



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KORNEA EPİTEL İYİLEŞMESİNDE
İNSAN ANNE SÜTÜNÜN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esra Hülya SUVEREN

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Doç. Dilek D. ALTINÖRS**

ANKARA – 2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında yetiŐmemde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitimimde büyük katkıları olan, eğitimim süresince iyi bir göz hekimi olarak yetiŐmem için gayret gösteren değerli hocam ve bölüm başkanım Prof. Dr. Yonca Aydın Akova'ya sonsuz saygı ve Őükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimimde ve göz cerrahisini öğrenmemde büyük katkıları olan ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Dilek Dursun Altınörs'e teŐekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Prof. Dr. Sibel Oto'ya, Prof. Dr Gürsel Yılmaz'a, Prof. Dr. Ahmet Akman'a, Doç. Dr. İmren Akkoyun'a, Yard. Doç. Dr. Cem Küçükerdönmez'e, Uzm. Dr. Sezin Akça Bayar'a ve Uzm. Dr. Altuğ Çetinkaya'ya teŐekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca beraber pek çok Őey paylaŐtıđımız, beraberce uzmanlık eğitimi yapmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma, kliniğimizde çalışan hemŐire ve personelimize teŐekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim ve öğrenim hayatımda desteklerini yanımda hissettiğim aileme, eŐime ve oğluma sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Esra Hülya SUVEREN

Mart 2010, Ankara

ÖZET

Bu çalışma zengin yağ içeriği, antimikrobiyal özellikleri, pek çok büyüme faktörü ve fibronektin içermesi açısından epitel rejenerasyonuna katkıda bulunacağını düşündüğümüz daha önce araştırması yapılmamış olan anne sütünün kornea reepitelizasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapıldı. Anne sütü damlasının etkisi, suni gözyaşı ve otolog serum damla ile karşılaştırıldı. Bunun için Balb/C türü 24 adet dişi fare, 40 mg/kg peritoneal ketamin hidroklorid ile sedasyona ek olarak % 0,5 proparakain hidroklorid ile göz topikal anestezi sağlandıktan sonra 2 mm çapında santral kornea epiteli kazınarak epitel defekti oluşturuldu. Rasgele seçilen 4 gruptan, birinci gruba topikal anne sütü 4x1, ikinci gruba topikal otolog serum 4x1, üçüncü gruba topikal prezervansız suni gözyaşı günde 4x1 damlatıldı ve dördüncü grup damla damlatılmayarak kontrol grubu olarak ayrıldı. 1.gün, 2. gün ve 3. gün biyomikroskopik muayeneleri yapıldı ve sonuçları kaydedildi. Üçüncü gün fareler sakrifiye edildi, histopatolojik inceleme yapıldı.

Histopatoloji ve elektron mikroskopi değerlendirmelerine göre en iyi epitelize olan anne sütü damlatılan grup idi. Bunu otolog serum damlatılan grup izliyordu. Buna karşılık kontrol ve suni gözyaşı damlatılan grubun epitelizasyonu 3. günün sonunda hala tamamlanmamıştı.

İdeal bir epitelizan veya suni gözyaşı bugün için mevcut olmamakla beraber, anne sütünün daha önce araştırılmamış olan bu yönünün güncel tedavilere alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER	v
RESİMLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KORNEA	2
2.1.1. Gözyaşı Film Tabakası	2
2.1.2. Kornea klasik olarak 5 anatomik tabakadan oluşur	3
2.1.3. Kornea İnnervasyonu	5
2.1.4. Kornea Metabolizması	5
2.1.5. Korneanın İşlevleri	5
2.1.6. Kornea Epiteline Klinik Yaklaşım	7
2.1.7. Kornea Epitelinin Yenilenmesi	9
2.1.8. Kornea Yara İyileşmesi	9
2.1.9. Kornea Epitel Defektlerinin Tedavisi	12
2.2. ANNE SÜTÜ	12
2.2.1. Kolostrum	12
2.2.2. Olgun Anne Sütünün Bileşimi ve Özellikleri	12
2.2.3. Anne Sütünde Bulunan Antimikrobiyal Faktörler	14
2.3. SUNİ GÖZYAŞI	17
2.4. OTOLOG SERUM	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Hayvan Modeli	20
3.2. Biyomikroskopik Değerlendirme	20
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	24
3.4. İstatistiksel Analiz	25

4. BULGULAR	26
4.1. Biyomikroskopik Bulgular.....	26
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	28
4.3. Transmisyon elektron mikroskopi (TEM) sonuçları.....	37
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ	48
7. KAYNAKLAR	49

KISALTMALAR VE SİMGELER

EGF	: Epidermal büyüme faktörü
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör- α
TGF- β	: Transforming growth faktör - β
Ig A	: İmmünglobülin A
IgG	: İmmünglobülin G
IgM	: İmmünglobülin M
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
TEM	:Transmisyon elektron mikroskopi
KCS	: Keratokonjonktivitis sikka
PED	: Persistan epitel defekti
BUT	: Break-up time
K	: Potasyum
Na	: Sodyum

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 3.1.	Normal fare gözünün mikroskopik görünümü.....	21
Resim 3.2.	Korneada 2 mm işaretleme için kullanılan punch.....	21
Resim 3.3.	2mm'lik santral kornea kazıma alanının işaretlenme işlemi.....	22
Resim 3.4.	Korneal işaretleme sonrası görünüm	22
Resim 3.5.	İşaretlenen santral kornea alanın 11 numara bistüri ile kazıma işlemi.....	23
Resim 3.6.	2 mm çapında santral kornea epitel defekti alanı.....	23
Resim 3.7.	2mm santral kornea epitel defektinin floresein boyama sonrası görünümü	24
Resim 3.8.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesiti ve ışık mikroskop görünümü	25
Resim 4.1.	Anne sütü damlatılan (Grup A), biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün (B)	26
Resim 4.2.	Otolog serum damlatılan (Grup B) 1.gün (a) biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün (B)	27
Resim 4.3.	Suni gözyaşı damlatılan (Grup C) biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün(B)	27
Resim 4.4.	Kontrol grubunun (Grup D) biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün(B)	27
Resim 4.5.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve anne sütü damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x10).....	33
Resim 4.6.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve anne sütü damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x40).....	33
Resim 4.7.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve otolog serum damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x40).....	34
Resim 4.8.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve suni gözyaşı damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x10).....	34

Resim 4.9.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve suni gözyaşı damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x40).....	35
Resim 4.10.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve kontrol grubu ışık mikroskopunda inceleme (x10)	35
Resim 4.11.	Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve kontrol grubu ışık mikroskopunda inceleme (x 40)	36
Resim 4.12.	Anne sütü damlatılan grup patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c).....	36
Resim 4.13.	Otolog serum damlatılan grup patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c).....	36
Resim 4.14.	Suni gözyaşı damlatılan grup patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c).....	37
Resim 4.15.	Kontrol grubu patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c)	37
Resim 4.16.	Grup A (Anne sütü): Kornea çok katlı yassı epitel, bazal membran, hücreler arası bağlantı birimleri, hücre organelleri ve çekirdekleri ile normale yakın görünümde. (x 2156)	38
Resim 4.17.	Grup B (Otolog serum): Kornea çok katlı yassı epitel, bazal membran, hücreler arası bağlantı birimleri, hücre organelleri ve çekirdekleri ile normale yakın görünümde. (x 2156)	39
Resim 4.18.	Grup C (Suni gözyaşı): Kornea epitel bazal membranı intakt, kornea epitel hücreleri arası bağlantılarda açılma görülürken, bazı hücrelerde vakuolizasyon ve yüzeyel hücrelerde ayrılmalar görülmekte idi. (x 2156).....	40
Resim 4.19.	Grup D (Kontrol): Korneal epitel bazal membranı intakt olmakla birlikte kornea epitel hücreleri hemen hemen birbirlerinden ayrılmış. Bazı hücreler parçalanmış ve en üst sırada bütünlüğünü kaybetmiş yassı hücrelerde yoğun vakuolizasyon dikkati çekmektedir. (x 2156).....	41

1. GİRİŞ

Kornea epitel bütünlüğü enfeksiyon ajanlarına karşı koruyucu bariyer olması, normal stromal hidrasyonun devam ettirilmesi ve görme keskinliğinin sürdürülmesi için gereklidir (1). Kornea epitel defektlerinin tedavisi bu nedenle oldukça önemlidir. Reepitelizasyon sonrasında bazal membran komplekslerinin yavaş rejenerasyonu nedeniyle epitel erozyonları, kapanmayan defektler görülebilir (1). Bunları önlemek için reepitelizasyonu artırmak gerekir. Reepitelizasyonu artıran faktörler arasında suni gözyaşı, rejenere olan epitelin travmadan uzak tutulması, inflamasyonun azaltılması (steroidler), otolog serum, EGF (Epidermal büyüme faktörü) ve doku yapıştırıcıları (fibronektin) yer almaktadır. Fibronektin ve epidermal büyüme faktörü gibi epitel yara iyileşmesini ve yapışmayı hızlandıran biyolojik ajanlar hala araştırma aşamasındadır.

Bozulan epitel bütünlüğünün hızlı bir şekilde restorasyonu ve düzgün bir optik yüzeyin sağlanması hem görsel rehabilitasyon için hem de oküler enfeksiyonun önlenmesi için gereklidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KORNEA

Kornea embriyolojik olarak incelendiğinde nöroektoderm ve mezenşim olmak üzere iki dokudan köken almıştır. İlk olarak intrauterin hayatın 8. haftasında yüzeyel ektodermden kornea epiteli ve desme zarı gelişmektedir. Hemen devamında nöroektodermden endotel oluşmaktadır. 5. ayda mezenşim dokunun göçüyle kornea stroması ve yüzey tabakada bu hücrelerin yoğunlaşmasıyla da Bowman katı gelişmektedir (1,2).

Kornea, makroskopik olarak baktığımızda skleranın devamı ve 1/3 ön kısımda yer alan saydam ve optik özelliği olan bölümdür (3,4) Kornea skleraya adeta saat camı gibi yerleşmiş ve 40–45 Dioptri (D) kırma gücü olan konveks bir yüzeye sahiptir. Optik görevinden başka dış ortama karşı koruyuculuk görevini de üstlenmiştir. Normal kalınlığı merkezde 520 µm, periferde 650 µm'dir. Erişkinde horizontal çapı 12,6 mm, vertikal çapı 11,7 mm, ön eğrilik yarıçapı 7,8 mm ve arka eğrilik yarıçapı 6,5 mm' dir (4,5).

Yenidoğan döneminde vertikal kornea çapı 10 mm'dir. Kırıcılık gücü yaklaşık 51 D'dir. Bir yaşında erişkin seviyeye ulaşır (6,7,8).

Ön yüzey kırma gücü +48,6 D, arka yüzeyinin kırma gücü –6,8 D olmak üzere toplam kırıcılık gücü +42 D'dir. Kornea gözün toplam kırma gücünün %70'ini oluşturur (4,5,9). Refraktif indeksi 1.376'dır. Kornea gelişimi 6 yaşa kadar devam etmektedir.

2.1.1. Gözyaşı Film Tabakası

Kornea ön yüzeyini gözyaşı film tabakası sarar. Sağlıklı bir epitel için önemli bir tabakadır. Düz bir optik yüzey sağlar. Yaklaşık 7 µm kalınlığındadır. Göz kırıldığında kalınlaşır ve ikinci kırpma hareketine kadar giderek inceler (3,7,10).

Üç tabakadan oluşur:

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

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

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

2.1.2. Kornea klasik olarak 5 anatomik tabakadan oluşur.

- 1- Epitel tabakası
- 2- Bowman tabakası
- 3- Stroma
- 4- Desme membranı
- 5- Endotel tabakası

Epitel tabaka: Kornea epiteli 40–50 mikron kalınlığındadır ve korneanın 1/10'unu yapar. 5–7 tabaka hücreden ibarettir.

Üç tip hücre içerir:

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

Yüzeyel hücreler elektron mikroskopik incelemede çok sayıda mikrovillus ve plika içerir. Ayrıca mikrokalik ile yüzeyi örtülmüştür. Bu yapıları ile epitelin gözyaşı filmine yapışmasını sağlar. Hücrelerarası sıkı bağlantılar ile hücreler arasında anatomik bariyer oluşturulur (6).

Kolumnar hücreler, tek sıra halinde bazal membran üzerinde dizilir. Bu hücrelerin mitotik aktivitesi vardır. Çoğalıp öne doğru ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar. Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunur. Tonofilamanlar ile hücrenin iskeleti korunur. Aktin filamanlar ise yara iyileşmesi sırasında hücre göçünde rol alır (6). Hemidesmozomlar, epitel hücrelerini birbirlerine ve bazal laminaya bağlarlar. “Gap junction” denilen sıkı bağlantı noktaları ise sadece hücreler arasındaki küçük moleküllerin alışverişine izin verir.

Epitel hücreleri, korneada çevreden merkeze doğru ilerler. Bazal ve kanatsız hücreler, arkadan öne doğru ilerler ve dökülürler. Bu, X-Y-Z hipotezi olarak bilinmektedir (6,11). Kök hücreler limbusta yüzeyel olarak bulunurlar ve epitel yenilenmesinde yardımcı olurlar. Kornea epiteli gözyaşı, aköz hümör ve limbal kapillerden beslenir. Yenilenme kabiliyeti çok yüksektir. Oksijen ihtiyacı, atmosfer, konjonktiva, kapak damarları ve aközden temin edilir. Glukoz ihtiyacı yine aközden temin edilir. Laktik asit birikimi epitel hücre membranını harap ederek bazal hücreyi bazal membrana yapıştırır ve kornea ödemeine

sebepler olur ve kistik değişiklikler, erozyon ve neovaskularizasyon oluşur. Ödem görmeyi bozar, ışık yansıması ve düzensiz astigmatizmaya yol açar. Epitel tabakası olmadığında stromal iyileşme çok gecikir.

Bowman tabakası: 8 –14 µm kalınlıktadır (12). Kısa kollajen fibrillerden oluşur. Travmaya karşı dirençlidir. Mikroorganizma ve tümör hücrelerinin korneaya invazyonuna karşı bariyer oluşturur. Yenilenme yeteneği yoktur. Travma sonucu ince tabaka olarak iyileşir ama eski haline geri dönmez.

Stroma: Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur. %78'i sudur. 500 µm kalınlığındadır(12,13). Kollajen lif demetleri mukopolisakkaritlerle lameller tarzda ayrılmıştır. Bu da lameller greftte alt tabakaların kolayca ayrılmasını sağlar. Kollajen fibriller birbirlerine paralel olarak uzanır. Fibril dizilişlerindeki anormallik şeffaflığı etkiler. Travma, enfeksiyon ve distrofiler stromada ödem ve skar dokusuna neden olur.

Stroma içerisinde seyrek olarak dağılmış keratosit adı verilen fibroblast kökenli hücreler bulunmaktadır. Sayıları 200 milyon ile 1.5 milyar arasında değişmektedir. Keratositler glikozaminoglikan yapımına aktif olarak katılırlar. Glikozaminoglikanlar; fibriller arası mesafeleri doldurmakta ve anyonik bir ortam oluşturarak katyon ve su bağlamaktadır. Stromada 3 tip glikozaminoglikan bulunmaktadır; keratan sülfat (%50), kondroitin sülfat (% 25) ve kondroitin sülfat A (%25).

Desme membranı: Stromanın arka sınırı desme tabakasıdır. Kalınlığı yaşla artar ve elastik özelliğe sahiptir. 10 µm kalınlığındadır (12). İç kısımdaki endotelin ise bazal membranıdır. Bu yüzden korneanın endotelial hastalıkları onun yapısında karakteristik değişikliklere yol açar. Açıya 2 mm uzaklıkta son bularak Schwalbe çizgisini yapar.

Endotel tabakası: Endotel hücreleri yaklaşık doğumda 3500 – 4000 hücre/mm², erişkinlerde 2500–3000 hücre/mm² düzeyindedir. Yaklaşık 350 – 400 bin hücre bulunmaktadır (4). Poligonal hücrelerdir 4–5 µm kalınlığında ve 18–20 µm genişliğindedir. Aközle direkt temastadır. Korneanın beslenmesini üstlenmiştir. Endotelde aktif pompa mekanizması vardır. Bu pompa ısıyla değişir (13).

Endotelial hücre bölünmesi çocuklarda mevcut iken yetişkinlerde nadirdir. Yaşla, hücre sayısında azalma ve büyüklüğünde artma olur. Hücre sayısı 300–400 mm² nin altında düşerse ödem gelişir. Aşırı stres ve travma sonucu endotel hücreleri fibroblast

benzeri hücrelere değişebilmektedir. Kornea endotel kaybı olduğunda çoğalamayan endotel hücreleri kendilerini genişleterek kayıp olan yerleri doldururlar (14,15).

2.1.3. Kornea İnnervasyonu

Kornea sinir yönünden çok zengindir. Bunların hepsi duyu sinirleridir. N. Trigemius'un oftalmik dalından (V1) gelen uzun arka siliyer sinirler, ön ve arka dala ayrılarak korneaya girmektedirler. Lifler korneaya ulaştıkları noktadan itibaren miyelin kılıflarını kaybederler. Ön kısma giden sinirler epitel bazal membranı ve bazal hücreler seviyesinde sonlanır. Buna karşılık endotel seviyesinde sinir lifi yoktur (4).

2.1.4. Kornea Metabolizması

Korneanın saydamlığı ve dehidratasyonunun devamlılığı için enerji gereksinimi vardır. Kornea glikozu aköz hümörden almaktadır (17). Gözyaşı ve limbal kapillerler yolu ile glikoz kazancı daha düşük düzeydedir. Korneada glikoz "Krebs siklusu" ile enerjiye çevrilmektedir. Krebs siklusu da oksijene gereksinim gösterir. Kornea endoteli gerekli oksijeni aköz hümörden, epitel ve stroma ise limbal damarlardan ve gözyaşında çözülmüş oksijenden karşılar. Epitel düzeyinde glikoz, glikojen olarak depolanır. Epitel stromaya göre çok daha yüksek oranlarda ATP, glikojen ve oksidatif enzimler içerir. Kornea endotelinin Krebs siklusu yanında, pentoz fosfat şantı ile çalışabilecek özellikleri bulunmaktadır. Bu yol ile kornea epiteli lipid sentezi yapabilir. Elektrolit düzeyleri karşılaştırıldığında; kornea stroması Na^+ , epitel ise K^+ iyonu bakımından zengindir. İodoasetat gibi metabolik zehirlerle korneanın Krebs siklusu (glikoz) bloke edilirse korneada su tutulumu ve ödem tablosu gelişecektir. Epitel ve endotel metabolizması ATP yokluğundan bozulacak ve Na^+-K^+ ATP az pompası çalışmadığından korneada elektrolit ve su tutulumu görülecektir.

2.1.5. Korneanın İşlevleri

Kornea üzerinde çok önemli özellikleri barındırmaktadır. İlk sırada gelenler ise kırıcılığı, saydamlığı, dehidratasyonu ve ilaç geçirgenliğidir. Kornea saydamlığının ilk şartı kollajen demetlerinin birbirlerine paralel ve düzgün dizilimidir. Fibrillerin birbirleri ile olan uzaklıkları aynıdır. Eğer aralarındaki mesafe farklılaşırsa bu ışık dağılmasına ve korneada bulanıklığa sebep olur. Ancak şüphesiz kornea saydamlığı sadece kollajen liflerin düzgün ve simetrik dizilimine bağlı değildir. Kollajen demetlerin uzaklığı ışık dalga boyundan kısa olduğu sürece saydamlık devam eder. Korneada kan damarının olmaması,

korneadaki hücrelerarası vasatın aynı kırıcılığa sahip olması ve korneanın su içeriği de saydam bir kornea için vazgeçilmez unsurlardır. Ani göz içi basıncı artışı kornea saydamlığını azaltır. Bunun muhtemel sebebi; ani basınç artışının glikozaminoglikan yapı içinde düzgün dizilmiş kollajen demetlerinin dağılımını değiştirmesi ve bu duruma bağlı olarak bölgesel kırıcılık indeksinin 2000 A çapının değişikliğe uğramasıdır.

Kornea liyofilik kolloidal bir sistemdir. İçerdiği su miktarını ayarlayan başlıca faktör kollajen ve glikozaminoglikanlardan oluşan su emici bağ dokusu yapısıdır. Ayrıca korneanın saydam kalabilmesi için, onu çevreleyen sıvıların ozmotik basınçlarının en az interstisyel sıvı basıncı kadar olması gerekir.

Korneal dehidratasyon: Korneanın toplam ağırlığının %75 – 80'i sudur. İzotonik ortamda bekletildiği halde su tutabilir ve daha önce belirtildiği gibi buradaki en önemli faktör stromal glikozaminoglikan yapının ozmotik gücüdür. Korneanın su içeriği 5 faktöre bağlıdır:

- 1- Endotel ve epitel tabakalarının anatomik bütünlüğü gerek mekanik gerekse kimyasal faktörlerle bozulduğunda korneada su tutulumu kaçınılmazdır. Epitel hücreleri gözyaşına karşı, endotel hücreleri aköz hümöre karşı bariyer görevi görürken, aynı zamanda endotel hücreleri aktif bir pompa gibi çalışarak dehidratasyona yardımcı olur.
- 2- Kornea stroması glikozaminoglikan yapı nedeniyle hidrofilik özelliktedir. Bu yüzden stromaya doğru su akımı vardır. Endotel hücreleri stromada tutulan su ve elektrolitleri aköz hümöre pompalamaktadır. Gözyaşı ve aköz hümörün ozmotik yükü kornea dehidratasyonuna doğrudan etki eder.
- 3- Kornea metabolizmasının bozulması aktif pompa fonksiyonunu bozacak ve korneada su tutulumuna yol açacaktır.
- 4- Göz yüzeyinden buharlaşma gözyaşının osmolaritesini artırarak korneal dehidratasyona yardımcı olur. Hipertonik gözyaşı korneadan su çekecektir.
- 5- Göz içi basıncının çok yükselmesi kornea ödemeine yol açar. Buradaki mekanizma hem endotel fonksiyonlarının bozulmuş olması hem de stromaya karşı aköz hidrostatik basıncının artmasıdır.

Kornea geçirgenliği, işlevleri arasındaki en önemlilerinden birisidir. Hem oksijen ve glukoz geçişi hem de ilaç geçirgenliği korneanın katlarına bağlıdır. Kornea epiteli lipid yapıda olup özellikle ilaç için önemli bir bariyer oluşturur. Epitelin kaldırıldığı durumlarda suda eriyen maddelerin penetrasyonu logaritmik olarak artacaktır. Hidrofilik yapıdaki stromadan penetrasyon, suda eriyen maddeler için daha kolay, lipofilik maddeler için daha

güçtür. Endotel düzeyinde lipofilik yapı belirginleşir ve stromadan aköz hümöre diffüzyon, hidrofilik maddeler için daha güçleşir.

Kornea geçirgenliğinde etkili mekanizmalar;

- 1- Maddenin kimyasal yapısı (hidrofilik – lipofilik ve diğer)
- 2- Maddenin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu
- 3- PH düzeyi ve osmolaritesi
- 4- Yüzey gerilimi ve ıslanma açısı

Kornea, üzerine tüm bu özellikleri almış ve bu özelliklerden dolayı da çok önemli görevler üstlenmiş benzersiz bir dokudur. Üzerinde oluşan herhangi bir hasar görevlerinde aksamaya neden olur ki bu durumda ona aynı görevleri tekrar yüklemeye ihtiyaç doğar. İlaç tedavisi ile düzelemeyen sorunlar sonunda dokunun ameliyatla daha sağlıklı başka bir doku ile değiştirilmesine kadar gidebilir.

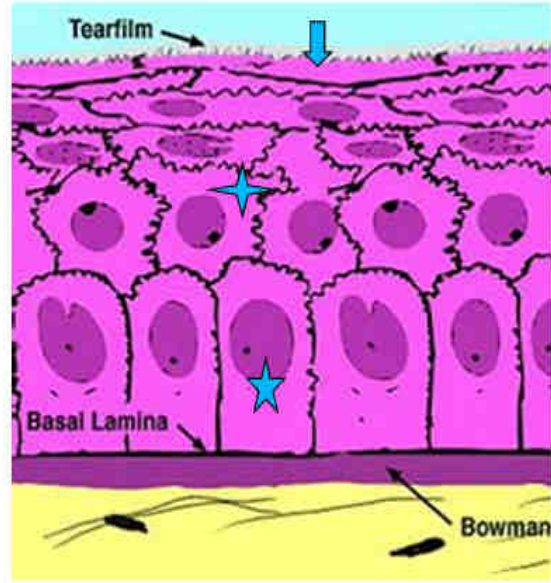
2.1.6. Kornea Epiteline Klinik Yaklaşım

Göz yüzeyi, kornea, limbal ve konjonktiva epitel hücreleri ile kaplanmıştır. Limbal kök hücrelerinin kornea epiteli oluşumunda kaynak oldukları ve sağlıklı gözyaşı tabakası ile birlikte saydam kornea yüzeyinin oluşmasında özel önem taşıdıkları anlaşılmıştır. Bazı sistemik inflamatuvar hastalıklar, birincil göz hastalıkları veya travma sonucu bu hücrelerin hasar görmesi, limbal kök hücre eksikliğine yol açar. Sonuçta göz yüzeyi bozuklukları oluşur ve normal epitelizasyon yeterli olmazsa kornea epitel defektleri kalıcı hale gelir. Hasta bize en sık gözünde yanma, batma, sulanma, bazen kaşıntı, bulanık görme, kızarıklık şikayetleri ile başvurur.

Bazal hücreler(★) : bazal membrana hemidezmozomlarla bağlanmış sütun şeklinde tek katlı

Kanatsız hücreler(★) : ince, kanatsız uzantılara sahip, 2-3 kat

Yüzey hücreleri(↓) : 2 kattan oluşmuş, köprülenmelerle bağlanmış yüzeyinde mikrovillüsler & mikropikalar birkaç günde gözyaşı film tabakasına dökülür rejenerasyon



Kornea epitel hücreleri düzenli olarak değişir, apoptozise uğrar ve soyulup dökülürler. Kornea epitel hücrelerinin tümünün değişimi 7–10 gün içerisinde gerçekleşir (18). Daha derinde yerleşen hücreler düzenli bir şekilde üste ilerleyerek dökülen hücrelerin yerini alırlar. En üstte yer alan kornea epitel hücreleri ortalama iki üç kat yassı poligonal hücrelerden oluşur. Yüzeyel hücrelerin hücre zarlarının oluşturduğu çok sayıda apikal mikrovillüsler ve küçük katlantılar, ince ve çok altındaki kornea epiteli glikokaliksi ile sıkı ilişki içerisindedir. Epitel hücre zarının üstte yaptığı uzantılar temas alan yüzeyi ve gözyaşı filminin müsinöz alt tabakası, yakın yerleşimli ve glikokaliks ile örtülüdür. Gözyaşının en alt kısmı olan müsinöz kısmı konjonktiva goblet hücrelerince salgılanır. Bu tabaka ile hücre zarı arasındaki yapışıklığı arttırır. Lateral olarak bitişik olan yüzeyel hücreler sıkı bağ kompleksleri ile birleşirler ki bunlar gözyaşının hücrelerarası geçişini engellerler. Bu sayede sağlıklı kornea epiteli floresein veya rose bengal gibi boyaları tutmaz.

Yüzeyel hücrelerin altında suprabazal veya kanat hücreleri yer alır. Kanat hücrelerinin altında kornea epitelinin en alt tabakası olan bazal hücreler yer alır. Bazal hücre tabakası da tek sıralı 20 µm yüksekliğinde silindirik hücrelerden oluşur. Kök hücreleri ve geçici çoğalan hücrelerin yanında bazal hücreleri bölünebilme yeteneği olan yegane epitel hücreleridir (19,20). Çok sayıda hücre içi organelere sahiptirler. Bazal hücrelerin yanlarında aralıklı bileşkeler ve aderan zonüller ile karakterize hücrelerarası bağlantıları vardır. Bazal hücreler altındaki bazal membrana yaygın bir hemidesmozom sistemi ile bağlıdır. Bu bağ çok katlı kornea epitelinin ayrılmasının engellenmesi

yönünden önemlidir. Bu bağ sistemindeki bozukluklar tekrarlayan erozyon sendromu veya iyileşmeyen inatçı epitel ülserlerine sebep olur.

Bazal membran, bazal hücreler tarafından salgılanan bir ekstraselüler matriks tarafından oluşur. Bazal membranın yıkımını takiben tekrar oluşması ve iyileşmesi için 6 hafta gerekir. Bu evrede altta yeni oluşan bazal membran ile olan epitel bağı sağlam değil, zayıftır. Epitel çıplak stroma veya Bowman tabakasına zayıf yapışır. Normal durumlarda tip IV kollajen ve laminin bazal membranın majör bileşenleridir, ancak akut epitel yaralanmasında fibronektin üretimi artar. Bazal membran yaklaşık 0,05 µm kalınlığındadır ve sıkıca bağlanan fibril ve plak gibi çok iyi anlaşılmamış mekanizmalar ile altındaki Bowman tabakasına bağlıdır.

Santral kornea normalde antijen üreten ve sunan hücrelerden yoksundur. Bazı durumlarda (örn. Kornea greft reddi, herpes virus enfeksiyonu ve yaralanma) immunolojik olarak aktif dendritik makrofajlar (langerhans hücreleri) limbus periferinden hızla göçerler. Bu hücreler kemik iliği kaynaklıdır, majör doku uyum kompleksi sınıf II molekülleri sunarlar ki bunlar CD4–pozitif T–lenfositler ile karşılaştıklarında immun sistemi düzenleyen sitokinleri salarlar.

2.1.7. Kornea Epitelinin Yenilenmesi

Epitel kök hücreleri limbus bazal epitelinde yerleşmişlerdir ve kornea epiteli için önemli bir kaynak oluştururlar. Hücreler kornea santraline doğru gittikçe geçici çoğalan hücrelere ve bazal hücrelere dönüşürler.

2.1.8. Kornea Yara İyileşmesi

Kornea epitel yaralanmasını takiben sıyrılan bölgenin kenarındaki hücreler hücre göçü ve hücre yayılmasının ortak hareketi ile en kısa zamanda hasarı kapatmaya çalışırlar. Daha geniş hasarlarda 4–5 saate varan gecikmeler görülebilir. Bu gecikme fazı hızlı hücre bölünmesi öncesinde anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal hazırlayıcı hücresel değişiklikler için gereklidir. Yaranın kenarında lamellipod, filopod ve tırtıklı kenar gibi çeşitli hücre zarı uzantıları oluşur. Bazal hücrelerdeki sıkı hemidesmozom bağları kaybolur. Erken mitotik olmayan yara kapanma fazı dikkat çekicidir, hücrelerin 60–80 µm/saat hızla ilerlediği gösterilmiştir (21).

Epitel hücrelerinin göçen tabakasının en sıkı bağı, altındaki alt yapıya ilerleyen kenardadır. Bu ilerleyen kenardaki nispeten sıkı bağlar epitel tabakasının hareketinin önden çekişli olduğunu düşündürür (22). Arkada kalan, birbirine daha az bağlı olan

hücreler muhtemelen aktini de içeren hücre içi kasılma mekanizmalarıyla ilerleyen kenarın arkasından çekilirler (23).

Hücre zarının sitoplazmik tarafında fokal yapışma plaklarında bulunan 130 kD sitoplazmik protein olan vinkülin, intrasitoplazmik aktin stres liflerinin hücre zarına bu fokal birleşme noktalarında tutunmasında etkili olabilir. Vinkülin aktin liflerini hücre zarı proteinine bağlar, diğer tarafta talin bir majör hücre alt yapısı yapışma proteini olan integrin ile bağlıdır (24). Bu yapışma protein kompleksleri en çok göçen hücrelerin ilerleyen kenarında yoğundur, bu hücrelerin hemidesmozom yokluğunda bazal membrana yapışmasını sağlar. Aktin liflerinin kasılması somayı ileri doğru ilerleyen kenar doğrultusunda çeker.

Plazmada taze yaralarda yaygın bulunan hücre dışı matriks proteini olan fibronektinin hücre alt yapı ilişkisi ile hücre göçünde anahtar eleman olduğu düşünülmektedir. Yapışma plakları hücre dışı kısmında mevcut oldukları için, yaralanma olduğunda epitel göçü esnasında vinkülin-talin-integrin kompleksi ile alt yapı arasında bir bağlantıyı sağlaması muhtemeldir. Daha seyrek bulunan hücre dışı proteini olan lamininin de benzer bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir.

Orta boyutta epitel yaralanmalarından 24–30 saat sonra mitoz ve hücre çoğalması başlar ve yoğun olmayan bir hücre topluluğu oluşur. Geniş epitel yaralanmalarından 96 saat sonra hücre bölünmesinde belirgin artış görülür (25). Sadece bazal hücreler, geçici çoğalan hücreler ve limbal kök hücreleri bu yeniden yapılandırıcı mitoz katılırlar (26).

Laboratuar ve klinik araştırmalarda epitel göçü, mitoz, apoptoz, yapışma ve değişimini etkileyen çeşitli ajanların kornea epitel iyileşmesini hızlandırmadaki muhtemel tedavi edici etkileri araştırılmıştır. Bunlar arasında büyüme faktörleri, fibronektin, retinoidler yer alır (27). Primer olarak mitotik ajanlar olsa da büyüme faktörleri ayrıca ekstrasellüler matris bileşenlerinin üretilmesini de arttırarak hücre ile alt yapı arası yapışmayı arttırırlar. Büyüme faktörlerinin hücre göçünü ve yayılmasını çoğaltıp çoğaltmadığı tartışmalıdır. Herpes simpleks keratiti, katarakt cerrahisi ve nörotrofik keratit gibi çeşitli durumlarda dirençli epitel hasarında topikal kullanılan fibronektin damlaları kornea epitel iyileşmesini başarıyla hızlandırmıştır (28). Diğer yandan kornea alkali yaralanması veya kuru göz sendromu ile gelişen epitel defektlerinin tedavisinde fibronektin damlalarının belirgin etkisi görülememiştir (29).

Bir A vitamini analogu olan retinoin tavşanlarda epitel hücrelerinin farklılaşmasını ve kornea epitel defektlerinin kapanma hızını arttırır.

Çeşitli dış faktörler hücre göçü sırasında yönlendirilmiş hücre hareketinde yer alırlar. Bunlar arasında kontakt inhibisyon, kemotaksi, haptotaksi sayılabilir. Kornea epitel hücrelerinin yara iyileşmesinde bir elektirik saha oluşturduğu da gösterilmiştir. Bu sahalar epitel hücrelerinin ilgili hasarlı alana göçünde rehber ve uyaran olarak hizmet edebilir görünmektedir (30).

Kornea epitel yara iyileşmesinde

1. Primer reepitelizasyon (erken)
2. Diferensiasyon (farklılaşma) (geç) aşamaları vardır.

Reepitelizasyonu şu faktörler artırır:

- A. Suni gözyaşı
- B. Otolog serum
- C. Rejenere olan epitelin travmadan uzak tutulması
- D. İnflamasyonun azaltılması (steroidler)
- E. EGF (Epidermal büyüme faktörü)
- F. Doku yapıştırıcıları (fibronektin gibi)

Reepitelizasyon sonrasında bazal membran komplekslerinin yavaş rejenerasyonu nedeniyle epitel erozyonları, kapanmayan defektler görülebilir. Epitel iyileşmesi için adezyon molekülleri ve gözyaşındaki sitokinler büyük önem taşır (33).

Epitel iyileşmesi için en önemli kaynak limbustur. Limbustaki bazal epitel hücreleri hem hücrel rezervi, hem de sitokin rezervini oluşturmaktadır. Epitelizasyon hızında ve epitelizasyon kalitesinde limbal kök hücreler çok önemlidir. Epitel defektinin genişliği de yara iyileşmesinde önemlidir. Epitelizasyonun ilerleme hızı dışında, epitelizasyon kalitesini yani epitel hücrelerinin yapışma kapasitesini takip etmek mümkündür.” Gap junction”, epitelyal junction ve epidermal büyüme faktörü (EGF) yapışma kalitesini belirler. Epitelyal yara kenarında EGF reseptörleri artar, bu epitel proliferasyon hızını artırır. EGF epitel hücrelerinin çok katlı hale gelmesinde de etkilidir (31).

Stromal keratositler epitelin yapışma kabiliyetini etkilemektedir. Keratosit kaybı fazla ve buna bağlı olarak stromada yapısal yetmezlik var ise epitelizasyon kalitesi iyi olmamaktadır. Yara iyileşmesi hem epitel hem stroma için sadece proliferasyon ve migrasyondan ibaret değildir. Yara iyileşmesinin erken döneminde hücre proliferasyonu, adezyon ve migrasyonu ile geç dönemdeki hücre farklılaşması (diferansiasyon) ve hücre ölümü (apoptozis) sitokinlerin kontrolü altında olmaktadır. Yeniden şekillendirme (remodelling) döneminde hücrelerin diferansiasyonu ve apoptozise uğraması yara iyileşmesini ve iyileşme kalitesini ve kornea saydamlığını etkiler.

Epitel defekti sonrası gözyaşındaki sitokin miktarı artmaktadır. Kornea yara iyileşmesine etki eden en önemli çevresel faktör olan gözyaşının azaldığı durumlarda ve kuru göz sendromunda gecikmiş yara iyileşmesi beklenmektedir.

2.1.9. Kornea Epitel Defektlerinin Tedavisi

Kronik kornea epitel defektlerinin tedavisinde ilk adım, altta yatan sebebi ortadan kaldırmak veya sınırlamaktır. Normal epitelizasyon işlemindeki eksiklik, kronik defekt üzerinde göz kapaklarının mekanik hareketinden kaynaklanan sürtünme ile, özellikle kapak konjonktivasi anormal olduğunda daha da artar. Bu etkinin azaltılması için, koruyucu madde içermeyen yapay gözyaşları ile topikal lubrikasyon, punktal oklüzyon, terapötik kontakt lens kullanılmaktadır. Cerrahi seçenekler arasında geçici veya kalıcı tarsorafi sayılabilir, fakat kornea yarasının iyileşme yeteneğindeki eksiklik bu tedavilerin etkinliğini sınırlamaktadır.

2.2. ANNE SÜTÜ

2.2.1. Kolostrum

Doğumdan hemen sonra ilk 5 günde salgılanan koyu sarı renkteki süte kolostrum adı verilir. Anne sütünde bulunan antienfektif öğeler (sekretuar IgA kolostrumda 20-30 g/l, protein %2-3 g), A vitamini, sodyum ve çinko düzeyi olgun süte oranla daha zengin olduğundan, steril ortamdan steril olmayan ortama gelen bebek ilk birkaç gün içerisinde enfeksiyonlardan en iyi şekilde korunmuş olur. Kolostrum 5-10 günler arasında geçiş sütü şeklini alarak 3. haftadan sonra olgun (matür) süt özelliğini taşır (32).

2.2.2. Olgun Anne Sütünün Bileşimi ve Özellikleri

Protein

Süt proteinini kazein whey proteinleri oluşturur. Whey proteinlerinin en önemli bileşenleri α -laktalbümin, laktoferrin, lizozim, immünoglobulinler ve serum albüminidir. Anne sütündeki taurin, büyümeyi düzenleyen maddelerden birisidir ve hücre membranının bütünlüğünü sağlar, retina zedelenmesini önler (33).

Antienfektif Ögeler

Hücre ve Antikorlar: T ve B lenfositler, makrofajlar, nötrofiller, epitelyal hücreler
Bifidus Faktör: Bağırsakta mikroorganizma ve mantarların üremesine engel olur (34).

Lizozim: Bakterisidal etkisi olan bir enzimdir. Peptidoglikan yıkımında görevlidir.
Laktoferrin: Bakteriostatik etkisi olan bir proteindir. Demiri bağlayarak patojen mikroorganizmaların üremesini engeller. Fagositik etkisi vardır. Bağışıklık sistemini güçlendirici ve uyarıcı etkisi vardır. Büyüme hızlandırıcı olarak kullanılır (35).
Laktoperoksidaz: Bakteriostatik etkisi olan bir proteindir.

İmmünoglobülinler: Özellikle sekretuar IgA, bakterilerden E Coli, vibrio kolera, H influenza, difteri, pnömoni, salmonella, shigella ve virüslerden polio, rotavirüs, HIV ve sitomegalovirusa karşı etkilidir (36).

İnterferon: Antiviral etkili bir proteindir.

Komplemanlar: Özellikle C3, opsonin (antijenle birleşerek onu fagositoza hassas kılan antikor) olarak görev alır.

Müsin: Rotavirüse karşı etkilidir.

Fibronektin: Opsonin (antijenle birleşerek onu fagositoza hassas kılan antikor) olarak işlev görür (37).

Sitokinler: Anne sütünde bulunan sitokinlerden interlökin 1b, T hücrelerini aktive eder, interlökin 6, IgA yapımını, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) kompleman salgılanmasını ve dönüştürücü büyüme etmeni (transforming growth factor; TGF- β) ise T hücrelerine dönüşümü arttırmaktadır (38).

Lenfositler: E.Coli'ye karşı etkindir.

Antiviral lipidler: Virusları parçalarlar.

Oligosakkaritler: Bakterilerin epitel dokuya bağlanmasını önlerler. Reseptör analogudur.

Yağlar

Anne sütünün yağlarının %98'ini trigliseritler oluşturur. Trigliserit yapısında en fazla bulunan yağ asitleri ise palmitik ve oleik asitlerdir. Kolostrumda daha fazla olmak üzere anne sütünün çoklu doymamış yağ asitlerden zengin olması beyin gelişimi, miyelinizasyon, retinal işlevler ve hücre proliferasyonunun normal olmasını sağlar (32). Anne sütünde bulunan yağların etrafı membranla çevrili, çekirdek kısmını trigliseridlerin ve membranını da fosfolipidler, kolesterol ve proteinlerin oluşturduğu yağ globülleri şeklindedir.

Karbonhidratlar

Süt şekeri laktozdur. Laktozun galaktoz komponentinin lipidlerle bileşikleri beyin dokusu gelişimi için çok önemlidir. Anne sütünde aminoasitlere ve proteinlere bağlı (glikoproteinler ve glikopeptidler) karbonhidratlar da vardır. Anne sütünde besleyici olarak önemli miktarlarda glikoz, galaktoz gibi basit şekerler ile bebeği enfeksiyonlardan koruma özelliği olan oligosakkaritler ve diğer bazı kompleks karbonhidratlar da bulunmaktadır (33).

Vitaminler

K ve D vitaminleri dışındaki yağda eriyen ve suda eriyen diğer vitaminlerin anne sütündeki konsantrasyonları süt çocuğu için yeterlidir. Bir antioksidan ve A vitamini öncüsü olan beta-karoten vücudun bağışıklık sisteminin korunmasında, hücre sağlığının sürdürülmesinde ve serbest radikallerin yol açtığı kümülatif hasarın önlenmesi açısından önemlidir (32).

Mineraller

Anne sütünde potasyum, sodyum ve kalsiyum serbest iyonlar olarak, diğer mineraller de kompleks bileşikler halinde bulunurlar. Anne sütünün demir yoğunluğu düşüktür (0,2–0,8mg/lt). Ancak biyoyararlılığı yüksektir. Anne sütünde çinko genellikle whey proteinlerine bağlıdır.

Anne sütündeki selenyum miktarı inek sütünden daha fazladır. Selenyumun humoral ve hücresele aracılı bağışıklık sisteminde görevi vardır. Toksik maddelerin yıkımını katalize eden glutatyon peroksidazın yapısına girer. Anne sütünde K⁺ iyonları Na⁺ iyonlarından daha fazladır. Bu özelliği ile anne sütü intrasellüler sıvılarla uyumluluk gösterir (33).

2.2.3. Anne Sütünde Bulunan Antimikrobiyal Faktörler

Anne sütünün içerdiği proteinler antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Kolostrumda immunoglobulinler yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Anne sütünde immunoglobulinlere ek olarak başka proteinlerin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlardan en önemlileri laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim ve N-asetil-b-D-glukozaminidazdır (39).

İmmunglobulinler

Bebekler doğumda bazı immunoglobulinlere sahiptir, ancak spesifik antijenlere karşı kazanılmış yanıt yetersizdir. Üç ana immünglobülin (IgG, Ig A, IgM) sadece IgG plasental bariyeri geçebilir. Bu da spesifik viral enfeksiyonlara karşı immüniteyi sağlar. Anne sütünde en fazla bulunan immunoglobulin türü IgA'dır. Salgısal IgA barsak ve solunum sisteminde büyük oranlarda bulunmaktadır, solunum yolu, GIS ve göz enfeksiyonlarına karşı korur (39).

Laktoferrin

Demir bağlayan bir glikoproteindir. Sekresyonlarda (anne sütü, gözyaşı, tükürük, semen) ve lökositlerde yüksek oranlarda saptanmıştır. Kolostrumda 0,5–1 gr/lt. kadar yüksek oranda saptanmıştır. Birçok biyolojik olayda rol oynamaktadır, antibakteriyel ve antiinflamatuvar aktivite gösterir. GIS enfeksiyonları üzerine koruyucudur. İmmunoglobulin ve diğer koruyucu proteinlerle sinerjik olarak lokal, salgısal immün sistem içerisinde rol almaktadır. Dokularda demir bağlayarak antioksidan etki gösterir.

Birçok mikroorganizma büyüme ve gelişmeleri için demire ihtiyaç gösterir ve laktoferrin demir kullanımını engelleyerek bakterilerin büyümesini baskılar. Laktoferrin bakteriyostatik aktivite gösterir. Özellikle Gram negatif bakterilerden yüksek oranda demire ihtiyacı olanlara (örneğin koliform bakteriler); mastitin major patojeni ve bazı Gram pozitif mikroorganizmalara antimikrobiyal etki gösterir.

Streptokok ve Vibrio cholerae'ya karşı demir kullanımını engellemeden bağımsız etkili bakterisidal etkinliği vardır. Enterik demirin emilimini sağlar, bu nedenle yaşamları için demire ihtiyaç gösteren enteropatojenik E.coli'nin oluşturduğu enfeksiyonları önler (35).

Laktoperoksidaz

Peroksidaz enzimleri oksidatif mekanizmalara bağlı olarak bakterileri öldürür. Peroksidaz aktivitesi birçok ekzokrin bez salgılarında (tükürük, gözyaşı, bronşiyal sekresyonlar, intestinal sekresyonlar ve süt) mevcuttur. Süt peroksidazı laktoperoksidaz olarak adlandırılmaktadır ve anne sütünde bulunan immunoglobulin dışı koruyucu proteinlerden birisidir.

Lizozim

Lizozim bakteri hücre duvarının bir parçası olan peptidoglikanın iki bileşeni arasındaki glikosidik bağın oluşumunu önleyerek bakterileri öldürür. Kolostrumda lizozim konsantrasyonu çok yüksektir. Bu enzimin fonksiyonları laktoferrin ve IgA ile ilişkilidir.

Özellikle lizozimin E. coli üzerindeki etkisi IgA ile birlikte olmaktadır. Sütte düşük oranda bulunan askorbat ve peroksit ile birlikte bazı salmonella türlerine lizis etkisi gösterir. Lizozim aynı zamanda hasar gören dokuya nötrofillerin göçünü sınırlandırarak antiinflamatuvar bir ajan gibi fonksiyon göstermektedir (35).

İmmun hücreler

Anne sütünde immün hücreler de bol miktarda bulunmaktadır, bunlar lökositlerdir. En fazla kolostrumda bulunmaktadır, bunların çoğu nötrofildir. İkinci sıklıkta makrofajlar bulunmaktadır, kolostrumdaki lökositlerin %40'ını oluşturmaktadır. Lenfositler anne sütündeki lökositlerin %10'unu oluşturur, bunlarında %20'si antikor üreten B lenfositlerdir. Geri kalanı ise enfekte hücreleri direkt öldüren ya da immün sistemin diğer komponentlerinin göçünü sağlayan kimyasal uyarıları gönderen T lenfositlerdir (34).

Diğer Anti-Enfektif Faktörler

Anne sütündeki bazı hormonlar (örneğin; kortizol ve bazı proteinler örneğin epidermal büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü, insülin-benzeri büyüme faktörü ve somatomedin C) mukozal bir bariyer oluşturarak mikroorganizmaların invazyonunu engeller (39).

İnterferon anne sütünde bulunan ve lökositler tarafından üretilen en önemli antiinfektif ajandır, güçlü bir antiviral etkinliği vardır. Anne sütünde bulunan ve musin olarak adlandırılan, protein ve karbonhidratlardan oluşan büyük bir molekül bulunmaktadır. Bunlar bakteri ve virüsleri bağlama kapasitesine sahiptir. B12 bağlayıcı protein mikroorganizmaları B12 vitamininden yoksun bırakarak, büyümelerini engelleyerek antibakteriyel etkinlik gösterir (4). Serbest yağ asitleri, suçüçeği virüsü gibi zarflı virüslerin membranlarını hasarlayarak mikroorganizmanın ölümüne neden olur.

Fibronektin, kendisine karşı spesifik antikoru bulunmayan mikroorganizmaların fagositler tarafından fagositozunu artırır. Salgısal IgA gibi fibronektin de inflamasyonu azaltır, inflamasyon nedeniyle hasarlanmış dokuların tamirine yardım eder (3). Anne sütünde bulunan ancak bilinmeyen bazı maddelerin de bebeklerin kendi fibronektinin üretimine yol açtığını göstermektedir (37).

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) lökosit üretimi için başlıca uyarıcıdır. Anne sütü önemli miktarda G-CSF içerir (38,40). Anne sütü özellikle kolostral fazda önemli miktarlarda oligosakkarit içermektedir. Bu oligosakkaritler konak hücre yüzeyindeki reseptörlerle benzerlik gösterirler, bakteriyel adezyonun inhibisyonu yoluyla enfeksiyonlara, özellikle üriner sistem enfeksiyonlarına karşı koruyucu etki göstermektedirler (41).

Anne sütündeki oligosakkaritler farenks ve yanak epitel hücrelerine Streptococcus pneumoniae'nın adezyonunu engeller. Anne sütü çok miktarda ksantin oksidaz içermektedir. Ksantin oksidaz ve nitritler birlikte yenidoğan gastrointestinal sisteminde nitrik oksit oluşumuna yol açar, oluşan nitrik oksit Enterobactericia, E. coli ve Salmonella enteritidis'in metabolizmasını baskıladığı gösterilmiştir (42).

2.3. SUNİ GÖZYAŞI

Gözyaşı; elektrolitler, su, müsin, vitamin A, antimikrobial proteinler (lizozim-laktoferrin), immünoglobulinler ve büyüme faktörleri (transforming büyüme faktörleri- α ve β , epidermal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü) içeren, göz yüzeyini koruyan aköz-müsin jeldir (43). Hidrofilik polar lipidler gözyaşının dış lipid tabakasını oluşturur. Gözyaşı büyük oranda göz yüzeyinin ve nazal mukozanın stimülasyonu sonucu refleks olarak salgılanır. Trigeminal sinirin oftalmik dalı ile uyarılar, santral sinir sistemine pons bölgesine ulaşır. Burada kortikal sinyaller ile entegre olduktan sonra parasempatik lifler pterigopalatin ganglionda sinaps yaparak fasial sinir yoluyla esas ve aksesuar lakrimal beze ulaşır. Sempatik lifler parasempatik lifler ile birlikte seyreder fakat pterigopalatin ganglionda sinaps yapmazlar. İki tip sinir lifi de gözyaşı sekresyonunda rol oynar. Gözyaşı yapımı yaşlanma ile, uykuda, genel ve lokal anestezi esnasında, nörotrofik keratitte ve nazal sensitivitenin azaldığı durumlarda azalır (44,45,46).

Kuru göz; gözyaşının azalması veya buharlaşmasının artması sonucu oluşan, çeşitli semptom ve rahatsızlıklarla beraber göz yüzeyinin hasarına yol açan gözyaşı tabakasının bozukluğu olarak tanımlanır (47). Kuru göz, klinikte çok sık karşılaşılan bir göz hastalığıdır. Altmış beş yaşın üzerinde yaklaşık 4.3 milyon hastada kuru göz semptomları mevcuttur (47). Sjögren sendromuna bağlı gelişen kuru göz, popülasyonun yaklaşık %1-2'sini etkiler ve hastalarının %90'ından fazlası kadındır (48).

Suni gözyaşları damla, pomad ve jel formunda olabilir. Damlalar polivinil alkol, selüloz deriveleri (hypromellose), mukomimetikler veya Na-hyaluronat içerir.

Hipotonik damlaların tedavide daha etkili olduğu bildirilmiştir (49). Suni gzyaşı damlaları koruyuculu veya koruyucusuz olabilir. Koruyucu madde olarak benzalkonyum klorid içeren suni gzyaşlarının sık kullanımının epitele toksik olabileceği gsterilmiştir. Bu sebeple suni gzyaşını sık kullanması gereken hastaların koruyucu madde içermeyen tek dozluk preparatları kullanması önerilir.

Suni gzyaşlarında bikarbonat tamponlama sisteminin kullanılmasında gzy zeyini olumlu etkilediği gsterilmiştir. Gzyaşı pomadları petrolum mineral yağı, jeli ise akrilik asit içerir. Lakrisertler, gzyaşında yavaşça eriyen koruyucu madde içermeyen polimerlerdir. Hidroksipropil selüloz içerirler. Bu ilaçların sakıncası gzyaşının çok az olduğu durumlarda eriyememeleri ve alt forniksdeki ideal pozisyonlarının her zaman korunamamasıdır.

2.4. OTOLOG SERUM

Otolog serum uygulamasının olumlu etkileri ilk olarak Fox ve arkadaşlarının 1984 yılında yaptığı çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır (50). Ancak etki mekanizmasının yeterince bilinmemesi nedeniyle klinik uygulamaya girişi Tsubota ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla daha sonraki yıllarda olmuştur (51).

Gzyaşı kornea ve konjontiva epitelinin stabilitesinde, yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesinde büyük öneme sahiptir. Kornea besinsel gereksinimlerini (glukoz, elektrolit vb.) başlıca aköz hümörden sağlar. Kornea epitelinin bölünmesinde, migrasyonunda ve farklılaşmasında görev alan büyüme faktörleri, vitamin ve nöropeptid gibi maddeler lakrimal bezlerden salgılanan gzyaşından sağlanmaktadır. Buna ilave olarak gzyaşı antimikrobik, besleyici ve optik özelliklere sahiptir. Gzyaşı yetersizliğinde bu dengenin bozulması epitel hasarı ile sonuçlanır. Bu durumda yapay gzyaşının kullanımı yeterince epitel rejenerasyonu sağlayamaz. Gzyaşının içeriğine yakın maddeler arayışı oftalmolojide otolog serum damlaların kullanımını gündeme getirmiştir.

Kord kanı ve dana serumundan elde edilen damlalar bu amaçla kullanılmış ancak infeksiyon bulaşı ve allerjik reaksiyon riski nedeniyle güvenli ve kullanışlı bulunmamıştır (52). Hastanın kendi kanından elde edilen otolog serum, antijenik olmaması ve hastalık bulaşması ihtimalinin olmaması nedeniyle diğer sıvılara göre daha avantajlıdır. Serumda bulunan birçok maddenin epitel hücreleri üzerine trofik etkileri olduğuna inanılmaktadır. Epitel kökenli büyüme faktörü (EGF), Transforme edici fibroblast kökenli büyüme faktörü (TGF-b), vitamin A, albumin, α 2 makroglobulin, Trombosit kökenli büyüme faktörü

(PDGF), Substance P benzeri nöropeptid ve insulin tip 1 büyüme faktörü bu maddeler arasındadır (53,54,55).

Fibronektin hücre migrasyonuna etkili en önemli faktörlerdendir (56,57,58) EGF, epitel hücrelerinin migrasyonunu artırır ve antiapoptotik etki gösterir (59). TGF- β stroma ve epitel tamirinde görev alır. α 2 makroglobulinin antikollajenaz, albuminin antiapoptotik etkileri vardır. Tüm bu maddeler serumda gözyaşına oranla daha fazla miktarda bulunur. Otolog serumda Ig G, lizozim gibi bakterisid ve bakteriostatik etki gösteren maddeler bulunur.

Otolog serum damlalar yüksek protein konsantrasyonları nedeniyle organizmaların kolonizasyonu için uygun ortam oluştururlar. İçine eklenebilecek koruyucu maddeler otolog serumun bazı yararlı etkilerini engelleyebileceğinden bu tür maddelerin ilavesinden kaçınılmaktadır (60). Bu damlalar her birey için steril koşullarda üretilmektedir, ancak hazırlanma sırasında ve kullanım esnasında kontaminasyon riski vardır. Bu nedenle otolog serum damlaları, profilaktik antibiyotik damlalar ile birlikte kullanılırlar. Buna rağmen otolog serum damlalarının kullanımını takip eden ciddi infeksiyon gelişimi bildirilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Çalışma Laboratuvarında, Deneysel Çalışma Etik Kurulunun onayıyla gerçekleştirildi (Onay no: DA 09/24).

3.1. Hayvan Modeli

Ağırlıkları 20–30 gr arasında değişen 24 adet erişkin dişi Balb/c fare kullanıldı. 40 mg/kg intraperitoneal Ketamin Hidroklorid + 4 mg/kg Xylazine ile sedasyona ek olarak % 0,5 propakain hidroklorid ile topikal anestezi yapıldı. Kornea epitel defekti oluşturmak için santralde 2mm çapında tek kullanımlık dermatolojik deri punch (Acu-Punch, Acuderm, Ft. Lauderdale, FL) ile işaretleme sonrası mikroskop altında kornea epiteli 11 numara bistüri ile kazındı. Bütün bu işlemler aynı araştırmacı (EHS) tarafından gerçekleştirildi.

Epitel kazınması sonrası fareler rasgele seçilen 4 gruba ayrıldı;

1. Grup A (n=6) Anne sütü damla günde 4 kez topikal
2. Grup B (n=6) Otolog serum damla günde 4 kez topikal
3. Grup C (n=6) Suni gözyaşı günde 4 kez topikal
4. Grup D (n=6) Kontrol

Uygulamalara epitel kazınmasından hemen sonra, bütün gruplara aynı günde başlandı, 3 gün süreyle devam edildi.

3.2. Biyomikroskopik Değerlendirme

Bütün farelerin 1. 2. ve 3. gün biyomikroskopik muayenesi yukarıda tanımlanan anestezi uygulaması sonrası yapıldı. Epitel defekti büyüklüğü her muayenede floresein boyama yapılarak değerlendirildi ve Sony 5.1 mega pixels dijital fotoğraf makinesi ile x16 büyütmede mikroskop altında fotoğraflanarak kaydedildi. Birinci gün, ikinci gün, üçüncü gün biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları aşağıda tanımlandığı şekilde evrelendirmeye göre skorlama yapıldı ve fotoğrafları çekilerek kaydedildi. (Resim 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7).

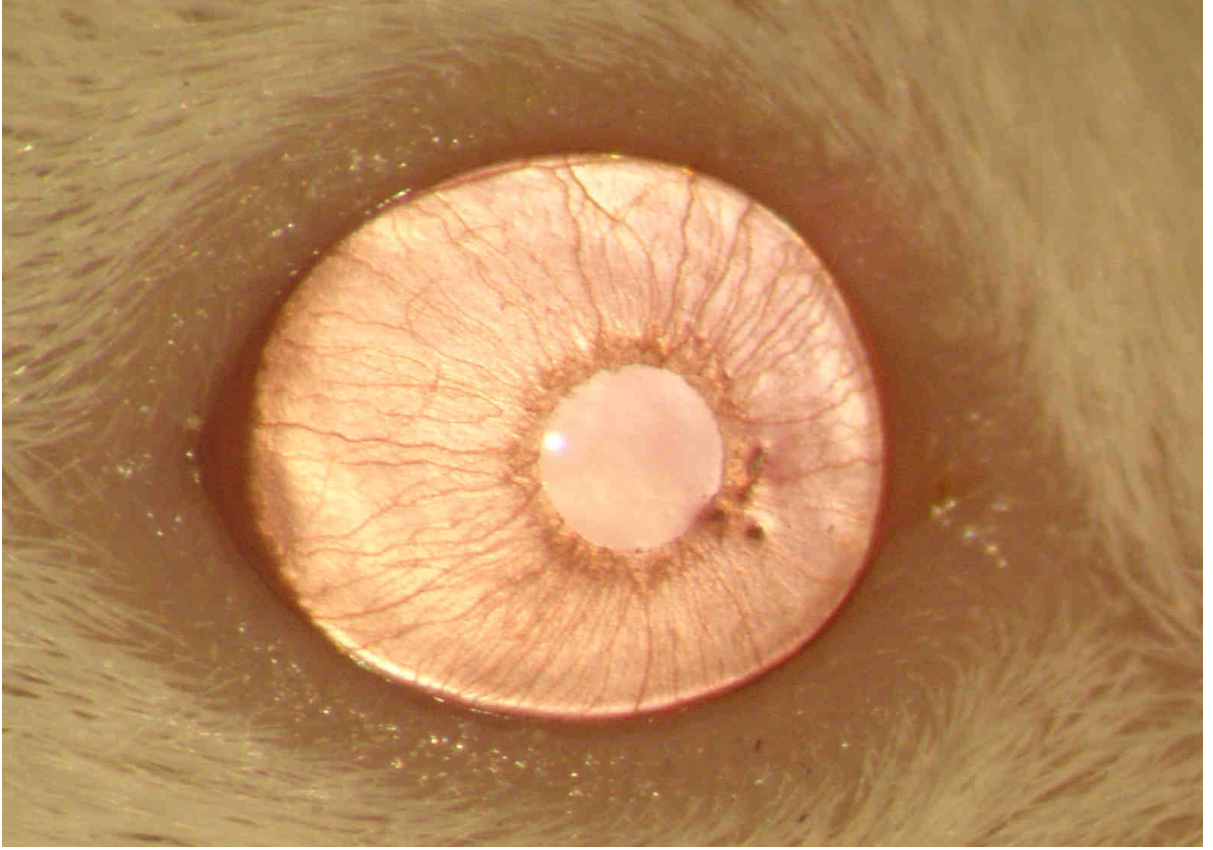
Evre 0: Hiç korneal floresein boyanma alanı yok

Evre 1: 1 mm'den küçük korneal floresein boyanma alanı

Evre 2: 1 -1,5 mm korneal floresein boyanma alanı

Evre 3: 1,5–2 mm korneal floresein boyanma alanı

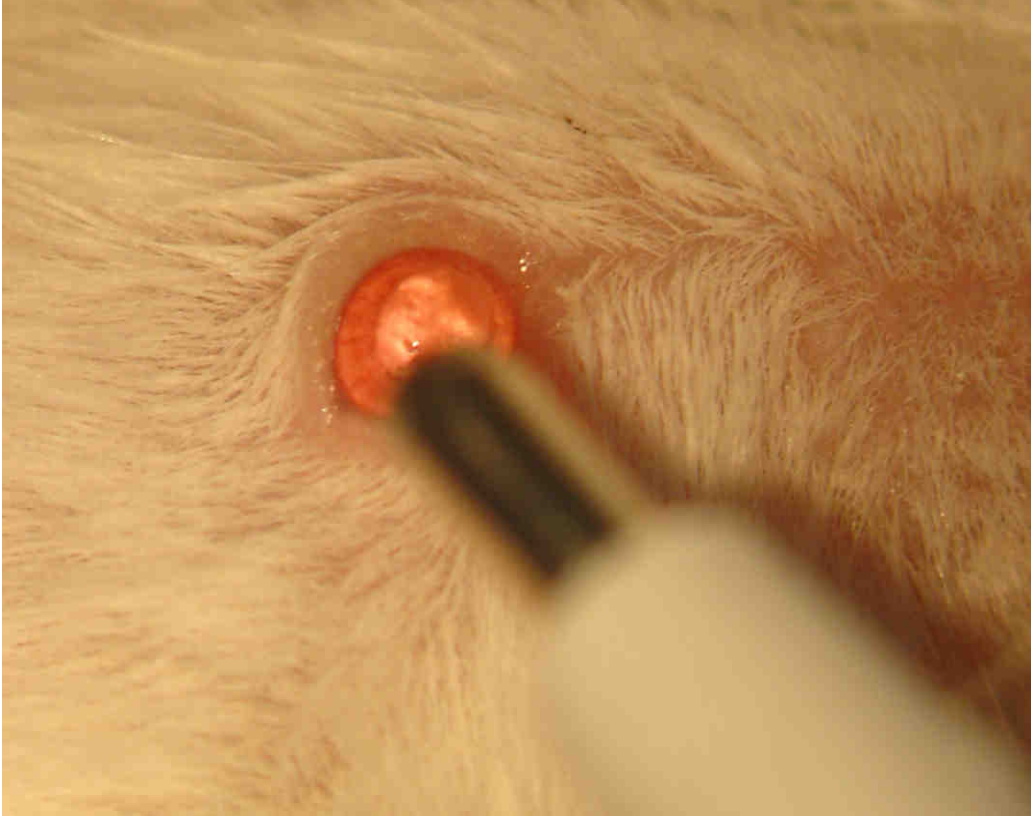
3. gün muayene sonrası 50 mg/kg intramüsküler ketamin hidroklorid ile fareler sakrifiye edildi ve enükleasyon yapıldı.



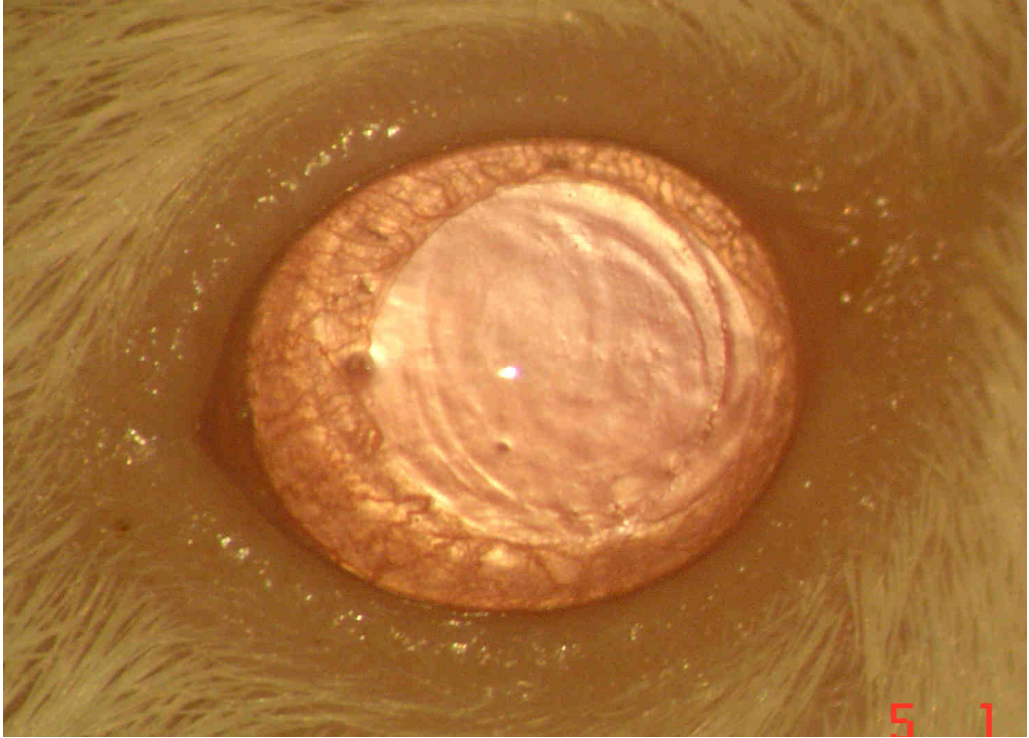
Resim 3.1. Normal fare gözünün mikroskopik görünümü



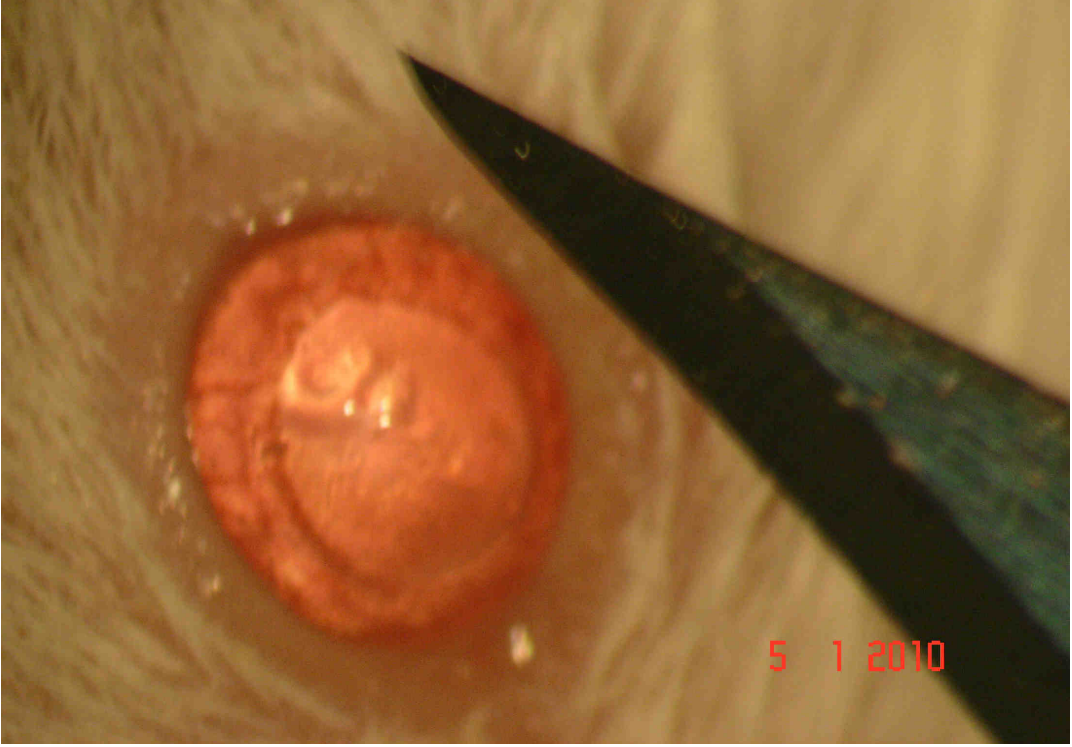
Resim 3.2. Korneada 2 mm işaretleme için kullanılan punch



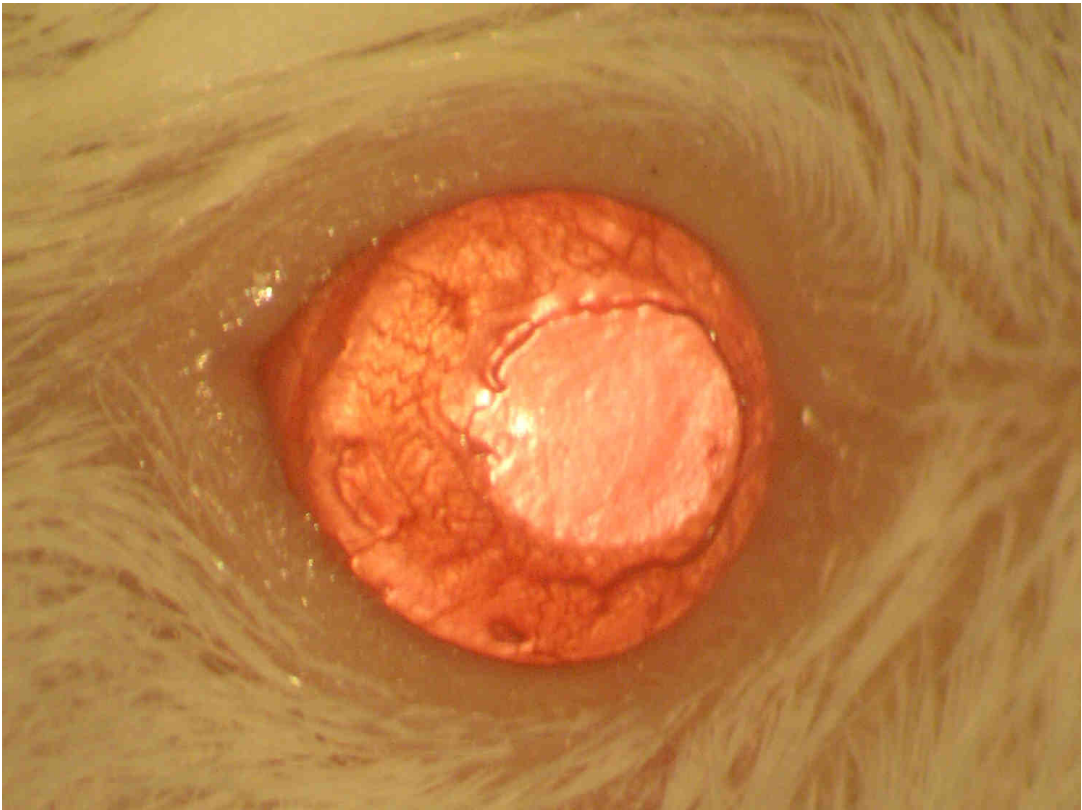
Resim 3.3. 2mm'lik santral kornea kazıma alanının işaretlenme işlemi



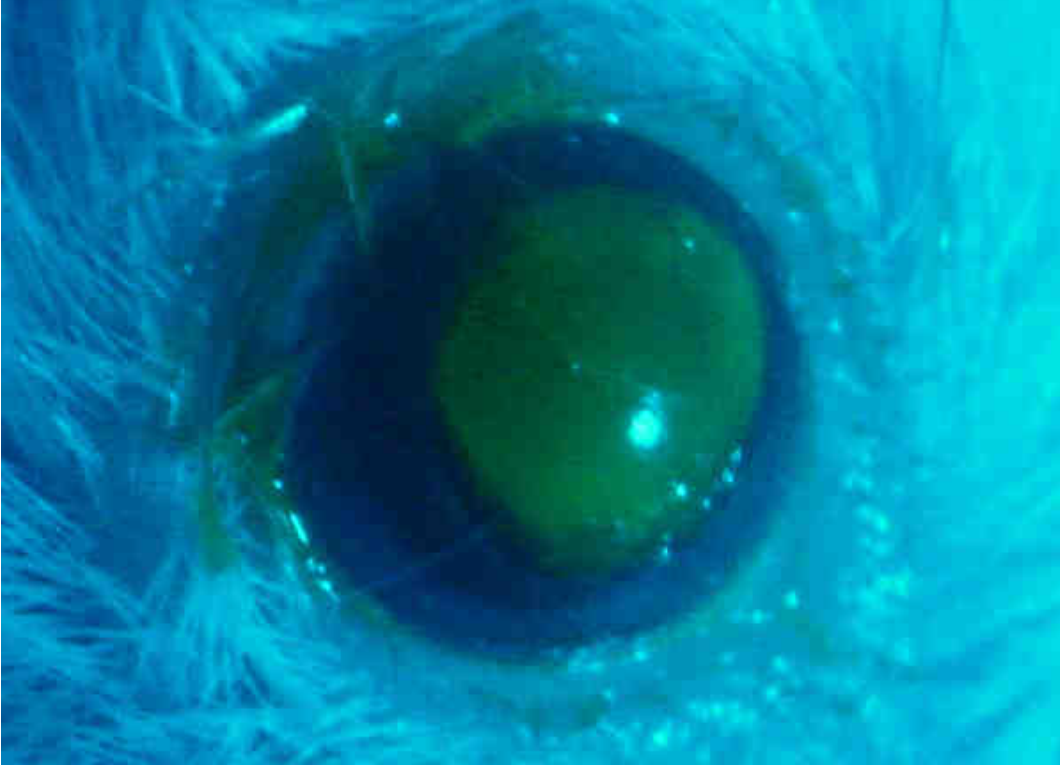
Resim 3.4. Korneal işaretleme sonrası görünüm



Resim 3.5. İşaretlenen santral kornea alanının 11 numara bistüri ile kazıma işlemi



Resim 3.6. 2 mm çapında santral kornea epitel defekti alanı



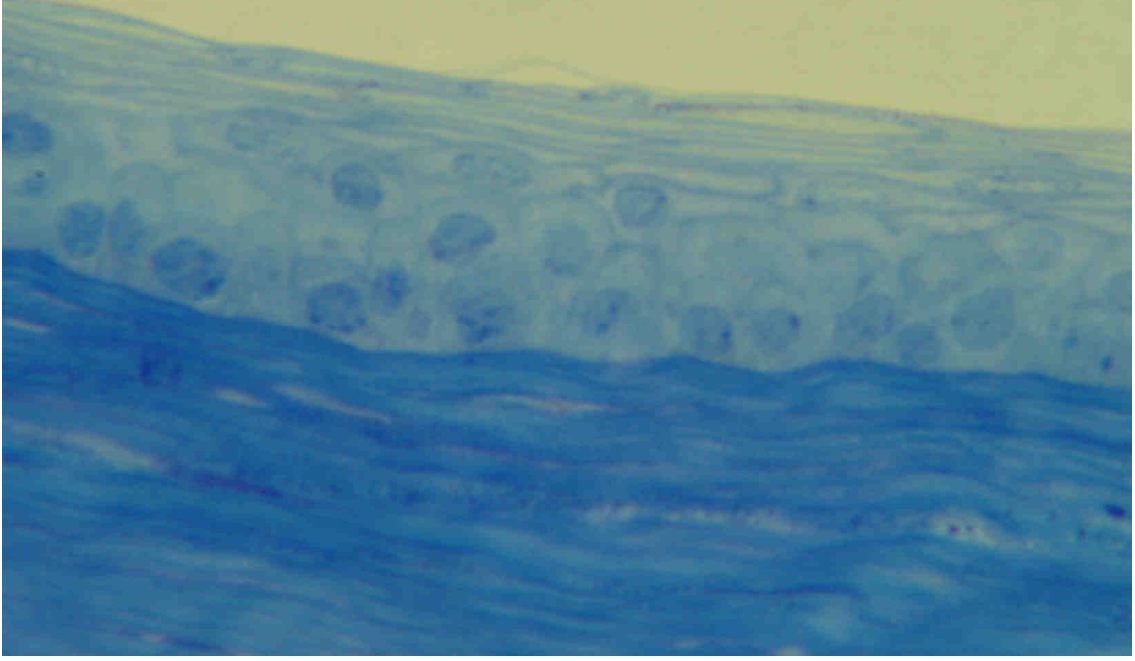
Resim 3.7. 2mm santral kornea epitel defektinin floresein boyama sonrası görünümü

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Patolojik değerlendirme için ayrılan grupta, enüklüasyonun hemen ardından fikse edici sıvının tüm globa girebilmesi için 27 gauge iğne kullanılarak, limbustan 1 mm mesafeden globlar saat 3 ve 9 meridyenlerinden perfore edildi. Globlar %10 formaldehit içinde muhafaza edildi. 24 saat sonra formaldehitten çıkarılarak dehidrate edildi ve parafin içine gömülerek hematoksilin ve eozinle boyanmak üzere 3 mikronluk kesitler alındı. Standartizasyon sağlamak için optik disk hizasından geçen santral kornea alanı değerlendirildi. Bu kesitlerden x10, x20 ve x40'lık büyütme altında fotoğraf çekildi.

Histolojik değerlendirme için enüklü edilen globlar fosfat tamponlu % 2,5 gluteraldehit içinde 2-3 saat fikse edildi. Sonra fosfat tamponlu % 1 osmium tetroksit ile postfiksasyon ve dereceli alkol serisi (%25, %50, %75, %95, absolü alkol) ile dehidratasyon yapılmıştır. Propilen oksitten geçirildikten sonra, spesimenler Araldehit CY 212, DDSA (2-dodocenil süksinik anhidrit) BDMA (benzildimetil amin) ve dibütülpitalat içine gömülmüştür. 48 saat, 56°C inkübatörde polimerize edilmiştir. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir (Resim 3.8).

Alınan ultra ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmış ve *LEO 906E EM* transmisyon model elektron mikroskopunda incelenerek dijital olarak görüntülenmiştir.



Resim 3.8. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesiti ve ışık mikroskop görünümü

3.4. İstatistiksel Analiz

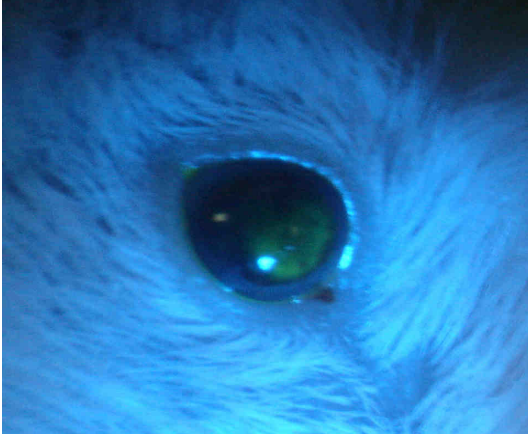
İstatistiksel değerlendirme SPSS Ver 10.0 programı ile yapıldı. Karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. 0,05'in altındaki p değerleri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi .

4. BULGULAR

4.1. Biyomikroskopik Bulgular

Bütün farelerin santral 2mm korneal epitel defekti floresein boya kullanılarak kontrol edildi ve tüm fareler çalışmaya alındı.

Günlük muayeneler sonrası, yapılan evrelemeye elde edilen skorlamaya göre Grup A (anne sütü) ve Grup B (otolog serum) arasında tüm muayene günlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p > 0.05$). Grup A'nın (anne sütü), grup C (suni gözyaşı) ve grup D'den (kontrol) tüm muayene günlerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak, daha hızlı epitelize olduğu görüldü ($p < 0.001$). Birinci gün muayene bulgularına göre gözyaşı ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p < 0.05$). Fakat ikinci ve üçüncü gün muayene bulgularına göre gözyaşı epitelizasyonu kontrol grubundan daha iyi anne sütü ve otolog serum grubundan daha kötü epitelize olduğu görüldü ($p < 0.001$), (Tablo 4.1), (Resim 4.1, 4.2, 4.3, 4.4) (Grafik 4.1.)



(A)

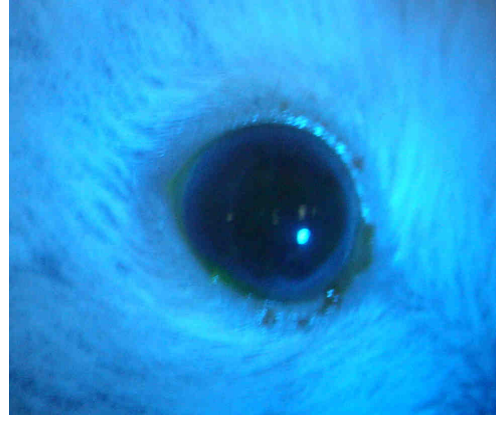


(B)

Resim 4.1. Anne sütü damlatılan (Grup A), biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün (B)

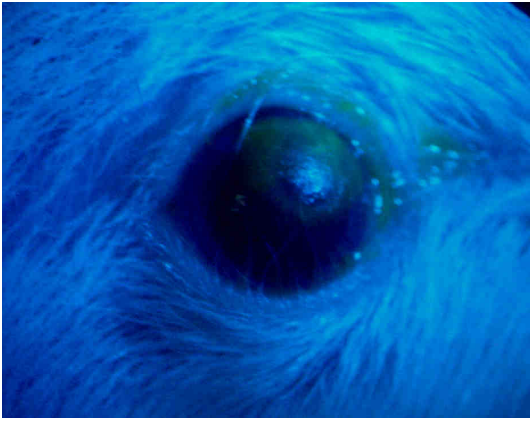


(A)

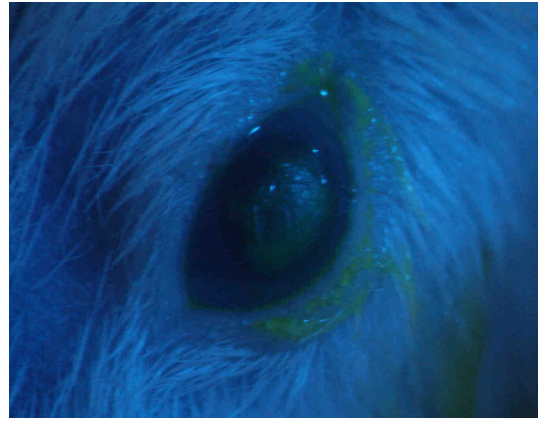


(B)

Resim 4.2. Otolog serum damlatılan (Grup B) 1.gün (a) biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün (B)



(A)



(B)

Resim 4.3. Suni gözyaşı damlatılan (Grup C) biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün(B)



(A)



(B)

Resim 4.4. Kontrol grubunun (Grup D) biyomikroskopik muayene ile korneal floresein boyanma alanları 1.gün (A) ve 3.gün(B)

Tablo 4.1. Biyomikroskopik korneal floresein tutulumu skorlama (Evre 0-3)

Grup	Muayene 1 gün	Muayene 2 gün	Muayene 3.gün	Muayene toplam skor
A1	1	0	0	1
A2	1	0	0	1
A3	1	0	0	1
A4	1	1	0	2
A5	1	0	0	1
A6	1	0	0	1
B1	1	0	0	1
B2	1	1	0	2
B3	2	1	0	3
B4	1	0	0	1
B5	1	0	0	1
B6	1	0	0	1
C1	2	1	0	3
C2	3	1	1	5
C3	3	2	2	7
C4	2	1	1	4
C5	2	1	0	3
C6	2	1	1	4
D1	3	2	1	6
D2	2	1	1	4
D3	2	1	1	4
D4	3	2	1	6
D5	3	2	1	6
D6	3	2	1	6

A=Anne sütü, B=Otolog serum, C=Suni gözyaşı, D= Kontrol

4.2. Histopatolojik Bulgular

Bütün gruplardaki farelerden elde edilen histopatolojik inceleme sonucu limbal inflamasyon, stromal lökosit infiltrasyonu, bazal hücre dizilimi, yüzeysel hücre dizilimini göre sınıflandırılarak gösterilmiştir (Tablo 4.2) (Grafik 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6) Limbal inflamasyon ve stromal lökosit infiltrasyonu için skorlama 0 = yok, 1=orta şiddetde, 2=yoğun, bazal hücre dizilimi ve yüzeysel hücre dizilimi için skorlama 0=düzenli, 1=orta, 2=kötü olarak yapıldı. Tüm preparatlar gruplar bilinmeden aynı patolog tarafından yapıldı.

Bazal hücre dizilimi açısından anne sütü damlatılan grup tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha iyi idi ($p<0.001$). Fakat anne sütü damlatılan grup ile otolog serum damlatılan grup arasında limbal inflamasyon, stromal lökosit infiltrasyonu ve yüzeysel hücre dizilimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaz($p>0.05$) iken suni

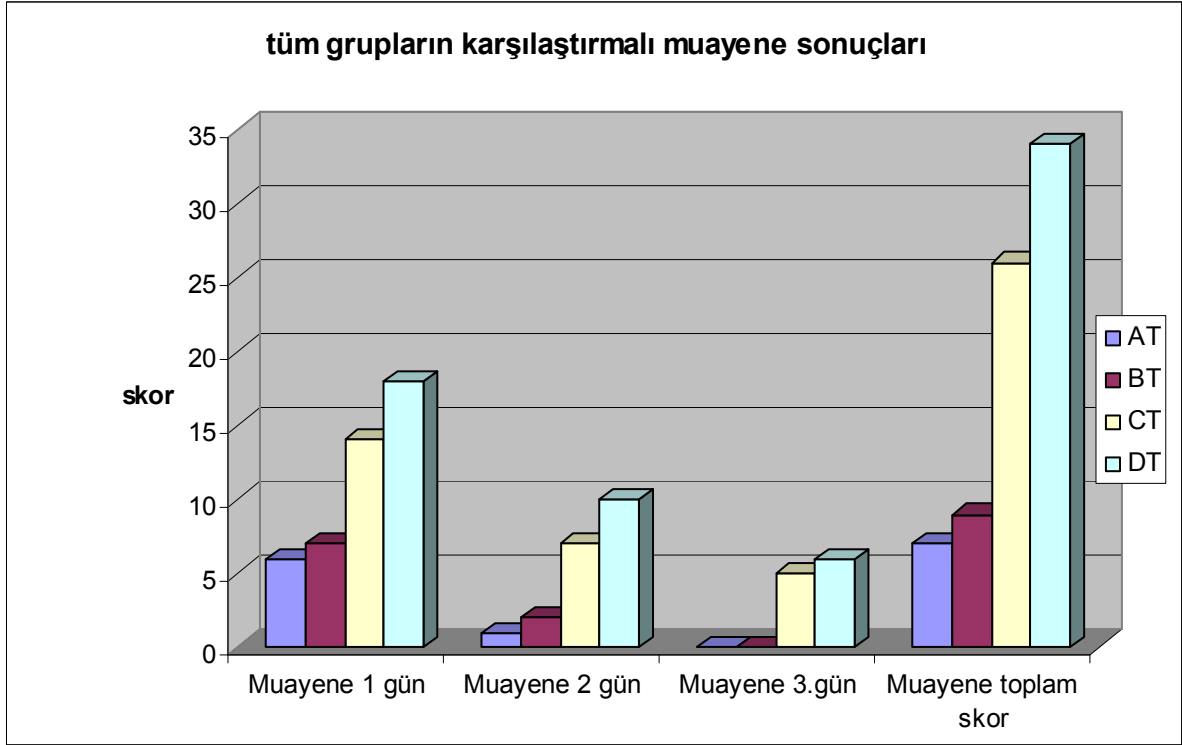
gözyaşı damlatılan grup ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha iyi idi ($p<0.001$).

Suni gözyaşı damlatılan grup ile kontrol grubu arasında limbal inflamasyon ve stromal lökosit infiltrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaz ($p>0.05$) iken bazal hücre dizilimi ve yüzeyel hücre dizilimi açısından suni gözyaşı damlatılan grubun istatistiksel olarak anlamlı olarak daha iyi olduğu görüldü. En çok patolojik değişiklik olan grup istatistiksel olarak anlamlı olarak herhangi bir damla damlatılmamış olan kontrol grubu idi ($p<0.001$) (Resim 4.5 – 4.15).

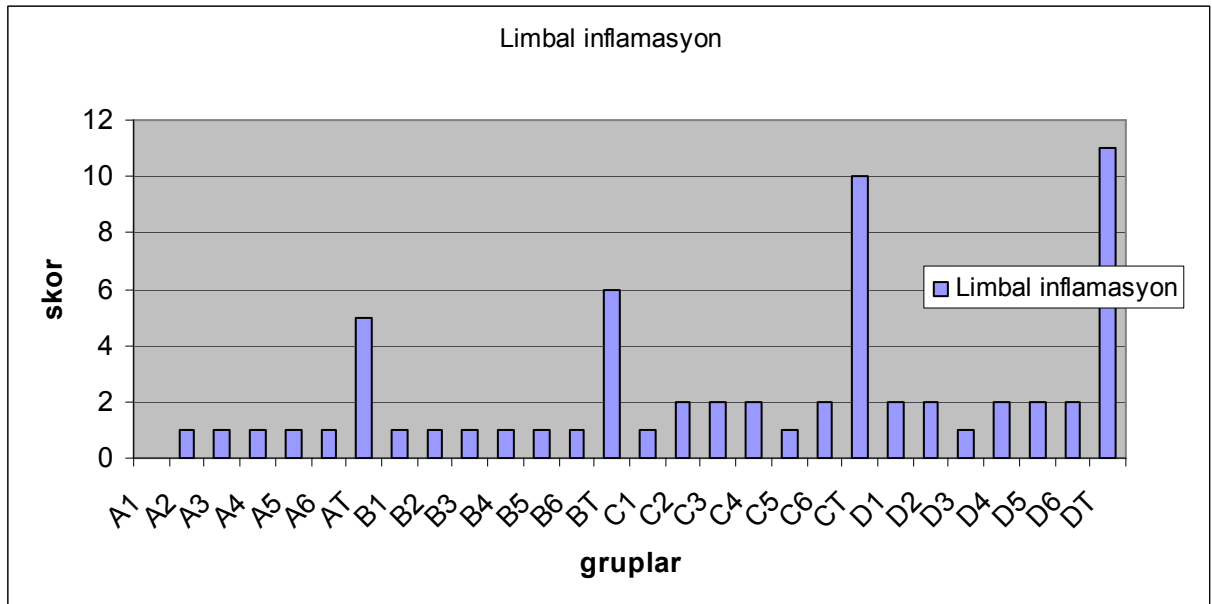
Tablo 4. 2. Histopatolojik değerlendirme

Grup	Limbal inflamasyon (0-2)	Stromal lökosit infiltrasyonu (0-2)	Bazal hücre dizilimi (0-2)	Yüzeyel hücre dizilimi (0-2)	Patoloji toplam skor
A1	0	0	0	0	0
A2	1	0	0	0	1
A3	1	0	0	1	2
A4	1	1	1	1	4
A5	1	0	0	1	2
A6	1	1	1	1	4
B1	1	0	0	1	2
B2	1	1	1	1	4
B3	1	1	2	1	5
B4	1	0	2	1	4
B5	1	0	0	1	2
B6	1	1	0	1	3
C1	1	1	1	1	4
C2	2	2	2	2	8
C3	2	2	2	2	8
C4	2	1	2	2	7
C5	1	1	2	2	6
C6	2	2	1	1	6
D1	2	2	2	2	8
D2	2	1	2	2	7
D3	1	1	2	2	6
D4	2	1	2	2	7
D5	2	2	2	2	8
D6	2	1	2	2	7

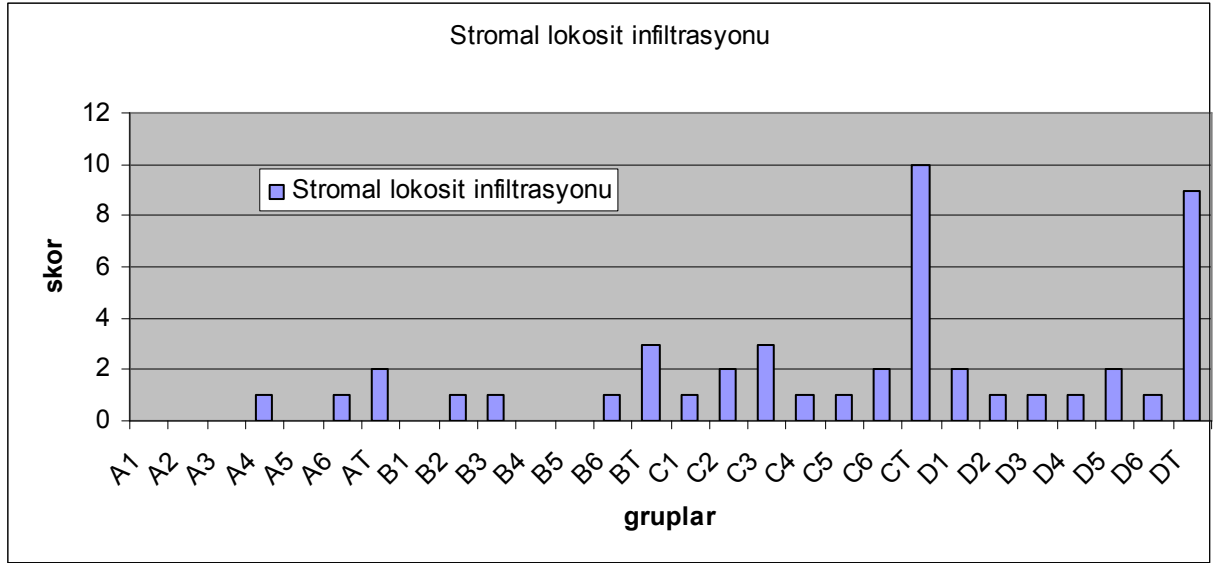
A=Anne sütü, B=Otolog serum, C=Suni gözyaşı, D= Kontrol



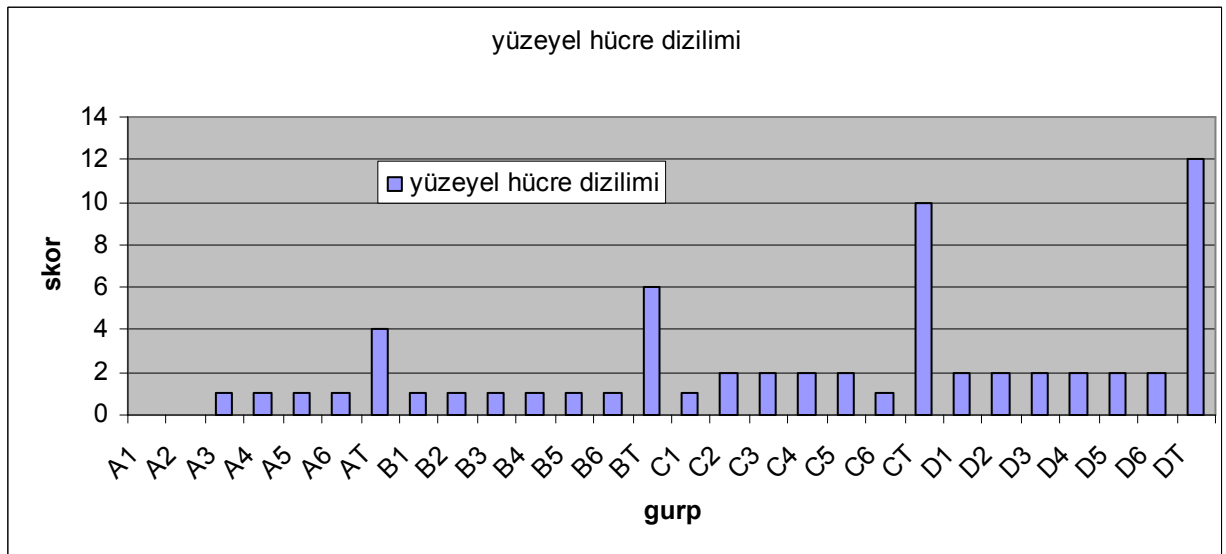
Grafik 4.1. Muayene bulgularına göre toplam skor karşılaştırması



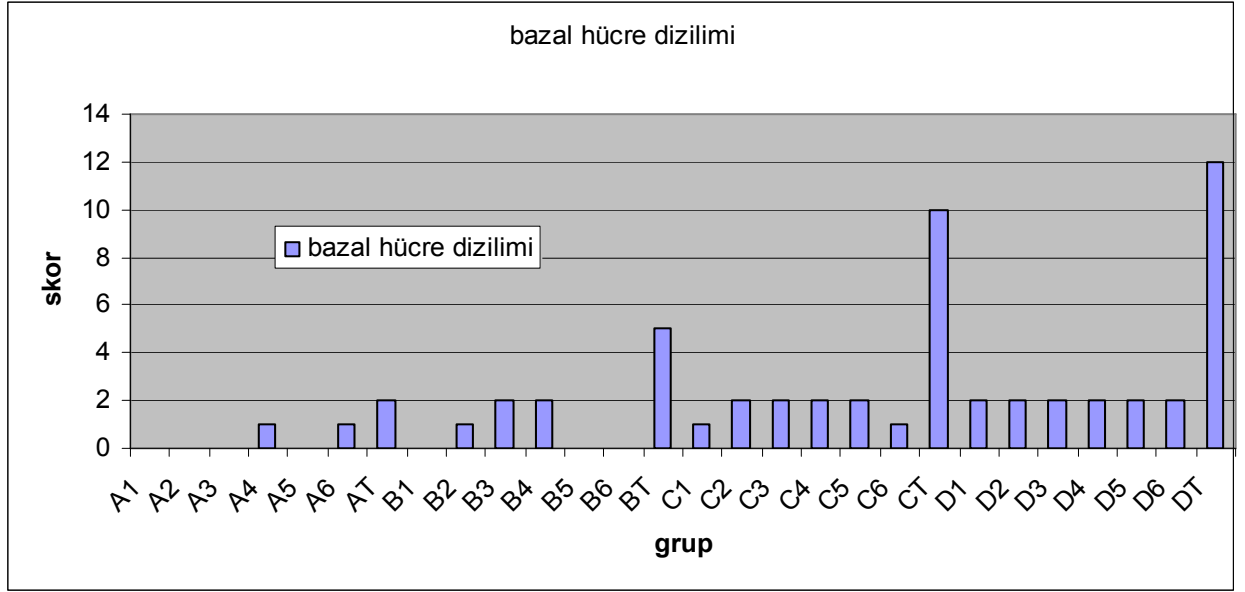
Grafik 4.2. Histopatolojik değerlendirmeye göre limbale inflamasyon



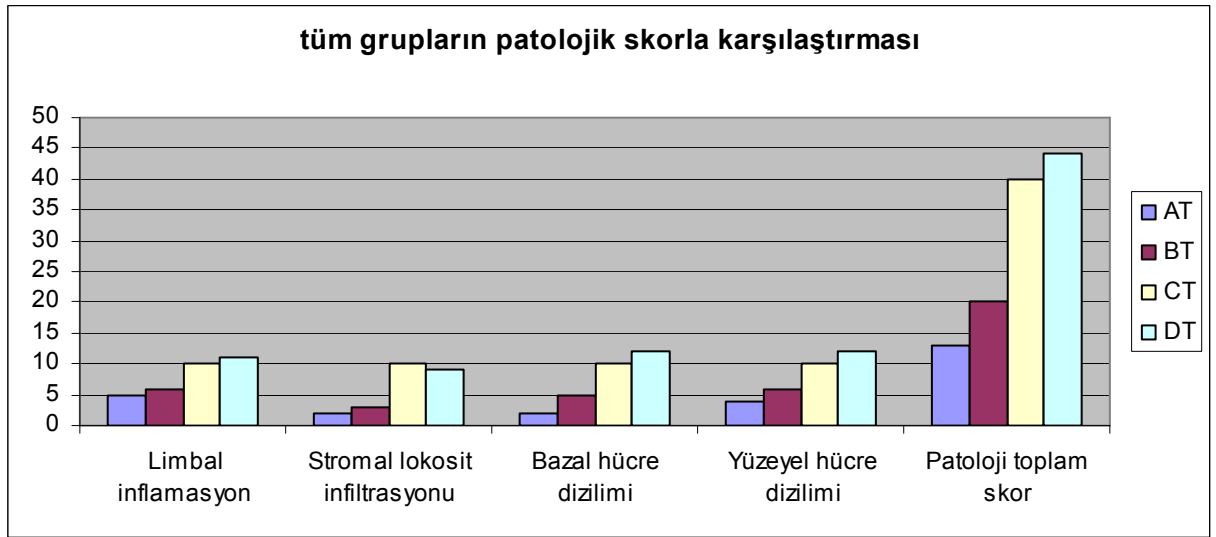
Grafik 4.3. Histopatolojik değerlendirmeye gre stromal lokosit infiltrasyonu



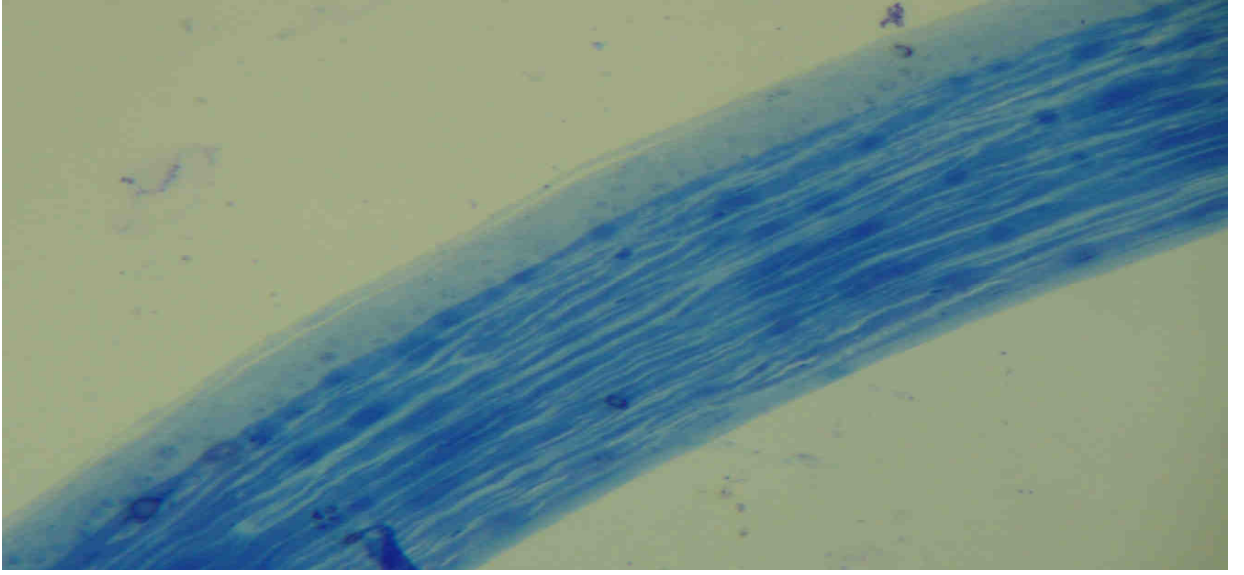
Grafik 4.4. Histopatolojik değerlendirmeye yüzeyel hcre dizilimi



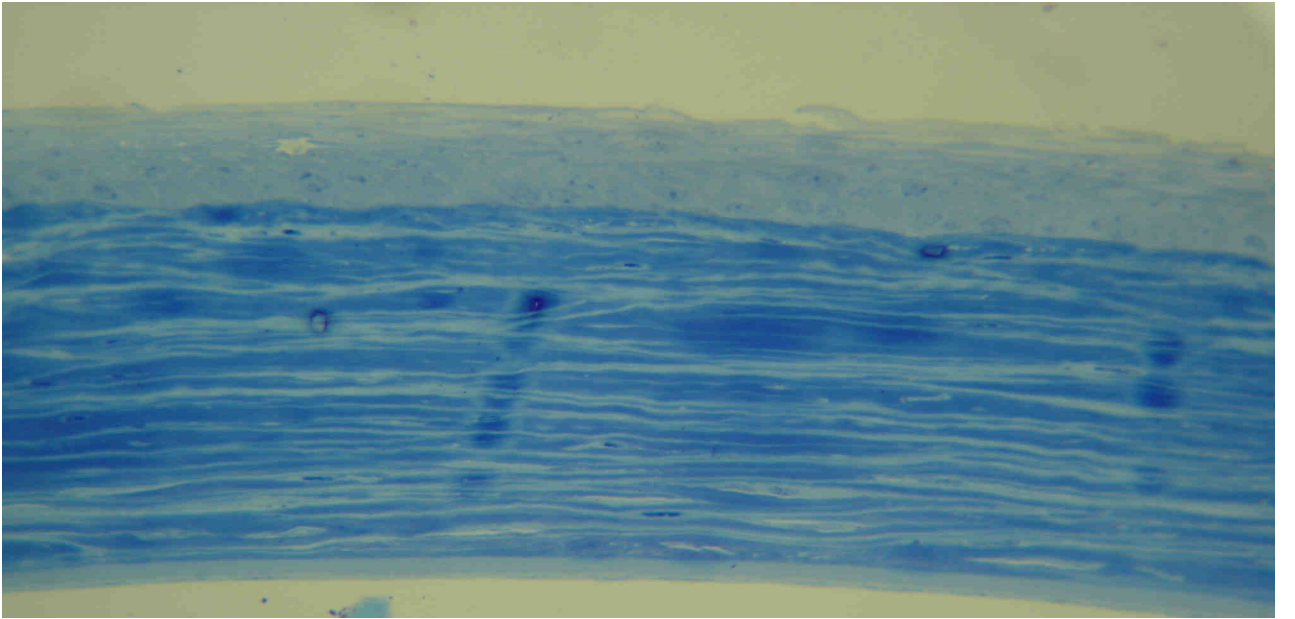
Grafik 4.5. Histopatolojik değerlendirmeye göre bazal hücre dizilimi



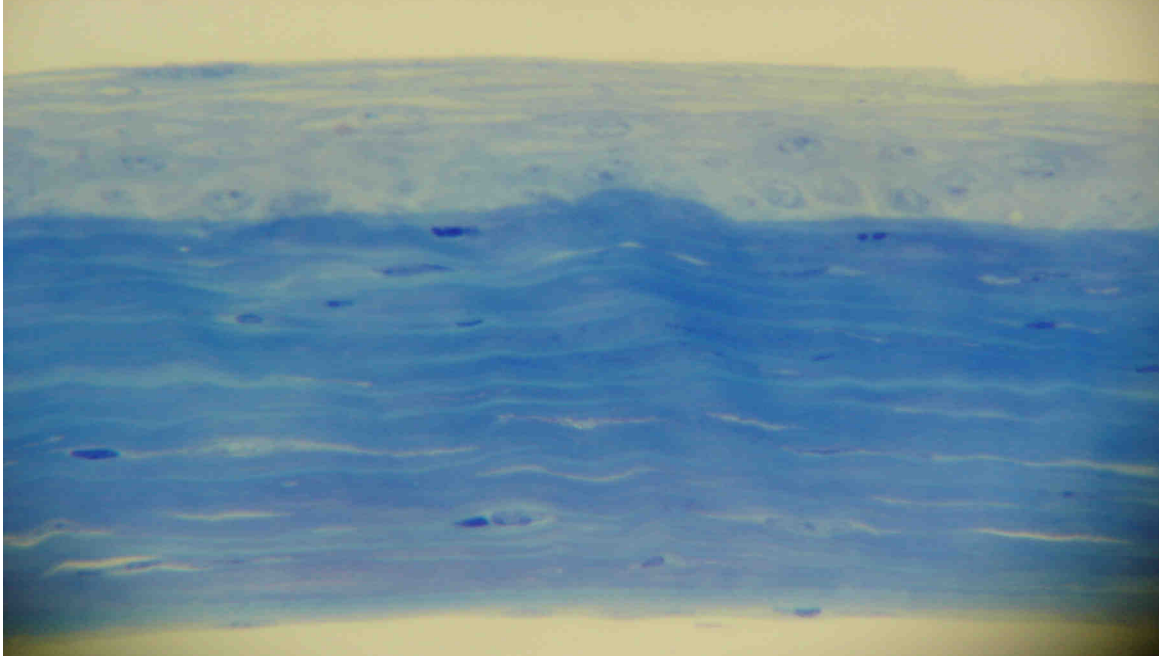
Grafik 4. 6. Histopatolojik değerlendirmeye göre toplam skor karşılaştırması



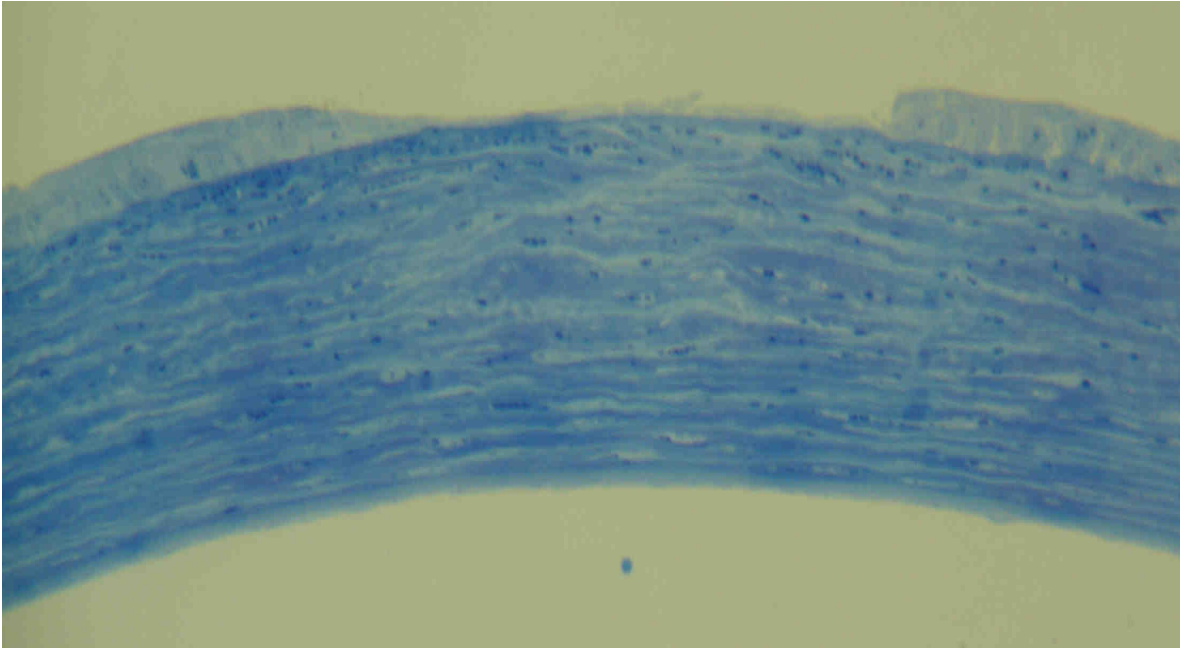
Resim 4.5. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve anne sütü damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x10)



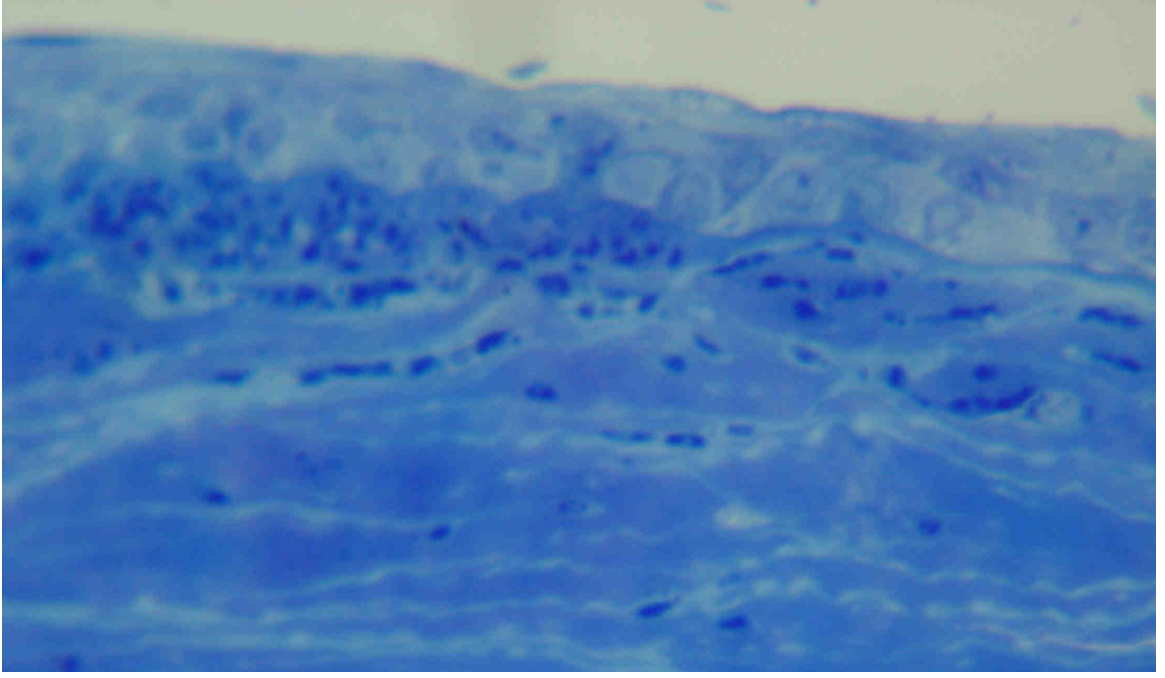
Resim 4.6. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve anne sütü damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x40)



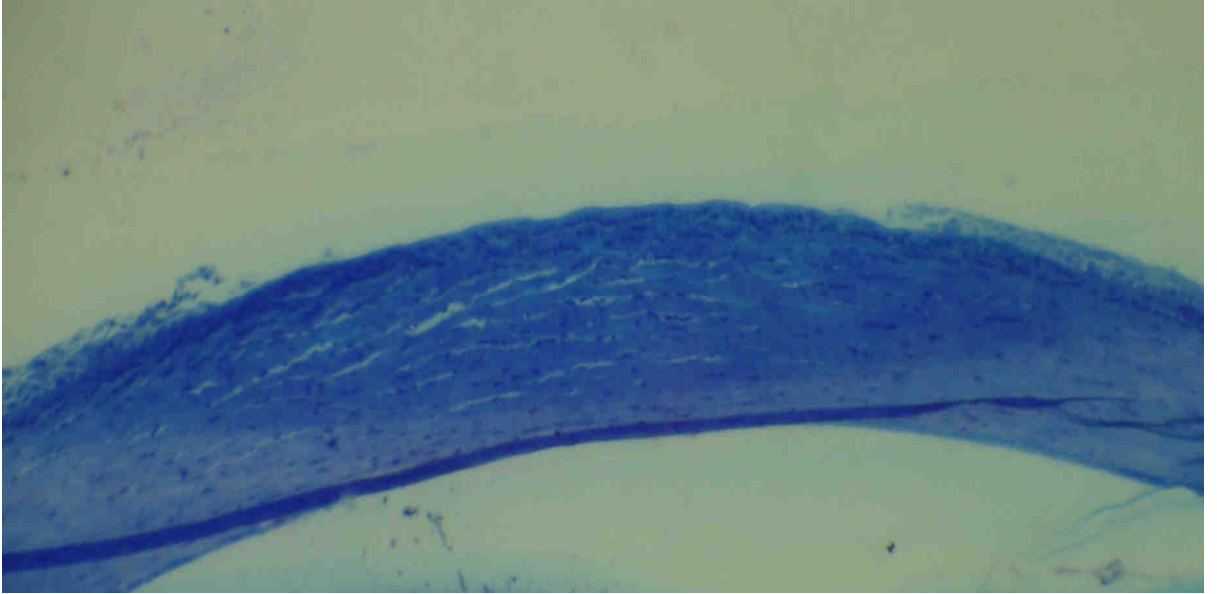
Resim 4.7. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve otolog serum damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (**x40**)



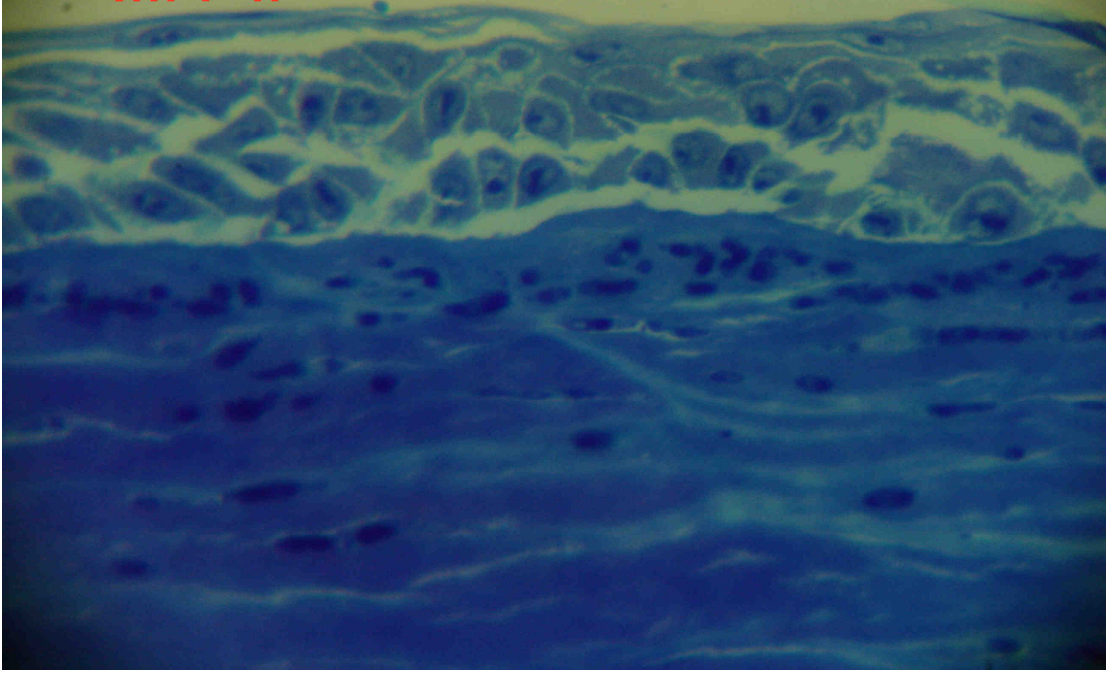
Resim 4.8. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve suni gözyaşı damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (**x10**)



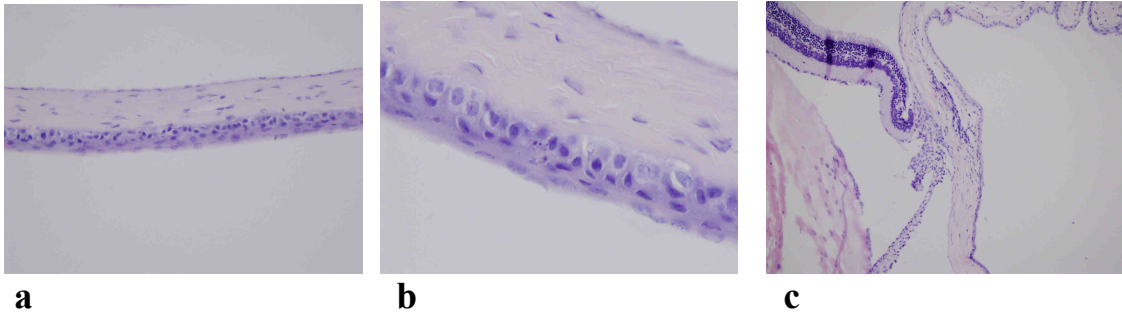
Resim 4.9. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve suni gözyaşı damlatılan grup ışık mikroskopunda inceleme (x40)



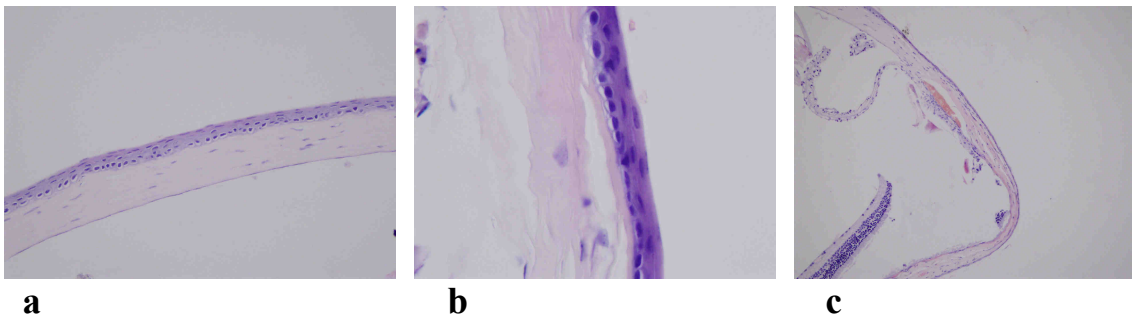
Resim 4.10. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve kontrol grubu ışık mikroskopunda inceleme (x10)



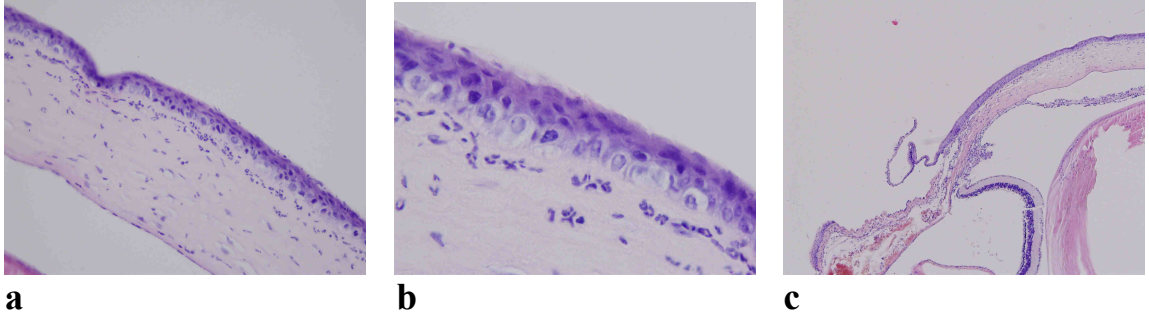
Resim 4.11. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ve kontrol grubu ışık mikroskopunda inceleme (x 40)



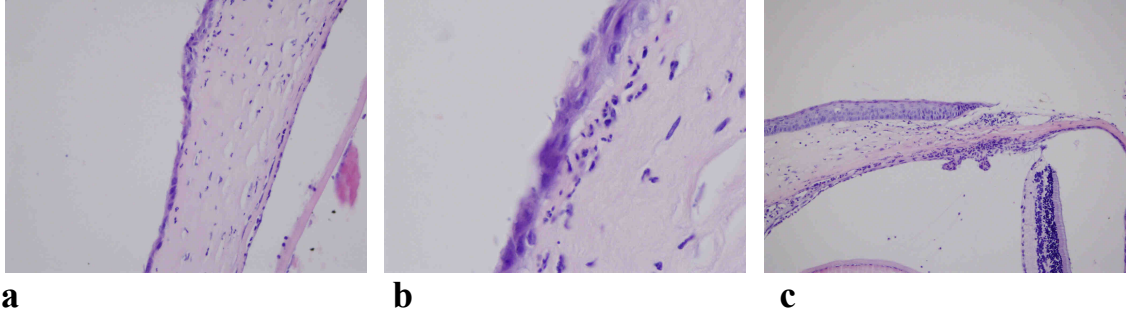
Resim 4.12. Anne sütü damlatılan grup patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c)



Resim 4.13. Otolog serum damlatılan grup patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c)



Resim 4.14. Suni gözyaşı damlatılan grup patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c)

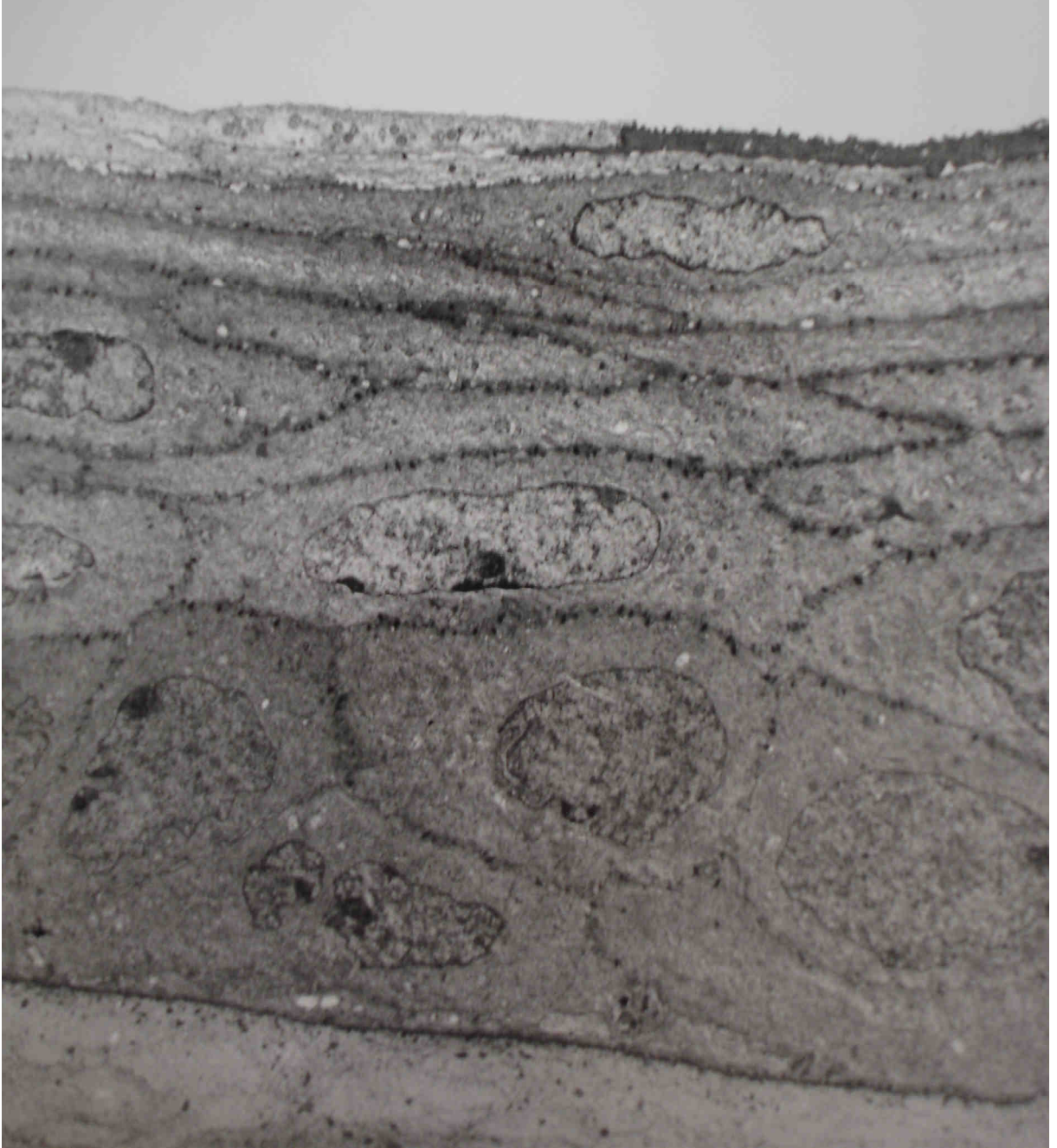


Resim 4.15. Kontrol grubu patolojik kesitler. Santral kornea görünümü büyütme x20 (a), büyütme x40 (b), limbal infiltrasyon, büyütme x10 (c)

4.3. Transmisyon elektron mikroskopi (TEM) sonuçları

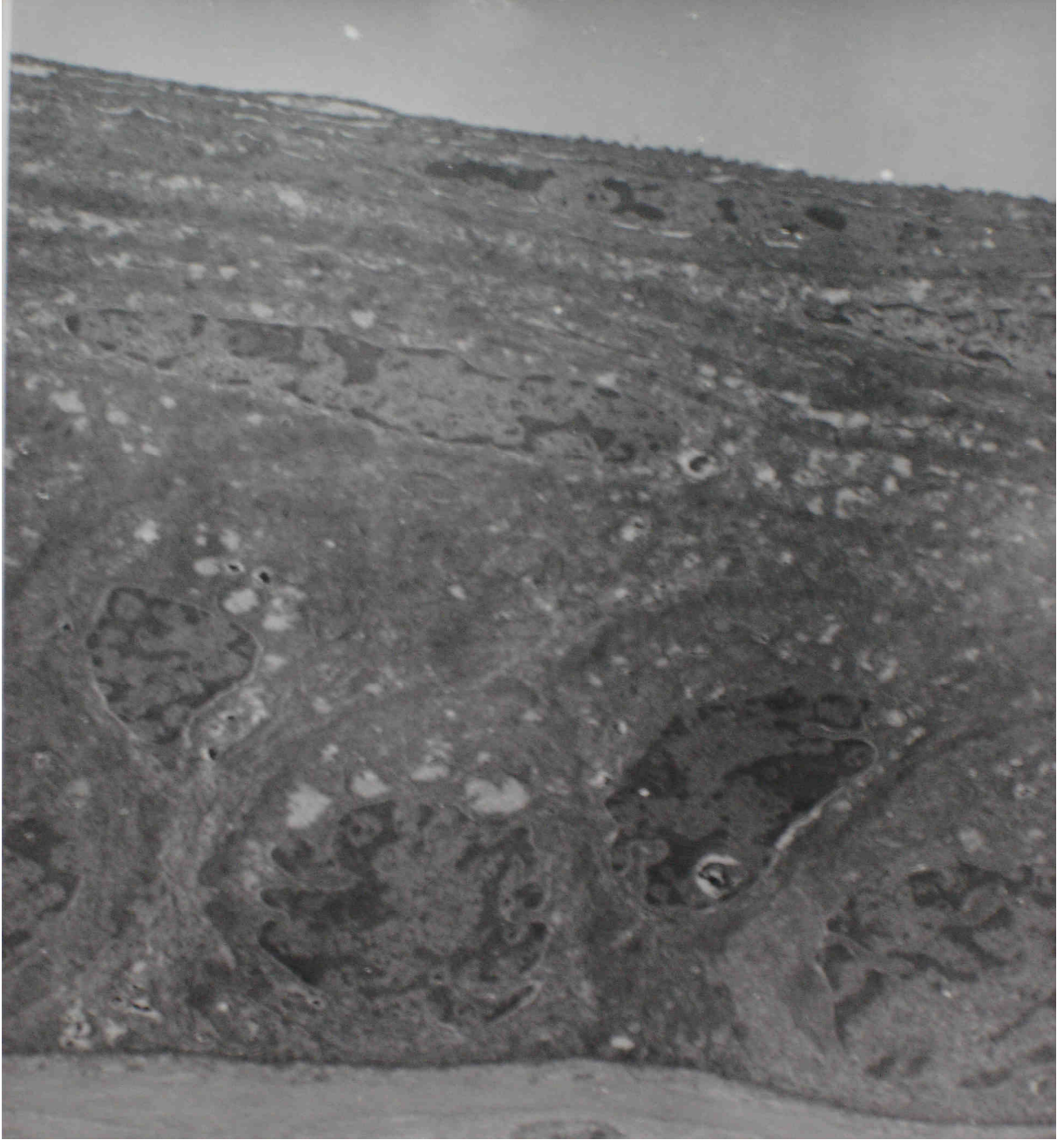
Normal kornea yapısına en çok benzeyen anne sütü damlatılmış olan grup A olarak görüldü (Resim 4.16). Otolog serum damlatılan grup B (Resim 4.17) anne sütüne yakın iyilikte görüldü. Gözyaşı damlatılan grup C (Resim 4.18) sadece kontrol (Resim 4.19) grubundan daha iyi idi.

Anne sütü



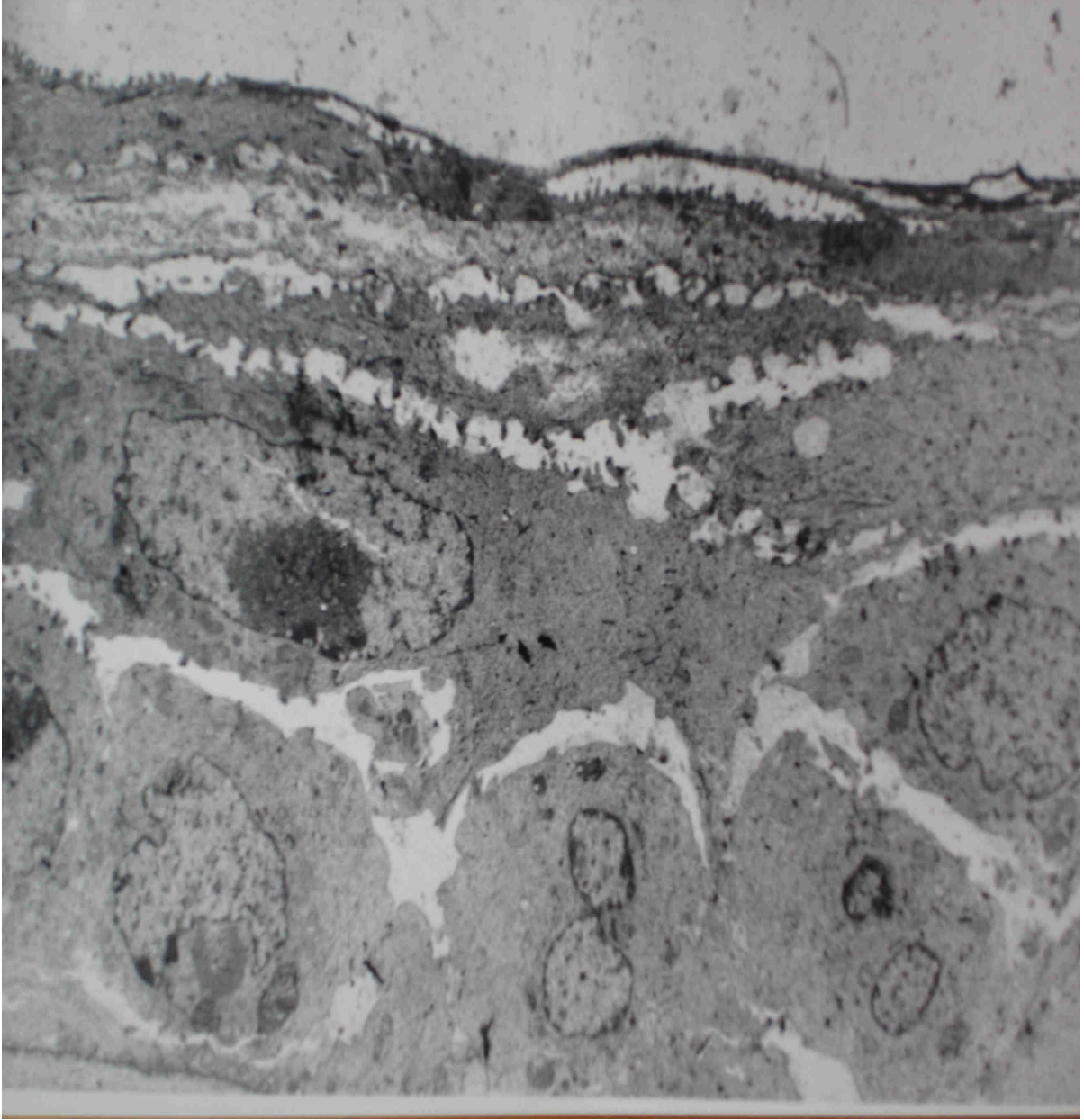
Resim 4.16. Grup A (Anne sütü): Kornea çok katlı yassı epiteli, bazal membran, hücreler arası bağlantı birimleri, hücre organelleri ve çekirdekleri ile normale yakın görünümdedir. (x 2156)

Otolog serum



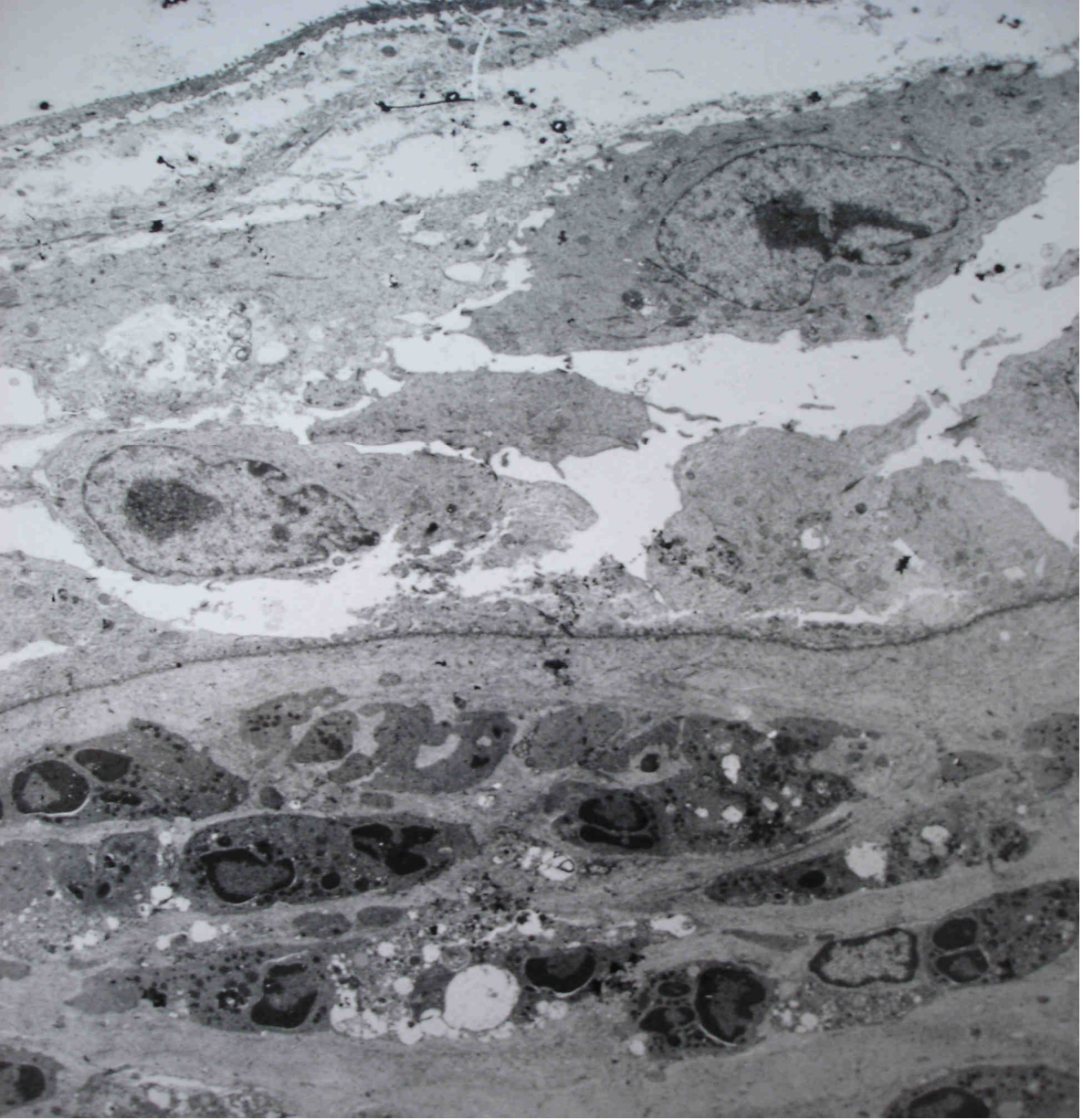
Resim 4.17. Grup B (Otolog serum): Kornea çok katlı yassı epiteli, bazal membran, hücreler arası bağlantı birimleri, hücre organelleri ve çekirdekleri ile normale yakın görünümündedir. (x 2156)

Suni gözyaşı



Resim 4.18. Grup C (Suni gözyaşı): Kornea epitel bazal membranı intakt, kornea epitel hücreleri arası bağlantılarda açılma görülürken, bazı hücrelerde vakuolizasyon ve yüzeysel hücrelerde ayrılmalar görülmekte idi. (x 2156)

Kontrol



Resim 4.19. Grup D (Kontrol): Korneal epitel bazal membranı intakt olmakla birlikte kornea epitel hücreleri hemen hemen birbirlerinden ayrılmış. Bazı hücreler parçalanmış ve en üst sırada bütünlüğünü kaybetmiş yassı hücrelerde yoğun vakualizasyon dikkati çekmektedir. (x 2156)

5. TARTIŞMA

Gözyaşı, kornea ve konjontiva epitelinin stabilitesinde, yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesinde büyük öneme sahiptir. Kornea epitelinin bölünmesinde, migrasyonunda ve farklılaşmasında görev alan büyüme faktörleri, vitamin ve nöropeptid gibi maddeler lakrimal bezlerden salgılanan gözyaşından sağlanmaktadır. Buna ilave olarak gözyaşı antimikrobik, besleyici ve optik özelliklere sahiptir. Gözyaşı yetersizliğinde bu dengenin bozulması epitel hasarı ile sonuçlanır. Bu durumda suni gözyaşının kullanımı yeterince epitel rejenerasyonu sağlayamamaktadır. Gözyaşının içeriğine yakın maddeler arayışı oftalmolojide sürmektedir.

Son araştırmalar, sağlıklı bir göz yüzeyi epitelini korumak için gözyaşı bileşenlerinin önemini göstermiştir. Bu nedenle gözyaşları içinde fibronektin, EGF ve vitamin A gibi mevcut olan bileşenler araştırılmıştır (61,62,63,64).

Ohashi ve ark.'ları temel ve refleks gözyaşlarında bulunan EGF'nin, kornea epitel proliferasyonunu hızlandırmada etkili olduğunu göstermiştir (65). Refleks, non-refleks gözyaşında ve otolog serumdaki EGF konsantrasyonunu miktarlarını ölçmüşlerdir. Otolog serumda EGF miktarının yaklaşık 0.5 ng / ml daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Speek ve ark.'ları tarafından insan gözyaşı içinde retinol miktarı 0,4-10,6 ng / ml bildirilmiştir (66). Otolog serumda retinol konsantrasyonu 55 mg / ml civarındadır. A vitamini eksikliğinde, epitelin skuamöz metaplazi oluşturma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (67,68). Otolog serum uygulama, gerekli retinolü daha yüksek seviyede içermesi nedeniyle patolojik durumlarda kullanılabilir görünmektedir.

Nishida ve ark.'ları 1983 yılında fibronektini korneal trofik ülserinde yeni bir tedavi yolu olarak yayımlamışlardır. Fibronektin, bir glikoprotein, plazma ve mevcut ekstraselüler matriks ve hücrel yapışmadan sorumludur. Bu çalışmada afinite kromatografisi kullanımı ile plazmadan arınmış fibronektin kullanımı ile trofik korneal ülser ve persistan epitel defektini tedavi etmişlerdir. Otolog saf fibronektin damlası ile epitel defektleri tamamen kaybolduğunu göstermişlerdir (69).

Spigelman ve ark.'larının yaptığı çalışmada persistan epitel defektinde fibronektinin tedavideki etkisine bakmışlardır. Persistan epitel defekti olan 6 göze fibronektin (300(mu)g/ml) damla 4x1 başladıktan sonra 4 gözdeki epitel defekti başarı ile

tedavi olmuştur. İyileşmeyen 2 gözde ise etiyojide termal yanık ve infeksiyon olduğu görülmüştür. Anne sütünde de olan fibronektin, epitel migrasyonunda in vitro ve in vivo çalışmalarında etkili olduğu gösterilmiştir (70).

Nakamura ve ark.'ları tarafından 1994 yılında yaptıkları çalışmada, tavşan kornea epitel yara kapanması üzerine Hyaluronan ve fibronektinin kombine etkileri invivo olarak araştırılmıştır. Fibronektin göz damlası (1 mg / ml) ve Hyaluronan göz damlası (1 mg / ml) 32 saat uygulanmıştır. Sonuçta tek tek kullanımına göre kombine grupta iyileşme oranının daha iyi olduğu görülmüştür. Bu sonuçlarla Hyaluronan ve fibronektin kombinasyonunun kornea epitel yara kapanmasında sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir (71).

Biyolojik olarak aktif moleküllerin konsantrasyonu gözyaşı sıvıları ve otolog serumda farklıdır. Ancak, gözyaşları temel bileşenlerinin çoğu otolog serum içinde mevcuttur. Otolog serum oküler yüzey bakımı için gözyaşı yerine kullanılması mümkün görünmektedir. Otolog serum oküler yüzey için zararlı bileşenleri de içerebilir. Örneğin TGF- β , antiproliferatif etkileri olduğu için yüksek konsantrasyonlarda oküler yüzey epitel yara iyileşmesini bastırıyor olabilir. Wilson ve ark.'ları, Gupta ve ark.'ları TGF- β miktarını gözyaşında 10 ng / ml olarak bildirdi (72,73). TGF- β insan serum konsantrasyonu yaklaşık 50 ng / ml, gözyaşına göre beş kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. TGF- β seviyelerini gözyaşları ile uygun seviyelere getirmek için, otolog serum seyreltilmiş şekilde kullanılmaktadır. Otolog serumun en etkili konsantrasyonu belirlemek için daha fazla çalışma gereklidir.

Kuru göz klinik pratikte sık karşılaştığımız bir durumdur. National Eye Institute/Industry Workshop'a göre kuru gözün tanısında 1) Semptomlar, 2) İnterpalpebral yüzey hasarı, 3) Gözyaşı film tabakasındaki instabilite ve 4) Hiperosmolar gözyaşı bulunuşu yer alır (74).

Kuru gözün ortaya çıkma nedenlerinden biri olan, gözyaşı film tabakasındaki instabilite, yağ tabakasının kalınlığının azalmasına bağlı olarak oluşur (75,76). Ayrıca, yağ tabakasının kalitesi de gözyaşı film tabakasının stabilitesinde önemli olarak bildirilmiştir (77,78). İncelmiş gözyaşı yağ film tabakası ile flöresein dağılma süresinde azalma, Schirmer testinde azalma, gözyaşı buharlaşmasında artış ve kuru göz birlikteliği gösterilmiştir (77,79). Lipid tabaka kalınlığı (LLT) kuru göz göstergesi olarak kullanılabilir. Hastanın kuru göz semptomlarında rahatma sağlayabilmek için

birinci basamak tedavi olarak lubrikan gözyaşı damlaları kullanılmaktadır. Ancak, lubrikan göz damlası olmasına rağmen, yetersiz yağ içeriği nedeniyle gözyaşı buharlaşma oranlarını bile artırabildiği gösterilmiştir (80). Bu bilgi daha etkili bir tedavi arayışını artırmıştır.

Kord kanı ve dana serumundan elde edilen damlalar kullanılmış ancak infeksiyon bulaşı ve allerjik reaksiyon riski nedeniyle güvenli ve kullanışlı bulunmamıştır. Yoon ve ark. kuru göz sendromunda umbilikal kord serum ve otolog serum damlatılmasını karşılaştırmışlardır. Prospektif olarak yapılan, vaka-kontrol çalışmasında 21 hastanın 41 gözü % 20 seyreltilmiş otolog serum ile tedavi edilmiş, 27 hastanın 51 gözü göbek kord serum göz damlası ile tedavi edilmiştir. Değerlendirme için break-up time (BUT), Schirmer testi, korneal duyarlılık testi, konjonktiva sitolojik analizi ve kornea flöresein boyama, tedavi öncesi, birinci ve ikinci ay tedavi sonrasında yapılmıştır. Hem otolog serum hem umbilikal kord serum tedavisi ile semptom skorunda ilerleme sağlanmıştır. Göbek kordonu serum göz damlası şiddetli kuru göz sendromunda otolog seruma göre daha etkili olduğu görülmüştür (81).

Hastanın kendi kanından elde edilen otolog serum, antijenik olmaması ve hastalık bulaşması ihtimalinin olmaması nedeniyle diğer sıvılara göre daha avantajlıdır. Otolog serumda bulunan birçok maddenin epitel hücreleri üzerine trofik etkileri olduğuna inanılmaktadır. Epitel kökenli büyüme faktörü (EGF), transforme edici fibroblast kökenli büyüme faktörü (TGF- β), vitamin A, albumin, a2 makroglobulin, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), substance P benzeri nöropeptid ve insulin tip 1 büyüme faktörü bu maddeler arasındadır. Tüm bu maddeler serumda gözyaşına oranla daha fazla miktarda bulunur.

Tsubota ve ark.'ları 1999 yılında, Sjögren sendromunda kuru göz tedavisinde otolog serum uygulamasının etkinliğini değerlendirmişlerdir. Klinik olarak Sjögren sendromu olan 12 hasta otolog serum ile 4 hafta boyunca, tedavi edilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası bulgular karşılaştırılmıştır. EGF, A vitamini ve TGF- β 'nın +4 ° C'de buzdolabında 1 aya kadar ve -20 ° C'de en fazla 3 ay korunduğunu saptamışlardır. Sırasıyla Rose Bengal ve flöresein puanları başlangıç skorları 4 hafta sonraki sonuçları 5,3 - 5,6 ve 1,7- 2,5 olarak görülmüştür. Sonuçta otolog serum uygulamasının Sjögren sendromlu hastaların tedavisinde oküler yüzey temel bileşenlerini sağlamak için güvenli ve etkili bir yol olduğunu göstermişlerdir (82).

Geerling ve ark.'ları oküler yüzey bozuklukları için otolog serum göz damlasını değerlendirmiştir. Gözyaşı, mekanik, besleyici, antimikrobiyal ve optik özelliklerle beraber büyüme faktörleri, fibronektin gibi bileşenler içermektedir. Bunlar proliferasyon, kornea ve konjonktiva epitel farklılaşması ve migrasyonu üzerine etkilemektedir. Bu epitelyotrofik faktörlerin eksikliği, kuru göz, ağır oküler yüzey bozuklukları ve kalıcı epitel defektlerine yol açabilmektedir. Otolog serum göz damlası bir prezervan içermeden hazırlanmaktadır. Allerjik olmayan, biyomekanik ve biyokimyasal özellikleri ile normal gözyaşına benzerdir. In vitro hücre kültürü deneylerinde kornea epitel hücre morfolojisi ve fonksiyonu otolog serum ile suni gözyaşına göre daha iyi görülmektedir. Klinik kohort çalışmalarda ciddi kuru göz ve kalıcı epitel defektlerinde başarılı kullanımı bildirilmiştir. Ancak, tedavi planlarını düzenlemek üzerinde çalışmalar devam etmektedir (83).

Tsubota ve ark.'ları 1999 da persistan epitel defekti tedavisinde otolog serum uygulamasının etkinliğini değerlendirmek üzere 16 olgu çalışmaya almışlardır. Olgulara %20 tuzlu su ile seyreltilmiş otolog serum hazırlanmış ve günde 6x1 kullanma talimatı verilmiştir. 16 kalıcı epitel defektinden 7 olgu (% 43.8) 2 hafta içinde iyileşmiş, 3 olgu (% 18.8) 1 ay içinde iyileşmiştir. Hiçbir olguda otolog serum uygulamasına ait belirgin yan etki gözlenmediğini ve damla etkinliğinin +4 derecede 1 ay , - 20 derecede 3 ay etkinliğinin devam ettiği gösterilmişlerdir (84).

Suni gözyaşı damlaları ile otolog serum tedavisinin etkinliğini karşılaştıran çalışmalar yapılmıştır. Kojima ve ark.'ları ciddi kuru göz hastalarının tedavisinde otolog serum damla etkinliğini değerlendirmek üzere, prospektif randomize vaka-kontrol çalışması yapmışlardır. Şiddetli kuru gözü olan ve punktal tıkanıklığı olmayan hastalar bu çalışmaya alınmışlardır. Rastgele iki gruba ayrılmışlar, Grup A: prezervan içermeyen suni gözyaşları, grup B : otolog serum damla kullanılmıştır. Tedavi başlamadan ve 2 hafta sonra subjektif semptom skorları, Schirmer testi, break up time (BUT), flöresein – rose bengal boyama skoru sonuçları değerlendirilmiştir. Tedavinin 2. haftasında otolog serum damla sonuçlarının şiddetli kuru göz hastalığının tedavisinde daha etkili olduğu bulunmuştur (85).

Schulze ve ark.'ları vitrektomi geçirmiş diabetik hastalarda korneal epitel abrazyonunun tedavisinde otolog serum ile hyalüronik asit etkisini karşılaştırmışlardır. Randomize ve prospektif olarak yapılan çalışmada standart 8-mm çapında korneal epitel defekti yapılmıştır. Birinci gruba otolog serum damla ve ikinci gruba hyalüronik asit damla ile tedavi edildirmiştir. Hastaların yaş, cinsiyet, ameliyat süresi, diyabet süresi ve HbA1C

gibi verileride değerlendirilmiştir. 23 hasta çalışmaya alınmış (15 erkek, sekiz kadın); otolog serum grubu 13 hasta, hyaluronik asit grubunda 10 hastadan oluşmaktaymış. Hastaların yaş ortalaması 64,8 yıl ve diyabet süresi 19,4 yılmış. Epitelizasyon süresi hyaluronik asit grubunda ortalama 7.1 gün olmuştur. Otolog serum grubunda epitel ortalama 4,3 gün sonra iyileşmiştir. Mann-Whitney U istatistiksel analiz testi ile iki grup arasında epitel kapanma zamanı önemli bir farklılık göstermiştir (P <0.05). Çalışma sonucunda otolog serum yapay gözyaşları ile karşılaştırıldığında, kornea epitel yaralarının daha hızlı iyileşmesini sağladığını göstermektedir (86).

Poon ve ark.'ları kuru göz ve epitel patolojileri için otolog serum damla kullanımını in vitro ve in vivo çalışmalarla toksisite yönünden araştırmıştır. Bu klinik pilot çalışma ve in vitro kornea epitel hücre kültürleri üzerinde, toksisite açısından otolog serum ve prezervansız mellose (hydroxypropylmethylcellulose% 0.3) etkisini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Hastaların tedavi öncesi, 1.hafta, 2.hafta ve 2 haftalık tedavi kesilmesi sonrasında kontrolleri yapılmıştır. Bulgular her ziyarette değerlendirilmiştir. Klinik muayenede anestezi olmadan Schirmer testi, Rose-Bengal boyama ve flöresein boyama ile epitel defekti değerlendirilmiştir. Laboratuvarda, insan kornea epitel hücre kültürleri otolog serum damla ve mellose damla maruziyeti sonrası, floresan canlılığı (Calcein PM etidyum homodimer) boyama ve ATP assay ile değerlendirilmiş. Otolog serum damlanın keratokonjonktivitis sikka (KCS) ve kalıcı epitel defektlerinde (PED) yararlı olduğu bildirmiştir. Bu etki büyüme faktörleri, fibronektin, A vitamini ve anti-proteaz içeren serum aktif bir dizi faktöre bağlı olacağı düşünülmüştür. In vitro toksisite testinde otolog serum damla prezervansız mellose'a kıyasla epitel toksisitesinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (87) .

Shahriari ve ark.'ları yaptığı çalışmada, tavşan modelinde alkali yanık ile oluşturulan santral korneada 5 mm'lik kornea epitel hasarı sonrasında 1. gruba otolog serum damla, 2. gruba amnion membran örtme, 3. gruba suni gözyaşı damlatarak kornea epitelizasyon hızlarını karşılaştırmıştır. Otolog serum damlatılan grupta 67.8 microm/s, amniyon membran örtülen grupta 74.5 microm/s, gözyaşı damlatılan grupta 66.8 microm/s olarak bulmuştur. Tedavide amniyon örtme yapılan grubun en iyi olduğu ve otolog serum damlasının suni gözyaşı damlasına anlamlı üstünlüğünün olmadığını saptamışlardır (88). Fakat biz çalışmamızda otolog serum damlanın suni gözyaşına kıyasla daha iyi epitelizan olduğu saptanmıştır.

Göze anne sütü damlatılması geçmişten günümüze uygulanan bir yöntemdir. Yenidoğan konjonktivitlerinde ve nazolakrimal kanal tıkanıklığına ikincil enfeksiyonlarda göze anne sütü damlatıldığında olumlu sonuçlar görülmüştür.

Verd'nın 1999-2006 yılları arasında infantil epifora ile takip edilmiş 65 hastanın bilgilerini retrospektif olarak incelemiştir. Bu çalışmada, bebeklerdeki nazolakrimal kanal tıkanıklığının açılma zamanını, enfekte olduğunda antibiyotik damla damlatılan ve anne sütü damlatılan iki grubu karşılaştırmıştır. 1. ay sonunda kontrolde %15'e karşılık %57, 3. ay sonunda kontrolde % 50'ye karşılık %90, 6. ay kontrolünde %90'a karşılık %100 olarak, anne sütü damlatılan grubun nazolakrimal kanal obstrüksiyonunun daha erken açıldığını göstermiştir (89).

Kornea glukoz, elektrolit ve aminoasit ihtiyacını aköz hümörden temin ederken, büyüme faktörü, vitaminler ve nöropeptidler lakrimal glandlardan salgılanmaktadır (90,91). Fibronektin, kompleman faktör, laktoferrin ve immünglobulinler konjonktival damarlardan gözyaşına kaynak olmaktadır (92,93). Bunlar epitel proliferasyonu, migrasyonu ve differansiyasyonunu destekler. Suni gözyaşı damlalarında bulunmaz iken anne sütünde yer alır. Buda çalışmamızın sonucu olan anne sütünün suni gözyaşına epitelizasyondaki üstünlüğünü açıklayabilmektedir.

Nakamura ve ark.'ları yaptığı çalışmada epidermal growth faktör (EGF) ve interlökin 6 tavşan kornea epitel hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine etkisini kornea epitel hücre ve insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe karşılaştırmıştır ve EGF, IL 6'nın migrasyon ve proliferasyonunda anlamlı etkilerini göstermişlerdir. (94). Anne sütünde epitelizan etkiyi artıran EGF ve İnterlökin 6 içermektedir.

Çalışmamız sonucunda anne sütünün içeriği nedeniyle suni gözyaşı damlalarına daha üstün şekilde epitelizasyonu sağladığı görülmüştür.

6. SONUÇ

Anne sütü içerdiği gözyaşında da bulunan salgısal immunglobilin A, laktoperoksidaz, laktoferrin, bakterisidal etkisi olan lizozim, kompleman, mikroorganizmaların fagositozunu artıran ve hasarlanmış doku tamirinde hücre migrasyonuna etkili olan fibronektin, interlökin 6, epitel hücre migrasyonunu artıran ve antiapoptotik etkili epidermal büyüme faktörü, tümör nekrozis faktör α , stroma ve epitel tamirinde görev alan transforming growth faktör β , insülin benzeri büyüme faktörü, zengin yağ içeriği, A-C vitamini ile çalışmamızın da desteklediği üzere reepitelizasyonu artırıyor olduğunu düşünmekteyiz.

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda kuru göz ve persistan epitel defektlerinde günümüzde gözyaşı içeriğine benzer ve en iyi seçenek gibi görülen otolog serum damlasına göre bile anne sütünün daha iyi reepitelizasyon oluşturduğunu görülmüştür.

Bu bulguların günümüzün önemli göz problemlerinden biri olan kuru göz sendromunun tedavisinde en sık kullanılan suni gözyaşı damlalarında yapılacak yeniliklere yeni bir ışık tutacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Bengisu Ü. Göz hastalıkları,4.baskı: Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi. Ankara, Palme yayıncılık, 1998; 69-72.
2. Tiplathi RC, Chalam KV, Cibis GW, Kardon PH, Tiplathi BJ, Weleber RG, Wand M. Fundamentals and principles of ophtalmology, American Academy of ophtalmology, Taylor Fran, USA,1999; 150-4.
3. Özdemir Ö. Kornea transplantasyonu. Medikal Network Oftalmoloji Dergisi 1995; 2(1): 6-9.
4. Arffa RC. Disease of the cornea, fourth edition. Mosby Co. 1997, 6-7.
5. William MH. Adler's Physiology of the eye, Ninth edition, Mosby Co.1992.
6. Myron Yanoff, Jay S Duker. Ophthlamology. In: Ming XW, Carol LKarp, Robert P Selkin, Dimitri TA. Mosby edition. Chapter 5: 12.1-12.18.
7. Duke –Elder S. System of Ophthalmology. Henry Kimpton London, St Louis.1965; Vol III: 648.
8. Tucker SM. Corneal diameter, axial length, intraocular pressure in premature infants. Ophthalmology 1992; 99:1296.
9. Orhan M. Korneanın Yapısı, İşlevi ve Muayene Yöntemleri. Medikal Network Oftalmoloji Dergisi 1994; 4: 306-311.
10. Brown SI, Dervichian DG. The oils of the meibomian glands: physical and surface characteristics. Arch Ophtalmol 1969; 82:537.
11. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983 Oct;24(10):1442-3.
12. Katryn AH. Fundamentals and principles of Ophthalmology, Src 2; American Academy Of Ophthalmology, s.46.
13. Waltman RS, Hart WM. The Cornea In : Moses R.A, editor, Phisiology of the eye. St. Louis, CV Mosby, 1987; 36-59.
14. Waring GO, Laibson PR, Rodrigues M. Clinical and pathologic alterations of Descemet's membrane. Surv Ophthalmol 1974; 18: 325.

15. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea* 1997; 1:3-27.
16. Klyce SD. Distribution of sympathetic nerves in rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 354.
17. Thorft RA, Friend J. Corneal glucose flux. *Arch Ophthalmol* 1971; 86: 685.
18. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 196; 65: 695-8.
19. Gipsin IK, Friend J, Spurr-Michaud SJ. Transplant of corneal epithelium to rabbit corneal wounds in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26: 425-33.
20. Wiley L, Saunderson Raj N, Sun TT, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991; 32: 594-602.
21. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26: 897-900.
22. Di Pasquale A. Locomotory activity of epithelial cells in culture. *Exp Cell Res*. 1975; 94: 191-215.
23. Soong HK. Vinculin in focal cell-to-substrate attachments of spreading corneal epithelial cells. *Arch Ophthalmol*. 1987; 105: 1129-32.
24. Zieske JD, Bukusoglu G, Gipson IK. Enhancement of vinculin synthesis by migrating stratified squamous epithelium. *J Cell Biol*. 1989; 109: 571-6.
25. Arey LB, Cavode WM. The method of repair in epithelial wounds of the cornea. *Anat Rec*. 1943; 86: 75-82.
26. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, et al. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol*. 1983; 97: 1653-7.
27. Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, et al. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest*. 1981; 45: 120-9.
28. Sroong HK, Hassan T, Varani J, et al. Fibronectin does not enhance epidermal growth factor-mediated acceleration of corneal epithelial wound closure. *Arch Ophthalmol*. 1989; 107: 1052-4.
29. Tseng SCG, Maumenee AE, Stark WJ, et al. Topical retinoid therapy for various dry-eye disorders. *Ophthalmology*. 1985; 92: 717-27.

30. Soong HK, Parkinson WC, Bafna S, et al. Movements of cultured corneal epithelial cells and stromal fibroblasts in electric fields. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*1990;31:2278-82.
31. Lu L, Reinach PS, Kao WW. Corneal wound healing. *Exp Biol Med* 2001;226 (7):653-64.
32. Spear HJ. Breastfeeding & support. *AWHONN Lifelines.* 2005; 9:181-3.
33. American Academy of Pediatrics, Work group on breastfeeding. Breastfeeding and the use of Human milk, *Pediatrics* 1997; 100:1035-9.
34. Kelleher SL, Lonnerdal B. Immunological activities associated with milk. *Adv Nutr Res.* 2001; 10:39-65.
35. Tatyana GK, Svetlana EB, Dmitry VS, et al. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur J Biochem* 2003; 270:3353-61.
36. Filteau SM. Role of breast-feeding in managing malnutrition and infectious disease. *Proc Nutr Soc* 2000; 59:565-72.
37. Fukushima N, Nagashima K, Kuroume T. Fibronectin synthesis bioactivity in human breast milk. *Biol Neonate* 1994; 65:77-84.
38. Calhoun DA, Lunøe M, Du Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor serum and urine concentrations in neutropenic neonates before and after the intravenous administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Pediatrics* 2000; 105:392-7.
39. Goldman AS. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties *Pediatr Infect Dis J.* 1993; 12:664-71.
40. Darlene AC, Mathilde L, Yan D, Robert DC. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Is Present in Human Milk and Its Receptor Is present In Human Fetal Intestine. *Pediatrics* 2000; 105: 7.
41. Hanson LA. Protective effects of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Paediatr* 2004; 93:164-8.
42. Hancock, JT, Salisbury V, Cristina M, et al. 'Antimicrobial Properties of Milk: Dependence on Presence of Xanthine Oxidase and Nitrite'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:3308-10.

43. Nichols BA, Chappino ML, Dawson CR. Demonstration of the mucous layer of tear film by electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:464-73.
44. Mc Gill JL, Liakos GM, Goulding N, Seal DV. Normal tear protein profiles and age-related changes. *Br J Ophthalmol* 1984;68:316-20.
45. Crandall DC, Leopold IH. The influence of systemic drugs on tear film constituents. *Ophthalmology* 1979;86:115-25.
46. Polak BCP. Side effects of drugs and tear secretion. *Documental Ophthalmology* 1987;67:115-17.
47. The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *The Ocular Surface* 2007;5:75-92.
48. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:409-16.
49. Albiets J, Bruce A. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: Effect of preserved and nonpreserved topical treatments. *Curr Eye Res* 2001;22:8-18.
50. Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984;27:459-61.
51. Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-5.
52. Vajpayee RB, Mukerji N, Tandon R, et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1312-16.
53. Geerling G, Honnicke K, Schroder C, et al. Quality of salivary tears following autologous submandibular gland transplantation for severe dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:546-53.
54. Nelson JD, Gordon JF. Topical fibronectin in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. Chiron Keratoconjunctivitis Sicca Study Group. *Am J Ophthalmol* 1992;114:441-7.
55. Matsumoto Y, Dogou M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004;111:1115-20.

56. Gordon JF, Johnson P, Musch DC. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 1995;119:281-7.
57. McCluskey P , Wakefield D, York L. Topical fibronectin therapy in persistent corneal ulceration. *Aust N Z J Ophthalmol* 1987;15:257-62.
58. Phan TM, Foster CE, Bourochoff SA, *et al.* Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 1987;104:494-501.
59. Dugrillon A , Lauber S, Nguyen XD, *et al.* Platelets applied to wounds and in tissue regeneration: induction of proliferation apoptosis by platelet membranes. In: Mempel W, Schramm W, eds. *Infusion therapy and transfusion medicine* 2002:70-1.
60. Sauer R , Bluthner K, Seitz B. Sterility of non-preserved autologous serum drops for treatment of persistent corneal epithelial defects. *Ophthalmology* 2004;101:705-9.
61. Wilson S. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. *Am J Ophthalmol* 1991;111:763-765.
62. Ubels J, Loley K, Rismondo V. Retinol secretion by the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1261-1269.
63. Van Setten G, Viinikka L, Tervo T. Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989; 22:184-187.
64. Van Setten G, Tervo T, Tervo K, *et al.* Epidermal growth factor (EGF) in ocular fluids: presence, origin and therapeutical considerations. *Acta Ophthalmol* 1992;202:54-59.
65. Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, *et al.* Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989 ;30:1879-1887.
66. Speek AJ, van Agtmaal EJ, Saowakontha S, *et al.* Fluorometric determination of retinol in human tear fluid using high-performance liquid chromatography. *Curr Eye Res* 1986;5:841-845.
67. Tseng S, Farazdaghi M, Rider A. Conjunctival transdifferentiation induced by systemic vitamin A deficiency in vascularized rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1497-1504.

68. El-Ghorab M, Capone A, Underwood B, et al. Response of ocular surface epithelium to corneal wounding in retinol-deficient rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1671–1676.
69. Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin : A New Therapy for Corneal Trophic Ulcer. *Arch Ophthalmol*. 1983;101(7):1046-1048.
70. Spigelman AV, Thomas A. Application of homologous fibronectin to persistent human corneal epithelial defects. *Cornea* 1987;62:128-130.
71. Nakamura M, Nishida T, Hikida M, Otor T Combined effects of hyaluronan and fibronectin on corneal epithelial wound closure of rabbit in vivo. *Current Eye Res* 1994;13:385-388.
72. Wilson S, Lloyd S, Kennedy R. Basic fibroblast growth factor (FGFb) and epidermal growth factor (EGF) receptor messenger RNA production in human lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:2816–2820.
73. Gupta A, Monroy D, Ji Z, et al. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 1996;15:605–614.
74. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21:221-32.
75. Craig JP, Blades K, Patel S. Tear lipid layer structure and stability following expression of the meibomian glands. *Ophthal Physiol Opt* 1995;15:569-74.
76. Goto E, Tseng SC. Differentiation of lipid tear deficiency dry eye by kinetic analysis of tear interference images. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:173-80.
77. Guillon M, Styles E, Guillon JP, Maissa C. Preocular tear film characteristics of nonwearers and soft contact lens wearers. *Optom Vis Sci* 1997;74:273-9.
78. Korb DR. The tear film: its role today and in the future. In: Korb DR, ed. *The Tear Film: Structure, Function and Clinical Examination*. Oxford: Butterworth Heinemann; 2002:154-64.
79. Isreb MA, Greiner JV, Korb DR, Glonek T, Mody SS, Finnemore VM, Reddy CV. Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test. *Eye* 2003;17:79-83.

80. Trees GR, Tomlinson A. Effect of artificial tear solutions and saline on tear film evaporation. *Optom Vis Sci* 1990;67:886-90.
81. K. Yoon, H. Heo, S. Im, I. You, Y. Kim, Y. Park Comparison of Autologous Serum and Umbilical Cord Serum Eye Drops for Dry Eye Syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 2001;144:86-92.
82. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, Shimmura S Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-395.
83. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1467-1474 .
84. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-1989.
85. Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Matsumoto Y, Kaido M, Tsubota K. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: A prospective randomized case-control study. *American Journal of Ophthalmology* 2003;139:242-246.
86. Schulze S, Sekundo W, Kroll P. Autologous serum for the treatment of, corneal epithelial abrasions in diabetic patients undergoing vitrectomy. *American Journal of Ophthalmology*, 142:207-211.
87. Poon CA, Geerling G, Dart JH, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-1197.
88. Shahriari HA, Tokhmehchi F, Reza M, Hashemi NF. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in rabbit model. *Cornea* 2008;27:1148-50.
89. Verd S. Switch from antibiotic eye drops to instillation of mother's milk drops as treatment of infant epitheliorrhoea. *J Trop. Pediatr* 2007;53:68-69.
90. Wilson SE, Linag Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2185-90.

91. Scardovi C, De Felice GP, Gazzaniga A. Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers. *Ophthalmologica* 1993;206:119–24.
92. Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, et al. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:459–67.
93. Tiffany J. Tears and conjunctiva. In: Harding JJ, ed. *Biochemistry of the eye*. London: Chapman and Hall Medical, 1997:1–15.
94. Nakamura K. Interaction between injured corneal epithelial cells and stromal cells. *Cornea* 2003;22:35-47.