

# Mekanik Epitel Debridmanı Sonrası Topikal Vitamin-E ve Askorbik Asid Uygulamasının Keratosit Apoptosisine Etkisinin Tavşan Gözünde İncelenmesi

EFFECTS OF TOPICAL VITAMIN-E AND ASCORBIC ACID ON KERATOCYTE APOPTOSIS AFTER MECHANICAL EPITHELIAL DEBRIDEMENT IN RABBIT EYES

Dr. Şengül ÖZDEK,<sup>a</sup> Dr. Ali ALTINSOY,<sup>a</sup> Dr. Ufuk ADIGÜZEL,<sup>b</sup> Dr. Cem SEZER,<sup>c</sup>  
Dr. Berati HASANREİSOĞLU,<sup>a</sup> Dr. Kamil BİLGİHAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Göz Hastalıkları AD, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA

<sup>b</sup>Göz Hastalıkları AD, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, MERSİN

<sup>c</sup>Patoloji AD, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA

## Özet

**Amaç:** Tavşan kornealarında mekanik epitel debridmanını takiben, vitamin-E ve C'nin keratosit apoptosisine etkilerini değerlendirmek.

**Gereç ve Yöntemler:** Yirmi adet Yeni Zelanda tipi albino tavşan 4 gruba bölündükten sonra, tavşanların sadece bir gözü künt (Kimura) spatül yardımı ile 7mm'lik zonda mekanik olarak deepitelize edildi. Vitaminlerin uygulanmadığı 1. grup kontrol grubu olarak kabul edildi. İkinci grupta epitel kaldırılmasından 2-3 dakika önce korneaya 1 damla vitamin-E (1 IU/mg, 50IU/damla) uygulandı. Üçüncü grup epitel kaldırıldıktan hemen sonra topikal vitamin-C (10% (w/v) askorbik asid) aldı ve son olarak 4.grupta epitel debridmanı öncesi topikal vitamin-E ile debridman sonrasında da topikal vitamin-C ile tedavi edildi. Santral korneal dokular alındıktan 4 saat sonra, TUNEL yöntemi ile apoptotik keratositler sayıldı ve ışık mikroskopisi ile PMN lökosit yoğunluğu değerlendirildi. Bütün gruplardaki PMN ve apoptotik hücrelerin istatistiksel değerlendirilmesinde ANOVA testi ve farkı yaratan grupların belirlenmesinde de Post Hoc testleri kullanıldı.

**Bulgular:** Kontrol grubunda diğer üç gruptan anlamlı derecede daha fazla apoptotik keratosit saptandı (ANOVA, p<0.05, Post Hoc test: p<0.05). Fakat vitamin grupları arasında belirgin farklılık yoktu (p>0.05). PMN hücre sayısı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (ANOVA:p>0.05).

**Sonuç:** Mekanik epitel debridmanının neden olduğu keratosit apoptozisi vitamin-E ve C ile en azından kısmen önenebilir gibi gözükmektedir. Bu ajanlar refraktif cerrahi sonrası korneal yara iyileşmesinin modülasyonunda potansiyel terapötik ajanlar olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Keratosit apoptozisi, epitel debridmanı, vitamin-E, askorbik asid

Türkiye Klinikleri J Ophthalmol 2004, 13:175-179

## Abstract

**Objective:** To study the effect of vitamin-E and C on keratocyte apoptosis following mechanical epithelial debridement in rabbit corneas.

**Material and Methods:** Twenty New Zealand white rabbits were used divided into 4 groups and only one eye of each rabbit was deepithelialized mechanically within a 7mm zone by using a blunt (Kimura) spatula. Group 1 was not treated with any of the vitamins and acted as a control group. One drop of vitamin E (1IU/mg, 50IU/drop) was applied to the cornea 2-3 minutes before epithelial removal in group 2. Group 3 received topical vitamin-C (10% (w/v) ascorbic acid) just after epithelial removal and lastly group 4 was treated with topical vitamin-E before and vitamin-C after the epithelial debridement. Central corneal tissues were removed and TUNEL assay was used for the demonstration of the apoptotic keratocytes 4 hour after corneal surgery. PMN leukocyte densities were also assessed. ANOVA test was used for the statistical evaluation of apoptotic cells and PMN cells between all groups.

**Results:** Control group had the highest number of apoptotic keratocyte (ANOVA: p<0.05, Post Hoc test: p<0.05 for all three groups). On the other hand, there was no significant difference between each vitamin group (Post Hoc test: p>0.05). There was no statistically significant difference between groups in terms of PMN cell number (ANOVA: p>0.05).

**Conclusion:** Mechanical epithelial debridement induces keratocyte apoptosis which can be prevented by vitamins E and C at least partially. These agents may be the potential medications for modulation of corneal wound healing after refractive surgeries.

**Key Words:** Keratocyte apoptosis, epithelial debridement, vitamin-E, ascorbic acid

Fotorefraktif keratektomi (PRK)'de en sık kullanılan epitel kaldırma teknikleri, künt spatül

veya keskin bıçaklarla yapılan mekanik debridman, topikal alkol uygulaması, transepitelyal excimer laser uygulaması ve dönen epitelyal kazıyıcılardır. PRK sonrası meydana gelen postoperatif ağrı, haze ve skar gelişimini önlemek ve/veya azaltmak için daha önce epitel uzaklaştırılmasının rutin yolu olan epitelin mekanik debridmanı son yıllarda yerini transepitelyal excimer laser ablasyona ve alkol

Geliş Tarihi/Received: 12.11.2003 Kabul Tarihi/Accepted: 29.09.2004

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Şengül ÖZDEK  
İşçi Blokları mah. 31. Cad. Özgür Anıl sitesi  
A-Blok Daire:30, 100. YIL, 06530, ANKARA  
ozdek@ttnet.net.tr

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

yardımları ile epitelyal flep kaldırılmasına bırakmıştır.<sup>1-4</sup>

Son 40 yıldaki çalışmalarda epitel debridmanının yara bölgesine komşu keratositlerin ölümüne yol açtığı ve son zamanlarda bu hücre ölümünün apoptozisi kapsadığı gösterilmiştir.<sup>5-7</sup> Apoptozis programlı hücre ölümüdür ve hücre sel büzüşme, membran değişiklikleri ve DNA fragmantasyonu gibi karakteristik özellikleri vardır. Keratosit apoptozisi epitel hasarını takiben meydana gelen ilk değişikliktir ve yara iyileşme sürecinin başlangıcını oluşturabilir. Keratosit apoptozisinin başlamasından sonra derin ve periferik yerleşimli keratositler proliferasyon olarak ölen hücrelerin yerlerini alırlar. Takiben keratositler miyofibroblastlara dönüşerek kollajen ve glikozaminoglikan salgılar. Epitelyal iyileşme ve morfolojiyi etkileyen sitokin ve büyüme faktörlerinin de üretimi bu esnada artar. Epitelyal hiperplazi ve stromal remodelling ile süreç tamamlanır.<sup>8</sup> Keratosit apoptozis cevabından epitel hasarı esnasında artan interleukin-1 (IL-1), excimer laser sırasında açığa çıkan reaktif oksijen radikalleri ve Fas/Fas ligand sistemi sorumlu tutulmaktadır.<sup>9</sup> Epitelyal hasar oluşturan refraktif cerrahi prosedürün çeşidine göre keratosit apoptozis cevabı da değişmektedir.<sup>6-7</sup> Keratosit apoptozisini inhibe eden fakat keratositlerde nekroza yol açmayacak farmakolojik ajanların bulunması için çalışmalar halen devam etmektedir. PRK sonrasında tavşanlardaki aşırı korneal yara iyileşmesinin vitamin-E ile önlenemediği bildirilmiştir.<sup>10</sup> Vitamin-C ve diğer antioksidanların sadece yüksek konsantrasyonlarda kornea epitelinde bulunabileceği ve gözdeki internal yapılar için bir ultraviyole filtresi rolünü üstlenebileceği gösterilmiştir.<sup>11-12</sup> Ek olarak; topikal askorbik asid, korneanın excimer laser cerrahisi sonrasında farmakolojik tedavinin tamamlayıcı bir parçası olarak önerilmiştir.<sup>13,14</sup>

Bu çalışmada, tavşan kornealarında mekanik epitel debridmanını takiben oluşan keratosit apoptozisine vitamin-E, vitamin-C, vitamin E ve C'nin birlikte etkileri değerlendirilmiştir.

### Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmada 20 adet Yeni Zelanda tipi albino tavşan kullanıldı. Tavşanlara intramusküler

25mg/kg ketamin HCl, 2.5mg/kg xylazine ve topikal proparacaine hidroklorid ile anestezi yapıldı. Her tavşanın sadece bir gözü çalışma için kullanıldı.

Herbiri 5 göz içerecek şekilde hayvanlar 4 gruba ayrıldı. Bütün gözler künt (Kimura) spatul ile 7mm'lik zonda mekanik olarak depepitalize edildi. Vitaminlerin uygulanmadığı 1. grup kontrol grubu olarak kabul edildi. İkinci gruptaki tavşanların kornealarına epitel kaldırılmasından 2-3 dakika önce 1 damla vitamin-E damlatıldı. Vitamin-E (DL-alfa tokoferol asetat) solüsyonu mineral yağı kullanılarak hazırlandı (1 IU/mg, pH 7.2, 50mg veya 50IU/damla). Vitamin-C veya 10% (w/v) askorbik asid solüsyonu distile su kullanılarak hazırlanıp, sodyum hidroksit yardımıyla pH'sı 7.2'ye yükseltildi. Üçüncü gruptaki gözlere epitel kaldırıldıktan hemen sonra topikal vitamin-C uygulandı. Son grup ise epitel debridmanı öncesi topikal vitamin-E sonra da vitamin-C ile tedavi edildi.

Epitel debridmanını takiben 4 saat beklendi ve hayvanlara 100mg/kg intravenöz pentobarbital enjeksiyonuyla ötenazi uygulandı. Apoptotik keratositlerin tespiti terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling (TUNEL) yöntemiyle en iyi postoperatif 4. saatte yapılabildiğinden dolayı bu yöntem korneal cerrahiden 4 saat sonra uygulandı.<sup>7</sup>

Santral korneal dokular 7.5mm'lik trephine ile çıkarılıp 2 saat %10'luk formaldehid solüsyonunda fikse edilip vertikal olarak parafin blok içine yerleştirildi. Farklı bölgelerden tam kat 4µm'lik kesitler hazırlandı. Deparafinizasyonu takiben, proteinaz K (Applipere, Oncor 130202) 15 dakika uygulandı. Kornea, Apop Tag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (S-7101, Oncor) kullanılarak imalatçı uyarıları dikkate alınıp TUNEL yöntemi ile boyandı. Örneklerin sayım boyaması %0.5'lik methyl green ile yapıldı. Ratlardan elde edilen göğüs dokusu pozitif kontrol materyali olarak kullanıldı. Bütün örneklerden 4 kesit alınıp ışık mikroskopu ile büyük büyütmede (x400) değerlendirildi. Sadece keratositlerdeki nükleer boyanma sayıldı. Her bir örneğin 40 farklı bölgesinin ortalama değerleri hesaplandı.

Bütün kesitlerdeki PMN lökosit yoğunluğu ışık mikroskopunda büyük büyütmede (x400) hematoxilen-eozin boyası ile değerlendirildi. Her bir örneğin 40 farklı bölgesinin ortalama değerleri hesaplandı.

İstatistiksel testler: Bütün gruplarda apoptotik ve PMN hücreler arasındaki istatistiksel değerlendirmede ANOVA testi kullanıldı. İki grup arasındaki farklılık Post Hoc testi ile değerlendirilip, p değeri 0.05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Dataların analizi SPSS 9.0 (SPSS inc.) kullanılarak yapıldı.

### Sonuçlar

TUNEL yöntemiyle boyanan keratositlerin ve PMN hücrelerinin ortalama sayıları ile kontrol grubu ve diğer grupların istatistiksel karşılaştırılması Tablo 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda ortalama apoptotik keratosit sayısı  $2.40 \pm 2.30$  (0-6) idi ve istatistiksel olarak diğer gruplardan belirgin yüksekti (Post Hoc test.  $P < 0.05$  diğer üç grup için) (Resim 1a). Vitamin-E, Vitamin-C ve Vitamin E+C gruplarının ortalama apoptotik keratosit sayıları sırasıyla  $0.40 \pm 0.54$  (0-1),  $0.20 \pm 0.44$  (0-1) ve  $0.60 \pm 0.89$  (0-2) idi (Resim 1b). Fakat vitamin gruplarının (2, 3 ve 4. gruplar) kendi aralarında belirgin farklılık izlenmedi (Post Hoc test:  $p > 0.05$ ).

Kontrol grubunun ortalama PMN hücre sayısı  $10.40 \pm 4.15$  (5-15) idi ve ortalama PMN hücre sayısı  $13.60 \pm 4.59$  (8-22) olan 3. gruptan (vitamin-C grup) sonraki en yüksek PMN hücre sayısına sahipti. Ortalama PMN hücre sayısı,  $7.40 \pm 5.63$  (0-14) olan vitamin-E grubunda en düşüktü. Vitamin E+C grubunda ise  $8.40 \pm 4.03$  (3-14) idi. Fakat bü-

tün gruplar arasında PMN hücre sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı izlendi (ANOVA:  $p=0.241$ ).

### Tartışma

Keratosit apoptozisi epitelyal hasarı takiben stromada oluşan en erken değişikliktir ve korneal yara iyileşme cevabının modülasyonunda halen hedef olarak gösterilmektedir. Cerrahi tekniklerin değişmesi ve farmakolojik araştırmalarla keratosit apoptozisi ve onu takip eden aşırı korneal yara iyileşmesinin sınırlandırılabilmesi düşünülmektedir. Bu çalışmamızda; mekanik epitel debridmanı sonrası oluşan keratosit apoptozisinin vitamin-E ve C ile kısmen inhibe edildiği gösterilmiştir. PRK sonrası meydana gelen haze ve regresyonu önlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Tavşan kornealarına bir antioksidan olan vitamin-E'nin topikal uygulanmasından sonra bu tür komplikasyonların azaldığı bildirilmiştir ve serbest radikallerin excimer laser keratektomi sonrası meydana gelen komplikasyonlardan sorumlu olabileceği düşünülmüştür.<sup>10</sup> Bir başka çalışmada da Brancato ve ark.,<sup>15</sup> serbest radikal hasarını azaltan ubiquinone Q10 ile excimer laser sonrası meydana gelen keratosit apoptozisinin önlenebileceğini göstermiştir.

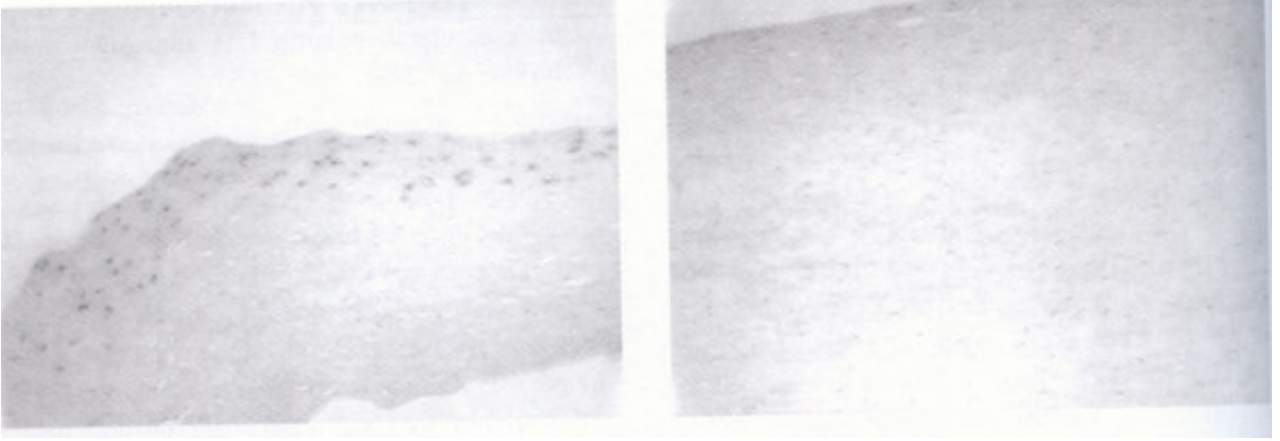
Topikal askorbik asidin excimer laser keratektomi sonrası meydana gelen oksijen radikallerinin yaptığı doku hasarını azalttığı ve akut inflamatuvar reaksiyonu başarıyla geriletmediği gösterilmiştir.<sup>13</sup> Bilgihan ve ark.<sup>14</sup> yaptıkları çalışmada refraktif cerrahiyi takiben insan gözyaşında vitamin-C seviyesinde belirgin azalma olduğunu bildirmişlerdir. Askorbik asidin gözyaşı ve kornea

**Tablo 1.** Apoptotik keratositler ve PMN hücrelerinin ortalama sayıları

Gruplar	n	Apoptotik hücreler (Ortalama $\pm$ SD) (Aralık)	p (ANOVA) (Post Hoc Test)	PMN hücreler (Ortalama $\pm$ SD)(Aralık)	p (ANOVA)
Grup 1 (Kontrol)	5	$2.40 \pm 2.30$ (0-6)	0.045*	$10.4 \pm 4.15$ (5-15)	0.241*
Grup 2 (Vit-E grup)	5	$0.40 \pm 0.54$ (0-1)	0.026**	$7.40 \pm 5.63$ (0-14)	-
Grup 3 (Vit-C grup)	5	$0.20 \pm 0.44$ (0-1)	0.016**	$13.60 \pm 4.59$ (8-22)	-
Grup 4 (Vit-E + C grup)	5	$0.60 \pm 0.89$ (0-2)	0.042**	$8.40 \pm 4.03$ (3-14)	-

\* P-ANOVA test

\*\* P-Post-Hoc test (Kontrol grubuyla karşılaştırılmış)



**Resim.** TUNEL yöntemiyle boyanmış kornea kesitleri. Oklar tunnel pozitif apoptotik hücreleri göstermektedir.

**1a)** Kontrol grubunda ön stromada yoğun olarak tunnel (+) apoptotik hücreler izlenmektedir.

**1b)** Vitamin-E grubundan alınan bir kornea kesitinde ön stromada tek tük tunnel (+) apoptotik hücreler izlenmektedir.

epitelinde süperoksit radikalleri için major koruyucu olmasından dolayı, topikal askorbik asid tedavisi refraktif cerrahi sonrasında serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyebilecek gibi gözükmektedir. Bu çalışmamızda, vitamin-C ile tedavi edilen kornealarda keratosit apoptozisinin azaldığı gösterilmiş ve bu bulgu ile topikal askorbik asid tedavisinin excimer laser kornea cerrahisinde farmakolojik modülatör olarak tamamlayıcı tedavide kullanılacağı düşünülmüştür.

Kornea epitelinin lipofilik olması nedeniyle; bir nonpolar, yağda eriyen molekül olan vitamin-E'nin epitelten kolaylıkla penetre olabileceğini fakat polar ve suda eriyen bir molekül olan vitamin-C'nin epitel penetrasyonu olmayıp, hidrofilik stromadan kolaylıkla geçebileceğini kabul ederek, ajanların korneal geçişini artırmak için vitamin-E, 2-3 dakika önce vitamin-C, epitel debridmanını takiben uygulanmıştır.

Her iki vitamin (E+C) ile tedavi edilen grupta belirgin olarak daha az apoptotik hücre izlenmesine rağmen; bu kombinasyondan beklenen aditif anti-apoptotik etki görülmemiştir. Brancato ve ark.<sup>16</sup> yaptıkları çalışmada, vitamin-E ve ubiquinone Q10'nun birlikte verilmesiyle apoptotik hücrelerin belirgin azaldığını göstermişler fakat onlar da bu etkinin beklenen aditif etkiye bağımlı olarak mı ortaya çıktığı konusunda yeterli çalışmayı yapmamışlardı. Halen apoptozis miktarıyla meydana gelebilecek korneal haze ve refraktif

regresyon arasındaki korelasyon bilinmemektedir. Bu korelasyonun bilinmesi, bu komplikasyonların önlenmesinde vitamin-E ve C'nin daha potent olarak kullanılmasını sağlayabilirdi. Daha önce yaptığımız çalışmada topikal vitamin-E'nin PRK'yı takiben tavşan kornealarında meydana gelen haze ve skar oluşumunu önlediği gösterilerek bu teyit edilmiştir.<sup>10</sup>

Bizim çalışmamızda ayrıca mekanik epitel debridmanından 4 saat sonra korneaya yönelen ve inflamatuvar cevabı gösteren PMN hücreleri sayılarak tespit edildi. Park ve ark.<sup>17</sup> amniotik membran kaplama ile hücrel infiltrasyonun önlendiğini ve bunun lipid peroksidasyonu ve keratosit apoptozisini azalttığını göstermiştir. Kasetsuvan ve ark.<sup>13</sup> yaptıkları çalışmada, 24 saatte 3'er saat aryla topikal 10%'luk askorbik asid uygulayarak akut inflamatuvar reaksiyonun belirgin azaldığını göstermişlerdir. Muhtemelen 4.saatın inflamatuvar cevabı değerlendirmek için çok erken olması nedeniyle, bizim çalışmamızda vitamin uygulaması ile korneal PMN hücre sayısı arasında anlamlı ilişki izlenmedi.

Sonuç olarak, mekanik epitel debridmanı keratosit apoptozisini indüklemekte ve vitamin-E ve C bu apoptotik olayı önleyebilecek ajanlar olarak görülmektedir. Bu çalışma vitamin-C ve E'nin korneanın excimer laser cerrahisi sonrasında farmakolojik tedavinin tamamlayıcı bir parçası olabileceğini göstermiştir.

**KAYNAKLAR**

1. Griffith M, Jackson WB, Lafontaine MD, Mintsoulis G, Agapitos P, Hodge W. Evaluation of current techniques of corneal epithelial removal in hyperopic photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 1998 Aug;24(8):1070-8.
2. Carones F, Fiore T, Brancato R. Mechanical vs. alcohol epithelial removal during photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1999 Sep-Oct;15(5):556-62.
3. Weiss RA, Liaw LH, Berns M, Amoils SP. Scanning electron microscopy comparison of corneal epithelial removal techniques before photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 1999;25(8):1093-6.
4. Abad JC, An B, Power WJ, Foster CS, Azar DT, Talamo JH. A prospective evaluation of alcohol-assisted versus mechanical epithelial removal before photorefractive keratectomy. *Ophthalmology* 1997;104(10):1566-74.
5. Wilson SE. Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: programmed cell death and wound healing. *J Refract Surg* 1997;13(2):171-5.
6. Kim WJ, Shah S, Wilson SE. Differences in keratocyte apoptosis following transepithelial and laser-scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg* 1998;14(5):526-33.
7. Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 Feb;39(2):276-83.
8. Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000;19(3):7-12.
9. James DZ, Sabino RG, Udrey EKH. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* 2001;72:33-9.
10. Bilgihan K, Özdek SC, Özogul C, Gürelik G, Bilgihan A, Hasanreisoglu B. Topical vitamin-E and hydrocortisone acetate treatment after photorefractive keratectomy. *Eye* 2000;14:231-7.
11. Brubaker RF, Bourne WM, Bachman LA, McLaren JW. Ascorbic acid content of human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1681-3.
12. Ringvold A. Corneal epithelium and UV-protection of the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:149-53.
13. Kasetuwan N, Wu FM, Hsieh F, Sanchez D, McDonnell PJ. Effect of topical ascorbic acid on free radical tissue damage and inflammatory cell influx in the cornea after excimer laser corneal surgery. *Arch Ophthalmol* 1999;117(5):649-52.
14. Bilgihan A, Bilgihan K, Toklu Y, Konuk O, Yis O, Hasanreisoglu B. Ascorbic acid levels in human tears after photorefractive keratectomy, transepithelial photorefractive keratectomy, and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:585-8.
15. Brancato R, Schiavone N, Siano S. Prevention of corneal keratocyte apoptosis after argon fluoride excimer laser irradiation with the free radical scavenger ubiquinone Q10. *Eur J Ophthalmol* 2000;10(1):32-8.
16. Brancato R, Fiore T, Papucci L. Concomittant effect of topical ubiquinone Q10 and vitamin E to prevent keratocyte apoptosis after excimer laser photoablation in rabbits. *J Refract Surg* 2002;18(2):135-39.
17. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(10):2906-14.