

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL UVB IŞININA BAĞLI KORNEAL HASAR
MODELİNDE CITICOLINE İÇEREN DAMLANIN
ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR ÜZERİNDEN YARA
İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN VE HÜCRE SAĞKALIMINDAKİ
ROLÜNÜN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Ecem Önder Tokuç
Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

2019

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL UVB IŞININA BAĞLI KONEAL HASAR
MODELİNDE CİTİCOLİNE İÇEREN DAMLANIN
ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR ÜZERİNDEN YARA
İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN VE HÜCRE SAĞ KALIMINDAKİ
ROLÜNÜN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Ecem Önder Tokuç
Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

2019

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL**

**Etik Kurul Onayı: 18.10.2018 karar tarihli KOÜ/HADYEK 1/2-
2018**

ÖNSÖZ

Kliniğimiz ve üniversitemizin kurucularından olan, uzmanlık eğitimim boyunca tanımaktan onur duyduğum Prof. Dr. Yusuf Çağlar hocama teşekkür ederim.

Anabilim dalı başkanımız, tez öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, sevgi dolu yaklaşımı ile yanında kendimi daima güvende hissettiğim, kliniğe geldiğim ilk günden beri desteğini benden esirgemeyen, klinik deneyimi ve tecrübesiyle kendime örnek aldığım sevgili Prof. Dr. Nurşen Yüksel hocama çok teşekkür ederim.

Bilgi birikimi, tecrübesi ,hasta yaklaşımı , iş disiplini ile beni kendine hayran bırakan, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, tüm asistanlık sürecim boyunca bana olan güvenini hep hissettiğim ve yanında kendimi her zaman güvende hissettiğim, üzerimdeki emeklerini her zaman hatırlayacağım değerli Prof. Dr. Levent Karabaş hocama çok teşekkür ederim.

İş disiplini ve titizliği ile örnek aldığım kısa süre de olsa çalışma şerefine nail olduğum Prof. Dr. Özgül Altıntaş hocama teşekkür ederim.

Sabırlı ve sevgi dolu yaklaşımı ile her zaman desteğini hissettiren, kısa süre de olsa çalışma şerefine nail olduğum Prof. Dr. Berna Özkan hocama teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince her sorunumla bir abla şefkati ile ilgilenen, desteğini hep hissettiğim, ilk cerrahi deneyimlerimde yanımda olan ve sabırla kendimi geliştirmeme yardımcı olan değerli Dr. Öğr. Üyesi Dilara Pirhan hocama çok teşekkür ederim.

Asistanlık süreci ve sonrasında beraber çalışma fırsatı bulduğum sakinliği, sabrı ve sevgi dolu yaklaşımı ile her zaman çok sevdiğim Dr. Öğr. Üyesi Sevgi Subaşı hocama çok teşekkür ederim.

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım, Prof.Dr. Yusufhan Yazır ve Doc.Dr. Gökhan Duruksu ‘ ya teşekkür ederim. Birlikte çalışma fırsatı bulduğum Ahmet Öztürk ve Selenay Furat Rençber’e çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde beraber çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma destekleri için çok teşekkür ederim. Eğitimim süresince uyum içinde çalıştığım klinik hemşirelerine, sekreterlerine ve personeline de teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde şüphesiz en büyük emeğe sahip olan sevgili annem , kardeşim ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim babama çok teşekkür ederim

Öğrencilik ve asistanlık yıllarımda her zaman yanımda olan , en büyük destekçim , hayat arkadaşım Berkay’a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. AMAÇ VE KAPSAM.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kornea Anatomisi.....	2
2.1.1 Epitel Tabakası.....	3
2.1.2 Bowman Tabakası.....	4
2.1.3 Stroma Tabakası	4
2.1.4 Dua Tabakası.....	5
2.1.5 Descement Membranı.....	5
2.1.6 Endotel Tabakası	5
2.2 Gözyaşı Film Tabakası.....	6
2.3 Kornea Fizyolojisi.....	6
2.3.1 Korneanın Şeffaflığının Korunması ve Stromal Hidrasyon	6
2.3.2 Korneanın Bariyer Fonksiyonu	7
2.3.3 Korneanın Metabolizması	7
2.3.4 Korneal inervasyon	7
2.4 Korneanın Hasarlanması ve Yara İyileşmesi.....	8
2.4.1 Epitel	8
2.4.2 Stroma	8
2.4.3 Endotel ve decement membranı.....	9
2.4.4 Yara İyileşmesinin Endojen Modülasyonu.....	9
2.5 Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri	12
2.5.1 Serbest Radikaller	12
2.5.1.1 Reaktif Oksijen Ürünleri ve Serbest Radikaller	12
2.5.1.1.1 Serbest Radikal Kaynakları (131).....	13
2.5.1.1.1.1 İç Kaynaklar	13
2.5.1.1.1.2 Dış kaynaklar	13
2.5.1.1.1.3 Fizyolojik Faktörler	13
2.5.1.1.2 Serbest radikal çeşitleri.....	13
2.5.1.1.2.1 Hidroperoksil radikali	13

2.5.1.1.2.2 Süperoksit	14
2.5.1.1.2.3 Hidrojen Peroksit.....	14
2.5.1.1.2.4 Tekli oksijen	14
2.5.1.1.2.5 Üçlü oksijen	14
2.5.2 Antioksidanlar	15
2.5.2.1 Enzimatik ve Peptid Yapılı Antioksidan Savunma Sistemleri.....	15
2.5.2.1.1 Superoksit dismutaz (SOD)	16
2.5.2.1.2 Katalaz	17
2.5.2.1.3 Glutasyon sistemleri	17
2.5.2.1.4 Askorbik Asit	17
2.5.2.1.5 Glutasyon (GSH).....	18
2.5.2.1.6 Melatonin.....	18
2.5.2.1.7 Tokoferoller ve Tokotrienoller (E Vitamini).....	18
2.5.2.1.8 Ürik asit	19
2.6 Ultraviyole Radyasyonun Teknik Özellikleri ve Kornea Üzerine Etkisi.....	19
2.6.1 Korneanın Oksidatif Hasarında Gözün UVB Işınlamasının Rolü, Kornea Optik Özelliklerinde Değişiklikler.....	20
2.6.2 Fotokeratit	22
2.7 Citicoline Etki Mekanizması.....	22
2.7.1 Farmakoloji ve Etki Mekanizması	22
2.7.1.1 Farmakokinetik	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Denekler.....	25
3.2 Çalışma Dizaynının Oluşturulması.....	25
3.3 Model Oluşturulması ve Çalışma Dizaynı.....	28
4. KLİNİK BULGULAR	29
5. HİSTOLOJİK - BİYOKİYASAL BULGULAR VE GEN EKSPRESYON ANALİZİ	33
5.1 Materyal-Metod	33
5.1.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom Boyamaları	33
5.1.1.1 H&E.....	33
5.1.1.2 MT	33
5.1.2 İmmün floresan boyamalar	34
5.1.3 Gen Ekspresyon Analizi	34
5.1.4 Toplam Protein Miktarının Ölçümü	35
5.1.4.1 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü.....	36

5.1.4.2 Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddelerin (TBARS) Ölçümü.....	36
5.1.4.3 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi	37
5.1.4.4 Glutathionin Miktarının Tayini	37
5.1.5 İstatistiksel Analiz	37
5.2 Bulgular	38
5.2.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom	38
5.2.2 İmmünfloresan incelemeler.....	43
5.2.3 Biyokimyasal incelemeler	48
5.2.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	48
5.2.3.2 Glutatyon (GSH)	49
5.2.3.3 Katalaz (CAT)	50
5.2.3.4 Malondialdehit (MDA)	51
5.2.4 Gen ekspresyon analizi	52
5.2.4.1 İnterlökin 1 beta (IL-1b).....	52
5.2.4.2 Transforme büyüme faktörü beta (TGF b)	53
5.2.4.3 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF A)	54
6.TARTIŞMA	55
7. SONUÇLAR	61
8. ÖZET.....	63
9. ABSTRACT	64
KAYNAKLAR.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ca+2 : Kalsiyum İyonu

CAT: Katalaz

CCT: Kolin Fosfat Sitiltil Transferaz

CDP-kolin, CDPCho : Sitidin-5'-difosfokolin

CK: Sitidin Kinaz

CMP: Sitidin 5 'Monofosfat

CoQ10: Koenzim Q10

CTP: 1,2-Diasilillicerol Kolin Fosfotransferaz

Cu : Bakır

DETAB: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi

EGF: Epitel Büyüme Faktörü

GSH : Glutasyon

GSH-Px : Glutasyon peroksidaz

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

HMF: Heksoz Monofosfat Yolu

HO₂ : Hidroperoksil radikali

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL: interlökin

KGF: Keratosit Büyüme Faktörü

MDA : Malondialdehid

MAPK : Mitojenle aktifleştirilen Protein Kinaz

NADPH : Nikotin Amid Dinukleotid Fosfat

NGF : Sinir Büyüme Faktörü

O₂- : Süperoksit Radikali

OH- : Hidroksil Radikali

1O₂ : Tekli Oksijen

3O₂ : Üçlü Oksijen

PC: Fosfotidilkolin

PDGF: Trombosit Büyüme Faktörü

PI-3K : Fosfatidilinositol 3-kinaz

PKC: Protein kinaz C

PtdCho : Fosfolipit

RO- : Alkoksi

ROO- : Peroksi

ROS: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

TBARS: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler

TGF: Transform Büyüme Faktörü

TNF: Tümör Nekroz Faktörü

UV: Ultraviyole

UVA: Ultraviyole A

UVB: Ultraviyole B

UVC: Ultraviyole C

X . : Radikal

Zn : Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı

Şekil-1: Citicoline Kimyasal Yapısı

Şekil 2: Işık kaynağının mekanizması

Şekil 3:Tasarlanan sistem

Şekil 4 : Odaklanmış spot çapı

Şekil 5: Ultraviyole ışık spektrumu

Şekil 6: Model Oluşturulması(1)

Şekil 7: Model Oluşturulması(2)

Şekil-8: Epitel defektinin hesaplanması

Şekil-9: Grupların 1. ve 2. vizitteki epitel defekti büyüklüğünün takibi

Şekil-10: Grupların 1. ve 2. vizitteki korneal yüzel düzensizliği ve opasite büyüklüğünün takibi

Şekil-11: H&E boyama uygulanan kornea kesitleri

Şekil-12 : UVB grubuna ait H&E boyama uygulanan kornea kesitleri

Şekil-13: Masson Trikrom boyama uygulanan kornea kesitleri

Şekil-14: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri (MMP-9)

Şekil-15: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri (MMP-2)

Şekil-16: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri (VEGF)

Şekil-17: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri (Kaspaz-3)

Şekil-18: Süperoksit dismutaz biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (1)

Şekil-19: Süperoksit dismutaz biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (2)

Şekil-20: Glutatyon biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (1)

Şekil-21: Glutatyon biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (2)

Şekil-22: Katalaz biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (1)

Şekil-23: Katalaz biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (2)

Şekil-24: Malondialdehit biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (1)

Şekil-25: Malondialdehit biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması (1)

Şekil-26: IL1-b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil-27: IL1-b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması (2)

Şekil-28: TGF-b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil-29: TGF-b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması (2)

Şekil-30: VEGF gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil-31: VEGF gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması (2)

TABLolar DİZİNİ

Tablo Numarası ve Başlığı:

Tablo-1: 1. ve 2. vizitteki epitel defekti ölçümleri ve p değerleri

Tablo-2: 1. ve 2. Vizitteki opasite ölçümleri ve p değerleri

Tablo-3: Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerler ve Dizi Bilgisi

Tablo-4: Histopatolojik Derecelendirme

Tablo-5 : Kontrol grubu histopatolojik skorlama

Tablo-6: Citicoline grubu histopatolojik skorlama

Tablo-7 : UVB+ citicoline grubu histopatolojik skorlama

Tablo-8: UVB grubu histopatolojik skorlama

Tablo-9 : Grupların histopatolojik skorlamalarının istatistiksel karşılaştırılması

Tablo-10: UVB+ Citicoline grubu ile UVB grubunun histopatolojik skorlamalarının istatistiksel karşılaştırılması

1. AMAÇ VE KAPSAM

Ultraviyole (UV) ışınları , güneş ışığı spektrumunun bir kısmını oluşturmaktadır ve gözde radyasyon hasarının en yaygın nedenidir. Kornea, ultraviyole B (UVB) radyasyonunun çoğunu engellemenin fizyolojik yeteneğine sahiptir ve gözün iç tabakalarını UVB ile indüklenen fototoksisite ve oksidatif hasara karşı korur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, UVB'nin% 92'sinin ve ultraviyole A (UVA) radyasyonunun % 60'ının, kornea tarafından emildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, UVB radyasyonuna aşırı maruz kalmanın korneal etkileri arasında fotokeratit, epitelyumda hasar, ödem ve DNA modifikasyonu, protein çapraz bağlanması , reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretilmesi enzim inaktivasyonu ve üretimi dahil olmak üzere bir dizi biyokimyasal değişiklik sayılabilir (1-2).

Birçok çalışma, doğal antioksidanların, UVB ile indüklenen korneal patolojinin, özel etkileşimleri ve sinerjizmi nedeniyle önlenmesinde ve iyileştirilmesinde etkili olduğunu bildirmiştir (3). Korneal hasarın önlenmesi ve tedavisi için önemli bir savunma mekanizması, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve azalan lipid peroksidasyonu gibi endojen antioksidan enzimlerin seviyelerini artırarak reaktif metabolitlerin üretimini azaltmayı içerir (4).

Bazı çalışmalarda UVB ışınlarının kornea üzerinde oluşturduğu tahribatın, koenzim Q10 (Ubiquinone Q10, CoQ10) gibi antioksidan ve mitokondriyal fonksiyonu koruyucu rolü olan terapötiklerin epitel hasarı sonrası korneal yara iyileşmesini modüle edip yardımcı olabileceğini göstermiştir (5).

Cytidine-5'-difosfokolin (CDPcholine, CDPCho) veya Citicoline, doğal bileşikle özdeş bir farmasötik maddedir ve fosfolipid sentezinde önemli bir role sahiptir. 1950'li yıllarda Kennedy ve arkadaşları , citicoline'ın hücre membranının en önemli fosfolipidlerinden biri olan fosfatidilkolin (PC) öncüsü olduğunu gösterdi . Fosfolipidler, hücre devresinin ana bileşenlerinden olup, yüksek bir devir hızına sahiptir, bu nedenle bu maddelerin sürekli sentezi, hücrenin optimal yapısını ve işlevini sağlar. CDP-Kolin, riboz, pirofosfat, sitozin ve kolin'den yapılan bir mononükleotiddir (6).

Citicoline, hücre zarı fosfolipidlerinin biyosentezinde bir ara ürün olarak işlev gören doğal olarak oluşan bir bileşiktir. Citicoline tedavisi serebral iskemi ve karaciğer toksisitesi gibi oksidatif stresin rol oynadığı mekanizmalarda başarılı bir ajan olarak gösterilmiştir. Citicoline ' in , oksidatif stresi azaltarak ve mitokondriyal fonksiyonu koruyarak iskemi- reperfüzyon hasarını azalttığı belirtilmiştir (7-8).

Citicoline , aşağıdaki gibi birkaç mekanizma ile nöroproteksiyon ve antioksidan aktiviteye katkıda bulunur : Sfingomiyelin ve kardiyolipin seviyelerini korur (iç mitokondriyal membranın yapısını oluşturan ana membranlar), hasara bağlı dūřen PC seviyelerini arttırır , glutasyon redüktaz aktivitesini ve glutasyon sentezini arttırır, lipit peroksidasyonunu azaltır , Na⁺ / K⁺ + ATPaz aktivitesini arttırarak hücrenin enerji döngüsünü korumasını sağlar (9).

Citicoline, beyin iskemisi, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve glokom, non-arterik iskemik nöropati ve ambliyopi gibi oküler hastalıklarda umut verici bir terapötik ajan olarak çalışılmıştır (9).

Citicoline içeren göz damlaları (OMK1®, Omikron Italia,) hücre yenileyici ve hücreyi oksidatif hasara karşı koruyucu ve nöroprotektif mekanizmalarından faydalanılarak glokom , retinal dejenerasyon , ambliyopi gibi çeşitli spektrumdaki hastalıklarda tedavi edici ajan olarak kullanılmıştır.

Citicoline içeren göz damlasının UVB ışınına bağlı korneada oluşan inflamasyonu ve artan ROS 'u; hücrenin enerji döngüsünün temeli olan mitokondriyal yapıyı koruyarak ve hücre membran fosfolipidlerinin devamı sağlayarak , antioksidan enzim seviyelerini arttırarak geri çevirebileceğini dūřünmekteyiz. Bu hipotezimizi klinik, histopatolojik ve immünhistokimyasal verilerle destekleyebilirsek ultraviyole ışınlarına bağlı korneal yaralanmalarda citicoline ajanı terapisi rutin tedavi modaliteleri arasına girmeye aday olabilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kornea Anatomisi

Kornea, gözün ön tarafında, hafifçe çıkıntılı kısmını oluşturur. Kornea, gözün iç kısmını enfeksiyondan koruyan yapısal ve fonksiyonel olarak gözün birincil bariyeridir. Gözyaşı sıvısı ile birlikte, refraksiyon için pürüzsüz bir yüzey sağlar ve gözün toplam kırılma gücünün neredeyse üçte ikisine katkıda bulunur. Korneanın kalınlığı merkezde 520 µ, periferde 650 µ'dir. Yetişkinlerde, korneanın ortalama yatay çapı 11.5 ila 12 mm (10) iken, dikey çap yaklaşık 10.5-11 mm kadardır (11). Korneanın şekli optik fonksiyonunun temel belirleyicisidir ve ortalama 43 diyoptrilik bir kırıcılığa sahiptir. Korneanın şeffaf yapısı hem doku detaylarının hem de doku fizyolojisinin sonucunda oluşmaktadır.

Kornea mikroskobik olarak 6 anatomik katmandan oluşmaktadır.

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

2.1.1 Epitel Tabakası

Korneal epitel, gözün dış ortama karşı ilk engelini temsil eder. Keratinize olmayan skuamöz tiptedir ve embriyolojik ektodermden türemiştir. Kornea epiteli 5-7 sıra tabaka hücreden oluşmaktadır. Epitel yaklaşık 50 um kalınlığında ölçülür ve sklera'yı kaplayan konjonktival epitelyum ile devam eder (12). Gözyaşı sıvısının kaplama işlevi ile anatomik ve fonksiyonel birim tamamlanır.

Diğer epitel hücreleri gibi korneal epitel de sürekli yenilenme ile korunur (13). Epitel tabakası 3 çeşit hücreden oluşmaktadır. Bu hücreler yüzeyden derine doğru yüzeyel hücreler, kanatsız hücreler ve bazal hücreler olarak sıralanabilir. Bazal hücreler çoğalarak ve farklılaşarak yüzeye doğru göç eder. Epitel hücrelerinin ortalama ömrü 7 ila 10 gündür (14). Bazal hücrelerin farklılaşmasının tamamlanmasından sonra, invazyon, apoptoz ve deskuamasyon gerçekleşir. Epitel tabakasında en üstteki hücreleri arasındaki sıkı birleşme kompleksleri, gözyaşı sıvısının korneaya difüzyonunu önler. Bu fiziksel bariyer, klinik pratikte (florescein veya rose bengal) kullanılan normal boyalara karşı, aynı zamanda toksinlere ve mikroplara karşı da etkilidir. Bu, yarı geçirgen, yüksek dirençli (12–16 kohms / cm²) bir zar olarak işlev gören sıkı bağlantılar, zonula tıkanıklıkları ile gerçekleştirilir (15). Skuamöz hücrelerin yüzeyel katmanlarının altında 2-3 kanatlı hücre tabakası bulunur. Bu hücreler daha az düzdür ancak aynı sıkı yan bağlantılara sahiptir. Epitelin bazal hücreleri, bölünebilen (limbal hücrelerin dışında) tek hücre kümesini oluşturmaktadır (16). Bazal hücreler, kanat hücrelerinin kaynağıdır ve zonula adherens ile birbirine bağlanırlar. Bazal hücreler, üstteki hücrelere destek sağlayan ve epiteli komşu katmanlara bağlayan temeldeki taban zarını üretirler. Bazal membran yaklaşık 0.05 um kalınlığındadır ve çoğunlukla kolajen tip IV ve laminin içerir. Bazal hücrelerin kaynağı ve dolayısıyla epiteldeki tüm hücreler limbusun kök hücre rezervi içindeki kornea çevresine lokalize olmuştur. Bu alandaki hücreler merkezi korneaya doğru göç eder ve yavaş yavaş mitotik kapasitelerini kaybeder ve geçici olarak yükselen hücreler ve bazal hücrelere dönüşür.

Limbal epitel yaklaşık 10 ila 12 hücre tabakası kalınlığında bir vasküler dokudur. Limbal stroma ve epitel, Vogt Palisadları adı verilen radyal fibro-vasküler yapıda düzenlenmiştir (17). Bu palisadlar en çok üst ve alt korneada tanımlanmıştır, ancak korneanın tüm çevresinde mevcuttur.

2.1.2 Bowman Tabakası

Bowman tabakası yaklaşık 15 um kalınlığındadır ve kollajen tip I, III ve V liflerinden ve epitelyum-stroma etkileşimine aracılık eden diğer hücresel bileşenlerden oluşur (18). Gelişim sırasında, hem epitel hücreleri hem de keratositler tarafından ardışık olarak bulunur (19). Stromaya mikrobiyal invazyonu önlemek için biyolojik bir bariyer oluşturur. Aynı zamanda keratositlerin stromadan yayılmasını da önleyebilir (20). Yaralandığında rejenere olmaz ve bir skar oluşturabilir.

2.1.3 Stroma Tabakası

Korneal stroma veya substantia propria korneal kalınlığın çoğunluğunu temsil eder (kornea kalınlığının% 80-85'i). Primer korneal stroma epitelyum tarafından salınırken sekonder stroma keratinosit aktivitesinin sonucudur. Stromanın yapısı, doğal mühendisliğin eşsiz bir örneğidir. Stromadaki lif oluşturuçu kollajen (esas olarak kollajen tip I, III ve V), fibriller olarak adlandırılan paralel demetlerde düzenlenir; paralel fibriller lamel oluştururlar. Bu paralel yapılanma korneanın şeffaflığını sağlamaktadır. Bu lamellerin 200'den fazlası stroma kütesini oluşturur ve görevleri şunlardır: 1) kornea kurvatürünü korumak ve göz içi basıncına karşı koymak , 2) ışık saçılmasını en aza indirmek. Korneanın periferinde stroma daha kalındır ve kollajen fibrilleri limbus 'a yakın bir çevresel yönelimle ilerler (21).

Stromal yaralanmada keratositler yaralanan bölgeye göç edip fibroblastlara dönür ve kollajen üreterek skara sebep olurlar (22,23). Glikozaminoglikanlar; fibriller arası mesafeleri doldurmakta ve anyonik bir ortam oluşturarak katyon ve su bağlamaktadır. Bu ara maddenin su tutulumunu artırmasının fibriller arası açıklığı ve kornea kalınlığını artırarak kornea ödeminde rol oynadığı düşünülmektedir. (22).

2.1.4 Dua Tabakası

Lameller kornea cerrahisi üzerine çalışmaları olan Harminder Dua tarafından yakın zamanda keşfedilen bir tabakadır. Korneanın stroma ve descement katları arasında $10.15_{-}+3,6\mu\text{m}$ 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 (24).

2.1.5 Descement Membranı

Stromanın arka sınırı ile endotel arasında uzanan bir tür basal laminadır. Descement membranı, endotel tabakasındaki hücreler tarafından sürekli salgılanır. Ön tabaka doğumdan önce salgılanır ve kesin bir organizasyona sahip gibi görünürken, doğumdan sonra salgılanan kısım daha amorfudur (25,26). Katman yaşla birlikte 10 um kalınlığa ulaşabilir.

2.1.6 Endotel Tabakası

Endotel hücreleri, korneanın arka tarafında bir tek tabaka oluşturur. Mezenkimal kökenlidirler ve stromadaki uygun hidrasyon seviyesini korumada çok önemli bir rol oynarlar. Endotel hücreleri spesifik bir poligon şekline sahiptir, düzleşir ve birbirine sıkıca bağlıdır. Ana hücresel işlevi, ön kamaradaki stromadan aköz humore karşı bir ozmotik gradyanın üretilmesidir. Bu gradyan, saydamlığı korumak için aköz humorun stromadan uzaklaştırılmasını kolaylaştırır (27,28). Korneal periferde, endotel, trabeküler ağ örgüsü hücreleriyle birleşir. Endotelyal hücreler bölünmemesi nedeniyle, sayıları, yaşam boyunca, ortalama olarak, yaklaşık 3500 hücre / mm^2 'lik başlangıç yoğunluğundan 20 hücre / yıl ile azalır (29,30). Fonksiyonu korumak için gereken minimum hücre sayısının, yaklaşık 500 hücre / mm^2 olduğu öne sürülmüştür (31). Bu ilerleyici hücre kaybı, travma, enflamasyon ve diğer hücresel stresörlerle şiddetlenir. Yüzeyi örtmek ve hücresel bariyeri korumak için endotel hücreleri göç eder ve / veya büyür.

2.2 Gözyaşı Film Tabakası

Oküler yüzey ve korneal epitel, yaklaşık 4 - 11 um'lik koruyucu bir gözyaşı sıvısı filmi ile kaplanır. Bu gözyaşı filminin fonksiyonları arasında; kapaklar ve oküler yüzeyler için kayganlık , antibakteriyel koruma, oküler yüzeyden yabancı maddelerin temizlenmesi, korneal epitelinin beslenmesi , ışık kırılması için düzgün bir yüzey sağlamak yer almaktadır (32,33). Gözyaşı sıvısı, birbiriyle yakın etkileşim içinde olmak üzere üç tabaka halinde yapılandırılmıştır:

- 1) Lipit tabaka: en dış tabakadır göz yaşını buharlaşmasını engeller. Meibomian, Zeiss ve Moll bezleri tarafından salgılanır.
- 2) Aköz tabaka: Lakrimal gland, Krause ve Wolfring bezlerinden salgılanır.
- 3) Müsin tabaka: epitel ile gözyaşı film tabakası arasındadır. Goblet hücrelerinden kaynaklanır.

2.3 Kornea Fizyolojisi

2.3.1 Korneanın Şeffaflığının Korunması ve Stromal Hidrasyon

Ana görsel işlev, kornea'nın saydamlığı ve şekli ile gerçekleştirilir. Şeffaflık, epitelin bariyer fonksiyonu, korneal stroma özel yapısı ve stromadan endotel pompalarının aktivitesi boyunca sürekli olarak sıvı alınması arasındaki işbirliği ile elde edilir ve sürdürülür. Kalınlıklarının a olması nedeniyle Bowman tabakası ve Descemet membranı ışık saçılmasına katkıda bulunmaz. Epitel, bir bariyer oluşturarak şeffaflığın korunmasına katkı sağlar. Bu bariyer fonksiyonu, tabakaların fizyolojik bütünlüğüne bağlıdır ve epitelyal sıkı bağlantılar ve epitel hücrelerinin sürekli yenilenmesi ile devam eder. Korneanın şeffaflığı; stromadaki kollajen fibrillerinin mükemmel dizilimi ve korelasyonu sonucudur (34).

Endotel hücrelerinde bulunan $Na^+ / K^+ ATP$ -ase ve karbonik anhidraz aktivitesi sayesinde korneanın aktif dehidratasyonu sağlanmış olur. Korneanın şeffaflığının korunmasındaki ana faktörleri özetleyecek olursak;

- 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 (35)

2.3.2 Korneanın Bariyer Fonksiyonu

Oküler yapıdaki ilk tabaka olarak kornea, gözün şeklini belirleyici ve koruyucu bir dokudur. Daha önce de belirtildiği gibi, korneanın kuvveti stromal kollajen tarafından sağlanır, koruyucu fonksiyonların geri kalanı korneal epitelyum tarafından desteklenir. Epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ; mikroorganizmalar, elektrolitler ve en önemlisi su için çok etkili bir bariyerdir (36). Dışarıdan gelen çeşitli stres faktörlerine karşı birincil korumadan kornea epiteli sorumludur. Buna örnek olarak UV radyasyonu verilebilir. Epitelyal hücreler 310 nm ve daha kısa UV dalga boylarını absorbe eder ve iç tabakalara geçişi önlenir (37). Daha uzun dalga boyları lens tarafından absorbe edilir ve retinada UV ile indüklenen hasarı önlenir (38). Ek olarak gözyaşının bariyer fonksiyonu ve epitel tabakası beraber mikroorganizmalara karşı engel oluşturmaktadır. Kornea enfeksiyonlarının çoğu, bu bariyeri zayıflatan olaylar, örneğin: iltihaplı reaksiyonlar veya epitelyumun değişken travmaları ile mümkün olur. Önemli istisnalar viral enfeksiyonlardır.

2.3.3 Korneanın Metabolizması

Kornea şeffaflıktan ödün vermeyeceğinden, kan dolaşımına sahip değildir. Kornea beslenmesi için gerekli olan glukozun %90 ını aköz humorden geri kalan % 10 unu ise limbal damarlar ve gözyaşı tarafından sağlamaktadır. Korneada glukoz üç metabolik yol; TCA siklusu, anaerobik glikoliz ve heksoz monofosfat yolu (HMF) ile metabolize edilir. HMF yolu sırasında üretilen NADPH ortamdaki serbest radikallerin uzaklaştırılması için gerekli olan sistemler tarafından kullanılır.(39)

Korneanın oksijen gereksinimi havadan ,gözyaşından ve aköz humorden sağlanmaktadır. Oksijen, glukoz TCA siklusunda metabolize olurken kullanılmaktadır. Hücrenin enerji ihtiyacına göre glikolitik yol veya TCA siklusu seçilebilir. Oksijen superoksit oradan da hidrojen peroksit çevrildiğinde hücre için son derece hasar verici olmaktadır. 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 (35).

2.3.4 Korneal inervasyon

Korneal sinir liflerinin çoğu duyusaldır ve trigeminal sinirin oftalmik dalından çıkar (40). Kornea ayrıca otonom sempatik ve parasempatik innervasyon içerir (41,42). Miyelinsiz

sinir demetleri, stromayı kollajen lamelleri ile paralel olarak radyal bir şekilde girer ve daha sonra epitele doğru ilerler, Bowman zarını ve bazal epitelyal tabakanın altındaki alt-bazal sinir plexusundan perforer eder (43,44). Lifler buradan tek tek ayrılarak yüzeyel epitele doğru ilerler. Buradan, tek tek lifler yüzeyel katmanlarda durmak için epitelyumu ayırır ve nüfuz eder.

2.4 Korneanın Hasarlanması ve Yara İyileşmesi

2.4.1 Epitel

Korneanın en dış tabakası olan epitel zarar görmesi en muhtemel hücre popülasyonudur. Ancak, aynı zamanda en hızlı şekilde iyileşen ve en etkili şekilde yaralanma öncesi yapıya ve fonksiyona geri dönen katmandır. Nadir de olsa epitel iyileşmesi yavaş olan bir çeşit yaralanma ile tehlikeye girer. Bu durum, alkali yanıkları (45), enfeksiyonlar (46) veya diyabetik nöropati ile ilişkili yaralarda (47) oluşabilir. Bu şartlar altında risk altındaki en önemli yapılar, korneanın daha savunmasız, daha derin yapılarıdır. Neyse ki, epitelyal yaralanmaların çoğunluğu, hızla ve sorunsuz olarak iyileşir. Korneal epitel yara iyileşmesi spesifik fizyolojik fonksiyonlarla dört evreye ayrılabilir (48). İlk aşama latent evre olarak adlandırılır. Bu evrede hücre hareketi ve hücre sayısında değişiklik yoktur (49). Bu süre zarfında metabolik aktivitede bir artış ve bir sonraki faz için hazırlıkta hücre yapısının yeniden düzenlenmesi vardır (50). İkinci faz migrasyon fazıdır. Bunu proliferasyon aşaması izler. Bu aşamada hücreler bölünmeye ve farklılaşmaya başlayarak restorasyonu sağlarlar (51,52). Son faz, hareketli olmayan epitelde bulunan hücre substrat eklerinin geri dönüşüdür (53). Genellikle, bir sonraki faz önceki fazın tamamlanmasından önce başlayacak, ancak fazların sırası korunacaktır.

2.4.2 Stroma

Stromal yara iyileşmesi, keratositlerin transformasyonu, fibroz materyal üretimi ve dokunun yeniden düzenlenmesini içerir (54). Stromanın yaralanmaya yanıtı, stroma şişmesi, fibroblastların ve enflamatuar hücrelerin invazyonu ile başlar ve bu durum etken stromaya temas etmese bile oluşabilir (55,56). İşlemin erken dönemlerinde lökositler, konjonktival damardan yara bölgesine taşınırlar. Lökositler enfeksiyona karşı koruma sağladıkları gibi aynı zamanda doku hasarına da katkıda bulunabilmektedirler (56,57). Ayrıca, iyileşmenin geliştirilmesinde rol aldıklarını gösteren kanıtlar da vardır (58). Yaralanma bölgesine en yakın keratositler fibroblastlar veya miyofibroblastlar olmak üzere aktive edilirler (59,60). Bu transforme hücreler daha sonra yaraya göç eder ve defekti doldurmak için fibrotik materyal olarak birikirler (61,62). Bu yeniden yapılanma korneanın şeffaflığını azaltan ve kırıcılığının değişmesine sebep olan bir opaklaşma ile sonuçlanabilmektedir.

Transforme olan keratositlerin sayısı, yara doldurulduktan ve tadilat aşaması gerçekleştikten sonra azalmaya başlar. Ancak korneanın şeffaflığı geri kazanmak için kollajenin yeniden yapılanma süreci yıllar boyunca devam edebilir (60). Yeniden yapılanma sürecinde yapıcı ve yıkıcı ajanların dengesine, matriksmetalloproteinaz (MMP) lara ve yaranın derecesine bağlı olarak stromal iyileşme; normal stromal yapı, bir opak skar, stromal erime veya neovaskülarizasyon ile sonuçlanabilir (63,64). Stromal yara iyileşmesi, enflamatuvar hücrelerin varlığında yarayı fibröz doku ile tamir eden transforme keratinositleri içerir ve görmenin azalmasına neden olabilir.

2.4.3 Endotel ve decemet membranı

Endotel yara iyileşmesi, sağlam kalan hücrelerin yeniden düzenlenmesi ve yeni bir bazal membran salgılanması ile sınırlıdır. Endotel penetran yaralanmalar, trans-korneal insizyonlar veya aşırı kornea distorsiyonu nedeniyle hasar görebilir (11). Endotel hasarı, ön kamara sıvısının stromaya geçmesine sebep olabilir. Bu durum stromanın şeffaf yapısının bozulması ve kalınlığının artmasıyla sonuçlanabilir (65). İnsan gözünde endotel hücre kaybı meydana geldiğinde, yara yerine bitişik sağlam endotel hücrelerin göçü ve kalan hücrelerin daha büyük bir yüzey alanı kaplayacak şekilde genişletilmesiyle doldurulur (66,67). Endotel hücre göçü altı saat içinde başlar ve yaklaşık 1 mm / gün ilerler (68,69). Endotelyumun arka stroma üzerinde yeniden şekillendiği bir hafta içinde, normal fonksiyonlar geri kazanılır ve olası şişliğin azalmasıyla sonuçlanır (68). Descemet membranının hasarlanması durumunda endotel hücreleri yeni bir bazal membran oluşturacak şekilde yeniden şekillenir (70). Endotel yara iyileşmesi tamamen insan gözündeki hücre göçü ile normal fonksiyona sahip olup, alanın hücreler tarafından kaplanmasından birkaç gün sonra geri döner.

2.4.4 Yara İyileşmesinin Endojen Modülasyonu

Korneal yara iyileşmesi, çok sayıda sinyal yolu ve süreci tarafından modüle edilen, oldukça karmaşık ve sıkı bir şekilde koordine edilmiş bir fizyolojik cevaptır. Yaralanma sırasında salınan sitokinler, yaranın iyileşmesi yanıtının, özellikle de interlökin (IL) 1 ve IL-6'nın düzenlenmesinde kilit bir rol oynar. Bu sitokinler, Epitel Büyüme Faktörü (EGF), Kerosit Büyüme Faktörü (KGF), Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), Transform Büyüme Faktörü (TGF) ve Trombosit Büyüme Faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu etkileyebilir (71). Bu büyüme faktörleri ve sitokinler birlikte apoptoz, göç, çoğalma ve farklılaşma iyileşme süreçlerini düzenler.

Yara iyileşmesi sürecinde yer alan epitelyal hücre içi sinyal yolları Mitojenle aktifleştirilen Protein Kinazlarının (MAPK), Fosfatidilinositol 3-kinazın (PI-3K), Rho ailesinin ve Protein Kinaz C'nin (PKC) aktivasyonunu içerir (51,72,73). Yaranın kapatılması ayrıca proteazların aktivasyonunu, hücre dışı matris proteinlerinde değişiklik yapılmasını ve nöral faktörlerden etkilenmeyi içerir (51). Böylece kornea epitelindeki yara iyileşmesi, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, matris proteinleri ve proteazlar tarafından düzenlenir.

Sitokinler kornea epitel hasarını takiben serbest bırakılır ve iyileşme yanıtını başlatıyor gibi görünür. Epitel yaralandığında IL-1, IL-6 ve TNF- α eksprese edilir (74). IL-1 ve IL-6 seviyelerinin, hasarın ciddiyeti ile orantılı olduğu bulunmuştur (74). IL-6, fibronektin için integrin reseptörünün regüle edilmesiyle epitel hücre göçünü kolaylaştırır ve ayrıca aktive keratositler tarafından fibrotik materyal üretimini etkileyebilir (61,75). IL-1'in HGF ve KGF seviyelerini yükseltmesine ek olarak EGF ile sinerjistik olarak yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir (76,77). IL-1 ayrıca MMP üretimi, keratosit apoptoz ve lökosit infiltrasyonu gibi diğer stromal değişiklikleri de uyarır (78,79). Anjiyojenik ve nötrofil kemotaktik faktör IL-8, ayrıca IL-1 tarafından da düzenlenir (80,81). IL-1'den daha az oranda olmak üzere , epitelde yaralanma, IL-8'i benzer şekilde düzenleyen TNF-a ekspresyonunu artırır, apoptozu teşvik eder, lökositleri hasar bölgesine yönlendirir ve epitel iyileşmesini etkileyebilir (74,82- 85). Böylece epitel yaralanmasının ardından salınan sitokinler epitel göçünü teşvik eder, büyüme faktörlerini artırır ve stromal iyileşme sürecine aracılık eder.

Epitel yaralanmasına cevap olarak veya sitokin stimülasyonunu takiben serbest bırakılan büyüme faktörleri, hücre mitoz ve göç oranlarını artırır. HGF, KGF ve bunların epitel reseptörleri, IL-1'e cevap olarak düzenlenir, bu da epitel hücre çoğalmasını artırır (86,87).

Sinir büyüme faktörü (NGF) de yaralanmayı takiben miktarı artan moleküllerdendir ve epitelyal proliferasyon ve farklılaşmayı arttırdığı gösterilmiştir (88,89). EGF, iyileşme sürecinde miktarı artan ancak lakrimal bezde ve korneal epitelde düşük seviyelerde reseptör ekspresyonuna sahip olan kornea epitelinin bir mitojenidir (87,90,91). Reseptör ekspresyonu yaralanma sonrası değişmeden kaldığı için, artmış aktivasyon gözlenirse de, EGF'nin rolünün onarımdan ziyade epitelyal homeostazla daha fazla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (87,92). EGF ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında, heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF) ve TGF- α , yara iyileşmesinde miktarı artar , ancak sadece epitel hücre göçünü arttırdığı ve farklılaşmayı önlediği in vitro olarak gösterilmiştir (86,93). Benzer şekilde, epitelyal göçü teşvik eden epitelde salınan PDGF'dir ve bu ayrıca stromal keratositlerin göç etmesini ve çoğalmasını uyarır (94-96).

TGF- β üretimi de epitelde lokalizedir, ancak bazal membran zarar gördüğünde stromaya girer ve keratosit fenotip değişimini etkiler (97,98). TGF- β aynı zamanda, EGF, KGF ve HGF'nin korneal epitelde mitojenik etkisini de artırır. Bu şekilde TGF- β ' nın göç eden epitel hücrelerinde proliferasyonu lokal olarak inhibe ettiği düşünülmektedir (99). Dolayısıyla, hasarla artış gösteren büyüme faktörleri, stromal tepkiye etki etmenin yanı sıra epitelyal göçü teşvik eder ve proliferasyonu modüle eder (100,95). Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin hücre zarı reseptörlerine bağlanması, iyileşme sırasında hücrenin tepkisini yönlendiren hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Epitel EGF reseptörlerinin yaralanmasının uyarılmasının ardından, MAPK ve PI-3K hücre içi sinyal yollarını başlatırken, bu reseptörü bloke eder veya bu yolların hücre göçü ve çoğalması üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır (101-106).

Sinir sistemi de kornea epitelyal yara iyileşmesi sürecine de katkıda bulunur. Nöral girdilerin korneal yara iyileşmesi sürecindeki önemi, herpetik göz hastalığı, beşinci sinir lezyonları, topikal anesteziye kötüye kullanımı ve diabetes mellitus ile ilişkili değişmiş trigeminal sinir fonksiyonunun karakteristik özelliği olan gecikmiş yara iyileşmesi ile öne sürülmektedir (107). Korneal epitel hücrelerinin trigeminal veya sempatik nöronlarla birlikte kültürü, mitotik aktivitenin artmasına neden olur (108). Kültürlü trigeminal nöronlar, epitel hücrelerinde bulunan tip VII kolajenleri farklılaştırıp eksprese etmelerine neden olur (108-110). Nöropeptid P maddesinin İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF) ile birlikte eklenmesi, fokal adezyon kompleksleri ile ilişkili sinyal proteinlerinin fosforilasyonunun artmasıyla epitelyal göçü teşvik eder (111,112). Öte yandan, kalsitonin geni ile ilişkili peptid, in vitro epitelyal mitozisi azaltır (113). Sempatik sinirlerden gelen noradrenalinin yara iyileşmesinde küçük bir rolü olabilir, ancak şu ana kadar raporlar çelişkilidir (114,115). Asetilkolin aynı zamanda korneal epitel tarafından oküler yüzeydeki parasempatik sinirlerden daha yüksek seviyelerde üretilmesine rağmen, yara iyileşmesinin desteklenmesinde rol oynayabilir (116,117). Böylece, oküler nöral patolojide meydana gelen yavaş iyileşme ve yaranın sinirsel türevli faktörlerle desteklenmesi, sinir sisteminin yara kapanmasında rol oynadığını göstermektedir.

MMP-9, kollajen ve bazal membran proteinlerini parçaladığı, IL-1'i modüle ettiği ve TGF- β 'yi aktive ettiği belirtilmiştir (118-121). MMP-9'un varlığının, mitotik aktiviteyi azaltarak, enflamasyonu geciktirerek ve ardından yara kapanmasını takiben geçici matrisi kaldırarak yara kapanma oranını düzenlediği gösterilmiştir (121,122). Böylece proteazlar, kornea epitelyal yara iyileşmesi sırasında hücre göçünü ve çoğalmasını destekler ve düzenler.

2.5 Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri

Yaşamın vazgeçilmez bir unsuru olan oksijenin, belirli durumlarda insan vücudu üzerinde zararlı etkileri olması ve bu zararlı etkilerinin çoğunun, bazı kimyasal bileşiklerin oluşumu ve aktivitesinden kaynaklanması ironiktir (123,124). ROS olarak bilinen ve diğer maddelere oksijen verme eğiliminde olan serbest radikaller ve antioksidanlar, hastalık mekanizmalarının açıklanmasında yaygın olarak kullanılan terimler haline gelmiştir (125).

2.5.1 Serbest Radikaller

Serbest bir radikal, bir atomik yörüngede eşleşmemiş bir elektron içeren bağımsız varlığa sahip herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı çoğu radikal tarafından paylaşılan bazı ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Bir elektronu bağışlayabilir ya da diğer moleküllerden bir elektron kabul edebilir, bu nedenle oksidanlar veya indirgeyiciler gibi davranırlar. Birçok hastalık durumunda oksijen içeren serbest radikallerin çoğu tekli oksijen ($1O_2$), süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), hidroksi ($\cdot OH$), peroksi ($ROO\cdot$) ve alkoksi ($RO\cdot$) radikalleridir (Kaur and Kapoor 2001),(126). Bu moleküller çekirdekte DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik olarak ilgili moleküllere zarar veren , hücre zarında bulunan oldukça reaktif türlerdir. Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır (127). Serbest radikallerin hedefleri vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir.

Serbest radikaller, insan vücudundaki normal temel metabolik işlemlerden veya X ışınları, ozon, sigara, hava kirliliği ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dış kaynaklardan elde edilir (128). Serbest radikal oluşumu, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak hücrelerde sürekli olarak meydana gelir. Serbest radikallerin kaynağı olarak görev yapan enzimatik reaksiyonlar, solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer alır. Serbest radikaller ayrıca oksijenin organik bileşiklerle ve iyonlaştırıcı reaksiyonlarla da oluşabilir(129).

2.5.1.1 Reaktif Oksijen Ürünleri ve Serbest Radikaller

ROS, zincir reaksiyonunun başlangıcında ve / veya devamına katılan hem radikal hem de radikal olmayan türler dahil olmak üzere tüm reaktif oksijen formlarını içeren ortak bir terimdir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronların varlığından türetilen, çok kısa bir süre boyunca bağımsız olarak varolma yeteneğine sahip, oldukça reaktif bir ara kimyasal molekül olarak tanımlanır (130).

2.5.1.1.1 Serbest Radikal Kaynakları (131)

- İç Kaynaklar
- Dış kaynaklar
- Fiyolojik faktörler

2.5.1.1.1.1 İç Kaynaklar

Bunlar serbest radikallerin kaynağı olarak görev yapan enzimatik reaksiyonlardır. Solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P450 sisteminde yer alan reaksiyonları içerir. Serbest radikallerin bazı iç üretim kaynakları, mitokondri, ksantin oksidaz, fagositler, demir ve diğer geçiş metalleri içeren reaksiyonlar, peroksizomlar, araşidonik asit yolları , egzersiz, iskemi / reperfüzyon ve inflamasyondur.

2.5.1.1.1.2 Dış kaynaklar

Bunlar oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarını içerir. Serbest radikaller, iyonlaştırıcı radyasyonlarla başlatılan reaksiyonlarda da ortaya çıkar. Bazı serbest radikal kaynakları sigara dumanı, çevresel kirletici maddeler, radyasyonlar, ultraviyole ışık, ozon, bazı ilaçlar, böcek ilaçları, anestetikler ve endüstriyel çözücülerdir.

2.5.1.1.1.3 Fizyolojik Faktörler

Stres, ruhsal durum ve hastalık koşulları da serbest radikallerin oluşumundan sorumludur.

2.5.1.1.2 Serbest radikal çeşitleri

- Hidroperoksil Radikali (HO_2)
- Süperoksit Radikali O_2^-
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Üçlü Oksijen ($3O_2$)
- Aktif Oksijen

2.5.1.1.2.1 Hidroperoksil radikali

Perhidroksil radikali olarak da bilinen hidroperoksil radikali, HO_2 kimyasal formülü ile protonlanmış bir süperoksit şeklidir. Hidroperoksil, bir protonun bir oksijen atomuna transferi yoluyla oluşturulur. H_2O , hidrojen atomlarının tokoferolden ve çoklu doymamış yağ asitlerinden lipid çift katmanındaki soyutlanması gibi biyolojik olarak önemli reaksiyonlarda bir

oksitleyici olarak görev yapabilir. Bu nedenle, lipit peroksidasyonunun önemli bir başlatıcısı olabilir.

2.5.1.1.2 Süperoksit

Süperoksit oksidan ve indirgeyici olarak hareket edebilir. Kükürt askorbik asit veya NADPH' ı okside edebilir, sitokrom C ve metal iyonlarını azaltabilir. Hidrojen peroksit ve oksijen oluşumuna yol açan bir dismutasyon reaksiyonu kendiliğinden meydana gelebilir veya enzim süperoksit dismutaz tarafından katalize edilir (132).

2.5.1.1.2.3 Hidrojen Peroksit

Tek değerlikli süperoksit radikalının indirgenmesi serbest bir radikal olmayan hidrojen peroksit üretimine yol açar. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca nüfuz eder ve hücrede bölümlere ayrılmaz. Bu durum ; DNA'nın parçalanması, tek iplikçik kopmaları ve DNA protein çapraz bağının oluşması ile sonuçlanır. Çok sayıda enzim (peroksidaz), karmaşık organik moleküllerin sentezini içeren oksidasyon reaksiyonlarında substrat olarak hidrojen peroksit kullanır. Bu bir oksitleyici ajandır, ancak özel olarak reaktif değildir. Hidrojen peroksitin asıl önemi, reaktif geçiş metal iyonlarının varlığında bir hidrosil radikalının kaynağı olmasıdır.

2.5.1.1.2.4 Tekli oksijen

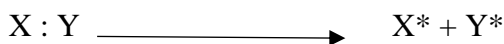
Serbest bir radikal değildir, ancak bazı radikal reaksiyonlarda oluşabilir ve diğerlerini tetikleyebilir. Bu hidrojen peroksit moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Ayrışmadaki singlet oksijen, süperoksit ve hidrosil radikalleri oluşturur.

2.5.1.1.2.5 Üçlü oksijen

Üçlü oksijen, oksitler oluşturmak için elementler ve iyonlarla reaksiyona girebilir. Bununla birlikte, diğer aktif radikallerin, radyasyonların, ultraviyole ışığın ve ısının etkisiyle üretilen serbest radikal moleküllerle veya aktif peroksit radikallerini üretmek ve doymamış yağ asitlerinin ve diğerlerinin otomatik oksidasyonunu tetiklemek için oksijen ve geçiş metali ile kompleks oluşumuyla kolayca reaksiyona girer. .

Serbest radikaller üç yolla oluşturulabilir ;

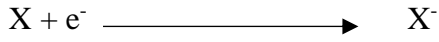
- Normal molekülün kovalent bağının homolitik bölünmesiyle, her bir parça eşleştirilmiş elektronlardan birini koruyarak;



- Normal molekülden tek elektron kaybıyla;



- Normal moleküle tek elektron ilavesiyle;



Bir radikal eşlenmemiş elektronunu başka bir moleküle bağışlayabilir. Eşleşmek için diğer moleküllerden elektron alabilir ya da basitçe moleküle katılabilir. Radikal bir elektron verirse veya bir elektron alırsa ; anyona radikal olmak için eklenir. Bu nedenle, genellikle zincir reaksiyon olarak ilerleyen reaksiyonların geleceği, bir radikalın bir diğerini kazanacağı şekildedir (133).

2.5.2 Antioksidanlar

Antioksidan özellikteki moleküller temel olarak serbest radikal temizleme özelliklerinden dolayı hücresel hasarı geciktirir veya inhibe eder (134). Bu düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilir ve vital moleküller zarar görmeden önce zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. Glutatyon, ubikinol ve ürik asit dahil olmak üzere bu tür antioksidanların bazıları, vücuttaki normal metabolizma sırasında üretilir (135). Diğer hafif antioksidanlar diyetle bulunur. Vücutta serbest radikalleri temizleyen birkaç enzim sistemi bulunmasına rağmen, temel mikro besin (vitaminler) antioksidanları E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve B-karotendir (136). Vücut bu mikro besinleri üretemez, bu nedenle diyetle alınmaları gerekir.

2.5.2.1 Enzimatik ve Peptid Yapılı Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar için iki temel etki mekanizması öne sürülmüştür (137). İlki, birincil antioksidanın vücutta mevcut serbest radikallere bir elektron bağışladığı zincirleme bir mekanizmadır. İkinci mekanizma, ROS / reaktif azot tür başlatıcılarının (ikincil antioksidanlar) zincir başlatıcı katalizörü söndürerek çıkarılmasını içerir. Antioksidanlar, biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini, elektron bağışı, metal iyonu şelatı, yardımcı antioksidanlar veya gen ekspresyon düzenlemesi dahil olmak üzere farklı mekanizmalar ile uygulayabilir (138).

Birinci savunma hattı serbest radikal oluşumunu baskılayan koruyucu antioksidanlardır. Her ne kadar in vivo radikal oluşumunun kesin mekanizması henüz tam

olarak açıklanmamasına rağmen, hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitin metal kaynaklı parçalanmalarının önemli kaynaklardan biri olduğu düşünülmektedir. Bu tür reaksiyonları bastırmak için, bazı antioksidanlar, serbest radikallerin ve bazı proteinlerin metal iyonlarını serbest bırakmadan, sırasıyla hidroperoksitleri ve hidrojen peroksiti, sırasıyla alkollere ve suya indirgemektedir. GSH-Px, glutasyon-transferaz, fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PHGPX) ve peroksidazın; lipit hidroperoksitleri karşılık gelen alkollere parçaladığı bilinmektedir. PHGPX, biyo-zarlara entegre edilmiş fosfolipidlerin hidroperoksitlerini azaltabilmesi bakımından benzersizdir. GSH-Px ve katalaz, hidrojen peroksidi suya indirger.

İkinci savunma hattı zincir başlangıcını bastırmak ve / veya zincir yayılma reaksiyonlarını kırmak için aktif radikalleri temizleyen antioksidanlardır. Çeşitli endojen kök temizleyici antioksidanlar bilinmektedir: Bazıları hidrofilik, bazıları ise lipofiliktir. C vitamini, ürik asit, bilirubin, albümin ve tiyoller hidrofilik, radikal temizleyici antioksidanlardır, E vitamini ve ubikuinol lipofilik radikal temizleyici antioksidanlardır. E vitamini, en güçlü radikal temizleyici lipofilik antioksidan olarak kabul edilir.

Üçüncü savunma hattı tamir ve de novo antioksidanlarıdır. Sitozolde ve memeli hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan proteolitik enzimler, proteinazlar, proteazlar ve peptidazlar oksidatif olarak değiştirilmiş proteinleri tanır, bozar ve uzaklaştırır ve oksitlenmiş proteinlerin birikmesini önler.

DNA tamir sistemleri ayrıca toplam savunma sisteminde oksidatif hasara karşı önemli bir rol oynamaktadır. Hasarlı DNA'yı onarabilen glikosilazlar ve nükleazlar gibi çeşitli enzimler bilinmektedir.

Serbest radikallerin üretimi ve reaksiyonları için sinyalin uygun antioksidanların oluşumunu ve doğru bölgeye taşınmasını sağladığı adaptasyon adı verilen başka bir önemli fonksiyon vardır (139).

Hücreler etkileşimli bir antioksidan enzim ağı ile oksidatif strese karşı korunur (140). Burada, oksidatif fosforilasyon gibi işlemler tarafından salınan süperoksit önce hidrojen peroksite dönüştürülür ve daha sonra su vermek üzere daha da azalır. Bu detoksifikasyon yolu, birden fazla enzimden oluşmaktadır. Süperoksit dismutazlar ilk basamağı katalize eder, sonra katalaz ve hidrojen peroksidi kaldıran çeşitli peroksidazlar ile detoksifikasyon devam eder (141).

2.5.2.1.1 Superoksit dismutaz (SOD)

SOD , süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen peroksit içine parçalanmasını katalize eden enzimler sınıfıdır (142,143). SOD enzimleri hemen hemen tüm aerobik hücrelerde

ve hücre dışı sıvılarda bulunur(144). Metal kofaktöre bağlı olarak başlıca süperoksit dismutaz familyaları: Cu / Zn (hem bakır hem de çinko bağlayan), Fe ve Mn tipleri (demir veya mangany bağlayan) ve son olarak nikeli bağlayan Ni tipi olarak sınıflandırılmıştır. Daha yüksek bitkilerde, SOD izozimleri farklı hücre bölmelerinde lokalize edilmiştir. Mn-SOD, mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. Fe SOD, esas olarak kloroplastlarda bulunur, ancak peroksizomlarda da tespit edilmiştir ve Cu Zn SOD, sitozol, kloroplast, peroksizom ve apoplastta lokalize edilmiştir (145-147).

İnsanlarda (diğer tüm memelilerde ve çoğu kordada olduğu gibi), üç süperoksit dismutaz formu mevcuttur. SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride ve SOD3 hücre dışında bulunur. Birincisi bir dimerdir (iki birimden oluşur), diğerleri ise tetramerlerdir (dört alt birim). SOD1 ve SOD3 bakır ve çinko içerirken, SOD2 reaktif merkezinde manganez içerir (148).

2.5.2.1.2 Katalaz

Katalaz, hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan ve hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrışmasını katalize etme işlevini gören, dokuda yaygın bulunan bir enzimdir (149). Hidrojen peroksit, pek çok normal metabolik işlemin zararlı bir yan ürünüdür: hasarı önlemek için, çabucak diğer, daha az tehlikeli maddelere dönüştürülmelidir. Bu amaçla, katalaz, hidrojen peroksitin daha az reaktif gaz halinde oksijen ve su moleküllerine ayrışmasını hızla katalize etmek için hücreler tarafından sıkça kullanılır (150). Özellikle karaciğerde olmak üzere tüm dokularda karaciğer kullanılır (151).

2.5.2.1.3 Glutasyon sistemleri

Glutasyon sistemi, glutasyon, glutasyon redüktaz, GSH-Px ve glutasyon S-transferazları içerir. Bu sistem hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur (152). GSH-Px , hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalize eden dört selenyum-kofaktör içeren bir enzimdir. Hayvanlarda en az dört farklı glutation peroksidaz izozimi vardır (153). GSH-Px 1 en bol miktarda bulunur ve çok etkili bir hidrojen peroksit temizleyicidir, glutasyon peroksidaz 4 ise en çok lipit hidroperoksitlerle aktiftir. Glutasyon S-transferazlar, lipit peroksitlerle yüksek etkinlik gösterir. Bu enzimler karaciğerde özellikle yüksek seviyelerdedir ve ayrıca detoksifikasyon metabolizmasında da görev yapar (154).

2.5.2.1.4 Askorbik Asit

Askorbik asit veya "C vitamini", hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunan bir monosakarit antioksidandır. İnsanlarda sentezlenemediğinden ve diyetten alınması gerektiğinden, vitaminler sınıfındadır (155).Diğer birçok hayvan bu bileşiği vücutlarında üretebilir ve diyetlerinde gerektirmez. Hücrelerde, protein disülfid izomeraz ve glutaredoksinler

tarafından katalize edilebilen glutatyon ile reaksiyona sokularak, indirgenmiş halde tutulur (156). Askorbik asit, bir indirgeyici maddedir ve hidrojen peroksit gibi ROS'u azaltabilir ve böylece nötralize edebilir (157). Doğrudan antioksidan etkilerine ek olarak, askorbik asit ayrıca bitkilerde strese karşı dirençte özellikle önemli olan bir fonksiyon olan antioksidan enzim askorbat peroksidaz için bir substrattır.

2.5.2.1.5 Glutatyon (GSH)

GSH , çoğu aerobik yaşam formunda bulunan sistein içeren bir peptittir (158). Diyetle gerekli değildir ve bunun yerine, oluşturucu amino asitlerinden hücrelerde sentezlenir. GSH , sistein kısmındaki tiyol grubu bir indirgeyici madde olduğundan ve tersine oksitlenip azaltılabildiğinden antioksidan özelliklere sahiptir. Hücrelerde, GSH ,glutatyon redüktaz enzimi tarafından azaltılmış formda tutulur ve sırayla diğer oksitler ve enzim sistemlerini azaltır ve doğrudan oksidanlarla reaksiyona girer (159). Yüksek konsantrasyonu ve hücrenin redoks durumunu muhafaza etmedeki merkezi rolü nedeniyle, GSH en önemli hücrenel antioksidanlardan biridir (160,161).

2.5.2.1.6 Melatonin

Kimyasal olarak N-asetil-5-metoksitriptamin olarak da bilinen melatonin, hayvanlarda ve algler dahil diğer bazı canlı organizmalarda bulunan doğal olarak oluşan bir hormondur (162). Melatonin, hücre zarlarını ve kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen güçlü bir antioksidandır (163). Diğer antioksidanların aksine, melatonin, bir molekülün tekrarlanan indirgeme ve oksidasyona uğraması olan redoks döngüsüne girmez. Bir kez oksitlendiğinde melatonin eski durumuna indirgenemez, çünkü serbest radikallerle reaksiyona girdiğinde birkaç kararlı son ürün oluşturur. Bu nedenle, bir terminal (veya intihar) antioksidanı olarak adlandırılmıştır (164).

2.5.2.1.7 Tokoferoller ve Tokotrienoller (E Vitamini)

E Vitamini, antioksidan özelliklere sahip yağda çözünen vitaminler sınıfında, sekiz ayrı forma sahip tokoferol ve tokotanollere verilen isimdir (165). Bunlardan, α -tokoferol, vücutta en yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu için, üzerinde en çok çalışılan formdur (166). A-tokoferol formunun en önemli lipitte çözünen antioksidan olduğu ve lipid peroksidasyon

zincir reaksiyonunda üretilen lipit radikalleriyle reaksiyona girerek membranları oksidasyondan koruduğu iddia edilmiştir (167). A-tokoferol serbest radikal ara maddeleri uzaklaştırır ve çoğaltma reaksiyonunun devam etmesini önler. Bu reaksiyon, askorbat, retinol veya ubikuinol gibi diğer antioksidanlar tarafından indirgeme yoluyla tekrar aktif indirgenmiş forma geri dönüştürülebilir oksitli a-tokoheroksil radikalleri meydana getirir (168).

2.5.2.1.8 Ürik asit

Ürik asit, plazmanın antioksidan yeteneğinin yaklaşık yarısını oluşturur. Aslında, ürik asit insan evriminde askorbat yerine kullanılmış olabilir (169). Bununla birlikte, askorbat gibi, ürik asit de aktif oksijen türlerinin üretimine aracılık edebilir.

2.6 Ultraviyole Radyasyonun Teknik Özellikleri ve Kornea Üzerine Etkisi

Göz dışında cilt, UV ışınlarının neden olduğu hasara en duyarlı organdır. Kaşlar, kirpikler ve miyozis, aşırı ışığa karşı bir miktar savunma oluştururken, göz hasara karşı hala hassastır. Ana UVR kaynağı güneştir, ancak UVR ayrıca suni lambalar ve kaynak yayları gibi aletlerle yapay olarak da üretilebilir. UVR, 100–400 nm dalga bandında elektromanyetik radyasyondur. Görünür ışık 400 ila 700 nm arasında ve kızılötesi ışık 700 ila 1200 nm arasındadır. UVR, görünür veya kızılötesi ışığa göre daha fazla enerji içerir ve sonuç olarak biyolojik hasar için daha fazla potansiyele sahiptir. UV spektrumu ayrıca üç gruba ayrılabilir: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ve UVC (100-280 nm) (170). Kısa dalga boyları daha fazla enerji taşır ve bu nedenle biyolojik hasar için en büyük potansiyele sahiptir. Güneş ışığı atmosferden geçerken, tüm UVC ve UVB radyasyonunun yaklaşık% 90'ı ozon, su buharı, oksijen ve karbondioksit tarafından emilir. Dünyanın yüzeyine ulaşan güneş radyasyonu yaklaşık% 95 UVA ve% 5 UVB'yi oluşturur (171). Ozon tabakasının incelmeye başlaması nedeniyle, dünyaya ulaşan UVR miktarında bir artış olmuştur (172). UVA, UVB'den daha uzun dalga boyuna sahiptir ve rakım veya atmosfer koşullarından daha az etkilenir. UVA radyasyonu deriden daha derine nüfuz edebilir ve pencere camı tarafından filtrelenmez (173). UVB radyasyonu daha yüksek enerji taşır, dolayısıyla hasar potansiyeli yüksektir. UVB radyasyonunun ortamdaki yoğunluğu değişkendir; Yaz aylarında, öğlen, ekvatorlara daha yakın yerlerde ve daha yüksek irtifalarda daha fazla yoğunluğa sahiptir. Kum, kar, beton ve su güneş ışığının% 85'ini yansıtabilir ve bu da maruz kalmayı daha da yoğunlaştırır (174).

UVR'ye maruz kalma, dokularda DNA hasarı, gen mutasyonları, immünsüpresyon, oksidatif stres ve enflamatuar tepkiler üretir (175). Kanıtlar, UV ışınlamasının ardından ROS oluşumu ve yüksek konsantrasyonlara ulaşması nedeniyle ciddi hasar verici etkilere yol açtığını

göstermektedir (176). DNA'daki tek iplikli kopmaların çoğu, UVR'ye maruz kalmadan reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle üretilir (177). UVR ayrıca epidermal DNA'nın doğrudan mutasyonuna da neden olabilir. Çoğu DNA kırılması, hücrenin çekirdeğindeki proteinlerle onarılır. DNA onarımında başarısızlık veya gecikme, DNA sentezinde ve aktif hücre proliferasyonu bağlamında kanserli hücrelerin gelişimine katkıda bulunabilecek somatik mutasyonlarda hatalara yol açmaktadır (178,179). Buna ek olarak UVR, p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlar yaratır (12). P53 geni, düzenleyici proteinlerin BCL-2 ailesi yoluyla mitokondriye bağımlı apoptoza aracılık eder. P53 doğrudan nükleotid eksizyon onarım düzenleyici proteinleri ile etkileşime girer. Nükleotid eksizyon onarım proteinlerindeki mutasyonlar, xeroderma pigmentosuma ve cilt kanserlerinin erken gelişmesine neden olabilir (179). Ayrıca, çalışmalar, DNA tamirinin fonksiyonel p53 yokluğunda bozulmuş olduğunu göstermiştir (179). UVB'nin ayrıca pirimidin dimerlerinin oluşması yoluyla DNA hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalar, UVA radyasyonunun UVB'den daha fazla immünoşüpresif olduğunu göstermiştir (180,181). Oküler dokularda güneşe maruz kalmak, gözdeki yapılarda akut ve kronik hasara yol açan fotokimyasal reaksiyonlara neden olabilir (182). UVA, lens epitelinde oksidatif bir işlemle DNA hasarına neden olur ve bu da lens hücresi hasarı ve opaklığı ile sonuçlanır (183,184).

2.6.1 Korneanın Oksidatif Hasarında Gözün UVB Işınlamasının Rolü, Kornea Optik Özelliklerinde Değişiklikler

Sağlıklı kornealarda, UV radyasyonunun absorpsiyon ve detoksifikasyon işlemleri, hem düşük moleküler ağırlıklı hem de yüksek moleküler ağırlıklı antioksidanların (antioksidan enzimler) dahil olduğu doku bileşenleri ve sıvıları ile sağlanır. Kornea tabakaları (özellikle epitel), gözün iç yapılarının UVB ışınlarının etkisine karşı korunmasında anahtar rol oynar (185-187). Düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar arasında askorbik asit (korneada yüksek miktarlarda bulunur) reaktif oksijen türlerinin önemli bir temizleyicisidir (188-191). Askorbik asidin yanı sıra, E vitamini de ROS'un zararlı etkilerine karşı koruyucu etki sağlar. E Vitamini serbest radikal temizleyicidir ve reaktif oksijen türlerinin zincirlerini kırarak hücreleri korur (192). Yüksek moleküler ağırlıklı antioksidanlar arasında, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz, korneayı ROS'un neden olduğu hasara karşı koruyan anahtar antioksidan enzimlerdir (193). Süperoksit dismutaz, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene süperoksit radikal dismutasyonunu katalize eder. GSH ve katalaz, hidrojen peroksitin güçlü temizleyicileridir. Korneal aldehid dehidrojenaz 3A1, ultraviyole kaynaklı peroksidik

aldehidlerin detoksifikasyonunda ve korneal UVB absorpsiyonunda önemli bir role sahiptir (194-197).

Normal şartlar altında korneada bulunan bu mekanizmalar, gözün iç yapılarını UV radyasyonunun zararlı etkilerine ve bunların neden olduğu oksidatif hasara karşı korur. Bununla birlikte, eşik UV radyasyonu seviyeleri aşıldığında, kornea rahatsızlıkları ortaya çıkar. Klinik uygulamaların yanı sıra, gözün UV ışınlarına aşırı derecede maruz kalmasının fotokeratit olarak bilinen kornea içi iltihaplanmaya neden olduğu deneysel çalışmalardan iyi bilinmektedir. Güneş ışınlarının sebep olduğu UV radyasyonuna karşı oluşan akut kornea yanıtı UVB radyasyonundan kaynaklanmaktadır (198). İlk in vivo (klinik) fotokeratit bulguları, kornea epitel hücrelerinde görülmektedir (199). Pitts ve arkadaşlarına göre tavşan korneasının eşik radyan maruziyeti, 300 nm'de 0.022 J / cm²'den (2) çok hızlı bir şekilde 335 nm'de 10.99 J / cm²'ye yükselir (200). 2 × eşik radyan maruziyetini aşan radyan maruziyetleri geri dönüşümsüz kornea hasarına neden olmaktadır. Cullen (199) ve Doughty-Cullen (200) endotel ultraviyole hasar eşığının yaklaşık 0.125 J / cm² (ön kornea yüzeyinde) olduğunu belirtmişlerdir.

Podskochy ve ark. apoptozun UVB ışınlarından sonra kornea hücresi ölümü mekanizması olarak görüldüğünü tarif etmişlerdir (201). Diğer morfolojik bozukluklardan, Kennedy ve ark. akut UV ışınlarına maruz kalmanın korneadan türetilmiş proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuna yol açtığını açıkladılar (202). Işınlanmış korneadaki hücreler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin lokal salımı, UV aracılı kornea iltihabından sorumlu olabilir. Hong ve diğ. epitel yaralanmasından sonra proinflamatuvar kemokinlerin, muhtemelen inflamatuvar hücrelerin kornea stromasına girişini tetikleyen keratositler tarafından üretildiğini bulmuşlardır (203). UVB ışınları ile tekrar tekrar ışınlanan korneada, kornea stromasında, özellikle ön bölgede çok sayıda inflamatuvar hücre olduğu görülmüştür. UVB ışınlanmış kornealarda morfolojik bozukluklar ile birlikte özellikle antioksidan enzimlerde bozulma olduğu belirtilmiştir. Kornea antioksidanları reaktif oksijen türlerini detoksifiye eder ve böylece gözü oksidatif hasara karşı korur (204). Tavşan kornea hücrelerinin UVB ışınlarına tekrar tekrar maruz kalması, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde önemli bir azalmaya yol açtığı belirtilmiştir (205,206). Aynı zamanda, ultraviyole bağlı peroksidik aldehidlerin detoksifikasyonunda ve korneal UVB emiliminde önemli bir role sahip olan bir enzim olan korneal aldehid dehidrojenaz 3A1'in etkinliği, UVB ışınlamasından sonra fare korneasında dramatik olarak azalmıştır (207). Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında askorbik asit, reaktif oksijen türlerinin önemli bir temizleyicisidir. Tekrarlanan UVB maruziyetinden sonra, kornea ve ön kamara sıvısı içerisinde askorbik asitte önemli bir azalma gösterilmiştir (208,209). Yukarıda belirtilen çalışmalardan, normal korneada, antioksidanların,

doku bileşenleriyle birlikte UVB radyasyonunu absorbe ettiği ve detoksifiye ettiği anlaşılmaktadır.

2.6.2 Fotokeratit

UVR'nin uzun süre korneaya zarar verdiği, UVR'nin neden olduğu “yanıklara” akut reaksiyonun fotokeratit olarak adlandırıldığı bilinmektedir. Fotokeratitlerin en yaygın ifadeleri “kar körlüğü” ve “kaynakçı keratiti” olarak belirtilmiştir. Kar körlüğü, kayak yaparken, kumsalda veya yüksek irtifada UVB ışınlarına aşırı maruz kalmaktan kaynaklanmaktadır. Buna karşılık, kaynakçı keratiti, yapay UVB (ve bazen UVC) kaynaklarına maruz kalmaktan kaynaklanır. Sıklıkla koruyucu gözlük takmadan kaynak yapan veya kış sporları ile uğraşan kişilerde görülmektedir. Fotokeratit semptomları 6-12 saat arasında değişen latent periyot ardından ortaya çıkmaktadır. Semptomlar genellikle hafif bir oküler rahatsızlık hissi ve fotofobi ile başlamaktadır. Bu ilk semptomlar, korneanın üst tabakalarındaki epitel hücrelerinin kaybına ve hasarına bağlıdır. UVB hasarına bağlı gelişen kornea ödemi puslu ve bulanık görme ile sonuçlanır. UVR'ye daha fazla maruz kalmak, kornea epitelinde pul pul dökülme ile birlikte şiddetli ağrı ile sonuçlanır. 1916'da Verhoeff ve Bell, korneada patolojik değişikliklere neden olmak için yapay bir kaynaktan yaklaşık 500 mJ cm² UVR eşik dozunun gerekli olduğunu ve belirtmişlerdir. Aynı çalışmada korneadaki patolojik değişimden sorumlu ana dalga boylarının UVB spektrumunda olduğu hesaplanmıştır (210). Ren ve ark., düşük dozda uygulanan UVB ışınının korneada epitel dökülmesine yol açarak subepitelyal sinir uçlarını açığa çıkardığını ve fotokeratitle ilişkili ağrıya sebep olduğunu belirtmişlerdir (211).

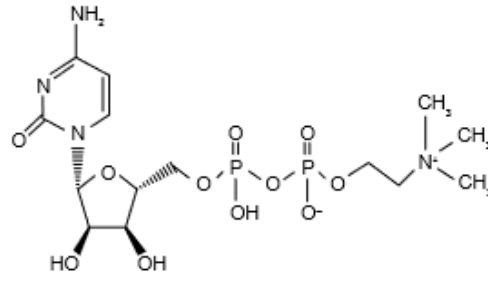
2.7 Citicoline Etki Mekanizması

2.7.1 Farmakoloji ve Etki Mekanizması

Cytidin-5'-difosfokolin (CDP-kolin, CDPCho) veya citicoline, doğal bileşik ile özdeş bir farmasötik maddedir ve fosfolipid sentezinde önemli bir role sahiptir. 1950'lerde Kennedy ve ark. citicoline'in hücre zarının en önemli fosfolipidlerinden biri olan fosfatidilkolin (PC) 'nin öncüsü olduğunu gösterdi (212).

Fosfolipitler, hücre zarının ana bileşenleridir, bu nedenle bu maddelerin sürekli sentezi, hücrenin yapı ve fonksiyonunun devamını sağlar.

CDP-Kolin, riboz, pirofosfat, sitozin ve kolinden yapılmış bir mononükleotittir ve kimyasal yapısı, Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1: Citicoline Kimyasal Yapısı

CDP-kolin yolu, fosfatidilkolinin novo sentezinin yolağıdır ve enzimlerin, sitidin kinaz (CK), kolin fosfat sitiltil transferaz (CCT) ve CDP-kolin: 1,2-diasililicerol kolin fosfotransferaz (CTP) enzimlerini içerir. Bu yolda, kolin PC devri ile sağlanır ve hücreye taşınır (212).

“Citicoline” terimi ilk olarak 1970'lerde maddenin bir ilaç olarak kullanıldığı zaman ortaya çıkmıştı. Manaka ve diğ. Japonya'dan 1974 yılında Parkinson hastalığı nedeniyle citicoline uyguladı. Uygulandığında (oral veya parenteral) citicoline hızlı bir şekilde metabolize edilir (dakika) ve pirimidinerjik ve kolinerjik katabolitlerde dönüşür. Oral uygulamadan sonra sindirim intoleransı gibi sadece birkaç yan etkisi olan güvenli bir moleküldür. İnsanlarda terapötik dozaj günlük 500-2000 mg olarak belirtilmiştir (7-28 mg / kg) (212). En önemli fosfolipidler; fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin ve sfingomyelindir. Hücre zarının bir parçasıdır ve zarın enzimatik süreçleri, reseptörleri ve hücre içi sinyalleri birbirine bağlayan ve hücre homeostazını koruyan fonksiyonlarının devamını sağlarlar. Vasküler demans, Alzheimer hastalığı ve bilişsel bozukluk gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların mekanizması, nöronal zarlardaki spesifik değişiklikleri ve yapısal fosfolipidlerin metabolizmasındaki bozulmaları içerir. Apoptotik kaskad, fosfatidilkolin metabolizmasındaki değişiklikler ile tetiklenir. CDP-kolin ayrıca asetilkolin metabolizması ile bağlantılıdır. Bu nedenle, eksojen citicoline uygulaması asetilkolin sentezi için kolin sağlar (213).

2.7.1.1 Farmakokinetik

Citicoline oral veya intravenöz yolla uygulandığında dolaşımdaki ana metabolitleri olan sitidin ve koline dönüştürülür. Sitidin plazmada üridine dönüştürülür ve daha sonra beyinde üridin fosfata metabolize edilir. Nöron seviyesinde sitidin trifosfata dönüştürülür. Uygulamadan sonra, citicoline hızla dokulara yayılır ve aktif olarak kullanılır. Karaciğer, beyin ve böbrekte bulunabilir. CDP kolininin atılımı, idrar veya dışkı yolu ile ve süresi dolmuş CO2

ile sağlanır. Citicoline, aşağıdakiler gibi birkaç mekanizma ile nöroproteksiyon sağlar: sfingomyelin ve kardiyolipin seviyelerini korur (iç mitokondriyal zarın bileşeni oluşturur), PC seviyesini geri kazandırır, glutatyon redüktaz aktivitesini artırır ve lipid peroksidasyonunu azaltır. Aynı zamanda asetilkolin sentezinde rol oynar ve asetilkolin için kolin sağlar (9). Sistidin ve kolin, bir difosfat köprüsü ile birbirine bağlanan citicoline'in iki parçasıdır. Emildikten sonra, sitidin ve kolin yeniden fosforile edilir ve citicoline kolin monofosfat ve sitidin trifosfattan yeniden oluşturulur. PC sentezi sırasında, PtdCho'ya kolin monofosfat eklenir ve cytidin 5 'monofosfat (CMP) serbest bırakılır. CMP, DNA veya RNA sentezi için kullanılabilir. Citicoline'in kolin kısmının asetilasyonu, asetilkolin sentezini sağlar. Araştırmalar citicoline'in oral yoldan uygulandığında neredeyse tamamen absorbe edildiğini ve bunun sadece küçük bir kısmının atıldığını göstermiştir. Citicoline metabolitleri, uygulamadan yaklaşık 30 dakika sonra beyine ulaşır. Intravenöz uygulamada tepe noktasına ulaşımı, oral uygulamaya göre 6 saat daha geç olmaktadır. Kolin, PtdCho ve asetilkolinin sentezi olmak üzere iki metabolik yolda kullanılır. Bu iki metabolik yol, kolin asetilasyonu için yarışır. Kolin tükendiğinde, fosfolipitler (PtdCho), kolin seviyelerini eski haline getirmek için hidrolize edilir. Asetilkolin sentezi, mevcut kolin miktarı sınırlı olduğunda tercih edilir. Bu nedenle citicoline, kolinerjik nöronların devamlılığını sağlayan bir kolin kaynağıdır. Citicoline'den sağlanan kolin, beyindeki en önemli endojen antioksidan savunma sistemlerinden biri olan glutatyona metabolize edilebilir. Glutatyon, lipid peroksidasyonunu azaltarak nöroprotektif bir role sahiptir. Citicoline' in , travmatik beyin hasarı ve geçici fokal veya global iskemide $Na^+ / K^+ -ATPase$ aktivitesini restore ederek serebral ödem azalmasında etkisi kanıtlamıştır (9). Bu özelliklere sahip citicoline, beyin iskemisinde, Parkinson hastalığında, Alzheimer hastalığında ve glokom, arteritik olmayan iskemik nöropati ve ambliyopi gibi oküler hastalıklarda umut verici bir terapötik ajan olarak incelenmiştir.

Çalışmalar göstermektedir ki karaciğer hasarı modelinde citicoline mitokondriyal fonksiyonu koruyarak ve serbest oksijen radikal üretimini azaltarak iskemi reperfüzyon hasarını önlemektedir (214).

Diğer bir çalışmada kardiyak reperfüzyon hasarından korunmada citicoline in etkili olduğu mitokondriyal geçirgenliği azalttığı ve oksidatif savunma mekanizmalarını güçlendirdiği kanıtlanmıştır (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneklere UVB hasar modeli uygulanması, citicoline damla tedavisi, sakrifikasyon ve alınan korneal dokuların hazırlanması işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler, görüntüleme işlemleri ve immünohistokimyasal boyama işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Anabilim Dalı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

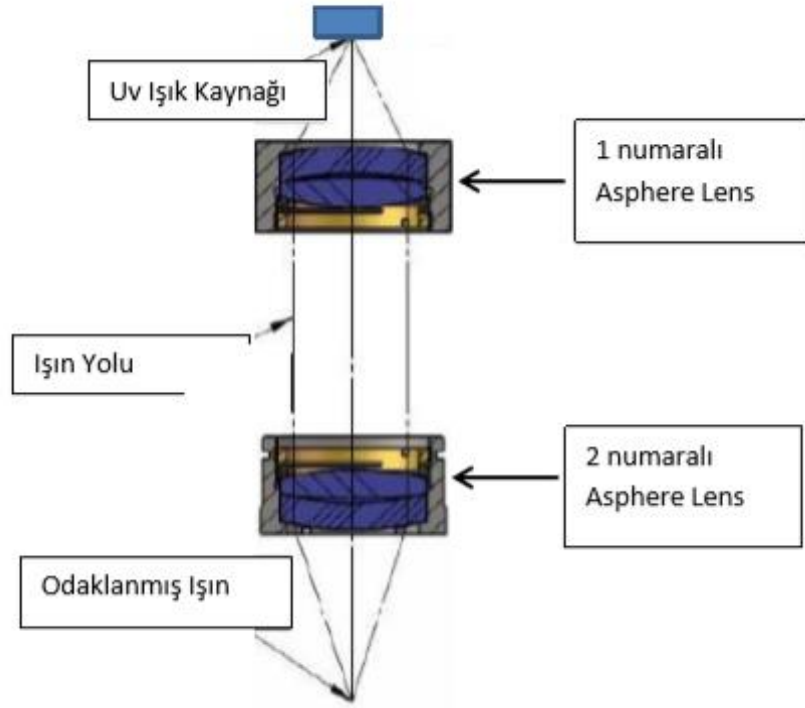
3.1 Denekler

Çalışmamızda toplam 30 adet, sağlıklı Wistar albino cinsi (250 gr) albino erkek rat kullanılmıştır. Deney hayvanları, DETAB tarafından temin edilerek, DETAB'da kendileri için özel üretilmiş olan rat kafeslerinde, tek ya da ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, ısısı ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması flöresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00-18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

3.2 Çalışma Dizaynının Oluşturulması

UVB ışık kaynağının tasarlanması ve ölçümler Kocaeli Üniversitesi Fizik Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Tasarlanan sistem, UV dalga boylu ışığı odaklayarak kornea üzerinde istenilen enerji miktarını aktarmak üzere kurulmuştur. Sistem üzerinde UV dalga boyu aralığında çalışan 2 adet 2 inch(50 mm) çapında Fused Silica Asphere f :60mm odak uzaklığına sahip 2 adet mercek kullanılmıştır. Işık kaynağı 312 nm dalga boyuna sahip 10-16mV güce sahip 5V gerilim ile çalışmaktadır. Işık kaynağının NA $2\theta/2 :120^{\circ}$ dır. Optik ve optomekanik olarak tasarlanan sistemin şeması sunulmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2: Işık kaynağının mekanizması

Ölçülen güç ölçümleri ile birim alan gönderilen enerji hesaplaması aşağıda verilen denklem ile yapılmaktadır. ;

(1)

P:W(Watt)

A:cm²

1000mW=1W

Birim çevirmeleri;

a) $P=0.459 \text{ mW}=4.59 \cdot 10^{-4} \text{ W}$ $r=0,2 \text{ cm}$ = sabit

$3.65 \cdot 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ (2)

b) $P=0.979 \text{ mW}=9.79 \cdot 10^{-4} \text{ W}$ $r=0,2 \text{ cm}$ = sabit

$7.79 \cdot 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ (3)

Sistemde spot çapı rat korneasına odaklanacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3-4)

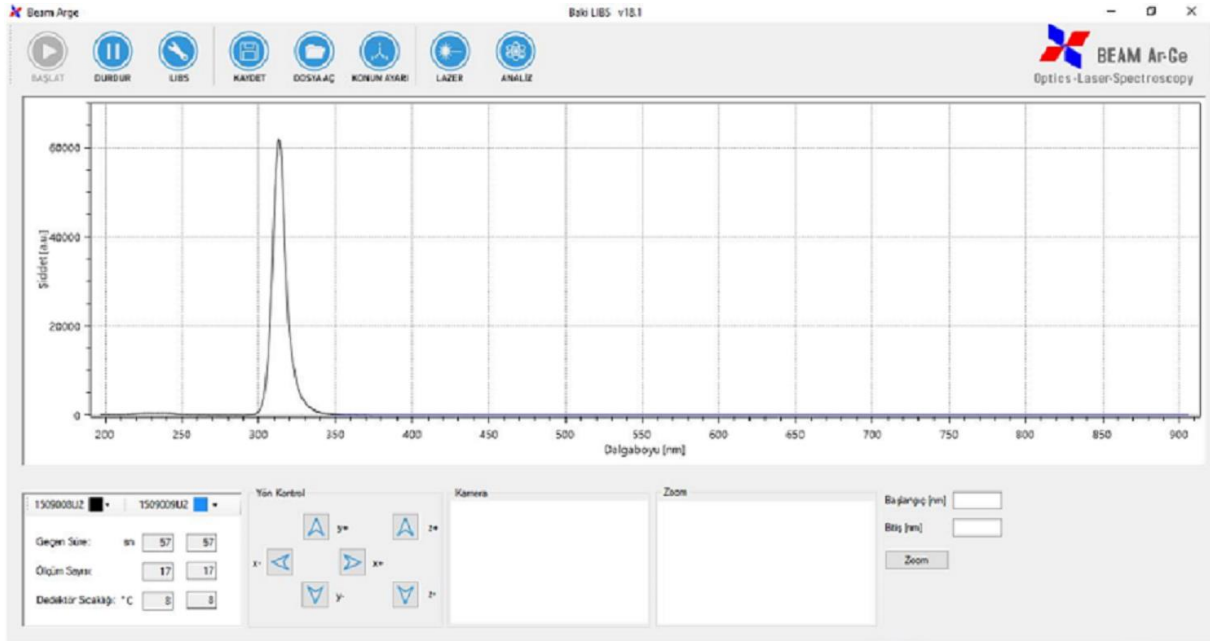


Şekil 3: Tasarlanan sistem



Şekil 4 : Odaklanmış spot çapı

Oluşturulan sistemde ultraviyole ışınının dalgaboyu spektrumu BEAM AR-GE optics laser spectroscopy tarafından değerlendirilmiş ve 312 nm dalga boyu elde edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5: Ultraviyole ışık spektrumu

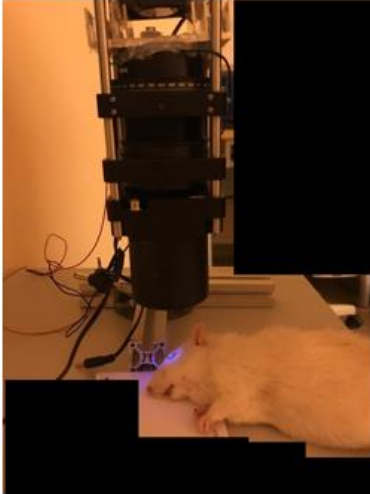
3.3 Model Oluşturulması ve alışma Dizaynı

Denekler DETAB’da 20 günlük karantina sürelerinin ardından hepsi sağlıklı olarak çalışmaya başlandı. Her grupta 10 rat olacak şekilde denekler 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu deneklerin sağlam gözleri kullanılarak belirlendi ve herhangi bir işlem uygulanmadı.

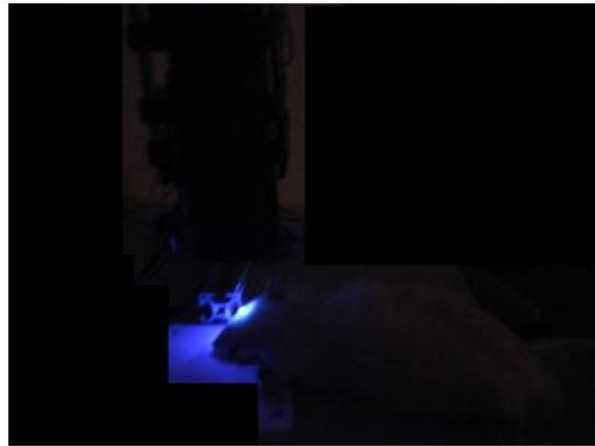
- 1.GRUP: UVB pozitif + citicoline damla :UVB hasarı oluşturulmadan 1 gün önce (0. Gün) başlayarak citicoline damla 8 saatte bir damlatılacaktır.
- 2.GRUP: Shame grup : Model uygulanacak ve tedavi verilmeyecektir.
- 3.GRUP: UVB negatif + citicoline damla : Ratlarda herhangi bir UVB hasarı yaratılmayacak , 8 saatte bir citicoline damla uygulanacaktır.
- 4.GRUP: Sağlam (Hiçbir müdahalede bulunulmamış sağlıklı denek kornealarından oluşur.)

Çalışma protokolü Tanito ve arkadaşlarının uygulamış olduğu protokole göre düzenlenmiştir (215).

İlk gün (0. gün olarak belirlendi) 1. ve 3. gruptaki deneklere % 1 citicoline damla (OMK1®) günde 3 kez damlatıldı ve deney süresi boyunca 8 gün süreyle (0-7 gün) aynı sıklıkta damlatılmaya devam edildi. 1. gün ; 1. ve 2. gruptaki deneklere UVB kaynağı ile hasar modeli oluşturuldu (şekil 6-7).



şekil 6: Model Oluşturulması(1)



şekil 7: Model Oluşturulması(2)

1. ve 2. gruptaki deneklerin sol gözlerine 312 nm dalga boyunda ayarlanmış sahip bir UVB ışık kaynağı 180 saniye boyunca 450 - 600 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$ UVB ışığı uygulandı. Işık kaynağının ölçümleri Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Anabilim Dalı tarafından değerlendirildi. UVB ışık spotu rat kornealarına odaklanacak şekilde dizayn edildi ve dış ortama geçişi en aza indirgenecek şekilde uygulandı. Bu işlem 1. ve 2. gruptaki deneklere 5 gün boyunca, her gün 180 sn süreyle uygulandı. 1. ve 2. gruptaki deneklere 7. gün ışın uygulanmamış sadece % 1 citicoline damla (OMK1®) damlatılmıştır.

Tüm deneklerin ön segment kornea fotoğrafları (software version 3.13.1; TOPCON Slit Lamp Microscopy 703963 Tokyo, Japan) model oluşturulmasından 72 saat sonra çekildi ve ötenazi uygulanmasından önce (8. Gün) tekrarlandı. İkinci gün model oluşturulmadan önce verilen genel anestezi sonrasında 1. ve 2. gruptan 3'er ratın öldüğü görüldü. 2. gün 2 tane, 3. gün 1 tane olmak üzere ,3. gruptan toplam 3 ratın öldüğü görüldü. Çalışmaya her grupta 7' şer rat ile devam edildi.

Her işlem öncesi deneklere genel anestezi uygulanmıştır. 1.1 ml Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.4 ml Xylazine HCl'in (Alfazyne % 2, 5 mg/kg) intraperitoneal (İP) uygulanması ile genel anestezi sağlanarak ön segment fotoğrafları çekilirken tekrarlanmıştır.

Opasite ve epitel defekti büyüklükleri alınan fotoğraflarla Adobe Photoshop programı ile belirlenmiş ve değerlendirilen parametrelerin tüm kornea dokusuna oranları şeklinde bu program ile hesaplanmıştır.

8. gün genel anestezi sonrası sakrifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kornealar limbus sınırından kornea makasıyla alınmıştır. Alınan kornealar ikiye ayrılmış ve histoloji, biyokimya ve genetik laboratuvarına uygun saklama koşullarında gönderilmiştir.

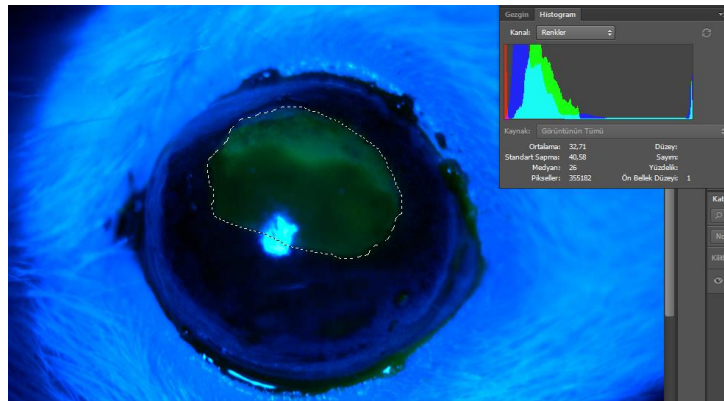
4. KLİNİK BULGULAR

UVB ışını ile fototoksik hasar modeli oluşturulmadan bir gün önce (0. gün) 1. ve 3. gruptaki deneklere citicoline damla günde 3 kez olacak şekilde damlatıldı. 5 gün süreyle 1 ve 2. gruptaki deneklere model uygulandı. Deneklerin ön segment fotoğraflarının çekimleri 3. gün ve satrifikasyon öncesi 8. gün olmak üzere iki vizitte yapıldı. Her vizitte deneklerin ön segment fotoğrafı çekildi, floresein boyama ile kobalt mavisi ışıkta epitel defektleri değerlendirildi. Ön segment fotoğraflarında deneklerin korneal opasitesi ve epitel defektleri değerlendirildi. Bu değerlendirmede veriler, Adobe Photoshop CC programı ile opasite /epitel defekti alanlarının

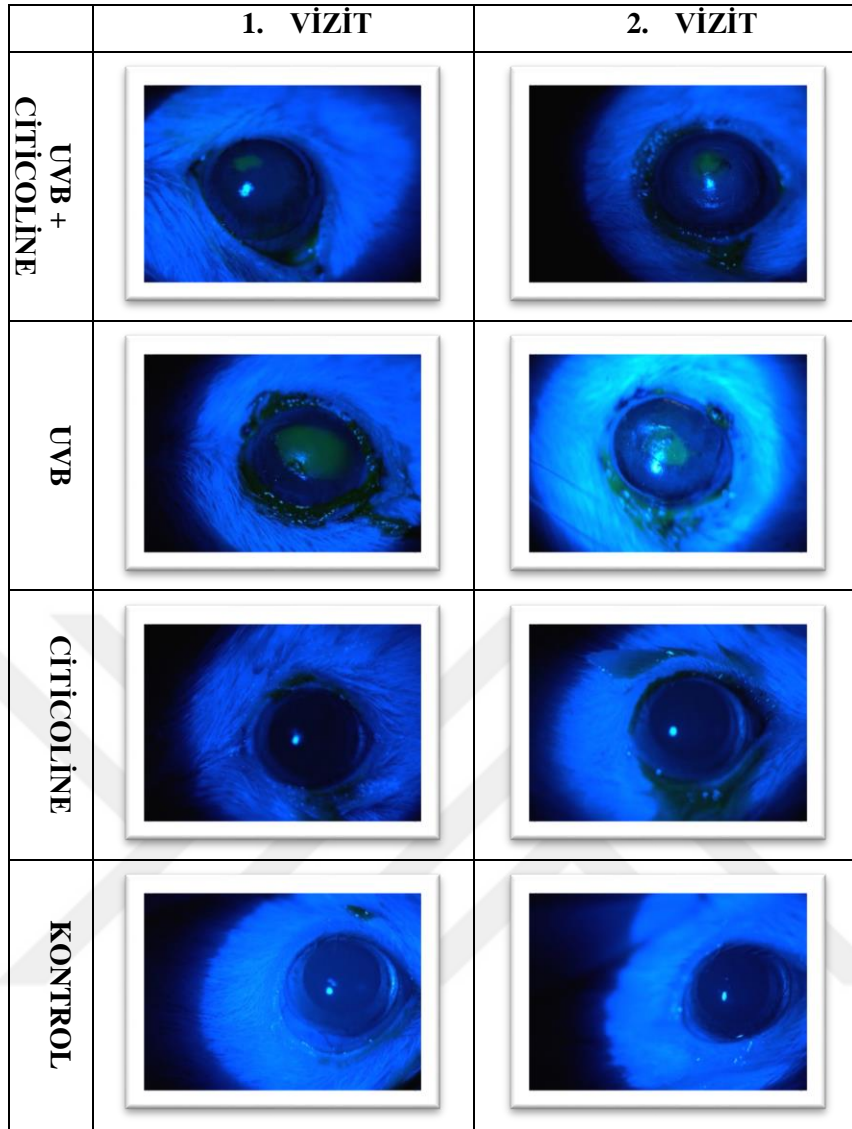
işaretlenerek piksel olarak hesaplanmasının ardından tüm kornealarının işaretlenip piksel olarak hesaplanarak birbirine bölünmesiyle yüzdesel olarak elde edildi.

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama±standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25.-75. persentil) olarak ifade edildi. Kategorik değişkenler ise frekans (yüzde) şeklinde özetlendi. Gruplar arası karşılaştırmalar student-t testi ve Mann Whitney U Testi ile yapıldı. Değişkenler içindeki zamana bağlı değişimler eşleştirilmiş t testi ve Wilcoxon işaretli sıralar testi ile incelendi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki-kare analizi ile belirlendi. İki yönlü hipotezlerin testinde $p<0.05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.

İlk klinik değerlendirilme 3. gün (UVB ışını uylanmasının 72. saatinde) gerçekleştirildi. UVB hasarına bağlı oluşan epitel defekti; floresein boyanma sonrası kobalt mavisi ışıkla yapılan biyomikroskopik muayene görüntüleri, Adobe Photoshop programıyla defektin tüm kornea çapına oranı olarak değerlendirildi (Şekil-8). Epitel defekti değerlendirilmesinde ilk vizitte 1. grupta 2. gruba oranla daha az epitel defekti olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p: 0.013$). İlk vizitte 3. ve 4. grupta epitel defekti izlenmedi. 2. vizitte (satrifikasyon öncesi) 1. ve 2. gruptaki epitel defekti arasında istatistiksel olarak fark saptandı ve ilaç uygulanan grupta daha az epitel defekti olduğu görüldü ($p= 0.038$) (Şekil-9), (Tablo-1) .



Şekil-8: Epitel defektinin hesaplanması, epitel defekti alanının tüm kornea alanına oranı ile hesaplanmıştır.



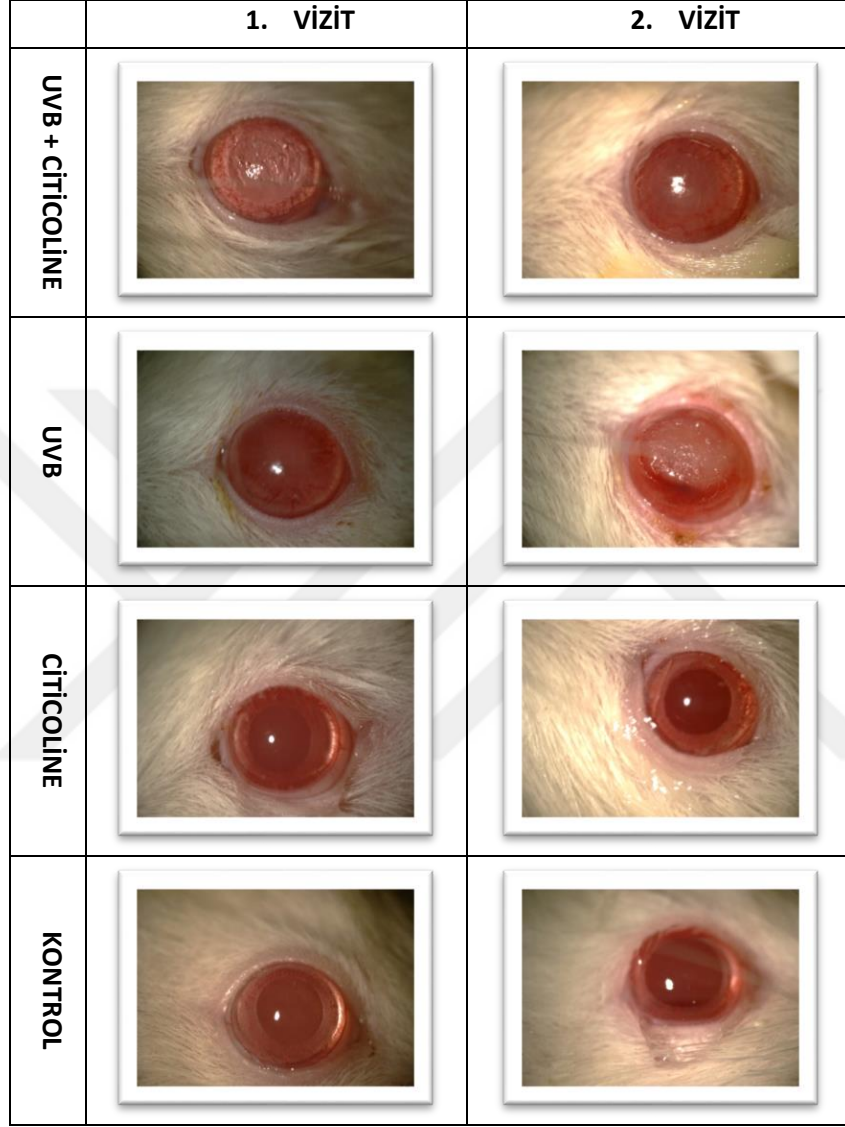
Şekil-9: Grupların 1. ve 2. vizitteki epitel defekti büyüklüğünün takibi

Tablo-1: 1. ve 2. vizitteki epitel defekti ölçümleri ve p değerleri

	UVB+ CİTİCOLİNE	UVB	P DEĞERİ
3. Gün epitel defekti	13,96 ± 11,10	30,94 ± 10,68	0.013
8. Gün epitel defekti	7,99 ± 3,69	16,35 ± 10,77	0.038

Opasite değerlendirmesi yine Adobe Photoshop programı ile opasite alanının ölçülerek tüm kornea alanına bölünmesiyle yüzdelik olarak hesaplandı. Opasite değerlendirmesinde ilk ve ikinci vizitte 1. grupta, 2. gruba oranla daha az opasite olduğu görüldü. Korneal opasite son vizitte her iki grupta başlangıca göre artmakla beraber, bu artış ilaç uygulanmayan grupta daha belirgindi (Şekil-10). Korneal opasite değerlendirilmesinde ilk vizitte 1. grupta, 2. gruba oranla daha az yüzey düzensizliği olduğu görüldü ve bu fark

istatistiksel olarak anlamlıydı (p: 0.037). İkinci vizitte (satisfikasyon öncesi) 1. ve 2. gruptaki korneal opasifikasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ; ancak 1. gruptaki opasifikasyon oranı daha düşük olarak bulundu (p: 0.073).



Şekil-10 : Grupların 1. ve 2. vizitteki korneal yüzey düzensizliği ve opasite büyüklüğünün takibi

Tablo-2:1. ve 2. Vizitteki opasite ölçümleri ve p değerleri

	UVB+ CİTİCOLİNE	UVB	P DEĞERİ
3. gün opasite	13,26 ± 10,34	29,48 ± 15,05	0.037
8. gün opasite	38,41 ± 20,35	53,06 ± 6,00	0.078

5. HİSTOLOJİK - BİYOKİYASAL BULGULAR VE GEN EKSPRESYON ANALİZİ

5.1 Materyal-Metod

Sakrifiye edilen sıçan korneaları nazikçe çıkarıldıktan sonra %10' luk nötral formalin solüsyonu içerisine koyularak 48 saat boyunca dokuların fiksasyonu sağlandı. Çeşme suyu ile yıkama işleminin ardından, kademeli olarak artan etil alkol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96, %100) geçirilen dokuların dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. 15 dk toluen ile şeffaflandırma işlemi takiben dokular 58°C'lik etüvde 30 dk boyunca 1:1 oranında hazırlanmış toluen-parafin karışımında bekletildi. Ardından saf parafin içerisinde 2 saat kadar tutulan dokular, oda sıcaklığında parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica SM 2000R) ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Ardışık alınan kesitlere, morfolojik incelemeler için Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Masson trikrom (MT) boyamaları yapılırken; immünfloresan inceleme için Caspase-3, VEGF, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarına bakıldı. H&E ve MT ile boyanan kesitler Leica DM 1000 model ışık mikroskobu ile; immünfloresan boyanan kesitler ise Leica DMI8 konfokal mikroskop ile incelendi.

5.1.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom Boyamaları

5.1.1.1 H&E

58°C'lik etüvde deparafinize edilen kesitler toluen içerisine alınarak parafinden iyice arındırıldı. Ardından, kademeli olarak azalan etil alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70) geçirilen kesitler distile suya kadar indirgenerek rehidrasyon işlemi sağlandı. Mayer hematoksilen ile 5 dk boyanmanın ardından 2 kez distile su ile yıkanan kesitler 10-15 saniye bluing reagent ile inkübe edildi. 2 kez distile sudan geçirilen örnekler absolute etanole daldırıldı. Daha sonra 2-3 dk Eosin Y (modifiye alkolik) solüsyonunda inkübe edilen kesitler absolute alkolde yıkanarak dehidre edildi. Son olarak toluende yaklaşık 30 dk bekletilen dokular Entellan aracılığıyla lamel ile kapatıldı.

5.1.1.2 MT

Aynı şekilde distile suya indirgenen kesitler eşit hacimde Weigert A ve Weigert B karışımından oluşan solüsyonun içerisinde 5 dk inkübe edildikten sonra 2 dk çeşme suyu ile yıkandı. Distile sudan geçirilen kesitler asit fuksin solüsyonunda 15 dk bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. Ardından kesitler fosfotungustik asit ile 15 dk diferensiyasyon edildi ve yıkama işlemi olmadan 5-10 dk süreyle Anilin blue solüsyonuna alındı. Distile su ile yıkamanın ardından asetik asit solüsyonunda 3-5 dk bekletilen kesitler hızlıca iki kez %96 alkolden ve

ardından %100 alkolden geçirilerek dehidre edilen kesitler toluen içerisinde alındı. Son olarak entellan ile kapama işlemi gerçekleştirildi.

5.1.2 İmmün floresan boyamalar

İmmün floresan boyamalar için dokuların uygun blok serumda 20 dk inkübasyonundan sonra anti-MMP2 antikorunu (43600, Thermo), anti-MMP9 (ab76003, Abcam), anti-aktif kaspaz 3 (ab49822, Abcam) ve anti-VEGF (sc-507, Santa Cruz) ile +4 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra PBS ile yıkanan örnekler floresan boya eklenmiş uygun ikincil antikorlar ile 37 °C'de 1,5 saat inkübe edilerek işaretlendi. Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için yıkama yapıldıktan sonra, son aşama olarak, nükleer boya içeren kapatma medyumunu DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (ab104139, Abcam) ile kapatıldı. Örnekler konfokal mikroskopta (Leica DMI 8 Laser Scanning Confocal Microscope) incelenerek fotoğraflandı.

5.1.3 Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon analizi için önce hücrelerden RNA izolasyonu, RNA dizisinden cDNA sentezi ve sonrasında Real-Time PCR gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu için GeneJET RNA Purification kiti (Thermo Scientific, Dreieich, Almanya) kullanıldı. Kit protokolünde belirtildiği gibi örneklere lizis tamponu eklenerek dokular döner bıçaklı homojenizatör (Ultra Turrax, Brinkmann Instruments Inc., CA, ABD) ile azami hızda 10 s boyunca parçalandı. Proteinaz K eklendikten sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Santrifüj ile çözünmeyen parçalar 12000g kuvvette 5 dk süre içerisinde çöktürüldü. Sıvı kısım alınarak saf etanol ile (3:1) karıştırıldıktan sonra sıvı doğrudan saflaştırma kolonuna eklendi. RNA örnekleri filtrede immobilize edilmişken kitin yıkama tamponu çözeltileriyle yıkandı. Sonra temizlenen RNA fragmanlarının kolondan çözünmesi için kolona 30 µL elüsyon çözeltisi (10 mM Tris-HCl tamponu, pH 7,5) eklenerek RNA sıvı faza aktarıldı. Santrifüj (13000g, 2 dakika) ile sıvı kolondan ayrıştırılarak RNA çözeltisi elde edildi. Örneklerin saflığı ve miktarı Picodrop cihazıyla (Picodrop, Hinxtun, İngiltere) ölçüldü. Tüm örneklerde saflığın istenilen 1,8-2,0 aralığında olduğu belirlendi.

cDNA sentezi için Maxima H Minus First Strand cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanıldı ve kit üretici firmasının belirttiği protokol uygulandı. Üretici firmanın protokolüne uyularak 2 µg RNA örneği, oligo-dT primerleri (5 µM), RNase inhibitörü ve reverse transkriptaz enziminin (50 mU/ µL) yardımıyla cDNA sentezi termal döndürücü cihaz (Takara, Tokyo, Japonya) gerçekleştirildi. Denatürasyon ve priming işlemi için karışım

25°C, 5 dk; reaksiyon için 46°C, 20 dk; ve inaktivasyon için 95°C, 1 dk tutularak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Gen ekspresyon analizi için Bright Green 2x qPCR master (Abcam, Cambridge, MA, ABD) çözültüsü kullanıldı. Gen ekspresyon analiz yöntemi olarak SYBR floresan boya temelli bir ölçüm yaklaşımı tercih edilmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri (100 ng/reaksiyon) genlere özel primerlerle (30 Nm Tablo-3) birlikte master karışımı içerisinde Real Time PCR cihazında (LightCycler480-II, Roche, Rotkreuz, İsviçre) çoğaltıldı. Çoğalan her çift zincirli banda bağlanan SYBR boyasının artmasıyla ışımaya artarak bantların çoğalması ölçüldü. ActB geni referans geni olarak çalışmada kullanıldı. Cihaz okumasından ve Cp değerinin cihaz tarafından belirlenmesinden sonra $\Delta\Delta C_p$ değeri referans genine göre normalize edilerek ve kontrol grubuna göre hesaplandı. Değerler aksi bir durum belirtilmemişse kontrol grubuna göre kat artış ya da kat azalış değerlerinde ifade edildi.

Tablo-3: Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerler ve Dizi Bilgisi

Gen	Primer 1 Dizisi (5'-3')	Primer 2 Dizisi (5'-3')
IL1 β	TGTGATGAAAGACGGCACAC	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
TGF β	GTTCTTCAATACGTCAGACATTCG	CATTATCTTTGCTGTCACAAGAGC
VEGF	CACATAGGAGAGATGAGCTTC	CCGCCTCGGCTTGTCACAT
ActB	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	AGTACTTGCGCTCAGGAGGA

5.1.4 Toplam Protein Miktarının Ölçümü

Biyokimyasal analizlerde kullanılan dokuların boyutlarındaki değişikliklerin ölçüm sonuçlarına olan etkisini gidermek için örnek içerisindeki toplam protein miktarı belirlendi ve diğer ölçümlerin sayısal sonuçlarına bölünerek normalizasyon gerçekleştirildi.

Daha önceden alınan dokular 10 mM PBS içerisinde 4°C dokular döner bıçaklı homojenizatör (Ultra Turrax, Brinkmann Instruments Inc., CA, ABD) ile azami hızda 20-30 s boyunca parçalandı. Santrifüj ile çözünmeyen parçalar 12000g kuvvette 5 dakika süre içerisinde çöktürüldü. Sıvı kısım alınarak toplam protein ölçümü için BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi kullanıldı. %1 BCA çözültüsü (Sigma) ve %4 CuSO₄ (Sigma) çözültüsü 50:1 oranında önceden karıştırılarak yeşil renkli solüsyon elde edildi. 20 μ L örnek ve 200 μ L BCA solüsyonu 96-

kuyucuklu plakalarda 37°C 30 dakika inkübe edildi. Protein varlığında mor renge dönüşen sıvının 562 nm dalga boyunda soğurması VIS-spektrofotometresi (VersaMax, Molecular Devices, ABD) kullanılarak belirlendi. Ölçümlerde BSA çözeltisi (0.5 µg/mL - 3.0 µg/mL) standart olarak kullanıldı.

5.1.4.1 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Dokudaki katalaz aktivitesi EnzyChrom Catalase Assay (ECAT-100, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği deney protokolüne göre gerçekleştirildi. Doku önce 4°C sıcaklıkta 200 µl PBS içerisinde döner bıçaklı homojenizatör (Ultra Turrax, Brinkmann Instruments Inc., CA, ABD) ile azami hızda 10 s boyunca parçalandı. Santrifüj ile çözünmeyen parçalar 14000g kuvvette 10 dakika süre içerisinde çöktürüldü. 10 µl supernatan ile kit içerisindeki aktivite tampon çözeltisi karıştırıldı ve içerisindeki katalaz miktarı H₂O₂ degradasyonu oranı doğrudan ölçülerek belirlendi. Renk değişimi 570 nm dalga boyunda belirlendi. Sonuçlar U/mL olarak ifade edildi. 1 U aktivite katalaz enzimininoda sıcaklığında ve pH 7 tampon çözeltisinde 1 µmol H₂O₂ 'ın 1 dakikadaki dekompozisyon miktarı olarak tanımlanmıştır. Normalizasyon toplam protein ölçülerek gerçekleştirildi.

5.1.4.2 Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddelerin (TBARS) Ölçümü

Dokuda biriken tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin belirlenebilmesi için doku hücreleri parçalanarak malondialdehid (MDA) miktarı ölçüldü. MDA ölçümü için QuantiChrome TBARS Assay (DTBA-100, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği deney protokolüne göre gerçekleştirildi. Doku önce 4°C sıcaklıkta 200 µl PBS içerisinde döner bıçaklı homojenizatör (Ultra Turrax, Brinkmann Instruments Inc., CA, ABD) ile azami hızda 10 s boyunca parçalandı. Santrifüj ile çözünmeyen parçalar 14000g kuvvette 10 dakika süre içerisinde çöktürüldü. Sıvı (supernatan) alınarak ıslak buz üzerinde %10 trikloroasetik asit ile 1:10 oranında karıştırıldı. Bu üzerinde 5 dakika bekletilerek ortamdaki proteinlerin denatüre olması sağlandı. Deproteinizasyon tamamlandıktan sonra santrifüj ile çözünmeyen parçalar 14000g kuvvette 5 dakika süre içerisinde çöktürüldü. Kit içerisinde gelen tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi ile deproteinize supernatan karıştırılarak 60 dakika boyunca 100 °C 'de reaksiyona girmesi sağlandı. Renk değişimi sıvının 535 nm dalga boyundaki ışığın soğurmasıyla VIS-spektrofotometresi

(VersaMax, Molecular Devices, ABD) kullanılarak belirlendi. Ölçümlerde MDA çözeltisi standart olarak kullanıldı. Normalizasyon toplam protein ölçülerek gerçekleştirildi.

5.1.4.3 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Dokudaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi EnzyChrom SOD Assay Kit, (ESOD-100, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) kiti kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği deney protokolüne göre gerçekleştirildi. Doku önce 4°C sıcaklıkta 200 µl PBS içerisinde döner bıçaklı homojenizatör (Ultra Turrax, Brinkmann Instruments Inc., CA, ABD) ile azami hızda 10 s boyunca parçalandı. Santrifüj ile çözünmeyen parçalar 14000g kuvvette 10 dakika süre içerisinde çöktürüldü. 20 µl supernatan ile kit il birlikte gelen xanthine içeren 160 µl reaksiyon tampon çözeltisi karıştırıldı. Beklenmeden karışımın 440 nm 'deki absorbans değeri ölçüldü ve T0 zamanında ölçüm olarak kaydedildi. Sonra reaksiyon 25 °C 'de 60 dakika boyunca inkübe edildi ve süreç sonunda tekrar 440 nm'de absorbans değeri ölçüldü. İki ölçüm arasındaki değer farkı SOD aktivitesi olarak hesaplandı. Aktivite U/mL olarak ifade edildi. Normalizasyon toplam protein ölçülerek gerçekleştirildi.

5.1.4.4 Glutathionin Miktarının Tayini

Glutathionin (GSH) miktarı QuantiChrom GSH Assay kiti (DIGT-250, BioAssay Systems) kullanılarak ölçülmüştür. Kit DTNB (5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic acid]) metodunu temel almaktadır. Doku önce 4°C sıcaklıkta 200 µl PBS içerisinde döner bıçaklı homojenizatör (Ultra Turrax, Brinkmann Instruments Inc., CA, ABD) ile azami hızda 10 s boyunca parçalandı. Santrifüj ile çözünmeyen parçalar 14000g kuvvette 10 dakika süre içerisinde çöktürüldü. %10 TCA ile deproteinize edildikten sonra kit prosederüne göre DTNB ile karıştırılarak 412 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Sonra oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edildi. Süreç sonunda absorbans 412 nm dalga boyunda ölçülerek ve inkübasyon öncesi absorbans değerini son ölçümden çıkartılarak GSH miktarı belirlendi. Sonuçlar GSH standartına göre hesaplanarak µM biriminde ifade edildi. Normalizasyon toplam protein ölçülerek gerçekleştirildi.

5.1.5 İstatistiksel Analiz

Her deney en az 3 kez tekrar edilmiş olup sonuçlar ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. Sonuçların değerlendirilmesinde SPSS 20.0 istatistik programı kullanıldı.

Anlamlılık (p) derecesinin belirlenmesinde Student-Newman-Keuls (SNK) testi kullanılmıştır. Elde edilen bulguların ikili karşılaştırmaları sonucunda SNK testi sonuçlarına göre $p < 0,05$ çıkması durumunda bu iki grup arasındaki farkın anlamlı olduğu yönde yorumlanmıştır.

5.2 Bulgular

5.2.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom

H&E boyanan kesitlerde sağlıklı grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; epitelyal proliferasyon, epitelyal kayıp, ödem, neovaskülarizasyon, inflamasyon ve nükleer değişim skorlama sonuçları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır.

Her gruba ait H&E ile boyanan kesitlerde histopatolojik değerlendirme yapıldı. Bu değerlendirmede; epitelyal proliferasyon, epitelyal kayıp, ödem, neovaskülarizasyon, inflamasyon ve nükleer değişim gibi parametreler 0 ile 3 arasında skorlandı.(Skorlama yöntemi Tablo-4 'te verilmiştir) (Suh MH, ve ark, 2008) (216). Skorlamada kornea santrali ve kornea periferi ayrı ayrı değerlendirildi ve kendi içerisinde skorlandı. Skorlamalar IBM 50 SPSS 20.0 programıyla istatistiksel olarak değerlendirildi. Her grupta en az 5 preparat ve her preparatta 5 farklı alan 40X büyütmede incelendi ve skorlandırıldı.

Tablo-4: Hisyopatolojik Derecelendirme

DEĞİŞKENLER	0	1	2	3
Proliferasyon	Değişim yok	Hafif derece	Orta derece	Şiddetli derece
Nükleer değişim	Değişim yok	Hafif derece	Orta derece	Şiddetli derece
Ödem	Değişim yok	Hafif derece	Orta derece	Şiddetli derece
İnflamatuar hücreler	<50	51-150	151-300	>300
Neovaskularizasyon	<7	7-13	14-20	>20

H&E ve MT ile boyanan kesitler incelendiğinde; kontrol grubuna ait örneklerde sağlıklı morfoloji gözlemlenirken ; UVB uygulanan grupta şiddetli ödem, lökositik infiltrasyon, epitelyal hasar ve neovaskülarizasyon izlenmiştir . UVB hasarından sonra citicoline ile tedavi edilen gruplarda bu bulguların oldukça azaldığı ve kontrole yakın morfoloji gösterdiği

saptanmıştır. Sadece citicoline verilen grup ile kontrol grubu arasında herhangi bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil-11,12,13). Grupların histopatolojik skorlamaları Tablo- 5,6,7 ve 8 ' de gösterilmiştir.

Epitel kaybı skorlamasında sağlam grup ve sadece citicoline damla uygulanan grupta hasar izlenmedi. Sağlam grup ve sadece damla uygulanan grup; diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, epitel kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.001$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p: 0.033, p:0.002$).

Korneal vaskularizasyon skorlamasında; sağlam grup ile sadece citicoline damla uygulanan grupta hasar izlenmedi. Sağlam grup ve sadece damla uygulanan grup diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, neovaskularizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.001$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p:0.002, p:0.017$).

Epitelyal proliferasyon; sadece damla uygulanan grupta ve kontrol grubunda izlenmedi. Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi uygulanan grup karşılaştırıldığında, epitelyal proliferasyonun belirgin olmadığı aralarında anlamlı bir fark izlenmediği görüldü ($p > 0.05$).

Stromal ödem; hasar modeli oluşturulan grupta, tedavi uygulanan gruba oranla daha fazlaydı ve aralarında istatistiksel olarak fark saptandı ($p: 0.002$, $p: 0.002$). Sadece damla uygulanan grupta ve kontrol grubunda ödem izlenmedi.

İnflamasyon ve lökositik infiltrasyon; hasar modeli oluşturulan grupta, tedavi uygulanan gruba göre belirgin olarak daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p:0.002$ $p:0.002$). Kontrol grubu ve sadece damla uygulanan grupta inflamasyon bulguları izlenmedi.

Nükleer değişim skorlamasında hasar grubu ile tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p:0.002, p:0.032$). Kontrol grubu ve sadece damla uygulanan grupta herhangi bir nükleer değişim izlenmedi.

Tablo-5 : Kontrol grubu histopatolojik skorlama

Hayvanlar	1.H	2.H	3.H	4.H	5.H	6.H	7.H
Bölümler	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P
İnflamasyon	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Neovaskularizasyon	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Proliferasyon	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Ödem	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Nükleer değişim	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Epitel kaybı	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Tablo-6: Citicoline grubu histopatolojik skorlama

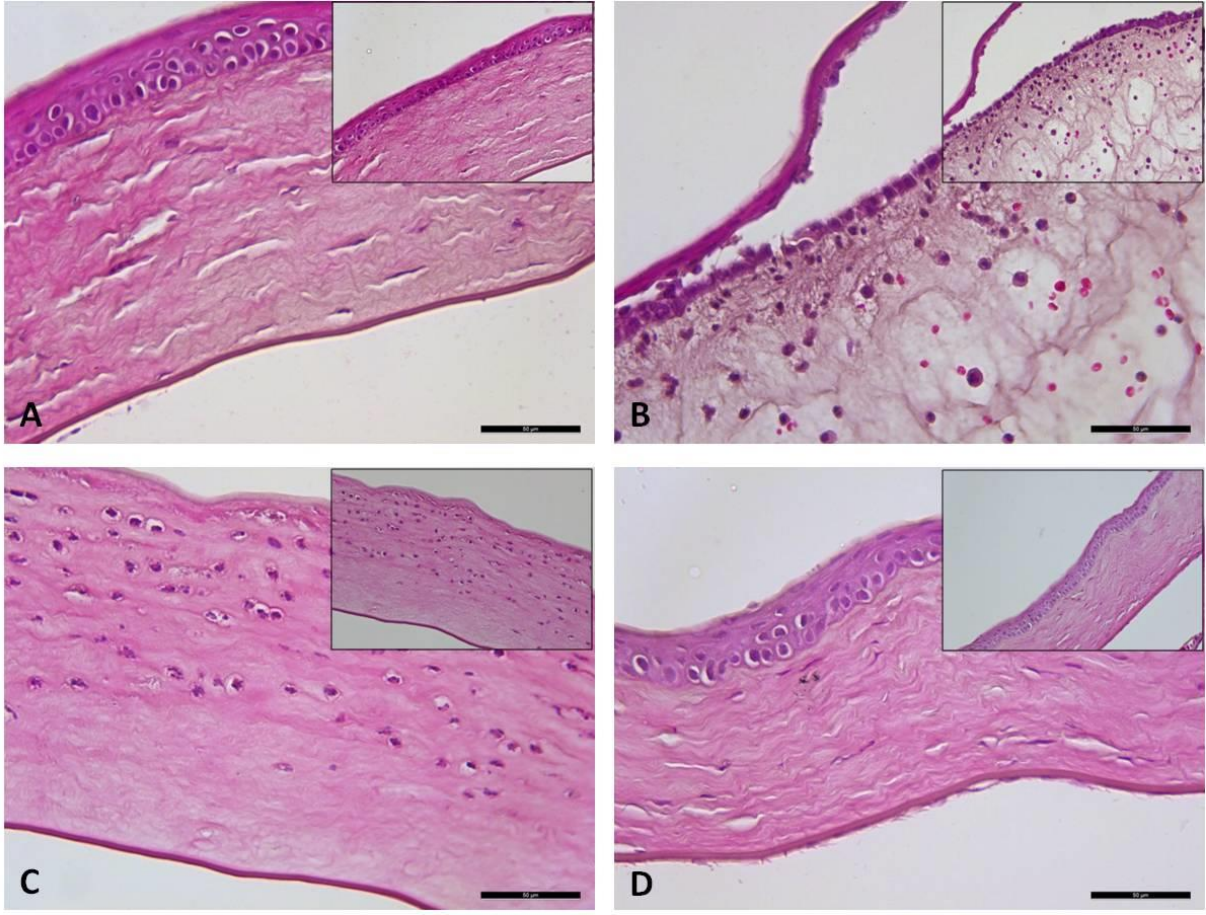
Hayvanlar	1.H	2.H	3.H	4.H	5.H	6.H	7.H
Bölümler	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P
İnflamasyon	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Neovaskularizasyon	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Proliferasyon	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Ödem	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Nükleer değişim	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Epitel kaybı	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Tablo-7 : UVB+ citicoline grubu histopatolojik skorlama

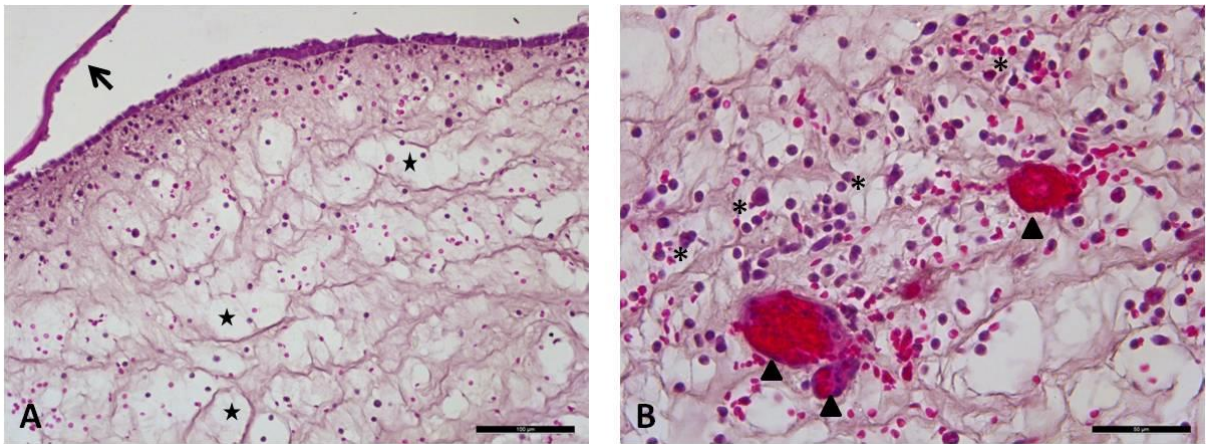
Hayvanlar	1.H	2.H	3.H	4.H	5.H	6.H	7.H
Bölümler	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P
İnflamasyon	0/2	0/2	0/0	0/1	1/2	0/2	0/1
Neovaskularizasyon	0/1	0/1	0/0	0/0	0/2	0/1	0/2
Proliferasyon	0/1	0/1	0/0	0/1	0/0	0/1	0/1
Ödem	0/1	0/1	0/0	0/1	0/1	0/0	0/1
Nükleer değişim	0/1	0/1	0/0	0/0	0/1	0/0	0/1
Epitel kaybı	1/0	0/0	0/0	1/0	1/0	0/0	1/0

Tablo-8: UVB grubu histopatolojik skorlama

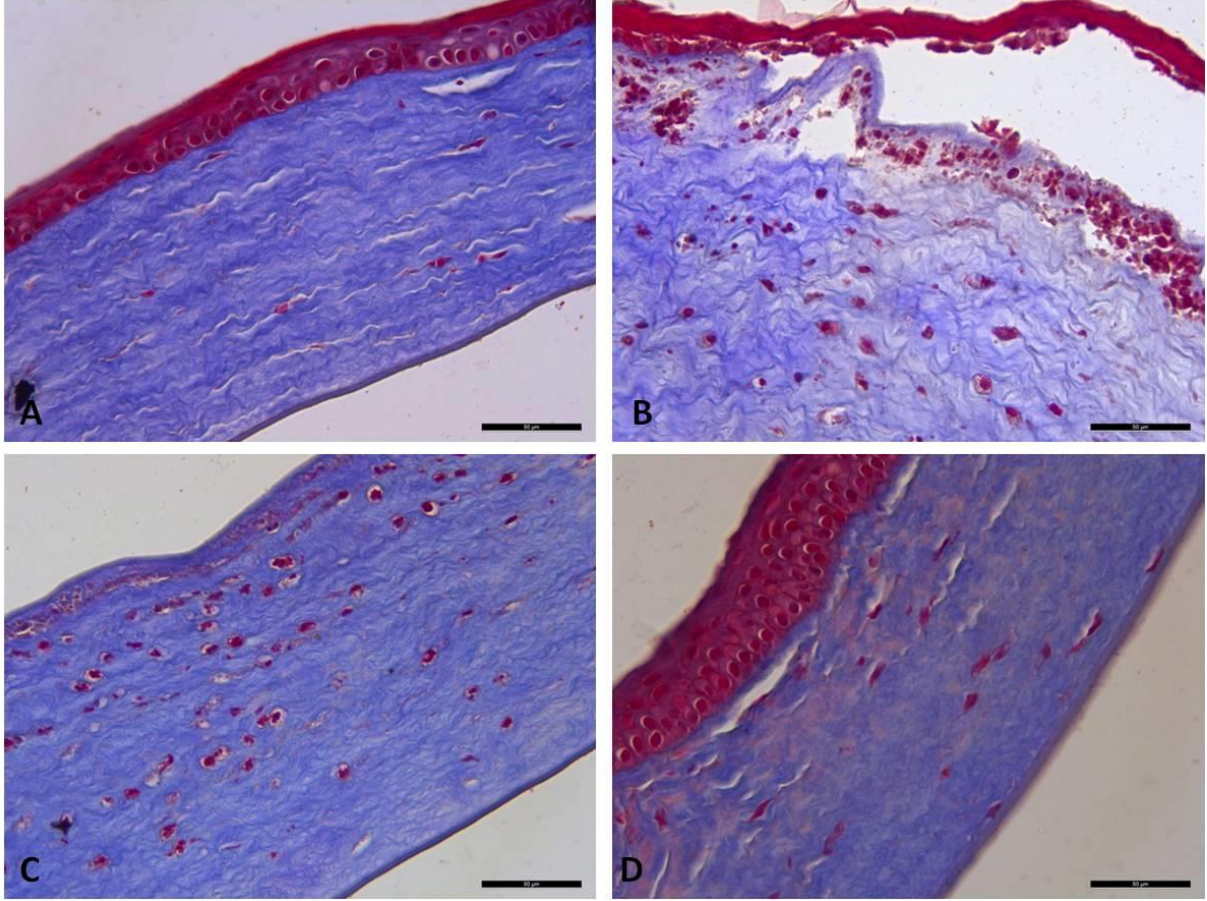
Hayvanlar	1.H	2.H	3.H	4.H	5.H	6.H	7.H
Bölümler	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P	C/P
İnflamasyon	2/3	3/3	1/3	1/3	2/3	3/3	1/3
Neovaskularizasyon	2/3	3/3	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3
Proliferasyon	1/2	1/1	0/1	0/0	0/2	1/1	0/1
Ödem	2/3	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	3/3
Nükleer değişim	2/2	2/3	2/2	1/1	1/2	1/2	1/2
Epitel kaybı	3/1	3/1	2/3	1/1	1/1	3/1	3/2



Şekil-11: H&E boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. A, Kontrol; B, UVB; C, UVB+Citicoline; D, Citicoline. UVB grubunda şiddetli ödem, lökositik infiltrasyon, epitelyal hasar ve neovaskülarizasyon izleniyor. UVB+ citicoline grubunda ödem ,epitel hasarı , lökositik infiltrasyon ve neovaskularizasyonun daha az olduğu görülüyor. Citikoline ve kontrol gruplarının benzer morfolojiye sahip olduğu görülüyor. 40X, H&E.



Şekil-12 : UVB grubuna ait fotomikrograflar. Ok, epitelyal ayrılma ve kayıp; Yıldız, stromal ödem; Ok başı, neovaskularizasyon; Yıldız (sağ foto), lökositik infiltrasyon. 40X, H&E.



Şekil-13: Masson Trikrom boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. A, Kontrol; B, UVB; C, UV+Citicoline ; D, Citicoline. UVB grubunda epiteldeki ayrılma ve yoğun stromal ödem göze çarpıyor. 40X, MT.

Tablo-9 : Grupların histopatolojik skorlamalarının istatistiksel karşılaştırılması (1. ,2. ,3. ,4. Grup)

Değişkenler	P değeri (C/P)
İnflamasyon	<0.001/ <0.001
Neovaskularizasyon	<0.001/ <0.001
Proliferasyon	<0.001/ <0.001
Ödem	<0.001/ <0.001
Nükleer değişim	<0.001/ <0.001
Epitel kaybı	<0.001/ <0.001

Tablo-10: UVB+ Citicoline Grubu ile UVB grubunun histopatolojik skorlamalarının istatistiksel karşılaştırılması

Değişkenler	P değeri (C)	P değeri (P)
İnflamasyon	0.002	0.002
Neovaskularizasyon	0.002	0.017
Proliferasyon	0.065	0.555
Ödem	0.002	0.002
Nükleer değişim	0.002	0.031
Epitel kaybı	0.033	0.002

5.2.2 İmmüno Floresan İncelemeler

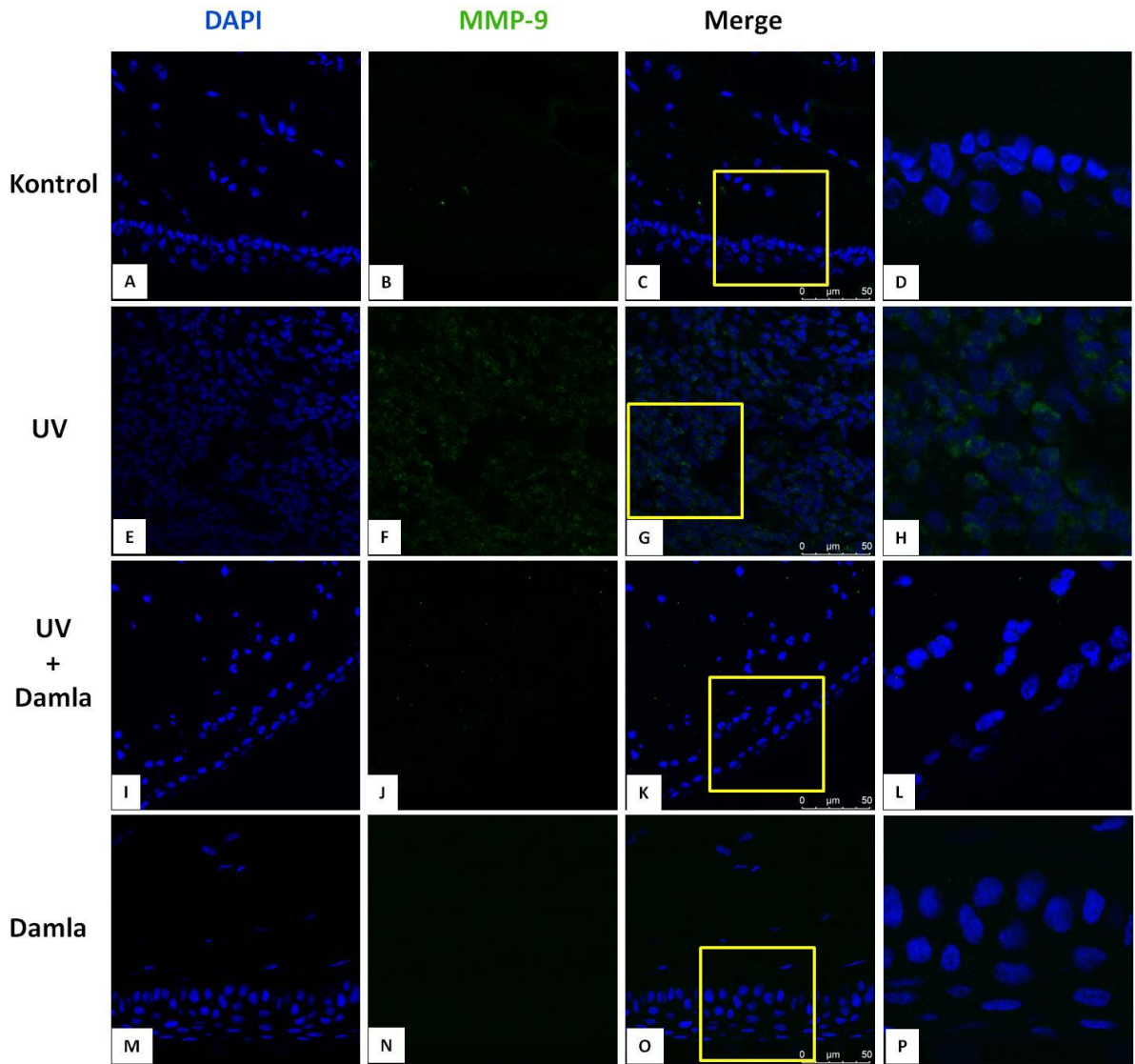
İmmüno Floresan olarak MMP-2, MMP-9, kaspaz-3, VEGF boyamaları yapıldı. İncelemelerde her grupta en az 5 preparat incelendi. İncelenen her preparatta 5 farklı alan 40X büyütmede değerlendirildi. Örnekler konfokal mikroskopta (Leica DMI 8 Laser Scanning Confocal Microscope) incelenerek fotoğraflandı. Örneklerin değerlendirilmesi Kocaeli Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

MMP- 9 immüno Floresan boyama uygulanan kornea kesitlerinde kontrol grubu ve sadece citicoline damla uygulanan grupta düşük miktarda izlenmiştir. Hasar modeli oluşturulan grupta, tedavi uygulanan gruba oranla MMP-9 miktarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. (Şekil -14).

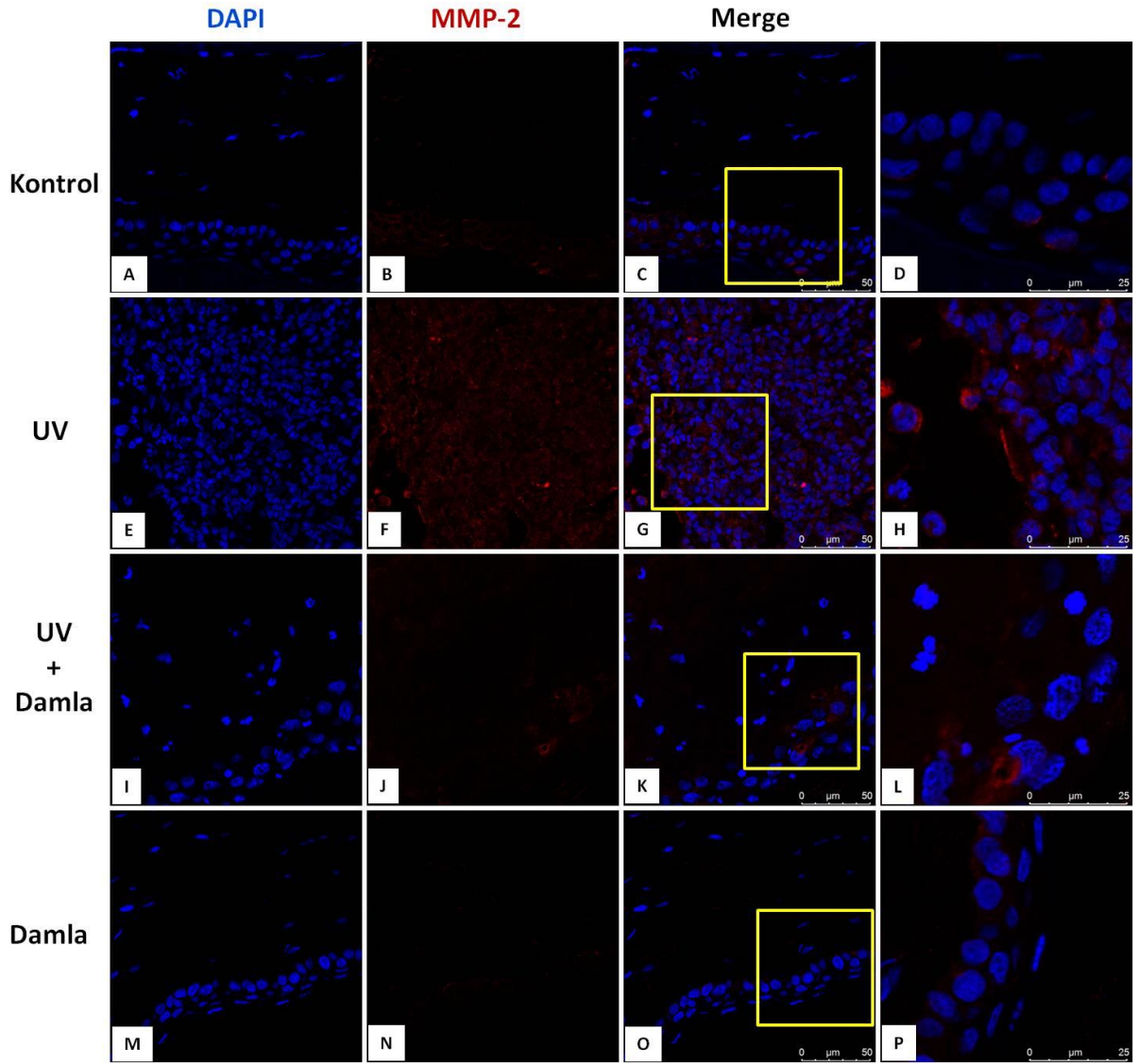
MMP-2 immüno Floresan boyama uygulanan kornea kesitlerinde kontrol grubu ve citicoline damla uygulanan grupta MMP-2 ekspresyonunda artış saptanmadı. Hasar modeli oluşturulan grupta MMP-2 ekspresyonu en yüksek oranda izlenirken; tedavi uygulanan grupta ekspresyon oranının azaldığı izlenmiştir (Şekil-15).

VEGF immüno Floresan tekniği uygulanan kornea kesitlerinde boya tutulumu epitel ve stromada değerlendirildi. Kontrol ve sadece damla uygulanan grupta VEGF immün boyanması izlenmedi. Tedavi grubunda VEGF ekspresyonu diğer gruplara oranla daha fazla bulundu (Şekil-16).

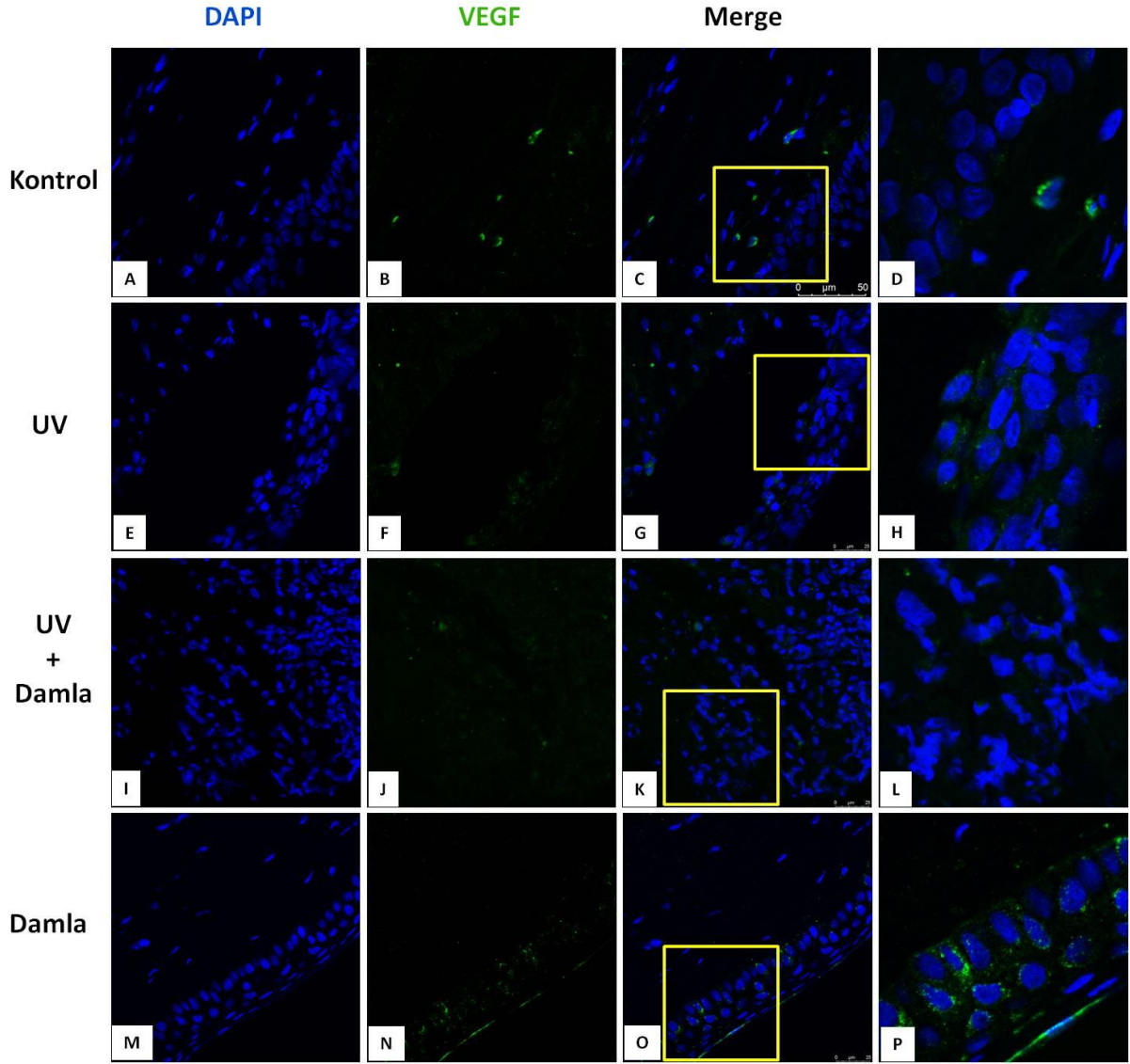
Kaspaz-3 immunfloresan tekniği uygulanan kornea kesitlerinde apoptotik hücreler değeriendirildi. Hasar modeli oluşturulan grupta diğer 3 gruba oranla daha fazla kaspaz-3 boyanmasının olduğu izlendi (Şekil-17).



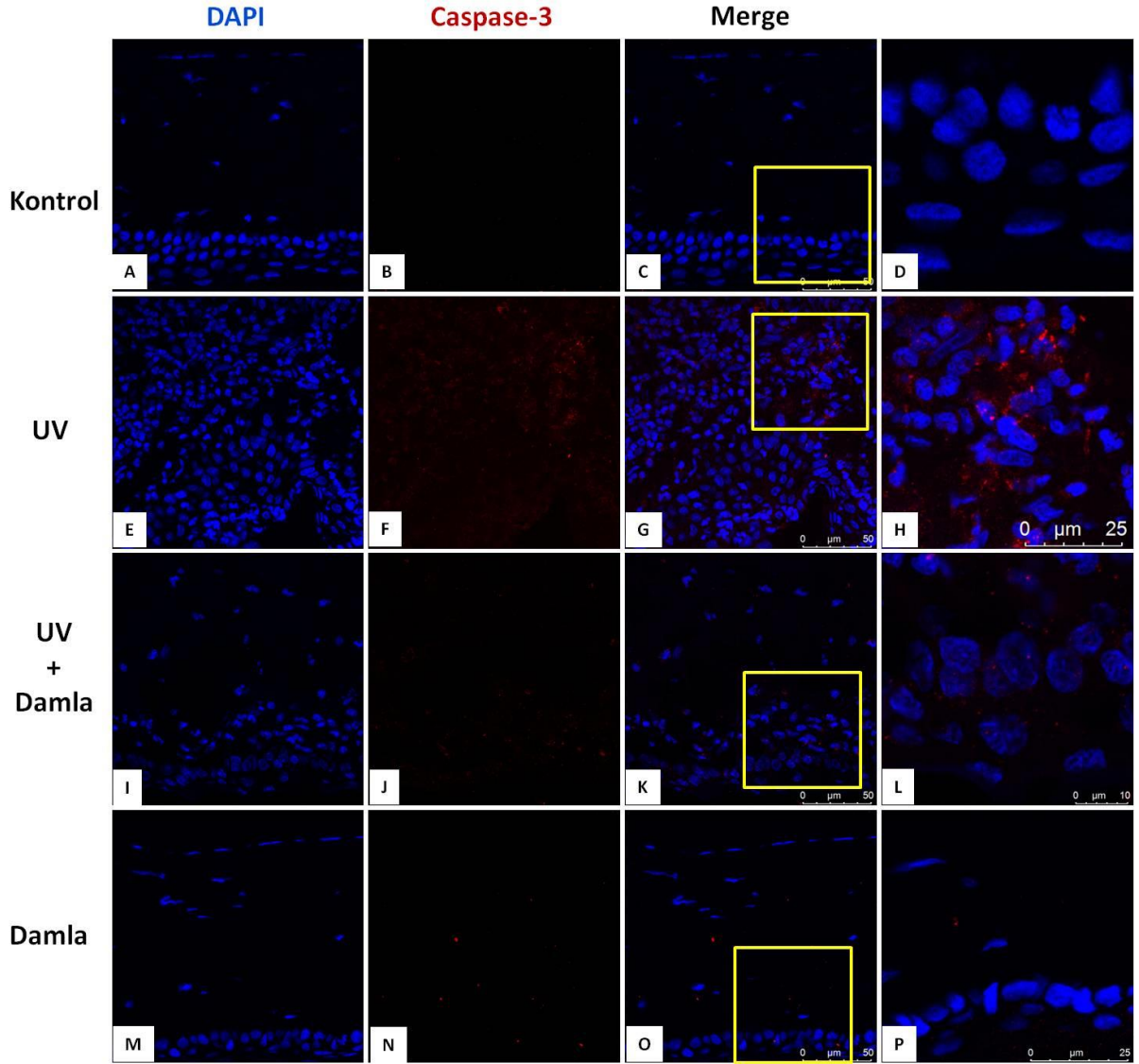
Şekil-14: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri gürölüyor. A,B,C,D Kontrol; E,F,G,H UVB; I,J,K,L UVB+Citicoline; M,N,O,P Citicoline. UVB grubunda MMP-9 boyanmasının daha fazla olduğu gürölüyor. UVB+ citicoline grubunda MMP-9 ekspresyonu daha düşük olduğu gürölüyor. Citikoline ve kontrol gruplarının benzer morfolojiye sahip olduğu gürölüyor.



Şekil-15: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. A,B,C,D Kontrol; E,F,G,H UVB; I,J,K,L UVB+Citicoline; M,N,O,P Citicoline. UVB grubunda MMP-2 boyanmasının daha fazla olduğu görülüyor. UVB+ citicoline grubunda MMP-2 ekspresyonu daha düşük olduğu görülüyor. Citikoline ve kontrol gruplarının benzer morfolojiye sahip olduğu görülüyor.



Şekil-16: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. A,B,C,D Kontrol; E,F,G,H UVB; I,J,K,L UVB+Citicoline; M,N,O,P Citicoline. UVB+ Citicoline grubunda VEGF boyanmasının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu görülüyor. Citicoline ve kontrol gruplarının benzer morfolojiye sahip olduğu görülüyor.

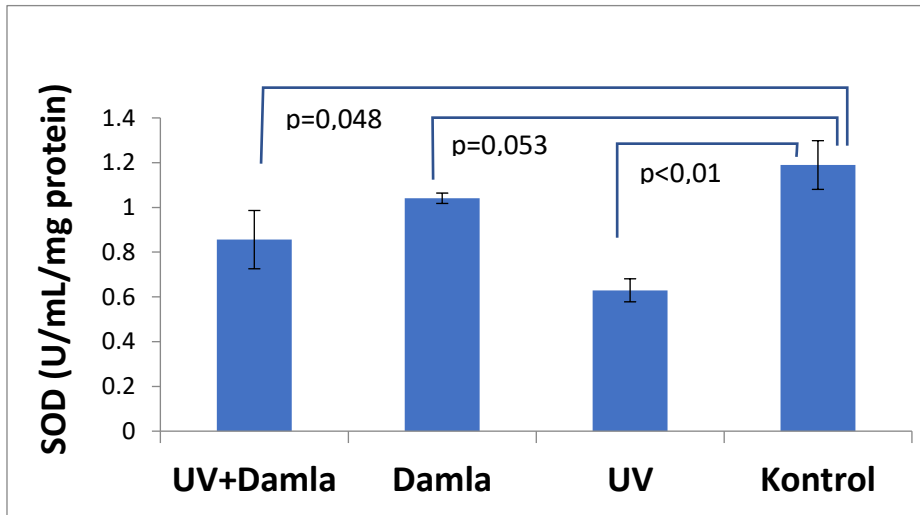


Şekil-17: İmmunfloresan boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. A,B,C,D Kontrol; E,F,G,H UVB; I,J,K,L UVB+Citicoline; M,N,O,P Citicoline. UVB grubunda Kaspaz-3 boyanmasının daha fazla olduğu görülüyor. UVB+ citicoline grubunda apoptozisin daha düşük olduğu izleniyor. Citicoline ve kontrol gruplarının benzer morfolojiye sahip olduğu görülüyor.

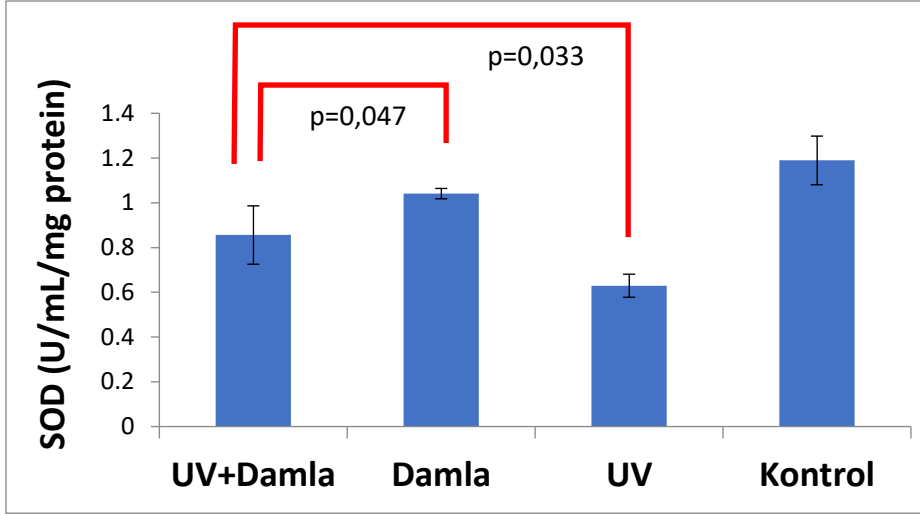
5.2.3 Biyokimyasal incelemeler

5.2.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Dokudaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin biyokimyasal analizinde grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında sadece UVB uygulanan grupta aktivite en düşük olarak değerlendirildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile sadece citicoline damla uygulanan grup arasında anlamlı fark izlenmedi ($p > 0,05$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grubu karşılaştırıldığında ; tedavi verilen grupta SOD düzeyi artmış olarak bulundu ve aradaki fark anlamlıydı ($p < 0,05$), (Şeki-18,19).



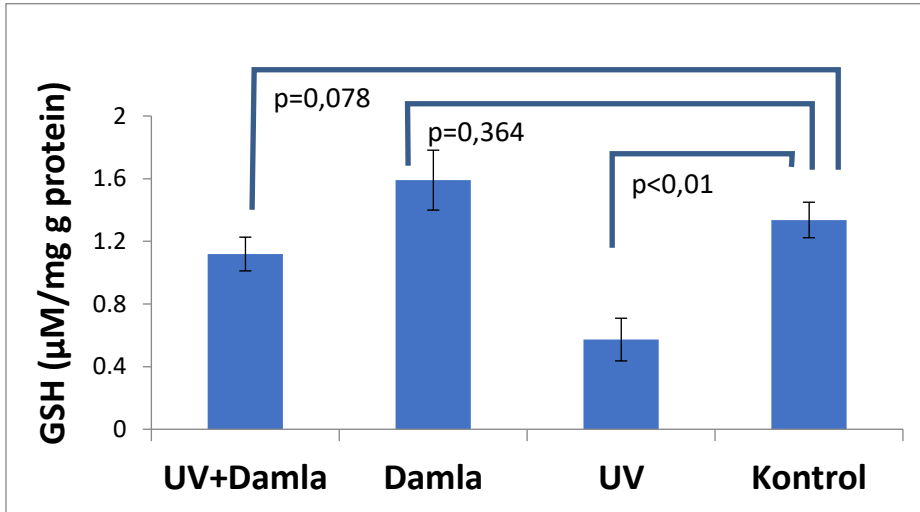
Şekil-18 :Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması. UVB grubunda SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma izlenmiştir. UVB+ citicoline grubunda kontrol grubu ile karşılatırıldığında SOD aktivitesinde azalma görülmüş ancak bu farkın UVB grubuna göre daha az olduğu izlenmiştir. Citicoline grubunda kontrol grubuna benzer sonuçlar izlenmiştir.



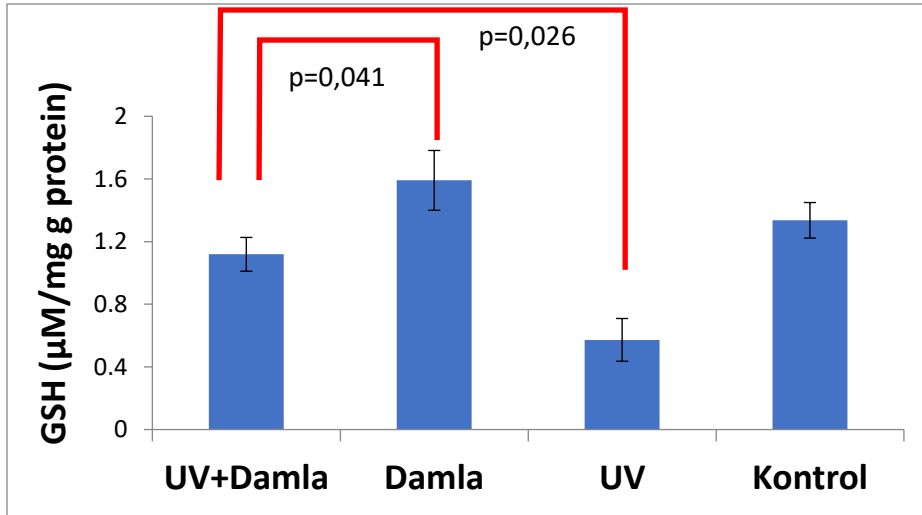
Şekil-19: Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması. UVB+ citicoline grubunda SOD aktivitesi UVB grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

5.2.3.2 Glutasyon (GSH)

Dokudaki GSH aktivitesinin değerlendirilmesinde sadece citicoline damla uygulanan grupta en yüksek olduğu ancak kontrol grubu ile arasında anlamlı fark olmadığı izlendi ($p > 0,05$). Kontrol grubuna göre sadece UVB uygulanan grupta GSH oranı belirgin olarak daha düşüktü ($p < 0,01$). Hasar modeli oluşturulan grup, tedavi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında GSH miktarının tedavi grubunda anlamlı olarak daha yüksek olduğu izlendi ($p < 0,05$) (Şekil-20,21)



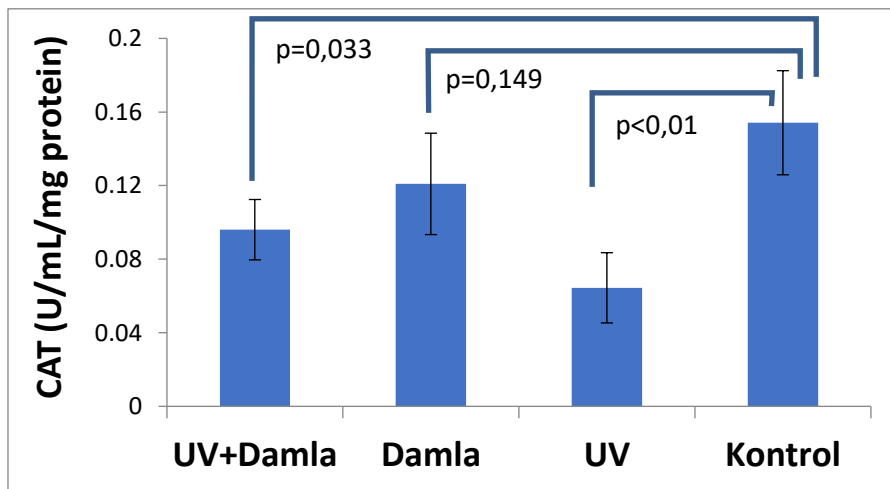
Şekil-20: Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması. UVB grubunda GSH seviyesi diğer gruplara oranla belirgin olarak düşük izlenmiştir. Citicoline grubundaki GSH seviyesinin tüm gruplardan yüksek olması dikkat çekicidir.



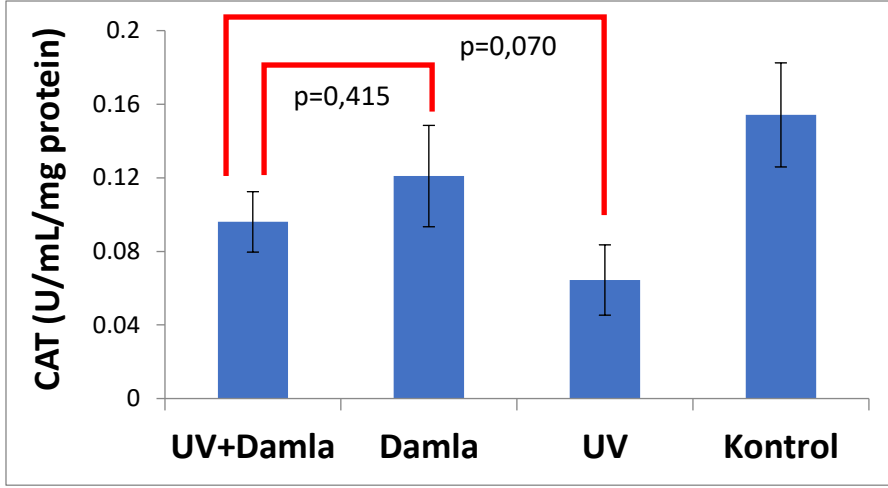
Şekil-21: : Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması. UVB+ citicoline grubunda GSH seviyesinin UVB grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu izleniyor.

5.2.3.3 Katalaz (CAT)

Dokudaki katalazın biyokimyasal değerlendirilmesinde kontrol grubunda en yüksek oranda izlendiği görüldü. Hasar modeli oluşturulan gruptaki katalaz miktarı ,kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Tedavi grubunda , kontrol grubuna göre katalaz miktarı daha düşük bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grubu arasında katalaz düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$) , (Şekil-22,23).



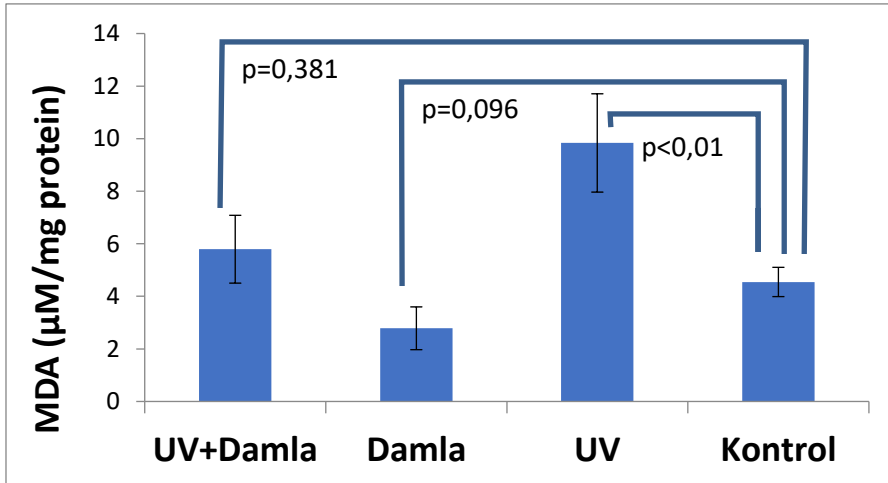
Şekil-22: Katalaz seviyelerinin karşılaştırılması. UVB grubunda CAT seviyesi en düşük bulunmuştur.



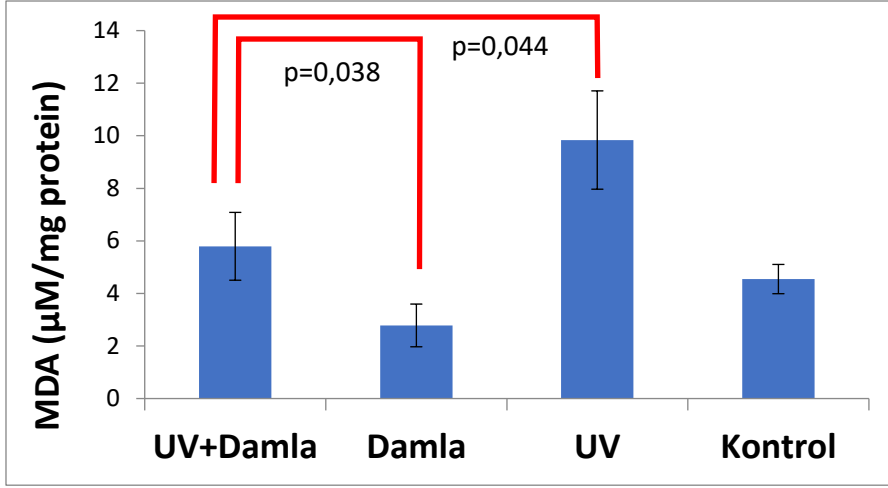
Şekil-23: Katalaz seviyelerinin karşılaştırılması. UVB+citicoline grubunda katalaz seviyesi UVB grubuna göre daha yüksek bulunmuş ancak bu fark anlamlı görülmemiştir.

5.2.3.4 Malondialdehit (MDA)

Dokudaki MDA miktarının biyokimyasal değerlendirilmesinde kontrol grubuna göre hasar modeli oluşturulan grupta belirgin artış ilenmiştir ($p < 0.01$). Tedavi grubunda MDA düzeyi, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p > 0.05$). Hasar modeli oluşturularak citicoline damla uygulanan grupta MDA düzeyi, damla damlatılmayan gruba göre daha düşük bulundu ve bu fark anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil-24,25).



Şekil-24: Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması. UVB grubunda MDA seviyesi diğer gruplara oranla belirgin olarak yüksek bulunmuştur. UVB+ citicoline ile kontrol grupları karşılaştırıldığında MDA seviyeleri arasında anlamlı fark izlenmemiştir.

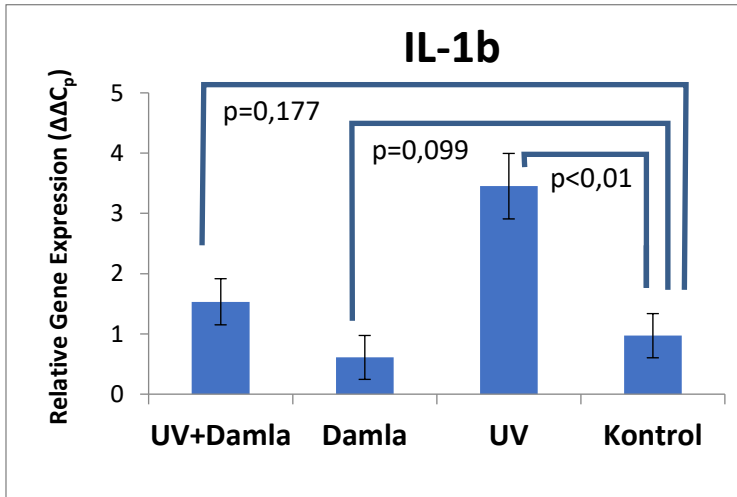


Şekil-25: Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması.

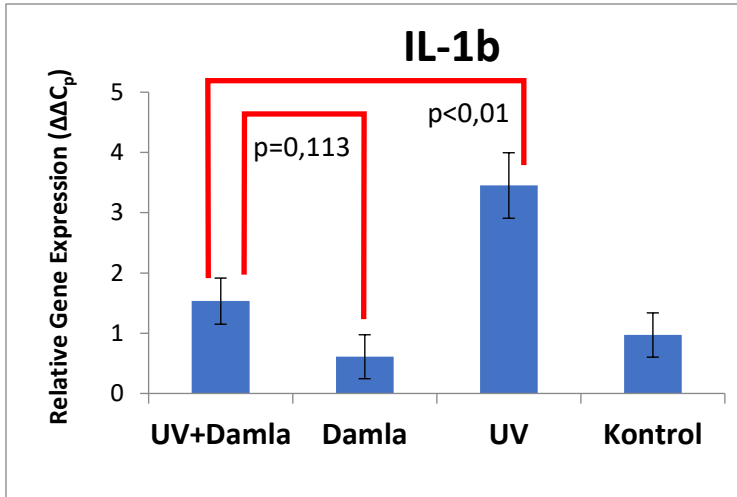
5.2.4 Gen ekspresyon analizi

5.2.4.1 İnterlökin 1 beta (IL-1b)

IL-1b gen ekspresyon analizi değerlendirilmesinde en yüksek ekspresyon oranı hasar modeli oluşturulan grupta izlendi ($p < 0.01$). Sadece citicoline damla damlatılan grupta IL-1b ekspresyonu diğer gruplara göre daha düşük bulundu; ancak kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p < 0.05$). Tedavi grubunda IL-1b ekspresyonu, hasar grubuna göre daha düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.01$), (Şekil-26, 27).



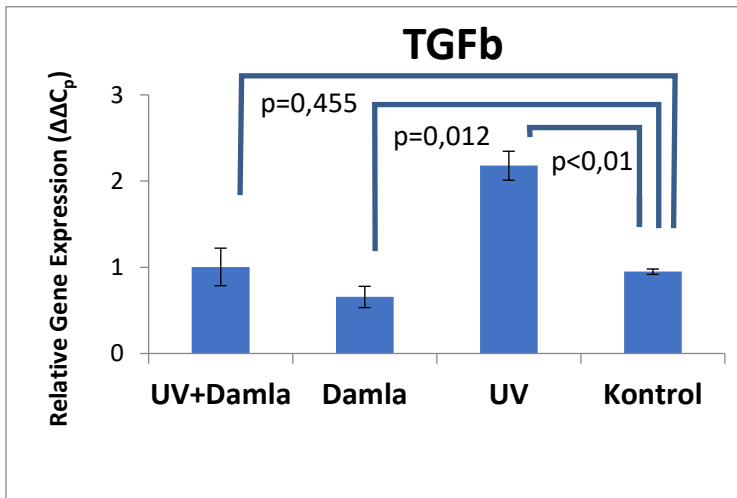
Şekil-26: IL-1b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması. UVB grubunda IL-1b ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin yüksek olduğu görülüyor. UVB+ citicoline grubunda IL-1b ekspresyonunun kontrol grubuyla benzer düzeyde olduğu izleniyor.



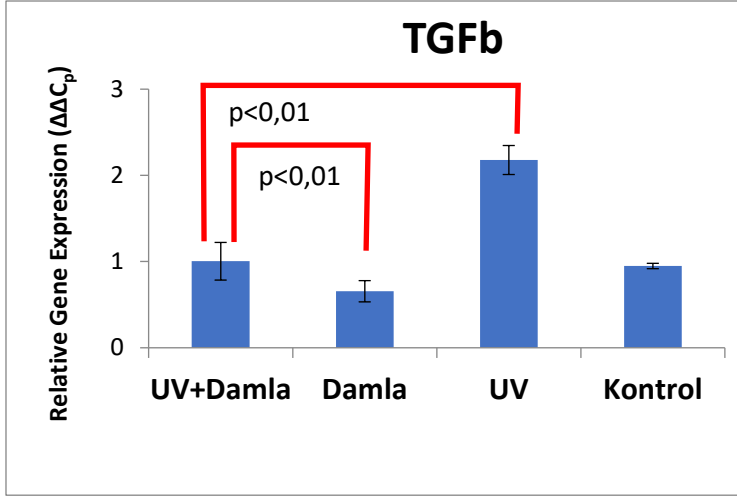
Şekil-27: IL-1b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması. UVB+ citicoline grubunda IL-1b ekspresyonu UVB grubuna göre belirgin olarak düşük izleniyor.

5.2.4.2 Transforme büyüme faktörü beta (TGF b)

TGF b gen ekspresyon analizi değerlendirilmesinde en yüksek ekspresyon oranı hasar modeli oluşturulan grupta izlendi ($p<0.01$). Sadece citicoline damla damlatılan grupta TGF b ekspresyonu diğer gruplara göre daha düşük bulundu ve bu fark anlamlıydı ($p<0.05$). Tedavi grubunda TGF b ekspresyonu, hasar modeli oluşturulan gruba göre daha düşüktü ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.01$) (Şekil-28,29).



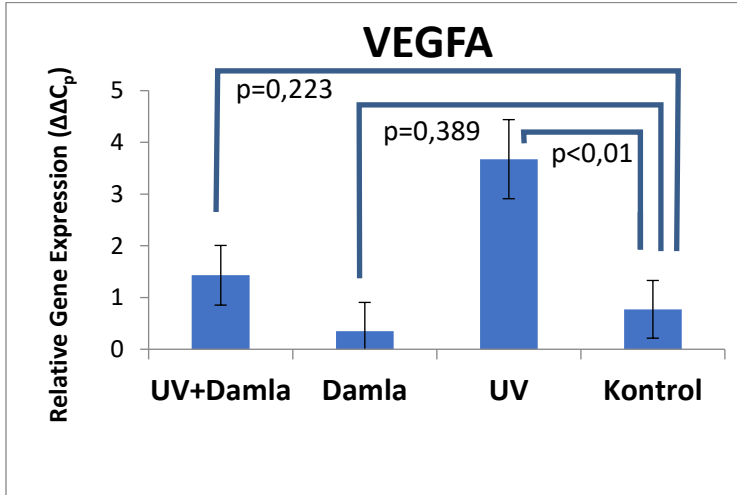
Şekil-28: TGF-b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması. UVB grubunda yüksek TGF-b gen ekspresyonu izleniyor.



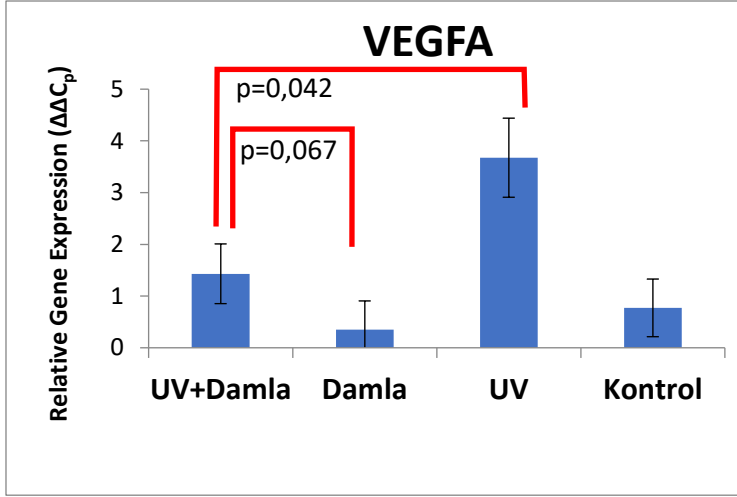
Şekil-29: TGF-b gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması. UVB+ citicoline grubunda TGFb ekspresyonunun UVB grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu görülüyor.

5.2.4.3 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF A)

VEGF A gen ekspresyon analizinde en düşük ekspresyon sadece citicoline damla damlatılan grupta izlendi ancak kontrol grubuna göre anlamlı değildi ($p > 0,05$). Hasar modeli oluşturulan grupta VEGF ekspresyonu en yüksek oranda izlendi ve diğer gruplara göre anlamlı fark görüldü ($p < 0,05$) (Şekil-30,31).



Şekil-30: VEGFA gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması.



Şeli-31: VEGF A gen ekspresyonu seviyelerinin karşılaştırılması.

6.TARTIŞMA

Fototoksik keratit, ultraviyole keratiti, kaynakçı keratiti fazla süre veya dozda ultraviyole ışınına maruz kalmakla ortaya çıkan akut kornea hasarına verilen isimlerdir. UVB ışınları kornea tabakası tarafından büyük oranda emildiği için ışınların gözün iç tabakalarına geçişi ve iç tabakaların ışın yaralanmalarından etkilenmesi engellenmiş olur. Kornea UVB radyasyonunun yaklaşık % 90'ını emer ve UVB hasarına karşı oldukça hassastır (1). Eşik dozun üzerinde akut UVB maruziyeti korneanın yüzeyel ve derin katlarında hasara neden olur (217). UVB ışınları, proinflatuvar mediatörleri aktive ederek DNA, proteinler ve hücrelerde çeşitli değişikliklere neden olur (218-220).

300- 315 nm dalga boyunda uygulanan UVB hasarı kornea epitelinde akut ve kronik değişikliklere yol açmaktadır. Min Hee Suh ve arkadaşlarının yeni zellanda türü tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmada 306 nm dalga boyunda toplam 6.84 J/cm² gücünde UVB ışını 1 hafta boyunca uygulanmış ve her uygulama öncesinde intravenöz olarak askorbik asit enjeksiyonu yapılmıştır (216). Çalışmanın sonuçlarında askorbik asit uygulanan tavşanlarda epitel defektinin özellikle santral korneada daha az olduğu ve korneal bulanıklığın askorbik asit uygulanmayan gruba göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde oral olarak uygulanan askorbik asidin korneadaki UVB hasarına iyileştirici etkisinin olmadığı ancak intravenöz uygulamanın ön kamara sıvısı ve vitrede daha yüksek askorbik asit konsantrasyonu sağlayarak epitel iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (221). Citicoline damlanın epitel defekti üzerine iyileştirici etkisinin olması ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Biz çalışmamızda UVB hasarı sonrası citicoline damla uyguladığımız grupta epitel defektinin, sadece UVB hasarı oluşturulan gruba göre daha az olduğunu ve takip eden süreçte iyileşme

oranının daha fazla olduğunu gördük. Bu durumun citicoline'in membran fosfolipitlerinin yapıtaşlarından biri olması, hücre membran bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunması ve antioksidan savunma sistemi üzerinden hasar miktarını azaltmasıyla (222) ilgili olduğunu düşünmekteyiz.

Ultraviyole ışınına bağlı gelişen inflamasyon; korneal anjiyogenez (veya korneal neovaskülarizasyon) için güçlü bir tetikleyici olabilir (223). Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi vasküler biyobelirteçlerin fizyolojik dengesi korneanın normal vaskülarizasyonunun korunmasında çok önemlidir (224). Anjiyogenik faktörler ve ilgili proteinlerdeki bir dengesizlik proanjiojenik süreçlere yol açabilir. Proinflamatuvar bir sitokin olan VEGF korneadaki inflamasyon miktarı ile düzenlenir ve kornea neovaskülarizasyonunda önemli bir anjiyogenik faktördür.

Shiu-Jau Chen ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada 550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ UVB ışını ile oluşturulan korneal hasar modelinde fucoxantin içeren antioksidanın topikal yolla rat gözlerine ışına maruziyet öncesi uygulamanın, VEGF ekspresyonunu kontrol grubuna oranla belirgin ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (225).

Önceki çalışmalarda korneadaki VEGF miktarının inflamasyon sırasında lökosit ekspresyonu ile birlikte arttığı ve korneal hasarlanmaya bağlı neovaskülarizasyona katkıda bulunduğu gösterilmektedir (226-229). Bizim çalışmamızda da gen ekspresyonu analizi ile H&E ve MT boyama yapılan histolojik kesitlerde VEGF ekspresyonu ve lökosit infiltrasyonunun, kontrol grubuna oranla tedavi verilen grupta belirgin ölçüde azaldığı gözlemlendi. Bu durum citicoline içeren göz damlasının antioksidan etkisinin yanı sıra inflamasyon kontrolü sağlamada da etkili olduğunu göstermiştir.

UVB ışınlarının apoptozisi indüklediği, hücrede çekirdek ve mitokondrinin parçalanmasına yol açtığı gösterilmiştir (230). UVB ışınlamasının indüklediği apoptozis, artan kaspaz 3 aktivitesi ile ilişkilendirilebilmektedir.

Shaobo Du ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada winstar albino türü ratlarda kornea epitel hücreleri ile hücre kültürü modeli oluşturularak Lycium barbarum polisakkaridi ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 24 saat sonra 20 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ UVB ışını uygulanarak hücre canlılığı ve apoptotik mekanizmalar incelenmiştir. UVB ışınları nedeniyle hasar gören hücrelerde mitokondri membran potansiyelinin azaldığı bu nedenle proapoptotik proteinlerin sitozolden mitokondriye ilerleyerek apoptotik süreci başlattığı izlenmektedir. Bu durum apoptozisin son aktivatörü olan kaspaz 3 aktivitesinin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Ancak Lycium barbarum polisakkaridi ile inkübe edilen grupta, kontrol grubuna oranla kaspaz 3 aktivitesinin daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır. (231).

J. Krupinski a ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serebral iskemide oluşturulan ratlara citicoline enjeksiyonu yapılmış ve citicoline verilen grupta kaspaz 3 seviyesinin daha düşük olduğu, apoptozisin daha az olduğu izlenmiştir. Citicoline in kaspaz aktivitesini azaltarak apoptozisi baskılaması, fosfotidilkolin seviyesini koruması ve fosfotidilkolin sentezini arttıran fosfotransferaz enzimini indüklemesi ile açıklanmaktadır (232).

Shuettauf ve ark. yetişkin sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada citicoline ve lityum intraperitoneal olarak enjekte edilmiş, ve retinal gangliyon hücreleri üzerinde citicoline in iyileştirici etkisi araştırılmıştır (233). Çalışmada citicoline in mitokondriye bağlı hücre ölüm mekanizmasında anti-apoptotik etkiye sahip olabileceği ve akson rejenerasyonuna yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Biz çalışmamızda UVB etkisi ile başlayan apoptotik sürecin citicoline damla uygulanan grupta baskılandığını ve kaspaz 3 gen ekspresyonu seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu gördük. Bu durumun citicoline in mitokondri iç membranı bileşenlerinin (fosfotidil kolin ve kardiyolipin) seviyesini koruması ile sağlandığını düşünüyoruz (231). Serbest oksijen radikallerinin hücre membranı ve mitokondri membranı üzerine etki ederek başlattığı apoptotik sürecin hücre membran fosfolipitlerinin seviyesinin korunmasıyla baskılanabileceğini savunmaktayız.

Kornea tabakasının UVB radyasyona maruz kalması; serbest radikal oluşumuna ve buna bağlı reaktif oksijen türlerinin üretimine (ROS) 1 neden olur. UVB radyasyonunun bir sonucu olarak üretilen ROS, hücrelerin antioksidan savunma yeteneğini aştığında korneada oksidatif stres yaratır. UVB ışınlanmasından sonra, kornea epitelyal ROS-üreten oksidazlar, antioksidan / prooksidant dengesizliğine, prooksidantların lehine ve korneadaki oksidatif strese katkıda bulunur (234-239). Antioksidan / prooksidant enzimatik dengesizliğini, kornea epitelindeki proteaz / antiproteaz dengesizliği izler. Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) ile metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) arasındaki MMP'ler lehine dengesizliği tarif ettik. Bu dengesizlik, proinflamatuvar sitokin indüksiyonuna ve intrakorneal inflamasyonun gelişmesine katkıda bulunmuştur (240).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), laminin, fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matriks proteinlerini bozan hücre dışı bir endoproteinaz ailesidir (241). MMP'ler, kanser, artrit, anjiyogenez ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere bir takım patolojik süreçlerin yanı sıra ekstrasellüler matriks yıkımının önemli bir adım olduğu normal gelişim, üreme ve doku yeniden

şekillenmesinde hayati bir rol oynamaktadır (242-245). MMP-9 normal sağlıklı gözlerde kornea epitelinden az miktarda salgınır (246)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, korneanın yeniden şekillenmesinin, matriks metaloproteinazlarının (MMP'ler), özellikle MMP-2 ve MMP9 ün aktivasyonunu içeren sıralı olaylara aracılık ettiğini göstermiştir (247-248). Bu nedenle, MMP'lerin korneadaki düzensiz aktivasyonu kornea yüzey bozukluğuna ve kornea opasitesinin artmasına neden olabilir. Bo-Yie Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CBA türü farelere diyetle verilen a- liopik asitin antioksidant ve antiinflamatuvar aktivitesi, UVB ışını uygulanan kornea ve konjonktiva hücreleri üzerinde değerlendirilmiş , MMP 2 ve 9 ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada oral a- lipoik asidin korneal MMP-9 aktivitesini azalttığı , MMP -2 aktivitesinde ise anlamlı değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir (249).

Osama M. A. Ibrahim; ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada farelerde UV kaynaklı kornea lezyonlarının ciddiyetinin , UV radyasyon dozu ve maruz kalma sayısına bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan günlük UVB dozu 2.73 J / cm² olarak belirlenmiştir. İnsanlarda ve deneysel hayvan modellerinde UVB'ye maruz kalma ile ilişkili fotokeratitin, matriks metaloproteinazların (MMP) artmış ekspresyonu, kornea stromal degradasyonu ve apoptoz indüksiyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (250).

J Surg Res. Ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada siyatik sinir hasarı oluşturdukları ratlara citicoline enjekte edildiğinde kontrol grubuna göre MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinde azalma olduğunu ve akson yenilenmesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Citicoline tedavisinin travma oluşturulduktan hemen sonra periferik sinir sistemine uygulandığında myelinli akson sayısını arttırdığını belirtmişlerdir. Citicoline uygulanmasının sinir sistemi, akciğer, veya bağırsak hastalıklarında dejeneratif süreçte yararı kanıtlanmıştır (251-253). Citicoline etkisi için, fosfolipid sentezindeki artışın yanı sıra apoptotik aktivite ve proinflamatuvar sitokin üretimindeki azalmayı da içeren çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır.

Çalışmamızda citicoline damla ve UVB nin birlikte uygulandığı grupta , sadece UVB ışını uygulanan gruba göre MMP- 9 ve MMP -2 ekspresyonunda anlamlı ölçüde azalma olduğunu tespit ettik. Kornea epitel iyileşmesinde MMP-9 ekspresyonunun baskılanmasının önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür.

UVB nin neden olduğu kornea patolojisinin önlenmesi ve tedavisinde ana savunma mekanizması doğal antioksidanların endojen seviyesini arttırmak ve reaktif oksijen metabolitlerinin üretimini azaltmaktır .Bir çok çalışmada SOD , katalaz , glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ve glutatyon gibi enzim olmayan antioksidanların oksidatif strese karşı etkileri gösterilmiştir (254).

Kayda değer miktardaki çalışma hidrojen peroksit , süperoksit anyonları , hidroksil radikalleri, gibi UVB kaynaklı reaktif oksijen türlerinin peroksidasyona yol açtığını bildirmekte (255) ve bu radikallerin protein veya lipitlerle reaksiyon göstererek membran lipit peroksidasyonuna ve en sonunda hücre nekrozuna yol açtığını bildirmektedir (256,257) .

Chia-Fang Tsai, ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı çalışmada 5 gün süreyle 560 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ gücünde korneal UVB hasarı uygulanmış ve dunaliella salina(D. Salina) bitkisi ile inkübe edilmiştir. D. Salina ile inkübe edilen grupta GSH , GSH-Px, SOD , katalaz seviyelerinin arttığı , MDA seviyesinin ise kontrol grubuna göre azaldığı izlenmiştir. Bu etkinin yüksek D salina dozlarında daha belirgin olduğu görülmüştür. Benzer bir model oluşturarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda citicoline içeren damlanın doğal antioksidan enzimlerden superoksit dismutaz ve katalaz miktarını arttırarak ve enzimatik olmayan antioksidan maddelerden glutatyon seviyesinde artış oluşturarak oksidatif stresi azalttığını gösterdik.

Citicoline in nöroprotektif etkisinin incelendiği çalışmalarda serebral iskemi hasarından sonra citicoline in tükenmiş hücre membranı fosfolipitlerini restore ettiği (sfingolmiyelin ,fosfotidilkolin ve kardiyolipin gibi) gösterilmiştir. Ek olarak reperfüzyon hasarı sonrası citicoline in glutatyon ve glutatyon redüktaz aktivitesini arttırdığı bu şekilde oksidatif stresin azalmasına katkıda bulunduğu belirtilmiştir (258).

Fosfotidilkolin biyosentezinde ara madde olan citicoline in intrakraniyal yaralanmalarda ve reperfüzyon hasarı sonrası glutatyon seviyesini arttırdığı izlenmiştir (258). Tüm bu etkiler citicolinin membran fosfolipitlerinin yapışması ile açıklanmaktadır.

Gözün diğer tabakalarını UVB hasarından korumada görevli ilk tabaka lipitler açısından zengin olan korneadır. Çeşitli doku yaralanmaları , hücre ölümü ve birçok akut ve kronik hastalığın ilerlemesi ile ilgili oksidatif stresin başlamasının genellikle artan lipit peroksidasyonunu indüklediğine inanılmaktadır (259,260) MDA biyolojik membranların çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ana reaktif bir aldehittir (32). Korneadaki MDA seviyesindeki artış, peroksidasyonun artmasına neden olarak doku hasarına ve antioksidan savunma mekanizmalarının aşırı serbest radikal engellemede başarısız olmasına yol açmaktadır (260) .

Literatürde citicoline içeren tedavilerin çeşitli dokularda oksidatif stresi ve lipit peroksidasyonunu azalttığı belirtilmiştir (214,261).

Korneadaki UVB ışınına bağlı değişiklikler kornea epitel ve stromasında IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF-a içeren proinflamatuvar sitokinlerin yükselişine büyük ölçüde bağlanabilir (262).

Proinflamatuvar sitokinlerin ve proteazların UVB hasarına uğramış hücreler tarafından salınması ,UVB aracılı kornea iltihabı ve hücre ölümünden oldukça sorumludur (263,264).

Teng MC ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada farelerde korneal UVB hasarı oluşturulmuş, salviyanik asit A sodyum (SAS) isimli Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan bitki oral olarak verilmiş, inflamatuvar mediatörler üzerine etkisi araştırılmıştır (265). SAS profilaktik tedavisinin UVB ye maruz kaldıktan sonra korneadaki yapısal değişiklikleri kontrol grubuna göre azalttığı ve inflamatuvar hasarı önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. İnflamatuvar mediyatörlerden (IL) -1 β , IL-6, monosit kemoatraktan protein-1 ve tümör nekroz faktörü-a oranında azalma görülmüştür.

Cejka C ve arkadaşları yeni zellanda türü tavşan kornealarına 1.0 J/cm² dozunda UVB ışını uygulayarak hasar oluşturmuş ve moleküler hidrojenin tedavi edici mekanizmalarını araştırmışlardır (240). Proinflamatuvar sitokinlerden olan (IL) -1 β ve TGF- β seviyesinin UVB hasarı sonrası moleküler hidrojen uygulanan grupta anlamlı şekilde azaldığı ve kontrol grubuna göre kornea yara iyileşemesinin belirgin olarak daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Büyüme faktörü beta (TGF- β), çok güçlü ve dokuda yaygın bulunan profibrojenik sitokindir ve hemen hemen tüm fibrotik hastalıklarda ve deneysel fibroz modellerinde ekspresyonu artar. TGF- β patolojik durumlarda ROS üretimini arttırırken önemli bir antoksidan olan glutasyon miktarını azaltır. Oksidatif stresin artmasının insanlarda fibrotik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı hipotezini destekleyen birçok araştırma yapılmıştır (266,267). TGF- β nin artan ROS üretimi ile apoptotik süreci indüklediği , antioksidanların TGF- β ile indüklenen apoptozu baskıladığı literatürde gösterilmiştir. (268,269) Bu veriler, ROS'un TGF- β 'nin fibrojenik etkilerine kısmen apoptozu indükleyerek aracılık ettiğini göstermektedir.

Biz çalışmamızda UVB hasarı uygulanan ve citicoline damlatılmayan grupta yüksek oranda TGF- β ekspresyonu olduğunu ve citicoline uygulanan grupta bu ekspresyonun anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. Bu durum citicoline içeren tedavinin oksidatif hasara bağlı artan proinflamatuvar ve inflamatuvar sitokinleri baskılaması ile açıklanabilir. Çalışmamızda citicoline tedavisi alan grupta korneal opasitenin daha az görülmesi, düşük TGF- β seviyesi ile ilişkilendirilmiştir.

Fosfolipitler, hücre zarlarının temel bileşenleridir ve hücrel homeostazın korunması, reseptör işlevi ve enzimatik aktiviteler gibi membran işlevlerinde rol oynarlar (8). İskemi veya hipoksi nedeniyle aktifleşen fosfolipazlar; membran fosfolipidlerinin

parçalanmasına ve hücre membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olurlar (8). Hücrede stres yaratan faktörlerin varlığında fosfolipitlerin yeniden sentezi çok önemlidir. Citicoline in fosfolipitlerin sentezine katkıda bulunduğu, fosfotidilkolinin apoptozunu azalttığı ve antiinflamatuvar özellikler gösterdiği bildirilmiştir (270,271). Citicoline in fosfolipitlerin seviyesini koruyarak inflamasyonu ve apoptotik süreci baskıladığı düşünülmektedir.

Cetinkaya M. ve arkadaşlarının yenidoğan sıçanlarda oluşturduğu nekrotizan enterokolit modelinde; citicoline tedavisinin intestinal hücre hasarı, membran fosfolipit içeriği, inflamasyon ve apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada intraperitoneal olarak citicoline tedavisi alan grupta, diğer inflamatuvar sitokinler ile birlikte proinflamatuvar mediyatörlerden olan (IL) -1 β seviyesinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca SOD ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin tedavi almayan gruba göre dokuda daha yüksek oranda tespit edildiği belirtilmiştir (272).

7. SONUÇLAR

Güneş ışığından kaynaklanan UVB radyasyonun kornea hasarı için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Günümüzde farklı tedaviler, UVB radyasyonuna bağlı oluşan hasarı engellemek ve oluşan komplikasyonların sağaltımında kullanılmak amacıyla denenmektedir.

Bildiğimiz kadarıyla daha önce literatürde citicoline içeren damlanın UV keratitini önleyici etkisi olup olmadığı bildirilmemiştir. Çalışmamızda citicoline içeren damlanın UVB maruziyetinden bir gün önce başlanarak, 8 saatte bir olmak üzere uygulanmasının istatistiksel olarak ultraviyole hasarını önleyici ve azaltıcı etkisinin bulunduğunu gördük. Citicoline damla; epitel iyileşmesini hızlandırmış ve korneal opasifikasyon oluşumunu azaltmıştır. Citicoline tedavisinin; UVB radyasyonuna bağlı oluşan stromal ödem, lökositik infiltrasyon ,epitelyal hasar ve neovaskularizasyon oluşumunu azalttığı histopatolojik incelemelerde gösterdik.

Yapmış olduğumuz immunfloresan boyamalar göstermiştir ki UVB hasar modeli oluşturulmadan önce uygulanmaya başladığımız citicoline tedavisi, MMP-2, MMP-9 aktivitesini baskılamış ve kaspaz aktivitesini azaltarak apoptotik süreci yavaşlatmıştır.

Biyokimyasal incelemeler sonucunda citicoline ile tedavi edilen grupta GSH , SOD, CAT gibi antioksidan moleküllerin düzeyi artarken , bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinin azaldığı görülmüştür. Bu durum citicoline tedavisinin oksidatif hasarı baskılayıcı etkisi ile açıklanabilmektedir.

Gen ekspresyon analizi sonuçlarımızda; citicoline damlanın inflamatuvar ve proinflamatuvar mediyatörlerden IL-1b ve TGF-b düzeyini azalttığını gördük. Bu şekilde citicoline tedavisinin inflamatuvar süreci baskılamada etkili olduğu fikrindeyiz.

Citicoline damlanın UVB radyasyona bağlı inflamasyonun baskılanmasında ve antioksidan mekanizmaların aktifleştirilmesinde oldukça etkili olduğunu düşünmekteyiz. Daha yüksek düzeyde ilaç konsantrasyonları ile gerçekleştirilecek çalışmalarla tedavi etkinliğinin artacağını düşünmekteyiz.



8. ÖZET

Amaç: Ultraviyole B (UVB) hasarına bağlı fotokeratit modelinde citicoline tedavisinin oksidatif hasar ve inflamasyon mekanizmaları üzerine koruyucu etkisini incelemek.

Gereç ve Yöntem: Korneal oksidatif hasar ratların , 560 μ W / cm²'de UVB ışımına maruz kalması ile oluşturuldu. 30 adet ratın sol gözleri çalışmaya alındı ve denekler sham , citicoline ve tedavi grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Sham ve tedavi grubuna UVB hasar modeli oluşturuldu. Tedavi ve citicoline grubundaki ratlara hasar modeli oluşturulmadan 1 gün önce başanarak citicoline damla günde 3 kez 7 gün süreyle damlatıldı. Tüm deneklerin 3. ve 8. Gün epitel defekti ve opasifikasyon (OP) değerlendirilmesi amacıyla ön segment (ÖS) fotoğrafları çekildi. 8. gün denekler sakrifiye edildi ve alınan kornealar histoloji , biyokimya ve genetik laboratuvarında değerlendirildi.

Bulgular: Tedavi ve sham grubunun epitel defektleri karşılaştırıldığında, tedavi grubunda ilk vizitten itibaren daha az epitel defekti olduğu ve epitel iyileşmesinin daha hızlı olduğu görüldü (p:0.038 , p:0,013). Deney süresince korneal OP tedavi grubunda sham grubuna göre klinik olarak anlamlı olacak şekilde daha az olduğu görüldü (p: 0.037). HP incelemede; epitel kaybı, vaskularizasyon, ödem, inflamasyon , epitelyal proliferasyon tedavi grubunda sham grubuna göre daha azdı (p< 0.001). Konfokal mikroskop ile yapılan immün floresan incelemede kaspaz 3 , MMP-2, MMP-9 boyamalarda tedavi grubunda sham grubuna göre anlamlı fark vardı. VEGF, IL1b ve TGFb gen ekspresyon analizinde tedavi grubunda inflamasyon markerları sham grubuna göre daha düşüktü (p<0.05, p< 0.01, p:<0.01). Biyokimyasal incelemelerde Malondialdehit (MDA) , glutatyon (GSH) , süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri incelendi . GSH , SOD tedavi grubunda , sham grubuna oranla daha yüksek bulundu (p<0.05 , p<0.05) . MDA düzeyi shame grubunda diğer gruplara göre daha yüksekti (p<0.05).

Sonuç: Citicoline tedavisinin birçok dokuda antioksidan aktiviteyi arttırdığı literatürde belirtilmiş ancak kornea dokusunda yara iyileşmesi üzerine etkisi henüz gösterilmemiştir. Çalışmamızda citicoline tedavisinin UVB korneal hasarı sonrası oksidatif stresin baskılaması ve iflamasyon kontrolü açısından etkili olabileceğini gösterildi.

9. ABSTRACT

Purpose: The aim of the present study was to investigate the protective effects of citicoline on UVB radiation-induced corneal oxidative damage in rat model

Materials and Methods: Corneal oxidative damage was induced by exposure to UVB radiation at 560 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. The left corneas of 30 albino rats were included in the study. The animals were divided into three equal groups; Sham group, Citicoline group, and treatment group. The healthy corneas of 10 randomly selected animals were also considered as healthy group. To induce disorders in the corneal tissues, the eyes of the animals in sham and treatment groups were exposed to UVB irradiation. Citicoline ophthalmic solution was instilled in rat eye immediately before UVB-exposure and for the following 7 days every 8 hours starting 1 hour after exposure. Anterior segment corneal photographs were taken to evaluate epithelial healing, opacification of all subjects on days 3 and 8. After the last visit on day 8, the animals were sacrificed and their corneas were removed from limbus border. The removed corneas were sent to the histology laboratory, biochemistry and genetics.

Results: When the epithelial defects of the treatment and sham groups were compared, it was observed that less epithelial defects were formed and epithelial healing was faster in the treatment group from the first visit ($p:0.038$, $p:0.013$). Corneal opacification was less in the treatment group than in the sham group ($p: 0.037$). In the histopathological examination epithelial loss, vascularization, edema, inflammation, epithelial proliferation were less than in the sham group ($p < 0.001$). Immunofluorescence examination with confocal microscopy showed a significant difference in caspase 3, MMP-2, MMP-9 staining compared to sham group. In VEGF, IL1b and TGFb gene expression analysis, inflammation markers were lower in the treatment group than in the sham group ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) levels were examined in biochemical examinations. GSH and SOD were higher in the treatment group than in the sham group ($p < 0.05$, $p < 0.05$). MDA level was higher in sham group than other groups ($p < 0.05$).

Conclusions: It has been reported in the literature that Citicoline treatment increases antioxidant activity in many tissues. However, its effect on wound healing in corneal tissue has not yet been demonstrated. In our study, it was shown that citicoline treatment may be effective in suppressing oxidative stress and controlling inflammation after UVB corneal injury.

KAYNAKLAR

1. Kolozsvári L, Nogradi A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2165–8 (2002).
2. Chen, M. H., Tsai, C. F., Hsu, Y. W., & Lu, F. J. Epigallocatechin gallate eye drops protect against ultraviolet B-induced corneal oxidative damage in mice. *Molecular vision*, 20, 153–162 (2014).
3. Pourzand C, Tyrrell RM. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 70:380–90 (1999)
4. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 32:671–83 (1994)
5. Mencucci, R, Favuzza, E.; Boccacini, C.; Lapucci, A.; Felici, R.; Resta, F.; Chiarugi, A.; Cavone, L. CoQ10-containing eye drops prevent UVB-induced cornea cell damage and increase cornea wound healing by preserving mitochondrial function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55 7266-7271 (2014).
6. Zazueta C., Buelna-Chontal M., Macias-López A., Román-Anguiano N.G., González-Pacheco H., Pavón N. Cytidine-5'-diphosphocholine protects the liver from ischemia/reperfusion injury preserving mitochondrial function and reducing oxidative stress. *Liver Transplantation* 24(8):1070–1083 (2018)
7. Qian, Ke, Yi Gu, Yumei Zhao, Zhenzong Li and Ming Sun. Citicoline Protects Brain Against Closed Head Injury in Rats Through Suppressing Oxidative Stress and Calpain Over-Activation. *Neurochemical Research* 39 1206-1218 (2014)
8. Griesemer D, Mautes AM Closed head injury causes hyperexcitability in rat hippocampal CA1 but not in CA3 pyramidal cells. *J Neurotrauma* 24(12):1823–1832. doi:10.1089/neu.2006.0237 (2007)
9. Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry.* 80,12±23 (2002)

10. Rufer, F., Schroder, A., and Erb, C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* 24, 259-261 (2005)
11. DelMonte, D. W., and Kim, T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 37, 588-598 (2011)
12. Ehlers, N., Heegaard, S., Hjortdal, J., Ivarsen, A., Nielsen, K., and Prause, J. U. Morphological evaluation of normal human corneal epithelium. *Acta Ophthalmol.* 88, 858-861 (2010)
13. Klyce, S. D., and Crosson, C. E. Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review. *Curr Eye Res* 4, 323-331(1985)
14. Hanna, C., and O'Brien, J. E. Cell production and migration in the epithelial layer of the lens. *Arch Ophthalmol* 66, 103-107 (1961)
15. Klyce, S. D. Transport of Na, Cl, and water by the rabbit corneal epithelium at resting potential. *Am J Physiol* 228, 1446-1452 (1975)
16. Wiley, L., SundarRaj, N., Sun, T. T., and Thoft, R. A. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 594-602 (1991)
17. Goldberg, M. F., and Bron, A. J. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 80, 155-171(1982)
18. Melles, G. R., Binder, P. S., Moore, M. N., and Anderson, J. A. Epithelial-stromal interactions in human keratotomy wound healing. *Arch Ophthalmol* 113, 1124-1130 (1995)
19. Gordon, M. K., Foley, J. W., Birk, D. E., Fitch, J. M., and Linsenmayer, T. F. Type V collagen and Bowman's membrane. Quantitation of mRNA in corneal epithelium and stroma. *J Biol Chem* 269, 24959-24966 (1994)
20. Wilson, S. E., and Hong, J. W. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* 19, 417-420 (2000)
21. Meek, K. M., and Boote, C. The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma. *Prog Retin Eye Res* 28, 369-392 (2009)

- 22- Nishida T. In: Cornea. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (Eds). Cornea Volume 1. 2nd ed. Philadelphia Elsevier Inc.3-22.-21. (2005)
- 23- Kanski J. In: Kornea ve Sklera. Kanski J (Ed.). (Çeviri: Orağlı K.). Klinik Oftalmoloji. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 94-155 (2001)
- 24- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. Sep;120(9):1778-85 (2013)
25. Gipson, I. K., and Joyce, N. C. Anatomy and cell biology of the cornea, superficial limbus, and conjunctiva., PA, Saunders, Philadelphia (2008)
26. Johnson, D. H., Bourne, W. M., and Campbell, R. J. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol* 100, 1942-1947 22 (1982)
27. Bourne, W. M. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond)* 17, 912-918 (2003)
28. Geroski, D. H., Matsuda, M., Yee, R. W., and Edelhauser, H. F. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 92, 759-763 (1985)
29. Bourne, W. M., Nelson, L. R., and Hodge, D. O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 779-782 (1997)
30. Yee, R. W., Matsuda, M., Schultz, R. O., and Edelhauser, H. F. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 4, 671-678 (1985)
31. Corneal endothelial photography. Three-year revision. American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 104, 1360-1365 (1997)
32. Whikehart, D. R. Biochemistry of the eye, Butterworth-Heinemann, Boston, MA (2004)
33. Tiffany, J. M. Tears and conjunctiva, Chapman & Hall, London (1997)
- 34- Messmer EM. Foster CS. Destructive comeal and scleral disease associated with rheumatoid arthritis. *Cornea* 14:408 (1995)
- 35- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 Kornea sf. 28. (2009)
- 36- Brazzell RK. Stern ME, aquavella et.al human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 32: 336-40. 82 (1991)

- 37- 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* 33: 1987-1995 (1992)
- 38- Rawe IM, Tuft SJ, Meek KM. Proteoglycan and collagen morphology in superficially scarred rabbit cornea. *Histochem J* 24:311-8 (1992)
- 39- Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11 *Kornea* (2009) sf. 27.
40. Zander, E., and Weddell, G. Observations on the innervation of the cornea. *J Anat* 85, 68-99 v
41. Marfurt, C. F., Jones, M. A., and Thrasher, K. Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res* 66, 437-448 (1992)
42. Tervo, T., Joo, F., Huikuri, K. T., Toth, I., and Palkama, A. Fine structure of sensory nerves in the rat cornea: an experimental nerve degeneration study. *Pain* 6, 57-70 (1992)
43. Muller, L. J., Vrensen, G. F., Pels, L., Cardozo, B. N., and Willekens, B. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 985-994 (1997)
44. Oliveira-Soto, L., and Efron, N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 20, 374-384 (2001)
45. Pfister RR, Burstein N. The alkali burned cornea I. Epithelial and stromal repair. *Exp Eye Res.* 23: 519-535 (1976)
46. Allen VD, Malinovsky V. Management of neurotrophic keratopathy. *Cont Lens Anterior Eye.* 26: 161-165 (2003)
47. Bikbova G, Oshitari T, Tawada A, Yamamoto S. Corneal changes in diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 8: 294-302 (2012).
48. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol.* 51: 5-15 (2003).
49. Crosson CE, Klyce SD, Beuerman RW. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27: 464-473 (1986).
50. Zieske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27: 1-7 (1986).

51. Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 2495-2500 (2000).
52. Hanna C. Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in the rabbit and the rat. *Am J Ophthalmol.* 61: 55-63 (1966).
53. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Keough M. Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30: 425-434 (1989).
54. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea.* 24: S2-2S11 (2005).
55. Wilson SE, Kim WJ. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 220-226 (1998).
56. Robb Rm, Kuwabara T. Corneal wound healing. I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds. *Arch Ophthalmol.* 68: 636-642 (1962).
57. Kenyon KR. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 83: 610-663 (1985).
58. Gan L, Fagerholm P, Kim HJ. Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 575- 581 (1999).
59. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, Mcdowall AW, Vital M, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Experimental Eye Research.* 62: 325-337 (1996).
60. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18: 529-551 (1999).
61. Malecaze F, Simorre V, Chollet P, Tack JL, Muraine M, Le Guellec D, et al. Interleukin-6 in tear fluid after photorefractive keratectomy and its effects on keratocytes in culture. *Cornea.* 16: 580-587(1997).
62. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 13: 7-12 (2005).

63. Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea. *Dev Biol.* 147: 425-439 (1991).
64. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 258: 1798-1801 (1992).
65. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M, Champeau EJ, Meyer LA, Edelhauser HF. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26: 1191- 1201 (1985).
66. Faure JP, Yong ZA KIM. Observations on the effects of alloxan on the cornea of the guinea pig. I. Destruction and regeneration of the endothelium. *Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol.* 26: 677-686 (1966).
67. Matsuda M, Suda T, Manabe R. Serial alterations in endothelial cell shape and pattern after intraocular surgery. *Am J Ophthalmol.* 98: 313-319 (1984).
68. Khodadoust AA, Green K. Physiological function of regenerating endothelium. *Invest Ophthalmol.* 15: 96-101 (1976)
69. Chi HH, Kelman CD. Effects of freezing on ocular tissues. I. Clinical and histologic study of corneal endothelium. *Am J Ophthalmol.* 61: 630- 641 (1966).
70. Morton PL, Ormsby HL, Basu PK. Healing of endothelium and Descemet's membrane of rabbit cornea. *Am J Ophthalmol.* 46: 62-67 (1958).
71. Yu FS, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull.* 81: 229-235 (2010).
72. Lu L, Reinach PS, Kao WW. Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med (Maywood).* 226: 653-664 (2001).
73. Chandrasekher G, Bazan HE. Corneal epithelial wound healing increases the expression but not long lasting activation of the p85alpha subunit of phosphatidylinositol-3 kinase. *Curr Eye Res.* 18: 168-176 (1999).
74. Sotozono C, He J, Matsumoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S. Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res.* 16: 670-676 (1999).

75. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 153: 1-5 (1992).
76. Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC. Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res.* 57: 293-300 (1993).
77. Weng J, Mohan RR, Li Q, Wilson SE. IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: interleukin-1 beta expression in the cornea. *Cornea.* 16: 465-471(1997).
78. Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32: 2441-2454 (1991).
- 79 Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, Helena MC, Baerveldt F, Wilson SE. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res.* 65: 575-589 (1997).
80. Cubitt CL, Tang Q, Monteiro CA, Lausch RN, Oakes JE. IL-8 gene expression in cultures of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34: 3199-3206 (1993).
81. Mukaida N, Harada A, Yasumoto K, Matsushima K. Properties of proinflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol Immunol.* 36: 773-789(1992).
82. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea.* 26: S70-74 (2007).
83. Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 1327-1336 (2000).
84. Elnor VM, Strieter RM, Pavilack MA, Elnor SG, Remick DG, Danforth JM, et al. Human corneal interleukin-8. IL-1 and TNF-induced gene expression and secretion. *Am J Pathol.* 139: 977-988 (1991).
85. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 20: 625-637 (2001).

86. Wilson SE, He YG, Weng J, Zieske JD, Jester JV, Schultz GS. Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 59: 665-678 (1994).
87. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res.* 68: 377-397 (1999).
88. Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 1063-1069 (2000).
89. Kruse FE, Tseng SC. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34: 1963-1976 (1993).
90. Wilson SE, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 2185-2190 (1999).
91. Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, et al. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31: 1773-1778 (1990).
92. Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 1346-1355 (2000).
93. Tuli SS, Liu R, Chen C, Blalock TD, Goldstein M, Schultz GS. Immunohistochemical localization of EGF, TGF- α , TGF- β , and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation. *Curr Eye Res.* 31: 709-719 (2006).
94. Denk PO, Knorr M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 235: 530-534 (1997).
95. Andresen JL, Ehlers N. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor- α , acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor- β . *Curr Eye Res.* 17: 79-87 (1998).
96. Kamiyama K, Iguchi I, Wang X, Imanishi J. Effects of PDGF on the migration of rabbit corneal fibroblasts and epithelial cells. *Cornea.* 17: 315-325 (1998).

97. Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM. Induction of alphasmooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea*. 15: 505-516 (1996).
98. Nishida K, Kinoshita S, Yokoi N, Kaneda M, Hashimoto K, Yamamoto S. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta , -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35: 3289-3294 (1994).
99. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res*. 65: 391-396 (1997).
100. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34: 2544-2561 (1993).
101. Xu KP, Ding Y, Ling J, Dong Z, Yu FS. Wound-induced HB-EGF ectodomain shedding and EGFR activation in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45: 813-820 (2004).
102. Block ER, Matela AR, Sundarraj N, Iszkula ER, Klarlund JK. Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints: role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling. *J Biol Chem*. 279: 24307-24312 (2004).
103. Boucher I, Yang L, Mayo C, Klepeis V, Trinkaus-Randall V. Injury and nucleotides induce phosphorylation of epidermal growth factor receptor: MMP and HB-EGF dependent pathway. *Exp Eye Res*. 85: 130-141 (2007).
104. Xu KP, Riggs A, Ding Y, Yu FS. Role of ErbB2 in Corneal Epithelial Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45: 4277-4283 (2004).
105. Yin J, Yu FS. Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295: C378-387 (2008).
106. Zhang Y, Akhtar RA. Epidermal growth factor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 38: 1139-1148 (1997).
107. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 76: 521-542 (2003).

108. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 59: 597-605 (1994).
109. Chan KY, Haschke RH. Isolation and culture of corneal cells and their interactions with dissociated trigeminal neurons. *Exp Eye Res.* 35: 137-156 (1982).
110. Baker KS, Anderson SC, Romanowski EG, Thoft RA, SundarRaj N. Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34: 137-144 (1993).
111. Nakamura M, Nishida T, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ. Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. *Exp Eye Res.* 65: 321-329 (1997).
112. Nakamura M, Nagano T, Chikama T, Nishida T. Up-regulation of phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin by combination of substance P and IGF-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 242: 16-20 (1998).
113. Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol.* 169: 159-166 (1996).
114. Liu GS, Trope GE, Basu PK. Beta adrenoceptors and regenerating corneal epithelium. *J Ocul Pharmacol.* 6: 101-112 (1990).
115. Reidy JJ, Zarzour J, Thompson HW, Beuerman RW. Effect of topical beta blockers on corneal epithelial wound healing in the rabbit. *Br J Ophthalmol.* 78: 377-380 (1994).
116. Er H. The effect of topical parasympathomimetics on corneal epithelial healing in rabbits. *Doc Ophthalmol.* 93: 327-335 (1997).
117. Mindel JS, Mittag TW. Variability of choline acetyltransferase in ocular tissues of rabbits, cats, cattle and humans. *Exp Eye Res.* 24: 25-33 (1977).
118. Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32: 3221-3237 (1991).
119. Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 161: 3340-3346 (1998).

120. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14: 163-176 (2000).
121. Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, et al. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem.* 2002; 277: 2065-2072.
122. Daniels JT, Geerling G, Alexander RA, Murphy G, Khaw PT, Saarialho-Kere U. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. *Exp Eye Res.* 77: 653-664 (2003).
123. Mohammed AA, Ibrahim AA. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanism. *Saudi Pharm J.* 12:1-18 (2004).
124. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr.* 4:350-60 (1998).
125. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 32:671-83 (1994).
126. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull.* 49:481-93 (1993).
127. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 54:176-86 (2001).
128. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr.* 4:350-60 (1998).
129. Liu T, Stern A, Roberts LJ. The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci.* 6:226-35 (1999).
130. Ke C., Xiaoling L., Keyi X., Ven M., Progress in neuropsychopharmacology and biological psychiatry 28 (5), 771-799 (2004).
131. Kumar S. Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research.* 2 (1): 129-135 (2011).
132. Gebiki JM and Bielski. *J Am Chem Soc.* 103(23), 7020-7022 (1981).

133. Cutler RG, Antioxidants, aging and longevity, In: Free Radicals in Biology, Pryor, WA, Vol 6 Ed, Academic Press, Orlando. FL. 371-428 (1984).
134. Halliwell B. How to characterize an antioxidant- An update. *Biochem Soc Symp.* 61:73–101(1995).
135. Shi HL, Noguchi N, Niki N. Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol and α - tocopherol, against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 27:334–46 (1999).
136. Levine M, Ramsey SC, Daruwara R. Criteria and recommendation for Vitamin C intake. *JAMA.* 1991;281:1415–23.
137. Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med.*15:77–96 (1993).
138. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200:248–54 (1992).
139. Niki E, Poli G, Albano E, Dianzani MU. Antioxidant defenses in eukaryotic cells. Free radicals: From basic science to medicine. 365–73 (1993) .
140. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82:291–5 (1997).
141. Magnenat JL, Garganoam M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: A lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect.* 106:1219–28 (1998).
142. Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 33:337–49 (2002).
143. Banniste J, Bannister W, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.* 22:111–80 (1987).
144. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 26:340–52 (2005).
145. Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Djinovic Carugo K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci.* 101:8569–74 (2004).

146. Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6:145–50 (2001).
147. Corpas FJ, Fernández-Ocaña A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, et al. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol.* 47:984–94 (2006).
148. Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, et al. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 283:16169–77 (2008).
149. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61:192–208 (2004).
150. Gaetani G, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood.* 87:1595–9. (1996).
151. Eisner T, Aneshansley DJ. Spray aiming in the bombardier beetle: Photographic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:9705–9 (1999).
152. Meister A, Anderson M. Glutathione *Annu Rev Biochem.* 52:711–60 (1983).
153. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 27:951–65 (1999).
154. Hayes J, Flanagan J, Jowsey I. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:51–88 (2005).
155. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm.* 61:241–66 (2001).
156. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.* 269:9397–400 (1994).
157. Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 22:18–35 (2003).
158. Meister A, Anderson A. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52:711 60 (1983).
159. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 1988;263:17205–8.

160. Matill HA. Antioxidants. *Annu Rev Biochem.* 16:177–92 (1947).
161. Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 46:695–729 (1992).
162. Nassar E, Mulligan C, Taylor L, Kerksick C, Galbreath M, Greenwood M, et al. Effects of a single dose of N-Acetyl-5-methoxytryptamine (Melatonin) and resistance exercise on the growth hormone/IGF-1 axis in young males and females. *J Int Soc Sports Nutr.* 4:14 (2007).
163. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 29:363–72 (1997).
164. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol Signals Recept.* 9:137–59 (2000).
165. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.* 57:43–56 (2001).
166. Brigelius-Flohe R, Traber M. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J.* 13:1145–55 (1999).
167. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 43:4–15 (2007).
168. Wang X, Quinn P. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.* 38:309–36 (1999).
169. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 65:166–76 (2002).
170. World Health Organization, and International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Global Solar UV Index: A Practical Guide; World Health Organization: Geneva, Switzerland.
171. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer. Volume 55: Solar and Ultraviolet Radiation. Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol55/mono55.pdf> (accessed on 17 October 2014).

172. Wargent, J.J.; Jordan, B.R. From ozone depletion to agriculture: understanding the role of UV radiation in sustainable crop production. *New Phytolo.* 197, 1058–1076 (2013).
173. Parrish, J.A.; Jaenicke, K.F.; Anderson, R.R. Erythema and melanogenesis action spectrum of normal human skin. *Photochem. Photobiol.* 36, 187–191 (1982).
174. Gilchrest, B.A. Actinic injury. *Annu. Rev. Med.* 41, 199–210 (1990).
175. Meeran, S.M.; Punathil, T.; Katiyar, S.K. IL-12 deficiency exacerbates inflammatory responses in UV-irradiated skin and skin tumors. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2716–2727 (2008).
176. Farrukh, M.R.; Nissar, U.A.; Afnan, Q.; Rafiq, R.; Sharma, L.; Amin, S.; Kaiser, P.; Sharma, P.; Tasduq, S. Oxidative stress mediated Ca²⁺ release manifests endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response in UV-B irradiated human skin cells. *J. Dermatol. Sci.* 75, 24–35 (2014).
177. Osipov, A.N.; Smetanina, N.M.; Pustovalova, M.V.; Arkhangelskaya, E.; Klokov, D. The formation of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites in human blood lymphocytes exposed to 365-nm UVA radiation. *Free Radic. Biol. Med.* 73, 34–40 (2014).
178. Balk, S.J. Ultraviolet radiation: a hazard to children and adolescents. *Pediatrics* 127, 588–597 (2011).
179. Lee, C.H.; Wu, S.B.; Hong, C.H.; Yu, H.S.; Wei, Y.H. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6414–6435 (2013).
180. Damian, D.L.; Barnetson, R.S.; Halliday, G.M. Low dose UVA and UVB have different time courses for suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans. *J. Invest. Dermatol.* 112, 939–944 (1999).
181. Nghiem, D.X.; Kazimi, N.; Cldesdale, G.; Ananthaswamy, H.N.; Kripke, M.L.; Ullrich, S.E. Ultraviolet A radiation suppresses an established immune response: Implications for sunscreen desigh. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1193–1199 (2001)
182. Reme, C.; Reinboth, J.; Clausen, M.; Hafezi, F. Light damage revisited: Converging evidence, diverging views? *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 234, 2–11 (1996).

183. Clement-Lacroix, P.; Michel, L.; Moysan, A.; Morliere, P.; Dubertret, L. UVA-induced immune suppression in human skin: Protective effect of vitamin E in human epidermal cells in vitro. *Br. J. Dermatol.* 134, 77–84 (1996).
184. Zigman, S.L. UVA photobiology. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 16, 161–165 (2001).
185. J. Mitchell and R.J. Cenedella, “Quantitation of ultraviolet light absorbing fractions of the cornea,” *Cornea*. vol. 14, no. 3, pp. 266–272 (1995).
186. Kolozsvári L, Nógrádi A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2165–8 (2002).
187. Podskochy A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage. *Acta Ophthalmol Scand.* 82:714–717 (2004).
188. Ringvold A. The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Exp. Eye Res.* 62:261–4. doi: 10.1006/exer.1996.0031 (1996).
189. Ringvold A. In vitro evidence for UV-protection of the eye by the corneal epithelium mediated by the cytoplasmic protein, RNA, and ascorbate. *Acta Ophthalmol Scand.* 75: 496–498 (1997).
190. Brubaker RF, Bourne WM, Bachman La, McLaren JW. Ascorbic acid content of human corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:1681–3 (2000).
191. Bilgihan A, Bilgihan K, Toklu Y, Konuk O, Yis O, Hasanreisoglu B, et al. Ascorbic acid levels in human tears after photorefractive keratectomy, transepithelial photorefractive keratectomy, and laser *in situ* keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 27:585–8 (2001).
192. Bilgihan A., Bilgihan K., Yis O., Sezer C., Akyol G., Hasanreisoglu B. Effects of topical vitamin E on corneal superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and polymorphonuclear leucocyte infiltration after photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol. Scand.* 81:177–180. doi: 10.1034/j.1600-0420.2003.00042.x (2003).
193. Atalla LR, Sevanian A, Rao NA. Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in ocular tissue. *Curr Eye Res.* 7(10):1023–1027 (1988).
194. Abedinia M, Pain T, Algar EM, Holmes RS. Bovine corneal aldehyde dehydrogenase: the major soluble corneal protein with a possible dual protective role for the eye. *Exp Eye Res.* 51: 419–26 (1990).

195. Downes JE, Vandeberg JL, Hubbard GB, Holmes RS. Regional distribution of mammalian corneal aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. *Cornea*. 15:560–566. doi: 10.1097/00003226-199211000-00013 (1992).
196. Uma L, Hariharan J, Sharma Y, Balasubramanian D. Effect of UVB radiation on corneal aldehyde dehydrogenase. *Curr Eye Res*. 15:685–90 (1996).
197. Piatigorsky J, “Enigma of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea :the“refracton”hypothesis. *Cornea*. vol.20,no.8,pp.853–858 (2001).
- 198 Young A.R., Acute effects of UVR on human eyes and skin , *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.vol.92,no.6,pp. 80–85(2006).
199. Cullen A.P. , Photokeratitis and other phototoxic effects on the cornea and conjunctiva. *International Journal of Toxicology*. vol.21,no.6,pp.455–464(2002).
200. Doughty M.J., Cullen A.P. Long-term effects of a single dose of ultraviolet-B on albino rabbit cornea—II. Deturgescence and fluid pump assessed in vitro, *Photochemistry and photobiology* vol.51,no.4,pp.439–449 (1990).
201. Podskochy A., Gan L., Fagerholm P. Apoptosis in UV exposed rabbit corneas. *Cornea*,vol.19,no.1,pp.99–103(2000).
202. Kennedy M., Kim K.H., Hartenetal B. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* vol. 38, no.12,pp.2483–2491 (1997).
203. Hong J.-W., Liu J. J., Lee J.-S. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. vol.42,no.12,pp.2795–2803 (2001).
204. Āejkov´a J., Ardan T., Āejka C., KovaĀeva J., Z´idek Z. Irradiation of the rabbit cornea with UVB rays stimulates the expression of nitric oxide synthase-generated nitric oxide and the formation of cytotoxic nitrogen-related oxidants. *Histology and Histopathology* vol.20,no.2,pp.467–473 (2005).
205. Cejkova J., Stipek S., Crkovska J., Ardan T. Changes of antioxidant enzymes in the cornea of albino rabbits irradiated with UVB rays. Histochemical and biochemical study *Histology and Histopathology*. vol.15,no.4,pp.1043–1050,2000.

206. Lodovici M., Caldini S., Morbidelli L., Akpan V., Ziche M., Dolara P. Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. *Toxicology*. 255, no. 1-2, pp. 1–5, (2009).
207. Downes J.E., Swann P.G., Holmes R.S. Ultraviolet light induced pathology in the eye: associated changes in ocular aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities. *Cornea* vol. 12, no. 3, pp. 241–248, (1993).
208. Tessem M.-B., Bathen T.F., Ćejkov' a J., Midelfart A., Effect of UV-A and UV-B irradiation on the metabolic profile of aqueous humor in rabbit analyzed by ¹H NMR spectroscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* vol. 46, no. 3, pp. 776–781 (2005).
209. Tessem M.-B., Midelfart A., Ćejkov' a J., Bathen T.F. Effect of UVA and UVB irradiation on the metabolic profile of rabbit cornea and lens analysed by HR-MAS H NMR spectroscopy. *Ophthalmic Research* vol. 38, no. 2, pp. 105–114 (2006).
210. Verhoeff, F. H., L. Bell and C. B. Walker The pathological effects of radiant energy on the eye. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 51, 627–818 (1916).
211. Ren, H. and G. Wilson The effect of ultraviolet-B irradiation on the cell shedding rate of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 72, 447–452 (1994).
212. Grieb P. Neuroprotective Properties of Citicoline: Facts, Doubts and Unresolved Issues. *CNS Drugs*. 28(3):185–193 (2014).
213. Secades JJ. Citicoline: Pharmacological and clinical review, 2010 update. *Revista de neurologie*. 52 Suppl 2(Suppl 2):S1-S62 (2011).
214. Hernández-Esquivel L, Pavón N, Buelna-Chontal M, González-Pacheco H, Belmont J, Chávez E. Citicoline (CDP-choline) protects myocardium from ischemia/reperfusion injury via inhibiting mitochondrial permeability transition. *Life Sci*. 96:53–58. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.026 (2014).
215. Tanito, M.; Takanashi, T.; Kaidzu, S.; Yoshida, Y.; Ohira, A. Cytoprotective effects of rebamipide and carteolol hydrochloride against ultraviolet B-induced corneal damage in mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2980–2985 (2013).

216. Suh MH , Kwon JW, Wee WR, Han YK, Kim JH, Lee JH. Protective effect of ascorbic Acid against corneal damage by ultraviolet B irradiation: a pilot study. *Cornea*. Sep;27(8):916-22. (2008)
217. Schein, O.D. Phototoxicity and the cornea. *J Natl. Med. Assoc.* 84, 579–583 (1992).
218. Kennedy, M.; Kim, K.H.; Harten, B.; Brown, J.; Planck, S.; Meshul, C.; Edelhauser, H.; Rosenbaum, J.T.; Armstrong, C.A.; Ansel, J.C. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 2483–2491 (1997).
219. Alexander, G.; Carlsen, H.; Blomhoff, R. Corneal NF-kappaB activity is necessary for the retention of transparency in the cornea of UV-B-exposed transgenic reporter mice. *Exp. Eye Res.* 82, 700–709 (2006).
220. Pauloin, T.; Dutot, M.; Joly, F.; Warnet, J.M.; Rat, P. High molecular weight hyaluronan decreases UVB-induced apoptosis and inflammation in human epithelial corneal cells. *Mol. Vis.* 15, 577–583 (2009).
221. Wu K, Kojima M, Shui YB, et al. Ultraviolet B-induced corneal and lens damage in guinea pigs on low-ascorbic acid diet. *Ophthalmic Res.* 30:277–283 (2004).
222. Iulia, C., Ruxandra, T., Costin, L. B., & Liliana-Mary, V. Citicoline - a neuroprotector with proven effects on glaucomatous disease. *Romanian journal of ophthalmology*, 61(3), 152–158 (2017).
223. Chang, J.H.; Gabison, E.E.; Kato, T.; Azar, D.T. Corneal neovascularization. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 12, 242–249 (2001).
224. Rubio, R.G.; Adamis, A.P. Ocular Angiogenesis: Vascular Endothelial Growth Factor and Other Factors. *Dev. Ophthalmol.* 55, 28–37 (2006).
225. Chen SJ, Lee CJ, Lin TB, et al. Inhibition of Ultraviolet B-Induced Expression of the Proinflammatory Cytokines TNF- α and VEGF in the Cornea by Fucoxanthin Treatment in a Rat Model. *Mar Drugs*.14(1):13. Published 2016 Jan 7. doi:10.3390/md14010013 (2016).
226. Edelman, J.L.; Castro, M.R.; Wen, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1112–1123 (1999).

227. Imanishi, J.; Kamiyama, K.; Iguchi, I.; Kita, M.; Sotozono, C.; Kinoshita, S. Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* 19, 113–129 (2000).
228. Lai, C.M.; Spilsbury, K.; Brankov, M.; Zaknich, T.; Rakoczy, P.E. Inhibition of corneal neovascularization by recombinant adenovirus mediated antisense. VEGF RNA. *Exp. Eye Res.* 75, 625–634 (2002).
229. Klenkler, B.; Sheardown, H. Growth factors in the anterior segment: Role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp. Eye Res.* 79, 677–688 (2004).
230. H.-Y. Youn, D.J. McCanna, J.G. Sivak, and L.W. Jones. In vitro ultraviolet-induced damage in human corneal, lens, and retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision* vol.17, pp.237–246, (2011).
231. Du S, Han B, Li K, Zhang X, Sha X, Gao L. Lycium barbarum Polysaccharides Protect Rat Corneal Epithelial Cells against Ultraviolet B-Induced Apoptosis by Attenuating the Mitochondrial Pathway and Inhibiting JNK Phosphorylation. *Biomed Res Int.* 2017:5806832. doi:10.1155/2017/5806832 (2017).
232. Krupinski J., Ferrer I., Barrachina M., Secades J. J., Mercadal J., Lozano R. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology.* 42(6):846–854. doi: 10.1016/S0028-3908(02)00032-1 (2002).
233. Schuettauf F, Rejdak R, Thaler S, Bolz S, Lehaci C, Mankowska A, Zarnowski T, Junemann A, Zagorski Z, Zrenner E, Grieb P. Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat. *Exp Eye Res.* 83(5):1128–1134 (2006).
234. Cejkova J, Stipek S, Crkovska J, Ardan T. Changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the corneal epithelium after UVB rays. Histochemical and biochemical study. *Histol. Histopathol.* 15:1043–1050 (2000).
235. Cejkova J, Stipek S, Crkovska J, Ardan T, Midelfart A. Reactive oxygen species (ROS)-generating oxidases in the normal rabbit cornea and their involvement in the corneal damage evoked by UV Brays. *Histol. Histopathol.* 16:523–533 (2001).

236. Cejkova J, Stipek S, Crkovska J. UV rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. *Physiol. Res.* 53:1–10 (2004).
237. Ardan T, Cejkova J. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in the rabbit corneal epithelium upon UVA and UVB irradiation. *Acta Histochem.* 114:540–546. doi: 10.1016/j.acthis.2011.10.004 (2002).
238. Ardan, T. *et al.* Reduced levels of tissue uinhibitors of metalloproteinases in UVB-irradiated corneal epithelium. *Photochem Photobiol.* **92**, 720–727, 10.1111/php.12612. Epub2016 Aug 25 (2016).
239. Cejka, C., Kossl, J., Hermankova, B., Holan, V. & Cejkova. J. Molecular hydrogen effectively heals alkali-injured cornea via suppression of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, 8906027, 10.1155/2017/8906027. Epub 2017 Mar 16 (2017).
240. Cejka C, Kossl J, Hermankova B, Holan V, Kubinova S, Zhang JH, et al. Therapeutic effect of molecular hydrogen in corneal UVB-induced oxidative stress and corneal photodamage. *Sci Rep.* 7(1):18017 (2007).
241. Li, D. Q. et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 73, 449–459 (2001).
242. Woessner, J. F. J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2145–2154 (1991).
243. Clark, A. F. New discoveries on the roles of matrix metalloproteinases in ocular cell biology and pathology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2514–2516 (1998).
244. Moses, M. A. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 15, 180–189 (1997).
245. Kugler, A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* 19, 1589– 1592 (1999).
246. Smith, V. A., Rishmawi, H., Hussein, H. & Easty, D. L. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 147–153 (2001).
247. Sambursky R, O'Brien TP. MMP-9 and the perioperative management of LASIK surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 22:294–303 (2011).

248. Riau AK, Wong TT, Finger SN, et al. Aberrant DNA methylation of matrix remodeling and cell adhesion related genes in pterygium. *PLoS One*. 6:e14687 (2011).
249. Chen BY, Lin DP, Chang LS, Huang TP, Liu HJ, Luk CP, et al. Dietary α -lipoic acid prevents UVB-induced corneal and conjunctival degeneration through multiple effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54:6757–66 (2013).
250. Ibrahim OMA, Kojima T, Wakamatsu TH, et al. Corneal and retinal effects of ultraviolet-B exposure in a soft contact lens mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:2403–13. 10.1167 (2012)
251. Adibhatla RM, Hatcher JF. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem Res*. 30:15-23 (2005).
252. Cetinkaya M, Cansev M, Kafa IM, Tayman C, Cekmez F, Canpolat FE, Tunc T, Sarici SU. Cytidine 5'- diphosphocholine ameliorates hyperoxic lung injury in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 74:26- 33 (2013).
253. Cetinkaya M, Cansev M, Cekmez F, Tayman C, Canpolat FE, Kafa IM, Uysal S, Tunc T, Sarici SU. CDP-choline reduces severity of intestinal injury in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Surg Res* 183:119-28 (2013).
254. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 32:671–83 (1994).
255. Riley MV, Susan S, Peters MI, Schwartz CA. The effects of UV-B irradiation on the corneal endothelium. *Curr Eye Res*. 6:1021–33 (1987).
256. Podskochy A, Gan L, Fagerholm P. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea*. 19:99–103 (2000).
257. Mehlhase J, Grune T. Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biol Chem*. 383:559–67 (2002).
258. Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ: Citicoline: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem* 80: 12-23 (2002)
259. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*. 55:S44–9 (1997).

260. Balci M, Devrim E, Durak I. Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats. *Curr Eye Res.* 32:21–5 (2007).
261. Ek, R. O., Serter, M., Ergin, K., Cecen, S., Unsal, C., Yildiz, Y., & Bilgin, M. D. Protective effects of citicoline on TNBS-induced experimental colitis in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(4), 989–997 (2014).
262. Notara, M., N. Refaian, G. Braun, P. Steven, F. Bock and C. Cursiefen Short-term UVB-irradiation leads to putative limbal stem cell damage and niche cell-mediated upregulation of macrophage recruiting cytokines. *Stem Cell Res.* 15, 643–654 (2015).
263. Cejkova J, Ardan T, Cejka C, Kovaceva J, Zidek Z. Irradiation of the rabbit cornea with UVB rays stimulates the expression of nitric oxide synthases generated nitric oxide and the formation of cytotoxic nitrogen-related oxidants. *Histol. Histopathol.* 20:467–473 (2005).
264. Cejkova J, et al. Reduced UVB-induced corneal damage caused by reactive oxygen and nitrogen species and decreased changes in corneal optics after trehalose treatment. *Histol. Histopathol.* 25:1403–1416 (2005).
265. Teng M.-C., Wu P.C., Lin S.-P., Wu C.-Y., Wang P.-H., Chen C.-T., Chen B.-Y. Danshensu decreases UVB-induced corneal inflammation in an experimental mouse model via oral administration. *Curr. Eye. Res.* 43:27–34. doi: 10.1080/02713683.2017.1379543 (2018).
266. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:813–816 (1996).
267. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:1055–1060 (1996).
268. Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, Caja L, Fausto N, Fernandez M, Fabregat I. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its proapoptotic activity. *J Hepatol.* 49:965–976 (2008).
269. Sancho P, Bertran E, Caja L, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Fabregat I. The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF-beta-induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms. *Biochim Biophys Acta.* 1793:253–263 (2009).

270. Lichtenberger LM. The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Ann Rev Physiol.* 57:565 (1995).
271. Treede I, Braun A, Sparla R, et al. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 282:27155 (2007).
272. Cetinkaya M., Cansev M., Cekmez F., Tayman C., Canpolat F.E., Kafa I.M., Uysal S., Tunc T., Sarici S.U. CDP-choline reduces severity of intestinal injury in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J. Surg. Res.*183:119–128. doi: 10.1016/j.jss.2012.11.032 (2013).

