederler.

Sonuç olarak çomak hücreler insan retinasında daha çok periferde, konlar ise merkezde konumlandığı için bu yapılar sırasıyla periferik ve merkezi görme işlemlerinden sorumludurlar (121).



NAD+Alkol dehidrogenaz

Resim 2. Görme Siklusu

A vitamini eksikliğine bağlı olarak konjonktiva ve korneada musin ve goblet hücre kaybıyla birlikte seyreden skuamoz metaplazi ve azalmış yara iyileşme fonksiyonuyla görülmektedir (8,9,11).

Vitamin A molekülü tüm musin ve keratin yapıların sentezi için mutlak gerekli bir bileşendir(122-126).

Keratin yapıların terminal differiasyonu Vitamin A ile modüle edilmekteyken musin gen expresyonu ise all-trans retinoik asit ile olmaktadır (127-130).

A vitamini eksikliği durumlarında müsün kaybı ve keratin yapısındaki değişimlerle birlikte psödomonas ve herpes simpleks gibi patojenlerle oküler infeksiyon riski artmış bulunmuştur (131,132).

Çocuklarda Vitamin A takviyesinin gözyaşı filminde laktoferrin ve demir bağlayıcı glikoproteinlerin modülasyonu yoluyla bakteri, virus ve mantar enfeksiyonlarına karşı bağışıklığı artırdığı gözlenmiştir (133).

Yakın zamanda IL-5 reseptoru ile yapılan çalışmalarA vitaminin mukozal Ig A modülasyonunda önemli bir görev aldığını göstermiştir (134).

Makrofajlar immun cevaptan ve fagositozdan sorumlu hücrelerdir. Makrofajlar TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile ilişkilendirilmiştir. Retinoidlerin makrofaj sayı ve aktivitesine etki ederek inflamasyonun proinflamatura basamağına etki gösterdikleri belirlenmiştir (135,136). A vitamini eksikliği olan hayvanlarda yapılan çalışmalarda, makrofajların lenfoid dokudaki sayılarının artmış olması, bu duruma bağlanmıştır (137).

İn vitro çalışmalarda faregillerde all-trans retinoik asitin bir proinflamaur TNF- α ünitelerini düşürdüğü; insanlarda ise IL-1 β ünitelerini regüle ettiği gözlemlenmiştir (138,139). Yapılan diğer fare çalışmalarda retinoidlerin IL-1 expresyonu ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (140,141).

2.8.3.2.3.1.1 Retinol Palmitat

Retinol palmitat retinol ve palmitik asitten oluşan bir ester form karotenoiddir. Karotenoidler anti oksidan etkileriyle bilinen genelde lipofilik formda bileşiklerdir. Retinol palmitat ile yapılan diğer çalışmalarda diğer A vitamini bileşiklerine göre daha az yan etkili bir bileşik olduğu gösterilmiştir (142). Antioksidanlarla çalışılırken meydana gelebilen en önemli handikap uygunsuz yüksek dozda antioksidanların prooksidan aktivite göstermeleridir (143,144). Wistar rat modellerinde dozdan bağımsız antioksidan aktivitenin gösterilmiş olması retinol palmitatı hayvan deney modellerinde daha çalışabilir kılmaktadır. Diğerlerine nazaran daha düşük yan etki içermesi ve ışık ve oksidasyon koşullarında da stabil kalabilmesi, prooksidan aktivitenin çalışılacak deney hayvanlarında oluşmaması bileşiğin pratik ve teorikte uygulanabilirliğini kolaylaştırmakta ve mantıklı kılmaktadır (145). Retinol palmitat göz kremi (Vitamin A-PosTM) A vitamini eksikliğine bağlı konjonktivit ve atropik kornea bozukluklarında destek tedavi amacıyla endikasyonu olan bir ilaçtır; retinol ve palmitik asitten oluşan bir ester form sentetik karotenoiddir. Erime noktası 28 °C derece kaynama sıcaklığı 184 °C dir. Suda çözünmez. Görünümü berrak altın yağ renginde olup, kokusuzdur. Hava, okside edici ajanlar ve kuvvetli asidlerle reaksiyon verebilir, çok yüksek sıcaklıkta kararsız hal alabilmektedir.

3. AMAÇ

Fototoksik keratit fazla süre veya dozda ultraviyole ışına maruz kalmakla ortaya çıkan akut kornea hasarına verilen isimdir. Sıklıkla koruyucu gözlük takmadan kaynak yapan veya kış sporları ile uğraşan kişilerde görülmektedir (80). Kaynak işlemi esansında UV-A, UV-B ve UV-C gibi çeşitli dalga boylarında ışınlar etrafa saçılmaktadır. Kaynakçı keratitinde esas olarak UV-B ışını olarak adlandırılan 280-315nm dalga boyundaki ışınlar suçlanmaktadır.

Korneaya belirli doz ve sürede akut UV-B ışını uygulanması sonucu korneal hücrelerde apoptozis ve fototoksik keratit ortaya çıkmaktadır (1). Akut maruz kalınan UV-B enerjisi kornea epitelinden daha derine nüfuz ederek tüm korneal hücrelerde hasar oluşturmakta ve apoptozisi uyarmaktadır (2,67). 270-290 nm dalga boyu aralığındaki UV ışınları korneal epiteli ve bowman tabakası tarafından tamamen emilerek ağırlı klasik fotokeratit tablosunu oluşturmakta, daha düşük dalga boylarında ise kornea endotel tabakası etkilenmeye başlamaktadır (145). 270 nm dalga boyunda sadece 0,005 J/cm²'lik UV ışını uygulamakla keratit ortaya çıkabilirken bu rakam 320 nm dalga boyunda 10 J/cm²'dir (80). 280-315nm dalga boyu spektrumundaki ultraviyole ışınları UV-B ışını olarak adlandırılmaktadır. UV-B ışınına akut maruziyet ile tüm kornea hücrelerinde harabiyet oluşturan serbest radikal mekanizması tetiklenmekte ve bunu takiben kornea epiteli, keratositler ve endotel hücrelerinde hasar, korneada geçici bulanıklık, ödem ve opasifikasyonların görüldüğü klinik tablo ortaya çıkmaktadır (81). Akut maruz kalınan UV-B ışınının kornea epitelinden daha derine nüfuz ederek, nükleik asitler, proteinler ve lipidleri yıkan serbest radikal hasar zincirini ve apoptozisi uyardığı ayrıca kornea epitelinde mitozu inhibe ettiği, nükleer fragmentasyon yaptığı, stroma keratositlerinde geri dönüşümlü hasara ve endotelde pleomorfik değişikliklere sebep olduğu ve bu olaylarda nükleer faktör, prostoglandin E2 ve pekçok başka inflamatuvar faktörlerin ekspresyonu ve serbest radikallerin rol oynadığı gösterilmiştir (80-83,118). Serbest radikal hasarı kuramına göre; akut hasar başladıktan sonra olay zincirleme reaksiyon şeklinde ilerleyici bir süreçtir. Bu reaksiyonun çeşitli basamaklarında önleyici etkisi olan bazı antioksidan bileşiklerin lokal ve sistemik uygulamalarının tedavide ve hasar mekanizmalarını önlemede etkinliği gösterilmiştir (1,4,5). Örneğin: süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin, N asetil sistein gibi farmakolojik

antioksidanların TNF- α aktivasyonunu inhibe ederek hasarı durdurdukları gösterilmiştir (154,157-159). Fototoksik keratit oluşumunu önlemek için de serbest radikallere karşı etkileri bilinen antioksidan ajanların faydalı olabileceği düşünülmekte ve bu konuyla ilgili bazı çalışmalar yapılmaktadır. Literatürde şimdiye kadar, bir A vitamini türevi olan topikal astazantin, laktoferrin, intravenöz C vitamini, diyetle zerumbon, diyetle C vitamini, intraperitoneal okreotid gibi bazı antioksidan ajanların fototoksik keratitin tedavisi ve önlenmesinde yararlılığı gösterilmiştir (1,4,146).

Kitaichi ve arkadaşların yapmış olduğu gen çalışmasında farelerde fototoksik etkiyle meydana getirilmiş keratitte, serbest radikal hasar mekanizmasında olay yerine makrofajların gelmesini engelleyen bir sitokin olan MIFgeni ekspresyonun, hasarı önleyici etkisi olduğu ortaya konmuştur (2).

Yukarıda bahsi geçen, fototoksik keratite karşı etkili antioksidan ajanlardan astazantin, β -karoten ve α -tokoferole göre daha güçlü antioksidan özelliği olduğu, aynı zamanda anti-tümör, anti-kanser, anti-diyabetik ve anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Astazantin deniz ürünlerinde bol miktarda bulunan ancak henüz topikal damla şeklinde müstahzarı olmayan bir karotenoiddir. Deneysel çalışmalarda özel olarak hazırlanmaktadır.

Karotenoidler anti oksidan etkileriyle bilinen genelde lipofilik formda bulunan bileşiklerdir. Çalışmamızda, retinol ve palmitik asitten oluşan ester formunda bir karotenoid olan retinol palmitatı, müstahzarına kolay ulaşılabilirliği nedeniyle fototoksik keratit hasarını önleyici etkisinden araştırmayı amaçladık.

Retinol palmitat, göz hastalıklarından A vitamini eksikliğine bağlı konjonktivit ve atopik kornea değişikliğinde destek tedavisi olarak kullanılan bir ilaçtır. A vitamini içeren topikal ilaçların keratokonjonktival epitelde keratozisde düzelme ve konjonktiva goblet hücrelerinde artış sağladığı, kornea abrazyonu modelinde yara iyileşmesini hızlandırdığı, insan ve tavşan konjonktiva doku kültüründe musin üretimini artırdığı gösterilmiştir (146,156). Hayvan modelleri üzerinde yapılan deneysel çalışmada retinol palmitat içeren göz damlasının n-heptanol alkolü ile meydana getirilmiş kornea ve konjonktiva epiteli yaralanması üzerinde tedavi edici etkinliği gösterilmiştir (146).

Retinol palmitat ile yapılan diğerk çalışmalarda diğerk A vitamini bileşiklerine göre daha az yan etkisinin olması (154), antioksidanlarla çalışılırken meydana gelebilen en önemli handikap olan yüksek dozda uygunsuz prooksidan aktiviteye sahip olmaması (143,144) ve wistar rat modellerinde dozdan bağımsız antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle retinol palmitatın fototoksik keratit modelinde kullanılabilir olduğunu düşündük (146,152,153). Düşük yan etkiye sahip ve stabilizasyonu iyi olan bu vitamin A türevi bileşiğin ratlarda oluşturulmuş fototoksik keratit modelinde akut dönemde uygulanmasının (5. ve 120.dakikalarda) hasarı önleyici etkisinin araştırmayı amaçladık. Yeterli doz ve sürede uygulanan UV-B ışını ile fotoksik keratit modeli oluşturduktan ve takiben ratların sağ gözlerine retinol palmitatın ticari formu olan vitamin A-pos krem™ sol gözlerine ise ticari kremde yer alan taşıyıcı maddeler olan beyaz vazelin lanolin karışımı sürdükten 24 saat sonra iki grupta kornea hasarını istatistiksel olarak karşılaştırarak krem içindeki etken madde olan retinol palmitatın fototoksik hasarı önlemede etkisi olup olmadığını incelemek istedik.

Kornea tabakalarından epitel ektoderm kökenli, diğerk katlar mezenşim kökenlidir (7,153-155). Fototoksik keratit sonucu kornea epitel, keratosit ve endotel hücrelerinin hasar alması sonucu hem ektoderm kökenli epitel hemde mezenşim kaynaklı nöral krestten oluşan keratosit ve endotel hücreleri etkilenmektedir. Çalışmamızda literatürdeki örnekleri esas alarak oluşturduğumuz keratit modelinin uygunluğunu doğrulamak için en azından kontrol rat gözlerinde hem ektoderm hem mezenşim kaynaklı kornea hücrelerinde apoptotik hücreleri görmeyi bekledik.

Antioksidan etkinliği bazı yayınlarda gösterilmiş olan retinol palmitat literatürde daha önce herhangi bir fototoksik keratit modelinde çalışılmamış olduğundan bu konuda literatüre katkıda bulunmayı amaçladık. İlacın fototoksik hasar tablosu ortaya çıkmadan önce, akut evrede kullanılmasının hasarı önlemede etkili olup olmayacağı konusunda fikir sahibi olmayı istedik. Bu çalışma sonrası elde edeceğimiz verilere göre retinol palmitatın fotoksik keratitte kullanılabilirliği konusunda ileri klinik çalışmalar yapmayı ve ayrıca fototoksik keratit tablosu ortaya çıktıktan sonra iyileşmeyi kolaylaştırıcı etkisi olup olmadığını araştıran yeni çalışmalara yönelmeyi planladık. Çalışmamızda elde edeceğimiz sonuçların modellenmiş ve diğerk keratit mekanizmaları üzerindeki yeni

tedavi arayışları ve yeni antioksidan etkili bileşiklerin çalışılması üzerine ileri çalışmaları teşvik etmesini umut etmekteyiz.

4. YÖNTEM VE GEREÇ

Destek: Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013/68 numara ile desteklenmiştir.

Çalışmanın Yapıldığı Yerler: Proje Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Ana Bilim Dalı Fototerapi Ünitesi, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Histoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı.

Etik kurul: T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 04.04.2013 tarih, 13 numaralı toplantısının 186 sayılı kararı ile Etik Kurul Onayı alınmıştır.

4.1. DENEY HAYVANLARI

Toplam 15 adet ağırlıkları 200-210 gr arasında değişen Wistar türü erkek rat kullanılmıştır. Ratlar gürültüden uzak 22 ± 30 °C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık ve karanlık ortamda dönüşümlü olarak tutulmuştur. Tüm hayvanlara yeteri kadar yiyecek ve su verilmiştir.

14 adet,200-210 gr erkek Wistar-Albino cinsi rat, eşit sayıda (n = 7) ve rastgele olarak iki deney grubundan birine dahil edildi.

Grup 1: 5. dakikadailaç uygulanan grup

Grup 2: 120. dakikada ilaç uygulanan grup

Ultraviyole ışını ile yeterli fototoksik hasar modeli oluşturulduğunu doğrulamak için 1 adet rat kontrol hayvanı olarak ışına maruz bırakıldıktan sonra hiçbir ilaç almadı.

Çalışmadaki sayı literatürde yer alan çalışmalar örnek alınarak ve istatistiksel çalışma yapılabilecek minimum sayıda olacak şekilde planlanmıştır(1,2,3,4,5).

Tablo 2. Deney hayvanlarının gruplara [grup 1 (5') ve grup 2 (120')] göre sayıca dağılımı; etken madde(250 IU/g retinol palmitat), taşıyıcı maddelerin (beyaz vazelin, sıvı parafin, lanolin) sağ -sol rat gözlerine uygulanması

	Sağ gözler	Sol gözler	n
Grup 1	etken madde	taşıyıcı madde	7
Grup 2	etken madde	taşıyıcı madde	7

	Sağ göz	Sol göz	n
Kontrol Hayvanı	uygulama yok	uygulama yok	1

4.2. İLAÇ :

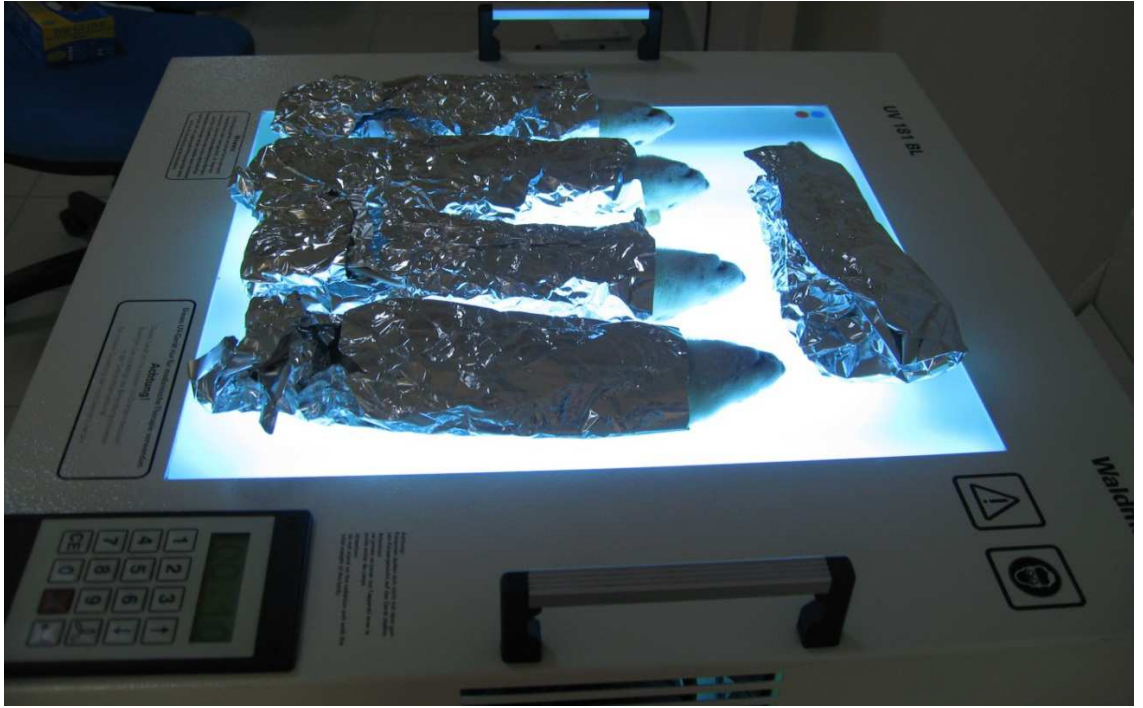
Vitamin A-POS™ 250 I.U./g göz merhemi:

Etken madde olarak Retinol palmitat 250 I.U./g içermektedir. Yardımcı madde içeriği beyaz vazelin, seyreltik likit parafin, likid parafin, lanolin'den oluşmaktadır.

4.3. DENEY PROTOKOLÜ

Her bir rat ketamin hidroklorür (1 mg/kg, IM) anestezisi altında,kafa dışındaki vücut yüzeyi açıkta kalacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Ana Bilim Dalı Fototerapi Ünitesinde yer alan UV 181 Waldmann(Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Almanya) cihazı ile 311 nm dalga boyunda 1 J/cm² UV-B ışınına maruz bırakılmıştır. Çalışmadaki 14 ratın her birinde sağ ve sol gözler UV ışını alarak model keratit oluşturulmuştur. Keratit modelleri oluşturulduktan sonra 14 adet rat rastgele 7'şer ratlık eşit 2 ayrı deney grubuna ayrılarak 1 grup 5, 2. grup 120 dakika grubu olarak belirlenmiştir. 5. ve 120. dakikalarda sağ gözlere 250 IU/ml retinol palmitat içeren vitamin A-pos™ krem ve sol gözlere taşıyıcı madde (ticari kremin içindeki etken madde harici içerik olan beyaz vazelin, parafin ve lanolin karışımı) uygulanmıştır. Bu aşamadan sonra hayvanlar T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleleri Laboratuvarı'na nakledilerek uygun ortamlarına tekrar kavuşturulmuştur. 24 saatlik deney süresi burada tamamlandıktan sonra ketamin 50 mg/kg, IM ve ksilazin 10mg/kg ile anestezi altında tüm ratlarda enükleasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deney bitiminde tüm ratlara

sakrifikasyon amaçlı yüksek dozda anestezik madde ile solunum depresyonu yapıldı. Enükle rat gözleri uygun doku fiksasyon tekniği ile hazırlanarak H&E ve TUNEL yöntemleriyle histopatolojik ve immunhistokimyasal olarak incelenmek üzere yardımcı araştırmacı olarak projemizde yer alan ESOGÜ Histoloji Ana Bilim Dalı Üyesi Prof.Dr. Varol Şahintürk'e ulaştırılmıştır. Ratların retinol palmitat uygulanan sağ ve retinol palmitat uygulanmayan sol gözleri arasında uygun istatistiksel yöntemlerle kornea tabakalarının morfolojisi, apoptotik hücre sayısı açısından istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı. Ayrıca 5.dakikada ve 120.dakikada retinol palmitat uygulanan deney grubu arasında ilacın hemen veya 2 saat sonra uygulanması ile elde edilen fayda arasında fark olup olmadığı incelenmiştir.



Resim 3. Waldmann UV 181 BL cihazı üzerinde temas mesafesinden gözlerine UV-B ışını alan ratlar görülmekte



Resim 4.Uv ışınlama sonrasında sağ gözlerine lokal retinol palmitat ve sol gözlerine vehicle preparat uygulanmış ratlar görülmekte



Resim 5.Işınlamadan 24 saat sonra enükle edilmiş bir rat gözküresi görülmekte

4.4. HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME:

Alınan dokular %10 luk formol içerisinde fikse edildi. Daha sonra parafin içine gömülen dokulardan TUNEL ve Hematoksilen & Eosin boyama için 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Aşağıda ayrıntısı belirtilen şekilde boyama yapıldı.

TUNEL ve Hematoksilen & Eosin Boyama Tekniği

Kullanılan kit: “Apoptag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (S7101-Chemicon International, USA)”

1. 3 kez değiştirilen ksilol 15'er dakika tutuldu.
2. 2 kez %100 alkolde 3 dakika tutuldu.
3. 1 kez % 95 alkolde 3 dakika tutuldu.
4. 1 kez % 70 alkolde 3 dakika tutuldu.
5. PBS solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
6. Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dakika tutuldu.
7. 2 kez değiştirilmiş distile su 2 dakika yıkama yapıldı.
8. % 3'lük hidrojen peroksidad içerisnde oda ısısında 5 dakika tutuldu.
9. PBS içerisinde 5-10 dakika çalkalama yapıldı.
10. Dengeleyici tampon çözelti içinde oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
11. Kesitler TdT enzimi uygulanarak etüvde 37 derecede nemli ortamda 1 saat tutuldu.
12. Kesitleri daha sonra Working Stop/ Wash buffer solüsyonunda 15 saniye çalkalandı ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
13. 3 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1 dakika tutuldu.
14. Oda ısısında kesitlere anti-digoxigenin peroksidad damlatıldıktan sonra üzerleri plastik lamile kapatıldı ve oda ısısında nemli ortamda 30 dk bekletildi.
15. 4 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda oda ısısında 2 dakika yıkama yapıldı.
16. Kesitler üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi.
17. Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1 dakika yıkandı ve son distile suda 5 dakika tutuldu.
18. Metil yeşili içinde 15 dakika tutuldu.
19. 3 kez değiştirilmiş distile suya 10 kez daldırıldı.

20. Butanol şale içine 2 kez daldırıp çıkarıldı.
21. Ksilol I içinde 2dakika.
22. Ksilol II içinde 2dakika.
23. Ksilol III içinde 5dakika.
24. Kapama yapıldı.
25. Alınan seri kesitlerden ayrıca H&E boyama yapılarak genel histopatolojik değerlendirme yapıldı.

H&E Boyama Tekniği

1. Dokulara etüvde 1 Saat deparafinize işlemi yapıldı
2. Ksilol I 10 dakika
3. Ksilol II 10 dakika
4. % 96'lık I Alkol 5 dakika
5. % 96'lık II Alkol 5 dakika
6. % 90'lık Alkol 5 dakika
7. %80'lık Alkol 5 dakika
8. %70'lık Alkol 5 dakika
9. Distile Su 5 dakika
10. Hemotoksilen 1 dakika
11. Çeşme Suyu
12. Eozin 5 dakika
13. Distile Su 2 dakika
14. %70'lık Alkol 5 dakika
15. %80'lık Alkol 5 dakika
16. % 90'lık Alkol 5 dakika
17. % 96'lık I Alkol 5 dakika
18. % 96'lık II Alkol 5 dakika
19. Ksilol I 10 dakika
20. Ksilol II 10 dakika
21. Kapatma

5. BULGULAR

5.1. HİSTOPATOLOJİK VE IMMUNHİSTOKİMYASAL ANALİZ SONUÇ BULGULARI

SKORLAMA

TUNEL boyama uygulanan kornea kesitlerinde pozitif boyanan kornea epitel ve stroma hücrelerinin sayısal yoğunluğu yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Apoptotik hücre yoğunluğu az ise +, fazla ise ++ olarak puanlandı. Apoptotik hücre skorlaması aşağıda Tablo-2’de görülmektedir.

Tablo 3. Gruplara Göre Apoptotik Hücre Skorları

TUNEL	Grup 1 (5. DAKİKA)		Grup 2 (120. DAKİKA)	
	SAĞ retinol palmitat	SOL taşıyıcı madde	SAĞ retinol palmitat	SOL taşıyıcı madde
1. rat	++	++	++	++
2. rat	++	++	++	++
3. rat	+	++	+	+
4. rat	+	++	+	++
5. rat	++	++	++	++
6. rat	++	+	+	++
7. rat	++	++	+	++
Toplam puan	12	13	10	13
	Kontrol sağ ++	Kontrol sol ++		

+: apoptotik hücre sayısı az

++: apoptotik hücre sayısı fazla

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR:

Grup 1- 5.dakikada retinol palmitat uygulanan sağ göz:

Kornea epitelinde düzensizlik görüldü. Kornea epitel hücrelerinde vakuolleşme ve piknotik çekirdekler dikkati çekti. Bir korneada stromada kanama ve PMNL artışı görüldü. TUNEL boyamada kornea epitelinin özellikle taban kısmında pozitif boyanan apoptotik hücreler dikkati çekti. Ayrıca yüzeysel epitel hücrelerinde dökülmeler görüldü. Kornea epitelinde düzensizlik ve epitel bütünlüğünde bozulma (epitel kaybı) gözlemlendi. Stromada ise keratositlerin de pozitif olarak boyandığı dikkati çekti.

Grup 1-5.dakikada taşıyıcı madde uygulanan sol göz:

Kornea epitelinde düzensizlik ve vakuolleşme gösteren hücreler dikkati çekti. Bir korneada epitel içine kanama görüldü. TUNEL boyamada ise epitelde düzensizlik, yüzeysel epitel hücrelerinde apoptoz ve epitelde dökülme gözlemlendi. Ayrıca, iki korneada epitel ile stromanın birbirinden ayrıldığı dikkati çekti. Stromal hücrelerde de apoptozisin gerçekleştiği saptandı.

Grup 2-120. dakikada retinol palmitat uygulanan sağ göz:

Kornea epiteli ve stroma diğer gruplara göre daha normal yapı sergilese de kornea epitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde apoptotik hücreler görüldü. Epitelde düzensizliğin azaldığı, ancak bir korneada ülserasyon olduğu görüldü.

Grup 2-120. dakikada taşıyıcı madde uygulanan sol göz

Korneanın yüzeysel epitel hücrelerinin sitoplazmalarında asidofili artışı dikkati çekti. Epitel hücrelerinde dökülme ve epitelde ayrılma gözlemlendi. TUNEL boyamada epitel hücrelerinde ve stromada apoptotik hücrelerin varlığı dikkati çekti. Bir korneada stromada PMNL artışı görüldü.

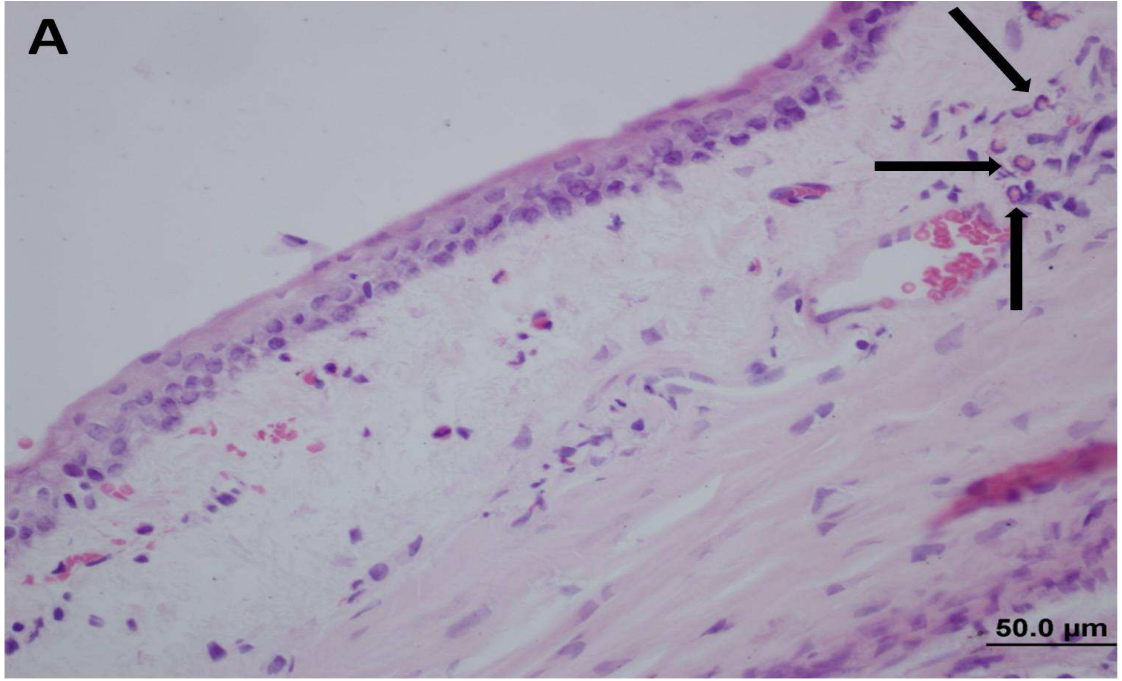
Kontrol sağ göz:

Kornea epitelinde düzensizlik dikkati çekti. Kornea epitel hücrelerinde vakuolleşme, çekirdeklerinde düzensizlik ve piknozis görüldü. Apoptotik hücreler kornea epiteli ve stromada dikkati çekti.

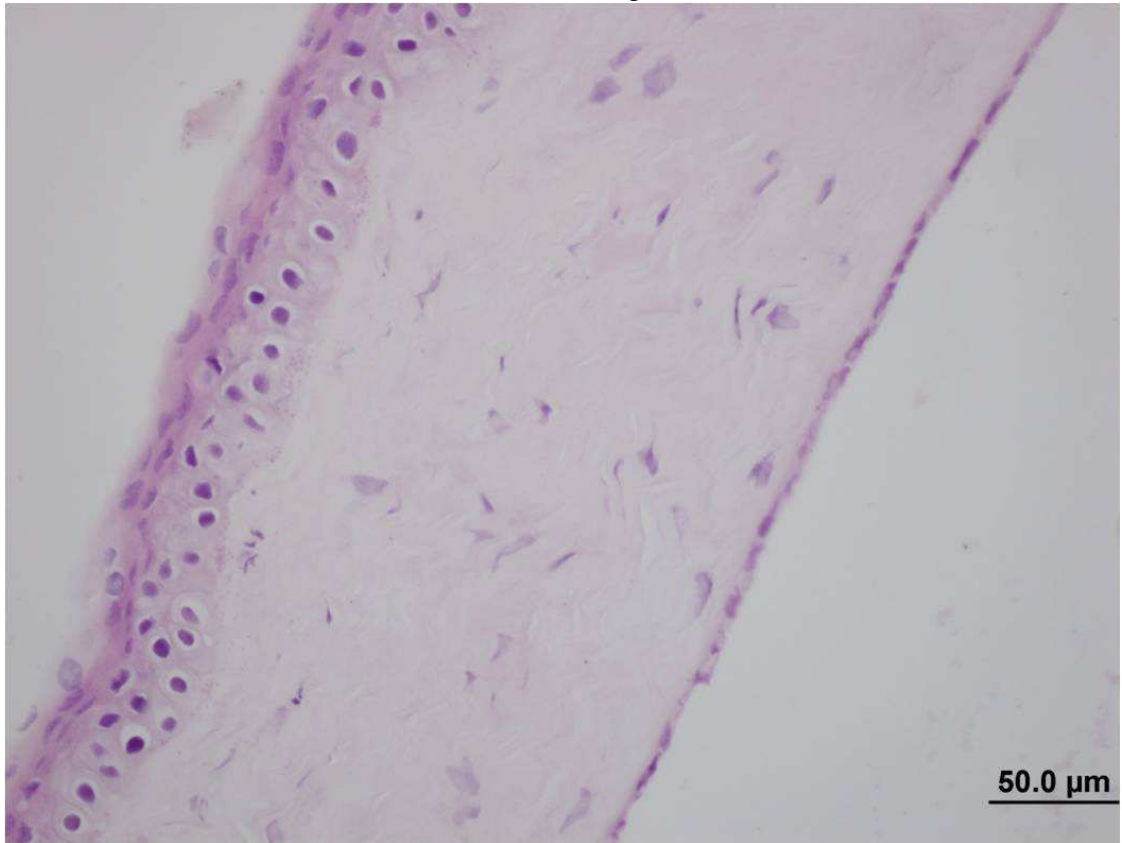
Kontrol sol göz:

Kornea epitelinde düzensizlik ve epitelde ayrılma görüldü. Apoptotik hücreler epitel ve stromada gözlemlendi.

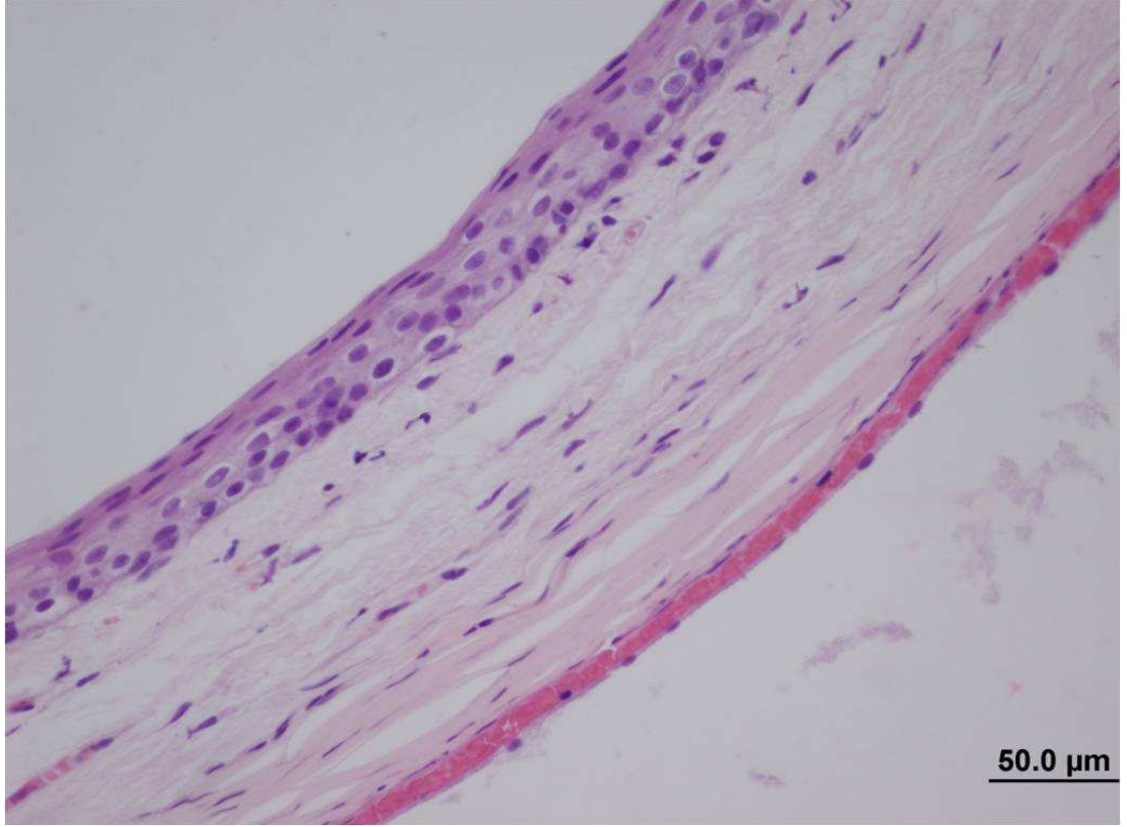
Sonuç olarak; tüm gruplara ait kornea kesitlerinde başta kornea epiteli olmak üzere, bazen stromayı da kapsayacak şekilde bozukluklar saptandı, apoptotik hücreler görüldü. Her ne kadar gruplar arasında belirgin bir fark istatistiksel olarak ortaya konulmasa da 120 dk sonra sağ göze Vit A uygulanan grupta hasarın diğer gruplara göre biraz daha az hasar görüldüğü kanaatine varıldı.



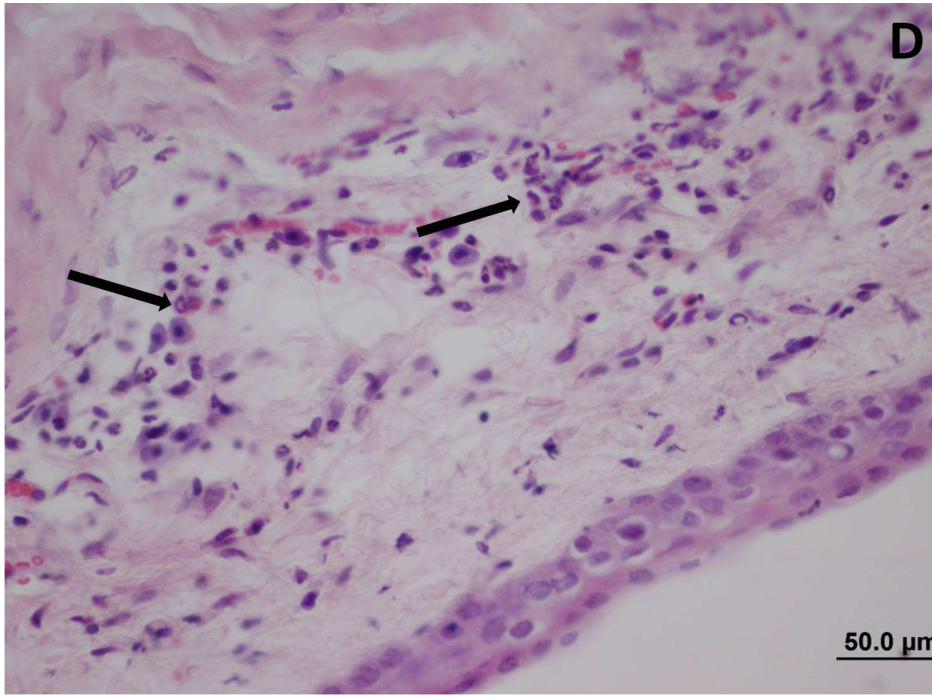
Resim 6. 5' sağ göz kesiti (H%E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)
(Ok:PMNL hücreler görölmekte)



Resim 7 5' sol göz kesiti (H%E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

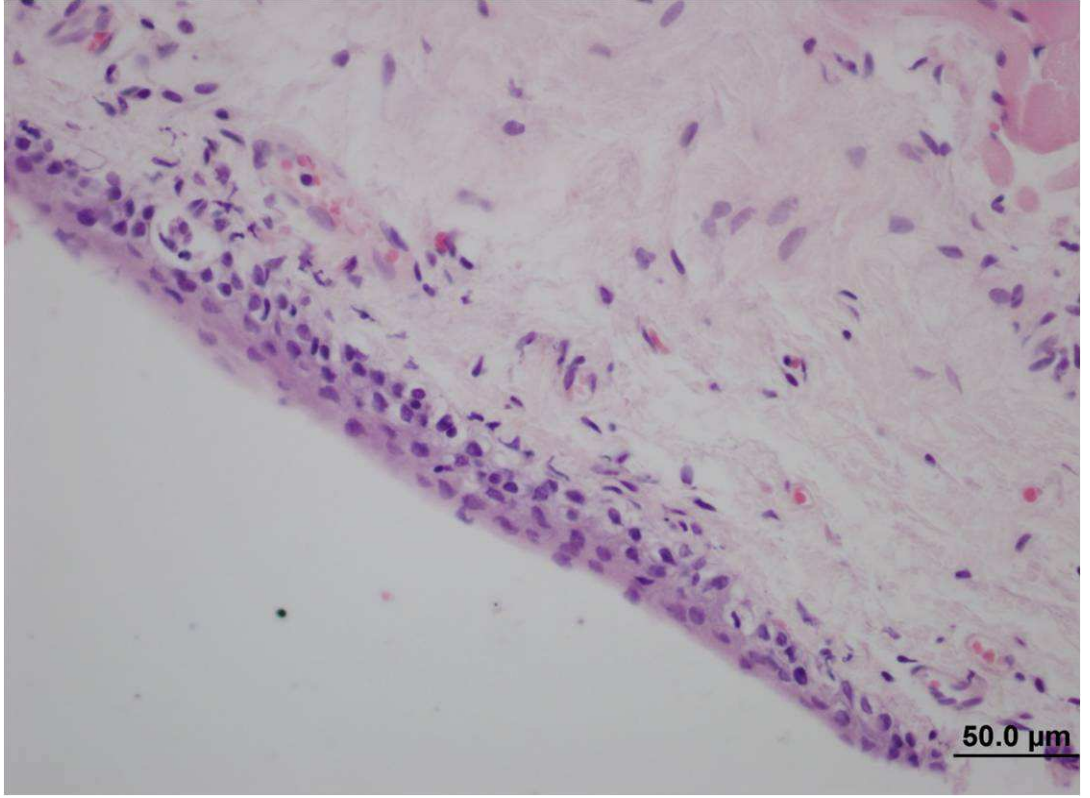


Resim 8. 120' sağ göz kesiti (H%E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

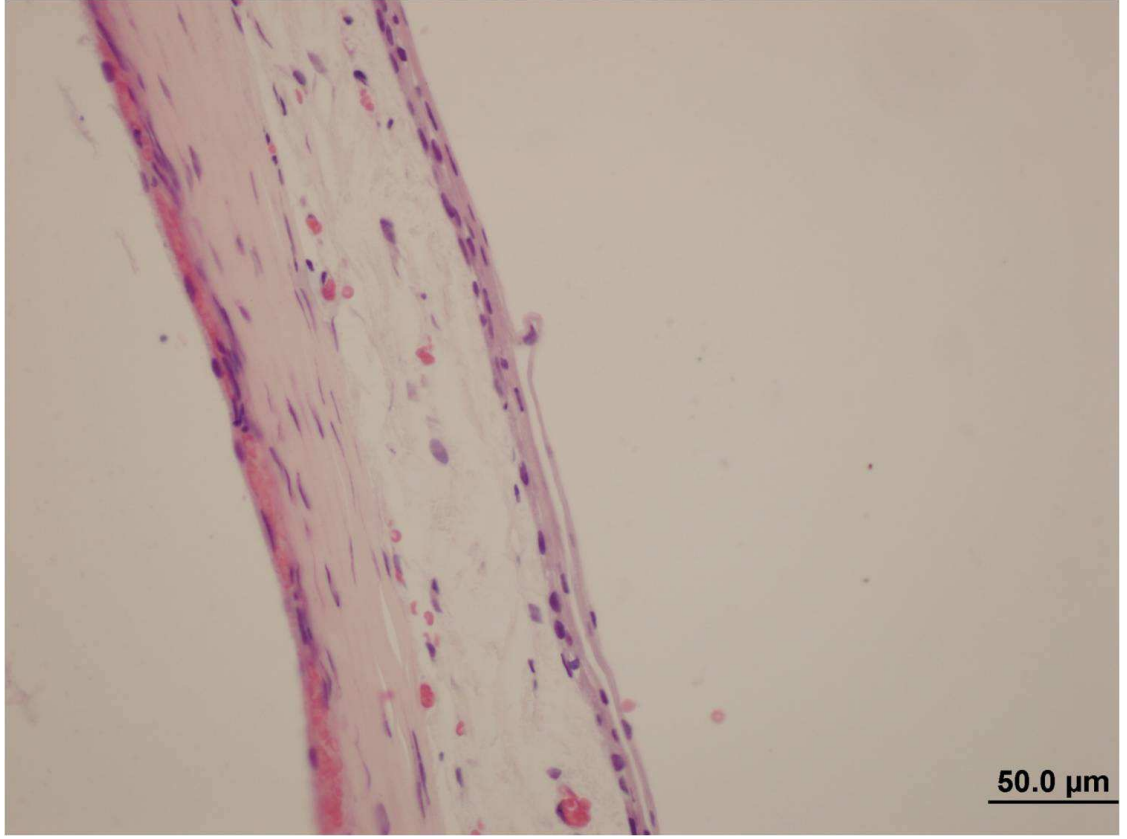


Resim 9. 120' sol göz kesiti (H%E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

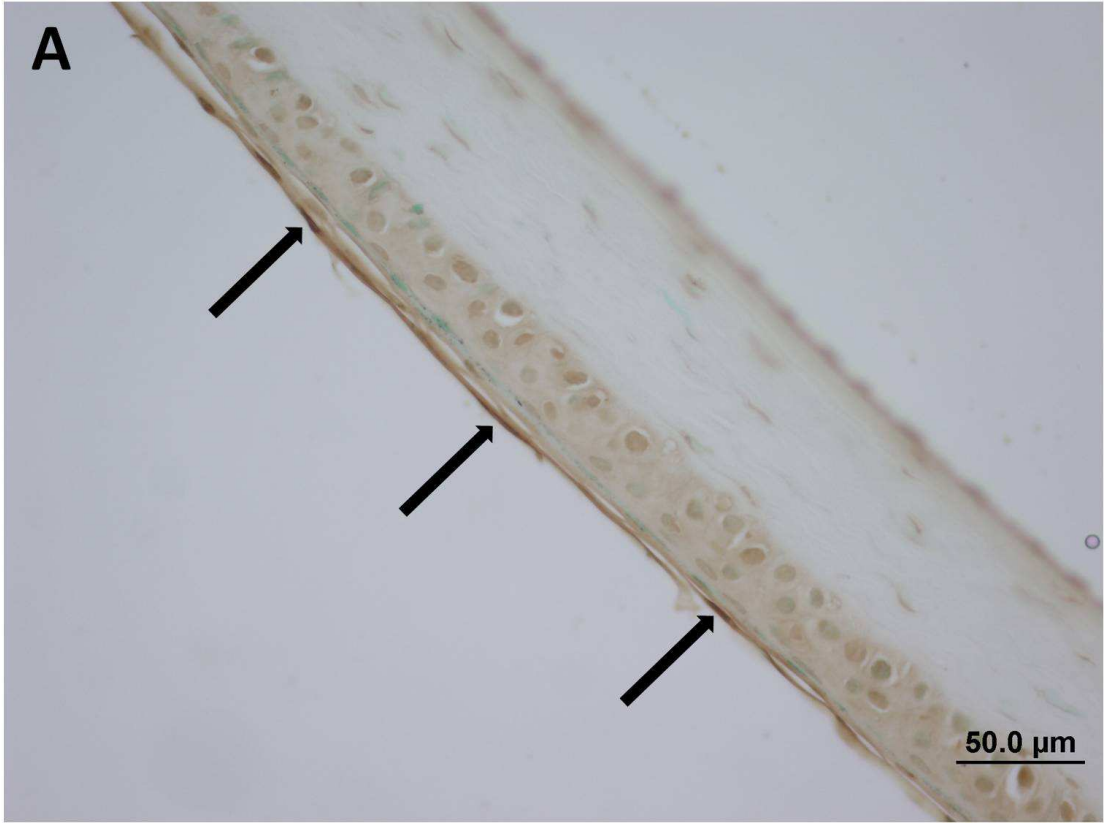
(Ok:PMNL hücreler görülmekte)



Resim 10. Kontrol sağ göz kesiti (vehicle ve ilaç uygulanmamış)

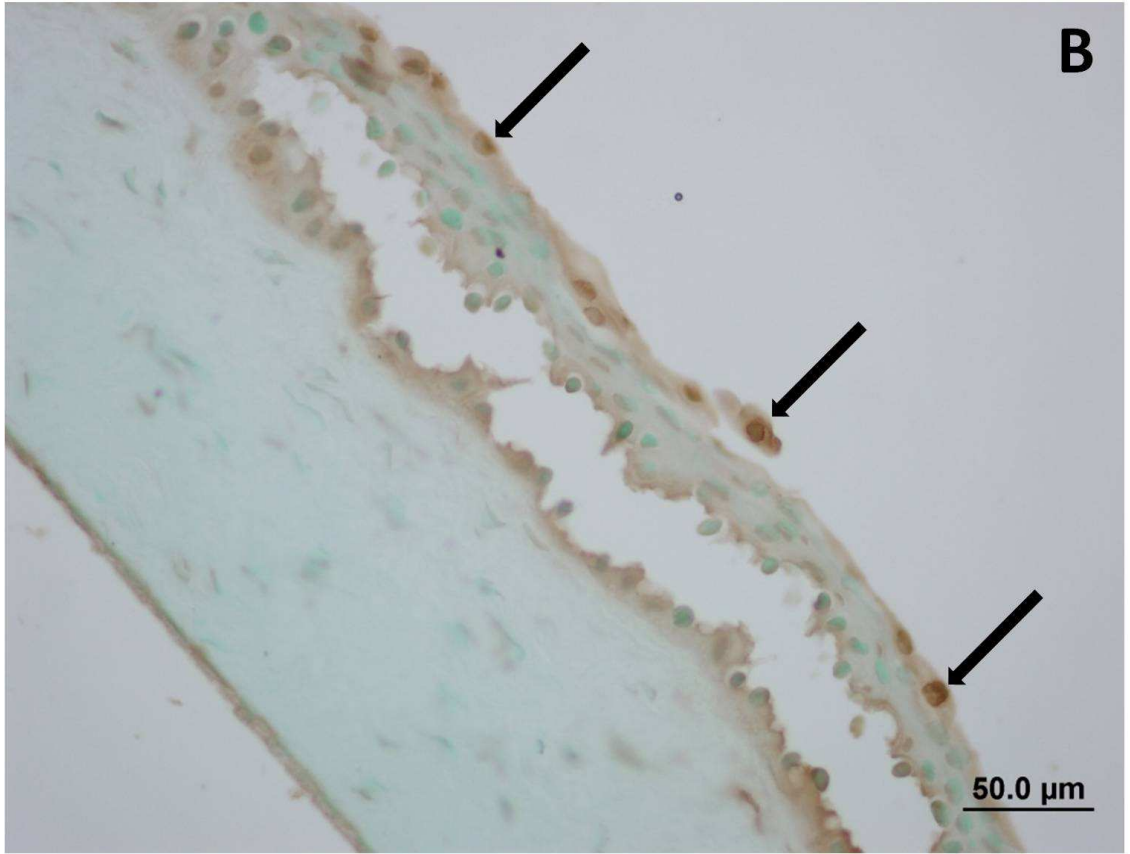


Resim 11. Kontrol sol göz kesiti(vehicle ve ilaç uygulanmamış) (H&E ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)



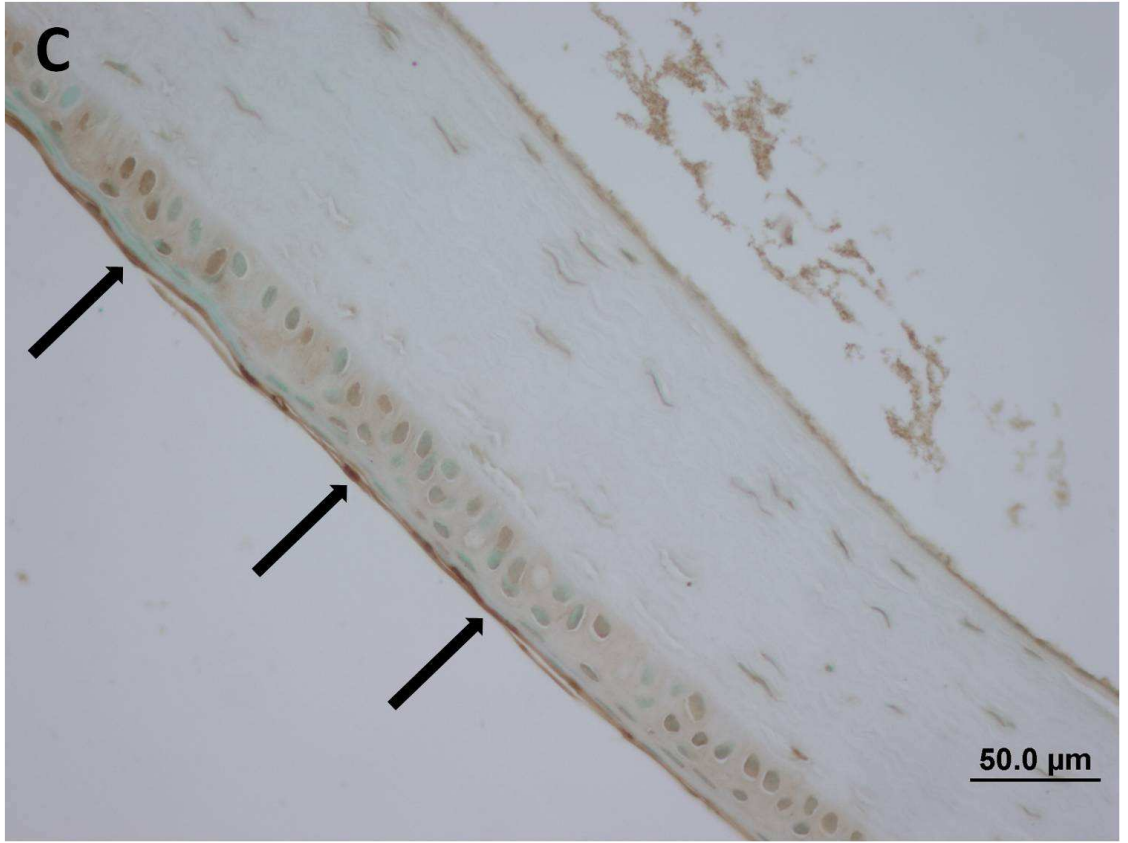
Resim 12. 5' sağ göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

(Ok: Apoptotik hücreler bütünlüğü korunan epitel katmanında)



Resim 13. 5' sol göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

(Ok: Apoptotik hücreler bütünlüğü bozulmuş epitel katmanında)



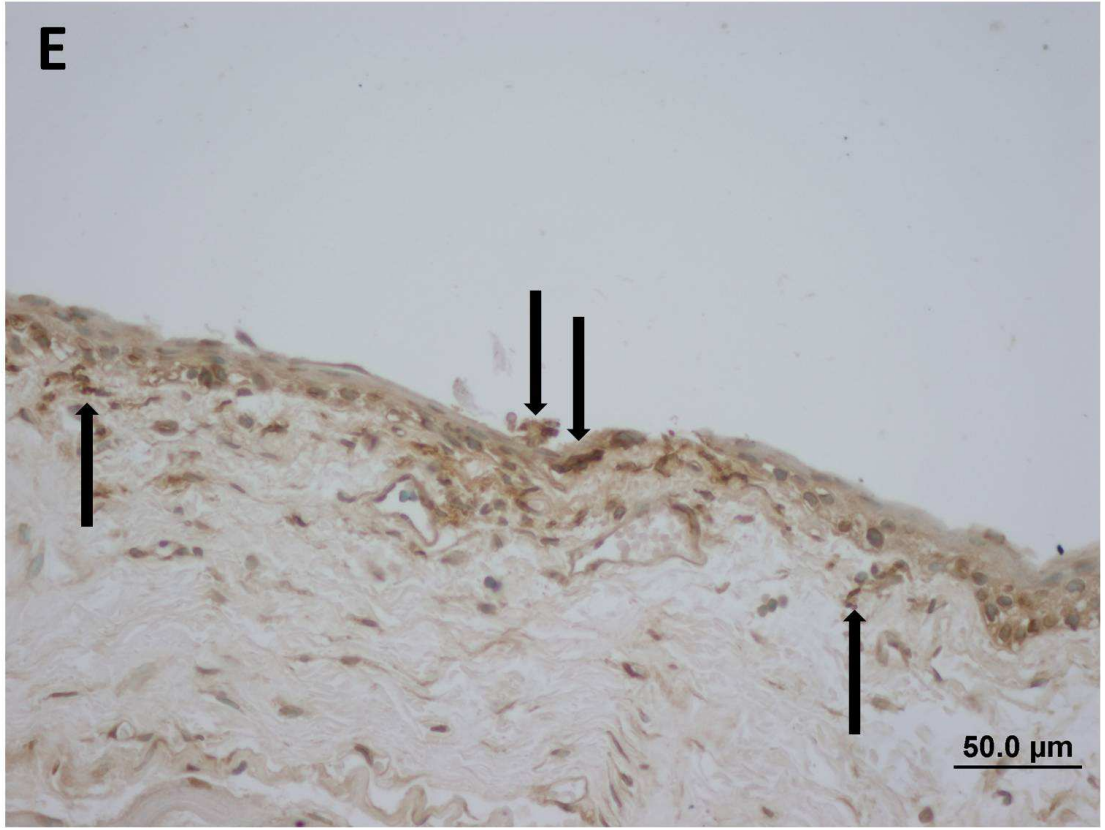
Resim 14. 120' sağ göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

(Ok: Apoptotik hücreler epitel katmanda)



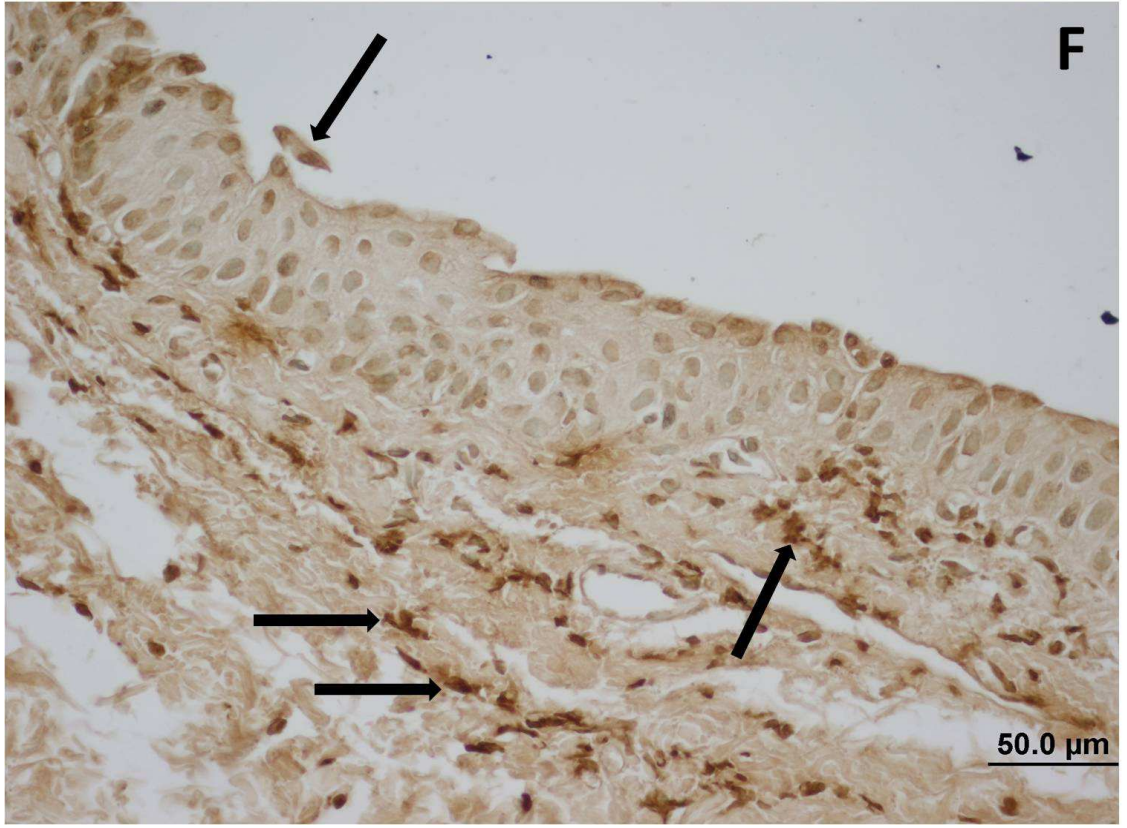
Resim 15. 120' sol göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

(Ok: Stroma ve bütünlüğü bozulmuş üst korneal katmanlarda apoptotik hücreler)



Resim 16. 120' kontrol sağ göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

(Ok: Stroma ve bütünlüğü bozulmuş üst korneal katmanlarda apoptotik hücreler)



Resim 17. 120' kontrol sol göz kesiti (TUNEL ile boyama yapılmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesit)

(Ok: Stroma ve bütünlüğü bozulmuş üst korneal katmanlarda apoptotik hücreler)

5.2. İSTATİKSEL ANALİZ SONUÇ BULGULARI

5.3. İSTATİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

Deney sonucu elde edilen histopatolojik semi-kantitatif apoptotik hücre skorları SPSS 11.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, United States) programı kullanılarak ki-kare fischer exact testleri yöntemleriyle istatistiksel olarak analiz edildi. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. dk sonunda histolojik apoptotik skorlar açısından sağ ve sol göze uygulanan yöntemler sonrasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. ($p=1.00$, ki-kare fischer exact test, $p > 0.05$)

120. dk sonunda histolojik apoptotik skorlar açısından sağ ve sol göze uygulanan yöntemler sonrasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. (p=0.266, ki-kare fischer exact test, p>0.05)

Tablo 4. 5. ve 120.dakikalarda semi-kantitatif apoptozis skorlarının istatistiksel gösterimi

	sağ göz toplam apoptotik skor	sol göz toplam apoptotik skor	p (ki-kare-fischer exact test)
5. dk	12	13	p: 1,00 (p>0,05)
120. dk	10	13	p:0,266 (p>0,05)

5. ve 120. dakikada ilaç (retinol palmitat) uygulanan sağ göz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. (p=0.592 , ki-kare fischer exact test, p>0.05)

5. ve 120. dakikada taşıyıcı madde (vazelin, lanolin, sıvı parafin karışımı) uygulanan sol göz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (p=1.00, ki-kare fischer exact test, p>0.05)

Tablo 5. Retinol palmitat ve vehicle uygulanmış gözlerde semi-kantitatif apoptotik skorların gruplara göre değişiminin istatistiksel gösterimi

	Grup 1 (5. dk)	Grup 2 (120. dk)	p (ki-kare-fischer exact test)
Retinol palmitat	12	10	P:0,592 (p>0,05)
Vehicle (taşıyıcı)	13	13	P:1,00 (p>0,05)

5. ve 120. dakikada ilaç (retinol palmitat) uygulanan tüm gözler ve vehicle uygulanmış tüm gözler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.(p= 0.209, ki-kare fischer exact test, p>0.05)

Tablo 6. Retinol palmitat (etken madde) ve taşıyıcı madde uygulanmış tüm gözlerde semi-kantitatif apoptotik skorların değişiminin istatistiksel gösterimi

	Grup 1+Grup 2 sağ göz	Grup 1+grup 2 sol göz	P (ki-kare-fischer exact test)
Retinol palmitat\vehicle	22	26	P:0,209 (p>0,05)

Sonuç olarak retinol palmitatın UV maruziyeti sonrasında fototoksik keratit tablosunun ortaya çıkmasını önlemede istatistiksel olarak anlamlı etkinliği saptanmamıştır.

6. TARTIŞMA

Fototoksik keratit, kar körlüğü, kaynakçı keratiti, fotokeratit, ultraviyole keratiti, fazla süre veya dozda ultraviyole ışınına maruz kalmakla ortaya çıkan akut kornea hasarına verilen isimlerdir. Genellikle koruyucu gözlük takmadan kaynak yapan veya kış sporları ile uğraşan kişilerde görülmektedir. Ultraviyole hasara bağlı belirtiler 6-12 saat içerisinde ortaya çıkmakta, hastada yüzeysel punktat keratit, total epitel deskuamasyonu ve buna bağlı şiddetli ağrı ve görme kaybı görülmektedir. Göz kapama, siliyer spazmı çözücü ve ağrı kesici damla ve suni gözyaşı gibi semptomatik tedavi ile 36-72 saat içinde kornea yeniden epitelize olmaktadır. Ancak bu süreçte hasta ağrılı ve iş göremez haldedir. Fototoksik hasarın önlenmesi ve hızlı tedavi edilmesi işgücü kaybının engellenmesi ve ekonomiye katkı açısından önem arz etmektedir.

Göz yüzeyini oluşturan kornea ve konjonktiva tabakaları dış maruziyete açıktır. Kornea lense beraber ışık ışınlarının retinaya odaklanması aynı zamanda; retinanın ultraviyole B ve A ışınlarından korunmasını sağlar. Güneş ışığı değişik dalga boylarında ışınlar içermektedir. Ozon tabakası 290 nm'den düşük dalga boylu ışınları etkili şekilde bloke ettiği için doğal UV kaynakları kısa süre maruziyet ile keratite sebep olmaz. İnsan yapımı UV kaynakları UV keratitin esas sebebidir. 295 nm'den daha düşük dalga boyundaki ışınlar kornea tarafından tamamen emilirken, daha uzun dalga boyları aköz hümör ve lense iletilir. Düşük dalga boyları daha kısa süre ve enerjide hasara sebep olabilmektedir. Örneğin; 270 nm dalga boyunda 0,005 J/cm²'lik UV ışını keratit meydana getirirken bu değer 320 nm dalga boyundaki ışınlar için 10 J/cm²'dir (80-83).

Kaynak işlemi esnasında UV-A, UV-B ve UV-C gibi çeşitli dalga boylarında ışınlar etrafa saçılmaktadır. Kaynakçı keratitinde esas olarak akut maruz kalınan UV-B ışını olarak adlandırılan 280-315nm dalga boyundaki ışınlar suçlanmaktadır. Akut maruz kalınan UV-B ışınının kornea epitelinden daha derine nüfuz ederek, nükleik asitler, proteinler ve lipidleri yıkan serbest radikal hasar zincirini ve apoptozisi uyardığı ayrıca kornea epitelinde mitozu inhibe ettiği, nükleer fragmentasyon yaptığı, stroma keratositlerinde geri dönüşümlü hasara ve endotelde pleomorfik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (81). Kornea katlarından epitel ektoderm kökenli, diğer katlar mezenkim kökenlidir. Fototoksik keratit sonucu kornea epiteli, keratosit ve endotel

hücrelerinin hasar alması sonucu hem ektoderm kökenli epitel, hem de mezenşimal nöral krest kökenli keratosit ve endotel hücreleri etkilenmektedir. Sonuç olarak akut maruz kalınan UV-B ışınının tüm korneal hücrelere hasar verebildiği gösterilmiştir (2-67). 270-290nm dalga boyu aralığındaki UV ışınları kornea epiteli ve bowman tabakası tarafından tamamen emilerek ağırlı klasik fotokeratit tablosuna sebep olmakta daha düşük dalga boylarındaki ışınlar ise korneal endotel tabakasını etkilemeye başlamaktadır (145).

Literatürde fototoksik keratitin ortaya çıkışında serbest radikal hasarının rol oynadığı gösterilmiştir (80,83). Oksijen; yaşam için vazgeçilmez bir gereksinim olmakla beraber oksijenin vücut hücre, doku ve organ sistemleri üzerinde çeşitli mekanizmalarla zararlı etkileri de olabilmektedir. Vücutta oksijenin kullanıldığı fizyolojik işlemler sırasında çeşitli kimyasal değişimler sonucu serbest radikal adı verilen kararsız oksijen bileşikleri oluşmaktadır. Serbest radikaller bunun dışında sigara dumanı, alkol, nitrojen oksit gibi çeşitli kimyasallar; ultraviyole ışını ve diğer radyasyon formları gibi dış faktörlerle de oluşabilmektedir (118).

Serbest radikaller, dış atom orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili ve kararsız bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verebilecek bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu nedenle çeşitli mekanizmalar sonucunda oluşan serbest radikaller hücrelere, hücre içi yapılara ve hücrelerin genetik materyaline zarar vermeye eğilim göstermektedirler. Serbest radikallerin reaktivitesi ve vücut içindeki devinimleri düşünüldüğünde bu radikallerle mücadele edilmesi önemli bir konu haline gelmektedir. Serbest radikallerin neden olduğu bu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip mücadeleci maddelere “antioksidan” adı verilmektedir (88). Bu mücadelede vücuttaki doğal antioksidan sistemlerin yanısıra vücut dışı kaynaklardan köken alan serbest radikallerle mücadele ederek onların etkisini geciktiren ya da yok edebilen eksojen (ikincil) antioksidan adı verilen maddeler mevcuttur. Bu antioksidan maddeler hücre doku ve organ sistemlerine lokal ve sistemik olarak etki edebilmektedir. Hücre doku ve organ sistemlerinde oksidan etkinin hücresel antioksidan mekanizmalarla yeterli derecede tolere

edilememesi ve serbest radikallerin birikici etkisi sonrası bu sistemlerde hücre sel düzeyde meydana gelen değişimler ve hasarlanmalar programlı ve programsız hücre ölüm mekanizmalarıyla sonuçlanmakta olay doku enfarktına kadar ilerleyebilmektedir (118).

Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışı faktörlerle oluşabilen travmatik programsız hücre ölümüken apoptozis yaşlanarak ömrünü tamamlamış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için belirli güvenlik limitlerinde yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilebilen programlanmış hücre ölümüdür (118).

Apoptozis yani programlı hücre ölümü morfolojik, biyokimyasal, immunolojik ve moleküler biyolojik gibi birçok diğer yöntemlerle de belirlenebilirken doku kesitlerinde bir immunohistokimyasal method olan TUNEL yönteminde sensitivite % 60-90, spesivite %87'ler düzeyinde olup pratikte kullanımı uygun bir yöntemdir (57,58). TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin – dUTP Nick End Labeling) yöntemi, DNA kırıklarının in situ olarak doku kesitlerinin yanı sıra hücre kültüründe de saptayabilmektedir (58).

Genetik olarak hasarlı hücrelerin apoptozis yoluyla programlı ölüm fazına alınması nedeniyle; UV-B ve UV-C ışınlarının DNA yapısında mutasyon, hücre yıkımı ve transformasyona neden olması önem arz etmektedir. Ayrıca UV-B ışınlarına maruziyet ile tümör supresor gen (P53 geni) aktivasyonu olduğu bilinmektedir (65). P53, hücrede bir şekilde DNA hasarı meydana geldiğinde, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda P53 apoptozisi indükler. P53'ün apoptozisi indüklemesi Bax geninin ekspresyonunu artırması, böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi sayesinde gerçekleşmektedir. Apoptozis; sonuç olarak genotoksik ajanların etkisiyle oluşturulan ağır nükleer veya mitokondrial DNA hasarına verilen bir yanıt şeklinde düşünülebilir (55).

UV maruziyetiyle birlikte serbest radikal hasarı temelinde meydana gelen fototoksik keratitin tedavisi ve önlenmesinde topikal astazantin, laktoferrin, intravenöz C vitamini,

diyette zerumbon, diyette C vitamini, intraperitoneal okreotid gibi çeşitli antioksidan maddeler çalışılmış ve yararlılıkları bildirilmiştir (1-5)..

Tsutomu Fujihara ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada 10 kJ/m² UV-B ışını ile oluşturulan korneal hasar modelinde laktoferrini topikal yolla rat gözlerine ışına maruziyet öncesi uygulamanın fluorosein skorlamaları ve slit mikroskop gözlemsel bulguları ışığında UV maruziyetine bağlı kornea epitel hasarını önlemede anlamlı etkinliği gösterilmiştir. Laktoferrin insan gözyaşında doğal olarak bulunan demir adsorbsiyonunu uyaran, hücre büyümesi ve DNA sentezini artıran, immün modülasyon yapan ve bakteri üremesini engelleyen bir proteindir. Gözyaşındaki laktoferrin gibi proteinler UV radyasyonun bir kısmını absorbe edebilmektedir. Özellikle laktoferrinin absorpsiyonu 310 nm dalga boyunun üzerinde bile devam etmektedir. Laktoferrinin gözü ultraviyole hasardan koruması UV absorpsiyon yeteneğine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra laktoferrinin, UV ışınının kornea epitel hücrelerinde oluşturduğu oksidatif stres sonucu hidroksil radikallerinin oluşmasını engellediği gösterilmiştir. Çalışmada laktoferrinin topikal olarak UV maruziyetten önce uygulanmasının kornea epitel defekti oluşmasını önlediği ancak UV sonrası uygulanmasının hasarı önlemediği bildirilmiştir. Laktoferrin diğer hücrelerde DNA sentezi ve proliferasyonu uyardığı ancak UV maruziyetten sonra tedavi amaçlı kullanılmasının kornea hasarından korumadığı gösterilmiştir (3). Kornea epitel hücre proliferasyonu ve migrasyonunun gözyaşındaki büyüme faktörlerinden olumlu etkilenmekle birlikte laktoferrinden etkilenmediği bildirilmiştir. Laktoferrinin UV maruziyetten önce uygulanmasının korneayı UV hasardan korumasına karşın, sonra uygulanmasının aynı etkiyi göstermemesi, esas etki mekanizmasının serbest radikal oluşumunu önlemekten çok, gözyaşında UV emilimi yapması olduğu hipotezi ile açıklanabilir.

Anton Lennikov ve arkadaşlarının çalışmasında C57BL/6 türü farelerde 400 mJ/cm² UV ışını ile oluşturulmuş keratit modelinde astazantin (astaxanthin) hasardan koruyucu etkisi araştırılmıştır. UV ışına maruziyetten hemen önce her grupta 10 hayvan olacak şekilde sağ gözlere 1, 0.1 veya 0.01 mg/ml dozlarda polietilen glikolde seyrelterek hazırlanmış astazantin, sol gözlere ise sadece taşıyıcı madde olan polietilen glikol topikal olarak uygulanmıştır. 24 saat sonra gözler enükle edilerek H&E ve TUNEL

NF- κ B immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle incelenmiştir. Ayrıca in vitro olarak fare korneal epitel hücre kültürüne astazantin uygulandıktan sonra UV ışını verilecek sitotoksitesite incelenmiştir. UV-B maruziyetinin kornea epitelinde incelmeye ve hücre ölümüne sebep olduğu, astazantin uygulanan gözlerin morfolojik olarak daha iyi korunduğu gösterilmiştir. Astazantin uygulanan gözlerde kornea epiteli sadece taşıyıcı madde uygulanan gözlerle göre doza bağımlı olarak daha kalın bulunmuş ($p < 0.01$) ve astazantin uygulanan gözlerde anlamlı olarak daha az apoptotik hücre tespit edilmiştir. Ayrıca astazantin oksidatif stresi ve in vitro çalışmada kornea epitel hücre kültüründe UV ışına bağlı sitotoksitesiteyi azalttığı gösterilmiştir (1). Bu çalışmada astazantin UV maruziyeti öncesi uygulanmasının bir nevi güneş gözlüğü etkisiyle UV blokajı yapabileceği göz önünde bulundurularak başka bir grup farede de uygulama UV maruziyetinden 5 dakika sonra yapılmıştır. Bu grupta da benzer sonuçlar elde edilmiştir: astazantin koruyucu etkisi irradyasyondan sonra uygulansa bile devam etmiştir. Astazantin antioksidan etkisi β -karoten ve α -tokoferolden daha yüksek olduğu bilinen ancak A vitamini aktivitesi bulunmayan bir karotenoiddir. Bunun yanı sıra anti-tümör, anti-kanser, anti-diabetik, anti-inflamatuar özellikleri olduğu bildirilmektedir. Astazantindeki her ionone halkasında hidroksil ve keto grubunun bulunması hem iç hem dış membran yüzeylerini koruyucu kendine özgü antioksidan aktivitesini açıklamaktadır. Astazantin somon gibi deniz ürünleri, ayrıca yengeç ve karides kabuklarındaki kırmızı turuncu pigmentlerde fazlasıyla bulunmaktadır. Antioksidan ve immün modülatör etkileri bilinmektedir (1). Çalışmamızda başka bir karotenoid olan retinol palmitatı UV kerati modelinde hasarı önleyici etki açısından araştırıldı ancak UV maruziyet sonrası uygulanmasının hasarı durdurucu etkisi olmadığını saptandı. Bu nedenle retinol palmitatın astazantin kadar güçlü bir antioksidan olmadığı kanaatine varıldı.

Kitaichi ve arkadaşların yaptığı bir gen çalışmasında UV-B maruziyetinde serbest radikal oluşumundaki zincirleme reaksiyon basamağına etki ederek olay yerine makrofajların gelmesini engelleyen, durdurucu bir sitokin olan makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) gen ekspresyonunun UV hasarı önleyici etkinliği ortaya konmuştur. Bu çalışmayla 400 mJ/cm^2 dozunda UV-B ışını uygulayarak keratit modeli oluşturulan farelerden aşırı MIF gen ekspresyonu yapan transgenik grupta H&E ve TUNEL yöntemleriyle yapılan incelemelerde histopatolojik düzeyde kornea

parametrelerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Kornea bazal membranın korunmuş, TUNEL boyamada apoptotik hücre sayısının daha az ve c-Jun pozitif hücrelerin daha fazla olduğu gösterilmiştir (2). Çalışmada sonuç olarak MIF geni ekspresyonunun UV-B'ye bağlı kornea hasarını önleyici etkisi olduğu ve bu etkinin MIF'ın c-Jun aracılı hücre proliferasyonunu artırmasına bağlanabileceği belirtilmiştir. UV hasarına uğramış korneanın MIF olmadan da düzelebileceği ancak bunun daha uzun zaman alacağı, yeterince MIF'e sahip korneanın UV'den daha az hasar göreceği ve daha çabuk iyileşeceği ileri sürülmüştür (2).

Chen ve arkadaşlarının 7 gün boyunca günlük 0.72 J/cm^2 dozda UV-B ışını uygulayarak oluşturdukları fototoksik keratit fare modelinde, diette zerumbon adı verilen antispazmotik, analjezik, antiromatizmal etkileri olduğu inancıyla nedeniyle halk arasında kullanılan bir fitokimyasalın etkileri araştırılmıştır. UV-B irradyasyonunun korneaya belirgin hasar verdiği, kornea ülseri, fazla miktarda epitel kaybı, kornea epitelinde incelme, inflamasyon, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, NF- $\kappa\beta$, iNOS ve TNF- α ekspresyonunun arttığı, bununla beraber kornea epitel ve stromasında malondialdehit birikiminin arttığı bildirilmiştir. Diette zerumbon alan farelerde ise doza bağımlı olarak kornea hasarının anlamlı olarak daha az olduğu gösterilmiştir. NF- $\kappa\beta$, iNOS ve TNF- α ekspresyonunun zerumbon alan grupta anlamlı olarak daha az olduğu, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonunun zerumbon ile bloke olduğu, ayrıca malondialdehit birikiminin azaldığı bildirilmiştir (4).

Demir ve arkadaşlarının 2 J/cm^2 dozunda UV-A ışını ile fotosensitize edilmiş tavşan konjonktiva ve korneasında oksidatif hasara karşı octreotidin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada intraperitoneal octreotid ile tedavi alan gruba nazaran ışın ile sensitize edilmiş diğer gruplarda epitelyal proliferasyon, displazi, hiperplazi, piknosis, parakeratoz gibi histopatolojik değişimlerin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Octreotid grubuyla ışın ile sensitize edilmeyen birinci kontrol grubu arasında histopatolojik bulgular açısından anlamlı fark gözlemlenmezken, ışın alan diğer iki gruba histopatolojik kriterler açısından anlamlı fark gözlemlenmiştir. Octreotid antioksidan etkisi bilinen bir hormon analogudur. (5)

Yukarıdaki çalışmalarda araştırılan maddelerin antioksidan özellikleri nedeniyle korneada UV hasarını önledikleri üzerinde durulmuştur. Antioksidanlarla çalışılırken meydana gelebilen en önemli handikap uygunsuz yüksek dozda antioksidanların prooksidan aktivite göstermeleridir (25,29). Retinol palmitat, rat modellerinde dozdan bağımsız antioksidan aktivitesinin gösterilmiş olması, ışık ve oksidasyon koşullarında stabil kalabilmesi, yan etkilerinin az olması, çalışılan deney hayvanlarında prooksidan aktivite göstermemesi, bu konuda henüz etkilerinin bildirilmemiş olması ve hazır preparatına kolay ulaşılabilirlik nedeniyle çalışmamızda tercih edilmiştir (143,146).

Retinol palmitat içeren göz kremi (Vitamin A-PosTM) A vitamini eksikliğine bağlı konjonktivit ve atopik kornea bozukluklarında destek tedavi amacıyla endikasyonu olan bir ilaçtır; retinol ve palmitik asitten oluşan ester formunda sentetik bir karotenoiddir. Erime noktası 28 °C kaynama sıcaklığı 184 °C dir. Suda çözünmez. Görünümü berrak altın yağ renginde olup, kokusuzdur. Hava, okside edici ajanlar ve kuvvetli asitlerle reaksiyon verebilir, çok yüksek sıcaklıkta kararsız hal alabilmektedir. Karotenoidler antioksidan etkileriyle bilinen genelde lipofilik formda bileşiklerdir. Vitamin A olarak bilinen retinol yağda çözünen ve insanlar için esansiyel bir vitamindir (143). Büyüme, epitel hücresi ve mezenkimal hücre yapılarının farklılaşması, müköz membranlarının keratinizasyona karşı korunması, uzun kemiklerin büyümesi ve gelişimi ile gonadların fonksiyonları için önemlidir. Retinol palmitat içeren oftalmik solüsyonların yan etki profilinin düşük olduğu bildirilmektedir (145-147).

Kasem Abdulmajed ve arkadaşlarının retinil askorbatın antioksidan etkilerinin askorbik asit, askorbik asit palmitat, retinoik asit, retinol ve retinol palmitat ile karşılaştırıldığı çalışmalarında, retinol palmitatın diğerlerine göre antioksidan aktivitesinin daha az olduğu bildirilmiştir (148). Çalışmamızda retinol palmitatın UV hasarı önleyici etkisinin olmadığı saptanması, retinol palmitatın yukarıdaki literatürde bildirilen zayıf antioksidan özelliğe sahip olması ile açıklanabilir.

Retinol palmitatın kornea yara iyileşmesine üzerine olumlu etkileri olduğu konjonktivada goblet hücre sayısında artış sağladığı ve kuru göz tedavisinde faydalı olduğu aşağıda bahsi geçen bazı çalışmalarda bildirilmiştir.

Hiroshi Toshida ve arkadaşlarının 30 adet Yeni Zelanda tavşanının gözleri üzerine n-heptanol ve etanol karışımı uygulayarak kimyasal yaralanma oluşturduktan sonraki keratokonjonktival epitel hasarının iyileşme sürecini saptamak amacıyla 500 IU/ml, 1000 IU/ml, 1500 IU/ml olacak şekilde farklı dozlarda günde 6 defa 11 gün süreyle retinol palmitat solüsyonu, kontrol gözlerine ise sadece taşıyıcı madde (surfaktan) damlatmak suretiyle yapmış olduğu çalışmada, iyileşme kriterleri floresein, rose bengal boya skorlamaları yanı sıra H&E, PAS boyama ve goblet hücre skorlama gibi histopatolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Tedavi süreci sonrasında tüm dozlarda ve tüm gözlerde rose bengal boyama skorları, surfaktan uygulanan gözlere nazaran anlamlı derecede düzelirken, floresein skorlarındaki düzelme 1000 ve 1500 IU/ml dozları kullanılan gözlerde anlamlı fark göstermiştir. H&E ve PAS skorlama ile değerlendirilen histopatolojik bulgular ise 1500 IU/ml uygulanan gözlerde 7 günlük tedavi sonrası anlamlı düzelme göstermiştir. Çalışmada retinol palmitatın, bir alkol türevi olan n-heptanolün kornea ve konjonktiva epiteli üzerinde yaptığı hasarı azalttığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve konjonktivada goblet hücre sayısını artırdığına dair sonuçları göz önünde bulundurulduğunda retinol palmitatın ultraviyole keratitinin tedavisi üzerine olumlu etkisi olabileceğini düşünmekteyiz (146).

Ubels ve arkadaşlarının, 1983 yılında, tavşan gözlerinde meydana gelen korneal epitel yaralanmalarının tedavi edilmesi konusunda topikal retinoidlerin kullanılmasıyla ilgili yapmış olduğu bir çalışmada 0.1% all-trans-retinoik asitin lokal olarak günde 3 kez uygulanmasıyla iyileşme oranında %21'lik bir artış kaydedilirken, uygulama günde 5 kez yapıldığında %35'lik bir iyileşmede artış saptanmıştır. Ayrıca retinoik asitin kornea dehidratasyon mekanizmalarında da düzelme sağladığı gözlemlenmiştir. Çalışmada tedavi sürecine etkisi denenilen retinoidlerden retinal palmitat, retinil asetat, retinol ve 13 cis retinoik asitin ise iyileşme üzerine etkisi saptanmamıştır (149). Ancak literatürde daha fazla sayıda makalede retinol palmitatın kornea yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (160)

Kim EC ve arkadaşları; NAOH uygulamak suretiyle ratlarda oluşturdukları alkali kornea yaralanma modelinde, retinol palmitat ve vehicle içerikli maddeyi tedavi ve kontrol grubu olacak şekilde iki grupta, ayrıca her iki gruba da levofloksasin %0.5 antibiyotik uygulamak suretiyle tedavi edici etkinlik açısından karşılaştırmışlardır.

Retinol palmitat ve antibiyotik uygulanmış gözlerde ,vehicle ve antibiyotik uygulanan kontrol grubuna nazaran 3 günlük (günde 4 kez) tedavi sonrası floresein skorları ve impresiyon sitolojisi analizlerinde daha fazla anlamlı düzelme bildirmişlerdir..Korneal yara iyileşmesinin retinol palmitat uygulanan çalışma grubunda daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (160).

Odaka ve arkadaşlarının lakrimal bezleri diseke ederek kuru göz modeli oluşturdukları ve 4 hafta sonra alkali yaralanma meydana getirdikleri tavşan gözlerinde, retinol palmitat %0.1'lik sodyum hyaluronat ile keratokonjonktival epitel hasarını tedavi edici etkinlik açısından karşılaştırılmış, yüksek doz 1500 IU/ml retinol palmitat uygulanmış gözlerde sodyum hyaluronat ile tedavi edilen gözlere nazaran 7 günlük tedavi sonrası floresein, rose bengal boyama skoru gibi kriterler yanı sıra impresiyon sitolojisi ile incelenen goblet hücre dansite skorlarında anlamlı olarak daha fazla düzelme bildirilmiştir (150).

Qiu ve arkadaşlarının 48 Yeni Zelanda tavşanı gözü üzerinde kazıma yoluyla korneal epitelyal hasar modeli oluşturarak yapmış olduğu bir çalışmada 7 günlük tedavi süreci boyunca Vit-A palmitat (retinol palmitat) ve b-FGF'in (basic fibroblast growth factor) subsellüler düzeyde konjonktiva ve kornea epitelinin mekanik değişimi, goblet hücre sayısı üzerine etkileri incelenmiş. Hem vit-A palmitat hem b-FGF'nin mekanik korneal epitel iyileşmesinde etkin olduğunu; konjonktiva yanı sıra korneal epitel bütünlüğü sağladığını bildirmişler. Vit-A palmitatın konjonktiva goblet hücreleri üzerine koruyucu etkisinin daha fazla olduğunu ve goblet hücre sayısını anlamlı oranda artırdığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra Vit-A palmitat ve b-FGF'nin beraber kullanılmasının anlamlı olarak daha fazla miktarda iyileşme sağladığını ve etkinliğin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (151).

Kastl PR ve arkadaşlarının her iki göze korneaskleral insizyon uygulamak suretiyle beş Zelanda tavşanının gözlerinde oluşturdukları cerrahi yaralanma modelinde, % 0,5 'lik retinol palmitat ve vehicle içerikli maddenin sırasıyla tedavi ve kontrol grubu olacak sağ ve sol gözlere 13 gün uygulanması suretiyle tedavi edici etkinliğini ,yara yeri direncini tedavi bitiminde ölçmek suretiyle karşılaştırmışlardır. %0,5'lik Retinol palmitat ve vehicle uygulanmış gözlerde ,yani çalışma ve kontrol grubunda tedavi bitiminde yara

yeri direnci açısından anlamlı fark bulunamazken aynı çalışma dokuz ve beşerli tavan gruplarında tekrar edilip % 0,5 yerine %0,1 'lik dozda retinol palmitat 13 gün uygulandığında kontrol grubuna nazaran anlamlı düzelme olduğunu gözlemlemişlerdir.Korneasklreal yara iyileşmesinde %0,1'lik retinol palmitatın etkin olduğunu bildirmişlerdir..(161)

Çalışmamızda retinol palmitatın UV maruziyetinden gerek 5, gerek 120 dakikada uygulanmasının istatistiksel olarak kornea hasarını önlemede etkili olmadığını saptadık. ilacın 24 saatlik süreçte istatikselsel olarak önleyici etkinliği bulunmamaktadır. Retinol palmitat uygulanan rat gruplarının sağ gözleri ile sadece taşıyıcı madde uygulanan sol gözlerin apoptotik hücre skorları ve gözlemsel histolojik bulgular açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi. 5. dakika ve 120. dakika grupları kendi içlerinde incelendiğinde de sağ gözler ve sol gözler arasında histopatolojik apoptotik skorlar açısından anlamlı fark bulunmadı.

Retinol palmitatın fototoksik etkiye maruz kalındıktan sonra keratit kliniğinin oturmasına önleyici etkisi olmadığı saptandı. Bu sonuç antioksidan etkisinin güçlü olmaması ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz. Daha uzun süreli ve sık tekrarlı uygulamanın sonuçları değiştirip değiştirmeyeceği ileri çalışmalarda araştırılabilir.

Literatürde retinol palmitatın kornea yara iyileşmesi üzerine anlamlı olumlu etkileri olduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda, her ne kadar istatikselsel olarak anlamlı olmasa da 120. dakikada ilaç uygulanan grupta gözlemsel histolojik bulgular korneanın bir miktar daha iyi olduğunu düşündürmektedir. Bu gözlem ilacın tedavi amacıyla UV maruziyet sonrası kullanılmasının kornea yara iyileşmesine katkıda bulunabileceği fikrini desteklemektedir. Literatürde retinol palmitatın farklı kornea hasarlarında tedavi edici veya tedaviyi hızlandırıcı etkisinin gösterilmiş olmasına karşın UV keratit iyileşmesi üzerine etkisi henüz çalışılmamıştır. İleri deneysel ve klinik çalışmalarda retinol palmitatın UV keratiti önleyici etkisi yerine tedavi sürecini hızlandırıcı etkisinin araştırılmasının, bu ağırlı ve şiddetli klinik tablo ile başvuran hastalarımız açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz.

7. SONUÇ

Gözde ultraviyole hasar mekanizmasının tam olarak anlaşılması hasarın çabuk ve en uygun bir şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Klinikte uygulanabilecek stratejilerin geliştirilmesi için klinik olarak uygulanan tedavinin etkinliğinin doğru bir şekilde ölçülmesi gerekmektedir. Bunun ilk basamağı ise hayvan deneyi modellerinde önleyici etkisi saptanan bir etken maddenin klinik deneylerde çalışmalarda kullanılmasından geçmektedir.

Bildiğimiz kadarıyla daha önce literatürde retinol palmitatın UV keratitini önleyici etkisi olup olmadığı bildirilmemiştir. Çalışmamızda retinol palmitatın fototoksik keratit modeli oluşturulmuş rat gözlerinde tek doz olarak maruziyetten 5 ve 120 dakika sonra uygulanmasının istatistiksel olarak ultraviyole hasarı önleyici etkisinin bulunmadığını gördük. İstatistiksel anlamlı olarak önleyici etkinlik saptanmasa da; 120. dakika uygulama grubumuzda retinol palmitat etken madde uygulanan gözlerde, diğer 5. dakikada ilaç grubumuza nazaran daha az hasar görülmesinin ileride yapılabilecek tedaviye yönelik çalışmalara bir esin kaynağı olacağı fikrindeyiz. Retinol palmitat ultraviyole hasarını önlemekte etkili olmasa da, oluşmuş hasarın tedavisinde etkili olabileceğini düşündüren, farklı hasar mekanizmaları üzerine olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (150,151). Bu konuda daha detaylı sonuçların ortaya çıkarılabilmesi için daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Farklı etken maddelerin farklı doz ve sürede etkinliklerinin karşılaştırıldığı daha ileri çalışmaların insanlarda oluşan ultraviyole hasarın önlenmesi ve tedavisinde yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Lennikov A, Kitaichi N, Fukase R, Murata M, Noda K, Ando R, Oghuchi T, Kawakita T, Ohno S, Ishida S, Amelioration of ultraviolet-induced photokeratitis in mice treated with astaxanthin eye drops. *Mol Vis*. 2012;18:455-64
- 2- Kitaichi N, Shimizu T, Yoshida K, Honda A, Yoshihisa Y, Kase S, Ohgami K, Norisugi O, Makino T, Nishihira J, Yamagishi S, Ohno S. Macrophage migration inhibitory factor ameliorates uv-induced photokeratitis in mice. *Exp Eye Res* 2008;86:929-35.
- 3- Fujihara T, Nagano T, Endo K et al. Lactoferrin protects against UV-B irradiation-induced corneal epithelial damage in rats. *Cornea*. 2000 Mar;19(2):207-11.
- 4- Chen BY, Lin DP, Wu CY, et al. Dietary Zerumbone Prevents Mouse Cornea From UVB-Induced Photokeratitis Through Inhibition Of NF- κ B, iNOS, And TNF- α Expression And Reduction Of MDA Accumulation. *Mol Vis*. 2011 Apr 6;17:854-63.
- 5- Demir U, 1 Demir T, 1 & Akpolat N, 2. The effect of octreotide against oxidative damage in photosensitized conjunctiva and cornea of rabbits. *Doc Ophthalmol*. 2005 Mar-May;110(2-3):193-201
- 6- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 21-22
- 7- Bengisu U, Göz Hastalıkları, 4. Baskı. Ankara, Palme Yayın Dağıtım Pazarlama. 1998, 69-89.
- 8- Arffa RC. Disease Of The Cornea, Fourth Edition. Mosby Co. 1997, 6-7.
- 9- William MH. Adler's Physiology Of The Eye, Ninth Edition, Mosby Co.1992.
- 10- Orhan M. Korneanın Yapısı, İşlevi ve Muayene Yöntemleri. *Medikal Network Oftalmoloji Dergisi* 1994;4: 306-311.
- 11- Duke Elder S. System Of Ophthalmology. Henry Kimpton London, St Louis. 1965;Vol III: 648.
- 12- Tucker SM. Corneal diameter, axial length, intraocular pressure in premature infants. *Ophthalmology* 1992;99:1296.
- 13- Yanoff M, Duker JS, Dimitri TA, LKarp C, Selkin RP. Ophthalmology. In: Ming XW. Mosby Edition. Chapter 5: 12.1-12.18.
- 14- Farjo AA, Soong HK: Kornea Epiteli. Yanoff M, Duker JS (Eds). Bavdek T. (Ceviri editörü). *Oftalmoloji*. 2. Baskı. İstanbul Hayat Yayıncılık 2007;413-21.
- 15- Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z Hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983 Oct;24(10):1442-3.

- 16- Katryn AH. Fundamentals And Principles Of Ophthalmology, American Academy Of Ophthalmology, s.46.
- 17- Waltman RS, Hart WM. In: The Cornea. Moses R.A (Editor) Phisiology Of The Eye. St. Louis, CV Mosby, 1987;36-59.
- 18- Nishida T. In: Cornea. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (Eds). Cornea Volume 1. 2nd ed. Philadelphia Elsevier Inc. 2005;3-22.-21.
- 19- Kanski J. In: Kornea ve Sklera. Kanski J (Ed.). (Çeviri: Orağlı K.). Klinik Oftalmoloji. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 2001;94-155.
- 20- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). Ophthalmology. 2013 Sep;120(9):1778-85.
- 21- Committee on ophthalmic procedures assesment. Corneal endothelial photography. Ophthalmol 1991 Sep;98(9):1464-68.
- 22- Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. Am J Ophtalmol 1982;93:1-29
- 23- Waring GO, Laibson PR, Rodrigues M. Clinical and pathologic alterations of descemet's membrane. Surv Ophthalmol 1974;18: 325.
- 24- Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. Cornea 1997;1:3-27.
- 25- Özdemir O. Kornea transplantasyonu. Medikal Network Oftalmoloji Dergisi 1995.
- 26- Brown SI, Dervichian DG. The oils of the meibomian glands: Physical And Surface Characteristics. Arch Ophtalmol 1969;82:537.
- 27- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 27.
- 28- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 28.
- 29- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 29.
- 30- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 36.
- 31- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 37.
- 32- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea 2009 sf. 38.
- 33- Iwata M, Yagihashi A. Roat Ml. et al. Human ieukocyte antigen class ii positive human corneal epithelial cells activate allogeneic T cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3991 – 4000.

- 34- Chandler JW, Cummings M, Gillette TE. Presence of langerhans cells in the central corneas of normal human infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:113-6.
- 35- Niederkorn JY, Peeler JS, Mellon J: Phagocytosis of particulate antigens by corneal epithelial cells stimulates interleukin-1 secretion and migration of langerhans cells into the central cornea. *Reg Immunol* 2:83. 1989.
- 36- Pepose JS, Gardner KM, Nestor MS. et al, Detection of HLA Class I and Class II antigens in rejected human corneal allografts. *Ophthalmology* 1985;92:1480-4.
- 37- Lewkowicz-Moss SJ. Shimeld C. Lipworth K, et al: Quantitative studies on langerhans cells in mouse corneal epithelium following infection with herpes simplex virus. *Exp Eye Res* 1987;45:127-40.
- 38- Elner VM. Streiter RM. Pavilack MA, et al: Human corneal interleukin-8: IL-1 and TNF- induced gene expression and secretion. *Am J Pathol* 1991;139:977-88.
- 39- Elner VM. Elner SG. Pavilack MA, et al. Intercellular adhesion molecule-1 in human corneal endothelium. *Am J Pathol* 1991;138:525-36.
- 40- Poets BJ. van den Oord JJ. Volpces R. et al. In situ immunohistochemical analysis of cell adhesion molecules on human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 1992; 76:205-9.
- 41- Donnelly JJ, I WY, Rockey JH et al. Induction of Class II (La) alloantigen expression on corneal endothelium in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985: 26:575-80.
- 42- Streiter RM. Kunkel SL, Elner VM, et al: Interleukin-8: A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* 1992: 141:1279-84.
- 43- Kawashima H. Prasad SA. Gregerson DS. Corneal endothelial cells inhibit T cell proliferation by blocking IL-2 Production. *J Immunol* 1994;153:1982-9.
- 44- Smolin G. Cellular response to inflammation at the limbus. *eye* 1989: 3:167-71.
- 45- Messmer EM. Foster CS. Destructive corneal and scleral disease associated with rheumatoid arthritis. *Cornea* 1995: 14:408.
- 46- Gordon JF. Johnson P. Musch DC, et al. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 1985: 119:281-7.
- 47- Van Setten GB. Salonen EM. Vaheri A. et al. Plasmin and plasminogen activator activities in tear fluid during corneal wound healing after anterior keratectomy. *Curr eye Res* 1989;8:1293-8.
- 48- Brazzell RK. Stern ME, Aquavella et al human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing. *invest. Ophthalmol Vis Sci* 1991;32: 336-40.

- 49- Wilson SE, Lloyd SA, He Y-G. EGF, basic FGF and FGF Beta-1 messenger RNA production by rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33: 1987-995.
- 50- Rawe IM, Tuft SJ, Meek KM. Proteoglycan and collagen morphology in superficially scarred rabbit cornea. *Histochem J* 1992; 24:311-8.
- 51- Ten Cate AR, Dcporter DA. The degenerative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue. *Anat Rec* 1975;182:1.
- 52- Baum JL, Niedra R, Davis C, Yue BY. Mass culture of human endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 1979;97:1136-40.
- 53- Kay RP, Smith RE, Nimni ME. Type 1 collagen synthesis by corneal endothelial cells modulated by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1985;260:5139-46.
- 54- Gordon JM, Bauer EA, Eisen AZ. Collagenase in human cornea: immunological localization. *Arch Ophthalmol* 1980;98:341-5.
- 55- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury And Cell Death. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Editors. *Pathologic Basis Of Disease*. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2005:3-46.
- 56- Edinger AL, Thompson CB. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:663-669.
- 57- Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000;301:19-31.
- 58- Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the tunel reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C1309-C1318.
- 59- Kim WJ, Helena MC, Mohan RR, Wilson SE. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:35-42.
- 60- Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res* 1999;69:475-481.
- 61- Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R, Jr, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: A review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 2005;24:509-522.
- 62- Wilson SE, Mohan RR, Hong J, Lee J, Choi R, Liu JJ, Mohan RR. Apoptosis in the cornea in response to epithelial injury: Significance to wound healing and dry eye. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:821-826.

- 63- Deda G, Atmaca L.S, Ultraviyole ve Göz, Retina-vitreus dergisi. 2002, cilt 10 sayı 2, sayfa 196-201.
- 64-Ada S, Sahin S, Boztepe G, Karaduman A, Kölemen F. No additional effect of topical calcipotriol on narrow-band UVB phototherapy in patients with generalized vitiligo, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005 Apr;21(2):79-83
- 65- Setlow, R.B, E. Grist, K. Thompson and Woodhead A.D,. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 15;90(14):6666-70.
- 66- Nagata S, Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):355-65
- 67- Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the nf-kappab signaling pathway. *Exp Eye Res* 2006;82:275-81.
- 68- Longstretch J et al. Health risks. *J Photochem Photobiol B*, 1998;46: 20-39.
- 69- Young R. The family of sunlight-related eye diseases. *Optom Vis Sci* 1994;71: 125.
- 70- Walsh K. UV radiation and the eye. *Optician* May 2009, 26-33.
- 71- Transitions UK. Transitions European Study. 2008.
- 72- Parisi VA, Green A, Kimlin G: Diffuse solar UV radiation and implications for preventing human eye damage. *Photochem Photobiol* 2001,73(2): 135-139.
- 73-Waxier M: Longterm visual health risks from solar ultraviolet radiation. *Ophthalmic Res* 1988, 20: 179- 182.
- 74- Millodot M, Earlam RA. Sensitivity of the cornea after exposure to ultraviolet light. *Ophthalmic Res*.1984;16:325-328.
- 75- Cogan DG, Kinsey VE. Action spectrum for keratitis produced by ultraviolet radiation. *Arch Ophthalmol*. 1946;35:676-677.
- 76- Zuclich JA. Ultraviolet induced damage in the primate cornea and retina. *Curr Eye Res*. 1984;3:27-34.
- 77- Miller D. Light and the cornea and conjunctiva. In: Miller D, ed. *Clinical light damage to the eye*. New York, NY: Springer-Verlag;1987:55-62.
- 78- Billore OP, Shroff AP, Vasavada KA. Superficial keratitis following solar eclipse burn. *Indian J Ophthalmol*. 1982;30:303- 304.
- 79- Millodot and Buschke W, Friedenwald JS, Moses SG. Effects of ultraviolet irradiation on corneal epithelium: Mitosis, nuclear fragmentation, post-traumatic cell movements, loss of tissue cohesion. *J Cell Comp Physiol*. 1945;26:147-164.

- 80- Oliver D. Schein. Phototoxicity and the cornea. *J Natl Med Assoc.* 1992;84:579-583.
- 81- Cullen AP. Photokeratitis and other phototoxic effects on the cornea and conjunctiva. *Int J Toxicol.* 2002 Nov-Dec;21(6):455-64.
- 82- Pitts DG. A comparative study of the effects of ultraviolet radiation on the eye. *Am J Optom* 1970;47:535.
- 83- Pitts DG, Cullen AP, Hacker PD. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:932.
- 84- Ringvold A, Davanger M. Changes in the rabbit corneal stroma caused by uv-radiation. *Acta Ophthalmol.* 1985;63:601-606.
- 85- Ringvold A, Davanger M, Olsen EG. Changes of the corneal endothelium after ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol.* 1982;60:41-53.
- 86- Karai I, Matsumura S, Sadafumi T, Horiguchi S, Matsuda M. Morphological change in the corneal endothelium due to ultraviolet radiation in welders. *Br J Ophthalmol.* 1984;68:544- 548.
- 87- Elliot, J.G. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53 (2);1999;46-48
- 88-.Kaur, C And Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int J. Food Sci. Tech* 36;2001;703-725.
- 89- Diplock, A. Healty Lifestyles Nutrition And Physical Activitiy: Antioxidant Nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, Belgium. 1998;59
- 90- Nawar, W.W. Lipids. In 'Food Chemistry', O.R Fennema (Ed), Marcel Dekker, New York. 1996; 225-319.
- 91- Porter, N.A. Mechanism Of Fatty Acid And Phospholipid Autoxidation. In 'Chemical Changes in Food During Processing', T. Richardson And J.W. Finley (Eds), Van Nostrand Rainhold Company, New York. 1985; 73-105.
- 92- Foote, C.S. Chemistry Of Reactive Oxygen Species. In 'Chemical Changes In Food During Processing'. T. Richardson and J.W. Finley (Eds), Van Nostrand Rainhold Company, New York. 1985;17-32.
- 93- Miller, D.D. Minerals. In 'Food Chemistry', O.R. Fennema (Ed), pp: 617-649. Marcel Dekker, New York. 1996; 617-649.
- 94- Lindsay, R.C. Food Additives. In 'Food Chemistry', O.R. Fennema (Ed), Marcel Dekker, New York. 1996; 767-823.

- 95-. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples Arch Toxicol. 2010 Nov;84(11):825-89
- 96- Duthie, G.G, Wahle, K.W.J. And James, W.P.T. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr. Res. Rev. 2;1989;51-62.
- 97- Meydani, M. Antioxidants and Cognitive Function. ILSI. Nutrition Reviews., 2001;59(8);S75-S82.
- 98- Lavelli, V, Peri, C. And Rizzola, A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. J. Agric. Food Chem. 2000;48(5);1442-1448.
- 99- Chen, H. And Tappel, A.L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by CBrCl₃ in liver, lung, kidney, heart, and spleen. J. Agric. Food Chem. 1996;44(3);854-858.
- 100- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., And Deemer, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. J. Agric. Food Chem. 2002;50(11);3122-3128.
- 101- Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. 1988;27(4);969-978.
- 102- Di Mascio P, Murphy ME And Sies H: Antioxidant defense system: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am J. Clin. Nutr. 53: 1991;194S-200S.
- 103- Gregory JF. Vitamins. In 'Food Chemistry', O.R Fennema (Ed). University of Wisconsin-Madison. Marcel Dekker Inc., New York. 1996. Chapter 8. pp: 531-616.
- 104- Kurllich AC, Tsau GJ, Brown A, Howard L, Klein BP, Jeffery EH, Kushad M, Wallig MA And Juvik JA. Carotene tocopherol and ascorbate contents in subspecies of brassica oleracea. J. Agric, Food Chem. 1999;47(4): 1576-1581.
- 105- Shahidi F. Antioxidants In Food And Tood Antioxidants. Nahrung. 2000;44(3): 158-163.
- 106- Abuja PM, Murkovic and Werner P. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (sambucus nigra) extract in low-density lipoprotein oxidation. J. Agric. Food Chem. 1998;46(10): 4091-4096.
- 107- Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S and Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin e but not by β -Carotene. Arterioscler. Thromb. 1993;13(4): 590-600.
- 108- Omoni AO, Aluko E. The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of

- lycopene: A Review. *Trends Food Sci Technol* 2005;16: 344-50.
- 109- Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* 2007;55: 207-16.
- 110- Ma L, Lin XM. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *J Sci Food Agric*. 2010;90: 2-12.
- 111- Johnson JD. Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? *Free Radic Biol & Med* 2009;47: 321-23.
- 112- Zino S, Skeaff M, Williams S, Mann J. Randomised controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentrations of lipids and antioxidants. *BMJ* 1997;314: 178791.
- 113- Kapoor VK, Dureja J, Chadha R. Herbals in the control of ageing. *Drug Discov Today* 2009;14 (19-20): 992-98.
- 114- Rock CL. Carotenoids: Biology and treatment. *Pharmacol Ther* 1997;75: 185-97.
- 115- Cornelli U, Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* 2009;27: 175-94.
- 116- Davidson GP, Decker TR. Chemopreventive role of fruits and vegetables in oropharyngeal cancer. *Nutr Clin Pract* 2009;24: 250-60.
- 117- Hassimotto NMA, Pinto MDS, Lajolo FM. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Juices with and without defatted milk. *J Agric Food Chem* 2008;56: 11727-33.
- 118- Robbins Basic Pathology Kumar, Abbas, Aster. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2013:1-29
- 119- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The Role Of Carotenoids In The Prevention Of Human Pathologies. *Biomed Pharmacother* 2004;58: 100-10.
- 120- Su Q, Rowley KG, Balazs NDH. Carotenoids: Separation methods applicable to biological samples. *J Chromatogr B* 2002;781: 393-18
- 121- Prof Dr. Bingöl G, Vitaminler Ve Enzimler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, sf 28-32.
- 122- Tei M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Vitamin a deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:82-88.
- 123- Tseng SCG, Hatchell D, Tierney N, Huang AJW, Sun TT. Expression of specific keratin markers by rabbit corneal, conjunctival, and esophageal epithelia during vitamin a deficiency. *J Cell Biol* 1984;99: 2279-2286.

- 124- Koo JS, Jetten AM, Belloni P, et al. Role of retinoid receptors in the regulation of mucin gene expression by retinoic acid in human tracheobronchial epithelial cells. *Biochem J* 1999;338:351-357.
- 125- Gijbels MJJ, Van Der Harn F, Van Bennekum AM, Hendriks HF, Roholl RJ. Alterations in cytokeratin expression precede histological changes in epithelia of vitamin A-deficient rats. *Cell Tissue Res* 1992;268:197-203.
- 126- Darwiche N, Celli G, Sly L, Lancillotti F, DeLuca LM. Retinoid status controls the appearance of reserve cells and keratin expression in mouse cervical epithelium. *Cancer Res* 1993;53(suppl 20):2287- 2299.
- 127- Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 1981;25:617-625.
- 128- Eckert RI, Green H. Cloning of cDNAs specifying vitamin A-responsive human keratins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4321-4325.
- 129- Manna B, Lund M, Ashbaugh P, Kaufman B, Bhattacharyya SN. Effect of retinoic acid on mucin gene expression in rat airways in vitro. *Biochem J* 1994;297:309-313.
- 130- Manna B, Ashbaugh P, Bhattacharyya SN. Retinoic-Acid regulated cellular differentiation and mucin gene expression in isolated rabbit tracheal epithelial cells in culture. *Inflammation* 1995;19:489-502.
- 131- DeCarlo JD, Van Horn DL, Hyndiuk RA, Davis SD. Increased susceptibility to infection in experimental xerophthalmia. *Arch Ophthalmol* 1981;99:1614-1617.
- 132- Twining SS, Zhou X, Schulte DP, Wilson PM, Fish B, Moulder J. Effect of vitamin A deficiency on the early response to experimental pseudomonas keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:511-522.
- 133- Van Agtmaal EJ. Vitamin A and protein in tear fluid: A nutritional field survey on preschool children in Northeast Thailand [thesis]. Amsterdam, University Of Amsterdam, 1989.
- 134- Nikawa T, Ikemoto M, Kano M, et al. Impaired vitamin a-mediated mucosal iga response in IL-5 Receptor-Knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:546-549.
- 135- Katz DR, Drzymala M, Turton JA, et al. Regulation of accessory cell function by retinoids in murine immune responses. *Brit J Exp Pathol* 1987;68:343-350.
- 136- Katz DR, Mukherjee S, Malsey J, et al. Vitamin A acetate as a regulator of accessory cell function in delayed-type hypersensitivity responses. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:53-56.

- 137- Smith SM, Levy NS, Hayes CE. Impaired immunity in vitamin A-deficient mice. *J Nutr* 1987;117: 857-865.
- 138- Mathew JS, Sharma RP. Effect of all-trans-retinoic acid on cytokine production in a murine macrophage cell line. *Int J Immunopharm* 2000;22:693-706.
- 139- Matikainen S, Serkkola E, Hurme M. Retinoic acid enhances IL-1P expression in myeloid leukemia cells and in human monocytes. *J Immunol* 1991;147:162-167.
- 140- Dillehay DL, Walla AS, Lamon EW. Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *J Leuk Biol* 1988;44:353-360.
- 141- Trechsel U, Evequoz V, Fleisch H. Stimulation of interleukin 1 and 3 production by retinoid acid in vitro. *Biochem J* 1985;230:339.
- 142- Woo SH, Park IC, Park MJ, An S, Lee HC, Jin HO, Park SA, Cho H, Lee SJ, Gwak HS, Hong YJ, Hong SI, Rhee CH Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-Induced apoptosis through ros-mediated upregulation of CD95/Fas by nf kapa b activation. *Int J Cancer* 2004;112:596-606.
- 143- 8. Olson, J. L. (1996). Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J. Nutr.* 126:1208S-1212S.
- 144- Schwartz, J. L. (1996) The Dual role of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effect on tumor cell growth. *J. Nutr.* 126: 1221S–1227S.
- 145- Bergmanson JP: Corneal Damage In Photokeratitis: Why Is It So Painful? *Optom Vis Sci*, 1990;67(6): 407–13
- 146- Toshida H, Odaka A, Koike D, Murakami A, effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Curr Eye Res.* 2008 Jan;33(1):13-8
- 147- Ohashi Y, Watanabe H, Kinoshita S, Hosotani H, Umemoto M, Man-abe R. Vitamin A eyedrops for superior limbic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 1988;105:523–527.
- 148- Kasem A, McGuigan C, Heard C.M, Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. comparative and-oxidant activity towards DPPH Free Radic Res. 2005 May;39(5):491-8
- 149- Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH, Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol.* 1983 Mar;95(3):353-8.

- 150- Odaka A,1, Toshida H,2, Ohta T,2, Tabuchi N,3,4, Koike D,4, Suto C,3, Murakami A, Efficacy of retinol palmitate eye drops for dry eye in rabbits with lacrimal gland resection. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1585-93
- 151- Zhonghua Yan Ke Za Zhi, Research on effects of vitamin a palmitate on repair of mechanical corneal epithelial defects and conjunctival goblet cells in rabbits. 2010;Feb;46(2):151-60.
- 152- Khaper N, Qin Q, Singal P.K., Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. *Canada J Neurochem*. 1989 Feb;52(2):585-8.
- 153- Das NP, Effects of vitamin a and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *J Neurochem*. 1989 Feb;52(2):585-8.
- 154- Woo SH, Park IC, Park MJ, An S, Lee HC, Jin HO, Park SA, Cho H, Lee SJ, Gwak HS, Hong YJ, Hong SI, Rhee CH. Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of CD95/Fas by NfkappaB activation. *Int J Cancer* 2004;112:596-606.
- 155- Wright P. Topical retinoic acid therapy for disorders of the outer eye. *Trans Ophthalmol Soc UK*. 1985;104(8):869–874.
- 156- Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: A cytological evaluation. *Ophthalmologica*. 1997;211:358–361.
- 157- Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:1939–46
- 158- Clark RA, Valente AJ. Nuclear factor kappa B activation by NADPH oxidases. *Mech Ageing Dev*. 2004;125:799–810.
- 159- Shao DZ, Lee JJ, Huang WT, Liao JF, Lin MT. Inhibition of nuclear factor-kappaB prevents staphylococcal enterotoxin A-induced fever. *Mol Cell Biochem*. 2004;262:177–85.
- 160- Kim EC, Kim TK, Park SH, Kim MS. The wound healing effects of vitamin A eye drops after a corneal alkali burn in rats. *Acta Ophthalmol*. 2012 Nov;90(7)
- 161- Kastl PR, Rosenthal WN, Battle I, Karcioğlu Z. Topical vitamin A ointment increases healing of cataract incisions. *Ann Ophthalmol*. 1987 May;19(5):175-7, 180.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Caner FİLİZAY

Doğum Yeri ve Tarihi : ESKİŞEHİR 28.02.1985

Medeni Durumu : Bekar

Adres : Yaylacık Mahallesi 331 Sokak Silah Sitesi B Blok D:6
KIRIKKALE

Telefon : 0505 624 57 54

Fax : -

E-mail : mcfilizay02@hotmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - 2009

Görev Yerleri : -

Dernek Üyelikleri : Türk Oftalmoloji Derneği Ankara Şubesi

Yabancı Diller : İngilizce