

**T.C.**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL ALKALİ YANIK MODELİNDE MATRİKS  
REJENERASYON AJANI VE KORNEAL CROSSLİNKİNG İŞLEMİNİN  
İNFLAMASYON, NEOVASKÜLARİZASYON VE ÜLSERASYON  
MEKANİZMALARI ÜZERİNE KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Enes KESİM**

**Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

**2018**

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

**DENEYSEL ALKALİ YANIK MODELİNDE MATRİKS REJENERASYON AJANI  
VE KORNEAL CROSSLİNKİNG İŞLEMİNİN İNFLAMASYON,  
NEOVASKÜLARİZASYON VE ÜLSERASYON MEKANİZMALARI ÜZERİNE  
KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Enes KESİM**

**Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Üyesi Dilara PİRHAN**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL**

**Etik Kurul Onayı: 09.02.2017 karar tarihli KOÜ/HADYEK 2/5- 2017**

## ÖNSÖZ

Üniversitemizin kurucularından olan ve ailem gibi sevdiğim kliniğimizin kurucusu, öğrencisi olmaktan büyük şeref duyduğum Prof. Dr. Yusuf Çağlar hocama teşekkür ederim.

Anabilim dalı başkanımız, tez çalışmamda çok büyük katkıları olan, kliniğimizin tüm çalışanlarına anne şevkiyle yaklaşan, bana olan güvenini daima hissettiğim ve yanımda olduğunda daima güvende hissettiğim, üzerimdeki emeklerini hiçbir zaman unutmayacağım ve her zaman minnet duyacağım sevgili Prof. Dr. Nurşen Yüksel hocama çok teşekkür ederim.

Mesleğine olan aşkı ve azmiyle hepimize örnek olan, cerrahi nosyonumun gelişmesinde çok önemli pay sahibi olan, bizim için gündüzünü/gecesini feda eden ve birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım hocam Prof. Dr. Levent Karabaş'a teşekkür ederim.

İş disiplini ve titizliğiyle hastalarına, asistanlarına ve öğrencilerine güven veren, klinik bilgi ve birikiminde çok önemli pay sahibi olan, birlikte çalışma şerefine nail olduğum Prof. Dr. Özgül Altıntaş hocama teşekkür ederim.

Güleryüzü ve sabrıyla bizlere olan desteğini her zaman hissettiren, cerrahiye adım attığım ilk aylarda ameliyathaneyi sevmemi sağlayan, kliniğimizden ayrılmış olsa da ihtiyacımız olan her an yanımda olan Doç. Dr. Berna Özkan hocama teşekkür ederim.

Kliniğe geldiği andan itibaren bizlere bir abla gibi yaklaşan, zor anlarımızda her daim imdadımıza yetişen, yeni adım atmış olduğum cerrahi yaşamımda bana ilk vakalarımı sabırla ve büyük bir güvenle yaptıran ve kendimi geliştirmemde çok önemli pay sahibi olan, ilk tez öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Dilara Pirhan hocama çok teşekkür ederim.

Tezimde katkıları çok büyük olan, güleryüzü ve sıcakkanlılığıyla her zaman yardımına koşan, hoş sohbetiyle zor zamanlarımda bana moral ve motivasyon veren Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz hocama teşekkür ederim. Tezimin maddi olarak tüm giderlerini karşılayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, bana her anlamda çok şey öğreten, birlikte zaman zaman güldüğümüz, zaman zaman üzüldüğümüz ancak ne olursa olsun birlik içinde olduğumuz ve birlikte yürüdüğümüz, eğitimimde bana büyük katkı sağlamış olan çok kıymetli asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Kliniğimizde emekleri çok büyük olan, bizleri ve kliniği ailesi gibi sahiplenen hemşirelerimize, sekreterlerimize ve emektar personelimize teşekkür ederim.

Yetişmemde ve bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, zor zamanları birlikte göğüslediğimiz, bana her zaman sabırla destek olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım annem, babam ve aileme çok teşekkür ederim.

Bana her anımda desteğini esirgemeyen, öğrencilik ve asistanlık yıllarımda beni her zaman motive eden, iyi günümde, kötü günümde hep yanımda olan hayat arkadaşım Selin'e sonsuz teşekkür ederim.

## **İÇİNDEKİLER**

<b>ÖNSÖZ</b>	2
<b>İÇİNDEKİLER</b>	3
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	5
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	7
<b>TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ</b>	8
<b>1. AMAÇ VE KAPSAM</b>	10
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	12
<b>--2.1 Korneal Kimyasal Yaralanmalar</b>	12
<b>----2.1.1 Asit Yanıkları</b>	12
<b>----2.1.2 Alkali Yanıklar</b>	12
<b>-----2.1.2.1 Patofizyoloji</b>	13
<b>-----2.1.2.2 Klinik Süreç</b>	14
<b>-----2.1.2.2.1 Acil Faz</b>	14
<b>-----2.1.2.2.2 Akut Faz</b>	15
<b>-----2.1.2.2.3 Erken Onarım Fazı</b>	15
<b>-----2.1.2.2.4 Geç Onarım Fazı</b>	15
<b>--2.2 Kimyasal Yaralanmaların Sınıflandırılması</b>	15
<b>--2.3 Oküler Kimyasal Yanıklara Yaklaşım</b>	17
<b>----2.3.1 Acil Tedavi</b>	17
<b>----2.3.2 Akut Tedavi</b>	17
<b>-----2.3.2.1 Re-epitelizasyonun Sağlanması</b>	18
<b>-----2.3.2.2 Antiinflamatuvar Tedavi</b>	18
<b>-----2.3.2.3 Antimikrobiyal Tedavi</b>	18
<b>-----2.3.2.4 Yüksek GİB Tedavisi</b>	19
<b>-----2.3.2.5 Sekelden Korunma</b>	19
<b>----2.3.3 Kronik Tedavi</b>	19
<b>3. KORNEAL CROSSLINKİNG (CXL)</b>	20
<b>--3.1 Tarihçe</b>	20
<b>--3.2 Korneal CXL Temel Prensipleri</b>	20
<b>--3.3 Teknik</b>	22
<b>--3.4 CXL Endikasyonları ve Kontrendikasyonları</b>	24
<b>--3.5 CXL'in Etkinliği ve Klinik Sonuçları</b>	24

--3.6 CXL Komplasyonları	27
<b>4. MATRİKS REJENERASYON AJANI (RGTA)</b>	28
--4.1 Kimyasal Yapı ve Stabilitate	28
--4.2 RGTA Etki Mekanizması – Yapısal ve Koruyucu Roller	29
--4.3 RGTA Kornea Pre-klinik Çalışmalar	31
--4.4 RGTA Kornea Klinik Çalışmalar	32
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	34
--5.1 Denekler	34
--5.2 Model Oluşturulması	34
--5.3 Çalışma Dizaynı	34
--5.4 Muayene Dizaynı ve Deneyin Sonlandırılması	35
--5.5 CXL Uygulaması	36
--5.6 RGTA Uygulaması	37
<b>6. KLİNİK BULGULAR</b>	38
<b>7. HİSTOLOJİK BULGULAR</b>	48
--7.1 Materyal-Metod	48
----7.1.1 Hematoksilin&Eozin ve Masson Trikrom Boyamaları	48
----7.1.2 Kaspaz-3, VEGF, MMP-9, iNOS İmmünohistokimya Boyaması	48
--7.2 Bulgular	49
----7.2.1 Hematoksilin&Eozin ve Masson Trikrom	49
----7.2.2 İmmünohistokimyasal (IHC) incelemeler	54
-----7.2.2.1 Kaspaz-3	55
-----7.2.2.2 İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)	56
-----7.2.2.3 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	58
-----7.2.2.4 Matris Metalloproteinaz-9 (MMP-9)	60
<b>8. TARTIŞMA</b>	63
--8.1 Klinik Bulgular	63
--8.2 Histopatolojik Bulgular	65
<b>9. SONUÇLAR</b>	68
<b>10. ÖZET</b>	69
<b>11. ABSTRACT</b>	71
<b>12. KAYNAKLAR</b>	73

## **Simgeler ve Kısaltmalar Dizini**

**ABDEHAM:** Aykut Bolu Deney Hayvanları Merkezi

**BCVA:** Düzeltilmiş en iyi görme keskinliği

**Ca(OH)<sub>2</sub>:** Kalsiyum hidroksit

**CA:** Candida albicans

**COOH:** Karboksil

**CXL:** Cross-Linking (Çapraz bağlama)

**DETAB:** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi

**DRSP:** İlaça dirençli Streptococcus pneumoniae

**ECM:** Ekstrasellüler matriks

**EDTA:** Etilendiamin tetra asetik asit

**eNOS:** Endotelial nitrik oksit sentaz

**FGF:** Fibroblast büyüme faktörü

**GAG:** Glikozaminoglikan

**GİB:** Göz içi basıncı

**H&E:** Hematoksilen&Eozin

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen peroksit

**HS:** Heparan sülfat

**IHC:** İmmünohistokimya

**iNOS:** indüklenebilir nitrik oksit sentaz

**İP:** İntraperitoneal

**İV:** İntravenöz

**KOH:** Potasyum hidroksit

**LASİK:** Laser-Assisted in Situ Keratomileusis

**MDRPA:** Çoklu ilaca dirençli Pseudomonas aeruginosa

**Mg(OH)<sub>2</sub>:** Magnezyum hidroksit

**MMP:** Matriks metalloproteinaz

**MRSA:** Metisiline dirençli Stafilokokus aureus

**MT:** Masson trikrom

**NaCl:** Sodyum klorür

**NaOH:** Sodyum hidroksit

**NH<sub>3</sub>:** Amonyak

**NH<sub>4</sub>OH:** Amonyum hidroksit  
**nNOS:** Nöronal nitrik oksit sentaz  
**NO:** Nitrik oksit  
**NOS:** Nitrik oksit sentaz  
**OCT:** optik koherens tomografi  
**OH:** Hidroksil  
**PA:** Psödomonas aeruginosa  
**PMNL:** Polimorfonükleer lökosit  
**PRK:** Fotorefraktif keratektomi  
**PTK:** Fototerapötik keratektomi  
**RGTA:** Matriks rejenerasyon ajanı  
**ROS:** Reaktif oksijen türleri  
**SA:** Stafilokokus aureus  
**SDF-1:** Stromal hücre kaynaklı faktör-1  
**SE:** Stafilokokus epidermidis  
**SKK:** Santral kornea kalınlığı  
**TGFβ:** Transforming büyüme faktörü β  
**UCVA:** Düzeltilmemiş görme keskinliği  
**UV:** Ultraviyole  
**UVA:** Ultraviyole A  
**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

## **Şekiller Dizini**

<b><u>Şekil Numarası ve Başlığı:</u></b>	<b><u>Sayfa:</u></b>
<b>Şekil-1:</b> CXL Etki Mekanizması	22
<b>Şekil-2:</b> RGTA Etki Mekanizması	30
<b>Şekil-3:</b> Ön segment OCT görüntülerinin SKK ölçümünde kullanımı	39
<b>Şekil-4:</b> CXL grubunda bir deneğin 1.,2.,3. ve 4. ziyaret gelişen ülserasyonun değerlendirildiği OCT görüntüleri	41
<b>Şekil-5:</b> CXL grubundan 5 numaralı deneğin 3. Ziyatında görülen keratit, hipopiyon ve korneal ülserasyon	42
<b>Şekil-6:</b> Korneal epitel defektinin hesaplanması	43
<b>Şekil-7:</b> RGTA, CXL ve Kontrol gruplarında sırayla 1.,2.,3.,4. ziyaret epitel defekti büyüklüğünün takibi	44
<b>Şekil-8:</b> RGTA, CXL ve Kontrol gruplarında sırayla 1.,2.,3.,4. ziyaret vaskülarizasyon ve opasite takibi	46
<b>Şekil-9:</b> H&E boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri	51
<b>Şekil-10:</b> H&E boyama uygulanan tedavi grubu kornea kesitleri	52
<b>Şekil-11:</b> Masson Trikrom boyama uygulanan kornea kesitleri	53
<b>Şekil-12:</b> Kaspaz-3 immünhistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri	56
<b>Şekil-13:</b> iNOS immünhistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri	58
<b>Şekil-14:</b> VEGF immünhistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri	60
<b>Şekil-15:</b> MMP-9 immünhistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri	62



## Tablolar ve Grafikler Dizini

<b><u>Tablo Numarası ve Başlığı:</u></b>	<b><u>Sayfa:</u></b>
<b>Tablo-1:</b> Roper-Hall (Ballen) sınıflaması	16
<b>Tablo-2:</b> Oküler yüzey yanıklarının yeni sınıflandırması	16
<b>Tablo-3:</b> Model sonrası ortalama yara büyüklüğü ve santral kornea kalınlığı ölçümleri	39
<b>Tablo-4:</b> 1. ,2.,3., ve 4. ziyaret SKK ölçümleri ( $\mu$ )	40
<b>Tablo-5:</b> Her bir grubun kendi içinde tekrarlayan ölçümlerde SKK değerlerinin karşılaştırılması	40
<b>Tablo-6:</b> Her bir grubun son vizitteki ülserasyon skorları	42
<b>Tablo-7:</b> 1. ,2.,3., ve 4. ziyaret epitel defekti ölçümleri (%)	44
<b>Tablo-8:</b> 1. ,2.,3., ve 4. ziyaret korneal opasite ölçümleri (%)	45
<b>Tablo-9:</b> 2.,3., ve 4. ziyaret vaskülarizasyon ölçümleri (%)	46
<b>Tablo-10:</b> Grupların epitel kaybı, stromal ödem, korneal vaskülarizasyon ve lökositik infiltrasyon skorları ortalamaları	53
<b>Tablo-11:</b> Grupların epitel kaybı skorları istatistiksel karşılaştırılması	54
<b>Tablo-12:</b> Grupların stromal ödem skorları istatistiksel karşılaştırılması	54
<b>Tablo-13:</b> Grupların korneal vaskülarizasyon skorları istatistiksel karşılaştırılması	54
<b>Tablo-14:</b> Grupların lökositik infiltrasyon skorları istatistiksel karşılaştırılması	54
<b>Tablo-15:</b> Grupların Kaspaz-3 boyanma skorları ortalaması	55
<b>Tablo-16:</b> Grupların Kaspaz-3 boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması	55
<b>Tablo-17:</b> Grupların Kaspaz-3 boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması	56
<b>Tablo-18:</b> Grupların i-NOS boyanma skorları ortalaması	57
<b>Tablo-19:</b> Grupların i-NOS boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması	57
<b>Tablo-20:</b> Grupların i-NOS boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması	57
<b>Tablo-21:</b> Grupların VEGF boyanma skorları ortalaması	59

<b>Tablo-22:</b> Grupların VEGF boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması	59
<b>Tablo-23:</b> Grupların VEGF boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması	59
<b>Tablo-24:</b> Grupların MMP-9 boyanma skorları ortalaması	61
<b>Tablo-25:</b> Grupların MMP-9 boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması	61
<b>Tablo-26:</b> Grupların MMP-9 boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması	61

**Grafik Numarası ve Başlığı:**

<b>Grafik-1:</b> 1. ,2.,3., ve 4. vizit epitel defekti ölçümleri (%)	45
<b>Grafik-2:</b> 2.,3., ve 4. vizit vaskülarizasyon ölçümleri (%)	47

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Kimyasal yanıklar, tüm göz travmalarının %12' sini oluşturmaktadır. Kimyasal ve termal korneal yanıklar, hızlı ve ilerleyici tahribata yol açarak ciddi ön segment komplikasyonlarına neden olmaktadır.<sup>1</sup> Oluşan bu komplikasyonların ciddiyeti maruz kalınan ajanın konsantrasyonu, pH' ı, maruziyet süresi, oküler yüzeye ve dokulara uzanım miktarı ile ilişkilidir.<sup>1,2</sup>

Korneal alkali yanıklar çoğunlukla iş kazaları şeklinde görülmekte ve özellikle çalışan genç erkek popülasyonu etkilemektedir. Genç yaşta ciddi görsel kayba sebebiyet vererek maddi ve manevi kayıplara sebep olmaktadır. Ayrıca uzun tedavi süreci gerektirmesi nedeniyle kalıcı iş gücü kaybıyla beraber yüksek maddi kayıplara neden olmaktadır. Oküler kimyasal yaralanmalar ile ilgili yapılan retrospektif bir çalışmada 1 yıl boyunca başvuran 171 oküler kimyasal yaralanma vakalarının %61'i iş yeri kazası, %37'si evde, geri kalanı iste bilinmeyen bir sebepten ötürü gerçekleştiği görülmüştür.<sup>3</sup>

McCulley'e göre kimyasal göz yaralanmaları klinik seyri dört safhaya ayrılabilir: Acil, akut, erken onarım ve geç onarım.<sup>4</sup> (Daha sonra klinik süreç bölümünde bahsedilecektir.)

Tedavi oküler kimyasal yanığın olduğu yerde başlar. Etkilenen göz/gözlerden alkali madde mümkün olduğunca hızlı biçimde uzaklaştırılmalıdır. Amaç alkali maddeyi bölgeden uzaklaştırmak ve yüzey pH'ı dengelemektir (7.0-7.2). İlk müdahalenin ardından inflamasyonu baskılayıcı ve doku destekleyici tıbbi tedavi başlanmalıdır. Tıbbi tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda cerrahi yöntemlere başvurulur (limbal kök hücre transplantasyonu, amniyon zar transplantasyonu, keratoplasti, tarsorafi vb.)

Korneal cross linking (CXL); kornea içindeki kimyasal bağları güçlendirmek için fotosensitizör riboflavin ve ultraviyole A (UVA) kullanılan bir tekniktir.<sup>5</sup> CXL işleminin korneal ektazilerde etkili ve güvenli bir yöntem olduğu gösterilmiştir.<sup>6,7</sup> Son yıllarda yapılan çalışmalarda, CXL işleminin korneal alkali yanıklarda umut verici sonuçlar verdiği gösterilmiştir.<sup>8,9</sup>

Matriks rejenerasyon ajanı (RGTA) enzimatik bozulmaya dirençli heparan sülfat (HS) analoglarından geliştirilen biyopolimerlerdir. Hasarlı dokuda azalmış HS'nin yerini alarak ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerini ve büyüme faktörlerini bağlar, ECM'i proteolizisten korur, yara iyileşmesi için gerekli olan mikroçevreyi çeşitli proteolitik enzimleri inhibe ederek yeniden oluşturur, inflamasyon kontrolünde ve kollajen sentezi regülasyonunda rol oynarlar.<sup>10</sup>

Persistan epitel defektleri, nörotrofik ülserler, refraktif cerrahi sonrası gibi pek çok alanda denenmiş olup korneal iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir.<sup>10-14</sup>

Çalışmamızda korneal alkali yanık sonrası oluşan epitel defektleri, korneal opasite, neovaskülarizasyon ve korneal ülser üzerine etkili olabileceğini düşündüğümüz CXL işlemini, doku destekleyici topikal bir tedavi yöntemi olan RGTA tedavisi ve kontrol grubuyla karşılaştırarak tedavi sonrası klinik ve histopatolojik değişimleri ortaya koymak amacındayız.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Korneal Kimyasal Yaralanmalar

Gözün dış tabakalarına olan kimyasal travma hafif bir irritasyondan oküler yüzey epitelinin bütünüyle yıkımına, korneal opaklaşmaya, görme kaybına hatta gözün kaybına kadar değişen şiddette bir tabloya sebep olan, sık karşılaşılan bir problemdir.

Kimyasal yaralanmaları evde çamaşır suyu, kozmetikler, deterjanlar gibi evsel alkali ajanlarla, gübre ve böcek öldürücüler gibi tarım yaralanmaları şeklinde, kostik maddeler ve çözücülere bağlı endüstriyel kimyasal yanıklar şeklinde görmekteyiz. Kimyasal hasarın şiddeti kimyasal ajanın pH 'sı, miktarı, temas süresi ve doğal toksisitesine bağlı olduğu için mümkün olduğunca çabuk temas eden ajanın tanımlanması gereklidir.

#### 2.1.1 Asit Yanıkları

Asitler normal insan gözünün pH değerinden (7.4) daha düşük pH değerlerine sahiptir. Doku proteinini çöktürerek daha fazla oküler penetrasyonu engellerler. Bu nedenle asit yanıkları alkali yanıklara göre daha az ciddi olma eğilimindedir. Bunun bir istisnası hızla hücre membranlarından geçebilen ve ön kamaraya girebilen hidroflorik asittir.

Kollajenle reaksiyona girerek kollajen fibrillerini kısaltırlar ve göz içi basıncını (GİB) hızla yükseltirler. Ciddi asit yanıkları sonrası siliyer cisim hasarıyla aköz askorbat seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir.

Asitler korneal matrikse hasar verecek proteazların üretiminde ikincil düzenlemeye bağlı olarak şiddetli inflamasyonu tetikleselerde korneadaki proteoglikan temel maddesinin doğrudan kaybına neden olmazlar.

#### 2.1.2 Alkali Yanıklar

Alkali yanıklar pH değişikliği yaparak ülserasyon, proteoliz ve kollajen sentez defektleriyle korneal hasara yol açar. Alkali maddeler lipofildir ve göze asitlerden daha hızlı penetre olurlar. Temel madde oküler yüzeyde hızla çöker ve hücreler arasında sabunlaşma reaksiyonuna neden olur. Hasarlı doku daha fazla hasara yol açacak olan proteolitik enzimleri salgılar. Alkali maddeler ön kamaraya nüfuz ederek katarakt, siliyer cisim ve trabeküler ağ hasarına neden olabilir.

Pluripotent limbal kök hücre hasarı meydana gelmesi halinde kornea ve konjonktiva epitelinde meydana gelen hasar çok şiddetli olabilir. Bu korneanın opaklaşmasına ve

neovaskularizasyonuna neden olabilir. Korneanın ve skleranın daralması ve büzülmesinden dolayı akut bir GİB yükselmesi meydana gelebilir.<sup>15</sup> Uzun dönemde GİB yükselmesi inflamatuvar materyalin trabeküler ağda birikmesinden ve trabeküler ağ hasarından kaynaklanabilir. Konjonktiva hasarı yaygın skara, perilimbal iskemiye ve forniks kontraktürüne neden olabilir. Goblet hücre kaybı ve konjonktival inflamasyon oküler yüzeyi kuruluğa eğimli hale getirir (Alkali hasarın goblet hücre sayısında artış olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur<sup>16</sup>). Skatrisyel entropion ve ektropiona yol açan semblefaron oluşumu nedeniyle kapak malpozisyonu gelişebilir.

### 2.1.2.1 Patofizyoloji

Kimyasal maruziyet sonrası oküler hasarın şiddeti, temas yüzey alanı ve penetrasyon derecesine bağlıdır. Bunun yanında gidişatı belirleyen diğer faktörler: ısı, konsantrasyon, temas hızı, ozmolaritesi, redoks potansiyeli, oküler dokularla spesifik reaktivitesidir.<sup>17</sup> Genelde, alkaliler asitlerden daha etkili nüfuz eder.<sup>18-21</sup> Hidroksil (OH) molekülü hücre membranındaki yağ asitlerini sabunlaştırarak hücre hasarı ve ölümüne neden olurken katyon, alkali maddenin penetrasyonundan sorumludur.<sup>4</sup> Katyonlar karboksil gruplarıyla (COOH) stromal kollajen ve glikozaminoglikanlarla (GAG) reaksiyona girerler.<sup>21</sup> GAG'ların hidrasyonu stromanın berraklığını yitirmesiyle sonuçlanır.<sup>21</sup> Kollajen fibrillerin hidrasyonu, trabeküler ağları deforme eden kalınlaşma ve kısıalma ile sonuçlanır. Ajan trabekuluma ulaşarak dışa akımı bozar ve zamanla skarlaşmaya ve iris ,silier cisim ve lenste gcl bir inflamasyona sebep olur. Hücre membranlarında oluşan bu lizis prostaglandin, lökotrien ve interlökin gibi inflamatuvar mediatörlerin salınımıyla acil inflamatuvar bir yanıt oluşturur. Prostaglandinlerin salınımı alkali hasarın hemen ardında görülebilen GİB yükselmesinden sorumludur.<sup>22-25</sup>

n kamaraya penetrasyon, amonyak (NH<sub>3</sub>) ile maruziyetten sonra çok hızlı (neredeyse hemen), sodyum hidroksit (NaOH) ile maruziyetten sonra 3-5 dakikada gerçekleşir.<sup>20,26</sup> Ortam pH'ı normal düzeye döndürülürse, aköz pH seviyeleri 30 dk-3 saat arasında normale döner.<sup>26</sup> Siliyer cisim epiteli hasarı askorbat sekresyonunun ve ön kamara konsantrasyonunun azalmasına, bu da korneal keratositlerin kollajen sentezini ve stromal tamiri azaltmasına neden olur.<sup>27-31</sup> Aköz pH seviyesinin uzun süre 11.5 ve üzerinde seyretmesi kronik hipotoni ve fitizis bulbi ile sonuçlanabilir.<sup>26,32</sup>

Alkali yanığına neden olan en sık kimyasal maddeler; genellikle amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), magnezyum hidroksit [Mg(OH)<sub>2</sub>] ve kalsiyum hidroksit [Ca(OH)<sub>2</sub>], kireç, imento, amonyum, aerosoldur.

Penetrasyonun derecesine bağlı olarak, kornea ve konjunktiva epitelyumu, bazal membran, stroma keratositleri, stromadaki sinir uçları, endotelyum, lens epitelyumu, konjunktiva, episklera, iris, ve korpus siliare'nin vasküler epitelyumları hasara uğrayabilir.<sup>16,33</sup>

Bulbar konjunktivanın nekrozu sonucu, lökositlerin bölgeye infiltre olması, oküler yüzey yangısının sürmesine neden olur. Limbusta vasküler dokuların hasar görmesinden kaynaklanan iskemik nekroz ve buna bağlı olarak vasküler kollajenaz inhibitörlerinin azalması, kornea ülseri ve perforasyon oluşumunda etkilidir.<sup>34,35</sup>

En sık semptomlar ağrı, epifora, blefarospazm ve görme kaybıdır. Görsel prognoz genellikle oküler yüzey hasarının genişliği, deri yanığının varlığı ile derecesi ve gözkapağı fonksiyonuna etkisi tarafından belirlenir. En kötü görsel prognoz ileri limbal epitelyal hasar ve göz içi kimyasal penetrasyonda görülür.

Limbus limbal epitelyal kök hücrelerini içerir ve bu nedenle bu bölgeye olan hasar kornea epitelinin normal çoğalmasının bozulmasına yol açar. Korneal yüzey epitelinin doğru farklılaşma derecesine sahip olmayan hücreler ile kaplanması, korneanın konjunktivalizasyonuna neden olur. Bu durum vaskülarizasyon, korneada goblet hücre varlığı, zayıf epitelyal bağlantılar ile tekrarlayan erozyonlar ve travmanın şiddetine göre inflamasyon ile sonuçlanır.

### **2.1.2.2 Klinik Süreç**

McCulley'e göre kimyasal göz yaralanmaları klinik seyri dört safhaya ayrılır: Acil, akut, erken onarım ve geç onarım.<sup>4</sup>

#### **2.1.2.2.1 Acil Faz**

Acil faz kimyasal ajanın oküler yüzeyle temasından itibaren başlar. Prognozun ve oküler hasarın belirlenmesindeki ana unsurlar şunlardır:

- Korneal epitel defektinin toplam alanı
- Konjunktival epitel defektin büyüklüğü
- Limbal iskemi oranı
- Korneal opasifikasyon alanı ve yoğunluğu
- Göz içi basıncı yüksekliği
- Lens şeffaflığının yitilmesi

#### **2.1.2.2.2 Akut Faz**

Kimyasal göz yaralanmasından sonraki ilk 7 gün, iyileşmenin akut evresini oluşturur. Bu süre zarfında, kornea epitelinin yüzeysel koruyucu tabakası yeniden kurulurken dokular etkenden temizlenir.

Epitel tabakası, korneal incelme ve perforasyona sebep olan gözyaşı içerisindeki enzimlere karşı koruyucu bir bariyer olarak görev alır. Aynı zamanda stromal rejenerasyon ve tamirde de önemli rol oynar.

Bu dönemde oküler yüzeyde ve göz içinde önemli inflamatuvar olaylar gelişmeye başlar. Göz içi basıncı akut fazda bimodal yükselme eğilimi gösterir.<sup>23</sup>

#### **2.1.2.2.3 Erken Onarım Fazı**

Oküler yüzey epitelinin acil onarımının ve akut inflamatuvar olayların yol açtığı kronik inflamasyon, stromal tamir ve skarlaşmanın olduğu, oküler iyileşmenin geçiş dönemidir. Bu dönemde korneal ülser gelişebilmektedir. Stromal ülserasyon; yenilenen kornea epiteli ve polimorfonükleer lökositlerden (PMNL) salınan kollajenaz, metalloproteinaz ve diğer proteazlar gibi sindirim enzimlerinin aktivitesi sonucu gelişir.

#### **2.1.2.2.4 Geç Onarım Fazı**

Kimyasal hasardan 3 hafta sonra geç onarım fazı başlar. Bu aşamada Grade 1 ve 2 yanıklar iyi bir görsel prognozla iyileşirken, grade 3 ve 4 yanıklar sınırlı görme keskinliği ile iyileşirler. Kimyasal yanığın geç komplikasyonları arasında; düşük görme keskinliği, korneal skar, kseroftalmi, kuru göz, semblefaron, ankioblefaron, glokom, üveit, katarakt, lagoftalmi, ektropion, entropion, trikiyazis vb. sayılabilir.

### **2.2 Kimyasal Yaralanmaların Sınıflandırılması**

Korneal kimyasal yaralanmalarla ilgili sınıflama ilk kez 1964 yılında Ballen tarafından yapılmıştır.<sup>36</sup> Bundan 1 yıl sonra Roper-Hall korneal haze ve perilimbal iskemiye temel olarak bu sınıflamayı modifiye etmiştir (Tablo-1).<sup>37</sup>

Pfister daha sonra korneal haze ve perilimbal iskemiye gösteren resim ve fotoğraflarla yeni bir sınıflama yapmış ve hafif, hafif-orta, orta-ciddi, ciddi, çok ciddi olarak oküler kimyasal yaralanmaları 5 grupta sınıflandırmıştır.<sup>38</sup>



Dua ve arkadaşları saat kadranı olarak limbal tutulum ve bulbar konjonktivanın yüzdesel tutulumunu temel alan yeni bir sınıflama ileri sürmüşlerdir (Tablo-2).<sup>39</sup>

**Tablo-1: Roper-Hall (Ballen) sınıflaması**

Evre	Korneal Bulgular	Konjonktival Bulgular	Prognoz
Evre 1	Korneal epitelyal hasar	Limal iskemi yok	İyi
Evre 2	Korneal haze İris detayları görünüyor	<1/3 limbal iskemi	İyi
Evre 3	Total epitelyal kayıp Stromal haze İris detayları görünmüyor	1/3 - 1/2 limbal iskemi	Sınırlı
Evre 4	Kornea opak İris ve pupil görünmüyor	>1/2 limbal iskemi	Kötü

**Tablo-2: Oküler yüzey yanıklarının yeni sınıflandırması (Dua ve ark.)**

Evre	Prognoz	Limbal Tutulum (Saat Kadranı)	Konjonktival Tutulum (%)	Analog Ölçek (%)
1	Çok iyi	0	0	0/0
2	İyi	≤3	<30	0.1-3/1-29.9
3	İyi	3-6	>30-50	3.1-6/31-50
4	Belirsiz	6-9	>50-75	6.1-9/51-75
5	Kötü	9-12	>75, <100	9.1-11.9/75.1-99.9
6	Çok kötü	12	100	12/100

## 2.3 Oküler Kimyasal Yanıklara Yaklaşım

Kimyasal yaralanmaların yönetimi, yaralanmanın mekanizmasına ve ardından gelişen inflamatuvar sürece odaklanır.

### 2.3.1 Acil Tedavi

Akut yaralanma sonrası acil tedavi, nihai sonuçları olumlu etkiler. Temas eden kimyasal madde belirlenmeli, ancak bu tedaviyi geciktirmemelidir. Akut yaralanma sonrası kimyasal maddenin göz yüzeyinden uzaklaştırılması için uzun süre izotonik ve ya ringer laktat ile yıkama yapılmalıdır.<sup>16,26,40-43</sup> Eğer bu sınırlara ulaşılamazsa başka bir toksik ve kirli olmayan solüsyon örneğin karbonatlı içecekler tedavinin başlanmasına geç kalmamak için kullanılabilir. En az 10 dakika boyunca yıkama önerilmektedir.<sup>17</sup> Yıkama işlemi , intravenöz (İV) damar seti ,irriga edici spekulum veya İV sete bağlı özel bir skleral kontak lens olan Morgan medi-FLOW Lens kullanılarak da yapılabilir.

Oküler yüzey pH'ı bir idrar pH stribi ile kontrol edilerek 7.0-7.2 düzeyine gelene kadar irrigasyona devam edilmelidir. Eğer bu mümkün değilse pH'nın normale döndüğüne kanaat getirene kadar yıkamaya uzun süre devam edip fazladan tedavi uygulamak daha iyidir.

Yıkamanın ardından kalan partiküller nemli bir pamuklu çubukla veya uygun bir forseps yardımıyla alınmalıdır. Üst göz kapağının çevrilerek üst fornikte artık kalıp kalmadığının araştırılması yapılmalıdır. Göz kimyasal ajandan arındırıldıktan sonra canlılığını kaybetmiş kornea ve konjonktiva epiteli cerrahi spanç veya dakron pamuklu çubuğu ile debride edilir.

Silier spazmı çözüp ağrıyı azaltmak, damar permeabilitesini ve inflamasyonu azaltmak amacıyla sikloplejik ajanlar kullanılabilir.( Atropin %1 ,skopolamin %0.25 günde 2 defa veya homatropin %5 günde 3 defa )

Oftalmologlar dışındaki acil kimyasal yaralanmalara müdahale edecek kişilerin eğitilmesi iyi bir prognoz için çok önemlidir. Prognozun acil tedavi önlemleriyle yakından ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>17,44</sup>

### 2.3.2 Akut Tedavi

Tedavi planı büyük oranda muayene bulgularına bağlıdır. Akut tedavinin ana hedefleri; re-epitelizasyonu sağlamak, inflamasyonu azaltmak, enfeksiyondan korunmak, daha fazla epitel ve stroma hasarı oluşumunu önlemek ve sekeli minimuma indirmektir.

### 2.3.2.1 Re-epitelizasyonun Sağlanması

Prezervansız suni gözyaşları ve jeller persistan epitelyopatinin iyileşmesinde, rekürren erozyonların önlenmesinde ve vizüel rehabilitasyonun hızlandırılmasında etkilidir.<sup>45</sup> Genellikle yanık hastaları, kollajen sentezini ve yara iyileşmesini destekleyebilen sistemik askorbik asit tedavisinden fayda görürler.<sup>46-48</sup> İyileşmeyi teşvik eden birçok faktörü içeren otolog serum gözyaşı, epitelizasyonunu desteklemek için kullanılabilir.<sup>49-55</sup> Bandaj kontakt lensler gecikmiş epitel iyileşmesi olan hastalarda tercih edilebilir. Geniş çaplı, gaz geçirgen skleral kontakt lensler (Boston skleral lens) kimyasal ve ya termal yanıklar sonrası hastanede yatan hastalarda kullanılabilir.<sup>56-60</sup> Bu lensler aynı zamanda korneanın kurumasını önlemekte ve göz kapaklarının sürtünerek korneaya zarar vermesini önlemektedir.<sup>61</sup>

### 2.3.2.2 Antiinflamatuvar Tedavi

Topikal kortikosteroidler, kimyasal yaralanmalardan sonra akut inflamasyonun kontrolünde kritik bir rol oynamaktadır. İnflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltırlar ve nötrofillerin sitoplazmik ve lizozomal zarlarını stabilize ederler. Ön kamaranın yanı sıra konjontival inflamasyonun giderilmesini sağlarlar.<sup>62</sup> Bu ilaçların dezavantajı reepitelizasyonun ve kollajen sentezinin inhibisyonudur.

Topikal kortikosteroidlerle ilgili geleneksel düşünce; kollajen sentezinin inhibisyonu, korneanın incilmesi ve perforasyon riskleri nedeniyle 10-14 günden fazla kullanılmamalıdır.<sup>63,64</sup> Bu esasen ağır yaralanmalar sonrası görülen persistan epitel defektleri için bir endişe kaynağıdır. Eğer epitel defekti kapanmışsa kortikosteroidler 7-10 günden fazla da kullanılabilir.<sup>38,65</sup>

Sitrat, yanmış dokuya PMNL göçünü önlemek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır, böylece serbest radikallerin ve proteolitik enzimlerin salımını azaltır.<sup>46-48</sup> Serbest radikaller hidroksil iyonlarıyla oluşur ve askorbik asit ve tokoferollerle temizlenebilir.<sup>17</sup> Silier spazmı çözüp ağrıyı azaltmak, damar permeabilitesini ve inflamasyonu azaltmak amacıyla sikloplejik ajanlar kullanılabilir (Atropin %1 ,skopolamin %0.25 günde 2 defa veya homatropin %5 günde 3 defa). Sikloplejik damlalar ayrıca iris-siliyer cisim spazmından kaynaklanan ağrının azaltılmasını da sağlarlar.<sup>16</sup>

### 2.3.2.3 Antimikrobiyal Tedavi

Alkali yanık steril bir ülserasyon tablosu oluşturur ancak açık kornea epiteli ve erimeye başlayan stromal yüzey nedeniyle sekonder enfeksiyon riski her zaman mevcuttur. Bu sebeple

tedavi antimikrobiyal ajanları içermelidir (Polimiksin /basitrasin merhem günde 4 kez veya dördüncü kuşak florokinolonlar günde 4 kez kullanılır).

#### **2.3.2.4 Yüksek GİB Tedavisi**

Göz içi basıncı kontrolü mutlaka yapılmalıdır. Topikal ajanların yan etkilerinden kaçınabilmek amacıyla oral veya IV tedaviler tercih edilebilir (Mannitol %20 1-2g/kg 1-2 saat içinde IV, Asetazolamid 5-10mg/kg IV 6-8 saat arayla).

#### **2.3.2.5 Sekelden Korunma**

Göz yüzeyi, semblefaron oluşumu açısından her gün kontrol edilmelidir. Semblefaron oluşumunu etkin bir şekilde engellemek için fornikslere halka yerleştirilebilir.<sup>56</sup> Palpebral konjonktivanın bulbar konjonktivadan iyi ayrılmasını sağlayan en büyük boy tercih edilir. Bunlar akut fazda semblefaron oluşumunu başarılı bir şekilde engellemelerine rağmen, skarlaşma ve yapışıklık oluşumuna neden olan kronik sikatrisyel değişiklikleri engelleyemezler.

Korneal ülser ve melting ciddi kimyasal yaralanmalarda görülür. Korneal incelmeden PMNL'lerden ve yenilenen korneal epitel hücrelerinden salınan kollajenaz ve matriks metalloproteinaz (MMP)'lar sorumludur.<sup>66</sup> Aprotinin gibi proteinaz inhibitörleri ve sistein, asetilsistein, sodyum etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), kalsiyum EDTA, penisilamin, sitrat ve özellikle tetrasiklinler gibi kollajenaz inhibitörleri, korneal kimyasal yanıklardan sonra görülen incelmeyi önlediği gösterilmiştir.<sup>16,45,66-69</sup> Sistemik tetrasiklin, persistan korneal epitel defektlerinin iyileşmesini hızlandırır.<sup>56,70</sup>

#### **2.3.3 Kronik Tedavi**

Topikal nemlendirme; prezervan içermeyen suni göz yaşları ile yapılır. Anti enflamatuar tedavi; ideal olan kortikosteroid kullanımı kesilmiş veya azaltılmış olmalıdır. Anti mikrobiyal tedavi; kullanımına günde dört kez olarak yüzey epiteli iyileşinceye kadar devam edilmelidir. Göz içi basıncı kontrolü; aynı prensipler çerçevesinde takip ve tedaviye devam edilmelidir. Matriks metalloproteinaz inhibitörleri; yüzey epiteli iyileşinceye kadar epiteli destekleyen, stromal erimeyi azaltan bu ajanlara devam edilmelidir. Cerrahi tedavi; tenon fasyasının ilerletilmesi, inflamasyon kontrol edildiğinde limbal kök hücre transplantasyonu, skleral nekroza yönelik rotasyonel tarsokonjonktival greft uygulanabilir.

### 3. KORNEAL CROSSLINKING (CXL)

CXL; kornea içindeki kimyasal bağları güçlendirmek için fotosensitizör riboflavin ve UVA kullanılan bir tekniktir.<sup>5</sup> Riboflavin, kollajen fibriller arasında çapraz bağların indüksiyonu için bir fotosensitizör olarak çalışır ve aynı zamanda altta yatan dokulara UVA'nın penetrasyonunda bir kalkan gibi hareket eder.<sup>71</sup> CXL keratokonusta altta yatan patolojiye yönelik günümüzde tek tedavi seçeneğidir. Tedavinin amacı, keratektazisi olan hastalarda hastalığın ilerlemesini durdurmak ve keratoplastiden kaçınmaktır.<sup>72</sup>

#### 3.1 Tarihçe

CXL, doku fiksasyonu ve protez kalp kapağı sertleştirilmesi gibi birçok uygulama için yaygın olarak kullanılmıştır.<sup>73,74</sup> Biyolojik sistemlerde fotosensitize oksidasyon, ilk kez 1968'de Foote ve ark. tarafından tanıtıldı.<sup>75</sup> 1988'de Fujimori, üçüncü bir mekanizma ile Ozon (O<sub>3</sub>) ve ya ultraviyole (UV) ışık ile fotooksidasyon neticesinde tip 1 kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların meydana geldiğini göstermiştir.<sup>76</sup>

Korneada çapraz bağlama (CXL), 1998 yılında Almanya'da Spoerl ve arkadaşları tarafından domuz gözlerine uygulandı.<sup>77</sup> Çalışmada riboflavin-UVA (365 nm), glutaraldehit (%0,1 10 dk.) ve Karnovsky solüsyonu (%0,1 10 dk) etkinliği değerlendirilmiştir. Daha sonra bu üç ajan in vivo tavşan gözlerine uygulanmış ve riboflavin-UVA insan gözlerinde çalışılması için önerilmiştir.<sup>78</sup> Wollensak ve arkadaşları 1998 yılında insan gözleri üzerinde riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonu ile insanlar üzerindeki pilot çalışmalara başlamış ve sonuçlarını 2003 yılında yayınlamıştır.<sup>72</sup>

#### 3.2 Korneal CXL Temel Prensipleri

Kollajen, çeşitli insan dokularında destekleyici rol oynamaktadır. Kollajen monomerler arasındaki moleküler çapraz bağlar kollajen yapısını güçlendirir. Çapraz bağlanma, insan korneasındaki normal bir süreç olarak yaşlanma sırasında veya diyabet gibi hastalıkların bir sonucu olarak gerçekleşir. İnsan korneasında kollajen çapraz bağlanma süreci üç şekilde oluşur: enzimatik, glikasyon ve oksidasyon. Enzimatik çapraz bağlanma, kollajen fibrillerin normal olgunlaşmasının bir parçasıdır.<sup>79</sup> Kollajen fibriller salgılandıkları zaman, her iki ucunda kısa segmentlere sahip kollajen zincirler (telopeptidler) halindedirler. Bu aşamada üçlü helikal konformasyon henüz oluşmamıştır. Zincir sonlanma bölgelerindeki hidroksilizin rezidüleri çapraz bağlanma oluşumuna katılırlar. Çapraz bağlanmalar, kollajen telopeptidlerindeki lizin veya hidroksilizin aminoasitlerinin, lizil oksidaz enzimi ile ε-amino gruplarının oksidatif

deaminasyonu neticesinde meydana gelir. Doğal süreçte kollajen telopeptitleri arasında gerçekleşen bu çapraz bağlanmalar, kollajen fibrillerin üçlü helikal konfigürasyonunu oluşturur.

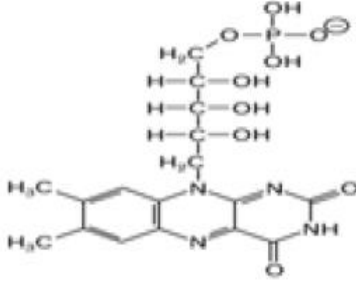
İkinci bir çapraz bağlanma yolağı yaşlanma sırasında oluşan, non enzimatik bir yol olan glikasyondur. Monosakkaridlerin bu reaksiyona uzun süre maruziyeti, protein moleküllerin şeker ve amino grupları arasında spontan oluşan bağların azalması ile sonuçlanır. Bu daha sonra daha kararlı ama reaktif Amadori ürünlerine (örneğin, HbA1c gibi) dönüşür. Sürecin devamında, diğer protein moleküllerinin amino grupları ile glukoz derive moleküller (pentozidin gibi) arasında ilave yavaş reaksiyonlar ile moleküller arası çapraz bağlanmalar meydana gelir. Bu glukoz derive moleküller glikasyon son ürünleri olarak adlandırılırlar.<sup>80</sup> Bu reaksiyon Maillard ve ya esmerleşme reaksiyonu olarak adlandırılır.<sup>81</sup> Yaşlılardaki kornea sertliği ve diyabetteki keratokonusun yavaş ilerlemesi bu mekanizmaya bağlanmıştır.<sup>82-84</sup>

Kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların oluşumundaki üçüncü mekanizma ise oksidasyondur. CXL, kollajen fibriller arasındaki bağları oluşturmak için oksidasyon reaksiyonlarından yararlanır.<sup>75</sup> Reaktif oksijen türleri (ROS) UV ışığı ile üretilir ve daha sonra monomerlerin çapraz bağlı polimer haline dönüştürülmesine aracılık eder.<sup>79</sup> Bu reaksiyona katılmak için dokuda oksijen bulunması gerekir. Richoz ve arkadaşları, CXL'nin biyomekanik etkisinin oksijene bağımlı olduğunu ve düşük oksijen basıncının CXL'nin etkisini azaltabileceğini buldu.<sup>85</sup> Kreuger ve ark. CXL sırasında oksijenin hızla tükendiğini gözlemleyerek oksijen ve ROS' un polimerizasyon sürecinde önemli rol oynadığı sonucuna vardı.<sup>86</sup>

Fotopolimerizasyon, endüstride UV ışınları gibi radyant enerji ile polimerlerin üretiminde kullanılmaktadır. Multifonksiyonel monomerlerin fotopolimerizasyonu, çok sayıda çapraz bağlantı içeren sert materyallerin üretimini sağlamaktadır. Bu yöntem endüstride, epoksi kaplamalar, optik lensler, optik fiber kaplamalar ve diş materyallerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Monomerler, UV ışık kaynağı ve ışık duyarlaştırıcı varlığında, çapraz bağlantılar ile polimerlere dönüşmektedir.

CXL tedavi, endüstride kullanılan UV aracılı fotooksidasyonun biyolojik sistemlere uyarlanmış şeklidir. Riboflavin ve UVA etkileşime girdiklerinde korneal stromada ROS oluşumuna neden olurlar. ROS, intrahelikal, interhelikal ve intermikrofibriller seviyede kollajen zincirlerinin aminoasitleri arasında oksidatif deaminasyon ve hidrojen bağ formasyonu oluşturur (Şekil-1).

### 1. Kombine riboflavin UVA uygulaması

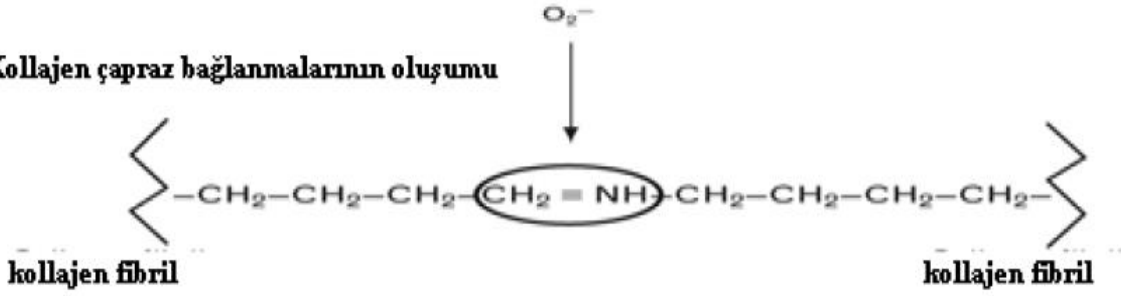


Ultraviyole ışınları



### 2. Oksijen radikallerinin üretimi

### 3. Kollajen çapraz bağlanmalarının oluşumu



**Şekil-1:** Işık duyarlaştırıcı riboflavin ve UVA reaksiyonu, ROS oluşumu ile sonuçlanır. ROS, çeşitli moleküllerle ileri tepkimeye girerek, kollajen fibrillerin amino grupları arasında yeni çapraz kovalent bağların oluşmasını sağlar. (Tip II fotokimyasal reaksiyon)

CXL tedavisinde kullanılan riboflavin, UVA'nın göz içine sınırlı penetrasyonuna yardım eder (370 nm dalga boyundaki UVA'nın %95'ini absorbe eder). Böylece, endotel ve göz içi yapıların hasarına karşı koruma sağlanır. Aynı mekanizmayla riboflavin, lensin ve retinanın doğal yapısında bulunarak UVA'nın hasar verici etkisinden korumaktadır.

### 3.3 Teknik

Teknik, kliniğimizde de mevcut olan, 365 nm dalga boyunda UVA ışığı üreten, "UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)" LED UVA ışık kaynağı üzerinden anlatılacaktır. Bu cihaz, geniş (11.5 mm), orta (9.5 mm) ve küçük (7.5 mm) olmak üzere 3 farklı büyüklükte homojen UVA spotu sağlamaktadır. Işık enerjisi, uygulama öncesinde özel UV dedektörü ile kalibre edilir. Uygun UVA enerji aralığı,  $3.0 \pm 0.3$  mW/cm<sup>2</sup> düzeyindedir.

Topikal anestezi sonrası (proparakain % 0.5) ultrasonik pakimetre ile korneal kalınlık birkaç noktadan ölçülür. Tüm noktalarda korneal kalınlık 400 µm'nin üzerinde olmalıdır. Korneal epitel, santralde 7-8 mm çapında ucu kör bir spatül veya % 20'lik alkol solusyonu ile

kaldırılır.<sup>87</sup> Bir başka yöntem ise, yoğun topikal anestezi uygulaması ile intakt olan epitelde gevşeme sağlamak ve ardından riboflavin solüsyonu uygulamaktır.<sup>88</sup> Ancak bu yöntem tartışmalıdır. Epitelin kaldırılmasının ardından, % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (10 ml %20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) kornea üzerine damlatılır.

Riboflavin uygulamasına, yarıklı lamba muayenesinde kobalt filtresi ile ön kamarada sarı flare tespit edildiğinde son verilir. Zaten bu durum, riboflavin uygulamasından ortalama 5 dk sonra ortaya çıkmaktadır.<sup>6</sup> Bu aşamada korneal kalınlık tekrar ölçülür, tüm noktalarda kalınlık 400 µm'nin üzerinde olmalıdır. Aksi takdirde, hipotonik % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (Medio-Cross hypotonic, Peschke Meditrade GmbH, Switzerland) her 10 saniye (sn)'de bir, 2 damla damlatılarak stromanın şişmesi ve korneal kalınlığın 400 µm'nin üzerine çıkması sağlanır. Bu uygulamayla genellikle 3 dk'da kornea kalınlığı 350 µm'den 400 µm'ye ulaşmaktadır. Bu aşamadan sonra UV-X ışık kaynağı, kornea yüzeyine 5 cm mesafede homojen UVA spotu oluşturacak şekilde yerleştirilir. Cihazın spot büyüklüğü, potansiyel limbal tosisiteye neden olmayacak şekilde ayarlanır. (Genellikle orta spot çapı tercih edilir) UVA ışığı, 3 mW/cm<sup>2</sup> dozunda (5.4 Joul/cm<sup>2</sup>), 30 dk boyunca uygulanır. Bu arada her 5 dk'da bir riboflavin solüsyonu damlatılmaya devam edilir. Bu protokolün varyasyonları, preoperatif pilokarpin (% 1) damlatılması, 9 mm'lik çapta epitelin kaldırılması ve uygulama sonrası korneal bulanıklığın önlenmesi amacıyla tedaviye steroidli damlaların ilave edilmesidir (Siena protokolu).<sup>89</sup> Tekniğin bir başka modifikasyonu ise, santral 9 mm'lik çapta epitelin kaldırılması ve her 3 dk'da bir damla olmak üzere 30 dk boyunca riboflavin solüsyonunun damlatılmasıdır.<sup>6</sup> Cihaz, 30 dk boyunca devam eden uygulamanın ardından otomatik olarak işleme son verir. Tedavi, reepitelizasyonun kalitesini bozmayacak, oksijen geçirgenliği iyi seviyede olan yumuşak kontakt lens uygulaması ile sonlandırılır.

Postoperatif yönetim Fotorefraktif Keratektomi (PRK)'ya benzer, ağrı kontrolü ve korneal epitelin iyileşmesini teşvik etmek en önemli noktalardır. Ağrı, ilk 24-48 saatte daha fazladır ve kademeli olarak azalır. Ağrısız geçen 5-7 gün sonunda kontakt lens çıkarılır. Topikal antibiyotik, enfeksiyon profilaksisi amacıyla verilir. Bunun için, 4. kuşak kinolonlar kullanılabilir. Ön kamara penetransı düşük steroidlerin (fluorometholone gibi) kullanımı opsiyoneldir.



### 3.4 CXL Endikasyonları ve Kontrendikasyonları

CXL önceleri keratokonus ve diğer korneal ektazilerin tedavisinde kullanılsa da son yıllarda birçok hastalıkta denenmiş ve faydalı bulunmuştur. CXL tedavi endikasyonları:

- Keratokonus ve diğer kornea ektazileri
- Enfeksiyöz keratitler<sup>90</sup>
- Laser-Assisted in Situ Keratomileusis (LASİK) sonrası gelişen korneal ektazilerin tedavisinde<sup>91-93</sup>
- İntrastromal halka tedavisi sonrası etkinliği arttırmak amacıyla<sup>94</sup>
- Büllöz keratopatiye korneal saydamlığı arttırmak, kornea kalınlığını azaltmak ve ağrıyı azaltmak amacıyla<sup>95</sup>
- Korneal melting ve yüzeysel ülserlerde perforasyona gidişi önlemek amacıyla<sup>96</sup>

Her ne kadar etkili ve güvenli bir yöntem olsa da CXL tedavisinin kontrendikasyonları vardır. CXL tedavi kontrendikasyonları:

- 400 mikronun altında kornea kalınlığı standart tedavi protokolüne kontrendikedir
- Geçirilmiş Herpetik enfeksiyon (reaktivasyona neden olabilir)
- Ciddi korneal skar ve ya opasifikasyon
- Zayıf epitel yara iyileşmesi öyküsü
- Ciddi oküler yüzeysel hastalığı (kuru göz vb.)
- Otoimmün bozukluk

### 3.5 CXL'in Etkinliği ve Klinik Sonuçları

Keratokonusta CXL'in etkinliğini değerlendirmek için dünya çapında çeşitli klinik çalışmalar yürütülmüştür. İnsan gözlerindeki ilk klinik çalışma 2003 yılında yayınlandı.<sup>72</sup> Bu randomize olmayan pilot çalışmada, Wollensak ve arkadaşları, 23 gözde CXL'in etkinliğini araştırdılar. Çalışmalarının sonuçları, tüm gözlerde keratokonus progresyonunun durdurulduğunu gösterdi. Wollensak'ın çalışmalarından sonra çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır. İtalya-Siena'da yapılan bir çalışmada CXL'in keratokonus progresyonu üzerinde etkisi incelenmiş.<sup>97</sup> Bu çalışmanın ön sonuçları, CXL'in tedavi edilmiş hastaların düzeltilmemiş görme keskinliğini (UCVA) ve düzeltilmiş görme keskinliğini (BCVA) iyileştirdiğini göstermiştir. Ayrıca yazarlar, CXL'in keratokonik gözlerde keratometrik değerleri

iyileştirebildiğini ve yüksek sıralı aberasyonları azaltabileceğini belirtmişlerdir.<sup>89</sup> Siena çalışmasının uzun dönem sonuçları CXL'in keratokonusta stabilite oluşturmada yararlı olduğunu göstermiştir.<sup>97</sup> Aralık 2011'de yayınlanan 142 keratokonuslu gözle yapılan bir Fransız araştırmasında, CXL'den bir yıl sonra, keratokonusun ilerlemesi gözlerin %69'unda durmuştu ve 13 gözün en dik eğrisi, 2.0 dioptriden fazla bir azalma göstermişti.<sup>98</sup> Bu çalışmada BCVA hastaların %40'ında arttı, %48'inde sabit kaldı ve %12'sinde azalma gösterdi. Komplikasyon oranı ise %3,5 olarak bildirildi.

CXL, keratokonusun progresyonun uzun vadede önlemede etkilidir. Raiskup ve arkadaşları retrospektif bir çalışmada CXL'nin uzun dönem etkinliğini değerlendirdiler. CXL'den 10 yıl sonra, Kmax ve Kmin anlamlı olarak azaldı ve BCVA'da anlamlı bir iyileşme gösterildi.<sup>99</sup> O'bart ve arkadaşlarının da 7 yıllık bir izlem sonucu benzer sonuçlara vardıkları görülmüştür.<sup>100</sup>

Teorik olarak, UVA ışığı endotel hücresi tabakasına zarar verebilir ve bu nedenle CXL 400 µ'den daha ince kornealarda kontrendikedir. Bazı çalışmalar, CXL'i takiben endotel hücresi sayısında azalma olduğunu bildirmiştir, ancak endotel hücrelerindeki azalma, bu çalışmaların hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı değildi.<sup>98,101-103</sup>

LASIK ve PRK'nın kornea stabilitesini ve genel kornea doku kuvvetini değiştirdiği bilinmektedir. Profilaktik CXL'in bu hastalarda PRK öncesi ve ya eş zamanlı uygulanmasının komplikasyonlara karşı koruyucu olabileceği savunulmuştur.<sup>104</sup> Bu tedavinin özellikle form frust keratokonustan şüphelenilen ve ya -8 Diyoptriden fazla düzeltme gerektiren hastalarda faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu hastalar kornea sertleşmesinden fayda görebilirler, çünkü keratektazi gelişmeyebilir. Dresden Üniversitesi'nde gerçekleştirilen LASIK sonrası iyatrojenik keratektazinin erken tedavileri, refraktif cerrahi sonrası ektazinin ilerlemesinin önlenmesinde etkili gibi gözükmektedir. Hafezi ve arkadaşları LASIK sonrası keratektazi gelişen 10 hastada yapmış oldukları çalışmada, 25 aylık takip sonunda CXL'in keratektaziyi durdurduğunu ve ya kısmen geri çevirdiğini, maksimum keratometri değerlerini de azalttığını göstermiştir.<sup>105</sup>

CXL, kornea ödemi için de bir tedavi olarak önerilmiştir. Bu kavram, domuz korneasının CXL sonrası hidrasyon davranışındaki değişiklikler ve stromal sertleşmenin izlendiği gözlemiyle desteklenmektedir. Ehlers ve Hjortdal, CXL ile tedavi edilen 11 gözün 10'unda kornea kalınlığında bir azalma olduğunu bildirdiler, hastaların çoğunluğunda görme keskinliğinde de bir iyileşme söz konusuydu.<sup>106</sup> Wollensak ve ark. bu etkiyi psödo-fakik büllöz

keratopati, korneal transplant reddine bağılı ödem ve Fuchs endotelyal distrofisi bulunan 3 hastada denemişler.<sup>107</sup> Epitelin büllöz değişiklikleri belirgin şekilde iyileşti ve ağrı ile rahatsızlık hissini azalmasına neden oldu. % 40 glukoz kullanılarak 1 gün süreyle dehidrasyon yapıldıktan sonra, tedavi için Wollensak ve arkadaşları tarafından standart CXL tekniği kullanıldı. Korneanın kalınlığı CXL'den 3 gün sonra  $90.33 \pm 17.04$  mikron ve 8 ay sonra sonra  $93.67 \pm 14.22$  mikron azaldı. Daha önce stromal skar gelişmeyen olguda görme keskinliği önemli derecede düzeldi. Krueger ve arkadaşları, ilerlemiş bir büllöz keratopati vakasında CXL uygulayarak benzer sonuçlar elde etti.<sup>108</sup> Cesaret edici bulgulara rağmen, büllöz keratopatide CXL'in uzun süreli etkisini doğrulamak için daha uzun takip gereklidir. Bununla birlikte, CXL için bu varsayılan uygulama, keratokonus dışındaki bir durumda kornea nakli ihtiyacını azaltma potansiyeline sahip olması açısından caziptir.

Riboflavinin fotoaktivasyonunun antimikrobik etkileri de kornea enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılabilir. Riboflavin, nükleik asit için ılımlı bir affiniteye sahiptir ve UVA'nın emilmesi, guanin bazlarının oksidasyonuna yol açar, böylece viral ve bakteriyel genomun çoğalmasını engeller.<sup>109</sup> Bu etki UVA ışınının direkt antimikrobiyal etkisi ve oksijen radikallerinin neden olduğu mikrobiyal hücre membranları ile DNA hasarına sinerjistikdir. Martins ve ark., 2008'de yaygın patojenlere karşı CXL'in antimikrobiyal özelliklerini göstermişlerdir.<sup>110</sup> Bu çalışmada bir grup bakteri; psödomonas aeruginosa (PA), stafilokokus aureus (SA), stafilokokus epidermid (SE), metisiline dirençli S. aureus (MRSA), çoklu ilaca dirençli P. aeruginosa (MDRPA), ilaca dirençli Streptococcus pneumoniae (DRSP ) ve candida albicans (CA) test edildi. Riboflavin/UVA SA, SE, PA, MRSA, MDRPA ve DRSP'ye karşı etkili ancak CA üzerinde etkisizdi. Iseli ve arkadaşları, CXL'i korneal melting ile ilişkili enfeksiyöz keratit tedavisinde etkinliğini değerlendirmiştir.<sup>96</sup> Korneal melting ile ilişkili keratiti bulunan 5 hasta CXL ile tedavi edilmiş, Hastaların tümü sistemik ve topikal antibiyotik tedavisine cevap vermeyen hastalardan seçilmişti. CXL sonrası takipler 1-9 ay arasında idi. Tüm olgularda kornea erimesinin ilerlemesi CXL tedavisinden sonra durdurulmuştur.

CXL'in korneayı en az 8 mm çapa ve anterior/mid-stromayı içeren derinliklere kadar steril etme kabiliyetine sahip olduğu kanıtlanmıştır, bu nedenle birçok korneal enfeksiyon tek bir işlem ile kontrol edilebilir.

### 3.6 CXL Komplikasyonları

CXL'in birçok uzun ve kısa vadeli komplikasyonları incelenmiş ve belgelenmiştir.<sup>97,99</sup> Tekniğin yanlış uygulanması, yanlış hasta seçimi, yumuşak kontakt lens kullanımına bağlı sekonder sebepler, kötü hasta hijyeni, tanı almamış eşlik eden oküler yüzey hastalıkları bu komplikasyonların artmasında etken olabilmektedir.

Kornea epitelinin debridmanı, korneayı mikrobiyal enfeksiyonlara karşı duyarlı hale getirmektedir. Postoperatif dönemde E.Coli, SE, PA geliştiği bildirilen etkenler arasındadır.<sup>111-113</sup> Zayıf kontakt lens hijyeninin neden olduğu polimikrobiyal keratit (streptococcus salivarius, streptococcus oralis, koagülaz negatif stafiloc) gelişen bir olgu bildirilmiştir.<sup>114</sup> Yine postoperatif dönemde bandaj kontakt lens takıldığından haberi olmayan ve yüzünü musuk suyuyla yıkayan bir hastada Akantamoeba keratiti sonrasında perforasyon geliştiği bildirilmiştir.<sup>115</sup> Herpetik keratit öyküsü olmayan bir hastada tedaviden beş gün sonra herpes simpleks keratitine bağlı coğrafik ülser ve iritis geliştiği bildirilmiştir.<sup>116</sup>

Korneal haze CXL sonrası gözlenen en sık komplikasyondur. Evre 1-3 keratokonuslu 127 hastanın 163 gözü üzerinde yapılan retrospektif bir çalışmada, hastaların % 8,6'sında 1 yıllık izlem sonrasında klinik olarak anlamlı bir haze geliştiği görülmüş.<sup>117</sup> Steroide dirençli korneal haze gelişen olgular incelendiğinde santral kornea kalınlığı daha ince, keratometri değerleri yüksek, ileri keratokonuslu olgularda kontrol grubuna göre daha sık geliştiği görülmüştür.<sup>118</sup>

Endotel hasarı eşiğinin 0.35 mW/cm<sup>2</sup>'lik bir ışınımında olduğu gösterilmiştir; bu, önerilen protokolü kullanırken korneal endotele ulaşan 0.18mW/cm<sup>2</sup>'nin yaklaşık olarak iki katı daha fazladır.<sup>119</sup> 400 µm'den küçük santral kornea kalınlığı varlığında ya da işlem sırasında yapılan odaklama hatalarında endotel hasarı gelişebilir ve korneal perforasyonla sonuçlanabilir. UV ışınlanması çeşitli göz içi yapılara zarar verebileceğinden, önerilen güvenlik kriterlerine uyulmalıdır.

CXL sonrası stafilocok antijenlerine karşı gelişen steril periferik infiltrat geliştiği bildirilmiş, bunun kontakt lens ilişkili olabileceği düşünülmüştür.<sup>120</sup>

#### 4. MATRİKS REJENERASYON AJANI (RGTA)

RGTA (Cacicol20®, Paris, Fransa) enzimatik bozunmaya dirençli HS analoglarından geliştirilen biyopolimerlerdir. Hasarlı dokuda azalmış HS'ın yerini alarak ECM proteinlerini ve büyüme faktörlerini bağlar, ECM'i proteolizisten korur, yara iyileşmesi için gerekli olan mikroçevreyi çeşitli proteolitik enzimleri inhibe ederek yeniden oluşturur, inflamasyon kontrolünde ve kollajen sentezi regülasyonunda rol oynarlar.<sup>10</sup> Persistan epitel defektleri, nörotrofik ülserler, refraktif cerrahi sonrası gibi pek çok alanda denenmiş olup korneal iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir.<sup>10-14</sup>

RGTA oftalmolojide ilk kez 2005 yılında prelinik bir tavşan çalışmasında denenmiştir.<sup>121</sup> Bu çalışmada oluşturulan alkali hasardan 1 saat sonrasında tek sefer RGTA damlatılmış ve epitel iyileşmesini hızlandırdığı, klinik bulguları geriletmediği, korneal opasiteyi azalttığı ve histolojik göstergeleri iyileştirdiği gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan 2 yeni çalışmada korneal alkali yanık sonrası RGTA tedavisi uygulanmış ve epitel iyileşmesi, inflamasyon, ve histolojik bulgular (neovaskülarizasyon, ödem, fibrozis, inflamatuvar hücreler) üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.<sup>122,123</sup>

İnsanlarda RGTA ilk kez korneal ülser ve tedaviye dirençli ciddi kornea distrofilerinde denenmiştir.<sup>124</sup> Bu sonuçların ardından nörotrofik keratopati ve kornea ülseri vakalarında RGTA kullanan birkaç vaka raporu, tedavinin pozitif etkilerini ortaya koymuştur.<sup>12,125,126</sup> Excimer laser uygulaması ile yapılmış çalışmalar, RGTA'nın epitel iyileşmesini arttırdığını ve sinir rejenerasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir.<sup>127-129</sup>

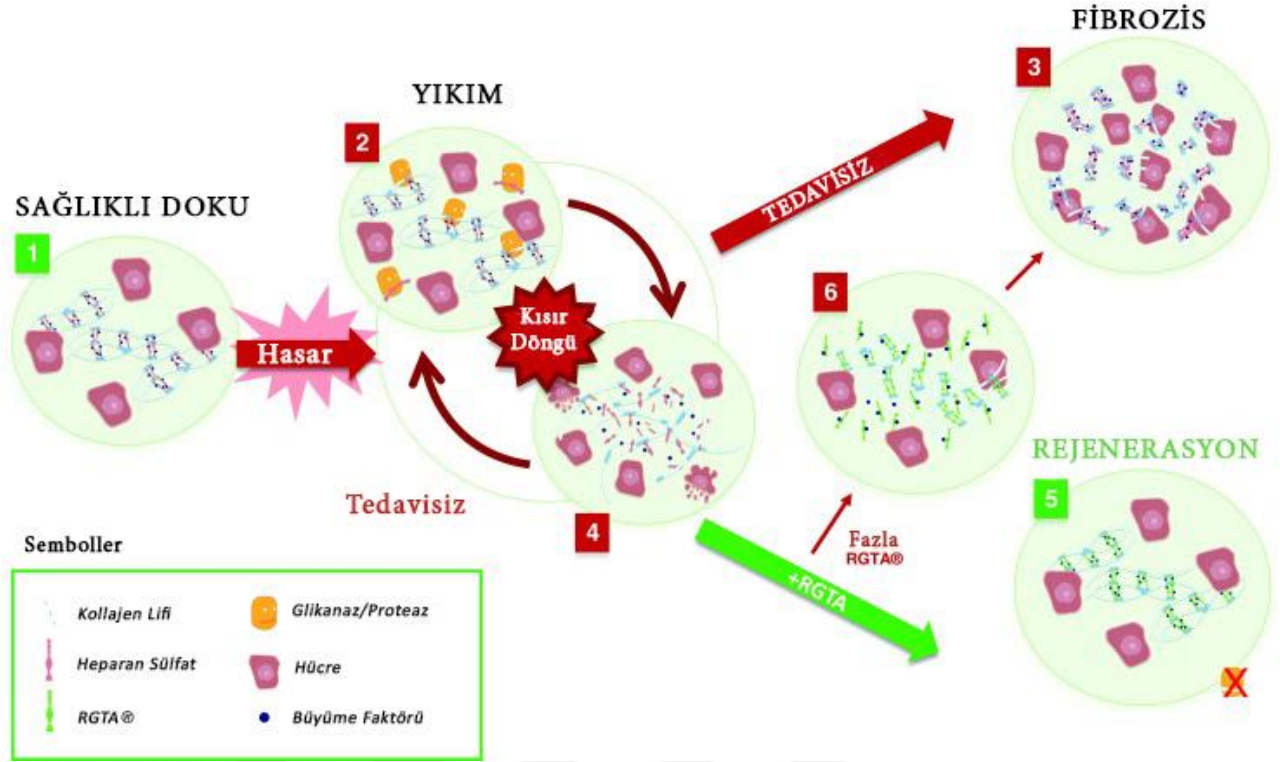
##### 4.1 Kimyasal Yapı ve Stabilite

RGTA'nın en önemli özelliklerinden biri olan doğal kaynaklı HS'a yapısal ve işlevsel olarak benzer olsa da enzimatik bozunmaya karşı direncidir. Bu, RGTA'ların kontrolsüz proteolitik aktivite ile karakterize kronik yaraların mikro ortamında dahi yapılarını ve aktivitelerini korumasını sağlar.<sup>130,131</sup> Hasar gören dokuda hücre yüzeyinde ve ECM içinde yer alan HS, heparinaz enzimi ile; yara iyileşmesi ve hemoestaz için gerekli diğer ECM elemanları da lokal olarak salgılanan proteazlar tarafından yıkıma uğrar. Enzimatik bölünmeye duyarlı  $\beta$ 1-4 karbon-karbon bağlarıyla bağlantılı olan HS dissakarit alt birimlerinin aksine, RGTA alt birimleri  $\alpha$ 1-6 karbon-karbon bağlarıyla bağlantılı olup, RGTA, doğal GAG'ları sindirdiği bilinen endoglikozidazlar, kondroitinaz ABC, dekstranaz, hiyalüronidaz ve heparinaz I, II ve III tarafından bozunmaya tamamen dirençlidir.<sup>130</sup> Bu şekilde, RGTA, zararlı mikro çevreyi tersine döndürerek ve doku iyileşmesini destekleyerek yıkılan HS'ı yenileyebilir.

## 4.2 RGTA Etki Mekanizması – Yapısal ve Koruyucu Roller

Hasar gören doku sahasındaki HS'ın bozulması, ECM'in dağılmasına ve proteaz aktivitesine yönelik yapısal ve haberleşme proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olur. RGTA, kollajen, fibronektin ve laminin gibi yapısal proteinlerde bulunan serbest heparan bağlanma bölgelerine bağlanıp hasarlı dokuya spesifik olarak yerleşerek ECM'in doğal mimarisinin restorasyonunu teşvik eder.<sup>132</sup> Bu bağlanmanın iki önemli sonucu vardır. Birincisi, matriks proteinlerini proteolitik bozulmadan korur ve ikincisi, doku onarımı için elverişli bir mikro ortamın yeniden sağlanmasında gerekli ilk adım olan ECM iskeletinin yeniden yapılandırılmasını kolaylaştırır (Şekil-2).





**Şekil-2** (Barritault D, Gilbert-Sirieix M, Rice KL, et al. RGTA® or ReGeneraTing Agents mimic heparan sulfate in regenerative medicine: from concept to curing patients. *Glycoconjugate Journal*. 2017;34(3):325-338. doi:10.1007/s10719-016-9744-5.)

1-Sağlıklı dokuda Ekstraselüler Matriks (ECM) organizasyonu. Mavi noktalar, glikozaminoglikanlar tarafından depolanan ve korunan iletişim peptidlerine karşılık gelir. Heparan sülfat (HS) (açık pembe heliksler) matriks proteinlerini (beyaz içcikler) hücrelere bir iskele oluşturacak şekilde bağlar. 2-Geniş doku hasarının ardından HS, glikanaz (sarı figürler) ile parçalanır, ECM iskele yapısı yok edilir, proteazlar (sarı figürler) matris proteinlerini yok eder ve büyüme faktörlerini depolayabilir. 3-Skar veya fibrozisle sonuçlanan hızlı onarım yanıtı tetiklenir. 4-Lezyonun nedeni çözülmezse, yaralar enflamatuvar fazda kalır ve bir tamir ve yıkım döngüsüne neden olur. 5-RGTA (yeşil heliksler), bozulmuş HS'ın yerine geçer ve ECM iskeletinin yeniden yapılandırılmasına ve hücresel mikro ortamın yeniden oluşturulmasına izin verir. Bu, doku yenilenmesini ve dokunun sağlıklı dokuya benzer bir duruma getirilmesini kolaylaştırır. 6-Aşırı RGTA, büyüme faktörleri ve iletişim peptidlerini yaradan uzaklaştırarak iyileşme sürecini engelleyebilir. Bu durumda etkin yara iyileşmesi için gerekli olan büyüme faktörlerinin biyoyararlanımı azalır. Bu nedenle RGTA tedavi protokolünü (doz ve zamanlama) dokuya spesifik matriks turnoverına göre ayarlanması önemlidir.

RGTA'nın sinyal peptidlerini ve büyüme faktörlerini koruması ve potansiyalize etmesi, ECM iletişim ağını yeniden kurma kabiliyeti, RGTA'nın terapötik etkisinin temelini oluşturan bir diğer önemli özelliğidir ve iyi dökümente edilmiştir. Kronik yaralarda matriks oluşumu, remodeling, granülasyon dokusu oluşumu ve re-epitelizasyon için gerekli büyüme faktörlerinin seviyesi azalmıştır. Bu, kısmen inflamasyon hücreleri tarafından salınan yüksek miktarda proteolitik enzimlerin yanı sıra reaktif oksijen türlerinin varlığına bağlıdır. RGTA; Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve Transforming büyüme faktörü- $\beta$  (TGF $\beta$ ) gibi çok sayıda heparin bağlayıcı büyüme faktörlerine veya Stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1) gibi kemokinlere bağlanır ve bu şekilde biyoyararlanımlarını kontrol eder, onları proteolitik bozulmadan korur (doğrudan bağlanmanın koruyucu etkisinden dolayı ve / veya RGTA'nın plazmin veya nötrofil elastaz gibi enzimleri inhibe etme kabiliyeti nedeniyle olabilir) ve ayrıca reseptörleri için affiniteyi arttırabilir.<sup>133-139</sup> RGTA büyüme faktörlerinin dağılımını yeniden düzenleyerek oksidatif stres ve apoptoza karşı genel koruma sağlayan, hücre göçü ve farklılaşması, anjiyogenez gibi doku iyileşmesi ve yenilenmesine katkıda bulunan önemli işlemleri etkileyebilir.<sup>138,140-143</sup>

Daha basit mekanik modelden, RGTA'nın etki mekanizması ile ilgili mevcut anlayışımız, değiştirilmiş ECM ortamında, RGTA'nın bozulmuş GAG ve kısmen HS'ın yerine geçtiğidir. Bu yolla, RGTA selektif olarak heparin bağlayıcı sitokinleri ve yapısal proteinleri korur, doğal matriks reorganizasyonunu kolaylaştırır ve doku homeostazını ve/veya onarımını destekler. RGTA'nın bilinen spesifik reseptörleri olmamasına rağmen, ECM'deki çeşitli HS bağlayıcı proteinlerle etkileşim kapasitesi ile, RGTA düşük affiniteli bir heparan bağlayıcı protein reseptör benzeridir. Matriks bileşenlerinin dönüşümü, dokuya özgüdür ve aynı zamanda yaranın derecesine bağlıdır. RGTA'nın iyileştirme kapasitesi, uygulanan doz ve kullanım sıklığına bağlıdır. Matriksin reorganizasyonunun sağlandığı ve matriksin protein bağlayıcı kısımları doygunluğa ulaştığı zaman serbest ve fazla RGTA halihazırda kaynamış yara dokusu faktörlerini çekmesinden dolayı zararlı olabilir (Şekil-2). Uygulanacak doz ve zamanlama dokudan dokuya ve iyileşme derecesine göre değişkenlik gösterebileceği için matriks dönüşümünü yansıtabilecek şekilde adapte edilmelidir.

### **4.3 RGTA Kornea Pre-klinik Çalışmalar**

RGTA'nın oküler yüzey inflamasyonunu kontrol altına aldığını ve kornea iyileşmesini hızlandırdığını gösteren belli başlı çalışmalar sonrasında, RGTA oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde önemli potansiyel teşkil etmektedir. Tavşan korneasında alkali yanık modelinde, yaralanma sonrası RGTA ile tek tedavi uygulaması ile RGTA'nın azalan inflamasyonla



birlikte re-epitilasyonu kolaylaştırdığı, histolojik paternleri (ödemi, fibrozis, kan ve inflamatuvar hücreleri azalttığı) ve spesifik kornea iyileşmesini hızlandırdığı ve normal kornea yapısına çok yakın doku organizasyonu sağladığı gözlemlenmiştir.<sup>122</sup> Daha sonrasında benzer bir kornea alkali yanık modelinde, yaralanmadan bir saat sonra uygulanan RGTA' nın kontrol grubuna göre kornea kalınlığında azalma, inflamasyon ve neovaskülarizasyonun baskılanması ile birlikte kornea iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir. Daha da önemlisi, yaralanmadan bir ay sonra uygulanan RGTA ülserleri iyileştirmiştir; bu da gösterir ki RGTA yaralanma sonrası koruyucu etkiyi arttırmakla kalmaz, aktif olarak yaralı dokuların iyileşmesini de teşvik eder.<sup>123</sup> Korneal hasar sonrasında, korneada antioksidan seviyelerinin düştüğü, prooksidan ve antioksidanların arasında bir dengesizlik oluştuğu ve oluşan toksik oksijen ve nitrojen ürünlerinin kornea hasarına yol açtığı gözlemlenmiştir. Cejkova ve ark. yapmış olduğu çalışmada görülmüş ki RGTA, süperoksit ve nitrik oksit oluşturan enzimler ile proteolitik enzimlerin açığa çıkmasını azaltarak ikili bir rol üstlenir: aşırı proteolizisi engeller ve aynı zamanda toksik oksijen ve nitrojen ürünlerinin yol açtığı kornea hasarını engeller.<sup>123</sup> Ayrıca PRK sonrası kornea ülserli fare modelinde RGTA tedavisi korneanın saydamlık derecesini arttırmış ve kornea epitel sitolojisini ve sinirlerin yeniden oluşumunu desteklemiş ve stromal miyofibroblastların varlığını azaltmış veya geciktirmiştir.<sup>129</sup>

Bir çalışmada tavşanlarda transepitelyal fototerapötik keratektomi (PTK) ile anterior korneanın terapötik lazer ablasyonundan sonra epitel iyileşmesi, korneal sinir rejenerasyonu ve oküler yüzey iyileşmesini desteklemedeki RGTA'nın etkinliği değerlendirilmiştir.<sup>144</sup> Bu çalışma RGTA'nın PTK tedavisi sonrası oküler yüzey iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir.

#### **4.4 RGTA Kornea Klinik Çalışmalar**

Bugüne kadar RGTA, kornea epitelini ve stromayı etkileyen yaralanmalarda 5000'in üzerinde hastanın tedavisinde kullanılmış ve bu hassas dokunun iyileşmesinde etkili olduğu 100'ün üzerinde klinik vaka ve yayın ile desteklenmiştir.<sup>145</sup> En önemlisi, bu raporlar ve devam eden çalışmalarda , RGTA iyi tolere edilmiş ve hiçbir yan etki rapor edilmemiştir. Kronik korneal hasarlarda RGTA'nın ağrıyı azalttığı görülmüştür;<sup>124</sup> bu da RGTA'nın antienflamatuvar özelliğini yansıtmaktadır.

Nörotrofik keratit, kornea epitelini etkileyen bir hastalıktır. Bunun altında birçok neden yatabilir; herpes keratiti, kimyasal veya fiziksel yanıklar, topikal ilaç toksititesi, diyabet, oküler cerrahi işlemler ve diğerleri. Bu dejeneratif hastalık, kronik inflamasyon ve hücre bozulması veya korneal vaskülarizasyon sonucu olarak ülsere, enfeksiyona ve perforasyona gidebilen

zayıf korneal iyileşme ile karakterizedir. Ciddi nörotrofik ülserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, RGTA 9 haftalık tedavi sonrasında (her iki günde bir), 11 hastanın 8' inde korneada tamamen iyileşme sağlamıştır.<sup>10</sup> Bu çalışma nörotrofik ülserli hastalarda daha önceki gözlemleri desteklemektedir.<sup>12,126</sup> Ciddi kornea distrofilli veya kornea ülserli 10 hastada yapılan ikinci bir çalışmada bir ay boyunca uygulanan haftalık RGTA tedavisi, azalan ağrı ile birlikte ülserlerin çoğunda iyileşme ve inflamasyonda iyileşme sağlamıştır.<sup>124</sup> Ancak bu çalışmada, tedavinin sonlandırılmasından sonra birçok hastada bu etkiler tersine döndüğü için, doz ve tedavinin optimizasyonu gerekmiştir. Her iki çalışmada da unutulmamalıdır ki hastalar önceki tedavilere direnç göstermişlerdir.

RGTA aynı zamanda kornea cerrahisi sonrasında iyileştirici ajan olarak gösterilmiştir. Transepitelyal PTK ile kornea epiteli kazınan keratokonuslu hastalarda RGTA tedavisinden 3 gün sonra gözlerin %61,1'inde tamamen iyileşme izlenirken kontrol grubunda bu oran %11,1 olarak gerçekleşmiştir.<sup>127</sup>

RGTA'nın diğer tedavi yöntemleriyle birlikte başarıyla kullanıldığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır; örneğin reepitelizasyonda etkili olduğu bilinen bandaj kontakt lensler ile birlikte kullanımı<sup>146</sup> veya keratokonususta CXL tedavisi sonrası kullanımı<sup>147</sup> gösteriyor ki RGTA kombine tedavilerde önemli bir ajandır.

Tüm bu çalışmalar gösteriyor ki RGTA matriks bazlı terapi korneayı etkileyen çeşitli yaralanmalara karşı etkili ve non-invaziv yaklaşımdır ve daha geniş ve randomize hasta örneklemiyle daha fazla araştırma yapılmalıdır.

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneklere alkali yanık modeli uygulanması, RGTA tedavisi, kollajen crosslinking işlemi, sakrifikasyon ve alınan korneal dokuların hazırlanması işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler, görüntüleme işlemleri ve immünohistokimyasal boyama işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

### 5.1 Denekler

Çalışmamızda toplam 24 adet, sağlıklı Avustralya-Yeni Zelanda Irkı (1500-2000 gr) albino dişi tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanları, Bursa Aykut Bolu Deney Hayvanları Merkezi'nden (ABDEHAM) temin edilerek, DETAB'da kendileri için özel üretilmiş olan tavşan kafeslerinde, tek ya da ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, ısı (21±2°C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00-18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

### 5.2 Model Oluşturulması

Denekler DETAB'da 20 günlük karantina sürelerinin ardından hepsi sağlıklı olarak çalışmaya başlandı. İlk gün tüm deneklere alkali yanık modeli oluşturuldu. Model sonrası her grupta 8 denek olacak şekilde denekler 3 gruba ayrıldı.

1N (1 Normal) NaOH ve 8 mm çaplı daire şeklinde Watman filtre kağıtları kullanıldı. Filtre kağıtları 60 sn boyunca 1N NaOH içerisinde bekletildi, ardından bu filtre kağıtları Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0.5; Alcon) ile topikal anestezi uygulanarak, kapak spekulumu takılan deneklerin sağ santral kornealarına uygulandı ve 60 sn beklendi. Sonrasında alkali ajan hemen uzaklaştırılarak 2 dakika boyunca 500 cc %0.9 Sodyum klorür (NaCl) ile oküler yüzey yıkandı ve nekroze olan dokular uzaklaştırıldı.

### 5.3 Çalışma Dizayını

İlk gün model oluşturulmasının ardından gruplar belirlenmeden tüm deneklerin ön segment kornea fotoğrafları (software version 3.13.1; TOPCON Slit Lamp Microscopy 703963 Tokyo, Japan) ve ön segment optik koherans tomografileri (software versiyon 6.0.11.0 ; Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany) çekilmiştir. Optik koherans tomografi kesitlerinden mikrometrik olarak yanık büyüklükleri ölçülmüş ve gruplar homojen olarak her

grupta 8 er denek bulunacak şekilde oluşturulmuştur. Çalışmaya alınan tüm deneklerin yanık dereceleri Roper Hall sınıflamasına göre 4. derece (total epitel defekti ve pupilla ve iris görünümünü engelleyen opak kornea) olduğu gösterilmiştir. RGTA grubu olarak belirlenen iki deneğin yanık büyüklükleri ve dereceleri çalışma standartlarına uymayan dereceler olduğu için denekler hesaplamalara katılmamıştır. İstatistiksel hesaplamalara katılmayan bu deneklere çalışma standartları aynı şekilde uygulanmıştır.

Tüm gruplara medikal tedavi aynı şekilde uygulanmıştır. Medikal tedavi olarak enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla yanık oluşumundan itibaren deney sonlanıncaya kadar moksifloksasin %0,5 (Moxai®) topikal olarak günde 3 kez; akut dönemdeki şiddetli inflamasyonu baskılamak amacıyla rutin tedavide yeri olan güçlü bir steroid topikal preparatı olan deksametazon (Onadron®) ilk 10 gün günde 3 kez olarak uygulanmış ve kesilmiştir.

Gruplar aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

1. GRUP: Sağlam (Hiçbir müdahalede bulunulmamış sağlıklı denek kornealarından oluşur.)
2. GRUP: Kontrol grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp 21 gün sadece medikal tedavi verilen grup.)
3. GRUP: RGTA grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp 1. Gün RGTA tedavisi -21 gün boyunca gün aşırı bir damla- başlanan ve 21 gün medikal tedavi uygulanan grup.)
4. GRUP: CXL grubu (Alkali yanık modeli uygulanıp 1. Gün CXL tedavisi uygulanan ve 21 gün medikal tedavi uygulanan grup.)

#### **5.4 Muayene Dizaynı ve Deneyin Sonlandırılması**

Her muayene öncesi deneklere genel anestezi uygulanmıştır. 1.1 ml Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.4 ml Xylazine HCl'in (Alfazyne % 2, 5 mg/kg) intraperitoneal (İP) uygulanması ile genel anestezi sağlanarak ön segment fotoğrafları ve optik koherens tomografileri (OCT) tekrar alınmıştır. (2. Gruptan -kontrol grubu- bir denek postop birinci gün muayene öncesi verilen genel anestezi sonrası öldü, yine 2. Gruptan bir denek 7. Günde verilen genel anestezi sonrası öldü.)

Muayeneler model oluşturulmasının ardından ilk gün: 1. ziyaret, 7. gün: 2. ziyaret, 14. gün: 3. ziyaret ve 21. gün: 4. ziyaret olarak gerçekleştirilmiştir. Muayene sırasında floressein gibi

uygulanan ajanların uzaklaşmasına fırsat vermek için son muayeneler sonrasında sakrifikasyon öncesi deneklerin korneaları 500 cc %0,9 NaCl ile yıkanmıştır.

OCT’de her ziyaret sırasında santral korneal kalınlık ölçülmüştür. Ön segment fotoğrafları opasite muayenesinde, vaskülarizasyon takibinde ve floresein boyalı mavi ışık altındaki fotoğraflar ise epitel hasarı tamiri seyrinin izlenmesinde kullanılmıştır. Vaskülarizasyon, opasite ve epitel defekti büyüklükleri alınan fotoğraflarla Adobe Photoshop programı ile belirlenmiş ve değerlendirilen parametrelerin tüm kornea dokusuna oranları şeklinde bu program ile hesaplanmıştır.

Matriks metalloproteinazların tekrar aktifleştiği ve enzimatik erimenin en fazla olduğu 21. gün sakrifikasyon günü olarak belirlenmiş ve denekler 0,4ml Xylazine Hydrochloride (Alfazyne % 2, 5 mg/kg) + 3,0ml Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg ; Pfizer, 35 mg/kg) ardından eter ile sakrifiye edilip kornealar limbus sınırından kornea makasıyla alınmıştır. Limbus hizasından skleradan ayrılan korneal doku örnekleri nötral tamponlanmış formaline konularak fikse edilip histoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

### **5.5 CXL Uygulaması**

CXL grubundaki deneklere alkali yanık modeli uygulanmasının ve muayenenin ardından 24. saatte 1.1 ml mg/ Ketamine Hydrochloride (Ketalar 500mg; Pfizer, 35 mg/kg) ve 0.5 ml Xylazine Hydrochloride (Alfazyne % 2, 5 mg/kg) İP uygulanması ile genel anestezi sağlandı. Çalışma gözlerine, Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0.5; Alcon) ile topikal anestezi sonrası, kapak spekulumu takıldı. Çalışmada epitelin kaldırılması veya bağlarının güçsüzleştirilmesi için bir aşama uygulanmadı çünkü alkali yanık modeli sonrası korneal epitel zaten zarar görüp dökülmüştü.

CXL işlemi şu şekilde yapıldı; % 0,1’lik riboflavin solüsyonu (10 ml % 20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) 30 dakika boyunca her 3 dk da bir damlatılarak kornea yüzeyinde bekletildi. UVA uygulama öncesi, cihazın spot enerjisi kalibre edildi. Kornea yüzeyine 5 cm mesafeden 3 mw/cm<sup>2</sup> dozunda (5.4 Joul/cm<sup>2</sup>) UVA ışığı 30 dk boyunca uygulandı. Bu esnada, her 3 dk da bir % 0.1’lik riboflavin solüsyonu damlatıldı.

Kliniğimizde mevcut olan UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland) ile crosslinking işlemi uygulanmıştır. Cihazın özellikleri:

- 365 nm dalga boyunda, 7-9-11 mm çaplı homojen UVA spotu üretebilmektedir.

- 3 mW/cm<sup>2</sup>'lik spot enerjisi sağlayabilmektedir. Çalışma mesafesi 50 mm'dir , 32×5×5 cm ebatlarındadır ve ağırlığı 6,5 kg'dir.

### **5.6 RGTA Uygulaması**

RGTA grubundaki deneklere alkali yanık modeli uygulanmasının ve muayenenin ardından 24. Saatte ilk doz RGTA (Cacicol®) damla uygulaması yapıldı. İlk uygulamanın ardından bu gruba gün aşırı (48 saatte bir) bir damla olacak şekilde tedaviye devam edilmiş olup (1,3,5,7,9,11,13,15,17,19. Gün) toplamda 10 doz uygulama yapılmıştır. Yıkama etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, RGTA tedavisinin diğer topikal tedavilerle arasında en az 2 saat süre olmasına dikkat edilmiştir.



## 6. KLİNİK BULGULAR

Alkali yanık modeli oluşturulmasının ardından deneklerin klinik muayeneleri 0. Gün (model oluşturulduktan sonra, tedavi öncesi) 7. Gün, 14. Gün ve 21. Gün olmak üzere 4 vizitte yapıldı. Her vizitte deneklerin ön segment fotoğrafı çekildi, floresein boyama ile kobalt mavisi ışıkta epitel defektleri değerlendirildi ve ön segment OCT'leri çekildi. Ön segment fotoğraflarında deneklerin korneal opasitesi, vaskülarizasyonu ve epitel defektleri değerlendirildi. Bu değerlendirmede veriler, Adobe Photoshop CC programı ile opasite/vaskülarizasyon/epitel defekti alanlarının işaretlenerek piksel olarak hesaplanmasının ardından tüm kornealarının işaretlenip piksel olarak hesaplanarak birbirine bölünmesiyle yüzdesel olarak elde edildi. Deneklerin ön segment OCT'leri Heidelberg Spectralis Domain OCT cihazı ile çekildi. Ön segment OCT'lerinde santral kornea kalınlığı (SKK) değerlendirildi.

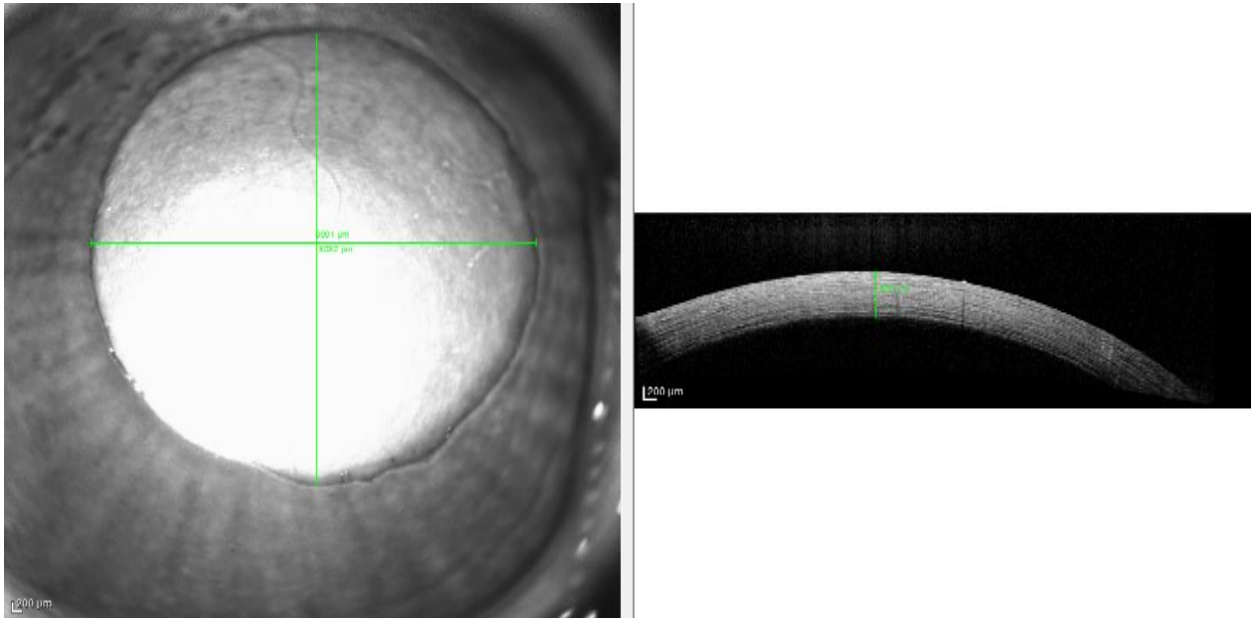
İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak, kategorik değişkenler ise frekans (yüzelikler) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için Tek yönlü varyans analiz ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi ile belirlendi. Haftalar arasındaki farklılıklar İki Yönlü Varyans Analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi ile incelendi. İki yönlü hipotezlerin testi için  $p<0.05$  istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.

İlk gün tüm grupların ortalama yara büyüklüklerinin (horizontal ve vertikal uzunluklarının ortalaması) ve korneal kalınlıklarının arasında fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ( $p>0,05$ ). Normalde ortalama 350 mikron olan sağlam tavşan korneasının alkali yanık sonrası ortalama santral korneal kalınlığı  $652,4\pm55$  mikron ( $\mu$ ) olarak bulunmuştur. Ortalama yara büyüklükleri  $8,08\pm0,37$  milimetre (mm) olarak tespit edilmiştir. Grupların yara büyüklükleri ve santral korneal kalınlıklarının başlangıç ölçümleri Tablo-3'de gösterilmiştir.

**Tablo-3:** Model sonrası ortalama yara büyüklüğü ve santral kornea kalınlığı ölçümleri

	Ortalama yara büyüklüğü (mm)	Santral korneal kalınlık ( $\mu$ )
<b>RGTA</b>	8,01 $\pm$ 0,4	650,1 $\pm$ 29
<b>CXL</b>	8,15 $\pm$ 0,27	651,2 $\pm$ 79
<b>KONTROL</b>	8,08 $\pm$ 0,43	657,8 $\pm$ 59
<b>p değeri</b>	0,781	0,972

Tekrarlanan ölçümlerde grupların SKK değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir değişim saptanmadı. Bununla birlikte grupların 3. hafta ortalama ölçümlerine bakıldığında kontrol grubunun SKK ortalamasının diğer gruplardan fazla olduğu, en düşük SKK ortalamasının ise CXL grubunda olduğu görüldü (Tablo-3). Grupların OCT ile SKK ölçüm örnekleri şekil-3’de gösterilmiştir. Her bir grubun tekrarlayan ziyaretlerde santral korneal kalınlıkları incelendiğinde; CXL grubunun ziyaretler arasında SKK ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı değilken RGTA ve kontrol gruplarında bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo-5).



**Şekil-3:** Ön segment OCT görüntülerinin SKK ölçümünde kullanımı



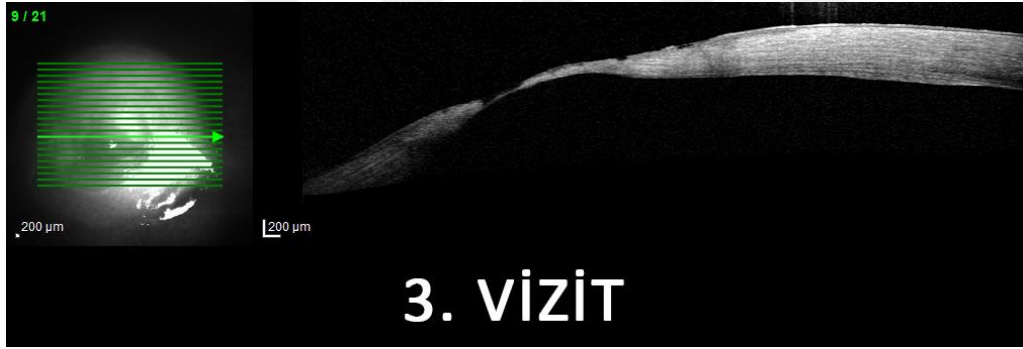
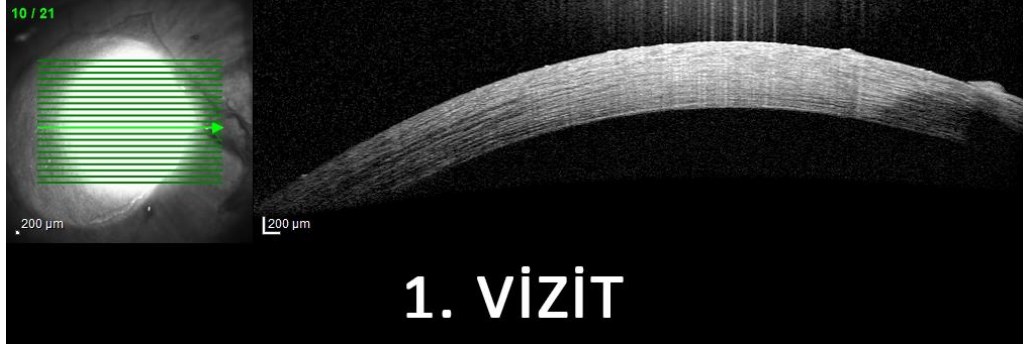
**Tablo-4:** 1. ,2.,3., ve 4. vizit SKK ölçümleri ( $\mu$ )

	1. Vizit	2. Vizit	3. Vizit	4. Vizit
RGTA	650,1 $\pm$ 29	660,6 $\pm$ 112	792,3 $\pm$ 238	979,1 $\pm$ 252
CXL	651,2 $\pm$ 79	627,8 $\pm$ 25	735,4 $\pm$ 227	792,1 $\pm$ 192
Kontrol	657,8 $\pm$ 59	739,6 $\pm$ 83	791,2 $\pm$ 139	1126,4 $\pm$ 249
<b>P Değeri</b>	<b>0,972</b>	<b>0,156</b>	<b>0,856</b>	<b>0,058</b>

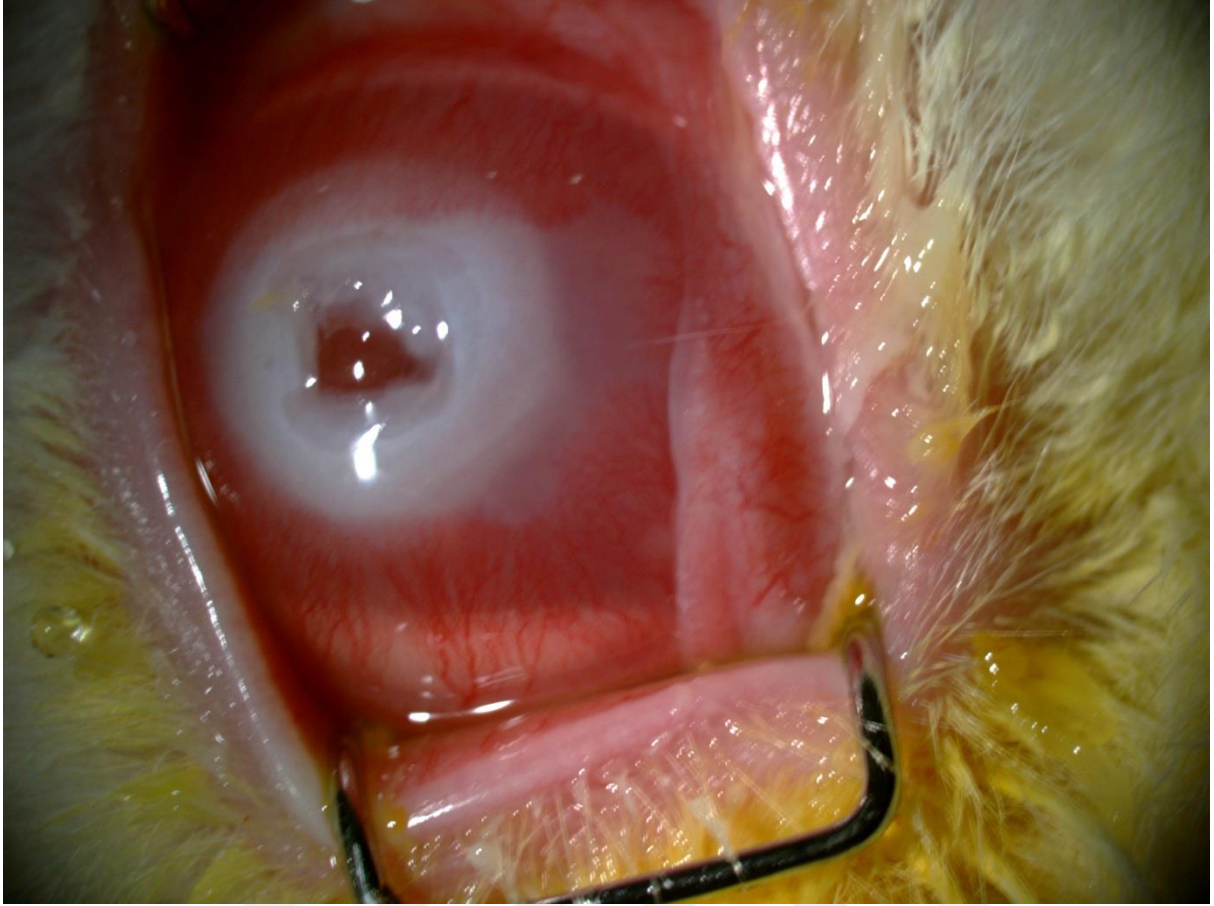
**Tablo-5:** Her bir grubun kendi içinde tekrarlayan ölçümlerde SKK değerlerinin karşılaştırılması

	1. Vizit	2. Vizit	3. Vizit	4. Vizit	P Değeri
RGTA	650,1 $\pm$ 29	660,6 $\pm$ 112	792,3 $\pm$ 238	979,1 $\pm$ 252	<0,001
CXL	651,2 $\pm$ 79	627,8 $\pm$ 25	735,4 $\pm$ 227	792,1 $\pm$ 192	0,170
Kontrol	657,8 $\pm$ 59	739,6 $\pm$ 83	791,2 $\pm$ 139	1126,4 $\pm$ 249	<0,001

Deneklerin son vizitlerinde korneal ülserasyonları değerlendirildi ve sınıflandırması yapıldı.<sup>148</sup> Süperfisyal ülserasyonda ülser korneanın anterior 1/3'ünde sınırlıydı, orta derece ülserasyonda ülser korneanın orta 1/3'ünde sınırlıydı, derin ülserasyonda ülser korneanın posterior 1/3'üne uzanmıştı. Ülserasyon ön segment OCT bulgularıyla değerlendirildi (Şekil-3). Bu sınıflamaya göre gruplarda gelişen ülserasyonun dağılımı Tablo-6'da gösterilmiştir. CXL grubunda bir denekte 3. vizitte keratit ile birlikte desmatosel gelişirken (Şekil-4) bir denekte ise orta derece ülserasyon geliştiği görüldü. RGTA grubundan ise hiçbir denekte ülser gelişmediği görüldü.



**Şekil-4:** CXL grubunda bir deneğin 1.,2.,3. ve 4. ziyaret gelişen ülserasyonun değerlendirildiği OCT görüntüleri.

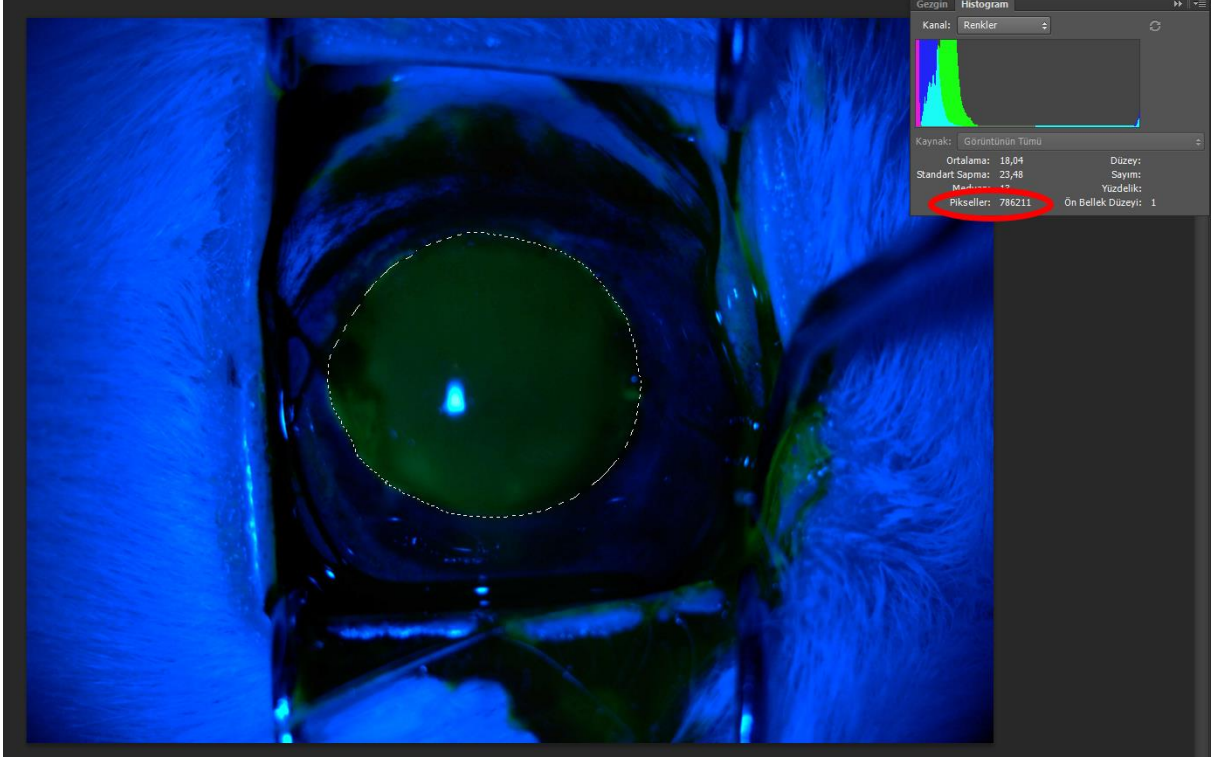


**Şekil-5:** CXL grubundan 5 numaralı deneğin 3. Vizitinde görülen keratit, hipopiyon ve korneal ülserasyon.

**Tablo-6:** Her bir grubun son vizitteki ülserasyon skorları

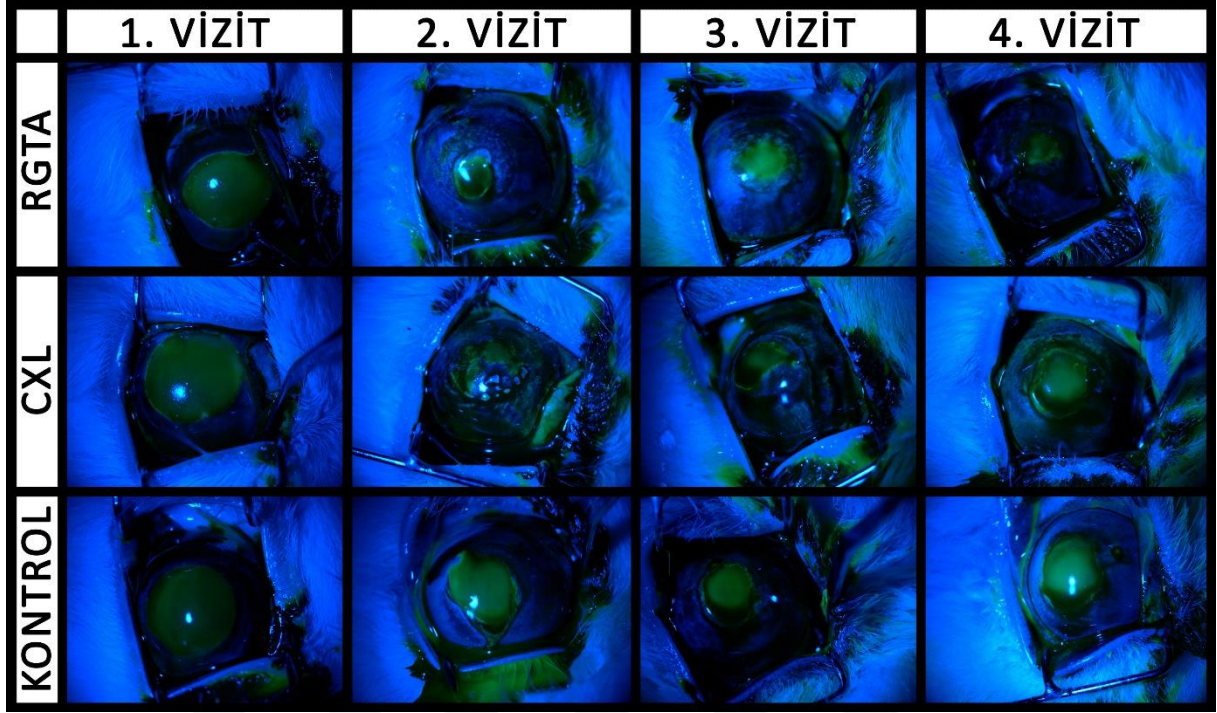
	RGTA (N=8)	CXL (N=8)	KONTROL (N=6)
Ülserasyon yok	8 (%100)	6 (%75)	5 (%83,3)
Süperfisyel ülser	0	0	0
Orta ülser	0	1 (%12,5)	1 (%16,7)
Derin ülser	0	0	0
Desmatosel	0	1 (%12,5)	0

Epitelyal iyileşme floressein boyanma sonrası kobalt mavisi ışıkla yapılan biyomikroskopik muayene görüntülerinin Adobe Photoshop programıyla defektin, tüm kornea çapına oranı olarak değerlendirildi (Şekil-6). Epitel defektlerinde ilk vizitte istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Takiplerdeki tüm vizitlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu. (Tablo-7, Grafik-1).



**Şekil-6:** Epitel defektinin hesaplanması, epitel defekti alanının tüm kornea alanına oranı ile hesaplanmıştır. (Kırmızı işaretli alan epitel defektinin alanını piksel cinsinden vermektedir.)

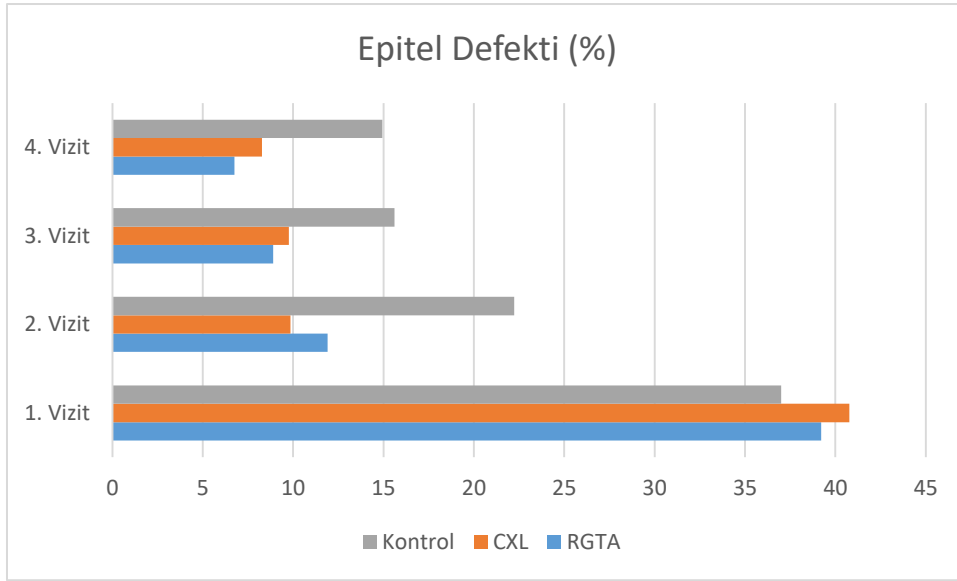




*Şekil-7: RGTA, CXL ve Kontrol gruplarında sırayla 1.,2.,3.,4. vizit epitel defekti büyüklüğünün takibi*

*Tablo-7: 1. ,2.,3., ve 4. vizit epitel defekti ölçümleri (%)*

	1. Vizit	2. Vizit	3. Vizit	4. Vizit
RGTA	%39,2 ± 8,9	%11,9 ± 6,3	%8,8 ± 4,2	%6,7 ± 4,2
CXL	%40,7 ± 4,9	%9,8 ± 3	%9,7 ± 3,2	%8,2 ± 4,6
Kontrol	%36,99 ± 9,4	%22,23 ± 5,5	%15,6 ± 2,7	%14,93 ± 6
<b>P Değeri</b>	<b>0,702</b>	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,023</b>



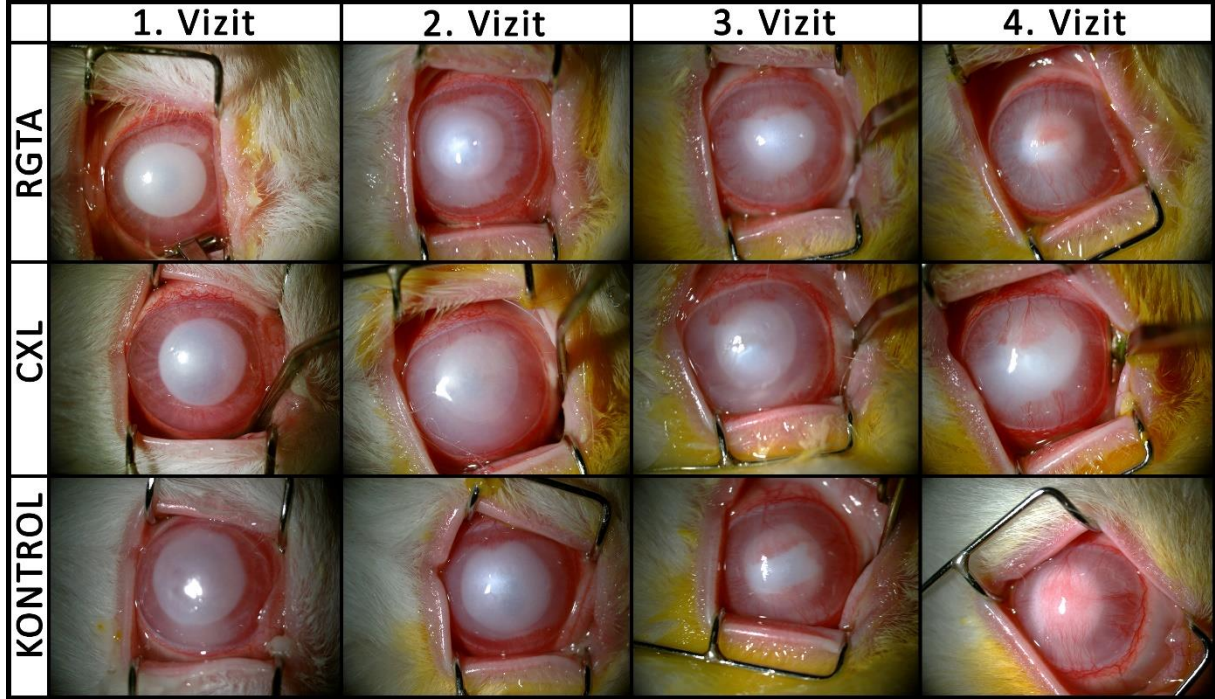
**Grafik-1:** 1. ,2.,3., ve 4. vizit epitel defekti ölçümleri (%)

Opasite değerlendirmesi yine Adobe Photoshop programı ile opasite alanının ölçülerek tüm kornea alanına bölünmesiyle yüzdelik olarak hesaplandı. Opasite değerlendirmesinde gruplar arasında tüm vizitlerde istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktu. Korneal opasite tüm gruplarda son vizitlerde başlangıca göre azalmakla beraber RGTA grubunda bu azalma en belirgindi (Tablo-8).

**Tablo-8:** 1. ,2.,3., ve 4. vizit korneal opasite ölçümleri (%)

	1. Vizit	2. Vizit	3. Vizit	4. Vizit
RGTA	%38 ± 2,9	%35,4 ± 3,7	%30,8 ± 5,8	%25,2 ± 7,1
CXL	%37,2 ± 4	%35,3 ± 3,1	%33,6 ± 4,6	%28,1 ± 3,9
Kontrol	%36 ± 5,7	%33,9 ± 7	%30,2 ± 4,7	%28,1 ± 3,4
<b>P Değeri</b>	<b>0,740</b>	<b>0,859</b>	<b>0,501</b>	<b>0,544</b>

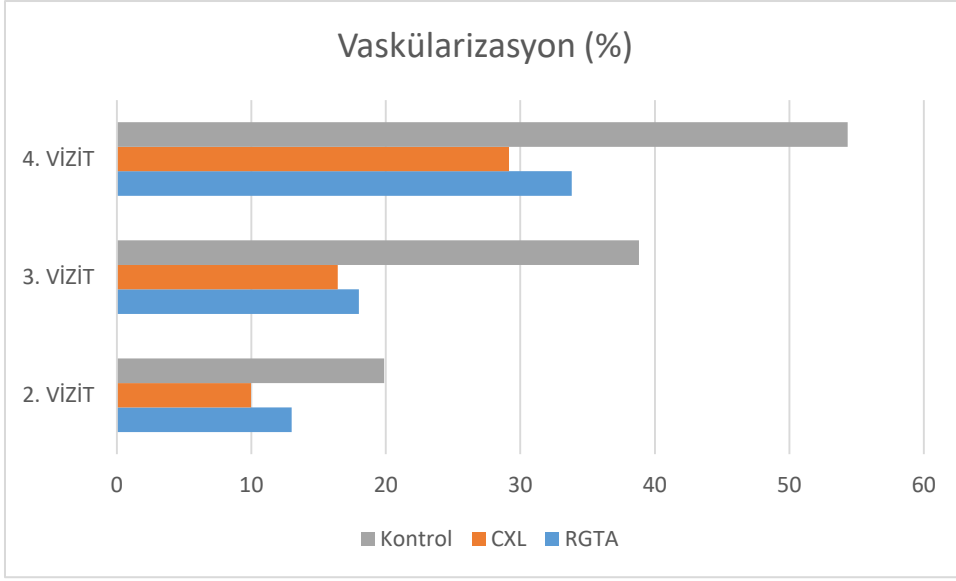
Vaskülarizasyon da opasite ve epitelyal hasar gibi ön segment fotoğraflarının Adobe Photoshop programıyla total korneaya oranlanması şeklinde hesaplandı. 2.,3. ve 4. Vizitlerde vaskülarizasyon açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark mevcuttu. Bu farkı oluşturan kontrol grubunun tedavi gruplarından daha fazla vaskülarize olmasıydı. (Tablo-9, Grafik-2).



*Şekil-8: RGTA, CXL ve Kontrol gruplarında sırayla 1.,2.,3.,4. vizit vaskülarizasyon ve opasite takibi*

*Tablo-9: 2.,3., ve 4. vizit vaskülarizasyon ölçümleri (%)*

	2. Vizit	3. Vizit	4. Vizit
RGTA	%12,9 ± 4,5	%17,9 ± 4,6	%33,8 ± 10,6
CXL	%9,9 ± 8,1	%16,4 ± 7,9	%29,1 ± 14,7
Kontrol	%19,8 ± 7,2	%38,8 ± 23,1	%54,3 ± 24,3
<b>P Değeri</b>	<b>0,042</b>	<b>0,013</b>	<b>0,03</b>



**Grafik-2:** 2.,3., ve 4. vizit vaskülarizasyon ölçümleri (%)



## 7. HİSTOLOJİK BULGULAR

### 7.1 Materyal-Metod

Deneklerden çıkarılan kornealar ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk nötral formalin solüsyonu ile 48 saat süre ile fikse edildikten sonra derecesi artan etil alkol serilerinden (%70, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra toluen içinde 30 dakika süreyle şeffaflandırma işlemi uygulandı. Dokular, 58-60°C'deki etüvde 15 dakika "toluen+parafin" karışımında bekletildi, daha sonra parafin banyolarından geçirilerek parafin impregnasyon işlemi uygulandı ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında seri kesitler mikrotom (Leica SM 2000R) ile alındı. Ardışık alınan kesitlere, morfolojik incelemeler için Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Masson trikrom (MT) boyamaları yapılırken; immünohistokimyasal inceleme için Kaspaz-3, VEGF, MMP-9 ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) immünreaktivitesine bakıldı. Tüm preparatlar, Leica DM 1000 model ışık mikroskobunda değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

#### 7.1.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom Boyamaları

Parafin kesitler 30 dakika 58-60°C'lik etüvde bekletilerek parafinin giderilmesi kolaylaştırıldı, sonra 2 saat toluen ile kesitler deparafinize edildikten sonra derecesi azalan alkol serisinden (100°, 96°, 90°, 70°) geçirilerek distile su ile yıkandı. Yıkama işleminden alınan ardışık kesitlere H&E ve MT boyama işlemleri uygulandı. Boyama işlemi tamamlanan kesitler 100° alkolden geçirilerek toluende ikişer defa 15'er dakika şeffaflandırıldıktan sonra entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi. Kapatılan kesitler Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile incelendi.

#### 7.1.2 Kaspaz-3, VEGF, MMP-9, iNOS İmmünohistokimya Boyaması

Mikrotom ile alınan 4-5 µm'lik kesitler, 30 dakika 58-60 °C'lik etüvde inkübasyondan sonra toluende 2x20 dakika bekletilerek deparafize edildi. Daha sonra derecesi azalan etil alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70) geçirildikten sonra 5 dk PBS (Phosphate-buffered salin/ fosfat tamponlanmış salin)'de yıkandı. Lam üzerindeki kesitlerin çevresi pap-pen denilen özel bir sınırlayıcı kalem ile çizilerek doku kesitlerinin çevresinde küçük bir havuz oluşturuldu. Antijen iyileştirme işlemi uygulandıktan sonra ve distile su ile yıkanan (2x2 dk) kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanol ile hazırlanan %3'lük Hidrojen peroksitte (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 dakika

bekletildi. Kesitlere 10 dakika oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitlere kit protokolüne göre primer antikor ve sekonder antikorları uygulandı, 3-6 dakika DAB (Diaminobenzidin) kromojen solüsyonu uygulamasından sonra distile suda (3x1 dk) bekletildi, Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Ardından distile su (3x30 sn) ile N-butanolle 3 defa yıkandı. Daha sonra toluene alındı ve kesitler lamel ile Entellan damlatılarak kapatıldı. Gruplara ait korneal dokularda 40X büyütmede 5 alan değerlendirilerek immün pozitif hücreler skorlandı<sup>149</sup>.

## **7.2 Bulgular**

### **7.2.1 Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom**

H&E boyanan kesitlerde sağlıklı grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; korneal epitelde hiperplazi, dejenerasyon, stromal ödem ve vaskülarizasyon skorlama sonuçları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır.

Kontrol grubunda epitel-epitel ve epitel-stroma bağlantılarında ayrılma (splitting) yoğun olarak gözlemlendi, bazı kesitlerde epitelin tamamen döküldüğü tespit edildi. Kontrol grubunda stromada yoğun ödem, kollajen liflerin düzenlenişinde bozulmalar/boşluklar ve lökosit infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil-9).

Kesitler MT boyama ile incelendiğinde alkali yanık uygulanan gruplardaki yoğun stromal ödem, kollajenlerin boşluklu-ayrık yapısı ve liflerin aralarındaki köprülerin oldukça azalmış olduğu, stromal vakuolizasyonun şiddetlendiği, keratositlerin kaybı gözlemlendi (Şekil-11).

CXL grubunda korneal epitelde sağlam (intakt) alanlar çoğunlukta idi. Keratositler ve kollajen lifler arası bağlantıların daha güçlü ve düzenli olduğu dikkat çekmekteydi. Kollajen liflerin aralarındaki köprüler yer yer sağlamdı (Şekil-10).

H&E boyamada epitel kaybı (0: Kayıp yok, 1: Hafif ayrılma, 2: Orta erozyon, 3: Şiddetli erozyon, 4: Şiddetli Ülserasyon), stromal ödem (0: Ödem yok, 1: Hafif ödem, 2: Orta ödem, 3: Şiddetli ödem, 4: Çok şiddetli ödem), korneal vaskülarizasyon (0: Vaskülarizasyon yok, 1: Hafif vaskülarizasyon, 2: Orta vaskülarizasyon, 3: Şiddetli vaskülarizasyon, 4: Çok şiddetli vaskülarizasyon) ve lökositik infiltrasyon (0: İnfiltrasyon yok, 1: Hafif infiltrasyon, 2: Orta infiltrasyon, 3: Şiddetli infiltrasyon, 4: Çok şiddetli infiltrasyon) skorlaması yapılarak IBM

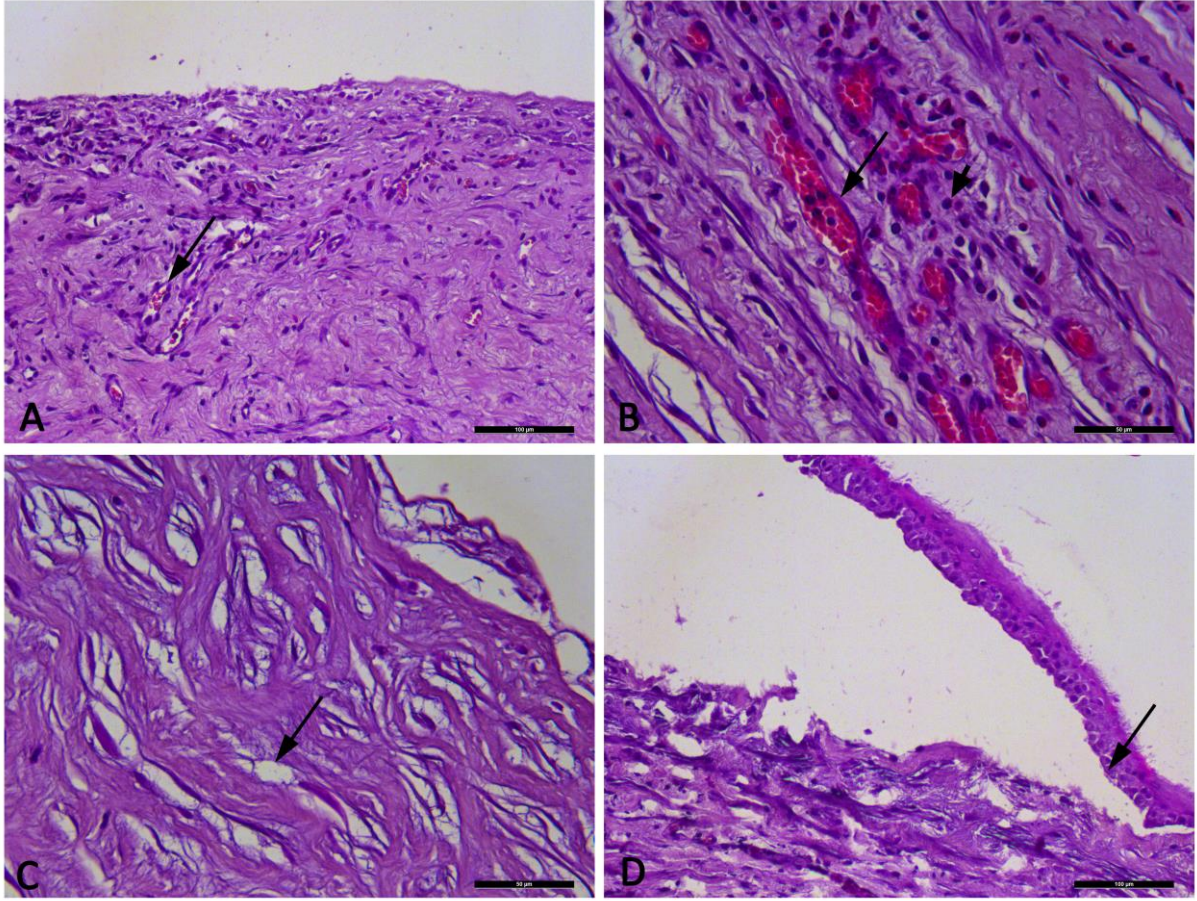
SPSS 20.0 programıyla istatistiksel olarak değerlendirildi. Her grupta en az 5 preparat ve her preparatta 5 farklı alan 40X büyütmede incelendi ve skorlandırıldı.

Epitel kaybı skorlamasında sağlam grup, CXL ve RGTA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p>0,05$ ). Bu 3 grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ( $p<0,05$ ).

Stromal ödem skorlamasında sağlıklı grup ile CXL grubu arasında ( $p=0,646$ ) ve RGTA grubu ile CXL grubu arasında ( $p=0,309$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Sağlıklı grup ile RGTA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,039$ ). Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ( $p<0,05$ ).

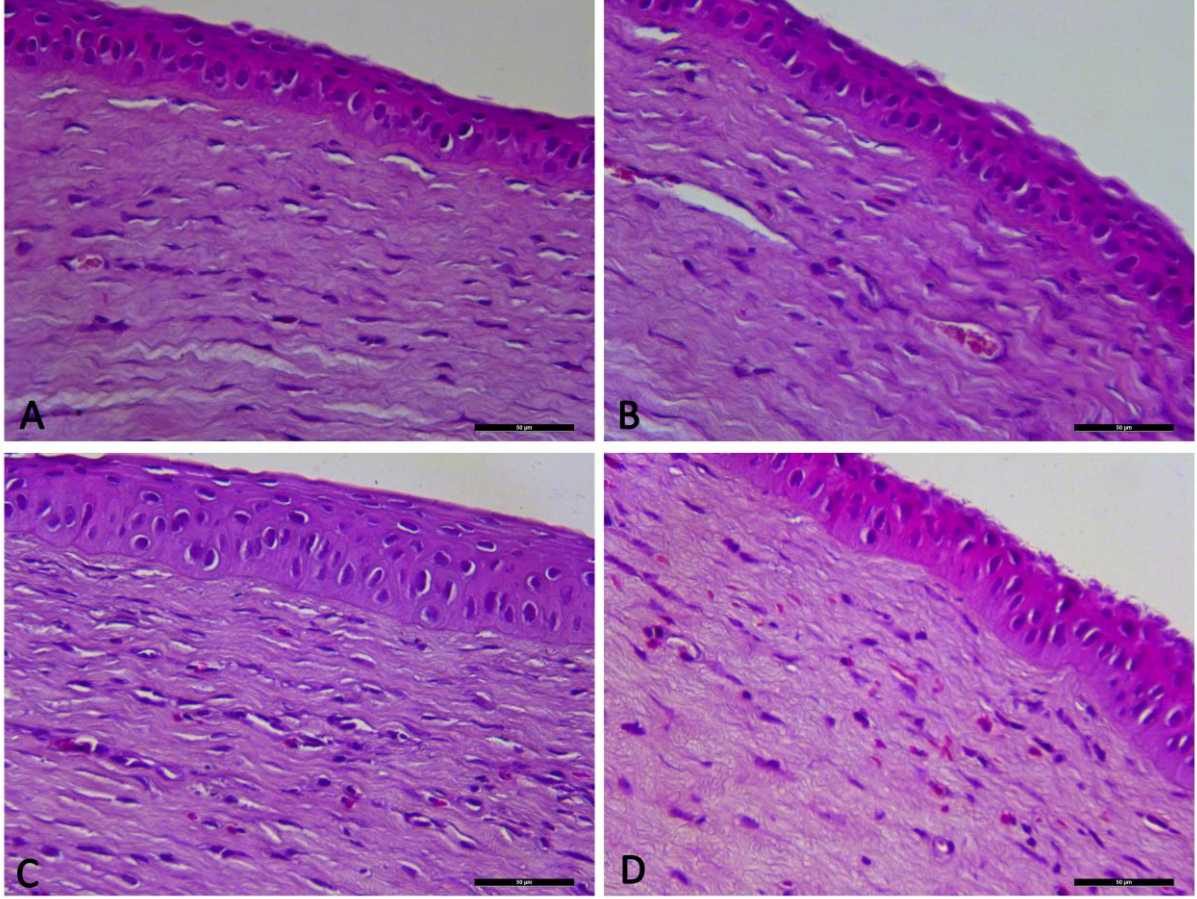
Korneal vaskülarizasyon skorlamasında CXL ve RGTA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,435$ ). Diğer gruplar arası karşılaştırmalar ise istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

Lökositik infiltrasyon skorlamasında da yine korneal vaskülarizasyon skorlamasına benzer bir şekilde CXL ve RGTA grupları arasında istatistiksel olarak fark yokken ( $p=0,777$ ) diğer gruplar arası karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

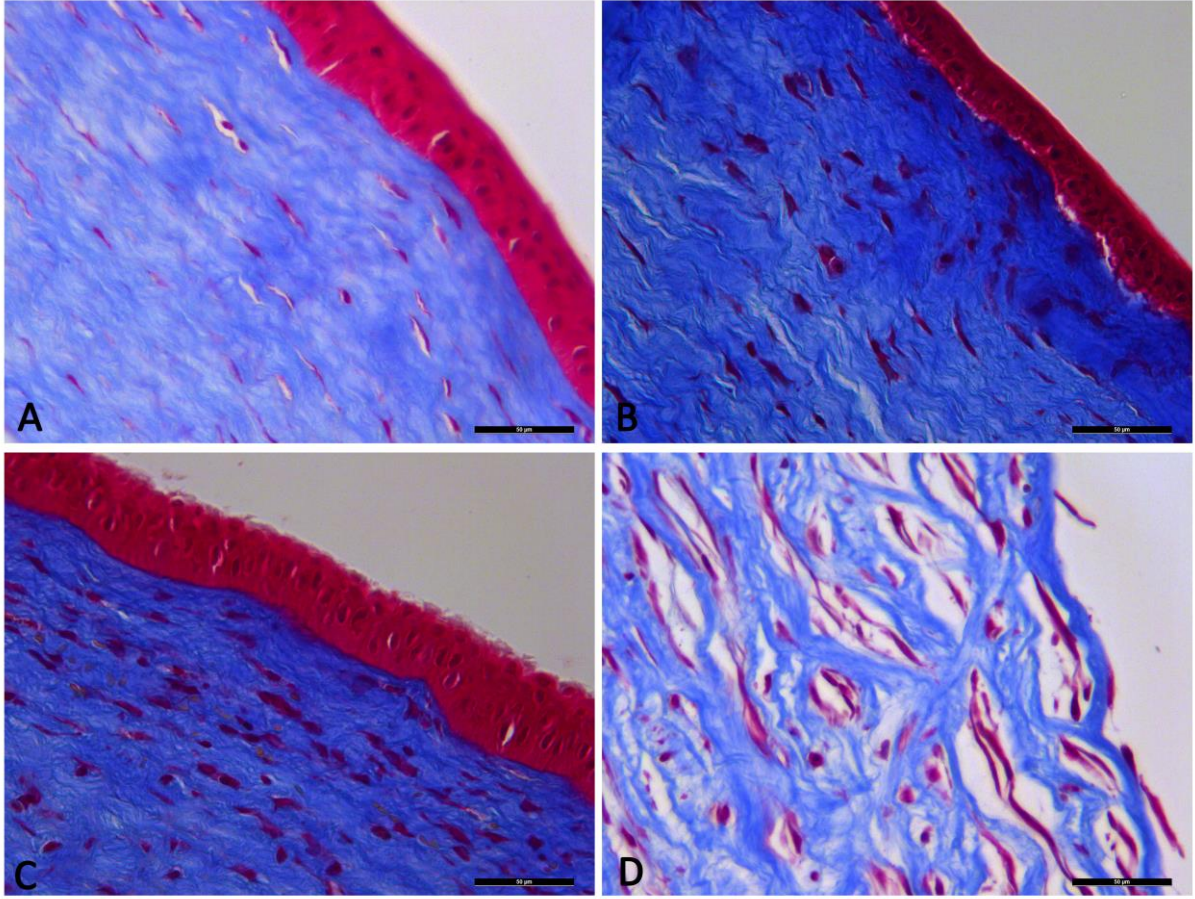


**Şekil-9:** H&E boyama uygulanan kontrol grubu kornea kesitleri görülüyor. **A:** Epitelin tamamen dökülmüş olduğu, lenfositik infiltrasyon ve korneal vaskülarizasyon (ok) görülüyor (Ölçek çubuğu: 100 µm). **B:** Yoğun vaskülarizasyon (ok) ve lenfositik infiltrasyon (ok başı) olduğu görülüyor (Ölçek çubuğu: 50 µm). **C:** Kollajen diziliminin bozulduğu, vakuolizasyonlar geliştiği (ok) görülüyor (Ölçek çubuğu: 50 µm). **D:** Kornea epitelinde ayrılma (ok) görülüyor (Ölçek çubuğu: 100 µm).





**Şekil-10:** H&E boyama uygulanan tedavi grubu kornea kesitleri görülyor (A ve B RGTA grubu, C ve D CXL grubu). Kontrol grubuna göre epitelin intakt olduğu, vaskülarizasyon ve lenfositik infiltrasyonun daha az olduğu görülyor. CXL grubunda daha belirgin olmak üzere her iki grupta da kollajen diziliminin kontrol grubuna göre daha düzenli olduğu görülyor. (Ölçek çubuğu: 50 µm)



**Şekil-11:** Masson Trikrom boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. A: Sağlıklı grup, B: RGTA grubu, C: CXL grubu, D: Kontrol grubu. Kontrol grubunda epitel izlenmiyor ve stromada yoğun vakuolizasyon dikkat çekiyor. (Ölçek çubuğu: 50 µm)

**Tablo-10:** Grupların epitel kaybı, stromal ödem, korneal vaskülarizasyon ve lökositik infiltrasyon skorları ortalamaları

	Epitel Kaybı	Stromal Ödem	Korneal Vaskülarizasyon	Lökositik İnfiltrasyon
Sağlıklı	0±0	0±0	0±0	0±0
Kontrol	3,37±0,83	1,6±0,23	2,1±0,87	2,42±0,98
RGTA	0,37±0,83	0,57±0,9	0,97±1,02	0,85±1,05
CXL	0,08±0,26	0,25±0,43	1,3±1,24	1,05±1,06

**Tablo-11:** Grupların epitel kaybı skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0,102	p=0,967
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p=0,102	p<0,001	-----	p=0,158
CXL	p=0,967	p<0,001	p=0,158	-----

**Tablo-12:** Grupların stromal ödem skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0,039	p=0,646
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p=0,039	p<0,001	-----	p=0,309
CXL	p=0,646	p<0,001	p=0,309	-----

**Tablo-13:** Grupların korneal vaskülarizasyon skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0,001	p<0,001
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p=0,002
RGTA	p=0,001	p<0,001	-----	p=0,435
CXL	p<0,001	p=0,002	p=0,435	-----

**Tablo-14:** Grupların lökositik infiltrasyon skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0,003	p<0,001
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p=0,003	p<0,001	-----	p=0,777
CXL	p<0,001	p<0,001	p=0,777	-----

### 7.2.2 İmmünohistokimyasal (IHC) incelemeler

İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz-3, i-NOS, VEGF ve MMP-9 boyamaları yapıldı.. İncelemelerde her grupta en az 5 preparat incelendi. İncelenen her preparatta 5 farklı alan 40X büyütmede değerlendirildi. Boyanmalar epitel ve stromada ayrı ayrı değerlendirildi ve boyanma paternleri zayıftan güçlüye doğru şu şekilde skorlandı; 0: Boyanma yok, 1: Zayıf, 2: Orta, 3:

Kuvvetli, 4: Çok kuvvetli. Daha sonra veriler IBM SPSS 20.0 programıyla istatistiksel açıdan değerlendirildi.

### 7.2.2.1 Kaspaz-3

Kaspaz-3 immünohistokimya (IHC) tekniği uygulanan kornea kesitlerinde sağlıklı gruba göre öncelikle kontrol grubunda, ve daha sonra sırasıyla RGTA grubunda ve en son olarak CXL tedavi grubunda epitelde ve stromada kahverengi boyanmış apoptotik hücreler gözlemlendi (Şekil-12). Epitel skorlamasına bakıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu görüldü ( $p<0,001$ ). Sağlıklı grup ile CXL grubu arasında istatistiksel olarak fark olmaması dikkat çekiciydi ( $p=0,804$ ). Kontrol grubuna kıyasla hem CXL hem de RGTA grupları arasında anlamlı fark vardı ( $p<0,001$ ). Stroma skorlamasında yine tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark mevcuttu ( $p<0,001$ ). Epitel skorlamasında aralarında anlamlı fark bulunmayan CXL ve sağlıklı grup arasında stromada anlamlı fark mevcuttu ( $p=0,001$ ). Kontrol grubuna kıyasla hem CXL hem de RGTA grupları arasında anlamlı fark vardı ( $p<0,001$ ).

**Tablo-15:** Grupların Kaspaz-3 boyanma skorları ortalaması

	Epitel	Stroma
Sağlıklı	0,2±0,4	0±0
Kontrol	3,26±0,63	3,32±0,76
RGTA	1,66±0,95	1,8±0,76
CXL	0,35±0,48	0,67±0,72

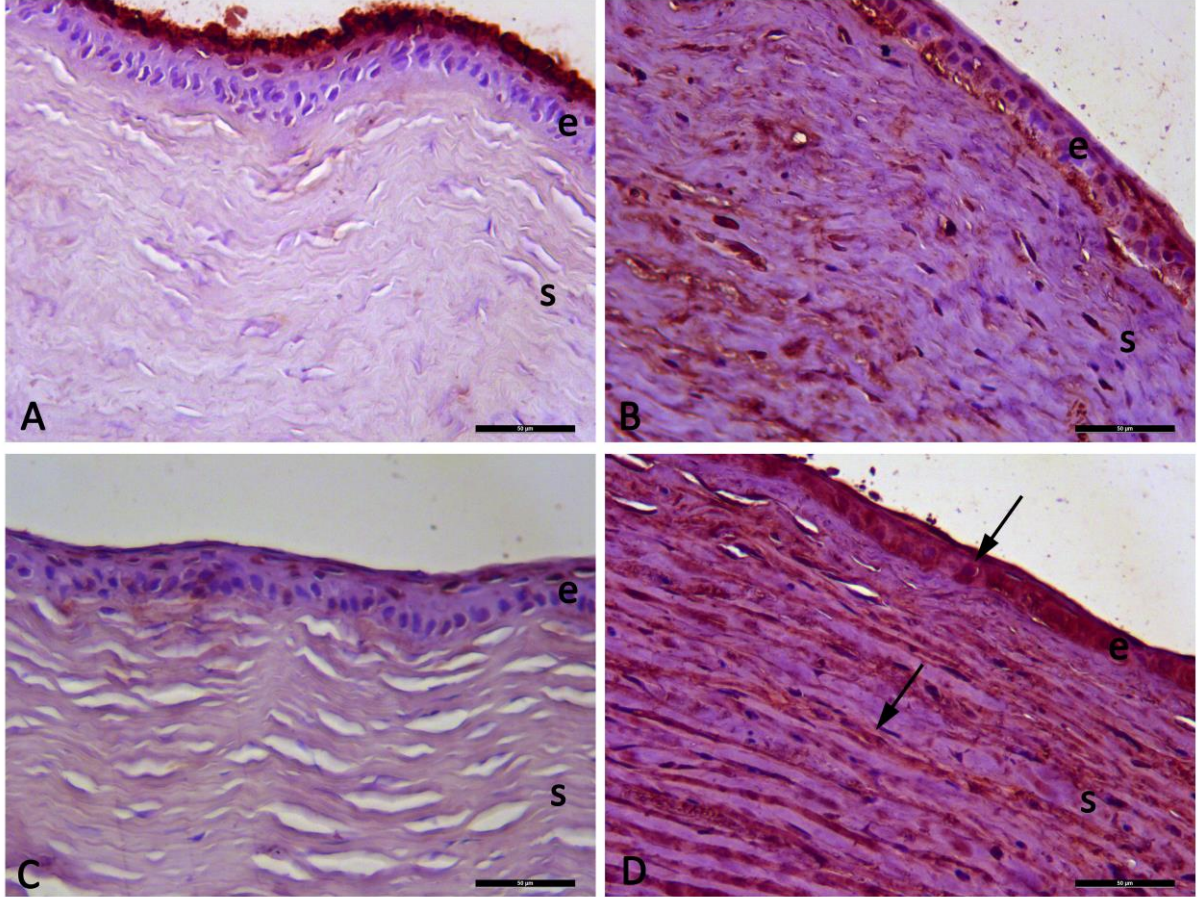
**Tablo-16:** Grupların Kaspaz-3 boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,804$
Kontrol	$p<0,001$	-----	$p<0,001$	$p<0,001$
RGTA	$p<0,001$	$p<0,001$	-----	$p<0,001$
CXL	$p=0,804$	$p<0,001$	$p<0,001$	-----



**Tablo-17:** Grupların Kaspaz-3 boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p<0,001	p=0,001
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p<0,001	p<0,001	-----	p<0,001
CXL	p=0,001	p<0,001	p<0,001	-----



**Şekil-12:** Kaspaz-3 immünohistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. Sağlıklı grup (A), RGTA grubu (B), CXL grubu (C) ve Kontrol grubu (D). Kornealarda epitelde ve stromada özellikle yanık grubunda kahverengi pozitif apoptotik hücreler (ok) görülüyor. Sağlıklı grup epitel üzerindeki boyanma artefakt olarak değerlendirildi. (e– epitelium, s–stroma). (Ölçek çubuğu: 50 µm.)

#### 7.2.2.2 İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

iNOS IHC tekniği uygulanan kornea kesitlerinde boya tutulumu epitel ve stromada değerlendirildi (Şekil-13). Epitel skorlamasına bakıldığında kontrol grubu ve sağlıklı grup

arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık mevcuttu ( $p=0,042$ ). Diğer karşılaştırmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p>0,05$ ). iNOS değerlendirmesinde asıl farklılıklar stroma düzeyinde izlendi. Stromada tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p<0,001$ ).

**Tablo-18:** Grupların i-NOS boyanma skorları ortalaması

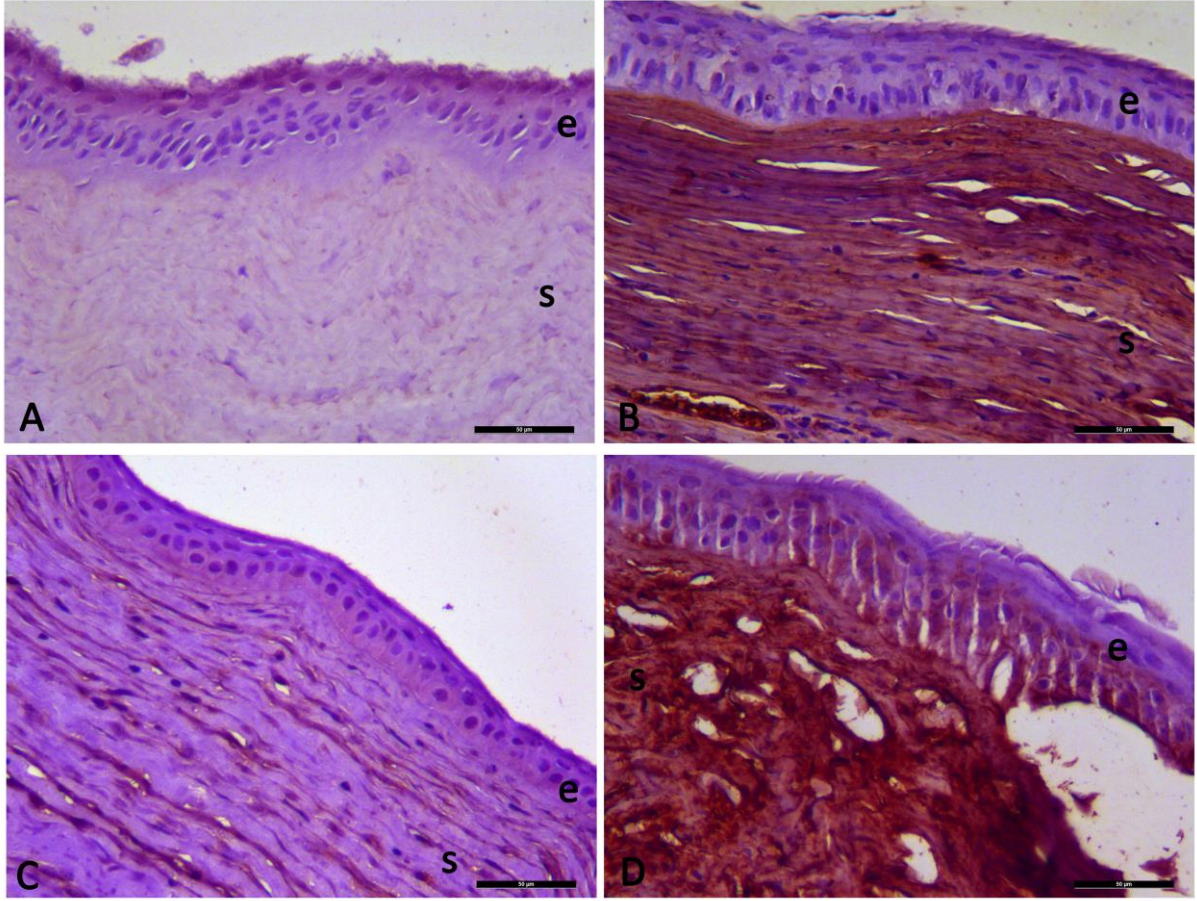
	Epitel	Stroma
Sağlıklı	0±0	0±0
Kontrol	0,2±0,4	3,2±0,72
RGTA	0,4±0,2	2,48±0,58
CXL	0,75±0,26	0,7±0,68

**Tablo-19:** Grupların i-NOS boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p=0,042	p=0,952	p=0,681
Kontrol	p=0,042	-----	p=0,146	p=0,253
RGTA	p=0,952	p=0,146	-----	p=0,954
CXL	p=0,681	p=0,253	p=0,954	-----

**Tablo-20:** Grupların i-NOS boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p<0,001	p<0,001	-----	p<0,001
CXL	p<0,001	p<0,001	p<0,001	-----



**Şekil-13:** iNOS immünohistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. Sağlıklı grup (A), RGTA grubu (B), CXL grubu (C) ve Kontrol grubu (D). Kornealarda iNOS, stromada daha fazla olmak üzere keratositlerde ve polimorfonükleer lökositlerde, enflamatuar hücrelerde kahverengi pozitif boyanma görülüyor. Sağlıklı grup epitel üzerindeki boyanma artefakt olarak değerlendirildi. (e– epitelium, s-stroma). (Ölçek çubuğu: 50 µm.)

### 7.2.2.3 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF IHC tekniği uygulanan kornea kesitlerinde boya tutulumu epitel ve stromada değerlendirildi (Şekil-14). Epitel skorlamasına bakıldığında CXL ve sağlıklı grup arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı görüldü ( $p=0,633$ ). Diğer grupların birbiri içinde karşılaştırılması ise istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ). Stroma düzeyinde ise CXL ve RGTA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,069$ ), yine diğer grupların birbiriyle karşılaştırılması ise istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

**Tablo-21:** Grupların VEGF boyanma skorları ortalaması

	Epitel	Stroma
Sağlıklı	0,12±0,33	0,4±0,2
Kontrol	2±1,14	3,03±0,76
RGTA	0,88±0,78	1,44±0,96
CXL	0,35±0,53	0,97±0,76

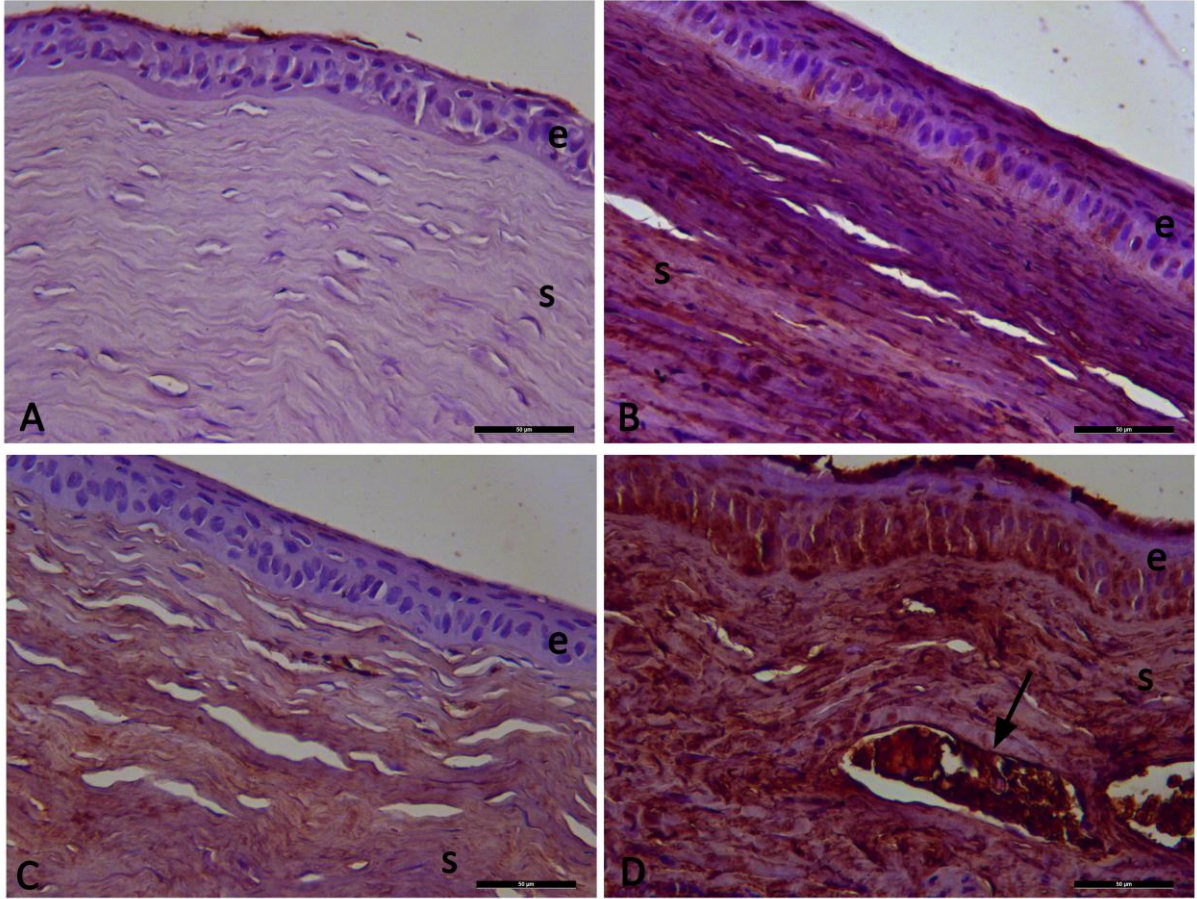
**Tablo-22:** Grupların VEGF boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p=0,003	p=0,633
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p=0,003	p<0,001	-----	p=0,035
CXL	p=0,633	p<0,001	p=0,035	-----

**Tablo-23:** Grupların VEGF boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p<0,001	p<0,001	-----	p=0,069
CXL	p<0,001	p<0,001	p=0,069	-----





**Şekil-14:** VEGF immunohistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. Sağlıklı grup (A), RGTA grubu (B), CXL grubu (C) ve Kontrol grubu (D). Kornealarda kahverengi pozitif boyanma stromada özellikle kontrol grubunda dikkati çekiyor. Kontrol grubunda stromal vaskülarizasyon (ok) içerisinde eritrositler görülüyor. Sağlıklı grup epitel üzerindeki boyanma artefakt olarak değerlendirildi. (e– epitelyum, s-stroma). (Ölçek çubuğu: 50 µm.)

#### 7.2.2.4 Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)

MMP-9 IHC tekniği uygulanan kornea kesitlerinde boya tutulumu epitel ve stromada değerlendirildi (Şekil-15). Epitel skorlamasına bakıldığında CXL ve sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,128$ ). Gruplar arasında yapılan diğer karşılaştırmalar ise istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ). Stroma skorlamasına bakıldığında ise CXL ve RGTA grubu arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0,999$ ). Gruplar arasında yapılan diğer karşılaştırmalar ise istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

**Tablo-24:** Grupların MMP-9 boyanma skorları ortalaması

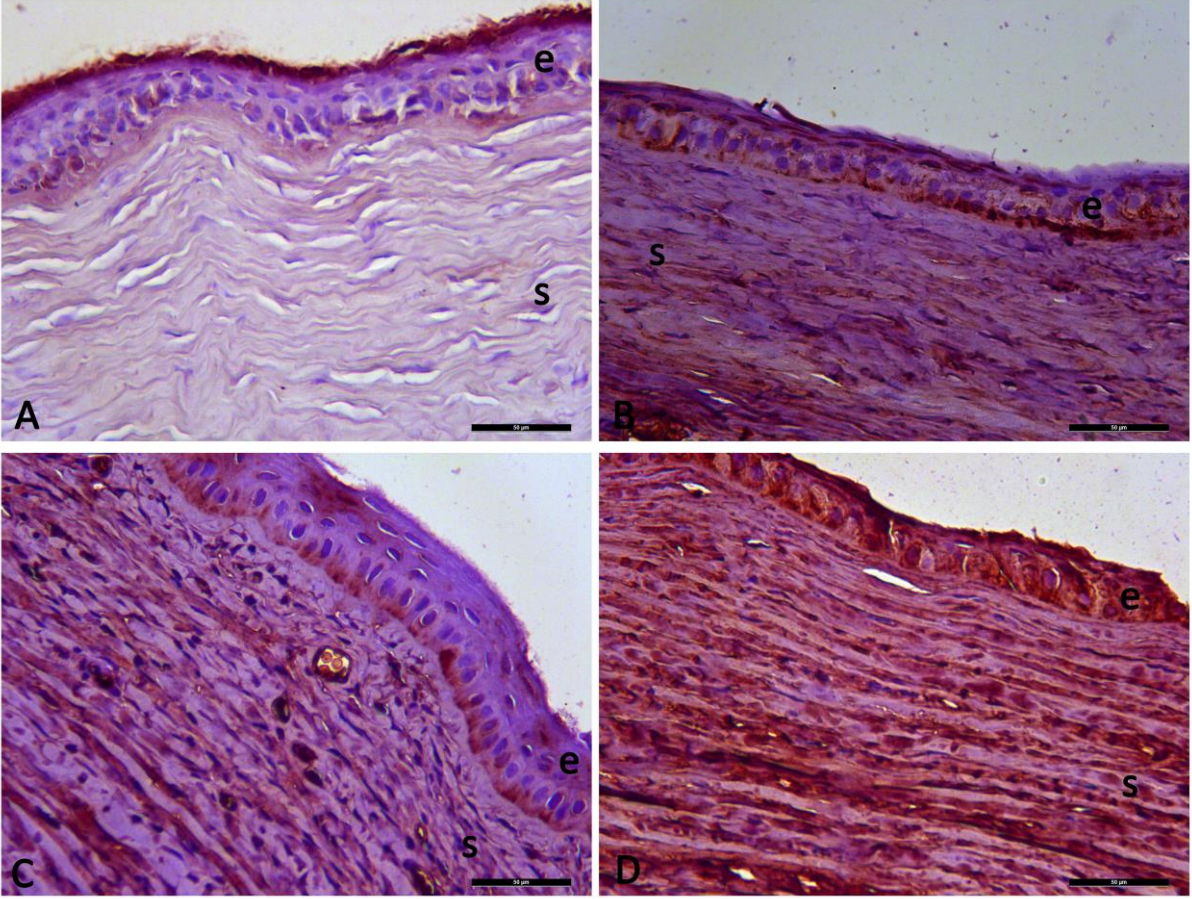
	<b>Epitel</b>	<b>Stroma</b>
Sağlıklı	0,24±0,43	0±0
Kontrol	3,12±0,64	2,45±1,03
RGTA	1,4±0,93	1,4±0,89
CXL	0,62±0,62	1,37±1

**Tablo-25:** Grupların MMP-9 boyanma (Epitel) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p<0,001	p=0,128
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p<0,001	p<0,001	-----	p<0,001
CXL	p=0,128	p<0,001	p<0,001	-----

**Tablo-26:** Grupların MMP-9 boyanma (Stroma) skorları istatistiksel karşılaştırılması

	Sağlıklı	Kontrol	RGTA	CXL
Sağlıklı	-----	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Kontrol	p<0,001	-----	p<0,001	p<0,001
RGTA	p<0,001	p<0,001	-----	p=0,999
CXL	p<0,001	p<0,001	p=0,999	-----



**Şekil-15:** MMP-9 immunhistokimya boyama uygulanan kornea kesitleri görülüyor. Sağlıklı grup (A), RGTA grubu (B), CXL grubu (C) ve Kontrol grubu (D). Kornealarda epitelde özellikle kontrol grubunda kahverengi pozitif boyanma görülüyor. Sağlıklı grup epitel üzerindeki boyanma artefakt olarak değerlendirildi. (e– epityum, s-stroma). (Ölçek çubuğu: 50 µm.)



## 8. TARTIŞMA

### 8.1 Klinik Bulgular

CXL tedavisi keratokonus gibi korneal ektazilerin tedavisinde günümüzde rutin olarak uygulanmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda CXL tedavisinin korneal kollajenin MMP gibi enzimler yoluyla enizmatik sindirilmesine karşı direnci arttırdığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır.<sup>150,151</sup> Bu gelişmeler ışığında çeşitli korneal ülserlerin tedavisinde denenilen CXL'in başarılı bulunduğu çalışmalar mevcuttur.<sup>152-155</sup> Bizim çalışmamızda CXL sonrası 1 denekte korneal perforasyon gelişmiş, 1 denekte ise orta dereceli ülserasyon geliştiği görülmüştür. Perforasyon gelişen denekte bu durumun keratite sekonder olarak gelişmiş olabileceği düşünüldü. Literatürde de CXL tedavisi sonrası keratit ve ülserasyon gelişen olgular mevcuttur.<sup>111,113,115,118,156</sup> Çalışmamızın kontrol grubundan 1 denekte de orta dereceli ülserasyon geliştiği görüldü. Bunlara karşın RGTA grubundaki 8 denekten hiçbirinde ülserasyon gelişmediği görüldü. Çeşitli kornea ülserlerinde RGTA ile yapılan çalışmalarda da RGTA'nın ülserlerde iyileşme sağladığı görülmüştür.<sup>10,157</sup> Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları da yapılan diğer çalışmalarla aynı doğrultudadır ve RGTA'nın ülserasyon üzerine olumlu etkileri olduğu ve bu konuda CXL tedavisinden daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

Epitel defektlerine bakıldığında ilk vizitte gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık yoktu (Tablo-7). 2,3 ve 4. Vizitlerde ise istatistiksel açıdan anlamlı farklılık mevcuttu ve bu farkın ana nedeni kontrol grubunun epitel defektlerinin RGTA ve CXL gruplarına göre anlamlı derecede daha büyük olmasından kaynaklanıyordu. RGTA ve CXL grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise istatistiksel açıdan anlamlı farklılık yoktu. Gruplar arasında son vizitler göz önünde bulundurulduğunda en iyi epitelyal iyileşmeyi gösteren RGTA grubu idi. Yanık sonrası 1. Haftada (2.vizit) en hızlı epitelyal iyileşme gözlenen grup ise CXL grubu idi. CXL grubu 1. Haftadaki hızlı iyileşmenin ardından nispeten sabit bir seyir göstermiş, buna karşın RGTA grubunda iyileşme daha hızlı devam etmiştir. Subaşı ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada korneal alkali yanık sonrası CXL tedavisi; kontrol ve amniyon zar transplantasyonu gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde daha iyi iyileşme göstermiştir.<sup>154</sup> Yine alkali yanık ile yapılan bir çalışmada CXL ve kontrol grubu karşılaştırılmış, CXL grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha iyi epitelyal iyileşme gösterdiği görülmüştür.<sup>158</sup> RGTA ile yapılan çalışmalar da göstermiştir ki korneal epitel defektleri ve tedaviye dirençli epitel defektlerinde RGTA etkili ve non invaziv bir tedavi yöntemidir.<sup>159-161</sup> Yaptığımız çalışmada da hem CXL hem de RGTA



epitel defekti üzerine etkili bulunmuş olup aralarında istatistiksel açıdan fark olmasa da RGTA grubunda bir miktar daha iyi bir iyileşme gözlemlenmiştir.

Kornea neovaskülarizasyonu ve opaklaşma şiddetli alkali yanık travması sonrası körlüğün en sık nedenidir.<sup>162</sup> Topikal steroidlerin rutin kullanımına rağmen<sup>163,164</sup> gelişen inflamatuvar yanıt; ödem, lipid birikimi ve korneal skar oluşumuna yol açabilir. Bir çalışma, travmadan hemen sonra neovaskülarizasyonun başladığını göstermiştir.<sup>165</sup> Vasküler endotelyumun proliferasyonu, inflamasyondan 24 saat sonra başlar.<sup>166</sup> Neovaskülarizasyon, perikorneal pleksustan kapillerlerden ve venüllerden gelen yeni damarların filizlenmesi ile oluşur.<sup>167</sup> Daha sonra ekstraselüler matriks bileşenlerinin yeniden organizasyonu sırasında, hyaluronik asit limbal bölgede birikir. Polimorfonükleer granüositler bölgeye gelir ve daha fazla inflamasyonu tetikler. Sadece lökositlerin değil, aynı zamanda korneal epitelyal, stromal ve endotelyal hücrelerin VEGF'in önemli kaynakları olduğu gösterilmiştir.<sup>168</sup> Korneanın inflamatuvar neovaskülarizasyonunda VEGF'in gerekli olduğu bilinmektedir.<sup>169,170</sup>

CXL tedavisinin korneal neovaskülarizasyonu azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>154,171</sup> Bunun, CXL'in inflamasyonu ve MMP aktivitesini azaltıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

RGTA tedavisiyle ilgili yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.<sup>122,123</sup> İnflamasyonu azaltıp re-epitelizasyonu hızlandırdığı ve VEGF ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.<sup>123</sup>

Çalışmamızın klinik sonuçlarına bakıldığında gruplar arasında tüm vizitlerde korneal vaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu (Tablo-9). 4. Vizit sonunda CXL ve RGTA grupları birbirine yakın derecelerde vaskülarize olduğu görülmüş olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,843$ ). 1. Haftadaki epitel defekti yüzdelik ölçümlerine bakıldığında kontrol grubunun CXL grubunun 2 katından daha büyük olduğu, RGTA grubunun ise 2 katı kadar olduğu görülmektedir. Son vizitteki epitel defekti yüzdelik ölçümlerine bakıldığında da kontrol grubu, RGTA grubunun 2 katından daha büyük, CXL grubunun ise hemen hemen 2 katı kadardı. Bu sonuçlar göstermektedir ki CXL ve RGTA tedavileri sonrası erken dönemde neovaskülarizasyon anlamlı derecede baskılanmaktadır ve neovaskülarizasyon ile epitel defekti arasında doğru orantılı bir korelasyon mevcuttur.

Alkali yanık sonrası görülen korneal opasifikasyon, uzun dönemli tedavi hedeflerindedir. Korneal opasite ve neovaskülarizasyon, alkali yanık sonrası görme keskinliğini uzun dönemde etkileyen ana komplikasyonlardır. Günümüzde erken dönemde

etkin bir tedavisi bulunmasa da bu konuda çalışmalar sürmektedir. Colombo-Barboza ve arkadaşları yaptığı çalışmada CXL tedavisinin alkali yanığın 15. Gününde kontrol grubuna göre anlamlı bir farkı olmadığını, ancak 30. Gününde CXL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde opasifikasyonun azaldığını göstermiştir.<sup>158</sup> Subaşı ve arkadaşlarının çalışmasında ise alkali yanık sonrası 7,14 ve 18. Günlerde CXL ve kontrol grubu arasında korneal opasitede anlamlı bir fark saptanmamıştır.<sup>154</sup> Çalışmamızda da CXL ve RGTA grupları ile kontrol grubu arasında tüm vizitlerde opasite açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo-8). 4. Vizit sonunda RGTA grubu opasifikasyonu diğer gruplara göre bir miktar daha küçüktü. Çalışmamız ve yapılan diğer çalışmalar göstermektedir ki alkali yanık sonrası korneal opasite tedavisi için uzun dönem tedavi sonuçlarına ihtiyaç vardır.

## 8.2 Histopatolojik Bulgular

CXL ve RGTA tedavisi ile yapılan farklı çalışmalarda görülmüştür ki her iki tedavi de kornea epiteli iyileşmesini teşvik etmektedir.<sup>123,154</sup> Çalışmamızda H&E ve MT boyama yapılan histolojik kesitlerde klinik sonuçlara paralel şekilde CXL ve RGTA gruplarında kontrol grubuna göre epitelin daha sağlam olduğu, splittingin daha az olduğu, stromada kollajen diziliminin daha fazla korunmuş olduğu ve vakuolizasyonların daha az olduğu görülmüştür. RGTA ve CXL grupları arasında epitel kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Bu grupların sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında epitel kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması dikkat çekiciydi.

Stromal ödem değerlendirilmesinde yine her iki tedavi grubu kontrol grubuna göre daha az ödemliydi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. RGTA ve CXL grupları arasında stromal ödem açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu fakat CXL grubunun skorlaması daha iyiydi ve sağlıklı grup ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması dikkat çekiciydi.

PMNL infiltrasyonu, alkali yanık sonrası gözlenen olağan bir cevaptır. Bu hücreler inflamasyonda çok önemli bir rol oynarlar. Ürettikleri kollajenaz yoluyla korneanın incelmeye ve ülserasyona neden olurlar.<sup>66,172</sup> Bu sebeple PMNL infiltrasyonunun engellenmesi, korneal alkali yanık sonrası komplikasyonların azaltılmasında büyük önem arz eder. CXL tedavisinin proteolitik enzimleri direkt inaktifleştirerek ve lökositleri hasara uğratarak bu enzimlerin salınımının engellenmesi yoluyla etki ettiği gösterilmiştir.<sup>173</sup> RGTA ile yapılan klinik çalışmalarda vücuttaki farklı dokularda lökosit infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir.<sup>174,175</sup> Çalışmamızda histolojik kesitlerde lökositik infiltrasyon sınıflamasına göre

RGTA ve CXL gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az lökosit infiltrasyonu olduğu görüldü.

Matriks metalloproteinazlar (MMP), laminin, fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matriks proteinlerini bozan hücre dışı bir endoproteinaz ailesidir.<sup>176</sup> MMP'ler, kanser, artrit, anjiyogenez ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere bir takım patolojik süreçlerin yanı sıra ekstrasellüler matriks yıkımının önemli bir adım olduğu normal gelişim, üreme ve doku yeniden şekillenmesinde hayati bir rol oynamaktadır.<sup>177-180</sup> MMP-9 jelatinaz/tip-4 kollajenaz grubunun bir üyesidir. MMP'ler arasında, MMP-9'un kornea epitelyal bariyer işlevini koruyan epitelyal bazal membran bileşenleri ve sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve okludin gibi) parçalanmasında merkezi bir öneme sahip olduğu bulunmuştur.<sup>181-183</sup> MMP-9 normal sağlıklı gözlerde kornea epitelinden az miktarda salgılır.<sup>184</sup> Oküler yüzey hasarının ardından MMP-9 salgınımı arttırır.<sup>148,185,186</sup> Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar gösteriyorki hem CXL hem de RGTA tedavisi kornea epiteli ve stromasından MMP-9 ekspresyonunu anlamlı ölçüde baskılamaktadır. CXL grubunun epitelyal MMP-9 ekspresyonunu çok daha başarılı şekilde engellediği görülmüştür. Kornea epitel iyileşmesinde MMP-9 ekspresyonunun baskılanmasının önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür.

Korneal alkali yanığın keratosit apoptozunu arttırdığı bilinmektedir.<sup>187</sup> CXL tedavisinin keratositlerde apoptozu arttırdığını gösteren yayınlar mevcuttur.<sup>188-190</sup> Ancak bu çalışmalarda kornealar 24 saat gibi erken dönemlerde incelenmiş, yüksek dozda UVA kullanılmış ve CXL için güvenilir UVA aralığı test edilmiştir. Bir diğer çalışmada korneal alkali yanık sonrası 21. Günde CXL uygulanan grupta apoptoz anlamlı ölçüde azalmıştır.<sup>154</sup> Topikal uygulanan RGTA tedavisinin PRK sonrası korneal ülser modelinde apoptozu azalttığı gösterilmiştir.<sup>191</sup> Çalışmamızda hücre apoptozunu belirlemek için Kaspaz-3 immünohistokimya boyası kullanılmıştır. Bunun sonucunda hem CXL hem de RGTA tedavisinin hücre apoptozunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde baskıladığı görülmüştür. Bu iki tedavi grubunun birbiri içindeki kıyaslamasında ise CXL grubunun daha başarılı olduğu görülmüştür.

Korneal vaskülarizasyon inflamasyon ve epitel defektine sekonder olarak gelişmektedir. Korneanın inflamatuvar neovaskülarizasyonunda VEGF'in gerekli olduğu bilinmektedir.<sup>169,170</sup> Cejkova ve arkadaşlarının yaptığı çalışma RGTA tedavisinin VEGF salgınımını baskıladığını ortaya koymuştur.<sup>123</sup> Çalışmamızda da CXL ve RGTA tedavilerinin VEGF salgınımını anlamlı derecede baskıladığı, CXL tedavisinin RGTA tedavisine göre bu konuda da daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

Nitrik oksit (NO) atmosferde küçük miktarlarda bulunan basit bir gaz molekülüdür. Nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla sentezlenir. NOS'un üç ayrı formu tanımlanmıştır: sinir sisteminde iki yapısal izoform [nNOS (NOS-1) ve endotelyal hücrelerde eNOS (NOS-3)] ve sitokinler veya endotoksinler tarafından transkripsiyonel aktivasyonun ardından farklı hücrelerde eksprese edilen iNOS indüklenebilir izoform (NOS-2).<sup>192,193</sup> Oküler dokularda NO, farklı durumlarla ilişkilidir.<sup>194</sup> Korneal inflamatuvar hastalıklarda, in vivo olarak yüksek NO seviyeleri görülür.<sup>195</sup> Çalışmamızda NOS izoformlarından iNOS immünhistokimya boyaması yapılarak CXL ve RGTA tedavilerinin iNOS üzerindeki etkisi incelenmiştir. Her iki tedavi yöntemi de epitelyal iNOS salınımı üzerinde anlamlı bir etki yapmamakla birlikte stromal (keratosit ve PMNL hücrelerinden) iNOS salınımını anlamlı derecede azaltmıştır. CXL tedavisi uygulanan deneklerde RGTA grubuna göre daha iyi sonuçlar alındığı görülmüştür. Cejkova ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da RGTA tedavisinin iNOS salınımını baskıladığı gösterilmiş, 6 haftalık tedavi ile baskılanmanın daha belirgin olduğu gösterilmiştir.<sup>123</sup>

## 9. SONUÇLAR

Korneal alkali yanıklar, oküler travmalar arasında tedavisi en zor olanlardan biridir. Günümüzde farklı tedaviler, alkali yanıklara bağlı oluşan komplikasyonların sağaltımında denenmektedir.

Çalışmamız verilerine göre RGTA korneal ülser oluşumunu etkili biçimde engellemiştir. CXL tedavisi ise korneal ödemi belirgin derecede azaltmış ancak ülser oluşumunu RGTA tedavisi kadar engelleyememiştir. Epitel iyileşmesinde her iki tedavi de oldukça etkili bulunmuş olup bu, histolojik preparatlarda da gösterilmiştir. Alkali yanık sonrası görme kaybının önemli sebeplerinden olan korneal vaskülarizasyonun engellenmesinde her iki tedavi de gerek klinik olarak gerekse histopatolojik incelemelerde etkili olduğu gösterilmiştir. Bir diğer morbidite sebebi olan korneal opasitenin tedavisinde ise her iki tedavinin de belirgin bir iyileşme sağlamadığı görülmüş olup, RGTA tedavisinin 6 hafta kullanıldığı çalışmada 3 haftalık sonuçlara göre daha olumlu etkiler görülmesi sebebiyle<sup>123</sup>, RGTA tedavisinin daha uzun süre kullanımının opasiteyi azaltabileceği düşünülmüştür.

Yapmış olduğumuz histopatolojik incelemeler göstermiştir ki CXL ve RGTA tedavileri alkali yanık sonrası inflamasyonun azaltılmasında da oldukça etkilidir. Her iki tedavi de hem PMNL göçünü azaltmış, hemde bu hücrelerden salınan inflamatuvar bir gösterge olan iNOS salınımını baskılamıştır.

Bu bulgularımıza göre korneal alkali yanık sonrası uygulanacak CXL ve ardından uygulanacak gınaşırı RGTA tedavisinin morbiditeyi önemli ölçüde azaltabileceğini düşünmekteyiz. CXL tedavisinin alkali yanık sonrası en ideal olarak kaçınıcı saatte/günde uygulanması gerektiği ve RGTA tedavi süresi ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Elde ettiğimiz verilere göre alkali yanık sonrası 24. Saatte uygulanacak CXL tedavisi ve 24. Saate başlamak üzere gınaşırı 1 damla şeklinde 3 hafta uygulanacak RGTA tedavisi klinik ve histopatolojik parametrelerde önemli ölçüde iyileşmeler sağlamaktadır. İki tedavinin kombine uygulanmasının tedavi etkinliğini arttırabileceğini düşünmekteyiz.

## 10. ÖZET

**Amaç:** Korneal alkali yanıklarda CXL ve RGTA tedavilerinin inflamasyon, neovaskülarizasyon ve ülserasyon mekanizmaları üzerine etkilerini klinik ve histopatolojik olarak incelemek.

**Gereç ve Yöntem:** 24 adet Yeni Zelanda ırkı dişi tavşanın sağ göz santral kornealarına 1N NaOH emdirilmiş 8 mm çaplı Whatman filtre kağıtları 1 dk süre ile uygulanarak alkali yanık modeli oluşturuldu. Model ardından denekler Kontrol grubu, RGTA grubu ,CXL grubu olarak sekizerli üç gruba ayrıldı. Rastgele seçilmiş 8 deneğin sağlam korneaları da sağlıklı grup olarak değerlendirmeye alındı. Tüm deneklerin 0,7,14 ve 21. Gün epitelyal iyileşme, opasifikasyon , ülserasyon ve neovaskülarizasyon değerlendirilmesi amacıyla ön segment optik koherans tomografi ve ön segment kornea fotoğrafları çekildi. 21. Gün son vizit sonrası denekler sakrifiye edilerek korneaları limbus sınırından alındı. Alınan kornealar histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için histoloji laboratuvarına gönderildi.

**Bulgular:** RGTA grubunda hiçbir denekte ülserasyon gelişmezken CXL grubunda ve kontrol grubunda birer denekte orta seviyeli ülserasyon, CXL grubunda bir denekte ise desmatosel gelişti. Son vizitte kornea kalınlıkları farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.058$ ). Epitelyal iyileşme açısından her iki tedavi grubu da etkili bulunmuştu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p=0.023$ ). Korneal opasite açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p=0.544$ ). Korneal vaskülarizasyon açısından her iki tedavi de etkili bulunmuş olup gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.03$ ). Histolojik incelemede; Epitel kaybı, stromal ödem, korneal vaskülarizasyon ve lökositik infiltrasyon açısından kontrol grubu ile RGTA ve CXL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p<0.05$ ). İmmünohistokimya incelemelerinde kaspaz-3, vegf, mmp-9 boyamalarda hem epitel hem stromada tedavi grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p<0.05$ ). iNOS immünohistokimya boyamasında ise tedavi grupları ile kontrol grubu arasında epitelyal üretimde istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ( $p>0.05$ ) stromal üretimde istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Hem CXL hem de RGTA tedavileri korneal alkali yanık sonrası morbiditenin azaltılmasında önemli derecede etkili bulunmuştur. İki tedavinin kombine uygulanmasının tedavi etkinliğini arttırabileceğini düşünmekteyiz. Her iki tedavinin daha etkili olabilmesi için

CXL uygulamasının optimal zamanlaması ve RGTA tedavi süresinin uzunluğuyla ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 11. ABSTRACT

**Purpose:** To investigate clinically and histopathologically examining the effects of CXL and RGTA treatments on inflammation, neovascularization and ulceration mechanisms in corneal alkali burns.

**Materials and Methods:** The right corneas of 24 New Zealand albino rabbits were anesthetized and alkali burns created with 8-mm filter paper discs (1 N NaOH for 1 minutes). After the modeling, the animals were divided three equal groups; Control group, RGTA group, and CXL group. The healthy corneas of 8 randomly selected animals were also considered as healthy group. Anterior segment optical coherence tomography and anterior segment corneal photographs were taken to evaluate epithelial healing, opacification, ulceration and neovascularization of all subjects on days 0, 7, 14 and 21. After the last visit on day 21, the animals were sacrificed and their corneas were removed from limbus border. The removed corneas were sent to the histology laboratory for histological and immunohistochemical examinations.

**Results:** There was one moderate ulceration in the CXL group and one in the control group, and a desmatocele in the CXL group, while no ulceration developed in the RGTA group. The difference in corneal thickness between the groups in the last follow-up was not statistically significant ( $p=0.058$ ). Epithelial healing was found to be effective in both treatment groups and there was a statistically significant difference between the groups ( $p=0.023$ ). There was no statistically significant difference between the groups for corneal opacity ( $p=0.544$ ). Both treatments were effective for corneal vascularization and the difference between the groups was statistically significant ( $p=0.03$ ). On histological examination; There was a statistically significant difference between control group and treatment groups for epithelial loss, stromal edema, corneal vascularization and leukocytic infiltration ( $p<0.05$ ). There was a statistically significant difference ( $p<0.05$ ) between the treatment group and the control group for both of the epithelium and stroma in the immunohistochemistry analyzes of caspase-3, vegf, and MMP-9 staining. There was a statistically significant difference in stromal production in iNOS immunohistochemistry staining ( $p<0.05$ ), although there was no statistically significant difference in epithelial production between treatment and control groups ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Both CXL and RGTA treatments have been found to be effective at reducing morbidity of corneal alkali burn. We think that the combined administration of these methods may increase the effectiveness of treatment. For both treatments to be more effective,



further studies are needed on the optimal timing of CXL administration and the length of RGTA treatment duration.



## 12. KAYNAKLAR

1. Tuft, S. J. & Shortt, a J. Surgical rehabilitation following severe ocular burns. *Eye (Lond)*. 23, 1966–1971 (2009).
2. Fish, R. & Davidson, R. S. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Curr. Opin. Ophthalmol*. 21, 317–321 (2010).
3. Kuckelkorn, R., Makropoulos, W., Kottek, A. & Reim, M. [Retrospective study of severe alkali burns of the eyes]. *Klin Monbl Augenheilkd* 203, 397–402 (1993).
4. McCulley JP. Chemical injuries. In: Smolin G, Thoft RA, editors. *Cornea Sci. Found. Clin. Pract. Bost. Mass Little Brown Co* 527–42 (1987).
5. SPOERL, E., HUHLE, M. & SEILER, T. Induction of Cross-links in Corneal Tissue. *Exp. Eye Res*. 66, 97–103 (1998).
6. Spoerl, E., Mrochen, M., Sliney, D., Trokel, S. & Seiler, T. Safety of UVA-Riboflavin Cross-Linking of the Cornea. *Cornea* 26, 385–389 (2007).
7. Kolli, S. & Aslanides, I. M. Safety and efficacy of collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Expert Opin. Drug Saf*. 9, 949–957 (2010).
8. Sharma, N., Kaur, M., Agarwal, T., Sangwan, V. S. & Vajpayee, R. B. Treatment of Acute Ocular Chemical Burns. *Surv. Ophthalmol*. (2017).  
doi:10.1016/j.survophthal.2017.09.005
9. Karti, O. *et al*. Effect of 1- and 6-Hour-Delayed Corneal Collagen Cross-Linking on Corneal Healing in a Rabbit Alkali-Burn Model. *Cornea* 35, 1644–1649 (2016).
10. Aifa, A., Gueudry, J., Portmann, A., Delcampe, A. & Muraine, M. Topical treatment with a new matrix therapy agent (RGTA) for the treatment of corneal neurotrophic ulcers. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 53, 8181–8185 (2012).
11. Hughes, L., Lockington, D., Mantry, S. & Ramaesh, K. Novel matrix ReGeneraTing Agent promotes rapid corneal wound healing. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 43, 391–392 (2015).
12. De Monchy, I. *et al*. [Management of herpes zoster neurotrophic ulcer using a new matrix therapy agent (RGTA): A case report]. *J. Fr. Ophtalmol*. 35, 187.e1-6 (2012).
13. Chappelet, M.-A., Bernheim, D., Chiquet, C. & Aptel, F. Effect of a New Matrix

- Therapy Agent in Persistent Epithelial Defects After Bacterial Keratitis Treated With Topical Fortified Antibiotics. *Cornea* 36, 1061–1068 (2017).
14. Xeroudaki, M., Peebo, B., Germundsson, J., Fagerholm, P. & Lagali, N. RGTA in corneal wound healing after transepithelial laser ablation in a rabbit model: a randomized, blinded, placebo-controlled study. *Acta Ophthalmol.* 94, 685–691 (2016).
  15. CA, P. & RR, P. Intraocular pressure changes after alkali burns. *Arch. Ophthalmol.* 91, 211–218 (1974).
  16. Wagoner, M. D. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology* 41, 275–313 (1997).
  17. Schrage, N. F. *et al.* Eye burns: An emergency and continuing problem. *Burns* 26, 689–699 (2000).
  18. Matsuda, H. & GK, S. Endothelial cells in alkali-burned corneas: Ultrastructural alterations. *Arch. Ophthalmol.* 89, 402–409 (1973).
  19. Matsuda, H. & GK, S. Epithelium and stroma in alkali-burned corneas. *Arch. Ophthalmol.* 89, 396–401 (1973).
  20. GRANT, W. M. Experimental investigation of paracentesis in the treatment of ocular ammonia burns. *AMA. Arch. Ophthalmol.* 44, 399–404 (1950).
  21. GRANT, W. M. & KERN, H. L. Action of alkalies on the corneal stroma. *AMA. Arch. Ophthalmol.* 54, 931–939 (1955).
  22. Stein, M. R., Naidoff, M. A. & Dawson, C. R. Intraocular pressure response to experimental alkali burns. *Am. J. Ophthalmol.* 75, 99–109 (1973).
  23. Paterson, C. A. & Pfister, R. R. Intraocular pressure changes after alkali burns. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 91, 211–218 (1974).
  24. Paterson, C. A., Eakins, K. E., Paterson, E., Jenkins IInd, R. M. & Ishikawa, R. The ocular hypertensive response following experimental acid burns in the rabbit eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18, 67–74 (1979).
  25. Chiang, T. S., Moorman, L. R. & Thomas, R. P. Ocular hypertensive response following acid and alkali burns in rabbits. *Invest. Ophthalmol.* 10, 270–273 (1971).
  26. Paterson, C. A., Pfister, R. R. & Levinson, R. A. Aqueous humor pH changes after

- experimental alkali burns. *Am. J. Ophthalmol.* 79, 414–419 (1975).
27. Levinson, R. a, Paterson, C. a & Pfister, R. R. Ascorbic acid prevents corneal ulceration and perforation following experimental alkali burns. *Invest. Ophthalmol.* 15, 986–93 (1976).
  28. Pfister, R. R., Friend, J. & Dohlman, C. H. The anterior segments of rabbits after alkali burns. Metabolic and histologic alterations. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 86, 189–193 (1971).
  29. Pfister, R. R. & Paterson, C. A. Additional clinical and morphological observations on the favorable effect of ascorbate in experimental ocular alkali burns. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 478–487 (1977).
  30. Pfister, R. R., Paterson, C. A. & Anderson Hayes, S. Topical ascorbate decreases the incidence of corneal ulceration after experimental alkali burns. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 1019–1024 (1978).
  31. Pfister, R., Paterson, C. A., Spiers, J. W. & Hayes, S. A. The efficacy of ascorbate treatment after severe experimental alkali burns depends upon the route of administration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 1526–1529 (1980).
  32. Pfister, R. R., Haddox, J. L., Dodson, R. W. & Deshazo, W. F. Polymorphonuclear leukocytic inhibition by citrate, other metal chelators, and trifluoperazine. Evidence to support calcium binding protein involvement. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 955–970 (1984).
  33. Christmas, R. Management of chemical burns of the canine cornea. *Can. Vet. J.* 32, 608–612 (1991).
  34. Kaufman, H. E., Barron, B. A., Mcdonald, M. B. No Title. in *The Cornea. 2.ed. Butterworth-Heine - mann* 642–671 (1998).
  35. Arffa. R. C. Grayson's Diseases of the Cornea. 4. cd. Mosby. St. Louis. 690–707 (1997).
  36. BALLEEN, P. H. TREATMENT OF CHEMICAL BURNS OF THE EYE. *Eye. Ear. Nose Throat Mon.* 43, 57–61 (1964).
  37. Roper-Hall, M. J. Thermal and chemical burns. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 85,

- 631–653 (1965).
38. Roswell R., P. Chemical Injuries of the Eye. *Ophthalmology* 90, 1246–1253 (1983).
  39. Dua, H. S., King, A. J. & Joseph, A. A new classification of ocular surface burns. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 1379–83 (2001).
  40. Chau, J. P. C., Lee, D. T. F. & Lo, S. H. S. A Systematic Review of Methods of Eye Irrigation for Adults and Children with Ocular Chemical Burns. *Worldviews on Evidence-Based Nursing* 9, 129–138 (2012).
  41. Gerard, M., Merle, H., Chiambaretta, F., Rigal, D. & Schrage, N. An amphoteric rinse used in the emergency treatment of a serious ocular burn. *Burns* 28, 670–673 (2002).
  42. Salzman, M. & O'Malley, R. N. Updates on the Evaluation and Management of Caustic Exposures. *Emergency Medicine Clinics of North America* 25, 459–476 (2007).
  43. Spector, J. & Fernandez, W. G. Chemical, Thermal, and Biological Ocular Exposures. *Emergency Medicine Clinics of North America* 26, 125–136 (2008).
  44. Kuckelkorn, R., Kottek, A., Schrage, N. & Reim, M. Poor prognosis of severe chemical and thermal eye burns: the need for adequate emergency care and primary prevention. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 281–284 (1995).
  45. Singh, P., Tyagi, M., Kumar, Y., Gupta, K. & Sharma, P. Ocular chemical injuries and their management. *Oman J. Ophthalmol.* 6, 83 (2013).
  46. Pfister, R. R., Nicolaro, M. L. & Paterson, C. A. Sodium citrate reduces the incidence of corneal ulcerations and perforations in extreme alkali-burned eyes - acetylcysteine and ascorbate have no favorable effect. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21, 486–490 (1981).
  47. Pfister, R. R., Haddox, J. L. & Lank, K. M. Citrate or ascorbate/citrate treatment of established corneal ulcers in the alkali-injured rabbit eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 1110–1115 (1988).
  48. Pfister, R. R. & Paterson, C. A. Ascorbic Acid in the Treatment of Alkali Burns of the Eye. *Ophthalmology* 87, 1050–1057 (1980).
  49. Goto, E., Shimmura, S., Shimazaki, J. & Tsubota, K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 20, 807–10 (2001).

50. Imanishi, J. *et al.* Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* 19, 113–129 (2000).
51. Panda, A. *et al.* Topical Autologous Platelet-Rich Plasma Eyedrops for Acute Corneal Chemical Injury. *Cornea* 31, 989–993 (2012).
52. Poon, A. C. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 1188–1197 (2001).
53. Tananuvat, N. *et al.* Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea* 20, 802–806 (2001).
54. Tsubota, K. *et al.* Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* 83, 390–5 (1999).
55. Vajpayee, R. B. *et al.* Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br. J. Ophthalmol.* 87, 1312–1316 (2003).
56. Lin, A., Patel, N., Yoo, D., DeMartelaere, S. & Bouchard, C. Management of ocular conditions in the burn unit: thermal and chemical burns and Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *J. Burn Care Res.* 32, 547–60 (2011).
57. C.L., B., L.T., C. J., Burns, C. L. & Chylack, L. T. J. Thermal burns: The management of thermal burns of the lids and globes. *Ann. Ophthalmol.* 11, 1358–1368 (1979).
58. Kalwerisky, K. *et al.* Use of the Boston ocular surface prosthesis in the management of severe periorbital thermal injuries: A case series of 10 patients. *Ophthalmology* 119, 516–521 (2012).
59. Ruedemann Jr., A. D. & Jardon, F. Ten years experience with scleral lenses. *Trans Am Ophthalmol Soc* 68, 245–276 (1970).
60. Segal, O. *et al.* Scleral Contact Lenses May Help Where Other Modalities Fail. *Cornea* 22, 308–310 (2003).
61. Rosenthal, P. & Cotter, J. The Boston scleral lens in the management of severe ocular surface disease. *Ophthalmology Clinics of North America* 16, 89–93 (2003).
62. Saud, E. E. *et al.* Clinical and Histopathological Outcomes of Subconjunctival Triamcinolone Injection for the Treatment of Acute Ocular Alkali Burn in Rabbits. *Cornea* 31, 181–187 (2012).

63. Beams, R., Linabery, L. & Grayson, M. Effect of Topical Corticosteroids on Corneal Wound Strength. *Am. J. Ophthalmol.* 66, 1131–1133 (1968).
64. Donshik, P. C. *et al.* Effect of topical corticosteroids on ulceration in alkali-burned corneas. *Arch. Ophthalmol.* 96, 2117–2120 (1978).
65. Davis, A. R., Ali, Q. H., Aclimandos, W. A. & Hunter, P. A. Topical steroid use in the treatment of ocular alkali burns. *Br. J. Ophthalmol.* 81, 732–734 (1997).
66. Reim, M., Bahrke, C., Kuckelkorn, R. & Kuwert, T. Investigation of enzyme activities in severe burns of the anterior eye segment. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 231, 308–312 (1993).
67. Gabler, W. L. & Creamer, H. R. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *Journal of periodontal research* 26, 52–8 (1991).
68. Ling, S. *et al.* Allograft survival enhancement using doxycycline in alkali-burned mouse corneas. *Acta Ophthalmol.* 91, (2013).
69. Ralph, R. a. Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea* 19, 274–277 (2000).
70. Seedor, J. A. *et al.* Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulceration in rabbits. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 105, 268–71 (1987).
71. Iseli, H. P., Thiel, M. A., Hafezi, F., Kampmeier, J. & Seiler, T. Ultraviolet A/Riboflavin Corneal Cross-linking for Infectious Keratitis Associated With Corneal Melts. *Cornea* 27, 590–594 (2008).
72. Wollensak, G., Spoerl, E. & Seiler, T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am. J. Ophthalmol.* 135, 620–627 (2003).
73. Sompuram, S. R., Vani, K., Messana, E. & Bogen, S. A. A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 190–199 (2004).
74. Balguid, A. *et al.* The Role of Collagen Cross-Links in Biomechanical Behavior of Human Aortic Heart Valve Leaflets—Relevance for Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 13, 1501–1511 (2007).
75. Foote, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types

- of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162, 963–970 (1968).
76. Fujimori, E. Cross-linking of collagen CNBr peptides by ozone or UV light. *FEBS Lett.* 235, 98–102 (1988).
  77. Spoerl, E., Huhle, M., Kasper, M. & Seiler, T. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Ophthalmologie* 94, 902–906 (1997).
  78. Spörl, E., Schreiber, J., Hellmund, K., Seiler, T. & Knuschke, P. Studies on the stabilization of the cornea in rabbits. *Ophthalmologie* 97, 203–206 (2000).
  79. Ashwin, P. T. & McDonnell, P. J. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br. J. Ophthalmol.* 94, 965–70 (2010).
  80. Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H. & Reusch, J. E. B. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 29, 1420–1432 (2006).
  81. John, W. G. & Lamb, E. J. The maillard or browning reaction in diabetes. *Eye* 7, 230–237 (1993).
  82. Seiler, T., Huhle, S., Spoerl, E. & Kunath, H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 238, 822–5 (2000).
  83. Kuo, I. C., Broman, A., Pirouzmanesh, A. & Melia, M. Is there an association between diabetes and keratoconus? *Ophthalmology* 113, 184–190 (2006).
  84. Elsheikh, A. *et al.* Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr. Eye Res.* 32, 11–19 (2007).
  85. Richoz, O., Hammer, A., Tabibian, D., Gatziofias, Z. & Hafezi, F. The Biomechanical Effect of Corneal Collagen Cross-Linking (CXL) With Riboflavin and UV-A is Oxygen Dependent. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 2, 6 (2013).
  86. Krueger, R., Spoerl, E. & Herekar, S. Rapid vs Standard Collagen CXL with Equivalent Energy Dosing. in *Rapid vs Standard Collagen CXL with Equivalent Energy Dosing* (2007).
  87. Abad, J. C. & Panesso, J. L. Corneal collagen cross-linking induced by UVA and riboflavin (CXL). *Tech. Ophthalmol.* 6, 8–12 (2008).



88. Chan, C. C. K., Sharma, M. & Wachler, B. S. B. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J. Cataract Refract. Surg.* 33, 75–80 (2007).
89. Caporossi, A., Baiocchi, S., Mazzotta, C., Traversi, C. & Caporossi, T. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen. Preliminary refractive results in an Italian study. *J. Cataract Refract. Surg.* 32, 837–845 (2006).
90. Alió, J. L., Abbouda, A., Valle, D. D., del Castillo, J. M. B. & Fernandez, J. A. G. Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* 3, 47 (2013).
91. Salgado, J. P., Khoramnia, R., Lohmann, C. P. & Winkler Von Mohrenfels, C. Corneal collagen crosslinking in post-LASIK keratectasia. *Br. J. Ophthalmol.* 95, 493–497 (2011).
92. Tong, J. Y. *et al.* Corneal Collagen Crosslinking for Post-LASIK Ectasia: An Australian Study. *Asia-Pacific J. Ophthalmol.* 6, 228–232 (2017).
93. Li, G., Fan, Z.-J. & Peng, X.-J. Corneal collagen crosslinking for corneal ectasia of post-LASIK: one-year results. *Int. J. Ophthalmol.* 5, 190–5 (2012).
94. Kremer, I., Aizenman, I., Lichter, H., Shayer, S. & Levinger, S. Simultaneous wavefront-guided photorefractive keratectomy and corneal collagen crosslinking after intrastromal corneal ring segment implantation for keratoconus. *J. Cataract Refract. Surg.* 38, 1802–1807 (2012).
95. Ghanem, R. C., Santhiago, M. R., Berti, T. B., Thomaz, S. & Netto, M. V. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *J. Cataract Refract. Surg.* 36, 273–276 (2010).
96. Iseli, H. P., Thiel, M. A., Hafezi, F., Kampmeier, J. & Seiler, T. Ultraviolet a/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea* 27, 590–594 (2008).
97. Caporossi, A., Mazzotta, C., Baiocchi, S. & Caporossi, T. Long-term Results of Riboflavin Ultraviolet A Corneal Collagen Cross-linking for Keratoconus in Italy: The Siena Eye Cross Study. *Am. J. Ophthalmol.* 149, 585–593 (2010).
98. Asri, D. *et al.* Corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: Multicenter

- results from the French National Reference Center for Keratoconus. *J. Cataract Refract. Surg.* 37, 2137–2143 (2011).
99. Raiskup, F., Theuring, A., Pillunat, L. E. & Spoerl, E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: Ten-year results. *J. Cataract Refract. Surg.* 41, 41–46 (2015).
  100. O’Brart, D. P. S. *et al.* Corneal Cross-linking to Halt the Progression of Keratoconus and Corneal Ectasia: Seven-Year Follow-up. *Am. J. Ophthalmol.* 160, 1154–1163 (2015).
  101. Wittig-Silva, C. *et al.* A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: Three-year results. *Ophthalmology* 121, 812–821 (2014).
  102. Vinciguerra, P., Albè, E., Trazza, S., Seiler, T. & Epstein, D. Intraoperative and postoperative effects of corneal collagen cross-linking on progressive keratoconus. *Arch. Ophthalmol.* 127, 1258–1265 (2009).
  103. Coskunseven, E., Jankov, M. R. & Hafezi, F. Contralateral Eye Study of Corneal Collagen Cross-Linking with Riboflavin and UVA Irradiation in Patients with Keratoconus. *J. Refract. Surg.* 25, 371–376 (2009).
  104. Kanellopoulos, A. J. & Binder, P. S. Collagen cross-linking (CCL) with sequential topography-guided PRK: A temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea* 26, 891–895 (2007).
  105. Hafezi, F., Kanellopoulos, J., Wiltfang, R. & Seiler, T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract Refract. Surg.* 33, 2035–2040 (2007).
  106. Ehlers, N. & Hjortdal, J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol.* 86, 549–551 (2008).
  107. Wollensak, G., Aurich, H., Wirbelauer, C. & Pham, D. T. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res.* 41, 114–117 (2009).
  108. Krueger, R. R., Ramos-Esteban, J. C. & Kanellopoulos, a J. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *J. Refract. Surg.* 24, S730–S736 (2008).

109. Corbin, F. Pathogen inactivation of blood components: Current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. *Int. J. Hematol.* 76, 253–257 (2002).
110. Martins, S. A. R. *et al.* Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: A potential new treatment for infectious keratitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3402–3408 (2008).
111. Sharma, N., Maharana, P., Singh, G. & Titiyal, J. S. Pseudomonas keratitis after collagen crosslinking for keratoconus: Case report and review of literature. *J. Cataract Refract. Surg.* 36, 517–520 (2010).
112. Pollhammer, M. & Cursiefen, C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J. Cataract Refract. Surg.* 35, 588–589 (2009).
113. Pérez-Santonja, J. J., Artola, A., Javaloy, J., Alió, J. L. & Abad, J. L. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *J. Cataract Refract. Surg.* 35, 1138–1140 (2009).
114. Zamora, K. V. & Males, J. J. Polymicrobial keratitis after a collagen cross-linking procedure with postoperative use of a contact lens. *Cornea* 28, 474–476 (2009).
115. Rama, P., Di Matteo, F., Matuska, S., Paganoni, G. & Spinelli, A. Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use. *J. Cataract Refract. Surg.* 35, 788–791 (2009).
116. Kymionis, G. D. *et al.* Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J. Cataract Refract. Surg.* 33, 1982–1984 (2007).
117. Raiskup, F., Hoyer, A. & Spoerl, E. Permanent Corneal Haze After Riboflavin-UVA-Induced Cross-Linking in Keratoconus. *J. Refract. Surg.* 25, S824–S828 (2009).
118. Koppen, C., Vryghem, J. C., Gobin, L. & Tassignon, M.-J. Keratitis and Corneal Scarring After UVA/Riboflavin Cross-Linking for Keratoconus. *J. Refract. Surg.* 25, S819–S823 (2009).
119. Wollensak, G., Spoerl, E., Wilsch, M. & Seiler, T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J. Cataract Refract. Surg.* 29, 1786–1790 (2003).

120. Angunawela, R. I., Arnalich-Montiel, F. & Allan, B. D. S. Peripheral sterile corneal infiltrates and melting after collagen crosslinking for keratoconus. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 35, 606–607 (2009).
121. Brignole, F. *et al.* Effects of RGTA OTR4131 on Ocular Surface: in vivo Evaluation on a Rabbit Corneal Wound Healing Model and in vitro Toxicological Studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2166 (2005).
122. Brignole-Baudouin, F., Warnet, J. M., Barritault, D. & Baudouin, C. RGTA-based matrix therapy in severe experimental corneal lesions: Safety and efficacy studies. *J. Fr. Ophthalmol.* 36, 740–747 (2013).
123. Cejkova, J., Olmiere, C., Cejka, C., Trosan, P. & Holan, V. The healing of alkali-injured cornea is stimulated by a novel matrix regenerating agent (RGTA, CACICOL20) - A biopolymer mimicking heparan sulfates reducing proteolytic, oxidative and nitrosative damage. *Histol. Histopathol.* 29, 457–478 (2014).
124. Chebbi, C. K. *et al.* [Pilot study of a new matrix therapy agent (RGTA OTR4120) in treatment-resistant corneal ulcers and corneal dystrophy]. *J. Fr. Ophthalmol.* 31, 465–71 (2008).
125. Mateo, A. *et al.* Treatment of Acanthamoeba neurotrophic corneal ulcer with topical matrix therapy. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* 5, (2015).
126. Pison, A., Feumi, C. & Bourges, J.-L. [Healing of a resistant neurotrophic corneal ulcer using a new matrix therapy agent]. *Journal francais d'ophtalmologie* 37, e101-4 (2014).
127. Kymionis, G. D. *et al.* Effect of the Regenerative Agent Poly(Carboxymethylglucose Sulfate) on Corneal Wound Healing after Corneal Cross-Linking for Keratoconus. *Cornea* 34, 928–931 (2015).
128. Aslanides, I. M., Selimis, V. D., Bessis, N. V. & Georgoudis, P. N. A pharmacological modification of pain and epithelial healing in contemporary transepithelial all-surface laser ablation (ASLA). *Clin. Ophthalmol.* 9, 685–690 (2015).
129. Alcalde, I., Íñigo-Portugués, A., Carreño, N., Riestra, A. C. & Merayo-Llodes, J. M. Effects of new biomimetic regenerating agents on corneal wound healing in an experimental model of post-surgical corneal ulcers. *Arch. la Soc. Española Oftalmol.*

- (*English Ed.* 90, 467–474 (2015)).
130. Ikeda, Y. *et al.* Synthesis and biological activities of a library of glycosaminoglycans mimetic oligosaccharides. *Biomaterials* 32, 769–776 (2011).
  131. Eming, S. a, Krieg, T. & Davidson, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 127, 514–25 (2007).
  132. Meddahi, A. *et al.* Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 525–531 (2002).
  133. Meddahi, A., Lemdjabar, H., Caruelle, J. P., Barritault, D. & Hornebeck, W. FGF protection and inhibition of human neutrophil elastase by carboxymethyl benzylamide sulfonate dextran derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* 18, 141–145 (1996).
  134. Meddahi, A., Lemdjabar, H., Caruelle, J. P., Barritault, D. & Hornebeck, W. Inhibition by dextran derivatives of FGF-2 plasmin-mediated degradation. *Biochimie* 77, 703–706 (1995).
  135. Tardieu, M., Gamby, C., Avramoglou, T., Jozefonvicz, J. & Barritault, D. Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators, and protectors of acidic or basic FGF. *J. Cell. Physiol.* 150, 194–203 (1992).
  136. Albanese, P. *et al.* Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: Structure/function insights\*. *Exp. Hematol.* 37, 1072–1083 (2009).
  137. Mestries, P. *et al.* Specific RGTA increases collagen V expression by cultured aortic smooth muscle cells via activation and protection of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Matrix Biol.* 20, 171–181 (2001).
  138. Rouet, V. *et al.* A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 32792–32800 (2005).
  139. Rouet, V. *et al.* Heparin-like synthetic polymers, named RGTAs, mimic biological effects of heparin in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 78, 792–797 (2006).
  140. Yue, X. L. *et al.* Insights on a new path of pre-mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic. *Cell Death Differ.* 16, 770–781 (2009).
  141. Mangoni, M. *et al.* Differential Effect Triggered by a Heparan Mimetic of the RGTA

- Family Preventing Oral Mucositis Without Tumor Protection. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 1242–1250 (2009).
142. Frescaline, G. *et al.* Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* 8, 180–192 (2012).
143. Tong, M. *et al.* RGTA OTR 4120, a heparan sulfate proteoglycan mimetic, increases wound breaking strength and vasodilatory capability in healing rat full-thickness excisional wounds. *Wound Repair Regen.* 16, 294–299 (2008).
144. Germundsson, J. & Lagali, N. Pathologically reduced subbasal nerve density in epithelial basement membrane dystrophy is unaltered by phototherapeutic keratectomy treatment. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 1835–1841 (2014).
145. Barritault, D. *et al.* RGTA® or ReGeneraTing Agents mimic heparan sulfate in regenerative medicine: from concept to curing patients. *Glycoconjugate Journal* 34, 325–338 (2017).
146. Kymionis, G. D. *et al.* Combined topical application of a regenerative agent with a bandage contact lens for the treatment of persistent epithelial defects. *Cornea* 33, 868–872 (2014).
147. Gumus, K., Guerra, M. G., de Melo Marques, S. H., Karaküçük, S. & Barritault, D. A New Matrix Therapy Agent for Faster Corneal Healing and Less Ocular Discomfort Following Epi-off Accelerated Corneal Cross-linking in Progressive Keratoconus. *J. Refract. Surg.* 33, 163–170 (2017).
148. Fini, M. E., Cook, J. R. & Mohan, R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch. Dermatol. Res.* 290 Suppl, S12-23 (1998).
149. Stern, M. E. *et al.* Effects of Fourth-Generation Fluoroquinolones on the Ocular Surface, Epithelium, and Wound Healing. *Cornea* 25, (2006).
150. H.-Z., J. Effect of matrix metalloproteinases in keratoconus. *Int. Eye Sci.* 16, 1644–1647 (2016).
151. Shetty, R. *et al.* Outcomes of Corneal Cross-Linking Correlate With Cone-Specific Lysyl Oxidase Expression in Patients With Keratoconus. *Cornea* 37, 369–374 (2018).

152. Zamani, M., Panahi-Bazaz, M. & Assadi, M. Corneal collagen cross-linking for treatment of non-healing corneal ulcers. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 10, 16–20 (2015).
153. Price, M. O. & Price, F. W. Corneal cross-linking in the treatment of corneal ulcers. *Current Opinion in Ophthalmology* 27, 250–255 (2016).
154. Subasi, S. *et al.* Comparison of Collagen Cross-Linking and Amniotic Membrane Transplantation in an Experimental Alkali Burn Rabbit Model. *Cornea* 36, 1106–1115 (2017).
155. Gao, X.-W., Zhao, X.-D., Li, W.-J., Zhou, X. & Liu, Y. Experimental study on the treatment of rabbit corneal melting after alkali burn with Collagen cross-linking. *Int. J. Ophthalmol.* 5, 147–50 (2012).
156. Pollhammer, M. & Cursiefen, C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J. Cataract Refract. Surg.* 35, 588–589 (2009).
157. Arvola, R. P. J., Robciuc, A. & Holopainen, J. M. Matrix regeneration therapy: A case series of corneal neurotrophic ulcers. *Cornea* 35, 451–455 (2016).
158. Colombo-Barboza, M., Colombo-Barboza, G., Felberg, S., Dantas, P. E. C. & Sato, E. H. Induction of corneal collagen cross-linking in experimental corneal alkali burns in rabbits. *Arq. Bras. Oftalmol.* 77, 310–314 (2014).
159. JULIENNE, R. *et al.* Topical treatment with a new matrix therapy agent (RGTA, CACICOL-20) improves epithelial wound healing after penetrating keratoplasty. *Acta Ophthalmol.* 92, (2014).
160. Solmaz, N. Regenerating Agent (RGTA) based matrix therapy for treatment-resistant persistent epithelial defects. *New Front. Ophthalmol.* 3, 1–3 (2017).
161. Bata, A. M. *et al.* Effect of a matrix therapy agent on corneal epithelial healing after standard collagen cross-linking in patients with keratoconus: A randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol.* 134, 1169–1176 (2016).
162. Chang, J. H., Gabison, E. E., Kato, T. & Azar, D. T. Corneal neovascularization. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 12, 242–249 (2001).
163. Den, S., Sotozono, C., Kinoshita, S. & Ikeda, T. Efficacy of early systemic betamethasone or cyclosporin A after corneal alkali injury via inflammatory cytokine

- reduction. *Acta Ophthalmol. Scand.* 82, 195–199 (2004).
164. Kuckelkorn, R., Schrage, N., Keller, G. & Redbrake, C. Emergency treatment of chemical and thermal eye burns. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 80, 4–10 (2002).
  165. Gan, L. & Fagerholm, P. Leukocytes in the early events of corneal neovascularization. *Cornea* 20, 96–99 (2001).
  166. Kvanta, A., Sarman, S., Fagerholm, P., Seregard, S. & Steen, B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp. Eye Res.* 70, 419–428 (2000).
  167. Yaylali, V., Ohta, T., Kaufman, S. C., Maitchouk, D. Y. & Beuerman, R. W. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea* 17, 646–653 (1998).
  168. Gan, L., Fagerholm, P. & Palmblad, J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol. Scand.* 82, 557–563 (2004).
  169. Kvanta, A. Ocular angiogenesis: The role of growth factors. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 84, 282–288 (2006).
  170. Amano, S., Rohan, R., Kuroki, M., Tolentino, M. & Adamis, A. P. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 18–22 (1998).
  171. Report, C. Extensive Corneal Neovascularisation Treatment by Ultraviolet Corneal Collagen Crosslinking. 62–64 (2017).
  172. Paterson, C. A., Williams, R. N. & Parker, A. V. Characteristics of polymorphonuclear leukocyte infiltration into the alkali burned eye and the influence of sodium citrate. *Exp. Eye Res.* 39, 701–708 (1984).
  173. Ehlers, N., Hjortdal, J., Nielsen, K. & Sondergaard, A. Riboflavin-UVA treatment in the management of edema and nonhealing ulcers of the cornea. *J. Refract. Surg.* 25, S803-6 (2009).
  174. Barbier-Chassefiere, V. *et al.* Matrix therapy in regenerative medicine, a new approach to chronic wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. A* 90, 641–647 (2009).



175. Escartin, Q. *et al.* A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 644–651 (2003).
176. Li, D. Q. *et al.* Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 73, 449–459 (2001).
177. Woessner, J. F. J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2145–2154 (1991).
178. Clark, A. F. New discoveries on the roles of matrix metalloproteinases in ocular cell biology and pathology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2514–2516 (1998).
179. Moses, M. A. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 15, 180–189 (1997).
180. Kugler, A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* 19, 1589–1592 (1999).
181. Asahi, M. *et al.* Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 21, 7724–7732 (2001).
182. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463–516 (2001).
183. Behzadian, M. A., Wang, X. L., Windsor, L. J., Ghaly, N. & Caldwell, R. B. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 853–859 (2001).
184. Smith, V. A., Rishmawi, H., Hussein, H. & Easty, D. L. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 147–153 (2001).
185. Pflugfelder, S. C. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am. J. Pathol.* 166, 61–71 (2005).
186. Zhang, H., Li, C. & Baciuc, P. C. Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 955–962 (2002).

187. Arikan, S. *et al.* Effect of topically applied azithromycin on corneal epithelial and endothelial apoptosis in a rat model of corneal alkali burn. *Cornea* (2016). doi:10.1097/ICO.0000000000000730
188. Wollensak, G., Spoerl, E., Wilsch, M. & Seiler, T. Keratocyte Apoptosis after Corneal Collagen Cross-linking Using Riboflavin/UVA Treatment. *Cornea* (2004). doi:10.1097/00003226-200401000-00008
189. Wollensak, G., Spoerl, E., Reber, F. & Seiler, T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye* (2004). doi:10.1038/sj.eye.6700751
190. Song, X. *et al.* Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *Biomed Res. Int.* (2015). doi:10.1155/2015/254237
191. Riestra, A. C. *et al.* Effectiveness of regenerative drops (CALCICOL) on corneal ulcers (post-PRK) in an experimental animal model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 5176 (2014).
192. Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100, 2417–2423 (1997).
193. Christopherson, K. & Brecht, D. Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. *J. Clin. Invest* 100, 2424–2429 (1997).
194. Becquet, F., Courtois, Y. & Goureau, O. Nitric oxide in the eye: Multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv. Ophthalmol.* (1997). doi:10.1016/S0039-6257(97)84043-X
195. Dighiero, P., Behar-Cohen, F., Courtois, Y. & Goureau, O. Expression of inducible nitric oxide synthase in bovine corneal endothelial cells and keratocytes in vitro after lipopolysaccharide and cytokines stimulation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1997).