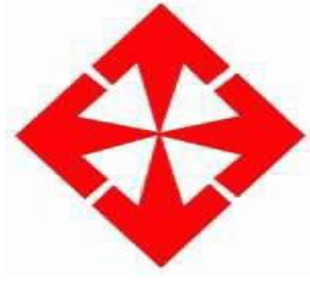


T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

SIÇAN KORNEA EPİTEL DEFİKTİ İYİLEŞME MODELİNDE
TOPIKAL İNSÜLİN VE HİYALÜRONAT TEDAVİSİNİN
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR GÖKHAN TORTUMLU

ANKARA - 2024



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

SIÇAN KORNEA EPİTEL DEFİKTİ İYİLEŞME MODELİNDE
TOPIKAL İNSÜLİN VE HİYALÜRONAT TEDAVİSİNİN
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR GÖKHAN TORTUMLU

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. DİLEK DURSUN ALTINÖRS

ANKARA - 2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Dilek Dursun Altınörs'e, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak emeklerini harcayan sayın hocalarım; anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Sibel Oto'ya, Prof. Dr. Gürsel Yılmaz'a, Prof. Dr. İmren Akkoyun'a, Prof. Dr. Sezin Akça Bayar'a, Prof. Dr. Sirel Gür Güngör'e ve Doç. Dr. Ümit Ekşioğlu'na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Tez hazırlık sürecinde desteğini eksik etmeyen Doç. Dr. Leyla Asena'ya teşekkür ederim. Uzm.Dr. Gülşah Gökgöz' e tezin planlanma ve hazırlık süreçlerinde verdiği tüm destek için teşekkür ederim.

Tezimi hazırlamamdaki yardımları için Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Attila Dağdeviren ve Öğr. Gör. Dr. Fatma Helvacıoğlu'na desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin tüm hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Bana aile olmayı , fedakarlığı ve sevgiyi öğreten, tüm zorluklarda yanımda olan kıymetli teyzem Bilfer Uyanık' a ve Ayşegül Uyanık'a , canım anneannem Fatime Uyanık ' a , canım annem Yeşim Uyanık'a , dayım Ali Sait Uyanık ve kardeşim Tunahan Tortumlu'ya , kıymetli kayınpederim Kemal Aşkan ve kayınvalidem Müfide Aşkan'a sonsuz teşekkür ederim.

Tezimi hayat arkadaşım, can yoldaşım ve öteki yarım biricik eşim İrem Aşkan Tortumlu ve hayat enerjim biricik oğlum Kemal Tortumlu'ya ithaf ediyorum.

Gökhan Tortumlu

ÖZET

Sıçan Kornea Epitel Defekti İyileşme Modelinde Topikal İnsülin Tedavisinin Etkinliğinin İncelenmesi Ve Topikal Hiyalüronat Tedavisi İle Etkinliğinin Karşılaştırılması

Kornea epitel defektleri oftalmoloji pratiğinde sıkça karşılaşılan önemli bir sağlık sorunudur. Çalışmamızda kornea epitel defekti modeli oluşturulmuş deney sıçanlarında topikal insülinin kornea epitel defekti iyileşmesi üzerine etkilerinin suni göz yaşı ve kontrol grupları karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada Sprague Dawley cinsi 28 erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilen 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu olarak epitel defekti oluşturulmayan grup alındı. Grup A'ya tedavisiz takip edilen epitel defekti grubu alındı. Grup B'yi topikal % 0.15 sodyum hiyalüronat tedavisi verilen epitel defekti oluşturulmuş sıçanlar alındı. Grup C'ye ise topikal insülin tedavisi verilen epitel defekti oluşturulmuş sıçanlar alındı. Epitel defekt grubu sıçanlarına sedasyon altında topikal anestezi sağlandıktan sonra 2 mm çapında, kornea santralinde epitel defekti oluşturuldu. Bütün sıçanların 4. saat, 12. saat, 1. Gün, 2. Gün ve 3.gün biyomikroskopik muayenesi yapıldı. Epitel defekti boyutu her muayenede florasein boyama yapılarak fotoğraflandı ve alan hesabı yapılarak defekt kapanma yüzdesi hesaplandı. 10.günde anestezi altında kornea dokuları tam kat eksize edildikten sonra sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Biyomikroskopik olarak epitel defekti kapanma hızları karşılaştırıldığında topikal insülin ve sodyum hiyalüronat tedavi grupları tedavisiz iyileşen gruba göre daha hızlı epitel defekti kapanması göstermiştir. Ancak topikal insülin ve sodyum hiyalüronat gruplarında epitel defekti kapanma hızı açısından iki grup arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir. Histopatolojik olarak incelendiğinde ise kornea hasarı sonrasında iyileştirici etkisi denenen gruplar karşılaştırıldığında; ince yapı düzeyinde topikal insülin grubunun yüzey epitelinin yeniden yapılanma sürecinin daha hızlı olduğu görülmüştür. Bu yenilenme sürecini izleyen ikinci grup topikal sodyum hiyalüronat grubu olarak belirlenmiştir. Yüzey epiteldeki en yavaş yenilenme tedavisiz izlenen epitel defekti grubunda izlenmiştir.

Sonuç olarak, topikal insülin tedavisinin kornea epiteli iyileşmesinde biyomikroskopik olarak fark izlenmemiş olsa da sodyum hiyalüronat'a göre histopatolojik olarak daha etkin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Kornea epitel iyileşmesi, İnsülin, Sodyum Hiyalüronat

ABSTRACT

Topical Insulin Treatment Efficacy in Rat Corneal Epithelial Defect Healing Model and Comparison of Efficacy with Topical Hyaluronate Treatment

Corneal epithelial defects are a commonly encountered issue in ophthalmology practice. Our study aims to examine the effects of topical insulin on the healing of corneal epithelial defects on experimental corneal epithelial defect model in rats and comparing them with artificial tears and control groups.

In the study, 28 adult male Sprague Dawley rats were randomly divided into 4 groups. The control group consisted of rats with no epithelial defect. Group A comprised rats with untreated epithelial defects. Group B included rats with epithelial defects treated with topical 0.15% sodium hyaluronate. Group C consisted of rats with epithelial defects treated with topical insulin. After providing topical anesthesia to the rats in the epithelial defect groups under sedation, a 2 mm diameter epithelial defect was created at the central cornea. Biomicroscopic examinations were performed on all mice at the 4th hour, 12th hour, 1st day, 2nd day, and 3rd day. The size of the epithelial defect was photographed at each examination after fluorescein staining, and the percentage of defect closure was calculated. On the 10th day, after excising the corneal tissues under anesthesia, rats were sacrificed by cervical dislocation, and histopathological examination was conducted.

When comparing the rates of corneal epithelial defect closure biomicroscopically, the topical insulin and sodium hyaluronate treatment groups showed faster closure compared to the untreated healing group. However, there was no statistically significant difference in the rate of epithelial defect closure between the topical insulin and sodium hyaluronate groups. Histopathologically, when the healing effects of the tested groups were compared, it was observed that at the fine structural level, the topical insulin group had a faster surface epithelial remodeling process. The second group following this renewal process was the topical sodium hyaluronate group. The slowest renewal in surface epithelium was observed in the untreated epithelial defect group.

In conclusion, although no biomicroscopic difference was observed in corneal epithelial healing with topical insulin treatment compared to sodium hyaluronate, it has been demonstrated to be more effective histopathologically.

Keywords: Corneal Epithelial Healing, Insulin, Sodium Hyaluronate

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Gözyaşı Film Tabakası.....	2
2.2 Kornea	3
2.2.1 Korneal Epitel Tabaka	4
2.2.2 Bowman Tabakası	5
2.2.3 Stroma	5
2.2.4 Dua Tabakası	6
2.2.5 Descement Membranı	6
2.2.6 Endotel	6
2.2.7 Korneal İnnervasyon	7
2.2.8 Korneal Vaskülarizasyon ve Metabolizma	7
2.3 Korneal Epitel Yara iyileşmesi	8
2.3.1 Korneal Epitel Yara İyileşmesinde etkili sitokinler ve büyüme faktörleri	9
2.3.1.1 Epidermal büyüme faktörü (EGF)	9
2.3.1.2 Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	10
2.3.1.3 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)	10

2.3.1.4 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	11
2.3.1.5 Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF)	11
2.3.1.6 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)	11
2.3.1.7 Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	12
2.3.1.8 Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	12
2.3.1.9 Fibronektin	12
2.3.2 Kornea Epitel İyileşmesinde Ekstrasellüler Matriks	13
2.3.3 Kornea Epitel İyileşmesinde Sinyal Yolakları	14
2.3.4 Kornea Epitel Yara iyileşmesinde Duyusal İnnervasyon	15
2.4. İnsülin	15
2.5. Suni Gözyaşları	18
2.5.1 Sodyum hiyalüronat	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1 Hayvan Modeli	19
3.2 Biyomikroskopik Değerlendirme	21
3.3 Histopatolojik Değerlendirme	23
3.4 İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	23
4.1 Biyomikroskopik Bulgular	23
4.2 Histopatolojik bulgular	32
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKLAR	55

KISALTMALAR

ATP: Adenozin trifosfat

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ERK: Ekstrasellüler-Regüle Kinaz

ESM: Ekstrasellüler Matriks

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

Gab 1: Grb 2 ilişkili Protein 1

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

HMF: Heksoz monofosfat yolu

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IGF-BP: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteinleri

IL-1 α : İnterlökin 1 alfa

IL-6: İnterlökin-6

IRS: İnsülin Reseptör Substrat

IU: İnternasyonal Ünite

KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü

MAP: Mitojen Aktive Protein

MAPK: Ras-Mitojen Aktive Protein Kinaz

MMP: Matriks Metalloproteinazları

NF-K β : Nükleer Faktör Kappa B Transkripsiyon Faktörü

NGF: Sinir Büyüme Faktörü

PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

PI3K/Akt: Fosfatidilinositol-3-Kinaz/Protein Kinaz B

SH2: Src onkoproteinindeki Homoloji 2 Alanı

SH3: Src onkoproteinindeki Homoloji 3 Alanı

Shc Proteinleri: Src Homoloji ve kollajen domain proteinleri

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü beta

TKA: Trikarboksilik Asit

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör alfa

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kornea tabakaları	4
Şekil 2.2	İnsülin etki mekanizması	17
Şekil 3.1	İşlem öncesi normal sıçan gözünün görünümü	19
Şekil 3.2	Korneada 2 mm işaretleme için kullanılan punch	20
Şekil 3.3	2mm santral kornea epitel defektinin florasein boyama sonrası görünümü	21
Şekil 3.2a	ImageJ programında mesafe işaretleme	22
Şekil 3.2b	ImageJ programında alan hesaplama	22
Şekil 4.1	Gruplarda epitel defektinin kapanma grafiği	25
Şekil 4.2	Grupların 4. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları	26
Şekil 4.3	Grupların 12. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları	27
Şekil 4.4	Grupların 24. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları	29
Şekil 4.5	Grupların 48. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları	30
Şekil 4.6	Grupların 72. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları	31
Şekil 4.7.1a-b	Kontrol grubu ışık mikroskopi kesitleri	33
Şekil 4.7.1c-1d	Kontrol grubu elektron mikroskopi kesitleri	34
Şekil 4.7.1e-1f	Kontrol grubu elektron mikroskopi kesitleri	35
Şekil 4.7.2a-2b	Topikal sodyum hiyalüronat grubu ışık mikroskopi kesitleri	36
Şekil 4.7.2c-2d	Topikal sodyum hiyalüronat grubu elektron mikroskopi kesitleri	37
Şekil 4.7.2e-2f	Topikal sodyum hiyalüronat grubu elektron mikroskopi kesitleri	38
Şekil 4.7.3a-3b	Topikal İnsülin grubu ışık mikroskopi kesitleri	39
Şekil 4.7.3c-3d	Topikal İnsülin grubu elektron mikroskopi kesitleri	40
Şekil 4.7.3e-3f	Topikal İnsülin grubu elektron mikroskopi kesitleri	41
Şekil 4.7.4a-4b	Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu ışık mikroskopi kesitleri	42
Şekil 4.7.4c-4d	Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu elektron mikroskopi kesitleri	43
Şekil 4.7.4e-4f	Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu elektron mikroskopi kesitleri	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Gruplarda zamana bağlı ölçümlerin karşılaştırılması	24
Tablo 4.2 Epitel iyileşmesinde Zaman * Grup posthoc karşılaştırılması	28
Tablo 4.3 Epitel defekti kapanması*Zaman posthoc karşılaştırılması	3
Tablo 4.4 Grupların Işık Mikroskopisi Görüntüleri	45
Tablo 4.5 Grupların Elektron Mikroskopisi Görüntüleri	46
Tablo 4.6 Grupların Elektron Mikroskopisi Görüntüleri	47

GİRİŞ

Kornea gözün en önemli refraktif ve bariyer fonksiyonu olan tabakalarından biridir. Kornea epitelinin sıvı ve patojenlere karşı temel bariyer görevi vardır. Bu bariyer işlevini hücreler arası sıkı bağlantılar, bazal hücre katmanında bölünen hücrelerin farklılaşması ve olgunlaşmasıyla sağlar. [1] Kornea epiteli, kimyasal maddeler, fiziksel etkenler ve patolojik ajanlarla hasar görebilir. Bu durumda oluşan korneal epitel defektinin hızlı ve düzgün bir şekilde iyileşmesi gözün bütünlüğünün ve fonksiyonun korunması için elzemdir ve bu iyileşme sürecini bozabilecek durumlar görme kaybına kadar gidebilmektedir. Çalışmalarda suni gözyaşlarının, otolog serum damlaların, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibronektin gibi doku yapıştırıcıları, anti-inflamatuar ajanların bu re-epitelizasyonu desteklemekte de olduğu gösterilmiştir.[2, 3] Kornea yara iyileşmesi, hücre ölümü, hücre göçü, çoğalması, farklılaşması ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini içeren karmaşık bir süreçtir.[4] Bu süreçte epitel bütünlüğünün tekrar sağlanması ve korneal homeostazının düzelmesi için büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstrasellüler matriks (ESM) sinyal aracılıklı hücre-hücre etkileşimleri tarafından sağlanır.[4]

Gözyaşı tabakasının antimikrobiyal, besleyici, mekanik ve optik özellikleri vardır ve kornea ve konjonktiva epitelinin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını destekleyen büyüme faktörleri, fibronektin ve vitaminler gibi bileşenleri içerir. Bu epiteliyotrofik faktörlerin eksikliğinin kalıcı epitel defektlerine yol açabileceği keratitis sikka hastalarında sıklıkla izlenmektedir.[3]

Sodyum hiyalüronat, yüksek molekül ağırlıklı, N-asetil glukozamin ve glukuronik asitten oluşur. Korneadaki çapraz bağlı kollajen matrisin fibriller arası alanındaki birincil glikozaminoglikandır.[5] Gözyaşı filmi stabilitesini arttırdığı, gözyaşı buharlaşma oranını azalttığı ve oküler tahriş ve yanma gibi kuru göz semptomlarını hafiflettiği gösterildiği gibi, diğer suni gözyaşlarından farklı olarak kornea yara iyileşmesini desteklediği çalışmalarda izlenmiştir.[6, 7]

Son yıllarda yapılan araştırmalarla kornea başta olmak üzere oküler yüzeyde İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) reseptörlerinin tespiti, bu reseptörlerin bağlı olduğu kaskadlar ve oküler yüzeydeki fonksiyonları daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır.[8] Vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak, insülin oküler yüzeyde glikoz alımında görevli değildir. Korneal epitel, stroma ve endotel hücrelerindeki otofaji, proliferasyon, migrasyon ve birçok metabolik

süreçte rol oynamaktadır.[9] Keratositler başta olmak üzere korneada bulunan birçok hücre tipinde insülin ve IGF reseptörü bulunmaktadır. Ayrıca İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteinleri ailesinin (IGF-BP), korneal hücrelerde yaygın olarak bulunduğu; inflamasyona yanıt, hemostaz, fibroblast farklılaşması gibi birçok süreçte önemli rol oynadığı düşünülmektedir.[10] Deneysel olarak insülin molekülünün topikal formunun persistan korneal epitel defekti, nörotrofik keratopati, korneal ülser, kimyasal yanıklar ve korneal vaskülarizasyon gibi birçok hastalığın tedavisinde etkinliği olup olmadığı araştırılmış ve tedavide etkinliği olabileceği gösterilmiştir.[11, 12]

Bu çalışmada kornea epitel defekti modeli oluşturulmuş deney sıçanlarında topikal insülin tedavisinin kornea epitel defekti iyileşmesi üzerine etkisi, topikal sodyum hiyalüronat ve kontrol grupları ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Gözyaşı Film Tabakası

Hava-gözyaşı film tabakası, gözün toplam refraktif gücünün 2/3'ünü oluşturur. Ayrıca, kornea ön yüzeyindeki mikro düzensizlikleri ortadan kaldırarak optik sistemde önemli bir rol oynar. Bu tabaka, özellikle mikrobiyal invazyon ve kimyasal, toksik, yabancı cisim hasarına karşı korneanın başlıca koruyucusudur. Epitel sağlığı, proliferasyonu ve tamirinde etkin immünolojik faktörler ve büyüme faktörlerini içermektedir.[1]

Gözyaşı filmi üç tabakadır:

1. Lipit Tabaka: Gözyaşının en dış kısmında bulunur ve buharlaşmayı önleme ve anti - bakteriyel görevi görür. Zeis, Moll ve Meibomian bezlerinden üretilen kolesterol esterleri ve yağ içerir.[13, 14]
2. Aköz Tabaka: Gözyaşı film tabakasının ortasında yer alır ve gözyaşı bezleri ile Krause ve Wolfring bezleri tarafından salgılanır. Gözyaşının en kalın bileşeni olan aköz tabakada; elektrolitler, proteinler, büyüme faktörleri, vitaminler, anti-bakteriyel moleküller, sitokinler, immünglobulinler ve hormonlar bulunmaktadır. Aköz tabakanın içeriği; oküler yüzeyin beslenmesini ve korunmasını sağlar. Salgılanması ise sempatik, parasempatik uyarılarla ve hormonal düzenleme ile gerçekleşir. Çevresel ve fizyolojik değişiklikler, içeriği oluşturan bileşenlerin miktarını etkileyebilir.[15-17]

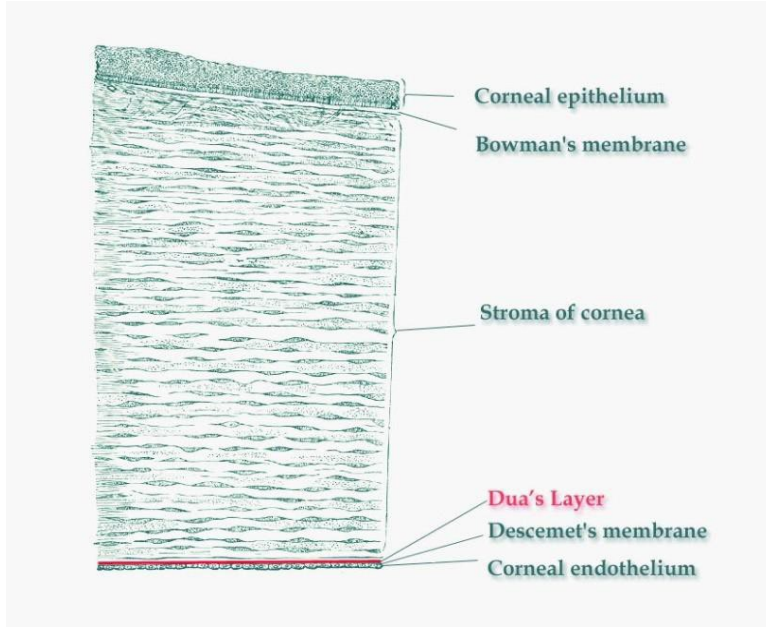
3. Müsin Tabaka: Kornea epiteli ile doğrudan temas halinde olan bu tabaka, konjonktival goblet hücreleri tarafından üretilir. Kornea epiteli ile glikokaliks tabakası arasında hidrofilik bir bağ kurarak her göz kırpma hareketinde gözyaşının yayılmasını sağlar. Bu glikokaliks tabakanın korneal yaralanma ile hasar görmesi, gözyaşı stabilitesinin kaybolmasına neden olur.[18]

2.2 Kornea

Kornea, gözün ön yüzeyinde gözü enfeksiyonlardan ve dış etkenlerden koruyan; avasküler ve saydam bir bariyerdir. Merkez kalınlığı yaklaşık olarak 0,5 mm'dir ve periferde gidildikçe artar. Erişkinde horizontal kornea çapı 11,5-12,0 mm'dir, vertikal çap ise horizontal çapından 1,0 mm daha geniştir.[19] Ön eğrilik yarıçapı 7,8 mm, arka eğrilik yarıçapı ise 6,5 mm'dir. Ön yüzeyin kırma gücü +48,6 dioptri (D), arka yüzeyin kırma gücü ise -6,8 D olup, toplam kırıcılık gücü +42 D'dir. Ortalama refraktif indeksi 1,3375'tir.[1]

Embriyolojik olarak nöroektoderm ve mezenşim'den farklılaşarak gelişir. Korneal epiteli ve Descement zarı yüzeyel ektodermden gelişir. Endotel ise nöroektoderm kökenlidir. Gestasyonel 39. günde, iki tabakalı epitel, bazal lamina üzerinde uzanır ve iki-üç tabakalı endotelden dar asellüler boşluk ile ayrılır. Mezenşimal hücreler, periferden gelerek 7. haftada epitel ile endotel arasındaki boşluğa göç eder. Bu mezenşimal hücreler, gestasyonel süreçte keratosit hücrelerini oluşturur. Descement membranı ise en arkadaki keratositler ile tek tabakalı endotel arasında uzanır ve bu aşamada iki zondan oluşur. Bowman tabakası, dördüncü ayın sonunda oluşur.[20] Yeni doğan döneminde vertikal kornea çapı 10 mm, kırıcılık gücü yaklaşık 51 D'dir ve bu değer 1 yaşında erişkin seviyesine ulaşır.[1]

Kornea; Epitel, Bowman tabakası, Stroma, Dua tabakası, Descement zarı ve Endotel olarak altı tabakadan oluşur (Şekil 2.1) . Bunlardan Bowman, Dua ve Descement tabakaları ara yüz segmentleridir.



Şekil 2.1: Kornea tabakaları
(Gray's Anatomy / Sci-News 2013)

2.2.1 Korneal Epitel Tabaka

Epitel tabakası, yüzey ektoderminde gestasyonel 5.-6. haftada gelişir ve yaklaşık 40-50 µm kalınlığında, 4-6 sıra çok katmanlı, keratinize olmayan yassı epitel hücrelerinden oluşur. Bu tabakanın en üstünde, glikokaliks ile kaplı mikrovilli ve mikropikalar içeren 2-3 sıra düz, çok kenarlı yüzey hücreleri bulunur. Bu yapı, gözyaşı müsin tabakası ile temas ve adezyonu artırarak düz ve saydam optik yüzey için önemlidir. Ayrıca, yüzey hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, enfeksiyöz ajanların ve toksinlerin derin tabakalara ulaşmasını engelleyen bir bariyer görevi görür.[21]

Yüzey hücrelerinin altında, yüzey hücresi kadar yassı olmayan ancak benzer sıkı hücreler arası bağlantılara sahip iki ila üç sıra suprabazal veya poligonal kanatsız hücreler bulunur. Epitel tabakanın en derininde ise yaklaşık 20 µm kalınlığında tek sıra dizilmiş bazal kolumnar hücreler yer alır. Bu hücreler mitozis ile çoğalarak anterior ilerlemeyle kanatsız hücreleri oluştururlar. Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunur; tonofilamanlar hücre iskeletini korurken, aktin filamanlar yara iyileşmesi sırasında hücre göçünde rol alır.[21]

Bazal epitel hücreleri, epitelyel bazal membranı sentezleyen elli nanometre kalınlığında bir yapı oluşturur; bu membran, tip IV kollajen, laminin ve diğer proteinleri içerir. Bu hücreler bazal hücreler, hemidesmozomlarla altındaki bazal membrana ve desmozomlarla yan komşu hücrelere bağlanır. Bu sıkı bağlantıda bir defekt oluşursa, klinik olarak iyileşmeyen epitel defektleri ve rekürren korneal erozyon ortaya çıkabilir.[19]

Epitel hücreleri, korneada çevreden merkeze doğru ilerler. Bazal ve kanatsız hücreler arkadan öne doğru ilerleyerek dökülürler. Limbal bazal epitelde yer alan epitel kök hücreleri, kornea epitel hücrelerinin ana kaynağını oluşturur. Bu hücreler, geçici çoğaltıcı ve bazal hücrelere farklılaştıktan sonra çoğalıp farklılaşma geçirerek yüzey epitel hücrelerine dönüşürler. Bu hücrelerin yüzeyinde gözyaşındaki müsinin daha iyi yapışmasını sağlayan mikrovilli vardır. Bu hücreler 7-10 gün süren döngülerinin sonunda deskuamasyona uğrayarak gözyaşına dökülürler. [19, 22, 23]

2.2.2 Bowman Tabakası

Epitel bazal membranının altında bulunan asellüler Bowman tabakası, düzensiz yerleşimli kısa kollajen fibrillerden oluşur. Bu tabaka, yaklaşık 8-12 µm kalınlığındadır ve yaşlanma süreciyle birlikte kalınlığında azalma görülür. Rejenerasyon yeteneği olmadığından, hasar durumunda skar dokusuyla iyileşir. Aynı zamanda, epiteldeki patolojilerin stromaya yayılmasını engelleyen bir bariyer görevi görür.[19, 24]

2.2.3 Stroma

Korneanın en kalın tabakasını oluşturan stroma, kornea kalınlığının yaklaşık olarak %80-85'ini kapsayan; ekstrasellüler matriks ve liflerin düzenli organizasyonu sayesinde saydam olan korneal tabakadır. Tip I ve tip V kollajenler bir araya gelerek paralel fibril demetlerini, bu demetler de lamelleri oluşturur. Stroma yaklaşık olarak 250-300 lamelden oluşur.[25] Bu kollajen ağları, yüksek bir organizasyon göstererek ışık saçılmalarını azaltır ve korneaya saydamlık ile mekanik dayanıklılık kazandırır. Lamellerin dizilimi, stroma derinliğine göre değişir. Derin stroma daha sıkı bir yapılanmaya sahiptir. Bu organizasyon farklılığı korneanın ödeme tepkisini ve Descement kırışıklıklarını etkiler.[26]

Kollajen kompleksleri, keratan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat ile yan zincirlerle çevrili olarak bulunur. Glikozaminoglikanlar, stromaya yapısal destek sağlar ve hidrasyonu düzenler [17]. Genellikle anterior stromada yer alan keratositler, stromanın esas hücreleri olarak görev yapar ve kollajen, glikozaminoglikan ve stroma homeostazında etkin bir rol oynayan matriks metalloproteinazları (MMP) sentezlerler. [19] Keratositler, içerdikleri çözünür protein kristalin sayesinde ışık saçılımını azaltmada ve korneal saydamlıkta görevlidir.[27]

2.2.4 Dua Tabakası

Descement membranının anteriorunda bulunan bu tabaka, tip I kollajenden oluşur ve $10,15 \pm 3,6$ mikron kalınlığındadır. İlk olarak kornea katlarındaki potansiyel boşluğa hava enjekte edilerek izlenmiştir.[28]

2.2.5 Descement Membranı

Korneal endotel bazal membranı oluşturur ve çocuklarda 3 mikron, erişkinlerde ise 10 mikron kalınlığındadır. Bu tabaka iki katmandan oluşur. Ön bantlı tabaka, fetal korneada gestasyonel on ikinci haftada ortaya çıkar ve kollajen lameller ile proteoglikanları içerir. Buna karşılık, bantsız arka katman, endotel hücreleri hemen altında uzanır, endotel hücreleri tarafından sekrete edilir ve yaşla birlikte kalınlaşır. Bu tabakadaki esas kollajen tip IV olmakla beraber; merdiven şeklinde dizilim gösteren tip VIII kollajen Descement membranına özgüdür.[29, 30]

2.2.6 Endotel

Descement membranının arka yüzeyini örten endotel tabakası, mozaik paternde düzenlenmiş poligonal hücrelerden oluşur ve çoğunlukla hekzagonal şekillidir.[1] Bu hücreler ortalama olarak $5 \mu\text{m}$ kalınlığında ve $20 \mu\text{m}$ genişliğindedirler. Bu hücrelerin lateral duvarların bulunan sodyum-potasyum ATPaz pompaları sayesinde stromal dehidratasyon korunur.[31, 32] Bu dehidratasyon, hipoozmolar stromadan hiperozmolar aköze pasif transportla pompa sızdırma yoluyla sıvı geçişi ile sağlanır. Ozmotik gradient ise endotel membranındaki sodyum-potasyum ATPaz pompası ve intrasellüler karbonik anhidraz yoluyla iyonların stromadan aköze aktif transportu ile sağlanır.[33] Endotel hücre morfolojisi, pompa fonksiyonu ile bağlantılıdır ve hücre boyutunda artış (polimegatizm) ve şekil varyasyonlarında artış (pleomorfizm) sonucunda endotel pompa fonksiyonu azalır.[34]

Endotel hücreleri mitotik aktivite kabiliyetleri yoktur ve yaşla beraber hücre yoğunluğunda azalma izlenir. Doğumda yaklaşık olarak 3500 hücre/mm^2 olan endotel yoğunluğu, yılda yaklaşık olarak %0.6 azalır.[35] Herhangi bir hücre kaybı sonrasında kalan hücrelerin uzama ve esneme ile kalan boşlukları doldurabildiği izlenmiştir. Bu süreçle birlikte, kalan endotel hücrelerinde polimegatizm ve pleomorfizm gelişebilir.[19]

2.2.7 Korneal İnnervasyon

Korneanın duyuşal sinir lifleri trigeminal sinirin oftalmik dalından ayrılır. Uzun siliyer sinirler, perilimbal sinir halkasını oluşturur. Bu sinir lifleri, korneayı derin periferik stroma tabakasından radyal olarak penetre eder ve anteriora doğru yönlendirilerek Bowman ve ön stroma arasında subepitelyal sinir pleksusunu oluşturur. Daha sonra bu sinir lifleri, Bowman tabakasını delerek epitelyel bazal hücreleri innerve eden subbazal epitelyel sinir pleksusu adını alırlar.[36] Sinir lifleri, şeffaf korneaya girdiklerinde miyelinlerini kaybederler. Endotel seviyesinde ise sinir lifleri bulunmaz.[37] Klinik olarak, yüzeysel epitel hücrelerinin kaybı, subepitelyal sinir pleksusunu açığa çıkaracağı için şiddetli ağrıya neden olabilir.

2.2.8 Korneal Vaskülarizasyon ve Metabolizma

Avasküler bir yapıya sahip olan korneanın beslenmesi ve metabolik artıkların uzaklaştırılması, arka yüzeyledeki aköz humor, ön yüzeyledeki gözyaşı film tabakası ve limbal damarlar tarafından sağlanır. Limbal vasküler ağ, oftalmik arter dalı (ön siliyer arter) ile dış karotis arter dalı (fasiyal dal) anastomozu ile oluşur yapar. Korneanın lenfatik drenajı yoktur.[38]

Glikoz, epitel hücreleri, keratositler ve endotel için temel metabolik maddedir. Stroma, glikozu aköz humordan aktif transport ile alırken, epitel glikozu stromadan pasif difüzyon ile alır. Endotelde bulunan sodyum-potasyum ATPaz ve karbonik anhidraz enzimleri, stroma ile aköz humor arasında iyon transportunda önemli rol oynar. Kornea glikozunun yaklaşık %10'u gözyaşı tabakası ve limbal damarlar aracılığıyla sağlanır.[39] Glikoz, korneada üç metabolik yolak üzerinden metabolize edilir: a) Trikarboksilik asit (TKA) siklusu b) Anaerobik glikoliz ve c) Heksoz monofosfat (HMF) yolu.

Epitel ve endotelde glikozun %35-65'i HMF yoluyla parçalanırken, stromal keratositlerin bu yolu etkileyen 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimini içermemesinden dolayı HMF yolunu kullanma yetenekleri sınırlıdır. TKA siklusu endotelde daha baskındır. Glikolizin son ürünü olan pirüvik asit; aerobik koşullarda karbondioksit ve suya, anaerobik ortamda ise laktik aside dönüştürülür. Laktik asit seviyesi, oksijen azlığı durumunda artar ve bu durum korneal ödeme ve stromal asidoza neden olabilir.[39]

2.3 Korneal Epitel Yara iyileşmesi

Kornea epiteli, limbustaki kök hücreler sayesinde kendini yenileyebilen bir dokudur.[40] Epitelde defekt oluşması durumunda epitel hücreleri iyileşme sürecini başlatmak üzere sinyal yollarını aktive ederler.[41] Bu iyileşme sürecinin ilk fazında defekt etrafındaki epitel hücrelerinin göçü tetiklenir.[42] Daha sonra hücre proliferasyonu ve farklılaşması ile devam ederek çok katmanlı epitel oluşumuna kadar devam eder.[43]

İlk olarak; korneal epitelde defekt oluştuğunda, kenardaki hücreler bazal hücrelerle hemidesmozomlarını kaybedip hücre zarında uzantılar oluştururlar. Aynı zamanda mitokondriyel enerji üretimini arttırarak, migrasyon ve yayılma ile defekt alanını kapatmaya başlarlar. Bu evrede, epitel kapanma hızı 60-80 $\mu\text{m/saat}$ arasındadır.[44] Hücre zarının sitoplazmik tarafında bulunan ve fokal yapışma plaklarında yer alan vinkülin, aktin liflerini hücre zarı proteinine bağlar, diğer tarafta talin bir majör hücre alt yapısı yapışma proteini olan integrin ile bağlıdır.[45] Bu yapışma protein kompleksleri, göç eden hücrelerin ilerleyen kenarında yoğun bir şekilde bulunur ve bu hücrelerin hemidesmozom olmaksızın bazal membrana yapışmasını sağlar. Ek olarak fibronektin, hücre adezyonunda ve göçünde etkin bir rol oynar.[19]

Korneal epitel hücrelerinin çoğalması, yaralanmadan en az on iki ila yirmi dört saat sonra meydana geldiği gösterilmiştir.[46] Yirmi dört ile otuz saat arasında mitoz başlar ve yoğun olmayan bir hücre topluluğu oluşur. Geniş epitel yaralanmalarından doksan altı saat sonra hücre bölünmesinde belirgin bir artış gözlemlenir.[47] Bu süreçte, sadece bazal hücreler, geçici çoğalan hücreler ve limbal kök hücreleri mitoz katılırlar.[48] Kronik kornea epitel defektlerinin tedavisinde ilk adım, altta yatan sebebi ortadan kaldırmak veya sınırlamaktır. Normal epitelizasyon sürecindeki eksiklik, özellikle göz kapaklarının mekanik hareketinden kaynaklanan sürtünme nedeniyle kronik defekt üzerinde artar, özellikle de kapak konjonktivasi anormal olduğunda. Bu etkiyi azaltmak için, koruyucu madde içermeyen yapay gözyaşları ile topikal lubrikasyon, punktal oklüzyon ve terapötik kontakt lens kullanılabilir. Cerrahi seçenekler arasında geçici veya kalıcı tarsorafi sayılabilir

2.3.1 Korneal Epitel Yara İyileşmesinde Etkili Sitokinler ve Büyüme Faktörleri

Epitel yara iyileşmesi sırasında hücrelerin büyüme, çoğalma, göç, farklılaşma, adezyon fonksiyonları ve ESM üretimi, proteinaz regülasyonunda büyüme faktörleri ve sitokinler etkin rol oynar.

Sitokinler, düşük molekül ağırlıklı glikoproteinler olup hücre büyümesi, farklılaşması, bağışıklık, inflamasyon, yara iyileşmesi ve apoptozis gibi birçok fonksiyonda aktif rol oynayan moleküllerdir. Özellikle proinflamatuvar sitokinlerden biri olan interlökin 1 α (IL-1 α) ve interlökin-6 (IL-6), defekt oluşumundan sonra hızlı bir artış gösterir ve seviyeleri defekt boyutuyla doğru orantılıdır.[49] IL-6, fibronektin üzerinden integrin salınımını artırarak epitel göçünü teşvik eder.[50] IL-1 ise EGF ile sinerjistik etki ederek epitel hücre göçünü ve epitel kapanmasını düzenler.[51] IL-1, stromal erimeye neden olan matriks metalloproteinazları salınımını da baskılar.[52] Hasarlanmış kornea epitelinden salınan IL-1, keratosit apoptozisini düzenler.[41]

Korneal hücrelerinin, epitel hücreleri üzerinde özellikli etkileri olan epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF beta), fibroblast büyüme faktörü (FGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), insülin benzeri büyüme faktörü gibi faktörleri eksprese etme özellikleri vardır.[4, 53-55]

2.3.1.1 Epidermal büyüme faktörü (EGF)

Epidermal Büyüme Faktörü, epitelyel yara iyileşmesini uyaran ve hücre göçünü ve çoğalmasını başlatan temel sinyal molekülüdür.[53] Polipeptit yapıdadır ve mitojeniktir. Lakrimal bezde ve kornea epitel hücrelerinde üretilir ve gözyaşında bulunur.[56] Hücreler tarafından üretilenler tarafından üretilenler tarafından üretilenler tarafından üretilenler tarafından üretilen EGF reseptörüne (EGFR) bağlanır.[57] EGF, parakrin, otokrin ve jukstakrin yollarla kornea hücrelerini uyarır. Kornea epitelinde (özellikle limbal bölgede) ve endotel hücrelerinde düşük afiniteli ve yüksek afiniteli EGFR bulunurken, stromal keratositlerde sadece az miktarda düşük afiniteli EGFR bulunmaktadır. EGF, EGFR'ye bağlanarak intrinsik tirozin kinaz reseptör aktivasyonunu sağlar. Bu durum DNA sentezi ve ESM moleküllerinin, özellikle de fibronektin ve hyalüronik asit üretimine yol açar. Reseptör fosforilasyonu ayrıca hücre içi anti-apoptotik proteinleri ve hücre iskelet proteinlerini aktive ederek hücre morfolojisini ve motilitesini düzenler. ESM moleküllerinin, özellikle fibronektin polarizasyonunun değişmesi ile göçün doğru yönlendirilmesi ve integrinler ile EGFR arasındaki bağlantının kolaylaştığı

gözlemlenmiştir.[57, 58] Ayrıca, EGFR'nin epitel hücrelerinde hücre göçü ve proliferasyonunu tetikleyen nükleer faktör kapp B (NF-κB) yolağını da uyardığı gösterilmiştir.[59]

EGF'nin kornea vaskülarizasyonu ile ilişkilendirildiğini gösteren yayınlar bulunmaktadır.[60] EGF tarafından uyarılan anjiyogenezin, yara iyileşmesi sırasında özellikle fibroblast büyüme faktörü gibi diğer büyüme faktörleriyle birlikte ilişkili olabileceği düşünülmektedir.[61] EGF'nin ayrıca korneal epitel hücrelerinin terminal farklılaşmasını inhibe ettiği ve proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir.[62]

2.3.1.2 Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF; A, B, C, D olmak üzere dört polipeptit zincirinin kombinasyonlarından oluşan bir glikoproteindir ve PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD izoformlarına sahiptir.[63] Korneada genellikle ilk üç izoform bulunur. Bu izoformlar biyolojik aktiviteler açısından temelde benzerdir ve reseptöre bağlandıklarında mitojenik etki gösterirler.[64, 65]

PDGF-BB izoformu, kornea epitel hücrelerinde üretilir ve bazal membrana bağlanır. PDGF reseptörleri genellikle korneal fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde bulunur. PDGF-AA ve PDGF-BB, fibronektin varlığında kemotaksisi uyarmabilir.[66]

2.3.1.3 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)

TGF-beta ailesi, üç izoformu bulunan, her biri yaklaşık 25 kilodalton moleküler ağırlığa sahip polipeptidlerden oluşan bir grup moleküldür. TGF-β, birçok hücre tarafından sentezlenir ve hücre bölünmesi, farklılaşma, adezyon, morfogenez, ekstrasellüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlar.[64] TGF-β genellikle epitel, endotel ve lökosit hücre büyümesini inhibe ederken, fibroblastların proliferasyonunu stimüle eder. [67]

TGF-β reseptörleri kornea stromal hücrelerinde, limbal ve santral korneal epitel hücrelerinde bulunan üç farklı tipi mevcuttur. Bu tipler arasında TGF-β2, kornea ve aköz humorde bulunan ana formdur. TGF-β, EGF tarafından uyarılan epitel hücre proliferasyonu ve göçü üzerinde zayıf, KGF ve HGF tarafından uyarılan proliferasyon üzerinde ise güçlü bir inhibisyon etkisine sahiptir. Hem TGF-β1 hem de TGF-β2, epitel hücre proliferasyonunu inhibe eder, ancak inhibisyon etkisi esas olarak TGF-β2 reseptörleri ile oluşturulur.[62] TGF-β1 ve TGF-β2, epitel yara iyileşmesinde hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde negatif

düzenleyiciler olarak önemli bir rol oynar. Kornea ve aköz humor içerisinde bulunan TGF- β , bu bölgedeki anjiyogenezi kontrol altına alır.[68]

2.3.1.4 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF ailesi, yaklaşık 18 kilodalton molekül ağırlığına sahip olan ve koruyucu glikoproteinlere (heparan sülfat) bağlanarak degrade olmamak için korunabilen 20 farklı proteini içeren bir molekül grubudur.[69] FGF, yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörüne bağlanabilen bir moleküldür. Bu molekül, epitel, endotel ve stroma için mitojeniktir.[70] FGF epitel proliferasyonu, migrasyonu, diferansiasyonu, ekstrasellüler matriks yapısını ve anjiyogenezin bütün süreçlerini etkiler.[67]

2.3.1.5 Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF)

KGF, FGF ailesinden bir polipeptit olup 28 kilodalton molekül ağırlığına sahiptir. Diğer adı FGF-7'dir ve uyarı yolağı, EGF, FGF ve TGF- α ile aynıdır.[71] KGF, limbal korneal stroma ve lakrimal bez tarafından üretilir. Özellikle limbal epitel hücreleri üzerinde HGF benzeri parakrin etkisi ile hücre homeostazında ve yara iyileşme sürecinde katkı sağlar.[72, 73] KGF, kornea epitel hücrelerinin migrasyon ve farklılaşmasını etkilemeden selektif olarak çoğalmasını uyarır.

2.3.1.6 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

IGF, kornea epitel hücrelerinin büyümesi ve enerji metabolizmasında rol alır. IGF'ler kornea epitel hücrelerindeki insülin reseptörleri, IGF-I ve IGF-II reseptörleri üzerinden etkilerini gösterirler. IGF-I, hücre fonksiyonu düzenleyici IGF sinyal yolunun bir üyesidir. Bu sistem, peptid hormonlarını (tip I ve II IGF), hücre yüzeyi reseptörlerini (insülin reseptörleri, tip I ve II IGF reseptörleri) ve dolaşımdaki IGF bağlanma proteinlerini (IGF bağlayıcı proteinler tip 1-6) içerir.[74] IGF-I, karaciğer tarafından üretildiği gibi, hem keratositler hem de kornea epitel hücreleri tarafından lokal olarak sentezlenir. Hem IGF-I hem de IGF-II etkilerini IGF-I reseptörü üzerinden gösterebilirler.[75]

Çalışmalarda, kornea hücrelerinde IGF-I ekspresyonunun, kornea hasarından sonra önemli ölçüde arttığı; ama IGF reseptörlerinin azaldığı izlenmiştir. Bunun nedeninin lokal IGF'nin kornea yerine limbal bölgeye penetre olarak bu alandaki kök hücre farklılaşmasını arttırıyor olabileceği düşünülmektedir.[76] IGF-I'in aynı zamanda Substance-P ile sinerjistik etki göstererek diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini hızlandırdığı *in vivo* olarak gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada, sağlıklı sıçanlarda yara iyileşmesinde herhangi bir fark izlenmiştir.[77] IGF-I'in ayrıca laminin-5 ve beta-1-integrin yapımıyla insan kornea epitel hücre göçünü regüle ettiği gösterilmiştir.[78]

2.3.1.7 Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

Ekstrasellüler matrikse bağlanan, 90 kilodalton molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Temel olarak stromal fibroblastlar tarafından üretilir ve hedef hücrelere parakrin etki ile epitel hücreleri aracılığıyla ulaşır. [79] Korneal epitel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve apoptozisini düzenler.[72] Epitel yara iyileşmesi sürecinde, keratosit ve epitel hücrelerinden salınımı artar ve bu süreçte epitel hücreleri üzerinde parakrin, otokrin ve intrakrin etkiler gösterir.[80, 81]

2.3.1.8 Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

NGF, nörotropin ailesine ait olan ve özellikle sempatik ve duyuşal sinirlerin büyüme ve devamlılığında önemli bir rol oynayan bir sinyal molekülüdür. Korneal homeostaz ve yara iyileşmesi için ısı, mekanik ve kimyasal uyarıcılar tarafından intakt korneal sinirlerden salınan nörotropinler kritik öneme sahiptir.[82] NGF, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırır; ancak, EGF'ye kıyasla daha az etkilidir.[83]

2.3.1.9 Fibronektin

Fibronektin humor aköz ve gözyaşında bulunan yüksek molekül ağırlıklı (~440 kilodalton) bir glikoproteindir. Hücre adezyonunda, migrasyonunda ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Ayrıca, lökosit ve makrofajların fagositik aktivitelerini arttırır. Fibronektin, korneal yara iyileşmesinde özellikle kilit bir rol oynar. Oküler yüzey hasarlandığında, refleks lakrimasyon ve konjonktival damarlarda dilatasyon meydana gelir. Bu hasarlanmalarda, plazma

fibronektini dilate konjonktival damarlardan gözyaşı filmine sızar. Ayrıca, korneal yara iyileşmesi sürecinde, korneal epitel hücreleri ve keratositler tarafından fibronektin üretimi gerçekleşir.[84]

2.3.2 Kornea Epitel İyileşmesinde Ekstrasellüler Matriks

Kornea epiteli, özelleşmiş epitel bazal membran formundaki kendi ekstrasellüler matriksini Bowman tabakasına yapışık olacak şekilde üretir. ESM yapısal desteğin yanı sıra, epitel göçünü, çoğalmasını, farklılaşmasını düzenler.[85] Korneal epitelyel bazal membran, vücuttaki diğer bazal membranlar gibi tip IV kollajenlerin, lamininlerin, nidojenlerin ve perlekanın özel ağlarından oluşur. Bunlara ek olarak trombospondin-1, matrilin-2, matrilin-4, tip XV, XVII ve XVIII kollajenler ile fibronektin bulunur.[86] Epitelyel yara iyileşmesi sırasında, bazal membran genellikle bozulur ve ardından tekrar sentezlenir; bu süreç sırasında da epitel hücrelerin yaranın içine yönlendirilmiş göçünü, kemotaktik faktör gradyanlarıyla birlikte düzenler.[87]

Epitel yaralanmanın ardından birkaç saat boyunca, hem bazal membranla ilişkili ESM bileşenleri (fibronektin vb) hem de bazal membrandan bağımsız bileşenler (gözyaşı kaynaklı fibrinler vb), önce yara yeri sınır hücreleri sonra bazal membran ve keratositler tarafından eksprese edilerek açık alana yerleşirler. Bu geçici ESM'nin, TGF- β bağımlı mekanizma tarafından yerleştirildiği izlenmiştir.[88] Yara kenarındaki hücreler, göçün erken aşamasında geçici ESM içindeki fibronektin ve fibronektin reseptörü olan integrin- $\alpha 5\beta 1$ 'i yukarı regüle ederler.[89] Daha sonra, laminin ve tip I ve IV kollajenler, fibronektin giderek azalırken, yeni epitel altında ortaya çıkarlar.[90] Lumikan, fare kornea epitelyumunda doku onarımı sırasında geçici olarak ifade edilen başka bir ESM bileşenidir; eksikliği *in vivo* çalışmalar ile epitelyel yara iyileşmesini geciktirdiği söylenmiştir.[91]

2.3.3 Kornea Epitel İyileşmesinde Sinyal Yolakları

Epitel yara iyileşmesi, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla aktive edilen hem paralel hem de ardışık sinyal yolakları tarafından düzenlenir. Çalışmalar yaralanmadan sonra epitel iyileşmede intrasellüler sinyal iletişimi varlığını ve önemini göstermektedir. Yara iyileşmesinin başlangıç veya gecikme aşamasında, hücre göçünü başlatan hücrel ve alt hücrel yapıları yeniden düzenlemek için aktive edilen bir dizi paralel sinyal yolakları, birbirleriyle iletişim kurarak, devreye girer. Bu başlangıç faktörleri arasında interlökin-1, TNF- α , EGF ve PDGF bulunur.[92, 93] Bunlar ekstrasellüler-regüle kinaz (ERK), mitojen aktive protein (MAP) kinazları ve/veya Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörü (NF- κ B) yolakları aracılığıyla epitelyel hücre göçüne yol açan bir dizi yanıtı tetikler. Ayrıca, c-fos, c-jun, jun-B ve fos-B gibi bir dizi transkripsiyon faktörü, hücrelerin göçmeye başlamadan önce yara iyileşmesinin gecikme aşamasında aktive olur.[94] Bu başlangıç faktörleri, Fas/Fas ligand aracılığıyla interlökin-1 tarafından başlatılan keratosit apoptozuna kadar uzanan diğer paralel yolakların aktive edilmesine de yol açar, bu da yaralanmayı takip eden ilk 24 saatte proinflamatuvar kaskadlara neden olur.[66, 92]

EGFR transaktivasyonunun, IGF, insülin ve HGF gibi EGF dışındaki ligandlarla birlikte kornea epitelyel yara iyileşmesinde ERK ve Fosfatidilinositol-3-Kinaz/ Protein Kinaz B (PI3K/Akt) yolaklarını aktive ederek intrasellüler sinyali artırdığı gösterilmiştir.[55, 95] Bunlardan Fosfatidilinositol-3-Kinaz (PI3K), hücre sağkalımı, proliferasyonu, protein sentezi ve veziküler trafik gibi görevlerden sorumlu bir protein çeşididir.[96] Akt diğer adıyla Protein Kinaz B de genel olarak hücre proliferasyonundan ve sağ kalımından sorumlu bir serin/treonin protein kinaz enzimidir.[97]

Bir başka başlangıç yara iyileşmesi faktörü de matriks metalloproteinaz salınımıdır, bu da hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonunu ayırmak için bir dizi süreci tetikler. Bu, integrinlerle iletişim kurarak ve fibronektin, laminin ve tenaskin gibi ESM proteinlerinin üretimi aracılığıyla hücre göçünün başlatılmasına ve kolaylaştırılmasına yol açar ve iyileşme süreci için göç etmeye başlayan hücreler için iskelet görevini üstlenirler.[98] PI3K/AKT sinyal yolunun diyabetes mellitus tip 2 olan hastalarda inhibe olduğu, keratit hastalarında ise aşırı aktive olduğu gösterilmiştir.[99]

Hücre yaralanması sonrasında hücrel nükleotidlerin (örneğin, ATP) salınımı, hızlı bir şekilde purinörik sinyalleme aktivasyonuna ve intrasellüler kalsiyum seviyelerinin artmasına neden olan bir başka başlangıç faktörü olarak da düşünülmektedir. Bu durum EGFR

transaktivasyonu ve hücre göçüne neden olur. Daha sonra korneal sinir katılımıyla epitelyel yara iyileşmesi gerçekleşir.[100-102]

Yara iyileşmesi sırasında hücre göçünün, büyüme faktörleri ile ESM arasında da bir sinyal etkileşimi ile indüklendiği düşünülmektedir. Örneğin, IGF-I'in, reseptörü aracılığıyla doğrudan hücre göçünü uyarmasının yanı sıra, *in vitro* ortamda epitelyel hücre göçünü kolaylaştıran kornea bazal membran bileşeni laminin-332'nin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir.[78]

2.3.4 Kornea Epitel Yara iyileşmesinde Duyusal İnnervasyon

Trigeminal gangliyonun oftalmik dalından köken alan duyusal sinir lifleri periferik olarak korneaya girer ve epitel hücreleri arasında incelererek sonlanırlar. Sinir liflerinin bütünlüğü, termal, mekanik ve kimyasal uyarıcıları algılayarak kornea homeostazı ve yara iyileşmesi için temel nörotrofinlerin salınımına öncülük ettiği normal korneal fonksiyon için kritiktir.[82]

Duyusal sinirlerin korneal epitelyel yara iyileşmesi üzerindeki trofik etkisinin, sinir uçlarındaki P maddesi gibi nöropeptitler aracılığıyla olabileceği düşünülmektedir.[103] Örneğin topikal olarak uygulanan nörotoksin kapsaisin ile indüklenen duyusal sinir uçlarındaki nörotoksinlerin tükenmesi, tavşanlarda korneal yara iyileşme hızını geciktirdiği gösterilmiştir.[103]

2.4. İnsülin

İnsülin ilk defa Ortopedist Frederick Banting ve asistanı Charles Best tarafından 1921'de başlayan ve fizyoloji profesörü John Macleod tarafından desteklenen deneyler sonucunda, köpek pankreasından elde edilmiş ve “isletin” adı verilerek 1922 yılında on dört yaşında bir diyabet hastasına enjekte edilmiştir.[104] İlk defa Eli Lilly tarafından seri üretime geçilen regüler insülin, Nordisk İnsülin Laboratuvarlarında Protamine-Çinko ilavesi ile ilk uzun etkili insüline dönüştürülmüştür. Rekombinant DNA teknolojisinin *Escherichia coli* üzerinde kullanılmasıyla elde edilen insan insülini, Genentech ve Lilly arasında 1982 yılında imzalanan anlaşma ile Humulin® R (hızlı) ve N (NPH, orta hızlı) olarak piyasaya sürülmüştür. Hızlı etkili Lispro 1996 yılında, aspart 2000 yılında kullanılmaya başlanmış, klinik kullanımdaki iki uzun etkili insülin olan glarjin 2000 yılında, detemir ise 2005 yılında onay almıştır.[104]

İnsülin miktarı, “internasyonal ünite (IU)” olarak tanımlanır. Bir IU insülin; 10 saat aç bırakılmış, 2 kg ağırlığındaki bir tavşanın kan şekerini 120 mg/dl'den 45 mg/dl'ye düşüren insülin miktarı olarak tanımlanmıştır. 1IU İnsülin, 0.0347 mg insan insülinine eşdeğerdir (28.8 IU/mg).[105]

İnsülin, vücuttaki tüm dokularda etkili olan güçlü bir polipeptit hormondur. Hücresel etkisini hücre membranındaki reseptörler aracılığıyla gerçekleştirir. İnsülin reseptörü, disülfid bağlarıyla birbirine bağlı olan 2 α ve 2 β alt ünitesinden oluşan heterotetrametrik bir transmembran proteindir. α üniteleri, ekstrasellüler konumlanmış olup insülinin bağlanmasından sorumludur; β üniteleri ise intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip intrasellüler yapıları temsil eder. İnsülinin reseptöre bağlanması, β ünitelerinin transfosforilasyonu yoluyla protein kinaz aktivasyonunu ve intrasellüler bazı substratların fosforilasyonunu indükler. Bu substratlar arasında IRS (insülin receptor substrates), Shc proteinleri (Src Homoloji ve kollajen domain proteinleri) ve Gab 1 (Grb 2 ilişkili Protein 1) bulunmaktadır. [106]

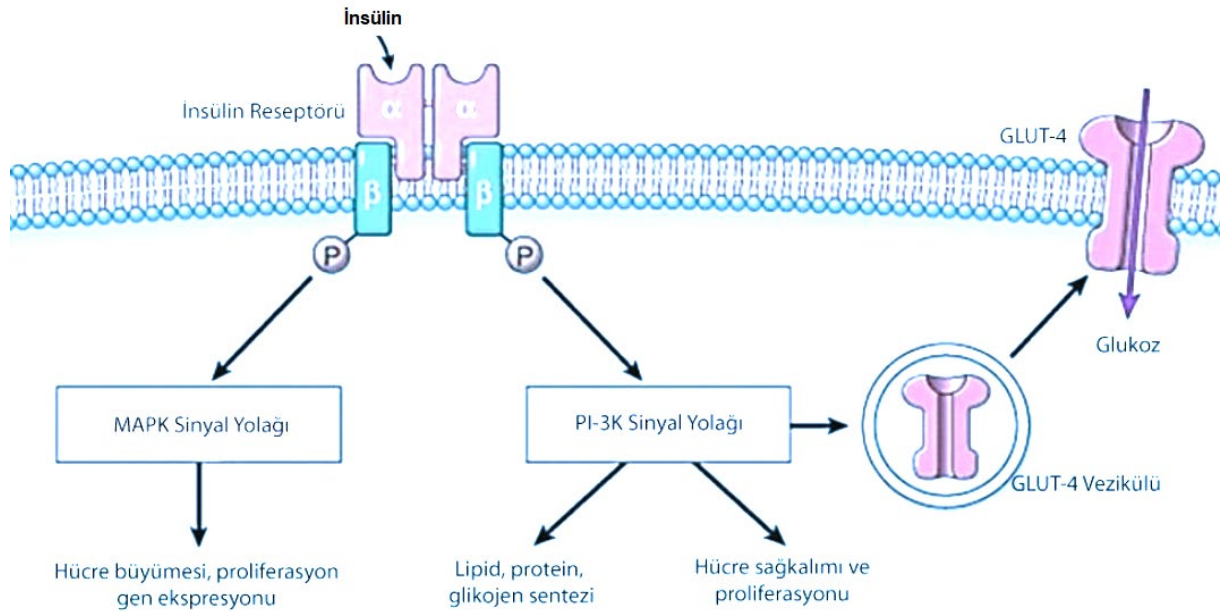
İnsülinin 2 adet ana hücre içi yolağı vardır; PI3K/AKT ve MAPK (MAPK: Ras-Mitojen Aktive Protein Kinaz) - ERK. PI3K, bir lipid kinazdır ve aktivasyonu ile PI3P (Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat) oluşur. (Şekil 2.2) PI3P bir sinyal molekülüdür ve PDK1 (Phosphoinositide bağımlı kinaz) aracılığıyla PKB (protein kinaz B) veya diğer adıyla AKT aktivasyonunu sağlar. AKT, bir serin/threonin protein kinazdır ve glikoz transportundan, glikojen sentezine, lipid ve protein sentezinden, hücre sağkalımına kadar metabolik aktivitenin düzenlenmesinden sorumludur. İnsülinin aktive ettiği diğer yolakta Ras-Raf etkileşimi sonrası aktive olan MAPK, ERK 1 ve 2 enzimlerini aktive eder. ERK 1/2, protein sentezinde rol alır ve hücre çekirdeğine translokasyonları sonrası gen transkripsiyonunu arttırmaları. Bu yolak da insülinin mitojenik ve büyümeyi arttırıcı etkilerinden sorumludur.[106, 107]

Topikal insülinin diyabetik veya diyabetik olmayan hayvan ve insanlarda yara iyileşmesine olumlu katkısı çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır.[108-111] İnsülinin yarattığı pozitif katkıya sebep olan yolaklar, önceki başlıkta incelenen PI3K-PKB/AKT ve Ras-Raf-MAPK-ERK yolaklarıdır.[110, 112]

İnsülinin keratinosit fonksiyonları üzerindeki etkisi, EGF reseptöründen bağımsız olarak gerçekleşir. Yüksek dozlarda insülin, hem insülin reseptörüne (IR) hem de IGF-1 reseptörüne bağlanarak etki sağlarken; düşük dozlarda sadece insülin reseptörü üzerinden

aktivite gösterir. IGF-1 reseptörü, insülin reseptörü ile %60 oranında homojenite içerir. Her iki reseptör de tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Aktivasyonları sonrasında gen ekspresyonunda ve protein sentezinde artış, ESM'de ve özellikle migrasyonda önemli etkisi olan integrin sentezinde artışa neden olur.[113]

Yara dokusuna uygulanan insülinin, ESM'deki integrin $\alpha 3\beta 1$ ve laminin 322 konsantrasyonunda artış gösterdiği gözlemlenmiştir. İntegrin ve laminin proteinleri, bazal membran ve iyileşme dokuları için önemli proteinlerdir.[114, 115] Sitoplazmadan hücre membranına transloke olan Rac1 proteininin, integrin $\alpha 3\beta 1$ ile etkileşime girerek keratinosit migrasyonunu sağladığı ve insülinin her iki süreci de hızlandığı belirlenmiştir.[112]



Şekil 2.2: İnsülin etki mekanizması (Bekele ve ark.'dan modifiye edilmiştir)[116]

IGF ile yakından ilişkili bir peptid olan insülin gözyaşında bulunmaktadır. [53] İnsülin reseptörünün alfa ve beta alt birimleri, immünohistokimya çalışmaları ile korneada tespit edilmiştir.[117] Yara iyileşmesi *in vitro* monolayer hücre kültür modelinde insan kornea epitel hücrelerinde insülinin re-epitelizasyonu arttırdığı gösterilmiştir.[118] İnsülinin korneal epitel hücrelerinde hücre proliferasyon ve göçünü stimüle eden ERK -1/2 ile fosfo-Akt düzeylerini

arttırdığı gösterilmiştir.[119] İnsülinin tedaviye yanıt vermeyen beş korneal ülser vakasında etkili olduğu ilk 1945'te gösterilse de; son yıllarda topikal insülinin kornea epitelizasyonunu teşvik ettiği ve hızlandırdığı ve diğer terapötik seçeneklere göre birçok fayda sağladığı da gösterilmeye başlanmıştır.[120]

2.5 Suni Göz Yaşları

Yapay gözyaşları damla, pomad ve jel formunda olabilir. Damlalar genellikle polivinil alkol, selüloz türevleri (hipromelloz), mukomimetikler veya sodyum hiyalüronat içerir. Gözyaşı tedavisi ile oküler yüzeyin nemlenmesi sağlanır, gözyaşı osmolalitesi azaltılır ve inflamatuvar maddeler seyreltilir.[121] Doğal gözyaşının içeriğinde bulunan su, tuz, hidrokarbon, proteinler, lipitler, büyüme faktörleri, yapay gözyaşlarında bulunmaz. Yapay gözyaşı, doğal gözyaşı film tabakasının yapısını göstermez. Doğal gözyaşının pH'ı 7,4 iken, yapay gözyaşlarındaki alkali özellik bikarbonat iyonu ile sağlanır[122]. Gözyaşlarının elektrolit içeriği, oküler yüzey epitel sağlığı için önemlidir. Özellikle kornea kalınlığını korumak ve saydamlığını sağlamak için potasyum, hasarlı epitelin yenilenmesi ve müsin tabakanın devamlılığı için bikarbonat gereklidir. Lubrikanların elektrolit oranları, gözyaşına benzer şekildedir.[123]

2.5.1 Sodyum hiyalüronat

Sodyum hiyalüronat korneadaki çapraz bağlı kollajen matrisin fibriller arası alanındaki primer glikozaminoglikandır. Prolifere olan hücrelerde yapımının arttığı izlenmiş olup mitoziste görevli olduğu düşünülmektedir.[5] Oküler yüzey yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir.[6, 124] Bu özellik, sadece viskoelastisitesinden dolayı olan epitel hücreleri üzerindeki mekanik koruyucu rolünden değil; aynı zamanda kornea epitel hücreleri üzerindeki pozitif biyolojik fonksiyonlarından da kaynaklanmaktadır.[125, 126] Etkilerini CD44 ve hyaluronan-aracılı motilite reseptörlerine bağlanarak gösterir. Bu reseptörlerin aktivasyonu hücre çoğalmasını ve göçünü modüle eder.[125] Bu fonksiyonun doz-bağımlı olarak gösterildiği *in-vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. [127] Bu çalışmalar sonunca sodyum hiyalüronat, farklı deneysel ve klinik durumlarda kornea onarımını desteklemek için kullanılma eğilimindedir.[128]

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. (Onay no: DA 23/11)

3.1 Hayvan Modeli

Çalışmada Sprague Dawley cinsi 28 erişkin erkek sıçan kullanıldı. 40 mg/kg intraperitoneal Ketamin Hidroklorid + 4 mg/kg Xylazine ile sedasyona ek olarak % 0,5 propakain hidroklorid ile topikal anestezi yapıldı. (Şekil 3.1) Kornea epiteli santralde tek kullanımlık 2mm çapında dermatolojik deri punch (AcuPunch, Acuderm, Ft. Lauderdale, FL) ile işaretleme sonrası mikroskop altında 11 numara bisturi ile kazındı. (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) Bütün bu işlemler aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.



Şekil 3.1 İşlem öncesi normal sıçan gözünün görünümü



Şekil 3.2 Korneada 2 mm işaretleme için kullanılan punch

Epitel kazınması sonrası sıçanlar rastgele seçilen 4 gruba ayrıldı;

Kontrol grubu (n=7): Epitel defekti modeli olmayan normal grup

Grup A (n=7): Tedavisiz takip edilen epitel defekti model grubu

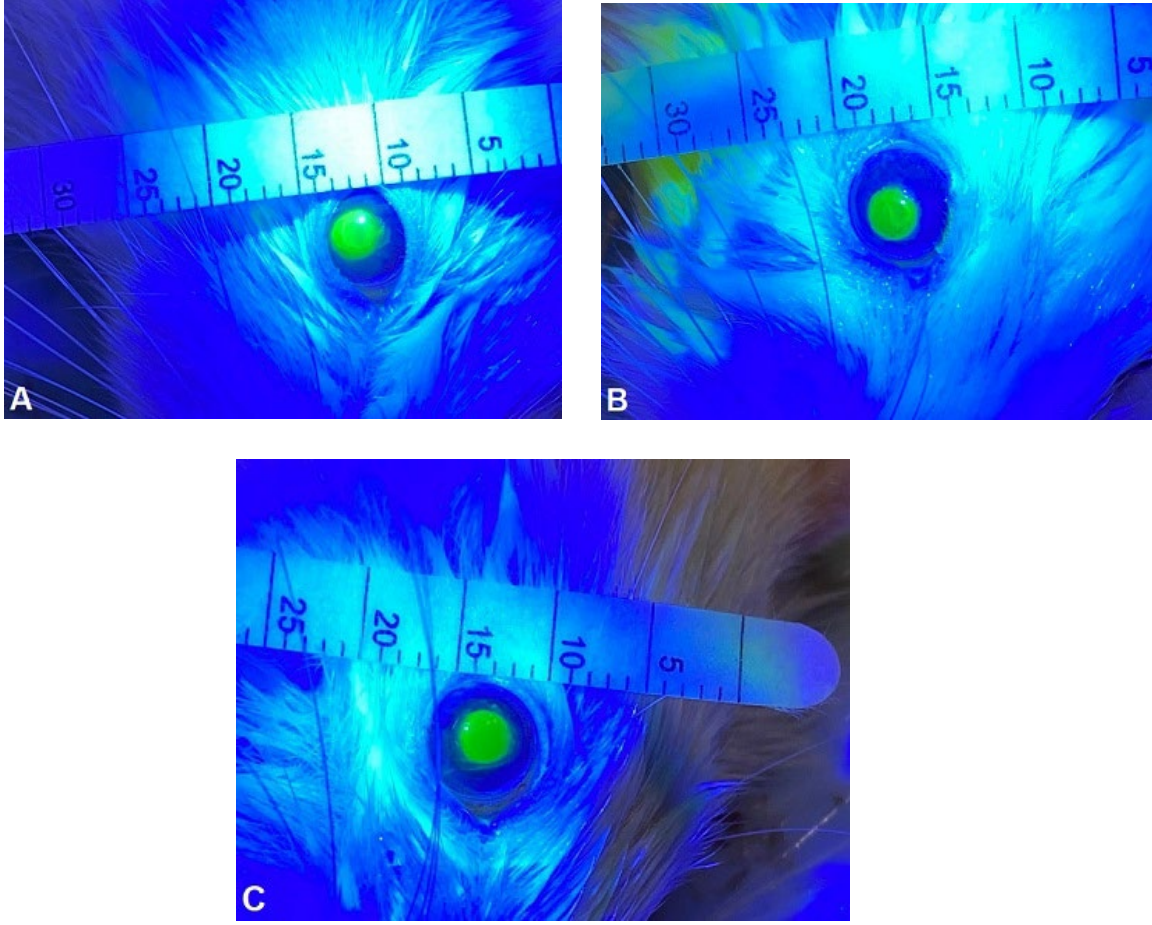
Grup B (n=7): Topikal % 0.15 sodyum hiyalüronat tedavisi verilen epitel defekt model grubu

Grup C (n=7): Standart doz topikal insülin tedavisi verilen epitel defekt model grubu

Grup B içinde yer alan sıçanlara, hazır sodyum hiyalüronat preparat (Hyonat %0.15 Tek Dozluk Göz Damlası, Çözelti; Vem İlaç) oküler yüzeye uygulanmıştır. Grup C içinde yer alan sıçanlara standart topikal insülin dozu 1 IU/mL olacak şekilde hızlı etkili insülin (ACTRAPID® HM Flakon; Novo Nordisk) preparatından hazırlanarak; her altı saatte bir oküler yüzeye uygulanmıştır. Tedavilere epitel kazınmasından hemen sonra ve bütün gruplara aynı günde olacak şekilde başlanmış ve on gün süre ile epitel defektleri kapansa bile devam edilmiştir.

Epitel defekti büyüklüğü her muayenede florasein boyama yapılarak fotoğraflanmıştır.

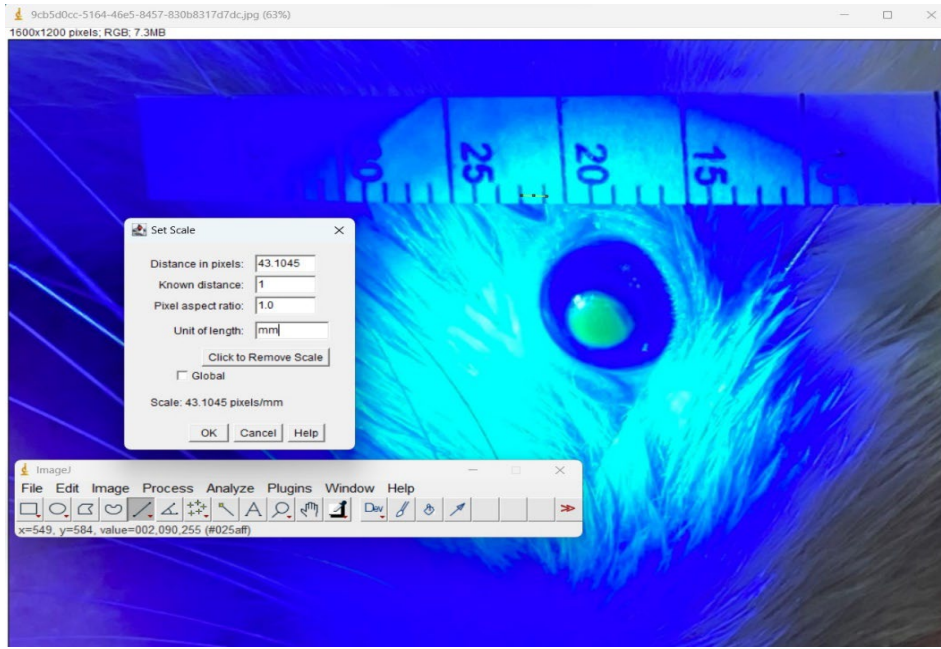
10.günde anestezi altında kornea dokuları tam kat eksize edildikten sonra sıçanlar servikal dislokasyon ile kurban edilmiştir.



Şekil 3.3 2mm santral kornea epitel defektinin florasein boyama sonrası görünümü.
A)Tedavisiz izlenen grup B)Topikal % 0.15 sodyum hiyalüronat tedavisi verilen grup
C)Standart doz topikal insülin tedavisi verilen grup

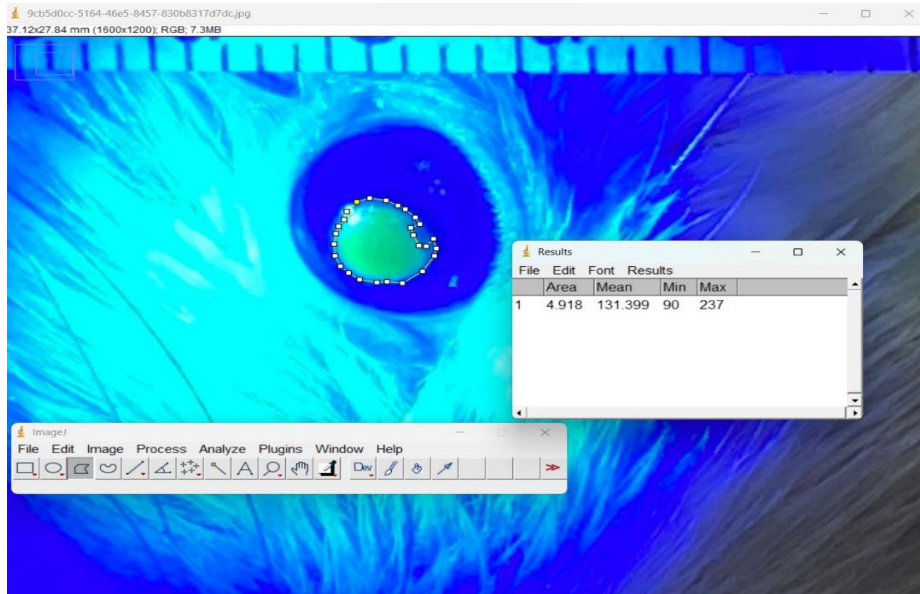
3.2 Biyomikroskopik Değerlendirme

Bütün sıçanların 4. saat, 12. saat, 1. Gün, 2. Gün ve 3.gün biyomikroskopik muayenesi yapıldı. Epitel defekti boyutu her muayenede florasein boyama yapılarak değerlendirildi ve tripod yardımı ile 30 cm'lik sabit çekim mesafesi oluşturularak Iphone 11 ile 5x büyütme yardımıyla fotoğraflanma yapıldı. ImageJ programı ile alan hesabı yapılarak defekt kapanma yüzdesi hesaplandı.



Şekil 3.2a ImageJ programında mesafe işaretleme

ImageJ programında kılavuz cetvelde 1 mm uzunlukta olduğu bilinen mesafe işaretlenmiş ve bu mesafeye programda denk gelen pixel sayısı belirlenerek kaydedilmiştir.



Şekil 3.2b ImageJ programında alan hesaplama

ImageJ programında düzensiz şekillerin alan hesaplaması için kullanılan gereç yardımı ile epitel defekti alanı fotoğraftaki gibi işaretlenerek Analyze kısmından bu işaretli alanın pixel/m² olarak sayısal değeri hesaplanmıştır.

3.3 Histopatolojik Değerlendirme

1mm³'lük parçalara bölünen doku örnekleri 0.1M fosfat tamponlu %2.5'lik gluteraldehitte (pH 7.4) 2 saat tespit edildi. Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez yıkanan dokular 1 saat %1'lik osmium tetraoxide ile etkin bırakılarak post fiksasyonları yapıldı. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlandı. Son olarak propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyaline gömülerek bloklar hazırlandı. 56⁰ C'lık etüvde 48 saat süreyle polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler alınarak toluidin blue ile boyandı ve ışık mikroskopta incelendi. İşaretlenen bölgelerden alınan yaklaşık 0.5µ'luk ince kesitler uranil asetat – kurşun sitrat ile boyanarak yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskopta (FEI/Tecnai G2 Spirit Biotwin) değerlendirildi.

3.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 ve jamovi versiyon 2.4 programları ile gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. A, B ve C gruplarına göre tekrarlı ölçümler açısından anlamlı farklılığı araştırmak için Karma Etkili Model kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar Dunn's Benferroni Testi ile belirlendi. P değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1 Biyomikroskopik Bulgular

Biyomikroskopik incelemeye epitel defekti oluşturulan gruplar dahil edilmiştir. Her grupta 7 erişkin erkek sıçan vardır. Tedavisiz takip edilen epitel defekti model (grup A), topikal

% 0.15 sodyum hiyalüronat tedavisi verilen epitel defekt model (grup B) ve standart doz topikal insülin tedavisi verilen epitel defekt model (grup C) gruplarında her sıçanın 4, 12, 24, 48. ve 72. saatteki göz yüzeyinde oluşturulan yaralanma yüzey alanı büyüklükleri (pixel/mm²) ölçülmüştür.

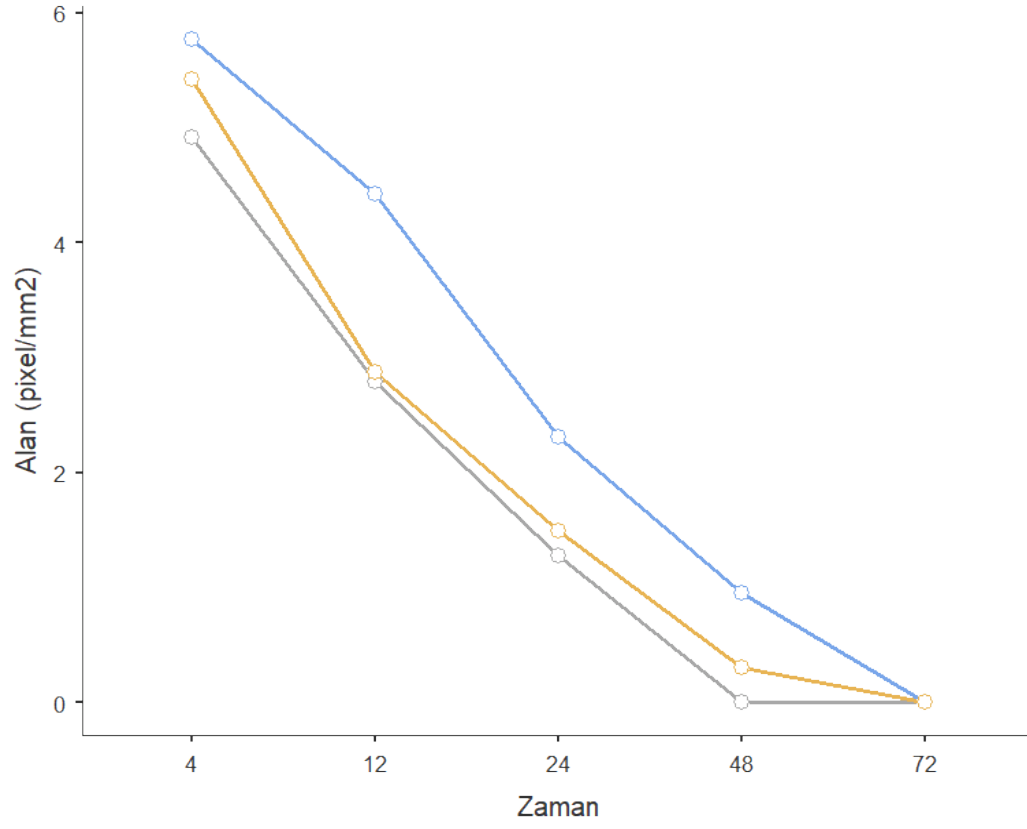
Yaralanma yüzey alanı büyüklükleri A, B ve C gruplarına göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<0.001$) ve yaralanma yüzey alanı büyüklükleri zaman içerisinde gruplarda farklılaşmaktadır. Yani, zaman-grup etkileşimi anlamlı bulunmuştur. ($p<0.001$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.2 Gruplarda zamana bağlı ölçümlerin karşılaştırılması

	Grup			p (Zaman)	p (Grup)	p (Zaman * Grup)
	A	B	C			
Saat 4	5,77±,64	5,42±,54	4,92±,45	<0.001	<0.001	<0.001
Saat 12	4,42±,85	2,88±,92	2,79±,49			
Saat 24	2,31±,81	1,49±,55	1,28±,27			
Saat 48	,95±,91	,31±,60	,00±,00			
Saat 72	,00±,00	,00±,00	,00±,00			

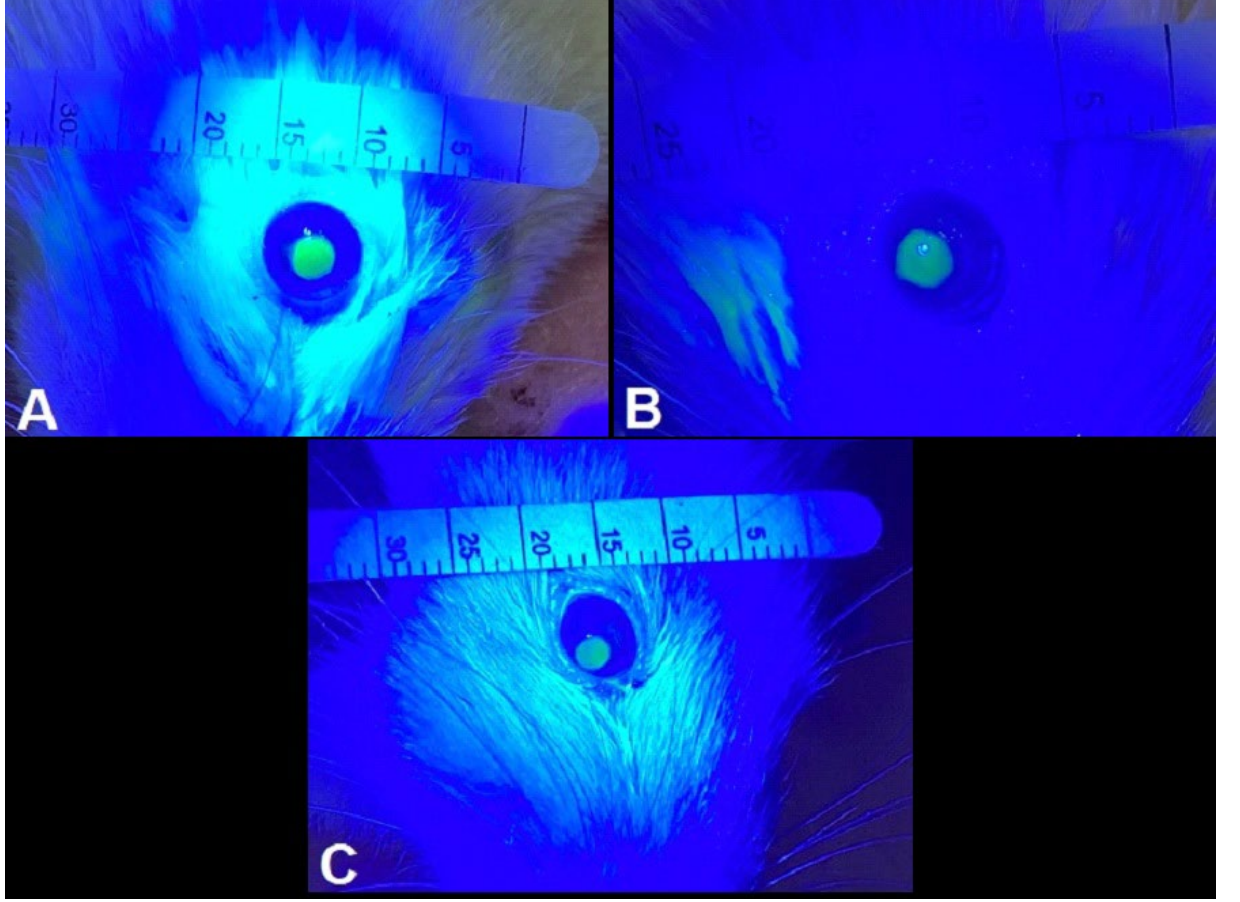
Mixed Effect Modeli, ortalama±sd

Zaman içerisinde yaralanma yüzey alanı ölçümleri anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4.1). A grubu ile B grubu arasında ve A grubu ile C grubu arasında büyüklük ölçümü açısından anlamlı farklılık vardır (sırasıyla $p<0.011$, $p<0.001$). Ancak B grubu ile C grubu arasında anlamlı farklılık yoktur ($p=0.880$).



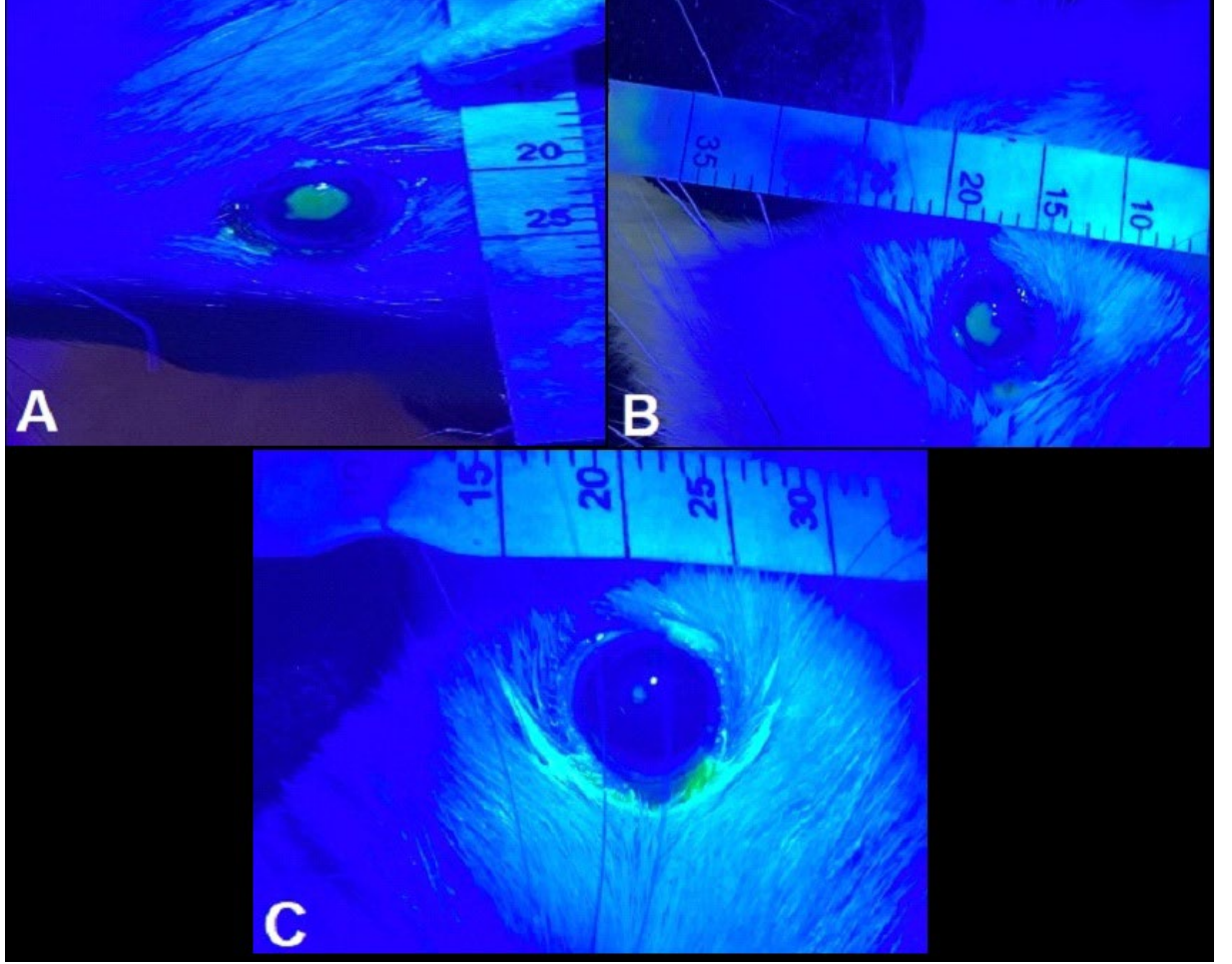
Şekil 4.1 Gruplarda epitel defektinin kapanma grafiği. A grubu mavi çizgi, B grubu sarı çizgi, C grubu gri çizgi ile gösterilmiştir.

4. saatte gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Ancak A grubunda, B grubunda ve C grubunda zamanla büyüklük ölçümü anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$). (Şekil 4.2)



Şekil 4.2 Grupların 4. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları A) A grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı B) B grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı C)C grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı

12. saatte A ve B ($p<0.001$), A ve C ($p<0.001$) grupları arasında büyüklük ölçümü açısından anlamlı farklılık varken B ve C ($p=1.000$) grupları arasında anlamlı farklılık yoktur. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Grupların 12. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları A) A grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı B) B grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı C)C grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı

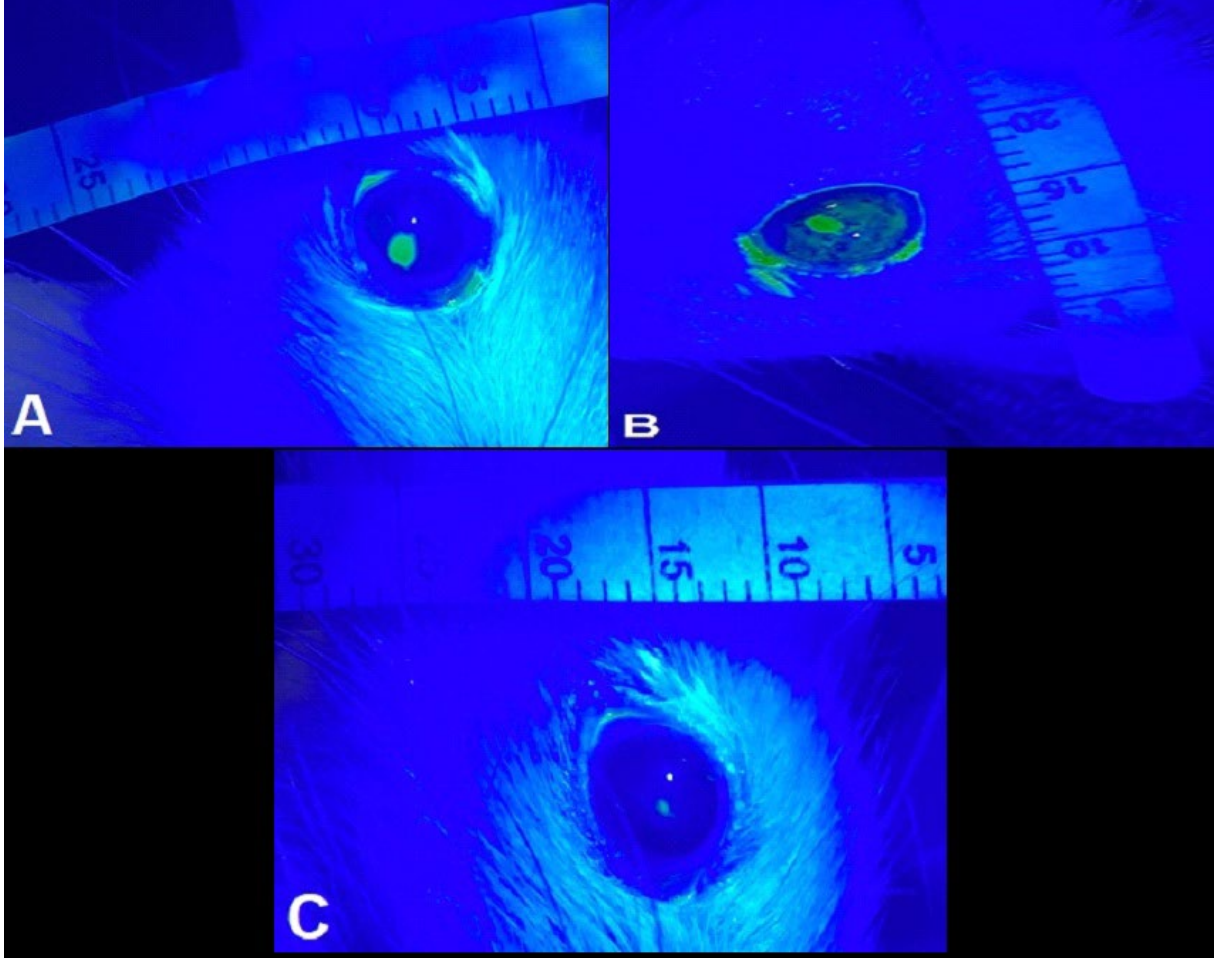
Ayrıca A grubunda, B grubunda ve C grubunda zamanla büyüklük ölçümü anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$). (Tablo 4.2)

Tablo 4.2 Epitel iyileşmesinde Zaman * Grup posthoc karşılaştırılması

Karşılaştırma										
Zaman	Grup	vs	Zaman	Grup	Fark	SE	t	df	p _{bonferroni}	
4	A	-	4	B	0.8489	0.283	2.996	63.3	0.410	
4	A	-	4	C	0.3501	0.283	1.236	63.3	1.000	
4	A	-	12	A	1.3496	0.218	6.179	84.0	< .001	
4	A	-	24	A	3.4551	0.218	15.819	84.0	< .001	
4	A	-	48	A	4.8194	0.218	22.066	84.0	< .001	
4	A	-	72	A	5.7681	0.218	26.410	84.0	< .001	
4	B	-	4	C	-0.4987	0.283	-1.760	63.3	1.000	
4	B	-	12	B	2.1261	0.218	9.735	84.0	< .001	
4	B	-	24	B	3.6431	0.218	16.680	84.0	< .001	
4	B	-	48	B	4.9193	0.218	22.523	84.0	< .001	
4	B	-	72	B	4.9193	0.218	22.523	84.0	< .001	
4	C	-	12	C	2.5393	0.218	11.626	84.0	< .001	
4	C	-	24	C	3.9256	0.218	17.973	84.0	< .001	
4	C	-	48	C	5.1123	0.218	23.407	84.0	< .001	
4	C	-	72	C	5.4180	0.218	24.806	84.0	< .001	
12	A	-	12	B	1.6254	0.283	5.736	63.3	< .001	
12	A	-	12	C	1.5399	0.283	5.434	63.3	< .001	
12	A	-	24	A	2.1056	0.218	9.640	84.0	< .001	
12	A	-	48	A	3.4699	0.218	15.887	84.0	< .001	
12	A	-	72	A	4.4186	0.218	20.231	84.0	< .001	
12	B	-	12	C	-0.0856	0.283	-0.302	63.3	1.000	
12	B	-	24	B	1.5170	0.218	6.946	84.0	< .001	
12	B	-	48	B	2.7931	0.218	12.788	84.0	< .001	
12	B	-	72	B	2.7931	0.218	12.788	84.0	< .001	
12	C	-	24	C	1.3863	0.218	6.347	84.0	< .001	
12	C	-	48	C	2.5730	0.218	11.781	84.0	< .001	
12	C	-	72	C	2.8787	0.218	13.180	84.0	< .001	
24	A	-	24	B	1.0369	0.283	3.659	63.3	0.054	
24	A	-	24	C	0.8206	0.283	2.896	63.3	0.544	
24	A	-	48	A	1.3643	0.218	6.246	84.0	< .001	
24	A	-	72	A	2.3130	0.218	10.590	84.0	< .001	
24	B	-	24	C	-0.2163	0.283	-0.763	63.3	1.000	
24	B	-	48	B	1.2761	0.218	5.843	84.0	< .001	
24	B	-	72	B	1.2761	0.218	5.843	84.0	< .001	
24	C	-	48	C	1.1867	0.218	5.433	84.0	< .001	
24	C	-	72	C	1.4924	0.218	6.833	84.0	< .001	
48	A	-	48	B	0.9487	0.283	3.348	63.3	0.144	
48	A	-	48	C	0.6430	0.283	2.269	63.3	1.000	
48	A	-	72	A	0.9487	0.218	4.344	84.0	0.004	

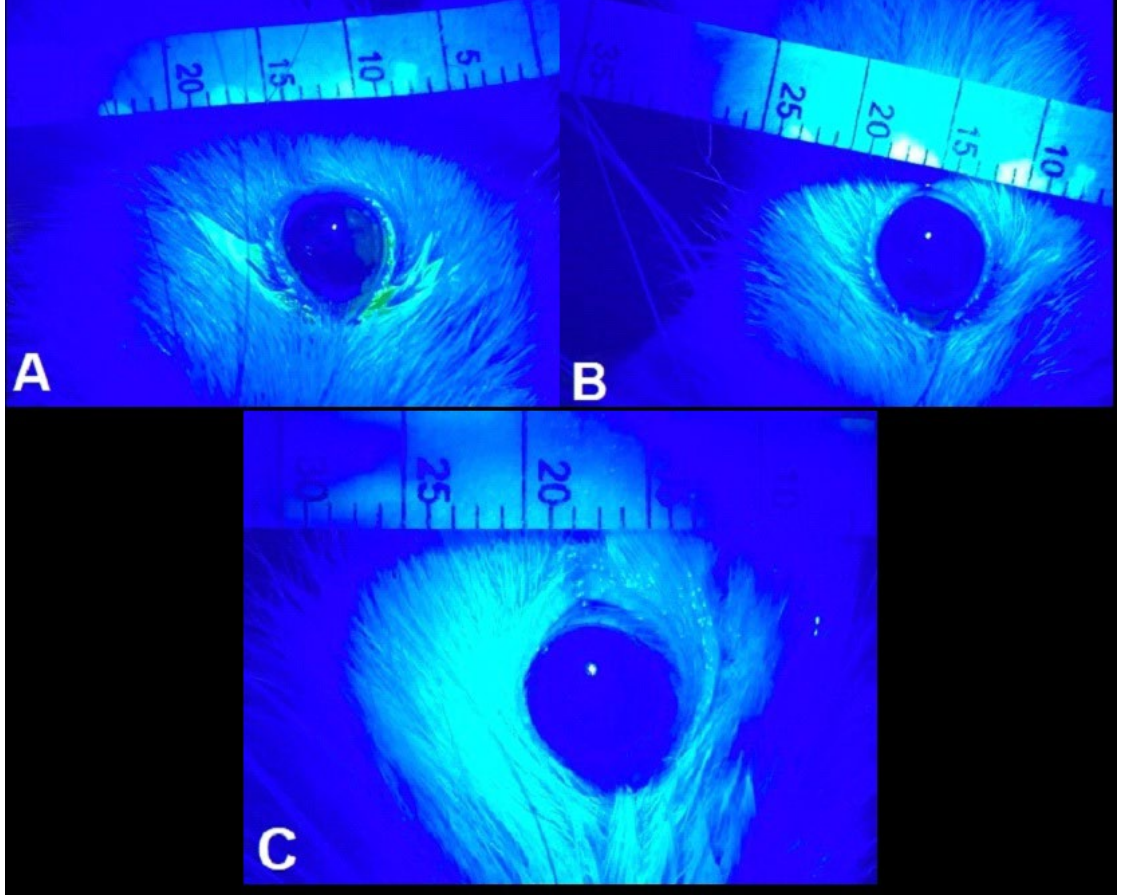
SE: sistematik hatalar t:hipotez dışı t değeri df: serbestlik derecesi

24. saatte gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Ancak A grubunda, B grubunda ve C grubunda zamanla büyüklük ölçümü anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$). (Şekil 4.4)



Şekil 4.4 Grupların 24. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları A) A grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı B) B grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı C)C grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı

Benzer şekilde 48. Saatte de gruplar farklılaşmamaktadır. 48. Saatte anlamlı azalma sadece A grubunda olmuştur ($p=0.004$). (Şekil 4.5) (Tablo 4.3)



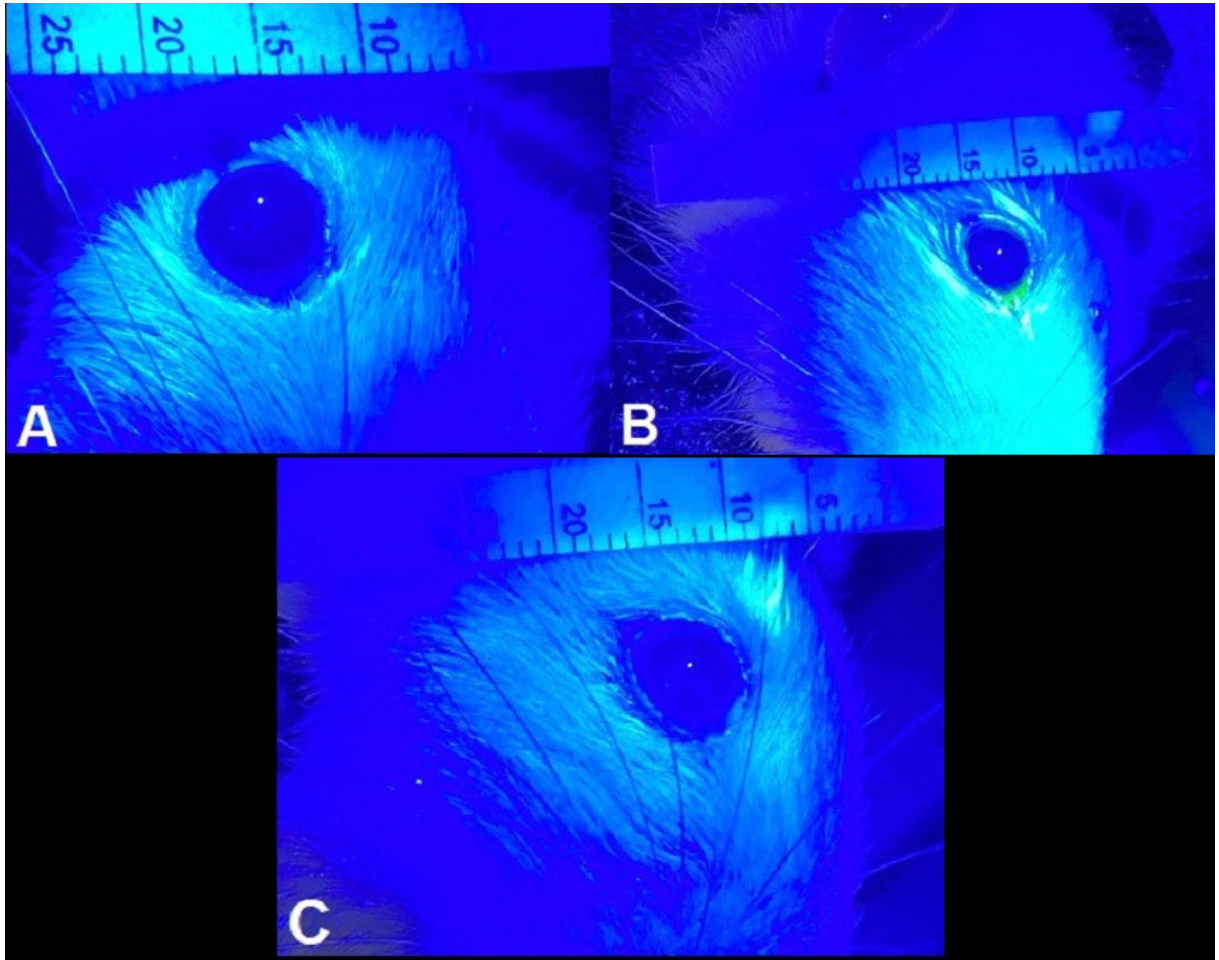
Şekil 4.5 Grupların 48. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları A) A grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı B) B grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı C)C grubu biyomikroskopik muayene ile korneal florasein boyanma alanı

Zaman	vs	Zaman	Fark	SE	t	df	P _{bonferroni}
4	-	12	2.005	0.126	15.90	84.0	< .001
4	-	24	3.675	0.126	29.14	84.0	< .001
4	-	48	4.950	0.126	39.26	84.0	< .001
4	-	72	5.368	0.126	42.57	84.0	< .001
12	-	24	1.670	0.126	13.24	84.0	< .001
12	-	48	2.945	0.126	23.36	84.0	< .001
12	-	72	3.363	0.126	26.67	84.0	< .001
24	-	48	1.276	0.126	10.12	84.0	< .001
24	-	72	1.694	0.126	13.43	84.0	< .001
48	-	72	0.418	0.126	3.32	84.0	0.014

Tablo 4.3 Epitel defekti kapanması*Zaman posthoc karşılaştırılması

SE:sistemik hatalar t:hipotez dışı t değeri df: serbestlik derecesi

72. Saatte büyüklük ölçümü sıfırdır. (Şekil 4.6)

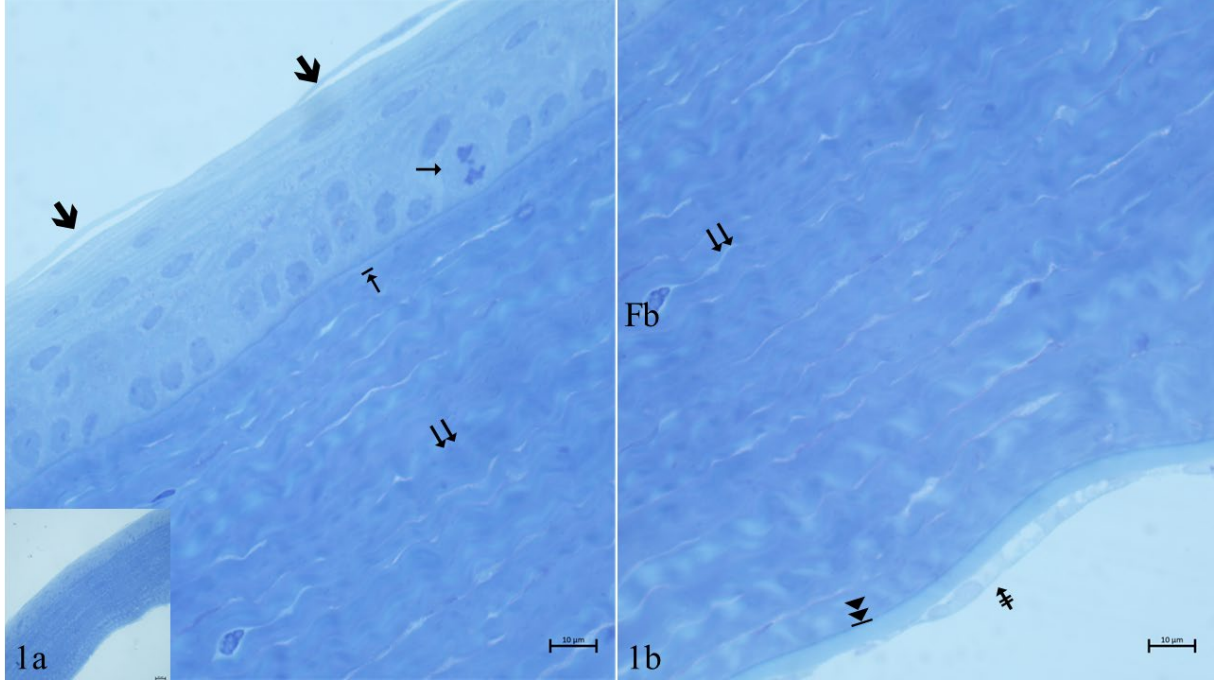


Şekil 4.6 Grupların 72. saat biyomikroskopik muayene fotoğrafları. Bütün gruplarda kornea epitel defektleri kapanmıştır

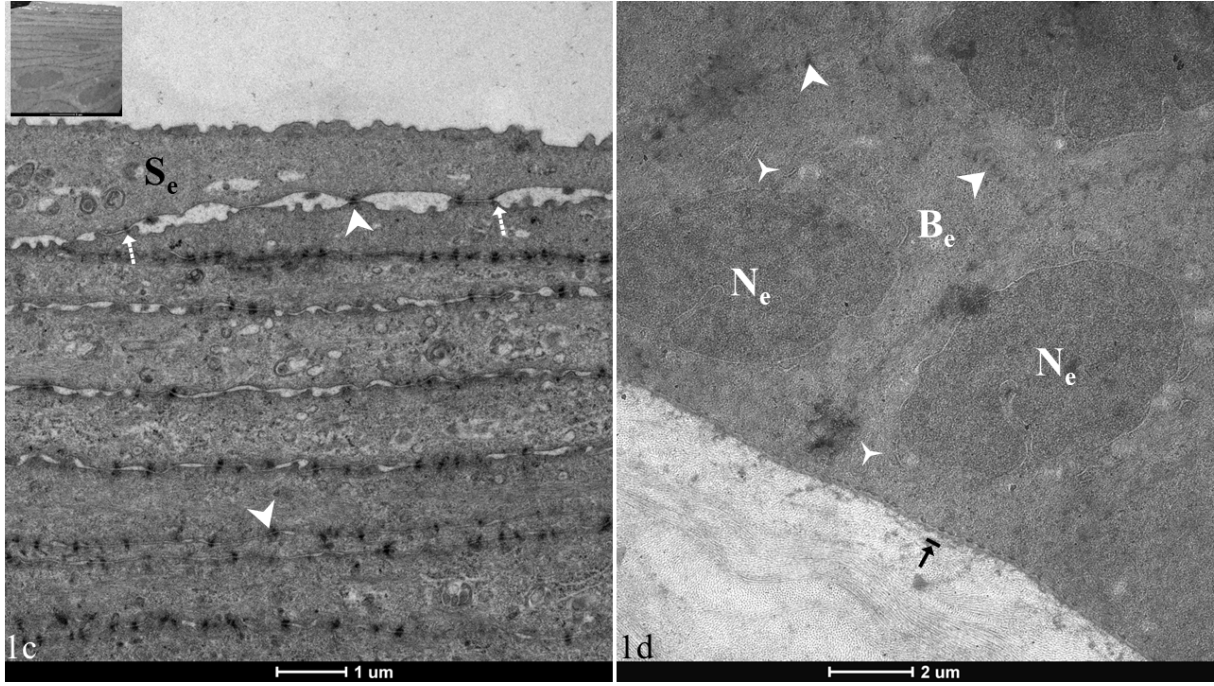
Sonuç olarak topikal insülin ve sodyum hiyalüronat tedavi grupları tedavisiz iyileşen gruba göre daha hızlı epitel defekti kapanması göstermiştir. Ancak topikal insülin ve sodyum hiyalüronat gruplarında epitel defekti kapanma hızı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.

4.2 Histopatolojik Bulgular

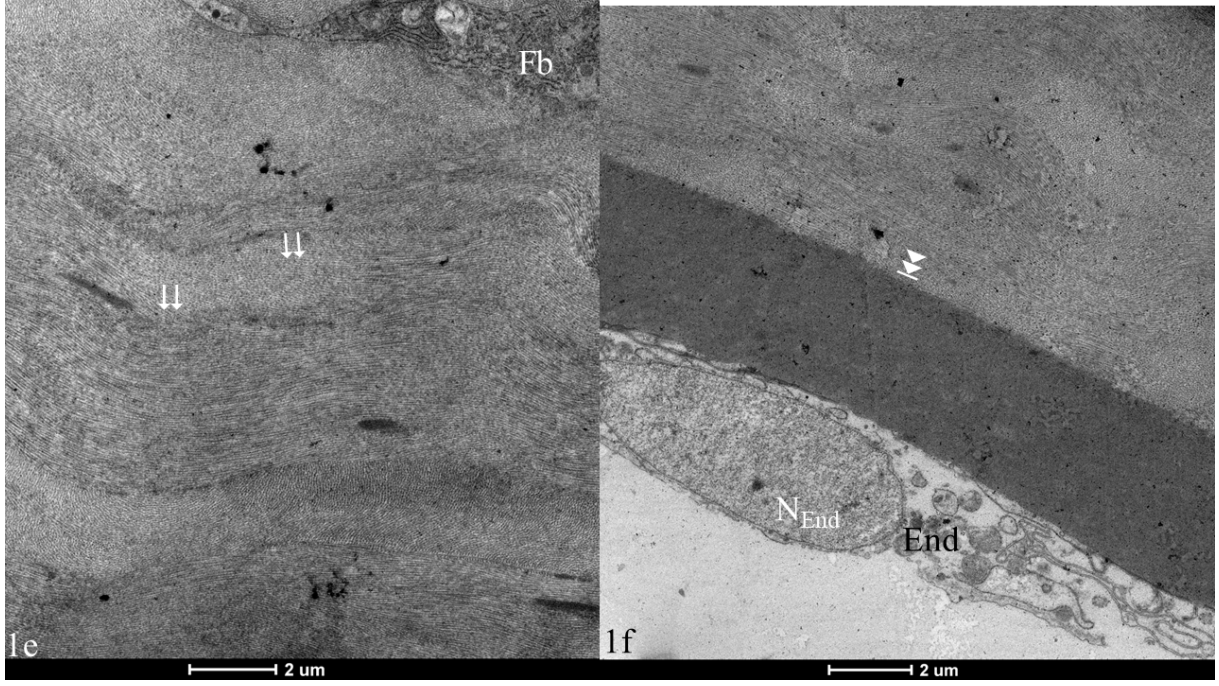
Kontrol grubunda; ışık ve elektron mikroskopta korneanın tüm katlarının normal düzenlenime sahip olduğu görülmüştür. Işık mikroskopta yapılan değerlendirmede yüzey epitel hücrelerinin doğal yapısal dizilim gösterdiği ve hücreler arası boşluğun yok denecek kadar az olduğu, Bowman membranı üzerinde bölünmekte olan bazal hücre olduğu görülmüştür. Yüzeyel epitel hücrelerde deskuamasyon izlenmiştir. Stromada kollajen liflerin hafif ondülasyon gösterse de doku genelinde düzenli yerleşim gösterdikleri ve aralarında ökromatik çekirdekleri ile fibroblastların varlığı görülmüştür (Şekil 4.7.1a-1b). Elektron mikroskopta yüzey epitel hücreleri arasındaki desmozomların yoğun plakları ile ayırt edilmiştir. Yüzeyden dökülmekte olan hücrelerde desmozomların silindiği ayırt edilmiştir. Bowman membranı üzerinde oturan hücrelerde çekirdeklerin indente ve ökromatinden zengin olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin hemidesmozomlar ile bazal membrana bağlandığı görülmüştür (Şekil 4.7.1c-1d). Elektron mikroskopta stromada yapılan değerlendirmede kollajen liflerin normal düzenlenim gösterdiği, fibroblastın aktif sentez aşamasında olduğu ayırt edilmiştir. Homojen görünümlü Descement membran ve kornea endotel ayırt edilmiştir (Şekil 4.7.1e-1f).



Şekil 4.7.1a-b Kontrol grubu ışık mikroskopi kesitleri Yüzey epitelinden dökülmekte olan hücreler➡, ile birlikte Bowman membranı (➡) üzerinde bölünmekte olan bazal epitel hücre (➡) izleniyor. Stromada düzgün düzenlenim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ökromatik çekirdeği ile fibroblast (Fb)görülüyor. Stromanın devamında homojen ve gergin yapısı ile izlenen Descement membranı (⇨) ve kornea endoteli (⌘) görülüyor (Toluidin Mavisi 1aX1000- 1bX1000).

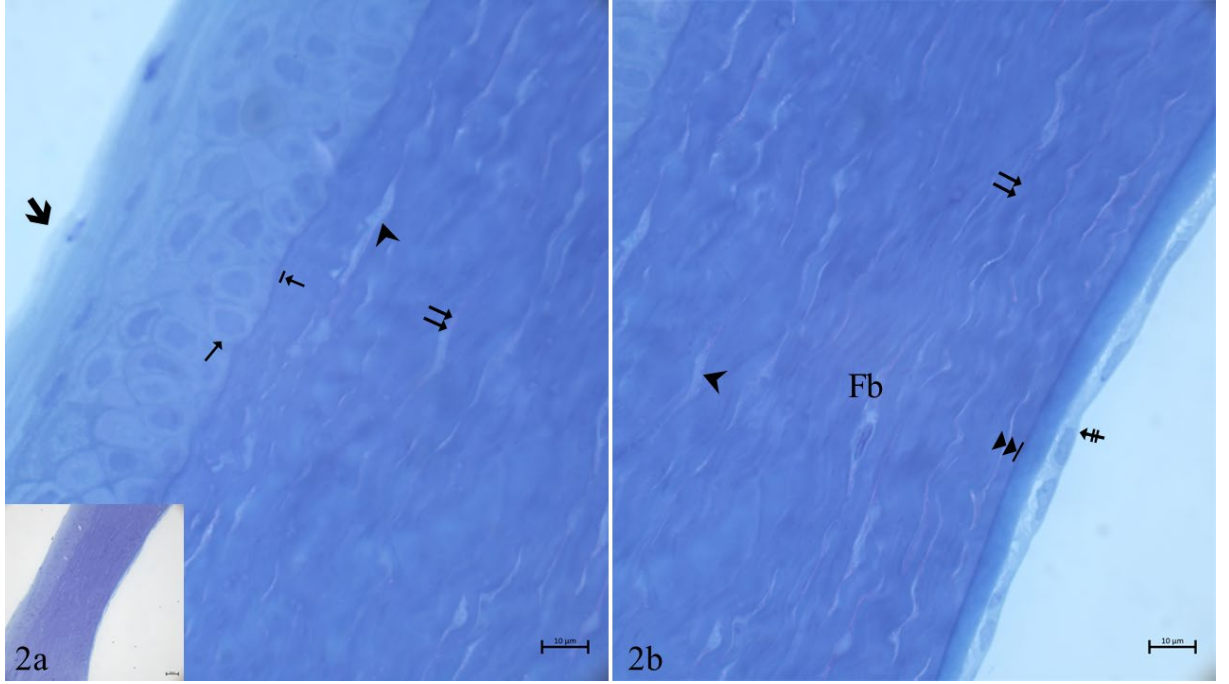


Şekil 4.7.1c-1d Kontrol grubu elektron mikroskopi kesitleri Elektron mikroskop mikrografında kornea epitelinin birbirine desmozomlar (➤) bağlı olduğu alanlar ve yüzey epitelinden ayrılmakta olan hücrede (Se), desmozomların silindiği (‡) noktalar izleniyor. Bowman membranı (→) üzerinde oturan bazal hücreler (Be) ökromatinden zengin indente çekirdekleri (Ne) ile ayırt ediliyor. Bu hücreler arasında desmozomlar (➤) ve interdijitasyonlar (↗) görülüyor (Kurşun Sitrat& Uranil Asetat 1cX1900- 1dX4800).



Şekil 4.7.1e-1f Kontrol grubu elektron mikroskopi kesitleri Elektron mikroskop mikrografında stromanın derin katmanında birbirine dik açılar ile yerleşim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında aktif sentez aşamasında olan fibroblast (Fb) görülüyor. Descement membran ve kornea endoteli izleniyor (Kurşun Sitrata& Uranil Asetat 1eX2900-1fX4800).

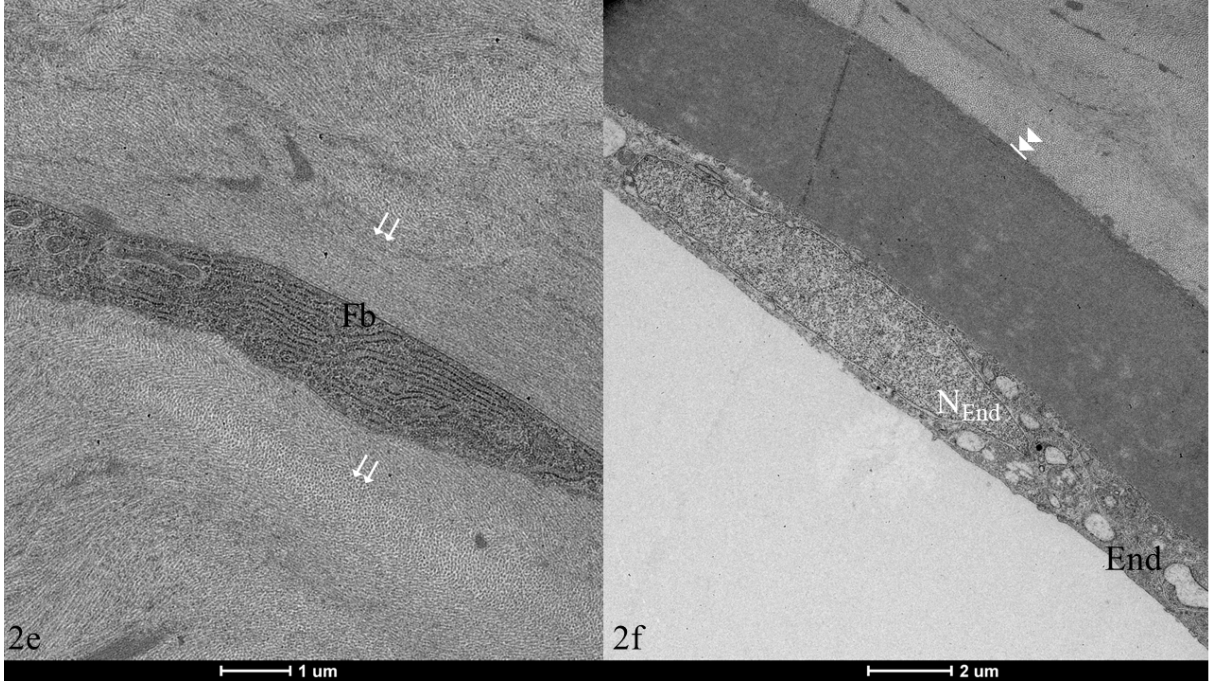
Topikal sodyum hiyalüronat grubunda yarı ince kesitte yüzey epitel hücreleri ve stroma normal yapıda ayırt edildi. Kontrol grubuna göre stromada kollajen lifler arasında hücrelere arası maddede artış gözlemlendi. (Şekil 4.7.2a-2b). Bu grupta yapılan ince yapı değerlendirmesinde kornea yüzey epitelinde dökülmekte olan hücreler ayırt edildi. Kornea epitelinin korunduğu alanlarda ve bazal hücrelerde hücrelerin birbirlerine desmozomlar ve interdijitasyonlarla bağlandığı izlendi. Bowman membranının bu grupta da çok dar bir aralık olarak görüldü (Şekil 4.7.2c-2d). Stroma da aktif sentez aşamasında olan fibroblast ve birbirine dik açı yapan kollajen lif demetleri görüldü. Descement membran homojen görünümlüydü. Kornea endotelinde sitoplazma ve hücre çekirdeği doğal yapısını koruduğu görüldü (Şekil 4.7.2e-2f).



Şekil 4.7.2a-2b Topikal sodyum hiyalüronat grubu ışık mikroskopi kesitleri Yüzey epiteli (➔) ile birlikte Bowman membranı (➡) üzerinde bazal epitel hücre (→) izleniyor. Stromada düzgün düzenlenim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ökromatik çekirdeği ile fibroblast (Fb)görülüyor. Stromanın devamında homojen ve gergin yapısı ile izlenen Descement membranı (⇢) ve kornea endoteli (⌘) görülüyor (Toluidin Mavisi 2aX1000-2bX1000).

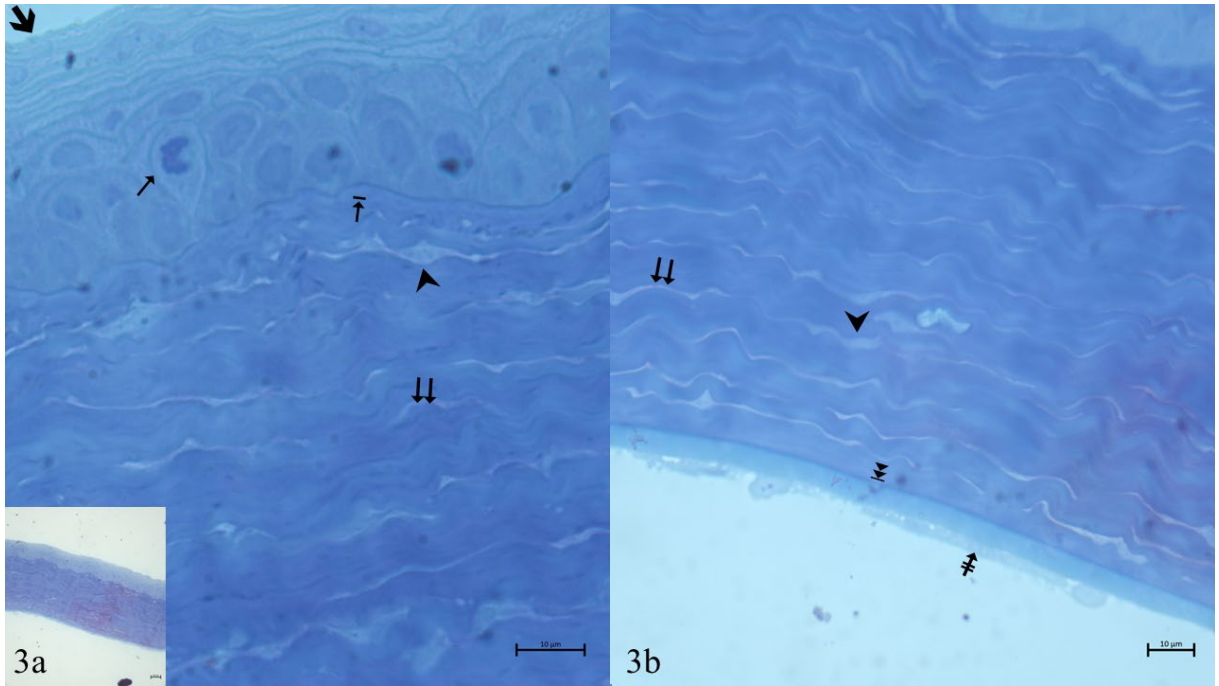


Şekil 4.7.2c-2d Topikal sodyum hiyalüronat grubu elektron mikroskopi kesitleri Elektron mikroskop incelemesinde yüzey epitelinden (Se) ayrılmaya hazırlanan hücrelerde desmozomların silindiği noktalar (↑) ile birlikte birbirine desmozomlarla (➤) bağlı normal kornea epitelini izleniyor. Bowman membranı (→) üzerinde oturan bazaldeki epitel hücreleri (Be) ökromatinden zengin indente çekirdekleri (Ne) ile ayırt ediliyor. Bu hücreler arasında desmozomlar (➤) ve interdijitasyonlar (↗) görülüyor (Kurşun Sitrata& Uranil Asetat 2cX1900-2dX4800).

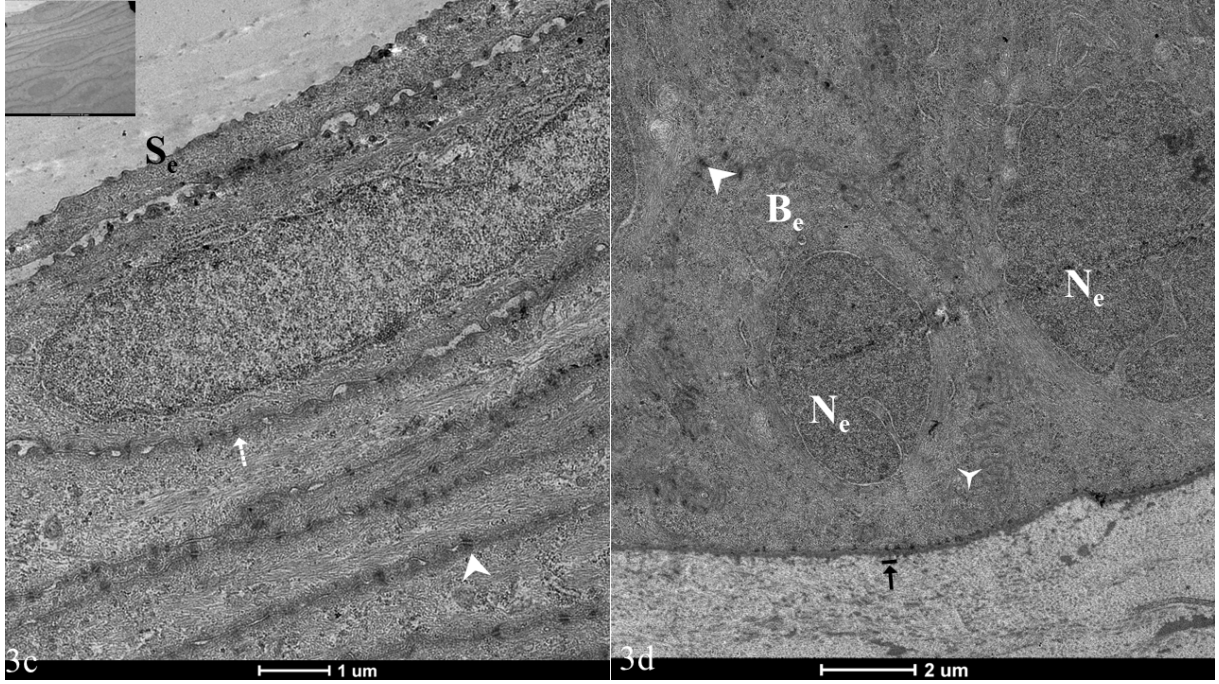


Şekil 4.7.2e-2f Topikal sodyum hiyalüronat grubu elektron mikroskopi kesitleri Elektron mikroskop mikrografında stromanın derin katmanında birbirine dik açılar ile yerleşim gösteren kollajen lif demetleri ($\Rightarrow$) arasında aktif sentez aşamasında olan fibroblast (Fb) görülüyor. Homojen görünümlü Descemet membran ve ökromatinden zengin kornea endotel çekirdeği, küçük normal izleniyor (Kurşun Sitrata& Uranil Asetat 2eX2900-2fX4800).

Topikal insülin grubunda yarı ince kesitte yüzey epiteli normal yapıda görüldü. Bu grupta diğer gruplardan farklı olarak ışık mikroskopta kollajen liflerdeki ondülasyon daha belirgindi. Bowman membranı üzerinde bazal hücreler ve yüzeye göç eden yassılaştıran hücreler normal ince yapısal özellikleri ile ayırt edildi. Bowman membranındaki gerginliğinin yer yer bozulduğu ve ondulalı bir görünüm sergilediği görüldü (Şekil 4.7.3a-3b). Elektron mikroskopta henüz yassılaştırmamış hücrelerin yüzeyden dökülmekte olduğu izlendi. Bowman membranı üzerinde oturan poligonal şekilli hücrelerin ökromatinden zengin çekirdekleri olduğu ve diğer hücrelerle arasında normal bağlantı birimlerine sahip oldukları görüldü (Şekil 4.7.3c-3d). Stromada ondulalı düzenlenim gösteren kollajen lifler bu grupta belirgindi. Aktif sentez aşamasında olan fibroblastlar görüldü. Descement membrana yakın alanda kollajen liflerin dağınık demetler halinde yerleşim gösterdiği izlendi. Kornea endotelinin bu grupta aktif ve sitoplazmada çok sayıda veziküller ile dolu olduğu izlendi. (Şekil 4.7.3e-3f).



Şekil 4.7.3a-3b Topikal İnsülin grubu ışık mikroskopi kesitleri Yüzey epiteli (➔), birlikte ondülasyon gösteren Bowman membranı (➔) üzerinde bölünmekte olan bazal epitel hücre (➔) izleniyor. Stromada düzgün düzenlenim hafif ondülasyon gösteren kollajen lif demetleri (➔) arasında ekstrasellüler matriks alanları (➤) görülüyor. Stromanın devamında homojen ve gergin yapısı ile izlenen Descement membranı (➔) ve kornea endoteli (⌘) görülüyor (Toluidin Mavisi 3aX1000- 3bX1000).

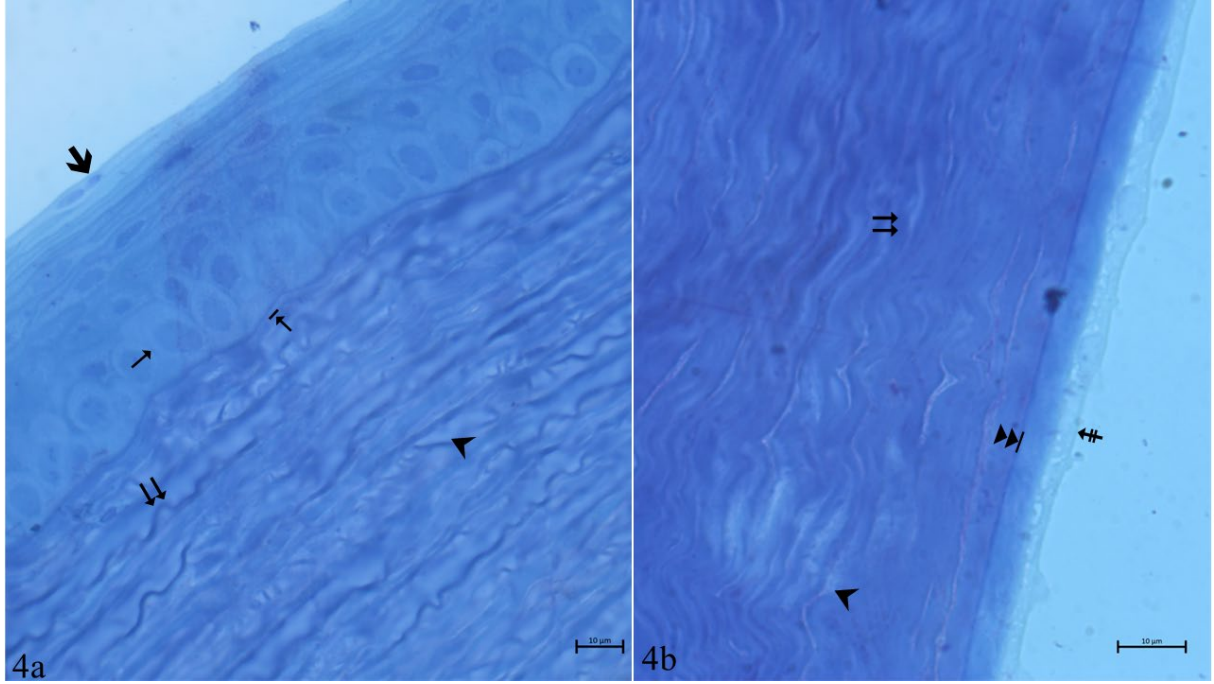


Şekil 4.7.3c-3d Topikal İnsülin grubu elektron mikroskopi kesitleri Elektron mikroskop incelemesinde yüzey epitelinden (Se) ayrılan hücreler katlarında desmozomların silindiği (↑) noktalar ve birbirine desmozomlarla (➤) bağlı normal kornea epitelini izleniyor. Bowman membranı (→) üzerinde oturan bazaldeki epitel hücreleri (Be) önkromatinden zengin indente çekirdekleri (Ne) ile ayırt ediliyor. Bu hücreler arasında desmozomlar (➤) ve interdijitasyonlar (⋈) görülüyor (Kurşun Sitrat & Uranil Asetat 3cX1900- 3dX4800).

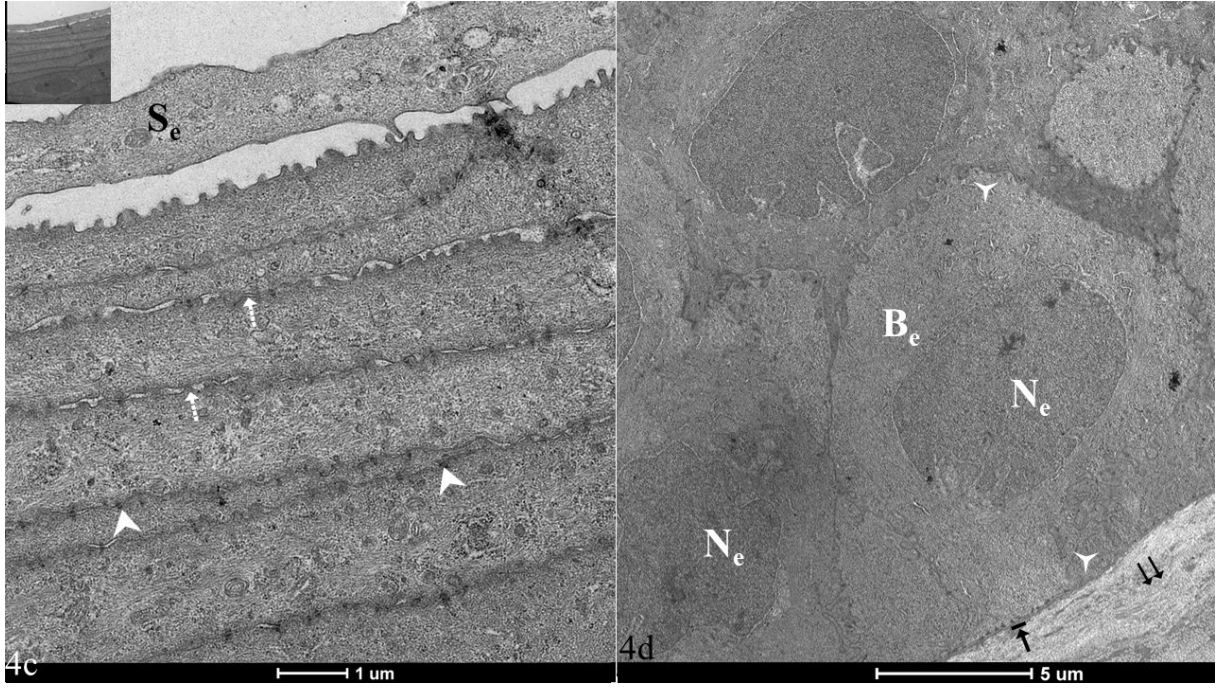


Şekil 4.7.3e-3f Topikal İnsülin grubu elektron mikroskop kesitleri Elektron mikroskop mikrografında stromada ondulalı düzenlenim gösteren kollajen lifler ($\Rightarrow$) ve aktif sentez aşamasında olan fibroblastlar (Fb) görülüyor. Stromanın Descemet membrana ($\gg$) komşu olan kollajen liflerin ($\Rightarrow$) dağınık demetler halinde yerleşim gösterdiği izleniyor. Kornea endoteli (End) ökromatinden zengin çekirdeği (N_{End}) ve aktif sitoplazmik bileşenleri ile ayırt ediliyor (Kurşun Sitrat& Uranil Asetat 3eX2900-3fX4800).

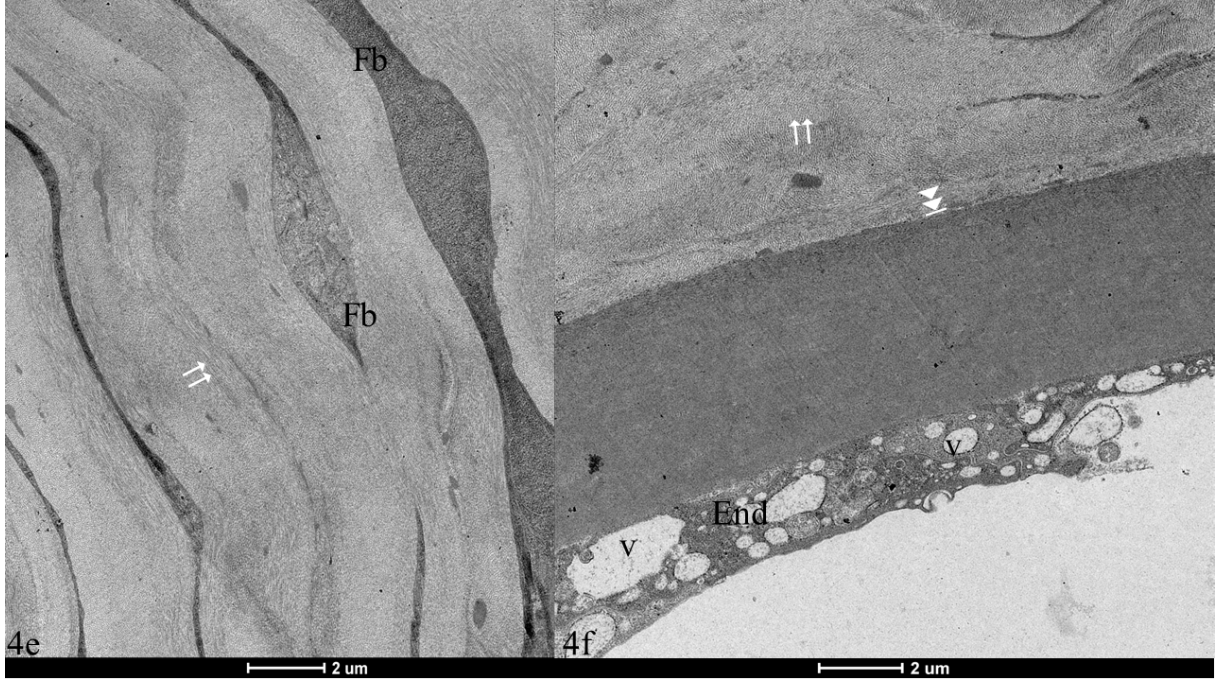
Tedavisiz izlenen epitel defekti grubunda ışık mikroskopta kornea yüzey epitelinin tüm katlarda normal düzenlenim gösterdiği görüldü. Gruplar arasında kollajen liflerdeki en belirgin ondülasyon bu grupta izlendi. Homojen görünümü ile Descemet membranı ve vakuoler sitoplazmalı kornea endoteli ışık mikroskobik düzeyde ayırt edildi. (Şekil 4.7.4a- 4b). Elektron mikroskobik değerlendirmede diğer gruplardan farklı olarak yüzey epitelinde birkaç hücre katı arasında desmozomların silindiği epitelin dökülmekte olduğu görüldü. Bazal epitel hücreler interdijitasyonlar ve hemidesmozomları ile normal yapıdaydı. Bowman membranı altındaki kollajen lif demetlerinin daha düzensiz yerleşim gösterdiği izlendi (Şekil 4.7.4c- 4d). Stromanın derinlerinde kollajen liflerin daha düzgün demetler oluşturdu ayırt edildi. Descemet membranının diğer gruplarda olduğu gibi homojen görünümünü koruduğu izlendi. Bu grupta kornea endotelinin yer yer bütünlüğünü yitirdiği ve vakuoler sitoplazmaya sahip olduğu görüldü (Şekil 4.7.4e-4f).



Şekil 4.7.4a-4b Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu ışık mikroskopi kesitleri Yüzey epiteli (➔), birlikte hafif ondülasyon gösteren Bowman membranı (→) üzerinde bazal epitel hücreler (→) izleniyor. Stromada belirgin ondülasyon gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ekstrasellüler matriks alanları (➤) görülüyor. Descement membranı (⇔) homojen olarak ayırt edilirken ve vakuoler ile dolu kornea endoteli (⌘) görülüyor (Toluidin Mavisi 4aX1000- 4bX1000).



Şekil 4.7.4c-4d Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu elektron mikroskopi kesitleri
Elektron mikroskop incelemesinde yüzey epitelinden (Se) ayrılan hücreler katı altında birkaç hücre katının yüzeyden dökülmeye hazırlandığı ve desmozomların silindiği (↑) görülüyor. Bu epitel katlarının altında desmozomlar (➤) ile birbirine tutunan normal kornea epiteli ayırt ediliyor. Bazaldeki epitel hücreler (Be) ökromatik çekirdekleri (Nb) ve aralarındaki belirgin interdiğitasyonları (↗) ile izleniyor. Bowman membranı (↘) altındaki kollajen lif demetlerinin (↔) daha düzensiz yerleşim gösterdiği görülüyor (Kurşun Sitrat& Uranil Asetat 4cX1900-4dX4800).

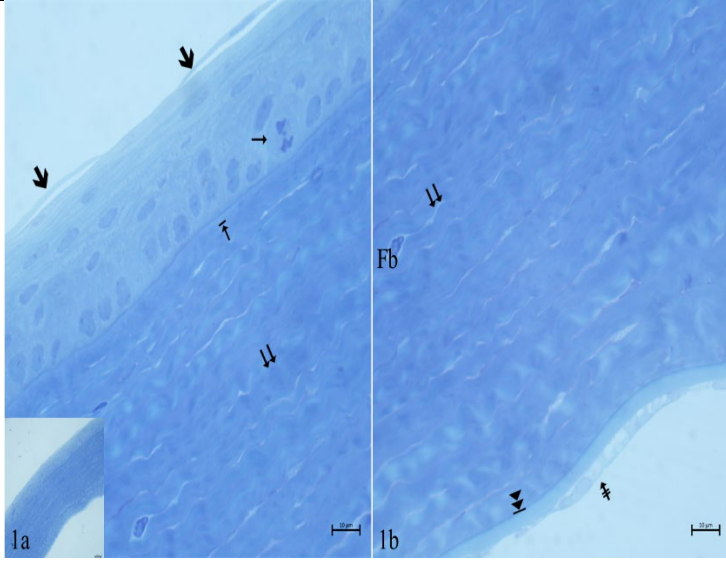


Şekil 4.7.4e-4f Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu elektron mikroskopi kesitleri
Elektron mikroskop mikrografında stromada ondulalı düzenlenim gösteren kollajen lifler (⇔) ve aktif sentez aşamasında olan fibroblastlar (Fb) görülüyor. Stromanın Descemet membrana (⇨) komşu olan alanında kollajen liflerin (⇔) daha düzenli konumlandığı ayırt ediliyor. Kornea endoteli (End) irili ufaklı oluşan vakuoler (v) sitoplazması ile izleniyor (Kurşun Sitrata& Uranil Asetat 4eX2900-4fX4800).

Sonuç olarak kornea hasarı sonrasında iyileştirici etkisi denenilen gruplar karşılaştırıldığında; ince yapı düzeyinde topikal insülin grubunun yüzey epitelinin yeniden yapılanma/yenilenme sürecinin daha aktif olduğu görülmüştür. Bu süreci izleyen ikinci grup topikal sodyum hiyalüronat olarak belirlenmiştir. Yüzey epitelindeki en az yapılanma/yenilenme süreci tedavisiz izlenen epitel defekti grubunda izlenmiştir.

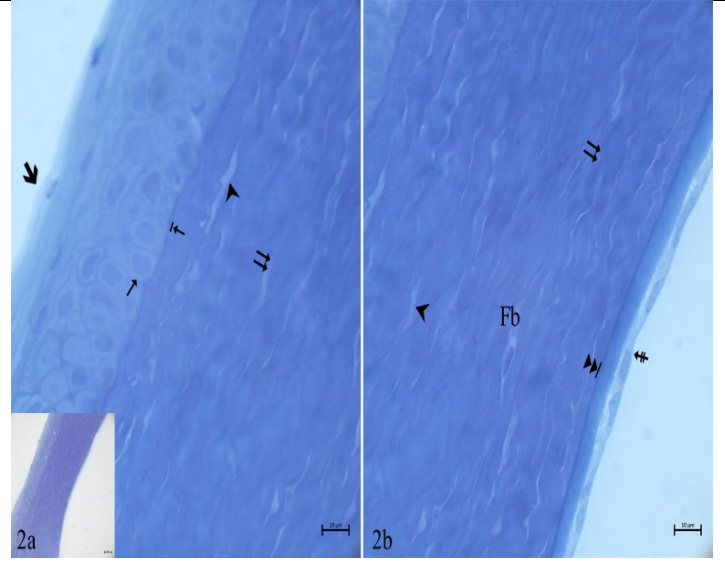
Stroma açısından yapılan değerlendirmede topikal insülin grubunda kollajen liflerinde artmış ondülasyona ek olarak aktif sentez aşamasındaki fibroblastların daha sık görülmesi stromal yeniden yapım/düzenlenim sürecinin diğer gruplara göre daha aktif olduğunu göstermektedir. Topikal sodyum hiyalüronat grubunda ise kollajen lifler arasında kontrol grubuna göre artmış hücreler arası madde (ekstraselüler matrix) izlenmesi yine yapım/yenilenme sürecinin aktif olduğunu göstermiştir.

Bowman membranı üzerinde yerleşmiş poligonal şekilli hücrelerde zengin ökromatin görünümü ve korunmuş hücreler arası bağlantılar kontrol grubu ve topikal insülin grubunda birbirine yakın izlenmiştir. Bu durum topikal insülin grubunun epitel yenilenme sürecini doğal seyrine uyumlu etkilediğini düşündürmektedir.



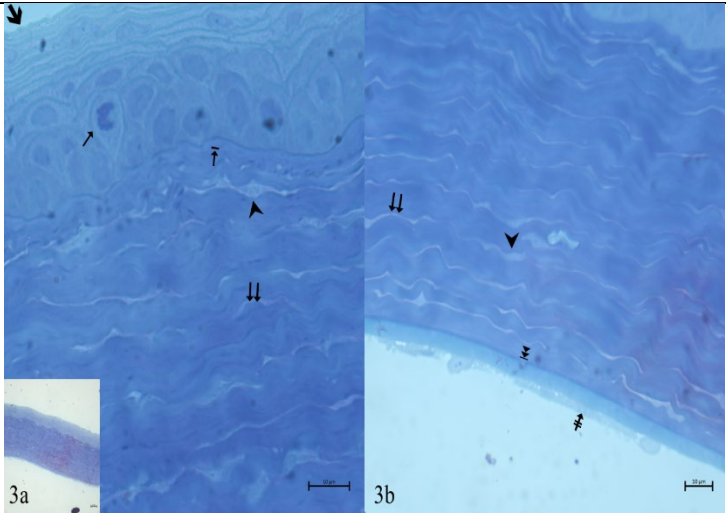
Kontrol grubu ışık mikroskopi kesitleri

Yüzey epitelinden dökülmekte olan hücreler➔, ile birlikte Bowman membranı (↔) üzerinde bölünmekte olan bazal epitel hücre (→) izleniyor. Stromada düzgün düzenlenim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ökromatik çekirdeği ile fibroblast (Fb)görüldüyor. Stromanın devamında homojen ve gergin yapısı ile izlenen Descement membranı (⏏) ve kornea endoteli (⊕) görüldüyor



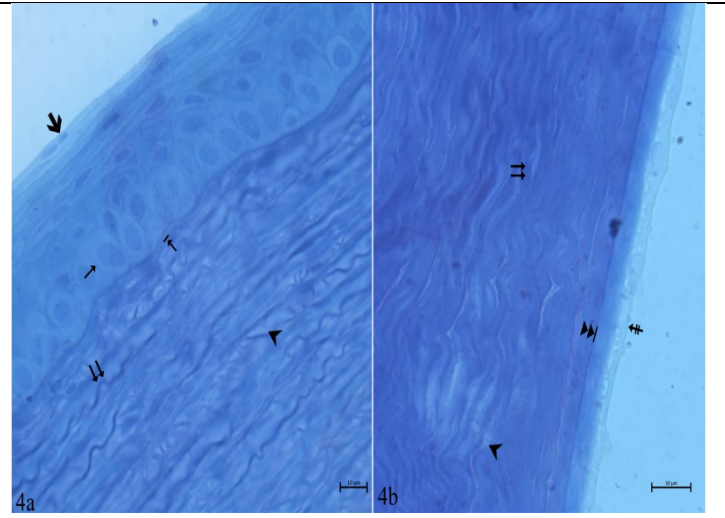
Topikal sodyum hiyalüronat grubu ışık mikroskopi kesitleri

Yüzey epiteli (➔) ile birlikte Bowman membranı (↔) üzerinde bazal epitel hücre (→) izleniyor. Stromada düzgün düzenlenim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ökromatik çekirdeği ile fibroblast (Fb)görüldüyor. Stromanın devamında homojen ve gergin yapısı ile izlenen Descement membranı (⏏) ve kornea endoteli (⊕) görüldüyor



Topikal İnsülin grubu ışık mikroskopi kesitleri

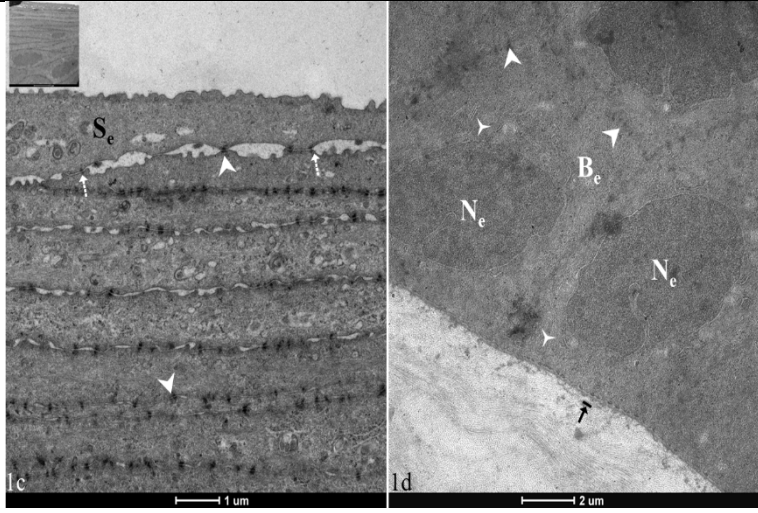
Yüzey epiteli (➔), birlikte ondülasyon gösteren Bowman membranı (↔) üzerinde bölünmekte olan bazal epitel hücre (→) izleniyor. Stromada düzgün düzenlenim hafif ondülasyon gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ekstrasellüler matriks alanları (➤) görüldüyor. Stromanın devamında homojen ve gergin yapısı ile izlenen Descement membranı (⏏) ve kornea endoteli (⊕) görüldüyor



Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu ışık mikroskopi kesitleri

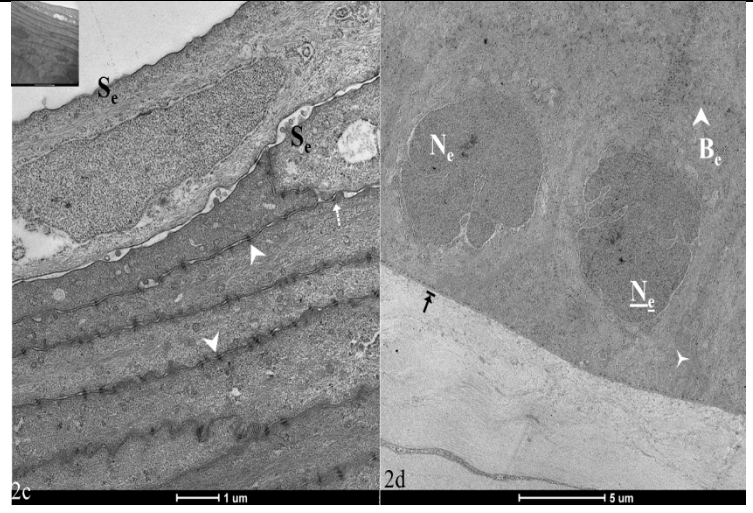
Yüzey epiteli (➔), birlikte hafif ondülasyon gösteren Bowman membranı (↔) üzerinde bazal epitel hücreler (→) izleniyor. Stromada belirgin ondülasyon gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında ekstrasellüler matriks alanları (➤) görüldüyor. Descement membranı (⏏) homojen olarak ayırt edilirken ve vakuoler ile dolu kornea endoteli (⊕) görüldüyor

Tablo 4.4 Grupların Işık Mikroskopisi Görüntüleri



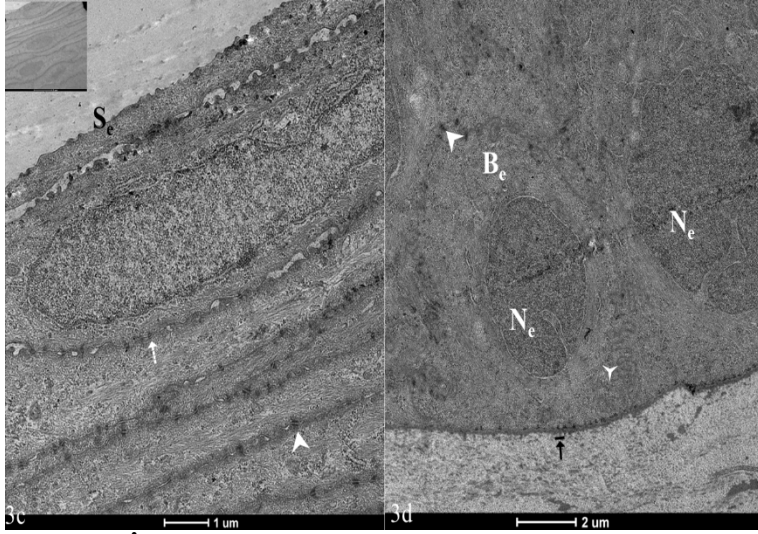
Kontrol grubu elektron mikroskopi kesitleri

Elektron mikroskop mikrografında kornea epitelinin birbirine desmozomlar (➤) bağlı olduğu alanlar ve yüzey epitelinden ayrılmakta olan hücrede (Se), desmozomların silindiği (†) noktalar izleniyor. Bowman membranı (↔) üzerinde oturan bazal hücreler (Be) ökromatinden zengin indente çekirdekleri (Ne) ile ayırt ediliyor. Bu hücreler arasında desmozomlar (➤) ve interdijitasyonlar (⋈) görülüyor



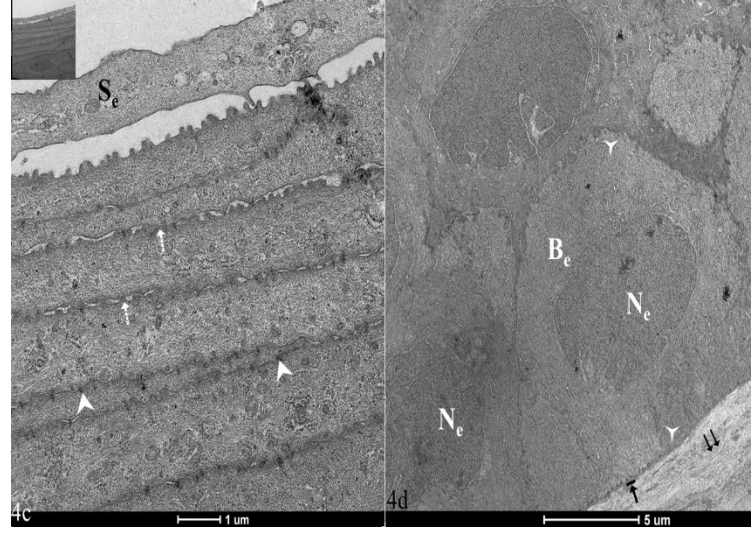
Topikal sodyum hiyalüronat grubu elektron mikroskopi kesitleri

Elektron mikroskop incelemesinde yüzey epitelinden (Se) ayrılmaya hazırlanan hücrelerde desmozomların silindiği noktalar (†) ile birlikte birbirine desmozomlarla (➤) bağlı normal kornea epitelini izleniyor. Bowman membranı (↔) üzerinde oturan bazaldeki epitel hücreleri (Be) ökromatinden zengin indente çekirdekleri (Ne) ile ayırt ediliyor. Bu hücreler arasında desmozomlar (➤) ve interdijitasyonlar (⋈) görülüyor



Topikal İnsülin grubu elektron mikroskopi kesitleri

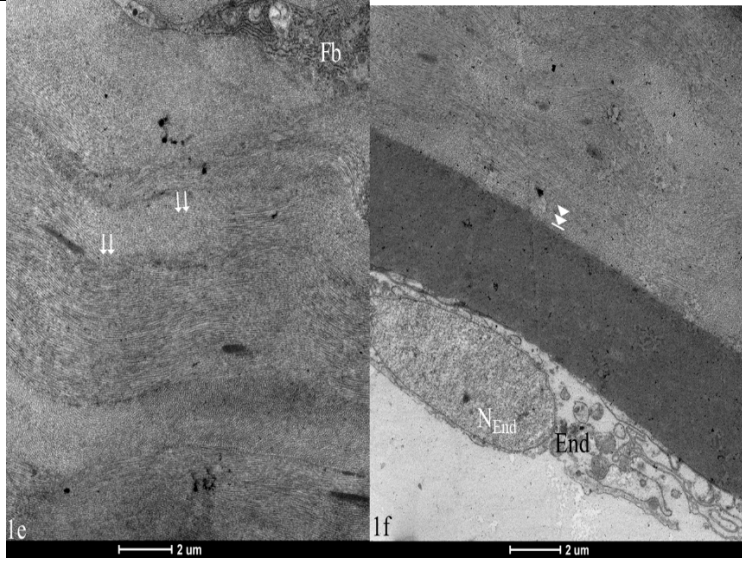
Elektron mikroskop incelemesinde yüzey epitelinden (Se) ayrılan hücreler katlarında desmozomların silindiği (†) noktalar ve birbirine desmozomlarla (➤) bağlı normal kornea epitelini izleniyor. Bowman membranı (↔) üzerinde oturan bazaldeki epitel hücreleri (Be) ökromatinden zengin indente çekirdekleri (Ne) ile ayırt ediliyor. Bu hücreler arasında desmozomlar (➤) ve interdijitasyonlar (⋈) görülüyor



Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu elektron mikroskopi kesitleri

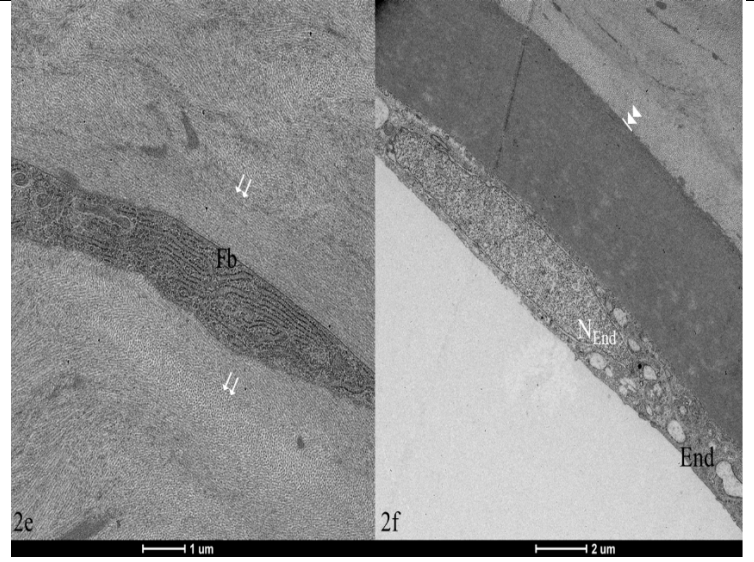
Elektron mikroskop incelemesinde yüzey epitelinden (Se) ayrılan hücreler katı altında birkaç hücre katının yüzeyden dökülmeye hazırlandığı ve desmozomların silindiği (†) görülüyor. Bu epitel katlarının altında desmozomlar (➤) ile birbirine tutunan normal kornea epitelini ayırt ediliyor. Bazaldeki epitel hücreleri (Be) ökromatik çekirdekleri (Nb) ve aralarındaki belirgin interdijitasyonları (⋈) ile izleniyor. Bowman membranı (↔) altındaki kollajen lif demetlerinin (⇔) daha düzensiz yerleşim gösterdiği görülüyor

Tablo 4.5 Grupların Elektron Mikroskopisi Görüntüleri



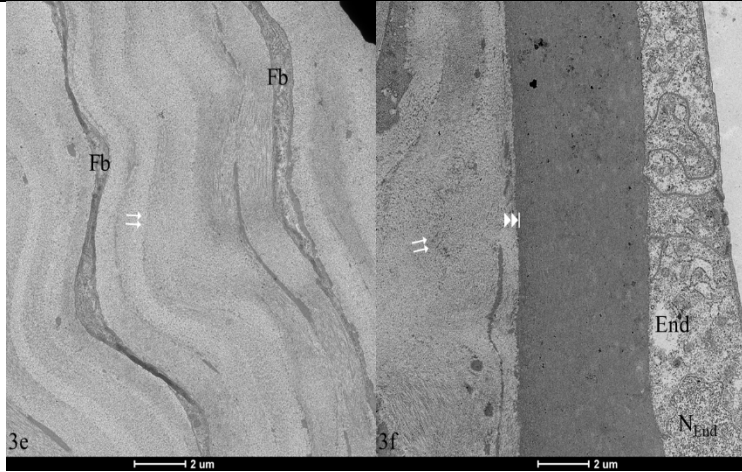
Kontrol grubu elektron mikroskopi kesitleri

Elektron mikroskop mikrografında stromanın derin katmanında birbirine dik açılar ile yerleşim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında aktif sentez aşamasında olan fibroblast (Fb) görülüyor. Descement membran ve kornea endoteli izleniyor.



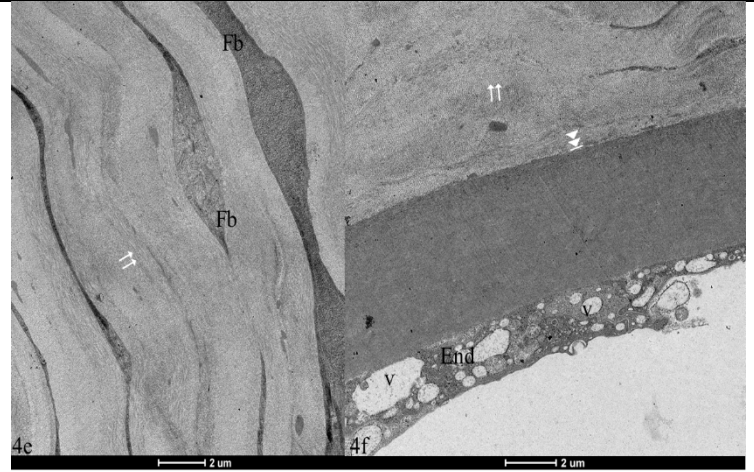
Topikal sodyum hiyalüronat grubu elektron mikroskopi kesitleri

Elektron mikroskop mikrografında stromanın derin katmanında birbirine dik açılar ile yerleşim gösteren kollajen lif demetleri (⇔) arasında aktif sentez aşamasında olan fibroblast (Fb) görülüyor. Homojen görünümlü Descement membran ve ökromatinden zengin kornea endotel çekirdeği, küçük normal izleniyor.



Topikal İnsülin grubu elektron mikroskopi kesitleri

Elektron mikroskop mikrografında stromada ondulalı düzenlenim gösteren kollajen lifler (⇔) ve aktif sentez aşamasında olan fibroblastlar (Fb) görülüyor. Stromanın Descement membrana (⇔) komşu olan kollajen liflerin (⇔) dağınık demetler halinde yerleşim gösterdiği izleniyor. Kornea endoteli (End) ökromatinden zengin çekirdeği (Nend) ve aktif sitoplazmik bileşenleri ile ayırt ediliyor



Tedavisiz izlenen epitel defekti grubu elektron mikroskopi kesitleri

Elektron mikroskop mikrografında stromada ondulalı düzenlenim gösteren kollajen lifler (⇔) ve aktif sentez aşamasında olan fibroblastlar (Fb) görülüyor. Stromanın Descement membrana (⇔) komşu olan alanında kollajen liflerin (⇔) daha düzenli konumlandığı ayırt ediliyor. Kornea endoteli (End) irili ufaklı oluşan vakuoler (v) sitoplazması ile izleniyor.

Tablo 4.6 Grupların Elektron Mikroskopisi Görüntüleri

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kornea epitel defekti iyileşmesinde topikal insülin tedavisi tedavisiz izlenen gruba göre defekti daha hızlı iyileştirmiştir. Biyomikroskopik olarak bu sürede sodyum hiyalüronat tedavisi ile arasında anlamlı bir farkı izlenmede de; histopatolojik incelenmede ince yapı düzeyinde topikal insülin grubunun korneal epitel yeniden yapılanma sürecini sodyum hiyalüronata göre daha fazla hızlandırdığı izlenmiştir.

İnsülinin yara iyileşmesindeki faydalı özellikleri tanınsa da, temel hücresel ve sinyal mekanizmaları henüz belirlenmemiştir. İnsülin, reseptörüne bağlandığında çeşitli hücresel tepkimeler tetiklenir; reseptörün otofosforilasyonu ve başlıca insülin reseptör substratı olan IRS-1 protein fosforilasyonu gerçekleştikten sonra sırasıyla sonraki SH2 ve SH3 alanı (Src onkoproteinindeki Homoloji 2 ve 3 protein alanları) içeren sinyal moleküllerini tanır[129] İnsan epidermal keratinositlerinde, insülin reseptörlerini ifade eden normal hücrelerde, insülinin motojenik bir aktiviteye sahip olabileceği belirtilmiştir.[130, 131]

Benoliel ve ark. çalışmasında, insülinin normal insan epidermal keratinositlerin haptotaktik göçünü doza bağlı bir şekilde etkilediğini ve bunu Nükleer faktör κ B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünün aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiğini göstermiştir. NF- κ B inflamatuvar ve bağışıklık sistem gen aktivasyonunda yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu migrasyonun, insüline maruz kalmamış kontrol hücrelerine kıyasla neredeyse 2 kat daha fazla olduğu izlenmiştir.[132] Aynı çalışmada bu etkinin keratinosit göçünü dört-beş kat daha fazla stimüle eden IGF-1, KHF, transforme edici büyüme faktörü alfa'da daha az olduğu; ama EGF'nin etkisiyle istatistiksel olarak aynı olduğu izlenmiştir.[131, 133, 134] Hücrelerin üzerinde göç ettiği ESM'in, bu fenomenlerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.[135] Benoliel ve ark. ayrıca insülinle aktive olan göç için belirli bir integrin-ekstrasellüler matriks ligand kompleksinin gerekli olmadığını da göstermiştir.

İnsülin reseptörünün alfa ve beta alt birimleri, immunohistokimya yöntemiyle insan gözlerinde gösterilmiştir. Rocha ve ark. insülin reseptörlerinin korneal epitel hücrelerinin sitoplazmalarında dominant olmak üzere tüm epitel katlarında eksprese olduğunu göstermiştir.[9] Normal gözlerde her iki insülin reseptör alt birimleri kornea, düz kas ve siliyer cisim epiteli ve lens kapsülünde en belirgin olarak bulunmuştur. Retinada ise, sinir lifi tabakasında, gangliyon hücrelerinde ve Müller hücrelerinde, dış nükleer tabakada, rod ve kon iç segmentlerinde, dış limitan membranda ve pigment epitelinde net bir şekilde boyandığı gözlemlenmiştir.[117]

İnsülin yara iyileşmesi üzerindeki ilk çalışmalar baskın olarak diyabetik sıçanlarda yapılmıştır. Zagon ve ark. diyabetik sıçanlara 1,2 ve 5 IU topikal insülin damla vererek korneal yara iyileşmesini incelemiştir. Diyabetik sıçanlarda topikal insülin başlanan sıçanlarda iyileşmesinin daha hızlı olduğu izlenmiştir. Bu çalışmada insülin damlatılan sağlıklı ve diyabetik sıçan korneaların kalınlıkları, sıçanların göz içi basıncı ve oküler yüzey morfolojik değişikliklerine bakılmış ve insüline ait herhangi bir toksik etki izlenmemiştir. Önemli olarak bu çalışmada, sağlıklı sıçanlarda yara iyileşmesinde topikal insülinin herhangi bir etkisi görülmemiştir.

Diyabetik hayvanlarda ise topikal insülin tedavisinin bazal epitelyel hücrelerde azalmış DNA sentezini düzelttiği gösterilmiştir.[136] Bizim çalışmamızda ise topikal insülin her ne kadar sodyum hiyalüronat ile karşılaştırıldığında daha iyi bir iyileştirme etkisi göstermemiş olsa da tedavisiz bırakılan kornealara göre iyileşmeyi hızlandırdığı bulunmuştur.

Diyabetik sıçanlarda günlük 0,1 IU topikal insülin damlanın dört hafta kullanım sonunda sistemik glisemik kontrolden bağımsız olarak subbazal sinir plexus kaybını önlediği izlenmiştir.[137] Yang ve ark. topikal insülinin katenin sinyal yolağı üzerindeki etkilerini diyabetik sıçanlar üzerinde araştırmıştır. 3 mikrolitre topikal insülin korneal debridmandan bir hafta önce ve bir hafta sonra olmak üzere günde dört kez damlatılmış ve sonuçta beta-katenin yolağı üzerinde hücre proliferasyonunun arttığı izlenmiştir.[138]

Klinik çalışmalar ise gene ilk önce diyabetes mellitus tip 2 hastalarında gerçekleştirilmiştir. Örneğin günde dört kez 1 IU/damla topikal insülinin etkisi diyabetik kuru göz hastalarında suni gözyaşı ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Hastalar bazal, ikinci hafta ve dördüncü haftada değerlendirilmiştir. Bu çalışmada suni gözyaşı ile topikal insülin arasında bir fark bulunmadığı gibi; topikal insülin hastalarında gözyaşı kırılma zamanının bazale göre azaldığı gösterilmiştir.[139]

Fai ve ark., günde dört kez 0,5 IU, 1 ve 2 IU/damla topikal insülin etkisini vitreoretinal cerrahi geçirmiş diyabetik hastalarda prospektif olarak plasebo ile karşılaştırarak değerlendirmiştir. Bu çalışmada ilginç bir şekilde, 0,5 IU insülinin daha yüksek dozlarla karşılaştırıldığında diyabetik hastalarda korneal epitel defekti kapanmasında yetmiş-iki saatte iyileşmeyle diğerlerinden daha etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca topikal insülinin insan gözü kullanımında güvenli olduğu gösterilmiştir.[140]

Bastion ve Ling retrospektif olarak vitreoretinal cerrahi sırasında korneal debridman uygulanan hastalara on ay süreli takip ile topikal insülin tedavisi sonuçlarını değerlendirmiştir. Bu çalışmada üç grup oluşturmuşlardır; günde dört kez 1 IU/damla topikal insülin uygulanan diyabetik hasta, standart topikal antibiyotik ve steroid tedavisi verilen diyabetik hasta ve standart topikal antibiyotik ve steroid tedavisi verilen non-diyabetik hasta grupları. Bu gruplar karşılaştırıldığında topikal insülin uygulanan hastalarda iyileşmesinin daha hızlı olduğu izlenmiştir.[141] Bu doz bizim çalışmamızda uyguladığımız doz ile uyusmaktadır. Her ne kadar bizim çalışmamızda biyomikroskopik olarak fark izlenmemiş olsa da; histopatolojik incelemede insülinin sodyum hiyalüronat'a nazaran iyileşmede daha etkili çıkmış olması bu sonucu desteklemektedir.

Quiroz-Mendoza ve ark. vitreoretinal cerrahi geçiren diyabet hastalarında korneal debridman tedavisinde topikal insülin ve sodyum hiyalüronat karşılaştırmasını prospektif kontrollü çalışma olarak gerçekleştirmiştir. 0,5 insülin IU/damla ve %0,15 topikal sodyum hiyalüronat damla ve ikisi kombine olacak şekilde günde dört kez hasta gruplarına randomize olarak verilmiştir. Bu çalışmada hem insülin grubu hem de kombine damla grubunda; tek başına sodyum hiyalüronat grubuyla karşılaştırılınca epitel iyileşmesinin daha hızlı olduğu görülmüştür. Tek başına insülin ile kombine grup arasında ise fark izlenmemiştir.[142] Bu sonuç çalışmamızın histopatolojik inceleme sonucunda bulunan insülinin sodyum hiyalüronat'a olan üstün onarıcı etkinliğiyle uyusmaktadır.

Başka bir diyabetik hasta grubu çalışmasında; vitreoretinal cerrahi sırasında korneal debridman oluşturulmuş ve bu epitel defekti günde 4 kez 0,5 IU topikal insülin veya günde 4 kez %0,18 sodyum hiyalüronat ile tedavi edilmiştir. Bu çalışmada, insülin grubu sodyum hiyalüronat grubuna göre daha hızlı iyileşmiştir.[143]

Tong ver ark. 55 yaşında kontrolsüz diyabeti olan bir hastada bilateral nörotrofik keratit için günde 3 kez 25 IU/mL topikal insülin damla kullanmış ve birinci haftada reepitelizasyon izlemiştir.[144] Bu çalışma da yüksek doz insülin kullanılmış olması dikkat çekmektedir. Bartlett ve ark insülin güvenilirliği açısından yaptıkları çalışmada normo-glisemik gönüllülerde 100 IU/ml'ye kadar olan dozlarda topikal insülinin toksik bir etkisinin olmadığını bulmuşlardır.[145]

Her ne kadar son yıllarda topikal insülin hastalarda kullanılmaya başlanmış olsa da; ticari olarak kullanılabilir bir topikal insülin formülasyonu bulunmamaktadır. Le Nguyen ve ark. bu nedenle ticari Humalog insülin Lispro çözeltisinin (100 IU/mL) polietilen ve propilen glikol içeren suni göz damlaları ile seyreltilerek 1 IU/mL konsantrasyonuna getirilmesiyle

hazırlanmış insülin damlasının fizikokimyasal ve mikrobiyolojik stabilitesini araştırmıştır. Bir grup damla açılmamış olarak 4°C'de 12 ay boyunca; diğer gruplar ise 4 °C ve 25 °C'de kullanım simülasyonu yapılarak otuz gün boyunca incelenmiştir. Fizikokimyasal stabilite için incelenen parametreler görsel kontrol, pH, bulanıklık, ultraviyole spektral emilim ve ozmolalite olarak ayrılmıştır. Sonuçlar, tüm test edilen parametrelerin olumlu olduğunu ve açılmamış göz damlalarının fizikokimyasal ve mikrobiyolojik olarak 4 °C'de on iki ay boyunca stabil olduğunu göstermiştir. Kullanım simülasyonu koşullarında, bu parametreler aynı zamanda 4 °C'de bir ay boyunca stabil kalmıştır. 25 °C'de depolandığında da, potansiyel sıcaklık artışlarının insülin konsantrasyonları üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı izlenmiştir. [146]

Diyabet dışı çalışmalar son yıllarda literatürde yoğunlukla yapılmaya başlanmıştır. Wang ve ark. nörotrofik korneal ülser olan, diyabeti olmayan altı hastaya (2-73 yaş) standart tedaviler, bandaj kontakt lens, amniyon zar örtülmesi ve tarsorafilere cevap alınamaması sonrası topikal insülin tedavisi başlamış ve 7-25 günde re-epitelizasyon izlemiştir.[12] Bu çalışmada topikal insülin 1 IU/ml olacak şekilde kullanılmıştır. Aynı dozla yapılan çalışmamızın histopatolojik sonuçları bu tedavi şemasını desteklemektedir.

Diaz-Valle ve ark. prospektif çalışmalarında persistan epitel defekti olan yirmi bir hastaya 1 IU/mL topikal insülin damlayı altı saatte bir olacak şekilde kullanmışlardır. Epitel defektlerinin nedenlerini enfeksiyöz keratit, kalsiyum keratopati, oküler cerrahi, lagofthalmi, büllöz keratopati ve herpetik keratit olarak kaydetmişlerdir. Hastalara topikal insülin damla, standart tedavilere cevap izlenmemesi sonra başlanılmış ve hastalar ortalama yedi gün takip edilmiştir. Hastalarda insülin tedavisine bağlı herhangi bir yan etki izlenmemiştir. Hastalara ortalama olarak epitel defekti tanısından yirmi gün sonra topikal insülin tedavisi başlanmıştır. Bütün hastalarda her hafta kontrolde istatistiksel olarak anlamlı küçülme izlenmiştir. On yedi hastada tam epitelizasyon sağlanmıştır, bu re-epitelizasyon sağlanma süresi ortalama 34,8±29,9 gün olarak bulunmuştur. Kalan hastaların %91,5'inde ise defekte küçülme izlenmiştir.[10]

Galvis ve ark. akustik nöroma rezeksiyonu sonrasında gelişen ekspoşur keratit hastası takip etmişlerdir. Hastada iki hafta sonra enfektif keratit gelişmiş, korneal kazıntı alınmış ve takibinde persistan epitel defekti gelişmiştir. Medikal tedaviye cevap vermeyen defekt için günde dört kez 1 IU/mL topikal insülin tedavisi adjuvan olarak başlanmıştır. İnsülin başlanması iki hafta sonra defekt tamamen kapanmıştır.[11] Bu sonuçlar da çalışmamızla örtüşmektedir. Bizim çalışmamızda biyomikroskopik olarak sodyum hiyalüronat ile fark bulunmasa da histopatolojik olarak kollajen dokunun daha hızlı modifiye olmuş olması uzun süreli kullanımda epitel defektinin küçülmeye başlamış olmasını açıklayabilmektedir.

Esmail ve ark. rekürren epitel erozyonu olan hastalarda prospektif çalışma yapmıştır. Bu çalışmada hastalar iki gruba ayrılmıştır; standart tedavi grubu ve standart tedaviye ek olarak günde dört kez topikal insülin damla kullanan hasta grubu. Hastalar 1., 2., 3 ve 4. haftalar ile 2. ayda muayene edilmiştir. İkinci haftadan itibaren topikal insülin alan grupta diğer gruba nazaran istatistiksel olarak anlamlı daha hızlı iyileşme izlenmiştir. Aynı zamanda topikal insülin grubunda rekürrens istatistiksel olarak daha az izlenmiştir. [147] Rekürrensin daha az izlenmiş olması, bizim çalışmamızda izlenmiş olan insülinin kollajen iskelet üzerindeki etkisi nedeniyle kaynaklanmış olabilir.

Khilji ve ark., herpetik nörotrofik keratit ile takip edilen altmış dört yaş erkek bir hastada oral ve topikal asiklovir'e ek olarak 1 IU/ml / günde 6 kez topikal insülin tedavisi başlamıştır. Hastada birinci ayda tam iyileşme izlenmiştir.[148] Moreker ve ark. elli beş yaşında, lagofaltni nedeniyle standart medikal tedavi almış ve tarsorafi olmuş bir hastada düzelmeyen epitel defekti için günde dört kez 1 IU/ml topikal insülin tedavisi vermiş ve defektte on ikinci günde iyileşme izlemiştir. [149]

Babal ve ark. iyileşmeyen persistan epitel defektleri için prospektif çalışma gerçekleştirmişlerdir. Otolog serum dahil konvansiyonel tedaviye cevap vermeyen on bir gözde günde dört kez topikal insülin tedavisi başlanmış; ve dokuz gözde 62.3 + 34.6 günde tam iyileşme izlenmiştir. Bir hastanın defektinde iyileşme görülürken, bir hastada insülinin bir etkisi izlenmemiştir.[150]

Serrano-Gimenez ve ark., araç aküsüyle yanmış ve dört yıllık standart tedaviye cevap vermeyen bir korneal ülser hastasında topikal 50 IU/mL insülin tedavisi başlamışlar ve tam iyileşme elde etmişlerdir.[151] Gene bu hastada yüksek doz insülin başlanmış olması dikkati çekmektedir. Her ne kadar daha önceki çalışmalarda yüksek doz insülinin düşük doz insüline göre üstünlüğü gösterilmemiş olsa da[140]; dört yıllık bir persistan epitel defektinin yüksek doz insüli ile tam kapanmış olması dikkat çekicidir.

Soares ve ark. evre iki ve üç nörotrofik keratopati hastalarında topikal insülin tedavisi denemişlerdir. Yirmi bir hastaya 1 IU/ml topikal insülin günde dört kez verilmiştir. Yedi ila kırk beş gün içinde hastaların yüzde doksanında tam iyileşme izlenmiştir. Evre iki keratopatiler, evre üç keratopatilerden daha hızlı reepitelize olmuştur (sırasıyla 18 ± 9 ve 29 ± 11 gün).[152]

Shanley ve ark. insan kornea epitel hücre kültüründe insülinin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. İnsülinin her ne kadar zayıf olsa da IGF-I reseptörlerine bağlanabiliyor olduğu göz önüne alınarak, Shanley ve ark bu çalışmada düşük doz ($5 \mu\text{g/mL}$ =

0.14 IU) insülin kullanmıştır. Bu çalışmada ilk olarak, insülinin hücre çoğalmasından bağımsız olarak defekt bölgesine hücre göçünü arttırdığını göstermiştir. İkinci olarak, insülinin Akt ve ERK1/2 aktivasyonunu uyardığı izlenmiştir. Üçüncü olarak da, defekt bölgesine olan bu göçün PI3-kinaz ve kısmen ERK sinyallenmesiyle olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışma hem insülinin hem de EGF'nin yara iyileşmesini hızlandırıyor olsa da tek başlarına ikisinin de tam iyileşme için yeterli olmadığını; ama kombine EGF-insülin tedavisinin additif etkiyle tam yara iyileşmesi sağladığını da göstermiştir. [119] Shanley ve ark. normalde insüline duyarlı dokularda, insülin, insülin reseptör substratı/PI3-kinaz yolları üzerinden sinyal verdiğini göz önüne olarak; bu yara iyileşmesi etkisinin PI3-kinaz'ın aktive edilmesi sonucu görülen aktin hücre iskeletinin modülasyonu yoluyla gerçekleşmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir.[119] Çalışmamızın histopatolojik sonucu Shanley ve ark. bu hipotezini doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda tek insülin dozu kullanılmış olması, kombine gruplar oluşturulmamış olması ve kısıtlı denek sayısı kısıtlayıcı faktörler arasındadır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda sıçanlarda kornea epitel defekti modelinde biyomikroskopik olarak topikal insülin ve sodyum hiyalüronat tedavi grupları tedavisiz iyileşen gruba göre daha hızlı epitel defekti kapanması göstermiştir. Ancak topikal insülin ve sodyum hiyalüronat gruplarında epitel defekti kapanma hızı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Ancak histopatolojik olarak kornea hasarı sonrasında iyileştirici etkisi denenen gruplar karşılaştırıldığında; ince yapı düzeyinde topikal insülin grubunun yüzey epitelinin yeniden yapılanma sürecinin topikal sodyum hiyalüronat grubuna göre daha aktif olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, topikal insülin tedavisinin kornea epiteli iyileşmesinde ve stromal yapılanmasında biyomikroskopik olarak fark izlenmemiş olsa da sodyum hiyalüronat'a göre histopatolojik olarak daha etkin olduğu gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD (2015) Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Progress in molecular biology and translational science* 134: 7-23 DOI 10.1016/bs.pmbts.2015.04.001
2. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R (1983) Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *The Journal of cell biology* 97: 1653-1657 DOI 10.1083/jcb.97.5.1653
3. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D (2004) Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *The British journal of ophthalmology* 88: 1467-1474 DOI 10.1136/bjo.2004.044347
4. Ljubimov AV, Saghizadeh M (2015) Progress in corneal wound healing. *Progress in retinal and eye research* 49: 17-45 DOI 10.1016/j.preteyeres.2015.07.002
5. Laurent TC, Fraser JR (1992) Hyaluronan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6: 2397-2404
6. Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G (2002) Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *The British journal of ophthalmology* 86: 181-184 DOI 10.1136/bjo.86.2.181
7. Lin T, Gong L (2015) Sodium hyaluronate eye drops treatment for superficial corneal abrasion caused by mechanical damage: a randomized clinical trial in the People's Republic of China. *Drug design, development and therapy* 9: 687-694 DOI 10.2147/dddt.S77270
8. Stuard WL, Titone R, Robertson DM (2020) The IGF/Insulin-IGFBP Axis in Corneal Development, Wound Healing, and Disease. *Frontiers in endocrinology* 11: 24 DOI 10.3389/fendo.2020.00024
9. Rocha EM, Cunha DA, Carneiro EM, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA (2002) Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Investigative ophthalmology & visual science* 43: 963-967
10. Diaz-Valle D, Burgos-Blasco B, Gegundez-Fernandez JA, Garcia-Caride S, Puebla-Garcia V, Peña-Urbina P, Benitez-Del-Castillo JM (2021) Topical insulin for

- refractory persistent corneal epithelial defects. *European journal of ophthalmology* 31: 2280-2286 DOI 10.1177/1120672120958307
11. Galvis V, Niño CA, Tello A, Grice JM, Gómez MA (2019) Topical insulin in neurotrophic keratopathy after resection of acoustic neuroma. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* 94: 100-104 DOI 10.1016/j.ofal.2018.06.003
 12. Wang AL, Weinlander E, Metcalf BM, Barney NP, Gamm DM, Nehls SM, Struck MC (2017) Use of Topical Insulin to Treat Refractory Neurotrophic Corneal Ulcers. *Cornea* 36: 1426-1428 DOI 10.1097/ico.0000000000001297
 13. Tomlinson A, Trees GR, Occhipinti JR (1991) Tear production and evaporation in the normal eye. *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)* 11: 44-47
 14. Fleiszig SM, McNamara NA, Evans DJ (2002) The tear film and defense against infection. *Advances in experimental medicine and biology* 506: 523-530 DOI 10.1007/978-1-4615-0717-8_74
 15. Nguyen DH, Beuerman RW, Toshida H (2002) The effects of sensory and parasympathetic denervation on the kinases and initiation factors controlling protein synthesis in the lacrimal gland. *Advances in experimental medicine and biology* 506: 65-70 DOI 10.1007/978-1-4615-0717-8_8
 16. Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR (1999) Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Investigative ophthalmology & visual science* 40: 1261-1265
 17. Brar SV (2023) *Fundamentals and Principles of Ophthalmology*. American Academy of Ophthalmology
 18. Gipson IK, Yankauckas M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Rinehart W (1992) Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. *Investigative ophthalmology & visual science* 33: 218-227
 19. DelMonte DW, Kim T (2011) Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of cataract and refractive surgery* 37: 588-598 DOI 10.1016/j.jcrs.2010.12.037
 20. Barishak YR (2001) *Embryology of the Eye and Its Adnexa*. S.Karger AG
 21. Farjo AA, McDermott ML, Soong HK (2009) *Corneal Anatomy, Physiology, and Wound Healing*.
 22. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE (1961) Cell turnover in the adult human eye. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 65: 695-698 DOI 10.1001/archopht.1961.01840020697016

23. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC (2007) Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell research* 17: 26-36 DOI 10.1038/sj.cr.7310137
24. Wilson SE (2020) Bowman's layer in the cornea- structure and function and regeneration. *Experimental eye research* 195: 108033 DOI 10.1016/j.exer.2020.108033
25. Maurice DM (1970) The transparency of the corneal stroma. *Vision research* 10: 107-108 DOI 10.1016/0042-6989(70)90068-4
26. Gipson I, Stepp M (2022) *Anatomy and Cell Biology of the Cornea, Superficial Limbus, and Conjunctiva*, pp. 3-30.
27. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavangh HD, Petroll WM, Piatigorsky J (1999) The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *Journal of cell science* 112 (Pt 5): 613-622 DOI 10.1242/jcs.112.5.613
28. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J (2013) Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 120: 1778-1785 DOI 10.1016/j.ophtha.2013.01.018
29. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ (1982) The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill : 1960) 100: 1942-1947 DOI 10.1001/archopht.1982.01030040922011
30. Murphy C, Alvarado J, Juster R (1984) Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Investigative ophthalmology & visual science* 25: 1402-1415
31. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH (1991) The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Current eye research* 10: 145-156 DOI 10.3109/02713689109001742
32. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF (1985) Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 92: 759-763 DOI 10.1016/s0161-6420(85)33973-8
33. Tuft SJ, Coster DJ (1990) The corneal endothelium. *Eye* 4: 389-424 DOI 10.1038/eye.1990.53
34. Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M (1990) Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Investigative ophthalmology & visual science* 31: 1542-1554
35. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO (1997) Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Investigative ophthalmology & visual science* 38: 779-782

36. Oliveira-Soto L, Efron N (2001) Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 20: 374-384 DOI 10.1097/00003226-200105000-00008
37. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (2010) *Cornea E-Book*. Elsevier Health Sciences
38. Snell RS, Lemp MA (1997) *Clinical Anatomy of the Eye*. Wiley
39. Levin LA, Nilsson SFE, Hoeve JV, Wu S, Kaufman PL, Alm A (2011) *Adler's Physiology of the Eye E-Book: Expert Consult - Online and Print*. Elsevier Health Sciences
40. Di Girolamo N, Bobba S, Raviraj V, Delic NC, Slapetova I, Nicovich PR, Halliday GM, Wakefield D, Whan R, Lyons JG (2015) Tracing the Fate of Limbal Epithelial Progenitor Cells in the Murine Cornea33: 157-169 DOI <https://doi.org/10.1002/stem.1769>
41. Liu CY, Kao WW (2015) Corneal Epithelial Wound Healing. *Progress in molecular biology and translational science* 134: 61-71 DOI 10.1016/bs.pmbts.2015.05.002
42. Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG (1976) Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Investigative ophthalmology* 15: 4-14
43. Crosson CE, Klyce SD, Beuerman RW (1986) Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Investigative ophthalmology & visual science* 27: 464-473
44. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF (1985) A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Investigative ophthalmology & visual science* 26: 897-900
45. Zieske JD, Bukusoglu G, Gipson IK (1989) Enhancement of vinculin synthesis by migrating stratified squamous epithelium. *The Journal of cell biology* 109: 571-576 DOI 10.1083/jcb.109.2.571
46. Beuerman RW, Thompson HW (1992) Molecular and cellular responses of the corneal epithelium to wound healing. *Acta ophthalmologica Supplement*: 7-12 DOI 10.1111/j.1755-3768.1992.tb02161.x
47. Arey LB, Covode WM (1943) The method of repair in epithelial wounds of the cornea86: 75-86 DOI <https://doi.org/10.1002/ar.1090860106>
48. Wiley L, SundarRaj N, Sun TT, Thoft RA (1991) Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Investigative ophthalmology & visual science* 32: 594-602
49. Sotozono C, He J, Matsumoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S (1997) Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Current eye research* 16: 670-676 DOI 10.1076/ceyr.16.7.670.5057

50. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T (1992) Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *Journal of cellular physiology* 153: 1-5 DOI 10.1002/jcp.1041530102
51. Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC (1993) Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Experimental eye research* 57: 293-300 DOI 10.1006/exer.1993.1127
52. Girard MT, Matsubara M, Fini ME (1991) Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 32: 2441-2454
53. Lu L, Reinach PS, Kao WW (2001) Corneal epithelial wound healing. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) 226: 653-664 DOI 10.1177/153537020222600711
54. Lu L, Wang L, Li T, Wang J (2010) NF-kappaB subtypes regulate CCCTC binding factor affecting corneal epithelial cell fate. *The Journal of biological chemistry* 285: 9373-9382 DOI 10.1074/jbc.M109.094425
55. Lyu J, Lee KS, Joo CK (2006) Transactivation of EGFR mediates insulin-stimulated ERK1/2 activation and enhanced cell migration in human corneal epithelial cells. *Molecular vision* 12: 1403-1410
56. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S (2001) The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. *Experimental eye research* 72: 511-517 DOI 10.1006/exer.2000.0979
57. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research* 284: 31-53 DOI 10.1016/s0014-4827(02)00098-8
58. Maldonado BA, Furcht LT (1995) Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. *Investigative ophthalmology & visual science* 36: 2120-2126
59. Li T, Lu L (2005) Epidermal growth factor-induced proliferation requires down-regulation of Pax6 in corneal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 280: 12988-12995 DOI 10.1074/jbc.M412458200

60. Taniguchi E, Nagae Y, Watanabe H, Ohashi Y, Kinoshita S, Manabe R (1991) [The effect of recombinant epidermal growth factor in corneal angiogenesis]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 95: 52-58
61. Nezu E, Ohashi Y, Kinoshita S, Manabe R (1992) Recombinant human epidermal growth factor and corneal neovascularization. *Japanese journal of ophthalmology* 36: 401-406
62. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S (2000) Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in retinal and eye research* 19: 113-129 DOI 10.1016/s1350-9462(99)00007-5
63. Heldin CH (2013) Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell communication and signaling : CCS* 11: 97 DOI 10.1186/1478-811x-11-97
64. Roberts AB (2002) The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 13: 3-5 DOI 10.1016/s1359-6101(01)00027-2
65. Denk PO, Knorr M (1997) The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 235: 530-534 DOI 10.1007/bf00947012
66. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio R, Jr., Hong J, Lee J (2001) The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Progress in retinal and eye research* 20: 625-637 DOI 10.1016/s1350-9462(01)00008-8
67. Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, Trinkaus-Randall V (2002) TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Molecular pathology : MP* 55: 164-176 DOI 10.1136/mp.55.3.164
68. Welge-Lüssen U, May CA, Neubauer AS, Priglinger S (2001) Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Current opinion in ophthalmology* 12: 94-99 DOI 10.1097/00055735-200104000-00003
69. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER (1996) Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *The Journal of biological chemistry* 271: 29822-29829 DOI 10.1074/jbc.271.47.29822

70. Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, Ljubimov AV, Kenney MC (2001) Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Experimental eye research* 73: 179-189 DOI 10.1006/exer.2001.1028
71. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA (1989) Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 802-806 DOI 10.1073/pnas.86.3.802
72. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG (1993) Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 34: 2544-2561
73. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J (1994) Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Experimental eye research* 59: 385-391 DOI 10.1006/exer.1994.1122
74. Pollak M (2008) Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews Cancer* 8: 915-928 DOI 10.1038/nrc2536
75. Smith TJ (2010) Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? *Pharmacological reviews* 62: 199-236 DOI 10.1124/pr.109.002469
76. Trosan P, Svobodova E, Chudickova M, Krulova M, Zajicova A, Holan V (2012) The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process. *Stem cells and development* 21: 3341-3350 DOI 10.1089/scd.2012.0180
77. Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T (1997) Combined effects of substance P and insulin-like growth factor-1 on corneal epithelial wound closure of rabbit in vivo. *Current eye research* 16: 275-278 DOI 10.1076/ceyr.16.3.275.15409
78. Lee HK, Lee JH, Kim M, Kariya Y, Miyazaki K, Kim EK (2006) Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 873-882 DOI 10.1167/iovs.05-0826
79. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science (New York, NY)* 251: 802-804 DOI 10.1126/science.1846706

80. Kakazu A, Chandrasekher G, Bazan HE (2004) HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad- but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Investigative ophthalmology & visual science* 45: 3485-3492 DOI 10.1167/iovs.04-0372
81. Li Q, Weng J, Mohan RR, Bennett GL, Schwall R, Wang ZF, Tabor K, Kim J, Hargrave S, Cuevas KH, Wilson SE (1996) Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 37: 727-739
82. Göbbels M, Spitznas M, Oldendoerp J (1989) Impairment of corneal epithelial barrier function in diabetics. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 227: 142-144 DOI 10.1007/bf02169787
83. Kruse FE, Tseng SC (1993) Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 34: 1963-1976
84. Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, Baleriola-Lucas C, Bestawros F, Sweeney D, Holden BA (1996) Fibronectin in the tear film. *Investigative ophthalmology & visual science* 37: 459-467
85. Suzuki K, Saito J, Yanai R, Yamada N, Chikama T, Seki K, Nishida T (2003) Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Progress in retinal and eye research* 22: 113-133 DOI 10.1016/s1350-9462(02)00042-3
86. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE (2007) Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Experimental eye research* 85: 845-860 DOI 10.1016/j.exer.2007.08.020
87. Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T (2000) Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science* 41: 2495-2500
88. Leask A, Abraham DJ (2004) TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 816-827 DOI 10.1096/fj.03-1273rev
89. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T (1990) Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *Journal of cellular physiology* 145: 549-554 DOI 10.1002/jcp.1041450323

90. Murakami J, Nishida T, Otori T (1992) Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 120: 86-93
91. Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, Liu CY, Kao WW (2002) Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea* 21: S23-29 DOI 10.1097/00003226-200203001-00006
92. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR (1999) Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Progress in retinal and eye research* 18: 293-309 DOI 10.1016/s1350-9462(98)00017-2
93. Tuominen IS, Tervo TM, Teppo AM, Valle TU, Grönhagen-Riska C, Vesaluoma MH (2001) Human tear fluid PDGF-BB, TNF-alpha and TGF-beta1 vs corneal haze and regeneration of corneal epithelium and subbasal nerve plexus after PRK. *Experimental eye research* 72: 631-641 DOI 10.1006/exer.2001.0999
94. Okada Y, Saika S, Hashizume N, Kobata S, Yamanaka O, Ohnishi Y, Senba E (1996) Expression of fos family and jun family proto-oncogenes during corneal epithelial wound healing. *Current eye research* 15: 824-832 DOI 10.3109/02713689609017623
95. Spix JK, Chay EY, Block ER, Klarlund JK (2007) Hepatocyte growth factor induces epithelial cell motility through transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Experimental cell research* 313: 3319-3325 DOI 10.1016/j.yexcr.2007.06.006
96. Terracciano L, Piscuoglio S, Ng C (2018) Hepatocellular Carcinoma: Pathology and Genetics.
97. Pathuri P, Norton D, Willems H, Tisi D, Jhoti H (2013) Structural Biology and Anticancer Drug Design. *Cancer Drug Design and Discovery: Second Edition*: 121-141 DOI 10.1016/B978-0-12-396521-9.00004-8
98. Tuft SJ, Gartry DS, Rawe IM, Meek KM (1993) Photorefractive keratectomy: implications of corneal wound healing. *The British journal of ophthalmology* 77: 243-247 DOI 10.1136/bjo.77.4.243
99. Chen K, Li Y, Zhang X, Ullah R, Tong J, Shen Y (2022) The role of the PI3K/AKT signalling pathway in the corneal epithelium: recent updates. *Cell death & disease* 13: 513 DOI 10.1038/s41419-022-04963-x
100. Weinger I, Klepeis VE, Trinkaus-Randall V (2005) Tri-nucleotide receptors play a critical role in epithelial cell wound repair. *Purinergic signalling* 1: 281-292 DOI 10.1007/s11302-005-8132-6

101. Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M, Trinkaus-Randall V (2010) The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *American journal of physiology Cell physiology* 299: C411-421 DOI 10.1152/ajpcell.00100.2009
102. Yin J, Xu K, Zhang J, Kumar A, Yu FS (2007) Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *Journal of cell science* 120: 815-825 DOI 10.1242/jcs.03389
103. Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C (1990) Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science* 31: 1968-1974
104. Quianzon CC, Cheikh I (2012) History of insulin. *Journal of community hospital internal medicine perspectives* 2 DOI 10.3402/jchimp.v2i2.18701
105. Federation ID (2021) Diabetes Atlas. International Diabetes Federation, Brussels
106. Külekci Ç, Özer S, Önen S, Korkusuz P, Yılmaz T (2023) Topical Intranasal Insulin Enhances Healing of Nasal Mucosa: An Experimental Animal Study. *American journal of rhinology & allergy* 37: 284-290 DOI 10.1177/19458924221139018
107. Huhtaniemi IT, L. Martini (2019) Encyclopedia of endocrine diseases.
108. Greenway SE, Filler LE, Greenway FL (1999) Topical insulin in wound healing: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of wound care* 8: 526-528 DOI 10.12968/jowc.1999.8.10.26217
109. Rezvani O, Shabbak E, Aslani A, Bidar R, Jafari M, Safarnezhad S (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effects of topical insulin on wound healing. *Ostomy/wound management* 55: 22-28
110. Lima MH, Caricilli AM, de Abreu LL, Araújo EP, Pelegrinelli FF, Thirone AC, Tsukumo DM, Pessoa AF, dos Santos MF, de Moraes MA, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ (2012) Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *PloS one* 7: e36974 DOI 10.1371/journal.pone.0036974
111. Apikoglu-Rabus S, Izzettin FV, Turan P, Ercan F (2010) Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clinical and experimental dermatology* 35: 180-185 DOI 10.1111/j.1365-2230.2009.03419.x
112. Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M (2009) Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC cell biology* 10: 1 DOI 10.1186/1471-2121-10-1

113. Araujo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA (2016) The topical use of insulin accelerates the healing of traumatic tympanic membrane perforations. *The Laryngoscope* 126: 156-162 DOI 10.1002/lary.25300
114. Brooks PC, Klemke RL, Schon S, Lewis JM, Schwartz MA, Cheres DA (1997) Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin alpha v beta 5 to promote tumor cell dissemination in vivo. *The Journal of clinical investigation* 99: 1390-1398 DOI 10.1172/jci119298
115. Hérard AL, Pierrot D, Hinnrasky J, Kaplan H, Sheppard D, Puchelle E, Zahm JM (1996) Fibronectin and its alpha 5 beta 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium. *The American journal of physiology* 271: L726-733 DOI 10.1152/ajplung.1996.271.5.L726
116. Bekele S, Taylor-Robinson A (2019) Hepatitis C virus infection, genotypes and mechanism of insulin resistance. *Journal of Molecular Pathophysiology* 8: 1-13 DOI 10.5455/jmp.20190703070703
117. Naeser P (1997) Insulin receptors in human ocular tissues. Immunohistochemical demonstration in normal and diabetic eyes. *Uppsala journal of medical sciences* 102: 35-40 DOI 10.3109/03009739709178930
118. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H (1995) An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Investigative ophthalmology & visual science* 36: 614-621
119. Shanley LJ, McCaig CD, Forrester JV, Zhao M (2004) Insulin, not leptin, promotes in vitro cell migration to heal monolayer wounds in human corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 45: 1088-1094 DOI 10.1167/iovs.03-1064
120. Aynsley TR (1945) THE USE OF INSULIN IN THE TREATMENT OF CORNEAL ULCERS. *The British journal of ophthalmology* 29: 361-363 DOI 10.1136/bjo.29.7.361
121. Oechsner M, Keipert S (1999) Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 47: 113-118 DOI 10.1016/s0939-6411(98)00070-8
122. Calonge M (2001) The treatment of dry eye. *Survey of ophthalmology* 45 Suppl 2: S227-239 DOI 10.1016/s0039-6257(00)00205-8

123. Ubels JL, McCartney MD, Lantz WK, Beaird J, Dayalan A, Edelhauser HF (1995) Effects of preservative-free artificial tear solutions on corneal epithelial structure and function. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill : 1960) 113: 371-378 DOI 10.1001/archopht.1995.01100030127036
124. Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M (2006) Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 244: 109-112 DOI 10.1007/s00417-005-0028-1
125. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of biological chemistry* 277: 4589-4592 DOI 10.1074/jbc.R100038200
126. Underhill CB (1989) The interaction of hyaluronate with the cell surface: the hyaluronate receptor and the core protein. *Ciba Foundation symposium* 143: 87-99; discussion 100-106, 281-105 DOI 10.1002/9780470513774.ch6
127. Nakamura M, Hikida M, Nakano T (1992) Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Current eye research* 11: 981-986 DOI 10.3109/02713689209033496
128. Goa KL, Benfield P (1994) Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* 47: 536-566 DOI 10.2165/00003495-199447030-00009
129. Cohen GB, Ren R, Baltimore D (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80: 237-248 DOI 10.1016/0092-8674(95)90406-9
130. Verrando P, Ortonne JP (1985) Insulin binding properties of normal and transformed human epidermal cultured keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 85: 328-332 DOI 10.1111/1523-1747.ep12276922
131. Ando Y, Jensen PJ (1993) Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration. *The Journal of investigative dermatology* 100: 633-639 DOI 10.1111/1523-1747.ep12472297
132. Benoliel AM, Kahn-Perles B, Imbert J, Verrando P (1997) Insulin stimulates haptotactic migration of human epidermal keratinocytes through activation of NF-kappa B transcription factor. *Journal of cell science* 110 (Pt 17): 2089-2097 DOI 10.1242/jcs.110.17.2089
133. Tsuboi R, Sato C, Kurita Y, Ron D, Rubin JS, Ogawa H (1993) Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal

- human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 101: 49-53 DOI 10.1111/1523-1747.ep12358892
134. Ju WD, Schiller JT, Kazempour MK, Lowy DR (1993) TGF alpha enhances locomotion of cultured human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 100: 628-632
 135. Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, Liotta LA (1990) Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *The Journal of cell biology* 110: 1427-1438 DOI 10.1083/jcb.110.4.1427
 136. Zagon IS, Kloczek MS, Sassani JW, McLaughlin PJ (2007) Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in diabetes mellitus. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 125: 1082-1088 DOI 10.1001/archophth.125.8.1082
 137. Chen DK, Frizzi KE, Guernsey LS, Ladit K, Mizisin AP, Calcutt NA (2013) Repeated monitoring of corneal nerves by confocal microscopy as an index of peripheral neuropathy in type-1 diabetic rodents and the effects of topical insulin. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 18: 306-315 DOI 10.1111/jns5.12044
 138. Yang S, Zhang Y, Zhang Z, Dan J, Zhou Q, Wang X, Li W, Zhou L, Yang L, Xie L (2020) Insulin Promotes Corneal Nerve Repair and Wound Healing in Type 1 Diabetic Mice by Enhancing Wnt/ β -Catenin Signaling. *The American journal of pathology* 190: 2237-2250 DOI 10.1016/j.ajpath.2020.08.006
 139. Aniah Azmi N, Bastion MC (2020) Short-Term Results of Trial of Topical Insulin for Treatment of Dry Eyes in Diabetics. *Eye & contact lens* 46 Suppl 1: S25-s32 DOI 10.1097/icl.0000000000000623
 140. Fai S, Ahem A, Mustapha M, Mohd Noh UK, Bastion MC (2017) Randomized Controlled Trial of Topical Insulin for Healing Corneal Epithelial Defects Induced During Vitreoretinal Surgery in Diabetics. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa)* 6: 418-424 DOI 10.22608/apo.201780
 141. Bastion ML, Ling KP (2013) Topical insulin for healing of diabetic epithelial defects?: A retrospective review of corneal debridement during vitreoretinal surgery in Malaysian patients. *The Medical journal of Malaysia* 68: 208-216
 142. Quiroz-Mendoza J, Garcia Roa M, Romero Morales V, Valera-Cornejo D, Vazquez Membrillo M, Ramírez Neria P, Villalpando-Gomez Y, García-Franco R (2021) Clinical trial of topical insulin and sodium hyaluronate in the treatment of epithelial defects produced by intraoperative corneal epithelial debridement during pars plana

- vitrectomy in diabetics. *Revista Mexicana de Oftalmología (English Edition)* 95 DOI 10.24875/RMOE.M21000157
143. Dasrilisyah AM, Wan Abdul Halim WH, Mustapha M, Tang SF, Kaur B, Ong EY, Bastion MLC (2023) Randomized Clinical Trial of Topical Insulin Versus Artificial Tears for Healing Rates of Iatrogenic Corneal Epithelial Defects Induced During Vitreoretinal Surgery in Diabetics. *Cornea* 42: 1395-1403 DOI 10.1097/ico.0000000000003308
 144. Tong CM, Iovieno A, Yeung SN (2020) Topical insulin for neurotrophic corneal ulcers. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie* 55: e170-e172 DOI 10.1016/j.jcjo.2020.04.001
 145. Bartlett JD, Turner-Henson A, Atchison JA, Woolley TW, Pillion DJ (1994) Insulin administration to the eyes of normoglycemic human volunteers. *Journal of ocular pharmacology* 10: 683-690 DOI 10.1089/jop.1994.10.683
 146. Le Nguyen MH, Naoum MS, Andre C, Lethier L, Limat S, Fagnoni-Legat C, Guillaume Y, Gauthier AS (2022) Physicochemical and microbiological stability of insulin eye drops in an artificial tear vehicle used in the treatment of refractory neurotrophic keratopathy. *Journal francais d'ophtalmologie* 45: 860-871 DOI 10.1016/j.jfo.2022.04.008
 147. Esmail A, Ibrahim M, Nage S (2023) Efficacy of topical insulin for recurrent epithelial corneal erosions. *Irish journal of medical science* 192: 3117-3123 DOI 10.1007/s11845-023-03373-y
 148. Khilji M, Tanveer S, Khan FZ, Yazdan DA, Khilji A (2023) Neurotrophic Keratopathy and Topical Insulin Therapy: A Case Report. *Cureus* 15: e46242 DOI 10.7759/cureus.46242
 149. Moreker MR, Thakre N, Gogoi A, Bhandari RP, Patel RC (2023) Insulin eye drops for neurotrophic keratitis. *Indian journal of ophthalmology* 71: 2911-2912 DOI 10.4103/ijo.Ijo_872_23
 150. Balal S, Din N, Ashton C, Ahmad S (2023) Healing of Chemical Injury-Related Persistent Corneal Epithelial Defects With Topical Insulin. *Cornea* 42: 1000-1004 DOI 10.1097/ico.0000000000003145
 151. Serrano-Giménez R, Contreras-Macías E, García-Bernal A, Fobelo-Lozano MJ (2020) Insulin eye drops for treating corneal ulcer in a non-diabetic patient: regarding a case. *Farmacia hospitalaria : organo oficial de expresion cientifica de la Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria* 44: 297-299 DOI 10.7399/fh.11521

152. Soares R, Arêde C, Sousa Neves F, da Silva Fernandes J, Cunha Ferreira C, Sequeira J (2022) Topical Insulin-Utility and Results in Refractory Neurotrophic Keratopathy in Stages 2 and 3. *Cornea* 41: 990-994 DOI 10.1097/ico.0000000000002858