

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

**CROSS-LİNKİNG TEDAVİSİNDE, RİBOFLAVİNE ALTERNATİF
OLABİLECEK QUERCETİNİN TAVŞAN KORNEASINDA
ETKİNLİĞİNİN VE GÜVENİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Büşra KATRE

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2014

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

**CROSS-LİNKİNG TEDAVİSİNDE, RİBOFLAVİNE ALTERNATİF
OLABİLECEK QUERCETİNİN TAVŞAN KORNEASINDA
ETKİNLİĞİNİN VE GÜVENİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Büşra KATRE

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özgül ALTINTAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Etik Kurul Onayı İlk 03.07.2012 tarihli KOÜ/HADYЕК – 6/2-2012

Etik Kurul Onayı Son 09.04.2013 tarihli KOÜ/HADYЕК – 4/3-2013

ÖNSÖZ

Kliniğimizizin kurucusu, Kocaeli Tıp Fakültesi kurucularından değerli hocamız Prof. Dr. Yusuf Çağlar ile birlikte çalışma şansını yakalamış bir hekim olarak; kendisine bizlerin bu yolculuğumuzda engin bilgilerinden faydalanabileceğimiz cömert bir deniz ve her zaman sığınabileceğimiz güvenilir bir liman gibi yanımızda, arkamızda duruşundan dolayı öncelikle sözcüklerle ifade edemeyeceğim en içten teşekkürlerimi ve en derin saygılarımı sunarım.

Eğitimimizde büyük pay sahibi olan, bilgi ve tecrübelerini en samimi haliyle bizlerle paylaşan, değerli hocamız Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurşen Yüksel'e; uzmanlık eğitimim süresince ve bilhassa tez çalışmalarım sürecinde ilgiyle, titizlikle ve sevgiyle benden desteğini ve tecrübelerini esirgemeyen, her an yanımda olduğunu hissettirip her sıkıntıda benimle birlikte taşın altına elini koymaktan geri durmayan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Özgül Altıntaş'a; birlikte çalışmış olmaktan gurur duyduğum ve ömrüm boyunca övünç duyacağım, cerrahisine hayran olduğum, bizlerden hiçbir bilgi ve tecrübesini esirgemeyip bilakis en iyi şekilde yetiştirmemiz için en cesur tutumla bizleri en zorlu vakalara iterek hekimlik hayatımız boyunca karşılaşılabileceğimiz türlü zorluklara bağışıklık sağlamamızda büyük katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Levent Karabaş'a; güler yüzü ve sıcak kanlı yapısıyla her an ulaşabileceğimiz mesafede gördüğümüz, eğitimimize büyük katkısı olan, bilgi ve becerilerini hiçbir zaman esirgemedi büyük bir özveriyle en iyi şekilde yetiştirmemiz için bizlerle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Berna Özkan'a; yine tecrübe ve bilgilerini bizden esirgemeyen, bir abla olarak gördüğümüz değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Dilara Pirhan'a; tez çalışmalarım sırasında benden desteğini esirgemeyip ufkumu genişleten değerli hocalarım Prof. Dr. Kürşat Yıldız'a, Yrd. Doç. Dr. Abdülkadir Cengiz'e ve Doç. Dr. Murat Kasap'a teşekkür ederim.

Başta tezimin yapım aşamasında emeği olan değerli dostum Dr. Esra Emre'ye olmak üzere bütün asistan arkadaşlarıma en içten sevgilerimi sunar, teşekkür ederim.

Bizlerle birlikte yeri geldiğinde geç saatlere kadar mesaide kalan, hastanenin işleyişi için hiçbir özveriden kaçmayan değerli hemşirelerimize, sekreterlerimize ve personelimize de teşekkürü borç bilir, emeklerine saygımı bilmelerini temenni ederim.

Hekim olmadığı halde hekimlik mesleğinin zorluklarını benimle birlikte tecrübe eden, pozitif mizacıyla zor zamanlarımda sabırla en büyük destekçim olmaktan bir an vazgeçmeyen değerli eşim Musa Furkan Katre'ye teşekkürü borç bilirim.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan annem ve babama, öğrencilik hayatım boyunca en yakın arkadaşım, destekçim olan ablama ve tüm aileme teşekkür ederim.

Saygılarımla,

Dr. Büşra KATRE



İçindekiler Dizini

<u>Konu Başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
İç kapak sayfası	2
Önsöz	3
İçindekiler dizini	5
Simgeler ve kısaltmalar dizini	8
Şekiller dizini	11
Tablo ve denklem dizini	13
1. AMAÇ VE KAPSAM	15
GENEL BİLGİLER	
2. KERATOKONUS	16
2.1. EPİDEMİYOLOJİ	16
2.2. KERATOKONUSUN ETYOPATOGENEZİ	17
2.2.1. Heredite	17
2.2.2. Mekanik travma	18
2.2.3. Enzimatik değişiklikler	18
2.2.4. Keratokonusta korneal incelme mekanizmaları	18
2.3. HİSTOPATOLOJİ	21
2.3.1. Epitel	21
2.3.2. Bazal membran	21
2.3.3. Sinir lifleri	21
2.3.4. Bowman tabakası	22
2.3.5. Stroma	22
2.3.6. Descemet membranı	22

2.3.7.	Endotel	22
2.4.	KLİNİK ÖZELLİKLER	23
2.4.1.	Semptomlar	23
2.4.2.	Bulgular	24
2.5.	SINIFLANDIRMA	24
2.6.	AYIRICI TANI	26
2.7.	TEDAVİ	26
2.7.1.	Gözlük ile refraktif düzeltme	26
2.7.2.	Kontakt Lens ile refraktif düzeltme	26
2.7.3.	İntastromal korneal ring uygulaması	26
2.7.4.	Penetran, lameller keratoplasti ve epikeratofaki	27
2.7.5.	Termokeratoplasti	27
2.7.6.	Kollajen Cross-linking (CXL) Tedavi	28
2.7.6.1.	Tarihçe	28
2.7.6.2.	Kollajen çapraz bağlanmanın biyokimyası	29
2.7.6.3.	Teknik	31
2.7.6.4.	Tedavi Endikasyonları	34
2.7.6.5.	Tedavi Kontrendikasyonları	34
2.7.6.6.	Sonuçlar	35
2.7.6.7.	Güvenlik	36
2.7.6.8.	Komplikasyonlar	36
2.7.6.9.	Tedavinin bilinmeyenleri ve hedefler	37
3.	FLAVONOİDLER	38
3.1.	Flavonoidlerin genel yapısı	38
3.2.	Flavonoidlerin genel özellikleri	38

4.	QUERCETİN	40
4.1.	Quercetin bileşiminin fiziksel özellikleri	40
4.2.	Prooksidan ve antioksidan ajan olarak quercetin	41
4.3.	Kimyasal CXL ajanı olarak quercetin	41
4.4.	Fotooksidatif ve fotosensitizatör ajan olarak quercetin	41
4.5.	Riboflavine alternatif fotooksidatif CXL ajanı olarak quercetin	42
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	43
5.1.	Crosslinking cihazının özellikleri	44
5.2.	Denekler	44
5.3.	Crosslinking uygulaması	46
5.4.	Histopatolojik inceleme	47
5.5.	Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneğinin hazırlanması	48
5.6.	İstatistiksel değerlendirme	53
6.	BULGULAR	53
6.1.	Histopatolojik değerlendirme bulguları	53
6.2.	Biyomekanik test bulguları	57
6.3.	Klinik bulgular	62
7.	TARTIŞMA	63
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	75
9.	ÖZET	77
10.	ABSTRACT	79
11.	KAYNAKLAR	81

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

CXL	: Kollajen crosslinking
MMP	: Matriks metalloproteinaz
TIMP	: Metalloproteinaz doku inhibitörü
UV	: Ultraviyole
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
NO	: Nitrik oksit
ALDH	: Aldehid dehidrogenaz
MDA	: Malondialdehid
NT	: Nitrotirozin
LAR	: Leucocyte common antigen related protein
İL	: İnterlökin
SP1	: İşaretleyici faktör
TGF	: Transforming growth factor
D	: Diyoptri
PMMA	: Poly methyl methacrylate
µm	: mikrometre
PK	: Penetran keratoplasti
O₃	: Ozon
Nm	: Nanometre
HBA1c	: Hemoglobin A1c
LED	: Light emitting diode
C3-R	: Epitel kapalı kollajen crosslinking tedavi
PRK	: Fotorefraktif keratektomi

LASİK	: Laser-assisted in situ keratomileusis
K	: keratometri
FDA	: Food and Drug Administration
GİB	: Göz içi basıncı
O₂	: Süperoksit
RO	: Lipid alkoksil
ROO	: Lipid peroksil
M	: molar
TNF	: Tumor necrosis factor
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
ORAC	: Oksijen radikal absorban kapasitesi
C	: Karbon
H	: Hidrojen
O	: Oksijen
DETAB	: Deneysel Tıbbi Araştırmalar Birimi
DEHYUAM	: Deneysel Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi
K	: Kontrol grubu
T	: %10'lük Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyon grubu
R	: Riboflavin grubu
Q	: Quercetin grubu
TBS	: Tris buffered saline
SMA	: Smooth muscle actin
H&E	: Hematoksilen-Eozin
F	: Kuvvet-Yük
ΔL	: Uzama miktarı

L	: İlk boy
B	: Kalınlık
ϵ	: Gerilim-mukavemet
σ	: Gerinim
E	: Elastiklik modülü-Young modülü
A	: Birim kesit alan
DC	: Doğru akım
MPa	: Mega Pascal
N	: Newton
SD	: Standart sapma

Şekiller Dizini

<u>Şekil numarası ve başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
<u>Şekil 1:</u> Keratokonusta korneadaki histopatolojik değişiklikler	23
<u>Şekil 2:</u> Riboflavin UVA etkileşimi ile çapraz kovalent bağların oluşumu	31
<u>Şekil 3:</u> Quercetin bileşiğinin açık formülü	40
<u>Şekil 4:</u> Riboflavinin flöresans spektrumu	42
<u>Şekil 5:</u> Quercetin'in flöresans spektrumu	43
<u>Şekil 6:</u> CXL tedavi düzeneği ve uygulama	47
<u>Şekil 7:</u> Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği	48
<u>Şekil 8:</u> Test düzeneğinin şematik görünümü	49
<u>Şekil 9:</u> Test düzeneği için hazırlanmış programa ait kullanıcı ara yüzü	50
<u>Şekil 10:</u> σ - ϵ eğrisi ve E'nin tespiti	52
<u>Şekil 11:</u> Biyomekanik test düzeneğinde çeneler arasına sıkıştırılmış korneal şerit	52
<u>Şekil 12:</u> Maksimum gerilme değerine ulaşan dokuda deformasyon anı	53
<u>Şekil 13:</u> K grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	54
<u>Şekil 14:</u> T grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	54
<u>Şekil 15:</u> R grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	55
<u>Şekil 16:</u> Q grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	55
<u>Şekil 17:</u> Gruplar arası ortalama " σ_{max} " değerlerinin kıyaslaması	59

<u>Sekil 18:</u>	Gruplar arası ortalama “ ϵ_{\max} ” değerlerinin kıyaslaması	61
<u>Sekil 19:</u>	Gruplar arası “E” değerlerinin kıyaslaması	62
<u>Sekil 20:</u>	2 diodlu LED ışık kaynağı	67
<u>Sekil 21:</u>	UV-X Illumination System ve 2 diod LED’e ait kornea yüzeyi ışık dağılım paternleri	68



Tablolar ve Denklemler Dizini

<u>Denklem-Tablo numarası ve başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
<u>Denklem 1:</u> Gerinim miktarının hesaplanması	50
<u>Denklem 2:</u> Gerilme miktarının hesaplanması	51
<u>Denklem 3:</u> Elastiklik modülünün hesaplanması	51
<u>Tablo 1:</u> Deney gruplarına ait histopatolojik verileri gösteren tablo	56
<u>Tablo 2:</u> R ve Q gruplarına ait histopatolojik verileri gösteren tablo	57
<u>Tablo 3:</u> Deney gruplarına ait biyomekanik test verilerini gösteren tablo	57
<u>Tablo 4:</u> Deney gruplarına ait biyomekanik test veri ortalamalarının karşılaştırması	59
<u>Tablo 5:</u> R ve Q gruplarına ait biyomekanik test veri ortalamalarının karşılaştırması	60

1. AMAÇ VE KAPSAM

Korneal ektazi, temelde korneal bütünlükte zayıflama, protrüzyon, düzensiz astigmatizma ve bunun sonucu olarakta görme kaybına neden olabilen bir grup korneal hastalıktır. Bu hastalıklardan başlıcaları, keratokonus, pellusid marjinal dejenerasyon ve iyatrojenik keratektazilerdir.^{1,2}

Keratokonus korneanın bilateral, asimetric ve non-inflamatuar ilerleyici bir dejenerasyonudur. İnsidansı, genel popülasyonda 1/2000'dir.³ Genellikle ergenlik çağında başlar ve gözlerin % 20'sinde penetran keratoplasti endikasyonu koyduracak seviyede ilerleme gösterir.⁴

Keratokonusta diğer tedavi seçenekleri ise; gözlük, sert kontakt lens kullanımı, termokeratoplasti⁵, intrakorneal ring segment uygulaması⁶, epikeratoplasti⁷ ve lameller keratoplastidir.⁸ Keratokonus tedavisinde kullanılan sert kontakt lensler, hasta intoleransı, uygulama güçlükleri ve maliyet yüksekliği, halen altın standart tedavi yöntemi olarak kabul edilen penetran keratoplasti ise donör doku bulma güçlükleri, yüksek tedavi maliyetleri, greft rejeksiyonu ve sekonder glokom gelişimi gibi dezavantajlara sahiptirler.

Son yıllarda kullanımda olan, solid bir kaynaktan gelen Ultraviyole-A (UV-A) ve ışığa duyarlılaştırıcı ribofilavinin (vitamin B2) kombine etkisi ile oluşturulan korneal kollajen crosslinking (CXL) tedavi ise keratokonustaki ilerleyici keratektaziyi durdurmada yeni bir yöntemdir. Keratokonustaki penetran keratoplasti ihtiyacını önemli ölçüde azaltabilmektedir. Basit, sade ve düşük maliyetli olmasının yanında, gelişmekte olan ülkeler için uygun bir tedavi seçeneğidir.⁹

Yakın zamanda, CXL tedavi ile ilgili yeni endikasyon alanları da doğmuştur; refraktif cerrahi sonrası gelişen iyatrojenik keratektazinin hem profilaksi hem de tedavisinde^{10,11}, korneal melting formları¹², pellusid marjinal dejenerasyonda¹³, yüzeysel korneal ülserler¹⁴ ve büllöz keratopateide^{15,16} uygulanarak başarılı sonuçlar alınabilmektedir.

Yaptığımız bu çalışmayla, keratokonus ve diğer korneal ektazilerin tedavisinde, riboflavine alternatif olabilecek fotooksidatif, fotosensitif bir ajan ve bir flavonoid olan quercetinin tavşan korneasında etkinliğini ve güvenilirliğini araştırmayı amaçladık.



GENEL BİLGİLER

2. KERATOKONUS

Keratokonus, korneanın dikleşme ve incilmesiyle karakterize, ilerleyici, noninflamatuvar bir dejenerasyondur. Keratokonus gelişen hastalar hayata normal bir kornea ile başlarlar. Asemptomatik subklinik dönem ilerleyerek ergenlik ile 30 yaş arası bir dönemde görme şikayetleri ortaya çıkar. İlerleyen miyopik astigmatizması olan her genç ve genç erişkinde keratokonus akla gelmelidir.

Keratokonus, korneanın bir hastalığı olarak ilk kez 1748'de Mauchart ve 1766'da Taylor tarafından bildirilmiştir. Korneanın diğer ektazik durumlarından ayırımı ve klinik özelliklerinin detaylı tanımlanması ise 1854'te Nottingham tarafından yapılmıştır.¹⁷

Keratokonus, ileri dönemlerinde kornea stromasında bir incelme bölgesi ile birlikte, korneanın lokalize konikal öne protrüzyonu ile karakterizedir. Keratokonusta, konik deformite, santral ya da daha sık olarak parasantraldir. Konun apeksi, görme aksının altında ve nazale lokalizedir. Kornea, normalde 2.5 mm olan konveksitesine ilave olarak yaklaşık 2 mm (10-15 Diyoptri) kadar öne protrüde olabilir. Ektazi bölgesi, genel olarak 3-6 mm çapında olup, karakteristik olarak korneanın en ince bölgesidir. Konun çevresindeki periferik bölgeler normal kalınlıkta ve hemen neredeyse normal kurvatürdedir.

2.1. EPİDEMİYOLOJİ

Keratokonusun değişken klinik prezentasyonu nedeniyle, değişik insidanslar raporlanmıştır. Genel popülasyonda 50-230/100000 civarındadır, yani yaklaşık 1/2000'lik insidans tanımlanmaktadır.³ Prevelansı ise 54.5/100.000'dir.¹⁸ Keratokonus olguların % 96'sında bilateraldir. Tipik olarak bir göz önce tutulur ve hastalık bu gözde diğer gözden daha hızlı ilerler. Keratonusta klinik olarak gözler ve cinsiyetler arasında belirgin bir fark gözlenmez.

Keratokonus genellikle izole olarak ortaya çıkar. Birçok hastalıkla birlikte görülebilse de Down Sendromu, Marfan Sendromu, Ehlers-Danlos Sendromu, Leber'in konjenital amarozi ve Retinitis Pigmentoza gibi hastalıklarla birlikteliği daha sık bildirilmiştir.¹⁹⁻²¹

Keratokonus, genellikle bir gözde 16-18 yaşlarında başlar ama daha erken ve daha ileri yaşlarda da görülebilir. 40-45 yaşına kadar remisyon ve nökslerle devam eder ve durur. Olağan seyri yavaş, küçük değişikliklerle sessiz ilerlemelerdir. Keratokonusta progresyonun şiddeti ve zamanını önceden bilmek zordur, tipik olarak 3-8 yıllık bir süreçte ilerler. Progresyonun son bulacağı zamanı önceden tahmin etmek güçtür, dikkatli izlem önemlidir. İkinci göz birkaç yıl sonraya kadar etkilenmez ve daha iyi seyreder. Nadiren ikinci göz klinik olarak tutulmaz. Korneada, gittikçe artan incelme, protrüzyon ve santral korneal stromanın skarlaşması, düzenli (ileri dönemde düzensiz) astigmatizmaya yol açar.

Keratokonuslu kişilerde, atopi (% 36) ve göz kaşıma (% 66-73) sık görülen semptomlardır. Kaşıntı, bir aşırı duyarlılık reaksiyonu olan atopinin primer semptomudur.²² Keratokonuslu bir çok hastanın hikayesinde sebep ve etki ilişkisi ispat edilememiş olmasına rağmen, bu hastaların gözlerini kuvvetli kaşıdıkları bilinmektedir.²³

2.2. KERATOKONUSUN ETYOPATOGENEZİ

Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte keratokonus gelişiminde heredite, mekanik travma, korneada enzim değişiklikleri ve keratosit apoptozisinin rolü olduğu varsayılarak birleştirilmiş bir hipotez olan “kaskad hipotezi” ileri sürülmüştür.²⁴

2.2.1. Heredite

Klinik gözlemler, topografik çalışmalar ve keratokonuslu hasta ailelerinin analizleri keratokonus etyolojisinde genlerin rol oynadığını akla getirmektedir. Göz kaşıma, sert kontakt lens kullanımı gibi çevresel faktörler genetik olarak yatkın kişilerde bu hastalığın ilerlemesine sebep olabilmektedir. Genellikle sporadik bir bozukluk olan

keratokonus¹⁸, dominant, resesif ve herediter olmayan geçişte gösterebilir. Birinci derece akrabalarda keratokonus prevalansı %3.34 olarak belirtilmiştir ki, bu genel populasyondan 15-16 kat daha fazladır.²⁵

2.2.2. Mekanik travma

Göz kaşıma ve kontakt lens kullanımının yaptığı mekanik travmanın, genetik olarak predispoze olan kişilerde hastalığın ilerlemesini arttıran çevresel faktörler olarak etki etmesi olasıdır.²⁶ Hayvan çalışmalarında, kornea epitelinin kronik, tekrarlayan biçimde kaldırılmasının stromal apoptozisi uyardığı gösterilmiştir.^{27,28} Bu bulgu önemlidir, zira keratokonuslu olgularda, sert gaz geçirgen kontakt lens kullanımına bağlı ya da atopi durumunda olduğu gibi yoğun göz ovuşturmaya ikincil kronik irritasyon öyküleri bulunmaktadır. Wilson, epitel üzerine kronik travmanın, keratokonuslu kornealarda stromada apoptozise neden olabileceğini ileri sürmüştür.^{21,22}

2.2.3. Enzimatik değişiklikler

Keratokonuslu kornealarda, doku yıkımına yol açan asit fosfataz, asit lipaz, asit esteraz, Katepsin G ve B, bir jelatinaz enzim olan Gelatinaz A (Matriks metalloproteinaz 2, MMP-2) gibi enzim aktivitelerinin arttığı ve yıkım enzim inhibitörlerinin düzeylerinin azaldığı, endotel, stroma ve epitelde gösterilmiştir.^{29,30}

Azalan inhibitörler, α -1 proteaz inhibitörü (tripsin, kimotripsin, elastaz ve plazmini inhibe eder), α -2 makroglobulin (tripsin, kimotripsin, elastaz, papain, kollajenaz, trombin, plazmin ve kallikreini inhibe eder), TIMP-1 (Metalloproteinaz-1 doku inhibitörü) ve TIMP-3 inhibitörleridir.³¹⁻³³

2.2.4. Keratokonusta korneal incelme mekanizmaları

Keratokonuslu kornealarda incelmenin birçok mekanizma ile oluşabileceği hipotezleri ileri sürülmesine rağmen, incelmenin neden olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Bugünkü bilgilerimize göre kabul edilen hipotez, Ultraviyole B (UV-B) ışını, atopi, göz ovuşturma, uygun olmayan kontakt lens kullanımı gibi faktörlerin, oksidatif hasara ya da hücre yapısı veya fonksiyonunun bozulmasına ve apoptozise sebep olduğudur.²⁴

Keratokonuslu kornealarda serbest radikallerin oluşum mekanizmaları

Keratokonuslu kornealarda oluşan oksidatif hasarın nedeni olarak, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumuna yol açan bir mekanizma ileri sürülmektedir.²⁴ Lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit (NO) yolu ile ortaya çıkan sitotoksik ürünlerin, keratokonuslu kornealarda biriktiğini gösteren deliller vardır.^{34,35}

Kornea, UV-B ışığının yaklaşık %80'inin emiliminden sorumludur.³⁶ Ultraviyole ışık, serbest radikalleri ve ROS'u oluşturur. Tipik olarak serbest radikaller ve ROS, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler ile biyokimyasal etkileşime girerek ortamdaki uzaklaştırılırlar. Alternatif olarak kalan serbest radikaller, lipid peroksidaz ile aldehit formuna geçebilirler ki bunların bir kısmı degradatif ve toksiktir. Normal olarak kornea kendisini, aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile bu aldehitlerden korur. Göz içindeki ALDH'nın yaklaşık %78'i korneada bulunur ve ALDH tip 3 kornea içindeki esas enzimdir. Gondhowiadjo ve ark. keratokonuslu kornealarda, normale göre ALDH tip 3'ün azaldığını ve buna ikincil olarak destrüktif aldehid seviyesinin artabileceğini ileri sürmüşlerdir.³⁷

Süperoksit dismutaz, serbest radikaller ve ROS'un uzaklaştırılmasından sorumlu bir antioksidandır.³⁵ Keratokonusta, süperoksit dismutaz düzeyinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar vardır.³⁸ Keratokonuslu kornealarda, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan sitotoksik bir aldehid olan malondialdehid (MDA) ve NO yoluyla oluşan sitotoksik özellikteki nitrotirozin (NT) birikimi gösterilmiştir.^{34,39} Peroksinitritler, dokuda destrüktif olabilirler. Nitrotirozine spesifik antikolar, doku içinde peroksinitritlerde lokalize olabilirler. Laboratuvar deneylerinde, keratokonuslu kornealarda nitrozine spesifik antikolarla epitel bazal membranında normal korneaya göre belirgin olarak artmış boyanma gözlenmiştir. Bu bulgu, keratokonuslu korneada ilave destrüktif yapı olarak düşünülen peroksinitritin varlığını kuvvetlendirmektedir.³⁹

Keratokonuslu kornealarda apoptozis ve hücresel tamir

Keratokonuslu korneanın aldehit ve/veya peroksinitrit seviyelerinin normalden daha yüksek olduğu doğru ise, bunların varlığında kornea içindeki hücrelerin bazıları geri

dönüşümsüz olarak hasara uğrayacaktır. Bu yolla hücre hasarı, programlı hücre ölümüne (apoptozise) yol açar. Hayvan çalışmalarında, kornea epitelinin sürekli tekrarlayan biçimde kaldırılmasıyla stromal apoptozisin uyarıldığının gösterilmesi önemli bir bulgudur.^{27,28} Artmış apoptozis, keratokonus korneasının incelmeyi açıklayan diğer bir mekanizmayı oluşturur.

Gen ekspresyon çalışmalarında, keratokonusta normal ve diğer hastalıklı kornealarda olmayan farklı bir enzim gösterilmiştir. Bu enzim, Leucocyte Common Antigen Related Protein (LAR) olarak adlandırılır.³⁴ Bir transmembran fosfotirozin fosfataz olan bu enzim, hücreler arası etkileşim, hücre matris etkileşimi, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda rol oynar. Fosfatların ilavesi ile olan enzim cevabı “kinaz” ve fosfat çıkarılması ile olan enzim cevabı ise “fosfataz” olarak isimlendirilmektedir. Normal olarak hücrede bu iki enzim arasında bir denge bulunur. Keratokonuslu kornealarda bu denge, fosfataz aktivite artışı lehine bozulmaktadır. LAR artışı ile apoptozisin arttığı, kinaz aktivite artışının (fosforilasyon) ise apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁴

Keratokonusu kornealarda doku tamiri

Yara iyileşme sürecinin farklı komponentleri keratokonuslu kornealarda artmıştır. Örneğin; farklı degradatif enzimler, İnterlökin 1 (İL-1) reseptörleri, Prostaglandin E2 ve işaretleyici faktör (SP1) keratokonuslu kornealarda artmıştır. Transforming growth factor β (TGF- β), İL-1 ve ısı şok protein 27, keratokonusta ve diğer bazı kornea hastalıklarında artar. Histolojik olarak keratokonuslu kornea, anormal ince stroma ve Bowman tabakasında genellikle fibrotik skar dokusu ile dolan kırıklar ihtiva eder. Primer patolojik değişiklik, başlıca santral kornea bölgesinde kornea epitelinin bazal hücrelerinin dejenere olmasıdır. Bütün diğer değişiklikler buna sekonder gelişmektedir. İlk gözlenen değişiklik, bazal hücre endoplazmik retikulumunda organel disorganizasyonudur. Bazal hücre dejenere olarak hücre duvarı parçalanır, proteolitik enzimler bazal membranın retikulum lif ağını tahrip eder. Böylece incelmış ve parçalanmış bölgeler düzensizleşir ve erimeye başlar. Daha sonra proteolitik enzimler Bowman membranını tutar. Eğer dejenerasyon yeni bazal membran oluşumu ile durarlarsa, proteolitik enzimlerin derin stroma tabakalarına hatta Descemet membranına ulaşması önlenmiş olur. Kollajen liflerin kaybından dolayı santral kornea incelir ve öne doğru bombeleşir. Bazal membran ve Bowman membranının destrüksiyonunu takiben

stromal konnektif doku, konun yüzeyel apikal skarlaşması ile sonuçlanan fibroblastik proliferasyona (normal iyileşme cevabı) uğrar.²⁴

2.3. HİSTOPATOLOJİ

Keratokonslu kornealarda görülen histopatolojik değişiklikler şunlardır (Şekil 1);

2.3.1. Epitel

Keratokonslu kornealarda yapılan ex vivo histolojik analizler ile, korneal epitelde önemli derecede incelmeye tespit edilmiştir. Scroggs ve ark. keratokonusta, çıkarılmış kornealarda santral epitelyal incelmeler göstermişlerdir.⁴⁰ İn vivo konfokal mikroskopik incelemelerde, keratokonik korneanın periferinde normal düzende epitelyal hücreler görülürken, koni apeksinde yerleşim gösteren yüzeyel epitelyal hücreler aşırı uzamış ve salyangoz benzeri düzenlenim göstermektedirler. Aynı zamanda koni apeksi aşırı reflektif bir yapı içermekte ve bazal hücre tabakasında katlantı benzeri değişiklikler izlenmektedir.⁴¹ Bu in vivo değişiklikler, bazal epitelyal bütünlüğün bozulduğunu göstermektedir. Keratokonik kornea örneklerinde, epitelyal seviyede apoptotik değişikliklerde izlenmektedir.⁴²

2.3.2. Bazal membran

Keratokonusta, bazal membranda düzensiz bir görüntü ve lokalize kırılmalar gözlenir.⁴³ Laminin 1 ve Laminin 5 ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda, defektli bölgelerde bazal membranda kalınlaşmalar ve düzensiz bir görüntü izlenmektedir.⁴⁴ Cheng ve ark. keratokonik kornealarda, epitelyal bazal membran ve matriksde kollajen tip XII boyanmasının azaldığını göstermişlerdir. Bu durumun, stromal matriks organizasyonunda, hücre matriks ilişkisinde ve korneal epitel bazal membran ilişkisinde kritik önem taşıdığını öne sürmüşlerdir.⁴⁵

2.3.3. Sinir lifleri

Keratokonik kornealarda, biyomikroskopik muayenede, korneal sinir lifi görülebilirliği artmaktadır. Bu sinir lifi kalınlaşmasının, Bowman tabakasındaki kırılmalar ve keratositlerle yakın ilişkisi olduğu ileri sürülmüştür.⁴⁶

2.3.4. Bowman tabakası

Keratokonik kornealarda, santral kısımda Bowman tabakasındaki defektler ve yapısal anomaliler iyi bir şekilde dökümente edilmiştir. Elektronmikroskopik çalışmalarda, Bowman tabakasında keskin kenarlı defektler ve rüptür alanları izlenmektedir.⁴⁷

2.3.5. Stroma

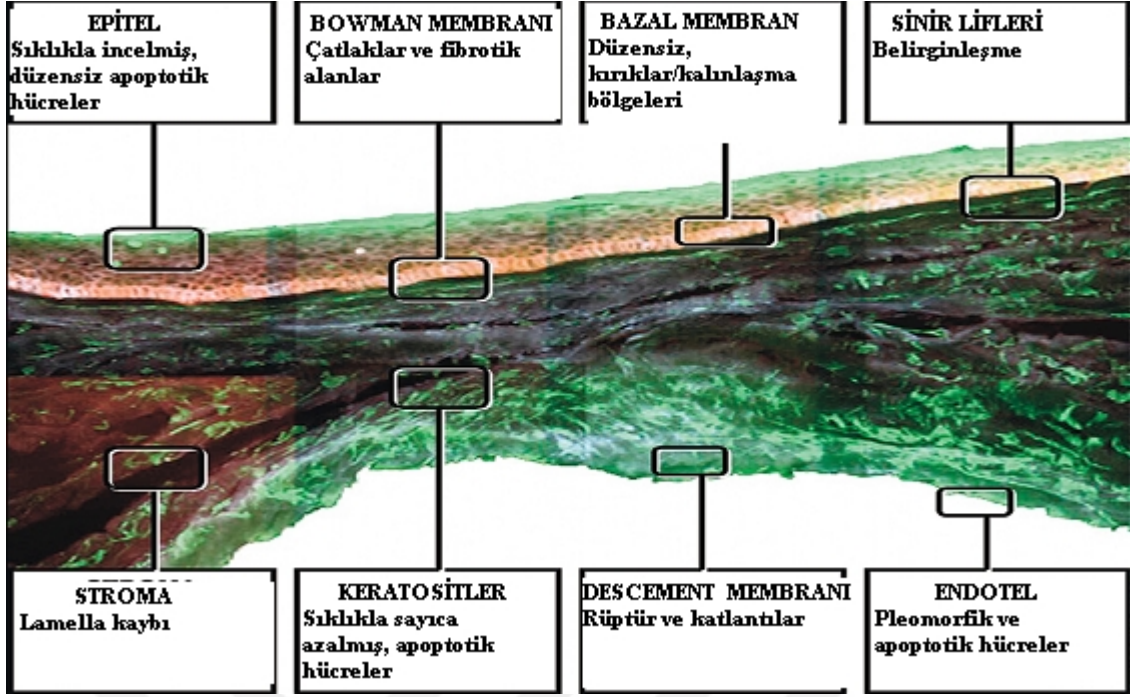
Keratokonuslu kornealarda normallere göre, kollajen tabaka sayısı daha az ve incedir.⁴⁸ Kollajen ve total protein düzeylerinin keratokonuslu kornealarda azaldığı gösterilmiştir.⁴⁹ Konfokal mikroskop ile keratokonuslu kornealarda, keratosit yoğunluğunun normallere göre % 12 daha az olduğu gösterilmiştir.⁵⁰

2.3.6. Descemet membranı

Keratokonusta, Descemet membran katlanmaları ve rüptürleri çok yaygın görülen bir özelliktir.⁴³ Descemet membranındaki bu değişikliklerin çevresel faktörlerle ilişkili olabileceği (göz ovuşturma gibi) öne sürülmüştür.⁴⁴

2.3.7. Endotel

Robinowitz, keratokonusta endotelin genellikle normal görünümde olduğunu, fakat intrasellüler koyu yapılar, pleomorfizm ve hücrelerde uzama gibi değişikliklerin görülebileceğini bildirmiştir.³



Şekil 1: Keratokonusunda korneadaki histopatolojik değişiklikler⁵¹

2.4. KLİNİK ÖZELLİKLER

Keratokonüs hastalarında ilk şikayet görme keskinliğinde tedricen azalmadır ve bu hastalar zaten pek çok kere göz muayenesinden geçmişlerdir. Reçete edilen gözlüklerle genellikle rahat edememişlerdir ve geçmişte verilen gözlük numaraları birbirinden farklı ve tutarsızdır. Hastalığın ilerlemiş evrelerinde tanı koymak kolay, erken dönemde tanı koyabilmek güçtür, detaylı anamnez ve ileri tetkik gerektirir.

2.4.1. Semptomlar

Semptomlar, hastalığın evresine bağlı olarak geniş bir aralıkta değişkenlik gösterir. Hastalığın başlangıç evresinde hiçbir semptom olmayabilir. En sık başvuru şikayeti, tek ve ya her iki gözde düzeltilmiş görme keskinliğinde azalma ve sık aralıklarla gözlük değiştirme ihtiyacının ortaya çıkmasıdır. Diğer semptomlar, kontrast duyarlılıkta azalma, çift görme, distorsiyon, ışıkların etrafında halolar görme ve fotofobidir. Akut korneal hidrops gelişirse, görmeye ani azalma ve ağrı şikayetiyle başvurabilirler.

2.4.2. Bulgular

Robinowitz 1998'de keratokonusun klinik bulgularını listelemiş ve orta veya ileri keratokonusunda bu bulguların tek tek veya kombinasyonlar şeklinde ortaya çıkabileceğini belirtmiştir. Keratokonus tanısını koymak için minimal gereksinimler, düzensiz astigmatizma ve korneal incelmedir. Düzensiz astigmatizma sıklıkla miyopik astigmatizma şeklindedir. Bu durum retinoskopide, distorsiyone (eğri-büğrü) kırmızı refle şeklinde görülür ve sıklıkla scissor reflex (makas refleksi) olarak tanımlanır.

Klinik bulgular, hastalığın şiddetine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bunlar;

Eksternal Bulgular: Munson işareti (aşağı bakış pozisyonunda alt göz kapağında öne doğru açılma), Rizutti fenomeni (temporalden kornea üzerine düşürülen ışığın, nazalde limbusun ötesine düşmesi)

Retroluminasyon Bulguları: Scissor reflex (makas refleksi), Charleaux bulgusu (yağ damlacığı bulgusu)

Biyomikroskopik Bulgular: Apikal incelme, Vogt striaları (derin stroma stres çizgileri), Fleischer halkası (demir halkası) ve korneal skar (epitelyal veya subepitelyal)

Fotokeratoskopi Bulguları: Mirlerin alt temporale doğru baskılanması (yumurta şekilli mirler) ve mirlerin alt veya santralde yoğunlaşması

Videokeratoskopi ve Topografi Bulguları: Lokalize artmış yüzey gücü, alt ve üst korneal kırıcı güçler arasında asimetri olarak sıralanabilir.

2.5. SINIFLANDIRMA

Keratokonus için genel olarak kabul edilmiş bir sınıflama sistemi yoktur. Ancak, birçok sınıflama sistemi önerilmiştir. Keratokonus, keratometri değerine göre, koni şekline göre, topografi ve wavefront bulgularına göre sınıflandırılabilir.

Keratokonusta en çok kabul gören sınıflama şeması ise şu şekildedir;⁵²

Normal kon

Düzenli aksiyel topografi paterni bulguları

Normal biyomikroskopik muayene bulguları

Gözlükle düzeltilmiş görme keskinliğinin Log Mar eşelinde, 4 m'den ≥ 55 harf olması

Atipik normal

Biyomikroskopik muayene veya anamnez ile açıklanabilen alışıla gelmemiş aksiyel topografi bulguları (kontakt lens warpage sendromu, keratokonus ile uyumlu olmayan korneal skar, refraktif cerrahi hikayesi)

Normal görme keskinliği ve ya en iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde hafif azalma

Keratokonus şüphesi

Keratokonus için şüpheli aksiyel topografi bulguları (izole dikleşme alanı, santral dikleşme > 48 Diyoptri (D) olması)

Normal biyomikroskopik muayene bulguları

En iyi düzeltilmiş görme keskinliğinin Log Mar eşelinde, 4 m'den ≥ 55 harf olması

Hafif keratokonus

Keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi bulguları

Düz keratometri değerinin < 51 D olması

Fleischer halkası veya Vogt striası bulunması

Korneal skarın yokluğu

En iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde azalma (Log Mar eşelinde 4 m'den < 55 harf)

Orta keratokonus

Keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi bulguları

Düz keratometri değerleri, 51.25-56.00 D aralığında veya ≥ 8 D astigmatizma olması

Fleischer halkası veya Vogt striasının bulunması

Korneal skar (keratokonus ile uyumlu, iyi sınırlı her türlü stromal skar)

En iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde azalma (Log Mar eşelinde 4 m'den ≤ 45 harf)

Ciddi keratokonus

Belirgin dikleşme alanları gösteren, keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi bulguları

Düz keratometri değerinin > 56.01 D olması

Fleischer halkası veya Vogt striası bulunması

Korneal skar görülebilir (keratokonus ile uyumlu her türlü dens/opak skar)

En iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde azalma (Log Mar eşelinde 4 m'den < 30 harf)

2.6. AYIRICI TANI

Keratokonusun ayırıcı tanısı, sekonder keratokonus, korneal warpage (çarpık kornea) sendromu, keratoglobus, pellucid marjinal dejenerasyon ve posterior keratokonus ile yapılmalıdır.

2.7. TEDAVİ

Keratokonusun tedavisi başlıca 2 yaklaşımı içerir. Bunlardan ilki optik yöntemlerle görmeyi arttırmaya çalışmaktır. Bu amaçla, erken dönemde gözlük ve ya sert kontakt lens verilir. Daha ileri vakalarda ise girişimsel yöntemlere başvurulur.

2.7.1. Gözlük ile refraktif düzeltme: Hafif ve ya ılımlı vakalarda tatmin edici görsel sonuçlar verebilir.

2.7.2. Kontakt lens ile refraktif düzeltme: Keratokonus ilerledikçe düzensiz astigmatizmadaki artışa bağlı olarak gözlükle yeterli düzeltme sağlanamaz. Bu durumda korneada düzenli bir ön kırıcı yüzey sağlayan kontakt lens kullanımı gündeme gelir. Yumuşak torik lenslerin keratokonusun tedavisinde yeri sınırlıdır. Gözlükle düzeltme sağlanabilen dönemde miyopi ve astigmatizmayı (-3.25 D'ye kadar) düzeltebilirler.

Sert gaz geçirgen kontakt lens kullanım amacı ise, mümkün olan en iyi görme keskinliğini sağlamak ve korneal fizyolojiye en az müdahale etmektir. Bu da, kontakt lensi daha güçlü bir yatak olan periferik kornea üzerine yerleştirmek, apikal skar oluşumunu şiddetlendirmemek için koni apeksine enaz teması sağlamak ve gözyaşı göllenmesini en aza indirmekle olur. En önemli dezavantajı, uzun süreli kullanım sonrası gelişen tolerans kaybıdır.

2.7.3. İntastromal korneal ring uygulaması: Bu yöntemde, Poly Methyl Methacrylate (PMMA)'dan yapılmış saydam yarım halkalar, periferik korneada bir tünel hazırlanarak

stromaya implante edilir. Halkalar, İntacs ve Ferrara ring olmak üzere iki tiptir. Yöntem, düzensiz astigmatizmayı azaltarak refraktif stabilite sağlar, kontakt lens toleransını artırır ve keratoplasti ihtiyacını geciktirebilmektedir. Çeşitli kalınlıklarda halka kullanımı, bir ve ya iki segment kullanımı, segment yerleşimindeki simetri ve segment yerleşim aksı gibi değişkenler nedeniyle, tedavi algoritması çeşitlilik göstermektedir. Yöntemin dezavantajları ise, keratokonus progresyonunu durduramaz, sadece hafif-orta şiddette keratokonusta kullanılır, korneal skarı olan vakalarda uygulanamaz ve implante edileceği alanda kornea kalınlığının ≥ 400 mikrometre (μm) olması gerekliliğidir.⁵³

2.7.4. Penetran, lameller keratoplasti ve epikeratofaki: Kontakt lens intoleransı geliştiğinde, kontakt lens ile yeterli görsel iyileşme sağlanamadığında ve ya santral korneal skara bağlı görme kaybı geliştiğinde tedavide keratoplasti yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Geleneksel penetran keratoplastinin (PK) uzun dönem sonuçları oldukça iyidir.⁵⁴ PK sonrası korneal distorsiyonun azalması ve santral skarın ortadan kaldırılmasına bağlı kontrast hassasiyetin artması nedenleriyle, halen keratokonus tedavisinde altın standart tedavi olma özelliğini korumaktadır. Postoperatif yüksek rezidüel astigmatizma, sekonder glokom, % 10 civarında greft rejeksiyon riski yöntemin dezavantajlarıdır.

Penetran keratoplastideki iyi görsel sonuçlara rağmen, endotel müdahalesinin olmaması, donör doku seçiminde katı kuralların olmaması, daha kısa sürede korneal sütür alımı ve görsel rehabilitasyonun sağlanması, daha düşük postoperatif astigmatizma gibi avantajlarıyla kısmi veya tüm korneal stromanın değişimini öngören lameller keratoplasti tedavi seçenekleri içerisinde ön plana çıkmaktadır. Arayüz problemlerine bağlı daha kötü görsel sonuçlar, işlemin daha uzun sürmesi, daha fazla cerrahi beceri gerektirmesi ve korneal perforasyon riski yöntemin dezavantajlarıdır.⁵⁵

Epikeratofaki, temel olarak 3 mm çapındaki planolameller donör greft ile koninin sıkıştırılması esasına dayanır, böylece düzensiz astigmatizma ve miyopi azaltılmış olur.⁵⁶

2.7.5. Termokeratoplasti: Kollajen fibrillerde hidrotermal büzülme etkisi ile keratokonik kornealarda düzleşme meydana getirir. Yöntemde, 90-130° C sıcaklıkta, 3-

5 mm çaplı prob kısa sürelerle (1-2 sn) koni apeksine temas ettirilir. Kontakt lens kullanamayan, % 50 den daha az korneal incilmesi olan ve koni apeksi pupiller aks üzerinde olan hastalarda uygulanabilir. Keratoplastinin zor ve tehlikeli olduğu mental retarde hastalarda alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.⁵⁷

2.7.6. Kollajen Cross-linking (CXL) Tedavi

CXL tedavi, solid bir kaynaktan gelen Ultraviyole-A (UV-A) ve ışığa duyarlılaştırıcı riboflavinin (Vitamin B₂) kombine etkisi ile korneada, stromal kollajen liflerde fotopolimerizasyon oluşturan bir tedavi yöntemidir. Fotopolimerizasyon, korneanın sertliğini ve keratektaziye karşı direncini arttırmaktadır. CXL tedavi ile korneada adeta “donma etkisi” ortaya çıkmaktadır. Tedavinin amacı, hastalığın ilerlemesini durdurmak ve keratoplastiden kaçınmaktır.⁹

2.7.6.1. Tarihçe

Tarihsel olarak moleküller arası çapraz bağlantı, çok faydalı bir uygulama olarak kabul edilmiştir. Örneğin, formaldehidin doku fiksasyon etkisi, lizin, arjinin, tirozin, asparajin, histidin, glutamin ve serin gibi aminoasitlerle çapraz bağlanma yeteneğine dayanır.⁵⁸ Yine yapay kalp kapakları, gluteraldehit kullanılarak sertleştirilmektedir.

İlk kez 1968’de Christopher Foote, biyolojik sistemlerde ışık duyarlılaştırıcı oksidasyonun mekanizmalarını yayınlamıştır.⁵⁹ 1988’de Fujimori, üçüncü bir mekanizma ile Ozon (O₃) ve ya UV ışık ile fotooksidasyon neticesinde tip 1 kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların meydana geldiğini göstermiştir.⁶⁰

1997’de Spörl ve ark. domuz kornealarında yeni çapraz bağlanmaları gösterdikleri çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır.⁶¹ Domuz kornealarında epitel kaldırıldıktan sonra sırasıyla, 254 nanometre (nm) dalga boyunda UV ışık, riboflavin ve UVA ışık (365 nm), riboflavin ve mavi ışık (436 nm), güneş ışığı, gluteraldehit (% 0.1, 10 dakika) ve Karnovsky solüsyonu (% 0.1, 10 dk) uygulanmış. Karnovsky solüsyonu, paraformaldehit, sodyum hidroksit ve gluteraldehitten oluşan bir fiksatifdir. Çalışmada,

her gruba 10 göz dahil edilmiş ve kontrollerle karşılaştırılmış. Riboflavin ve UVA (365 nm), gluteraldehit ve Karnovsky solüsyonu kullanılan gruplarda, kontrollere göre korneal sertliğin arttığı gösterilmiştir. Bir sonraki aşamada, riboflavin-UVA (365 nm) ve gluteraldehit (% 0.075) potansiyel adaylar olarak tavşanlarda in vivo olarak test edilmiş. Sonuçta, riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonunun insan çalışmaları için umut vaat ettiği gösterilmiştir.⁶² Riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonu ile insanlar üzerindeki pilot çalışmalar, 1998'de Dresden'de başlamış ve ilk sonuçlar 2003'de yayınlanmıştır.⁹

2.7.6.2. Kollajen çapraz bağlanmanın biyokimyası

Kollajenin birincil görevi genel olarak destek dokusu olarak bulunmaktır. Kollajen monomerleri, güçlü intermoleküler çapraz bağlantılarla bir araya gelirler. Kollajen lifler arasındaki çapraz bağlanmalar, doku olgunlaşma sürecinin doğal bir parçasıdır. 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 tahsis eder.

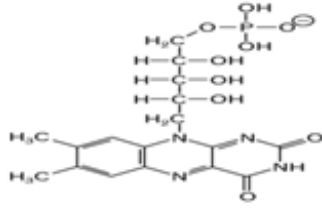
İkinci bir çapraz bağlanma yolu yaşlanma sürecinde oluşur. (daha büyük ölçüde diabetes mellitusta) Bu durum glikasyon olarak adlandırılır ve enzimatik olmayan bir reaksiyondur. Monosakkaridlerin bu reaksiyona uzun süre maruziyeti, protein moleküllerin şeker ve amino grupları arasında spontan oluşan bağların 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 (pentozin gibi) arasında ilave yavaş reaksiyonlar ile moleküller arası çapraz bağlanmalar meydana gelir. Bu glukoz derive moleküller glikasyon son ürünleri olarak adlandırılırlar.⁶³ Bu durum, 1912'de Maillard ve ya sarı kahverengi renk değişimi nedeniyle esmerleşme reaksiyonu olarak tanımlanmıştır.⁶⁴

Aynı yaş grubundaki diyabetik kornealar ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, pentozidin (kollajenin arjinin ve lizin rezidüleri arasında çapraz bağlantılar oluşturan glikasyon son ürünüdür) düzeylerinin diyabetik kornealarda daha yüksek olduğu bulunmuştur.⁶⁵ Yaşlanma ile birlikte korneal sertlikteki artış, gerinim-gerilme testleri ile gösterilmiştir.⁶⁶ Yüksek ve düşük açılı X-ray kırınım paternleri ile yaş ile birlikte kollajen molekülü kesit alanının, 3.04 nm²'den 3.46 nm²'e ulaştığı gösterilmiştir. Bu durum yaş ile ilişkili korneal glikasyon artışına atfedilmiştir.⁶⁷ Tip 2 diyabetli hastalarda, diyabetin keratokonusun gelişimi ve progresyonu üzerine koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bunun olası nedeni, moleküller arasında artmış çapraz bağlantılar nedeniyle meydana gelen korneal sertleşmedir.^{68,69}

Kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların oluşumundaki üçüncü mekanizma ise oksidasyondur. Bu mekanizma, daha önce anlatılan enzimatik ve glikasyon yolu ile oluşturulan çapraz bağlanmalardan farklıdır. Bu çapraz bağlanmalar, oksidasyon sonucu (O₃ aracılı) veya fotooksidasyon (UV aracılı) sonucu meydana gelebilir.⁵⁹ 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 dış 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 2)

1. Kombine riboflavin UVA uygulaması

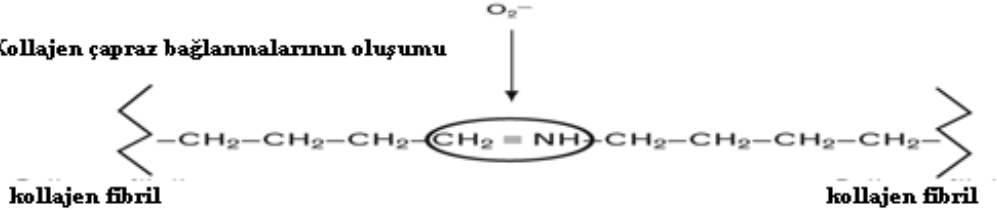


Ultraviyole ışınları



2. Oksijen radikallerinin üretimi

3. Kollajen çapraz bağlanmalarının oluşumu



Şekil 2: 1-2 : Işık duyarlaştırıcı riboflavin ve UVA reaksiyonu, ROS oluşumu ile sonuçlanır 3: ROS, çeşitli moleküllerle ileri tepkimeye girerek, kollajen fibrillerin amino grupları arasında yeni çapraz kovalent bağların oluşmasını sağlar. (Tip II fotokimyasal reaksiyon)⁷⁰

CXL tedavide 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.

Güvenlidir, kolayca elde edilebilir. Korneanın ve lensin şeffaflığını değiştirmez. Gıda endüstrisinde renklendirici olarak kullanılır. Non-toksiktir ve suda çözünebilir. Stromal penetransı oldukça iyi bir moleküldür. CXL tedavide, % 0.1 derişimde riboflavin solüsyonu (10 ml % 20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) kullanılır. Dextran T500, operasyon esnasında korneanın şişmesini engelleyerek kontrollü bir ortam oluşturur, ayrıca UVA'nın maksimum penetransını sağlayarak çapraz bağlanan kollajen hacmini arttırmaktadır.

2.7.6.3. Teknik

Preoperatif değerlendirme, tam göz muayenesine ilave olarak dikkatli bir refraksiyon muayenesi, keratometri, topografi, bölgesel pakimetri ve endotel hücre sayımını

(opsiyoneldir) içerir. Korneal kontürlerde eğriliklere neden olduğundan operasyon öncesinde kontakt lens kullanımına ara verilmelidir. Tedavi tercihen ameliyathanede, steril koşullarda gerçekleştirilir. 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, $3.0 \pm 0.3 \text{ mW/cm}^2$ düzeyindedir.

Topikal anestezi sonrası (proxymetacaine % 0.5) ultrasonik pakimetre ile korneal kalınlık birkaç noktadan ölçülür. Tüm noktalarda korneal kalınlık $400 \mu\text{m}$ 'nin üzerinde olmalıdır. Korneal epitel, santralde 7-8 mm çapında ucu kör bir spatül veya % 20'lik alkol solusyonu ile kaldırılır.⁷¹ Bir başka yöntem ise, yoğun topikal anestetik uygulaması ile intakt olan epitelde gevşeme sağlamak ve ardından riboflavin solusyonu uygulamaktır.⁷² (C3-R) 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.⁷³ Bu aşamada korneal kalınlık tekrar ölçülür, tüm noktalarda kalınlık $400 \mu\text{m}$ '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 $400 \mu\text{m}$ 'nin üzerine çıkması sağlanır. Bu uygulamayla genellikle 3 dk'da kornea kalınlığı $350 \mu\text{m}$ 'den $400 \mu\text{m}$ '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^2 dozunda (5.4 Joul/cm^2), 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)⁷⁴ 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 solusyonunun damlatılmasıdır.⁷³ 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. Önceden herpetik keratit epizodu geçirmiş vakalarda profilaktik olarak, preoperatif 1-3. günlerde 1200 mg/gün dozunda peroral acyclovir başlanıp, postop 7.günde tedavi kesilebilir.⁷⁵

Uygulamadaki Farklılıklar

Klasik CXL tedavisinde riboflavin uygulaması kornea epiteli kaldırılarak yapılır ve bu yolla riboflavinin kornea epitel bariyeri olmadan stromadan kolayca geçişi sağlanıp UV-A uygulanmasına hazır hale getirilmektedir.^{70,76} Epitel kaldırılarak yapılan yöntem etkinliği arttırmakla birlikte, epitel iyileşinceye kadar ağrı, batma, sulanma gibi şikayetlere yol açmaktadır.⁷⁷ Bu nedenden dolayı epitel kaldırılmadan uygulama seçeneği gündeme gelmiştir. Kornea epitelini kaldırmadan CXL tedavisine imkan veren ve direkt kornea üzerine damlatılan trans-epitelyal riboflavin preparatları üretilmiş ve bazı araştırmacılar tarafından bu yöntemin etkili olduğu gösterilmiştir.^{78,79} Fakat birçok çalışmada epitel kaldırılmadan yapılan tedaviler etkili bulunamamıştır.⁸⁰⁻⁸² Diğer taraftan bu yöntem daha güvenilir ve tolere edilebilir olduğundan çocuklara, uyum sağlanamayanlara ve kornea kalınlığı 400 mikronun altında ince kornealılara önerilebilmektedir.^{83,84}

Tedavide bir diğer tartışma konusu uygulama süresidir. Güncel CXL tedavisinde uygulanan süre 30 dakikadır. Bu sürenin 30 dakikadan az olması ile yeterli etki elde edilememektedir. Aynı şekilde uygulama süresinin daha uzun tutulması; deneysel olarak daha düşük mukavemet ve zayıf dokusal yapı oluşturduğundan ve hasta uyumunu olumsuz etkilediğinden önerilmemektedir.⁸⁵ Tedavi süresinin uzun olması özellikle uyum sorunu olan hastalar ve pediatrik yaş grubunda uygulamayı

zorlaştırmaktadır. İlave olarak uzun süre hekim için de bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu dezavantajı gidermek amacıyla birim üzerine uygulanan ultraviyole gücünü artırarak süreyi kısaltan yeni UV sistemi geliştirilmiş ancak yaygın kullanıma girmemiştir. Bu yöntemde 30 dakika süreyle 3 mW/cm² uygulanan ultraviyole gücü, 30 mW/cm² güce çıkarılarak süreyi azaltmak amaçlanmıştır.⁸⁰

2.7.6.4. Tedavi Endikasyonları

CXL tedavi şu durumlarda endikedir;

- Korneada ilerleyici dikleşmeye neden olan keratokonus ve diğer ektazilerin tedavisinde
- Laser-Assisted in Situ Keratomileusis (LASİK) sonrası gelişen, iyatrojenik keratektazinin tedavisinde^{10,86}
- İntrakorneal ring etkinliğini arttırmak amacıyla⁷²
- Korneal melting ve yüzeysel korneal ülserlerde incelmeyi durdurma amacıyla¹²
- Büllöz keratopatide ağrı kontrolü amacıyla^{15,87}

2.7.6.5. Tedavi Kontrendikasyonları

CXL tedavi şu durumlarda kontrendikedir;⁷¹

- Kornea, 400 µm'den ince ise (epitel kaldırıldıktan sonra), eğer korneal kalınlık hipotonik solüsyon uygulamasıyla 400 µm'nin üzerine çıkıyorsa uygulanabilir
- Hamile ve emzirenler
- Santral korneal opasiteler
- Şiddetli kuru göz
- Kollajen doku hastalıkları
- Öncesinde insizyonel refraktif cerrahi hikayesi olanlar (özellikle transvers insizyonun olması)

2.7.6.6. Sonuçlar

Biyomekanik Etki

İnsan ve domuz korneaları üzerinde yapılan in vitro çalışmalar, CXL tedavi sonrası korneal sertliğin önemli miktarda arttığını göstermektedir. Bir çalışmada, tedavi uygulanan domuz kornealarında, gerilim (mukavemet) artışı % 71.9, insan kornealarında % 328.9 olarak gerçekleşmiştir. Korneal sertliği ifade eden Young modülü (Elastiklik modülü) ise, domuz kornealarında 1.8, insan kornealarında ise 4.5 olarak bulunmuştur.⁸⁸ Sonraki çalışmalarda, sertleştirici etkinin uygulama derinliğine bağlı olduğu ve esas olarak ön stromada gerçekleştiği gösterilmiştir.⁸⁹ Tavşan kornealarında, tedavi etkinliğinin en yüksek olduğu ön stromada, kollajen fibril çaplarının % 12.2 (3.96 nm) oranında arttığı gösterilmiştir.⁹⁰ Yapılan termomekanik testlerde, ön stromada hidrotermal büzülme etkisinin 75°C de, arka stromada ise 70°C de gerçekleştiği gözlenmiştir.⁹¹

Tedavi uygulanan domuz kornealarında, pepsin, tripsin ve kollajenaz sindirim direncinin, kontrol gözlere göre daha fazla olduğu, tedavi etkisinin maksimum olduğu ön stromada, sindirimin en son gerçekleştiği gözlenmiştir.⁹² Tedavi uygulanan kornealarda, jel elektroforezi ile molekül ağırlığı en az 1000 kiloDalton (kDa) olan yoğun polimer bantlar saptanmıştır. Bu bantların, merkaptetanol, pepsin ve ısıya dirençli olduğu bulunmuştur.⁹³ Bu durum, kollajen lifler arasındaki çapraz bağlantılarla oluşan yüksek molekül ağırlıklı kollajen polimerlerin bir kanıtıdır.

Etkinlik

Wollensak ve ark. 15 ilerleyici keratokonuslu hastanın 16 gözünde yaptıkları ilk insan çalışması sonuçlarını, Ocak 2003'te yayınlamışlardır.⁹⁴ Aynı yılın Mayıs ayında bir başka çalışma sonucu daha yayınlanmıştır. Bu çalışmada, 24 hastanın 22 gözü, tedavi sonrası 3 ay ile 4 senelik periyotta (ortalama 23.2 ay) takip edilmiş ve tedavi gören tüm hastalarda bu dönem içerisinde hastalığındaki ilerlemenin durduğu bildirilmiştir. 16 gözde (% 70) maksimum keratometri (K) değerinde 2.01 D ve refraktif hatada 1.14 D azalma saptanmış, 5 hastada K değeri değişmemiş ve 1 hastada hafif bir kötüleşme görülmüştür. Görme keskinliği, 15 hastada (% 65) hafifçe artmıştır.⁹

Literatürde yayınlanmış klinik çalışmalarda, farklı etkinlik sonuçları bildirilmiştir. Bu çalışmaların yöntemlerine bakıldığında, çalışmaya dahil etme-dışlama kriterleri, tedavi parametreleri, sonuçların ölçümü ve analizleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Tüm çalışmalarda, farklı derecelerde görme keskinliği artışı, farklı derecelerde K değerlerinde azalma ve farklı takip süreleri bildirilmiştir. Çalışmalarda hiçbir ciddi komplikasyon ile karşılaşılmamıştır. CXL tedavi, Amerikan Gıda ve İlaç idaresi (The Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmıştır.

2.7.6.7. Güvenlik

Wollensak ve ark. yaptıkları pilot çalışmada, CXL tedavi sonrası kornea ve lens şeffaflığında, endotel hücre sayısında ve göziçi basıncında (GİB) bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir.⁹ Mazotta ve ark.'nın 44 hasta ve 3 yıl takipli çalışmalarında, in vivo konfokal mikromorfolojik analiz sonuçlarına göre, epitelial rejenerasyonun 4 günde tamamlandığı ve limbal toksisitenin gelişmediği gösterilmiştir.⁹⁵ Tedavi ile birlikte yok olan ön midstromal ve subepitelial sinir lifleri, postoperatif birinci aydan itibaren, subepitelial pleksustan rejenere olmakta, iki ve üçüncü ay itibariyle yeniden eski yapısına dönmektedir. Bu süreç 6 ayda tam olarak tamamlanmakta ve korneal duyarlılık yeniden kazanılmaktadır. Postoperatif keratosit kaybı (apoptozu) 340 µm derinliğe kadar gerçekleşmektedir. İnsanlarda konfokal inceleme ile postoperatif 2. ve 3. aylar arasında keratosit repopulasyonun kademeli olarak başladığı ve 6. ayda tamamlandığı gözlenmiştir.⁹⁶ Endotel hasarı riski nedeniyle, 400 µm'dan ince kornealarda CXL tedavi önerilmemektedir.¹ İnsan korneasında, kızılötesi termal kamera ile CXL tedavi esnasındaki ısı değişimi ölçülmüş ve ısının stabil olarak termal hasar eşiğinin altında kaldığı gösterilmiştir.⁹⁷

2.7.6.8. Komplikasyonlar

CXL tedavide literatürde çeşitli postoperatif komplikasyonlar bildirilmiştir. Bir hastada yavaş gerileyen diffüz subepitelial opasifikasyon⁹⁸, tedavi sonrası tüm hastalarda gelişen ve tam iyileşmesi postoperatif 12. aya kadar uzayabilen değişen derecelerde stromal bulanıklık⁹⁹, bakteriyel keratit¹⁰⁰, Acanthamoeba keratiti¹⁰¹, Herpetik keratit öyküsü bulunmayan bir hastada tedavi sonrası 5. günde jeografik ülser

ve iritis⁷⁵, post LASİK ektazi nedeniyle CXL tedavi uygulanan bir hastada evre 3 diffüz lameller keratit bildirilmiştir.¹⁰²

2.7.6.9. Tedavinin bilinmeyenleri ve hedefler

Keratokonus, hastaların % 20'sinde penetran keratoplasti endikasyonu koyduracak seviyede ilerleme göstermektedir.⁴ Bu hastalıkta transplantasyon cerrahisi ihtiyacını azaltacak herhangi bir uygulama, özellikle 3. dünya ülkeleri gibi sağlık harcamaları kısıtlı ülkeler açısından büyük önem taşımaktadır. CXL tedavi, hastalığa bağlı morbiditeyi azaltan başarılı bir tedavi yöntemi olmasının yanı sıra, tedavi maliyetlerinin düşük olması ile de ön plana çıkmaktadır. Ancak uzun dönem tedavi etkinliği ve güvenlik üzerine bilimsel verilerin yetersizliği, tedavinin kaygı verici yönleridir. Randomize çalışmalarda, tedaviye uygunluk ve dışlama kriterleri arasında farklılıklar mevcuttur. Hastalığın progresyon kriterleri genellikle kötü tanımlanmıştır ve çalışmalar arasında farklılıklar gösterir. Hangi vakalara yeniden tedavi uygulanacağı halen tartışmalı konulardır. Tedavi protokolu standardize edilmelidir. Tedavi uygulanacak yüzey alanı, tedavi öncesi pilokarpin kullanımı, epitel kaldırma metodu (alkol veya mekanik debridman), UVA uygulama öncesi riboflavin damlatılacağı süre, UVA uygulama sırasında riboflavin damlatma sıklığı, UVA ulaştırıcı sistem (doğrudan LED (Light Emitting Diode) veya homojen aydınlatma sistemi), postoperatif tedavi protokolü ve yeniden tedavi uygulamak için kesin endikasyonlar halen geliştirilmesi gereken durumlardır.

Kısa takip süreli çalışmalarda korneal sertlik artışı GİB ölçümlerini etkilememiştir. CXL tedavi korneada erken yaşlanmaya neden olmakta, yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Çünkü, zaten yaşlanma ile birlikte kollajen lifler arasında çapraz bağlanmalar meydana gelmektedir. Daha da kötüsü bazı vakalarda geç dönemde gelişebilecek diyabet nedeniyle non-enzimatik glikasyon da olaya dahil olacak ve tedavi etkisi daha da artacaktır. Yeterli takip süresi, stabil etki süresi gibi sorulara cevap verecek kadar uzun takip süreli çalışma henüz bulunmamaktadır. Tasarım ve yöntem kaygıları hala devam etmektedir.

UVA görünür ışığın emisyon spektrumu içinde kalmaktadır. Polimerizasyon, bir UVA ışık kaynağı kullanılmaksızın (UVA'nın zararlı etkileri en aza indirilerek) görünür

ışık uygun çözücüler kullanılarak gerçekleştirilebilir.¹⁰³ Fruktoz gibi şekerler, çapraz bağlanmaları (fruktuasyon) teşvik için umut vaad etmektedirler. Bu şekerlerin insan dokularında sorbitol yolağında rolleri bulunmaktadır.¹⁰⁴ Bu ajanlar, riboflavin-UVA yöntemi sınırlamalarının üstesinden gelebilirler.¹⁰⁵

3. FLAVONOİDLER

Flavonoidler polifenollerin doğal yollardan oluşan en büyük gruplarından biridir. Doğal olarak bitkilerin gövdelerinde, yapraklarında, kabuklarında, çiçeklerinde ve köklerinde bulunurlar. Flavonoidler hemen hemen yeşil bitkilerin tamamında bulunduğundan, bitki ekstraktlarıyla yapılan çalışmaların çoğunda sık sık karşılaşılır. Bu nedenle flavonoidler kimyacı, biyokimyacı, biyolojici ve bitkilerle ilgilenen diğer bilim adamlarının ilgi alanına girer.

3.1. Flavonoidlerin genel yapısı

Sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' adını almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C₆-C₃-C₆) gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilirler. İskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavonoid, kalkon gibi türleri vardır.¹⁰⁶ Flavonoidleri P vitamini olarak kabul eden görüşler mevcuttur.¹⁰⁷

3.2. Flavonoidlerin genel özellikleri

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit (O₂⁻), lipid alkoksil (RO⁻) ve peroksil (ROO⁻), nitrik oksit (NO) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α-tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, influenza ve rinovirüslere karşı) etkileri de söz konusudur.^{106,108-111} Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler.¹¹²⁻¹¹⁵ Quercetin ve rutin gibi major flavonoidlerin, serum trigliserit seviyesini ve platelet agregasyonunu azaltarak

antitrombolitik etki göstermeleri yanında quercetin, meme karsinomunda p53 tümör supressör geninde down-regülasyon yapar.¹¹⁶ Quercetin'in ovarian karsinoma hücrelerinde transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) üretiminin düzenlenmesi ile olabilen inhibitör aktivitesi gösterilmiştir.¹¹⁷ Yine bir flavonoid bileşik olan 3-hidroksifarrerolün, 10 M konsantrasyonda süperoksit anyonunun (O_2^-) nötrofil ürünlerini tetiklemesini azaltması, nötrofil miyeloperoksidaz ve elastaz salınımını inhibe etmesi, monositlerden tumor necrosis factor- α (TNF- α) ve IL-8 salınımını azaltması yoluyla antibakteriyel özellik gösterebileceği bildirilmiştir.¹¹⁸ Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, nikotinamid adenin dinükleotid oksidaz (NADH-oksidad), protein kinaz gibi bazı enzimleri inhibe ettiklerine dair veriler de mevcuttur.^{108,110,119-121}

Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekere parçalanabilirler. Fenolik antioksidanlar, lipid radikallere, hızla H^+ vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksil (ROO^-) ve alkoksil (RO^-) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır.¹²²

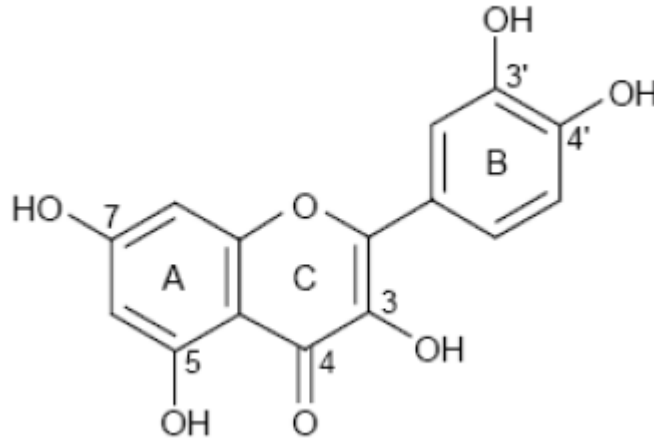
Literatürde flavonoidlerin prooksidan özellikleri olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Bu özellikleri şu şekilde özetleyebiliriz:

- Tümör promotörü olarak etkisi^{106,123,124}
- Glutatyon redüktaz enzimini inhibe etkisi¹¹⁹
- Monooksijenaz¹²⁵ ve siklooksijenaz enzimlerini aktive etkisi¹⁰⁶

Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Testi kullanılarak, bazı flavonoidlerin konsantrasyon ve serbest radikal kaynağına bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan davranabileceği gösterilmiştir. Flavonoidler serbest radikallere karşı antioksidan olarak davranırlar, ama bir geçiş metali varlığında prooksidan aktivite gösterirler. Bu flavonoidlerin antioksidan aktivitesi ve bakırın indüklediği prooksidan aktiviteleri kendi yapılarına bağlıdır.^{113,126}

4. QUERCETİN

Quercetin, (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) olarak adlandırılır. Flavonoidlerin flavon grubundadır. Yapısında 3,3',4' ve 5,7 pozisyonlarında -OH grubu bağlıdır. Yapısal formülü aşağıdaki gibidir:



Şekil 3: Quercetin bileşiğinin açık formülü

4.1. Quercetin bileşiğinin fiziksel özellikleri

Formülü : $C_{15}H_{10}O_7$

Molekül ağırlığı : 302,24 g/mol

İçeriği : % 65,19 C, % 3,34 H ve % 37,06 O

Saflığı : $\geq 95\%$

Erime noktası : $314^{\circ}C$

Görünümü : Hardal sarısı renkte katı toz

Çözünürlüğü : Alkolde çözünür. Suda eser miktarda çözünür. Asetik asit çözeltisinde yoğun sarı renk vererek çözünür. Ayrıca %10'luk Tween 20 buffer ve %5'lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde çözüldüğü gösterilmiştir.^{127,128}

Saklama koşulları : Güneş ışığından koruyarak $+4^{\circ}C$ 'de saklanmalıdır.

Maksimum eksitasyon : 380 ve 440 nm¹²⁹

UV maksimum absorbans : 365-380 nm¹³⁰⁻¹³²

4.2. Prooksidan ve antioksidan ajan olarak Quercetin

Quercetin gibi bazı flavonoidlerin konsantrasyon ve serbest radikal varlığına bağlı olarak hem prooksidan hem de antioksidan davranabileceği gösterilmiştir.^{113,132}

Quercetin, serbest oksijen radikallerini temizler. Ksantin oksidaz ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder.^{133,134} UVA'nın neden olduğu süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerindeki düşmeyi parsiyel olarak önler, sitotoksik bir aldehid olan malondialdehid (MDA) seviyesini belirgin olarak azaltır.^{132,135,136} Bir geçiş metali ve ya UV varlığında ise prooksidan aktivite gösterir.^{113,131,132}

4.3. Kimyasal CXL ajanı olarak Quercetin

Kimyasal CXL ve UV ışığının kullanıldığı fotooksidatif CXL olmak üzere iki farklı kollajen CXL methodu vardır.

2010 yılında Zhai ve ark., domuz kalp kapak ekstraselüler matriksi üzerinde quercetin kimyasal CXL etkilerini değerlendirdikleri çalışmayı yayınlamışlardır.¹³⁷ CXL sonrası mekanik özellikler, stabilite ve kalsifikasyon değerlendirilmiş, sonuçlar glutraldehit ile kıyaslanmıştır. Quercetin ile CXL sonrası ekstraselüler matriksin mukavemetinin daha yüksek olduğu, termal denatürasyon sıcaklığının belirgin olarak arttığı, enzimatik degradasyona karşı direncinin arttığı, quercetin glutraldehitten daha etkin ve daha güvenilir bir kimyasal CXL ajanı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile quercetin biyoprostetik kalp kapak ksenofragtları için yeni bir çapraz bağlayıcı reaktif olabileceği gösterilmiştir.

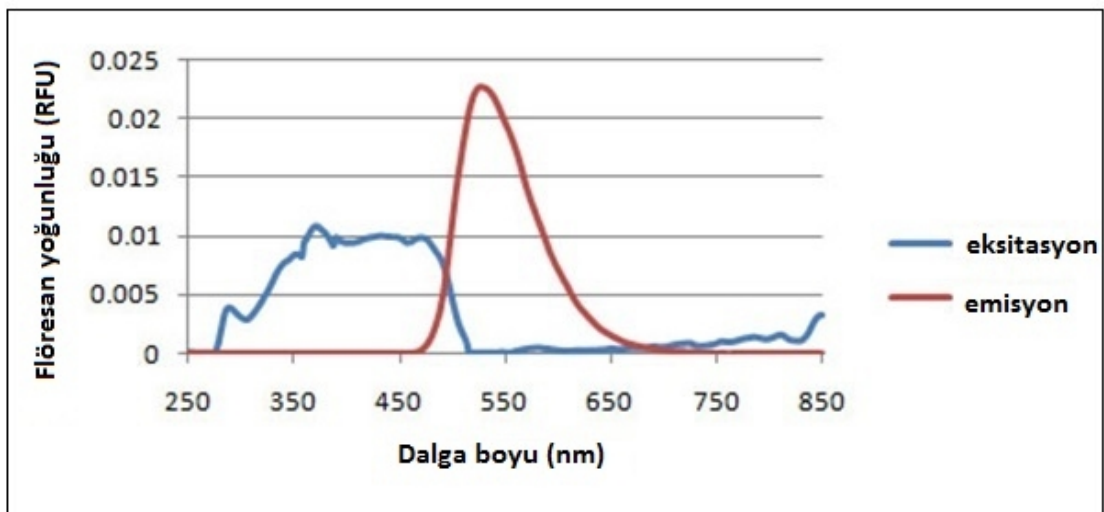
4.4. Fotooksidatif ve fotosensitizatör ajan olarak Quercetin

1985 yılında Takahama ve ark., quercetin fotooksidatif özelliğini ve O_2^- (süperoksit anyonu) bağımlı mekanizmasını yayınlamışlar, 380 nm civarında absorpsiyonun maksimum olduğunu bildirmişlerdir.¹³¹ 2009 yılında Fahlman ve ark. quercetin, UVA ve UVB'nin indüklediği oksidasyon ürünlerini göstermişlerdir.¹³²

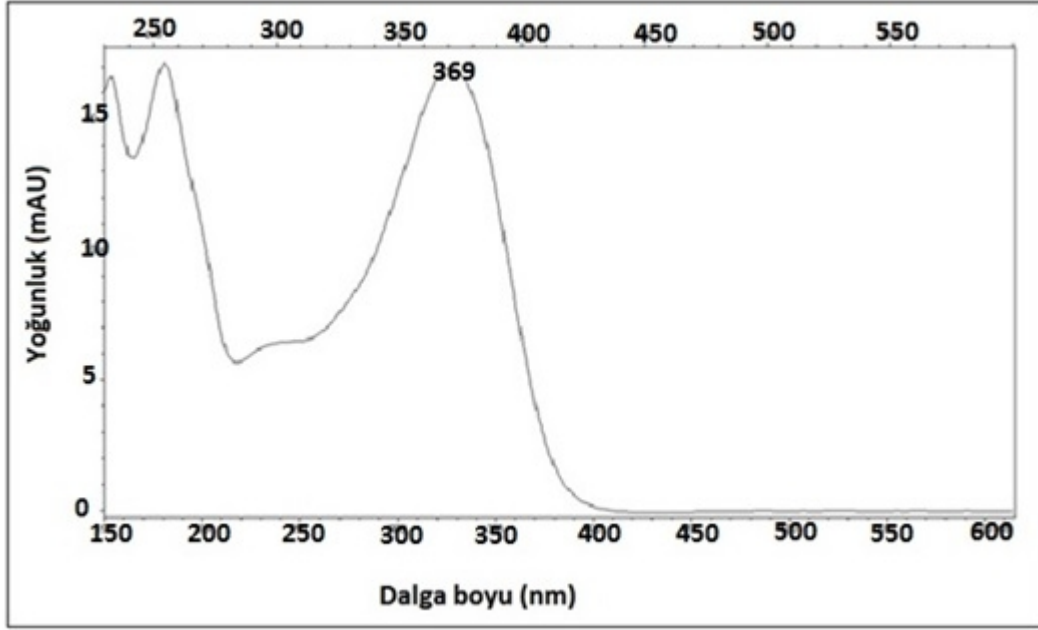
1965 yılında Waiss ve ark., 2010 yılında Montana ve ark.¹³⁸, 2013 yılında Li ve ark.¹³⁹ tarafından quercetinin fotosensitizatör etkisi gösterilmiştir.

4.5. Riboflavine alternatif fotooksidatif CXL ajanı olarak Quercetin

Çalışmamızda riboflavine maliyet ve etkinlik açısından üstün olabileceğini düşündüğümüz quercetini araştırdık. CXL tedavisinde ışığa duyarlılaştırıcı ajanın kornea stromasına diffüzyonu gereklidir. İntakt epitelium riboflavinin absorpsiyonunu yavaşlatan bir bariyerdir ve intakt epitelium varlığında riboflavinin penetrasyonu tam olmaz. Tavşan modellerinde epitelium korumanın CXL etkisini 5 kat azalttığı bildirilmiştir.¹⁴⁰ Bu nedenle CXL tedavisinde epitelium debride edilir. Yüksek molekül ağırlıklı maddelerin kornea stromasından geçişi sınırlıdır. 376,37 g/mol molekül ağırlıklı riboflavinin kornea stromasına geçişi bilinmektedir. Bu nedenle biz de 302,24 g/mol molekül ağırlıklı quercetinin bu yönden avantajlı olabileceğini düşündük. Kullanılan CXL ajanının fotooksidatif ve fotosensitizatör özellikte olmasının yanı sıra UV'yi maksimum oranda absorbe etmesi gerekir. Çünkü kornea stromasına etki ederken kornea endotel hücrelerinin, lensin ve retinanın UV'nin zararlı etkilerinden korunması gereklidir. Riboflavinin 370 nm'deki UV absorbansı % 90 civarındadır.⁹⁴ Quercetinin UV absorbansı da 370 nm'de maksimum düzeydedir.¹³⁰⁻¹³² Ayrıca quercetinin maksimum eksitasyon değeri 380 ve 440 nm dalga boylarındadır¹²⁹, bu da riboflavinin flöresans spektrumu ile oldukça benzerdir. (Şekil 4-5)



Şekil 4: Riboflavinin flöresans spektrumu



Şekil 5: Quercetin'in flöresans spektrumu

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; crosslinking uygulaması, sakrifikasyon işlemi ve denek kornealarından şeritlerin hazırlanması Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler ve görüntüleme işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneğinin hazırlanması ve biyomekanik testler Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Makina Eğitimi Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

Çalışma 2 aşamalı olarak planlanmıştır. Birinci aşamada, histopatolojik güvenlik testleri yapılmıştır. İkinci aşamada ise biyomekanik testler ile tedavi etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

5.1. Crosslinking cihazının özellikleri

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

UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)'in özellikleri:

- 365 nm dalga boyunda, 7-9-11 mm çaplı homojen UVA spotu üretebilmektedir
- 3 mW/cm²'lik spot enerjisi sağlayabilmektedir
- Çalışma mesafesi 50 mm'dir
- 32×5×5 cm ebatlarındadır
- Ağırlığı 6.5 kg'dir.

5.2. Denekler

Çalışmamızda, birinci ve ikinci aşamalarda toplam 60 adet, sağlıklı Avustralya-Yeni Zelanda Irkı, Chinchilla türü (3000-3500 gr) albino dişi tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHYUAM) temin edilerek, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) kendileri için özel ürettiği olan tavşan kafeslerinde, tek ya da ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, ısısı (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.

Çalışmamızda 60 denek, n=60 göz kullanılarak 4 grup oluşturuldu:

1. Grup (K) : Kontrol (n=15)
2. Grup (T) : UVA / %10'luk Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu (n=15)
3. Grup (R) : UVA / % 0,1 Riboflavin (n=15)
4. Grup (Q) : UVA / %1'lik Quercetin (%10'luk Tween 20 buffer solüsyonu ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde) (n=15)

Daha önceki çalışmalarda^{127,128,141} korneal geçirgenliği arttırdığı ve korneada güvenilir olduğu gösterildiği için çalışmamızda da %10'luk Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyon ile %1' lik topikal quercetin solüsyonu hazırlandı.

Birinci aşamada, n=30 göze histopatolojik çalışmalarla güvenilirliği kanıtlanmış patentli "UV-X Illumination System" ile standart tedavi parametrelerini⁹ içeren CXL tedavisi uygulandı. Her grupta n=10 olacak şekilde % 0,1'lik riboflavin, %10'luk Tween 20 buffer - %5'lik 0,2 M tris buffer solüsyonu ve %1'lik quercetin (%10'luk Tween 20 buffer - %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde) ile CXL tedavisi uygulandı. n=10 göze ise sadece epitelyal debridman yapıldı.

Uygulamayı takiben 7. ve 42. günlerde sakrifikasyon sonrası, denek kornealarından hazırlanan kesitler, rutin ve immunohistokimyasal yöntemlerle boyama sonrası histopatolojik olarak değerlendirildi. Tüm deneklerin CXL tedavisi öncesi ve sakrifikasyon öncesi ultrasonik pakimetre ile kornea kalınlığı ve TonoPen XL aplanasyon tonometresi ile (Mentor, Norwell, MA, USA) göziçi basıncı ölçüldü.

İkinci aşamada, n=20 göz, 4 gruba ayrıldı. T grubuna (n=5), R grubuna (n=5) ve Q grubuna (n=5) standart tedavi parametrelerini içeren CXL tedavisi uygulandı. K grubundaki (n=5) gözlere ise sadece epitelyal debridman yapıldı. Aynı gün sakrifikasyon sonrası denek kornealarından, her iki uçta 1'er mm skleral doku ile birlikte ortalama 14×4 mm boyutlarında şeritler hazırlandı. Korneal şeritler, Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Makina Eğitimi Bölümü'nde hazırlanan bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği ile biyomekanik testlere tabi tutuldu.

5.3. Crosslinking uygulaması

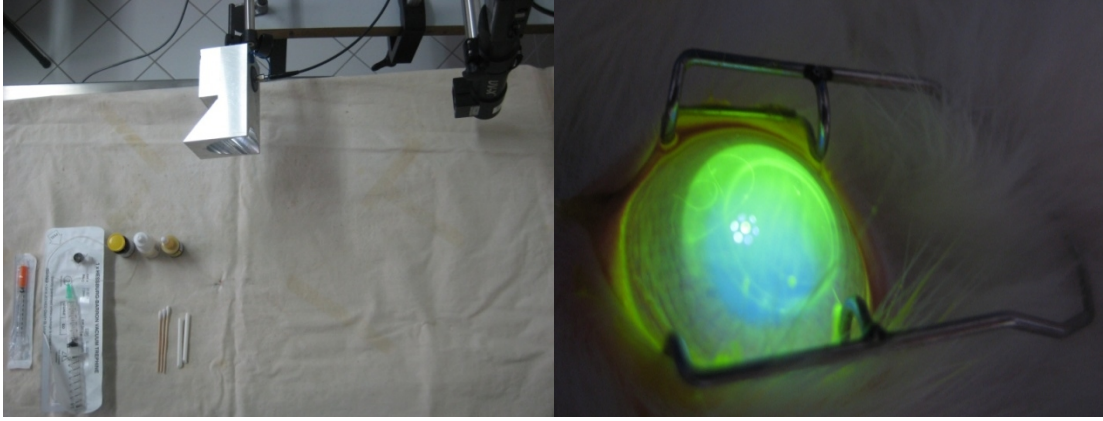
Deneklere, 1.5 ml Ketamine Hydrochloride (Ketasol % 10; Richter Pharma AG, 35 mg/kg) ve 0.5 ml Xylazine Hydrochloride'in (Rompun % 2; Bayer Pharma, 5 mg/kg) intramüsküler (İM) uygulanması ile genel anestezi sağlandı. Denek gözlerine, Proparacain Hydrochloride (Alcaine % 0.5; Alcon) ile topikal anestezi sonrası, kapak spekulumu takıldı. Vakumlu trepan ile santral 7.5 mm çapta korneanın işaretlenmesinin ardından, pamuklu çubuk kullanılarak korneal epitel kaldırıldı.

T grubunda, %10'luk Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu 30 dakika boyunca kornea yüzeyinde bekletildi. UVA uygulama öncesi, cihazın spot enerjisi kalibre edildi. Kornea yüzeyine 5 cm mesafeden 3 mw/cm² dozunda (5.4 Joule/cm²) UVA ışığı 30 dk boyunca uygulandı. Bu esnada, her 5 dk da bir %10'luk Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu damlatıldı.

R grubunda, % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (10 ml % 20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate) 30 dakika boyunca kornea yüzeyinde bekletildi. UVA uygulama öncesi, cihazın spot enerjisi kalibre edildi. Kornea yüzeyine 5 cm mesafeden 3 mw/cm² dozunda (5.4 Joule/cm²) UVA ışığı 30 dk boyunca uygulandı. (Şekil 6) Bu esnada, her 5 dk da bir % 0.1'lik riboflavin solüsyonu damlatıldı.

Q grubunda, %1'lik quercetin (%10'luk Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde) 30 dakika boyunca kornea yüzeyinde bekletildi. UVA uygulama öncesi, cihazın spot enerjisi kalibre edildi. Kornea yüzeyine 5 cm mesafeden 3 mw/cm² dozunda (5.4 Joule/cm²) UVA ışığı 30 dk boyunca uygulandı. Bu esnada, her 5 dk da bir %1'lik quercetin (%10'luk Tween 20 buffer ve %5' lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde) damlatıldı. Uygulamaya, denek gözlerine lomefloxacin (Okacin 3 mg/5 ml; Novartis) damlatılarak ve reepitelizasyonun kalitesini bozmayacak, oksijen geçirgenliği iyi seviyede olan yumuşak kontakt lens (Zeiss) konularak son verildi. Kontakt lens epitelyum iyileşmesin görüldüğü postop 3-5. günlerde çıkarıldı. Lomefloxacin damla 1 hafta, deksametazon damla (Dexa-sine 1mg/5ml; Liba) 2 hafta boyunca damlatıldı.¹⁴² CXL tedavisi, deneklerin tek gözlerine içerisinde uygulandı.

Denekler, birinci aşamada postoperatif 7. ve 42. günlerde, ikinci aşamada ise aynı gün, yüksek doz intravenöz (İV) Tiopental Sodium (Pentothal Sodium 0.5 gr; Abbott, 150 mg/kg) ile sakrifiye edildi. Globlar, 12 hizasında limbustan işaretlenerek enükle edildi.



Şekil 6: CXL tedavi düzeneği ve uygulama

5.4. Histopatolojik inceleme

Globlar, 10 gün süre ile % 4'lük paraformaldehide solüsyonu içerisinde tespit edildikten sonra, kornealar saat 12 hizasından (santralden) kesildi ve korneal doku örnekleri parafine gömüldü. Hazırlanan 4 µm'lik parafin kesitler, poly-L-lizin ile kaplı lamalar üzerine alındı. Kesitler, ksilen ve etanol ile deparafinize ve rehidrate edildi. Daha sonra deiyonize su ile yıkandı ve nonspesifik zemin boyanmasını önlemek amacıyla, tris buffered saline (TBS) içerisinde % 5 oranında dilüe edilmiş at serumu ile oda sıcaklığında 10 dk protein blokajı yapıldı ve primer antikor uygulamasına geçildi. Kesitler, poliklonal fare antikorunu anti-smooth muscle actin (anti-SMA) (1:400; Dako, Glostrup, Denmark) ile oda ısısında bir gece inkübe edilip, TBS ile 2 kez 5'er dk yıkandı. Sekonder antikor işlemi için sırasıyla streptavidin-biotin (Lab Vision, Biotinylated Goat Anti-Mouse, Lot:MBN11206A, CA, USA) ve streptavidin-peroksidaz (Lab Vision Streptavidin Peroxidase, Lot:SHR11210) solüsyonlarında 15'er dk inkübe edildi. Ardından kromojen olarak diaminobenzen (Lab Vision, Lot:AHD21119, CA, USA) solüsyonunda 15 dk bekletilip su ile yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksilin ile zıt boyama yapıldıktan sonra deiyonize su ile yıkanarak % 95 ve % 100'lük alkollerden, sonra ksilenden geçirildi ve kurutularak kapatıldı. İmmunohistokimyasal boyama ile birlikte, tüm kesitlere Hematoksilin-Eozin (H&E: Hematoxylin-Eosin) boyama da yapıldı.

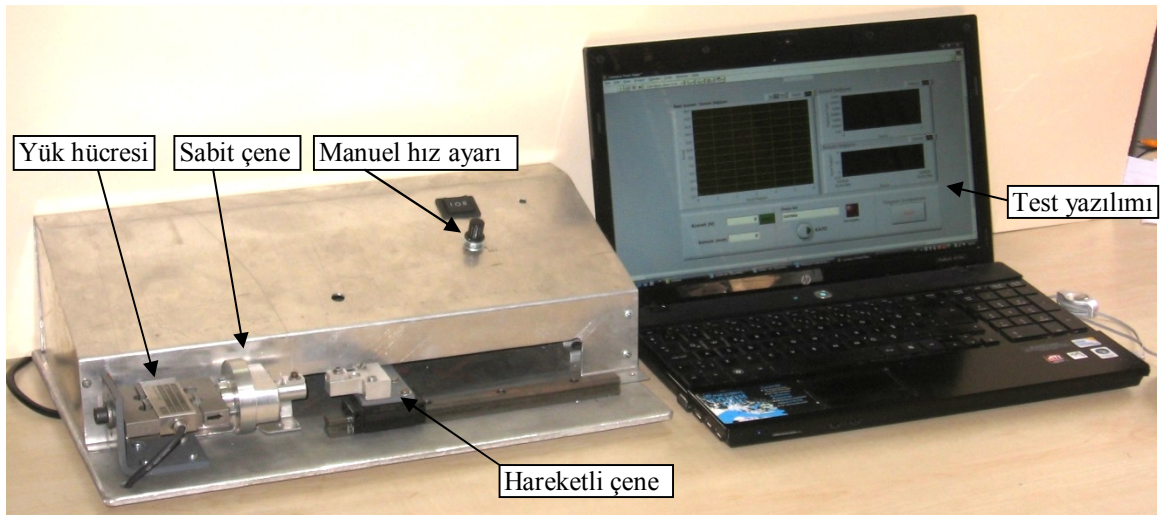
Preparatlar, Olympus BX51 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu ile incelendi. Kesit santralinde, en büyük büyütmede ($\times 400$), epitel-endotel bütünlüğü, keratosit sayısı, korneal ödem, kornea kalınlığı, inflamasyon ve immunohistokimyasal

olarak myofibroblastik aktivite değerlendirildi. Değerlendirmede, kesit santralinde en büyük büyütme alanında keratositler sayıldı ve kornea kalınlıkları ölçüldü.

5.5. Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneğinin hazırlanması

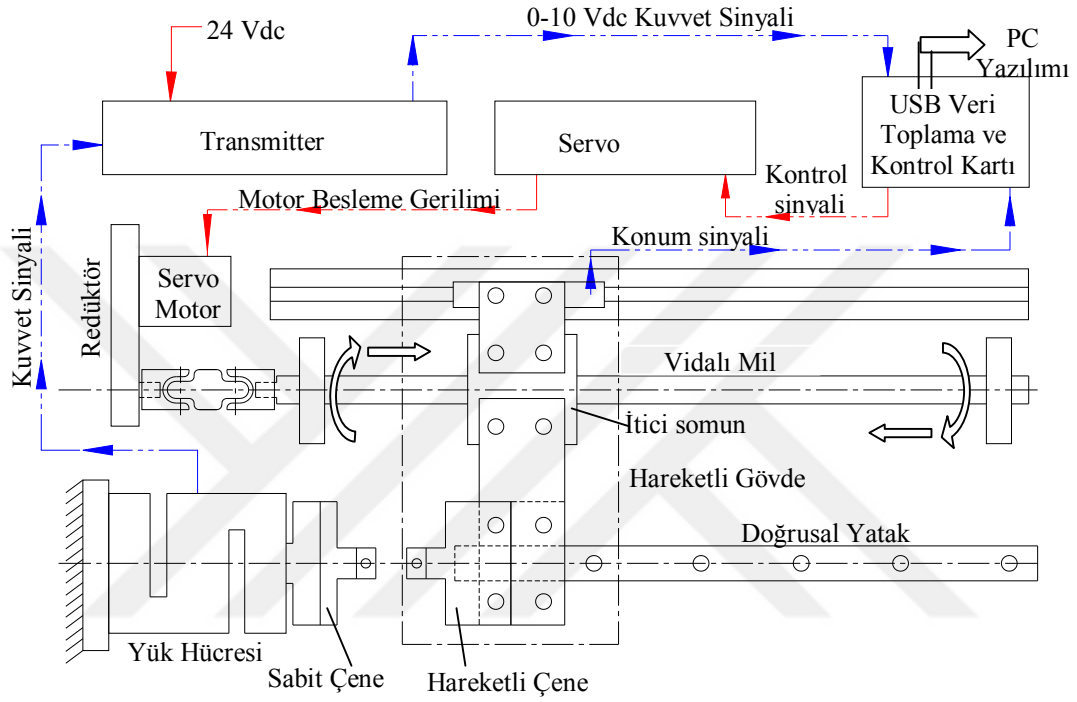
Deneyde kornealara ait biyomekanik test değerlerinin elde edilebilmesi için, Şekil 7'de görülen bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği kullanıldı. Test düzeneği ile çeşitli büyüklüklere ait veriler bilgisayara aktarılabilir. Bunlar; kuvvet-yük (F) [Newton, N], uzama miktarı (ΔL) [mm], kornea şeritlerinin ilk boyu (L) [mm] ve kalınlık miktarı (b) [mm] büyüklükleridir. Deneylerde çene aralığı ortalama 14 mm olarak ayarlanmıştır. Kornea kesit alanı, çekme testi öncesinde 0.01 mm dijital kumpas ile kalınlık ve genişlik ölçülerinin alınmasıyla belirlenmiştir.

Test düzeneğinde çekme kuvvetinin ölçülmesi amacıyla, Esit marka Sba tipi 50 N kapasiteli yük hücresi kullanılmıştır. Yük hücresinden elde edilen sinyallerin düzeltilerek 0-10 doğru akım (DC) voltaja dönüştürülmesi için, Esit model TR3 transmitter kullanılmıştır. Uzama miktarının ölçülmesi için, 0.005 mm hassasiyetli Haidenhain marka lineer dijital cetvel, hareketli çeneye montaj edilerek kullanılmıştır.



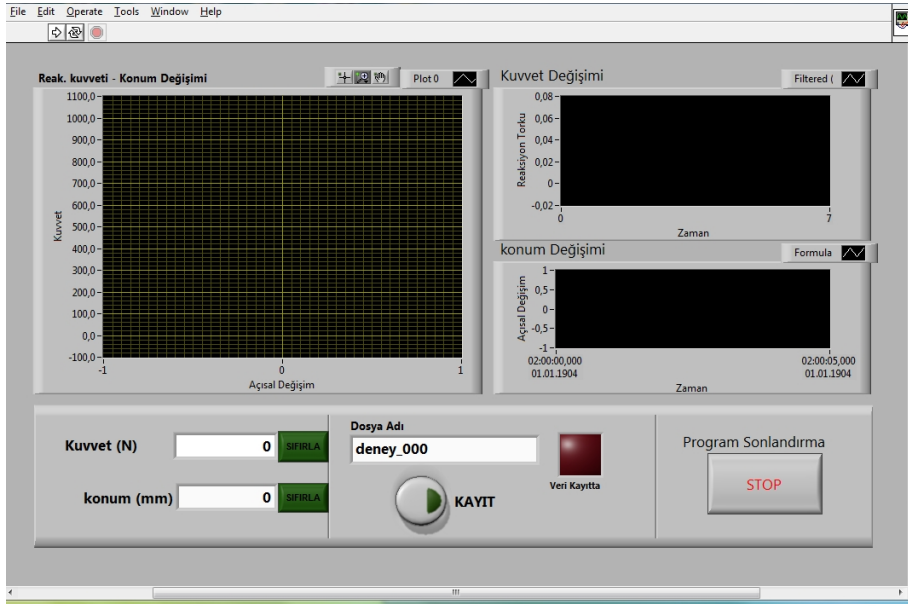
Şekil 7: Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği

Korneal şerit ucunu tutan hareketli çene, doğrusal bir yatak üzerine sadece tek eksende hareketine izin verilecek şekilde sabitlenmiştir. Böylece hareketli çene, doğrusal yatağın kayıcı arabası, itici somun ve dijital cetvelin okuyucu kafası, kendilerini rijit bir şekilde bir arada tutan gövde üzerine monte edilmişlerdir. Bu bağlantıların şematik görünümü Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8: Test düzeneğinin şematik görünümü

Bu sensörler ile elde edilen kuvvet ve deplasman verilerinin bilgisayar ortamına aktarılması, National Instruments marka USB6009 model veri toplama kartı ile gerçekleştirilmiştir. Test verilerinin bilgisayara kayıt edilmesi için Labview Programı ile yazılan bir paket program hazırlanmıştır. (Şekil 9) Ayarlanabilir çekme hızına sahip cihazda, veriler 10 Hz sıklığında alınmıştır.



Şekil 9: Test düzeneği için hazırlanmış programa ait kullanıcı ara yüzü.

Ölçülen ilk veriler ve düzenek ile elde edilen veriler, Microsoft Excel (Microsoft Office Pack 2003) programı ile işlenmiştir. Böylece korneanın biyomekanik özelliklerini ifade eden; Birim Deformasyon Oranı-Gerinim (ϵ), Gerilme Mukavemeti-Gerilim (σ) ve bu iki değer oransal değişimi ile tanımlanan ve dokunun sertliğini ifade eden Young Modülü-Elastiklik Modülü (E) değerleri tespit edilmiştir. Kuvvet ve deformasyon miktarları, temel mukavemet teorileri ile analiz edilmiştir.

ϵ , yapıların uzama kabiliyetini ifade eden bir terimdir. Birimi yüzde (%) olarak ifade edilir. Uzama oranı olarak da tanımlanır ve test edilen numunenin uzama miktarının, başlangıçtaki ilk boyuna olan oranıdır. Oluşan % gerinim miktarı, Denklem 1 ile hesaplanmaktadır.

$$\epsilon [\%] = \frac{\Delta L [\text{mm}]}{L [\text{mm}]}$$

Denklem 1: ϵ : Gerinim (%), ΔL : Uzama miktarı (mm), L : İlk boy (mm)

Korneanın biyomekanik özelliğini ifade eden bir diğer önemli büyüklük, dokunun bir birimlik kesit alanda taşıyabildiği yük değeri, yani gerilme mukavemetidir (σ). “ σ ” değerinin hesaplanması ile farklı kesit alana sahip yapılarda ölçülen farklı kuvvet değerlerinin anlamlı bir şekilde yorumlanması sağlanabilmektedir. Yani, ölçülen

kuvvetin kesit alana bölünmesi ile birim alana düşen yük miktarı bulunmakta, böylece farklı yapıların ‘‘σ’’ değerleri birbirleriyle kıyaslanabilmektedir. Dokunun gerilme mukavemetini gösteren ve kısaca; birim kesit alan (A) için taşınan yük (F) olarak da ifade edilen kornea içi oluşan gerilme değerleri, Denklem 2 ile hesaplanmıştır. Dokunun taşıdığı kuvvette ani düşüşün olması, dokunun maksimum gerilme değerine ulaştığını bir sonra ki adımda ise yırtılarak/koparak deforme olduğunu ifade etmektedir.

$$\sigma \text{ [MPa]} = \frac{F \text{ [N]}}{A \text{ [mm}^2\text{]}}$$

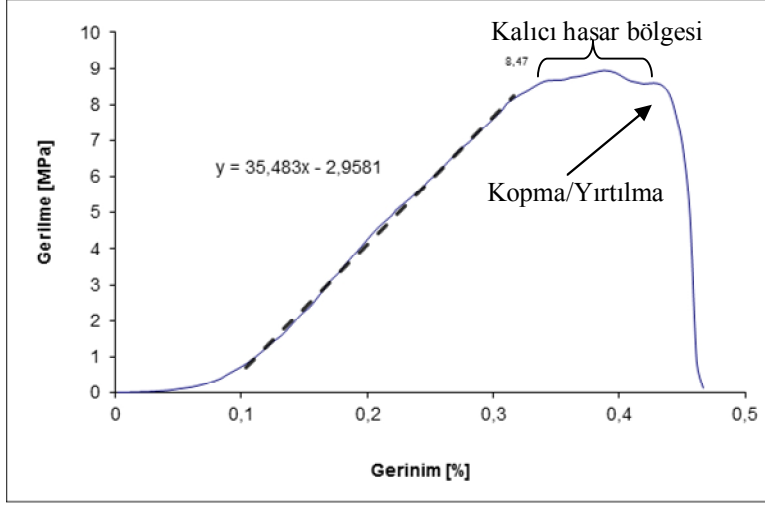
Denklem 2: σ: Gerilme (Mega Pascal, MPa), F: Yük(Newton, N), A: Birim kesit alan (mm²)

Young Modülü-Elastiklik modülü (E) ise yapıların esneklik kabiliyetlerini ifade eden en belirgin parametredir. Çekme-basma testleri gibi mekanik testlerden elde edilen gerilme-gerinim verilerinin değişimi olarak ifade edilmektedir ve Denklem 3 ile hesaplanmaktadır.

$$E \text{ [Mpa]} = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Denklem 3: E: Elastiklik modülü, σ: Gerilme, ε: Gerinim

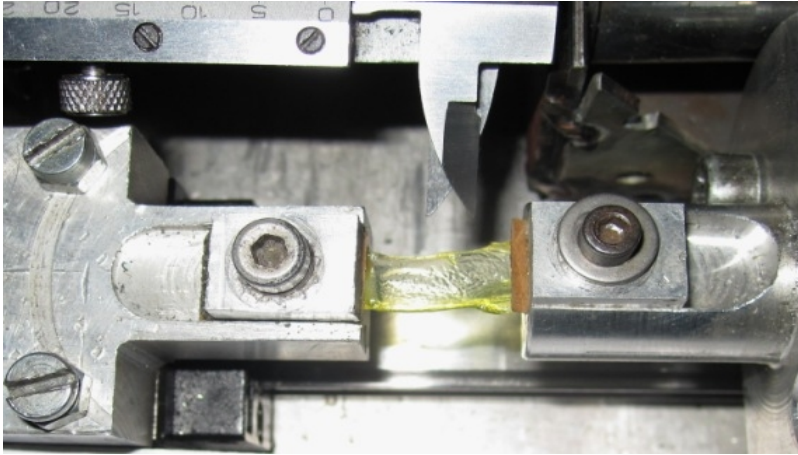
Şekil 10’da deney düzeneğinden elde edilen verilerin, Denklem 1 ve Denklem 2 kullanılarak Microsoft Excel programında işlenmesi sonucu, numunenin test süresince gösterdiği gerilme-gerinim karakteristiğinin belirlenmesine ait örnek bir çalışma görülmektedir.



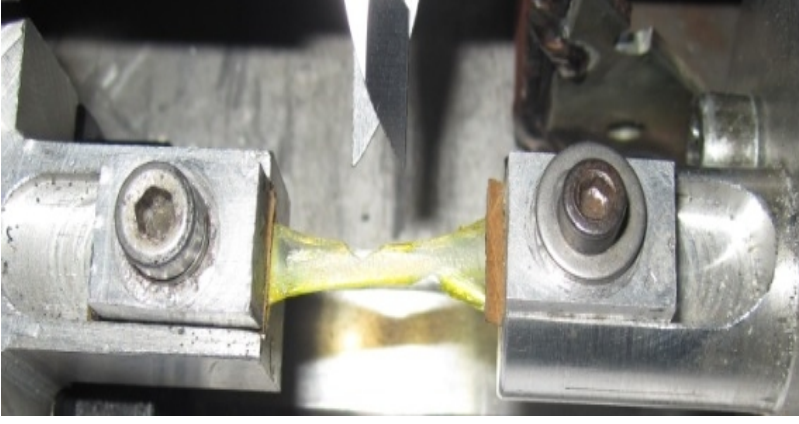
Şekil 10: σ - ϵ eğrisi ve E'nin tespiti.

Şekil 10'daki örnek incelemede olduğu gibi σ - ϵ eğrisi, belirli bir bölgede doğrusal artış göstermektedir. Bu bölgede, σ - ϵ değerlerindeki değişimin oranı, diğer bir ifade ile; bu değerleri kesen doğru denkleminin (kesikli çizgi ile gösterilmektedir) türevi, doğrunun eğimini yani elastiklik modülünü (E) vermektedir. Böylece $E=y'=35,483$ MPa olarak tespit edilir.

Yaptığımız biyomekanik testlerde, korneal şeritler 14 mm'lik çene aralığında sıkıştırılarak, hareketli çene ile şeritler üzerine 1 mm/dk'lık çekme hızıyla sabit bir kuvvet uygulanmıştır. (Şekil 11) Dokuların yırtıldığı maksimum gerilme değerine ulaşıldığında işlem sonlandırılmıştır. (Şekil 12)



Şekil 11: Biyomekanik test düzeneği, metal çeneler arasında sıkıştırılmış korneal şerit



Şekil 12: Maksimum gerilme değerine ulaşan dokuda yırtılma anı

5.6. İstatistiksel Değerlendirme

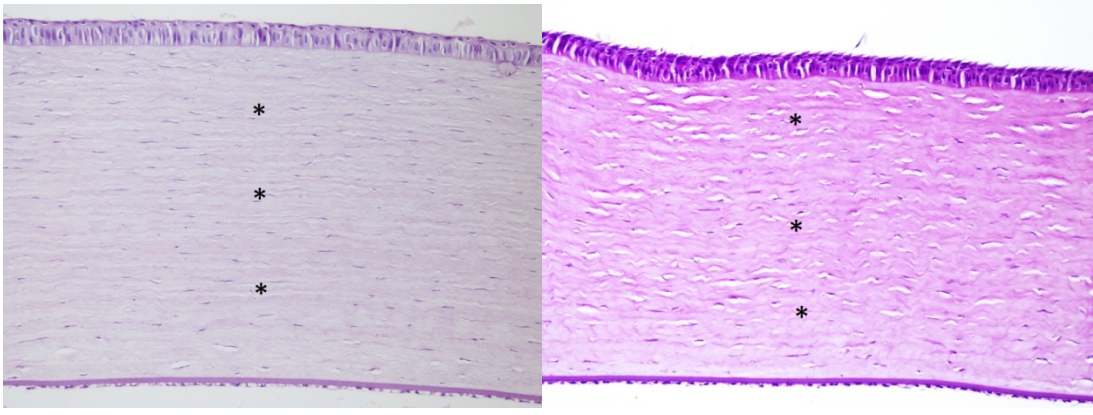
Verilerin istatistiksel değerlendirmesi “SPSS for Windows version 15” yazılımı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde, ikili gruplar nonparametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Metin içinde sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi.

6. BULGULAR

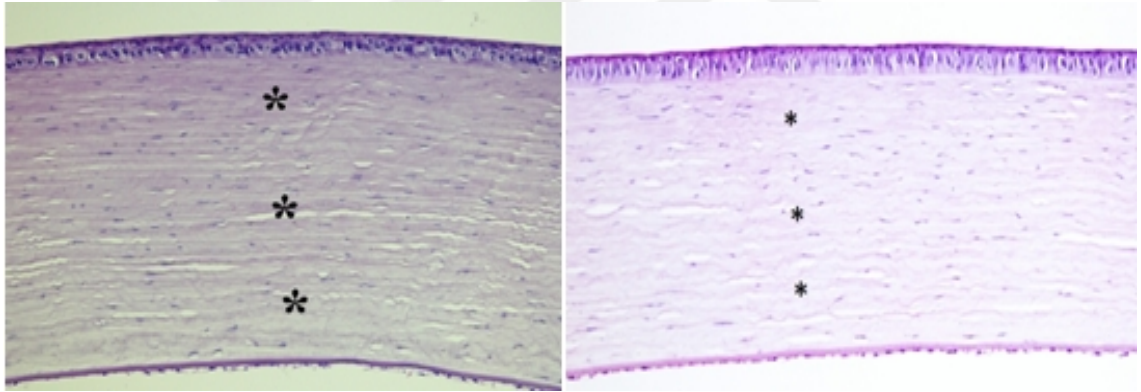
6.1. Histopatolojik değerlendirme bulguları

Tüm gruplarda postoperatif 7. ve 42. günlerde sakrifiye edilen deneklere ait korneal kesit incelemelerinde inflamasyon bulgusuna ve korneal ödeme rastlanmadı, kornea epitel ve endotel bütünlüğü intakt olarak değerlendirildi.

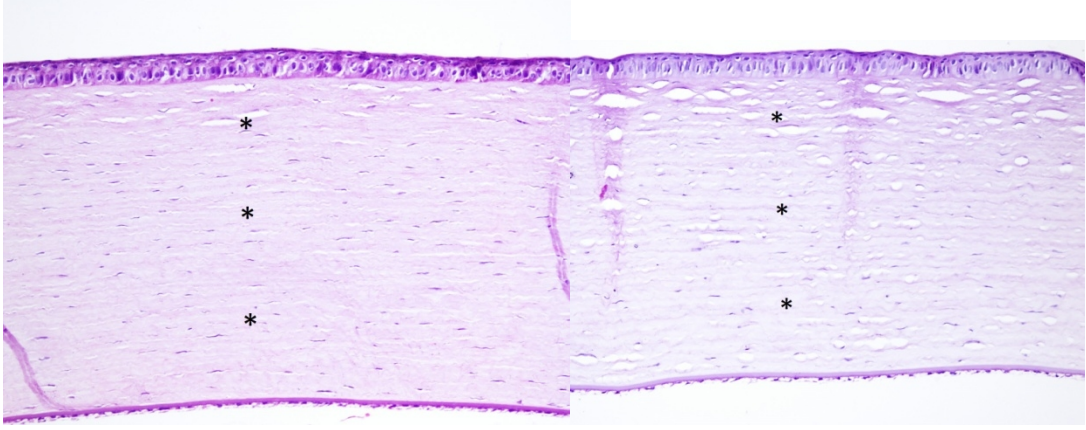
Histopatolojik kesitler niteliksel olarak değerlendirildiğinde, postoperatif 7. ve 42. gün deneklerinde, tüm gruplarda tüm stroma katlarında keratositlerin normal dağılım gösterdiği saptandı.



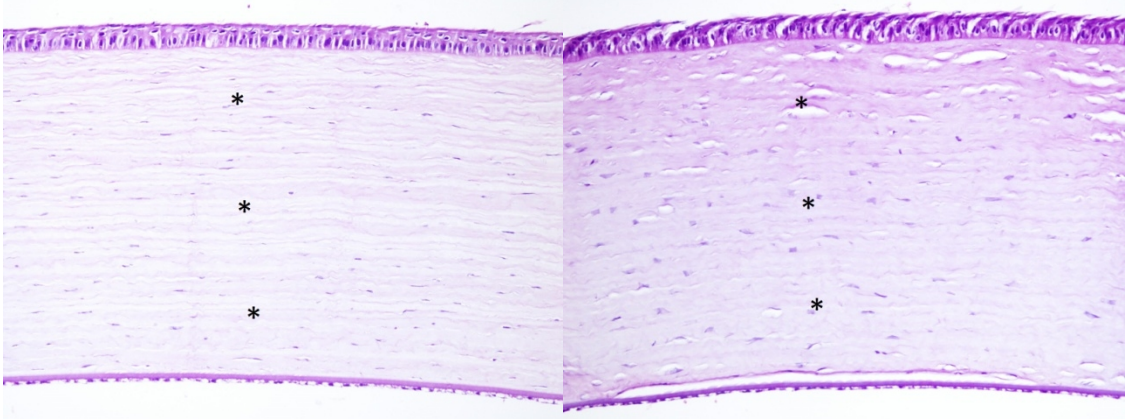
Şekil 13: K grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri. Sol fotoğraf postoperatif 7. gün deneklerine ($\times 200$), sağ fotoğraf postoperatif 42. gün deneklerine ($\times 200$) aittir, yıldızlar tüm stroma katlarında normal keratosit dağılımını göstermektedir.



Şekil 14: T grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri. Sol fotoğraf postoperatif 7. gün deneklerine ($\times 200$), sağ fotoğraf postoperatif 42. gün deneklerine ($\times 200$) aittir, yıldızlar tüm stroma katlarında normal keratosit dağılımını göstermektedir.



Şekil 15: R grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri. Sol fotoğraf postoperatif 7. gün deneklerine ($\times 200$), sağ fotoğraf postoperatif 42. gün deneklerine ($\times 200$) aittir, yıldızlar tüm stroma katlarında normal keratosit dağılımını göstermektedir.



Şekil 16: Q grubu deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri. Sol fotoğraf postoperatif 7. gün deneklerine ($\times 200$), sağ fotoğraf postoperatif 42. gün deneklerine ($\times 200$) aittir, yıldızlar tüm stroma katlarında normal keratosit dağılımını göstermektedir.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede, T, R ve Q gruplarında, belirgin bir dağılım paterni göstermeyen, tek tük α -aktin (+) hücreler (myofibroblastlar) görüldü.

Niceliksel değerlendirmede ise, postoperatif 7. ve 42. gün deneklerinde, korneal kalınlık ikili gruplar arasında (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. ($p>0.05$)

Postoperatif 7. gün deneklerinde, keratosit sayısının T, R ve Q gruplarında K grubuna göre azaldığı, ikili gruplar arasında, (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırıldığında, K-R ve K-Q grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($p<0.05$), K-T ve Q-R grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı grlmştr. ($p>0.05$)

Postoperatif 42. gün deneklerinde, keratosit sayısının T, R ve Q gruplarında K grubuna göre azaldığı, ancak ikili gruplar arasında (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadığı grlmştr. ($p>0.05$)

Grup	Postop süre (gün)	Gz sayısı (N)	Ortalama keratosit sayısı (\pm SD)	Ortalama kornea kalınlığı (\pm SD) (μ M)	P1	P2
K	7	5	98.20 \pm 23.48	460 \pm 20		
T		5	70.80 \pm 17.59	430 \pm 70	0.11	0.21
R		5	64.00 \pm 10.58	490 \pm 20	0.01*	0.07
Q		5	71.20 \pm 9.83	490 \pm 50	0.03*	0.18
K	42	5	81.40 \pm 14.20	450 \pm 70		
T		5	66.40 \pm 24.99	430 \pm 60	0.34	0.65
R		5	62.80 \pm 10.25	420 \pm 40	0.07	0.33
Q		5	59.60 \pm 32.25	470 \pm 60	0.20	0.57

Tablo 1: Deney gruplarına ait histopatolojik verileri gösteren tablo. K: Kontrol grubu, T: Tween 20 buffer ve tris buffer solüsyon grubu, R: Riboflavin grubu, Q: Quercetin grubu. P1: Postop 7. ve 42. gün deneklerinde keratosit sayısının kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı, P2: Postop 7. ve 42. gün deneklerinde kornea kalınlığının kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı, $P<0.05$; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık (*)

		R grubu	Q grubu	P
Postop 7.gün	Ortalama keratosit sayısı (±SD)	64.00±10.58	71.20±9.83	0.46
	Ortalama kornea kalınlığı (±SD) (µM)	490±20	490±50	0.70
Postop 42.gün	Ortalama keratosit sayısı (±SD)	62.80±10.25	59.60±32.25	0.46
	Ortalama kornea kalınlığı (±SD) (µM)	420±40	470±60	0.23

Tablo 2: Riboflavin ve quercetin gruplarına ait histopatolojik verileri gösteren tablo. P<0.05; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık (*)

6.2. Biyomekanik test bulguları

Gruplara (K, T, R, Q) ait denek kornealarının biyomekanik testler sonucu elde edilen maksimum gerilme (σ), Elastiklik modülü (E) ve maksimum gerilme değerleri için ölçülmüş maksimum gerinim (ϵ) değerleri toplu biçimde Tablo 3'te gösterilmiştir. Değerlendirmelerde Q grubuna ait bir göz uygun korneal şerit hazırlanamaması üzerine çalışma dışı bırakılmıştır.

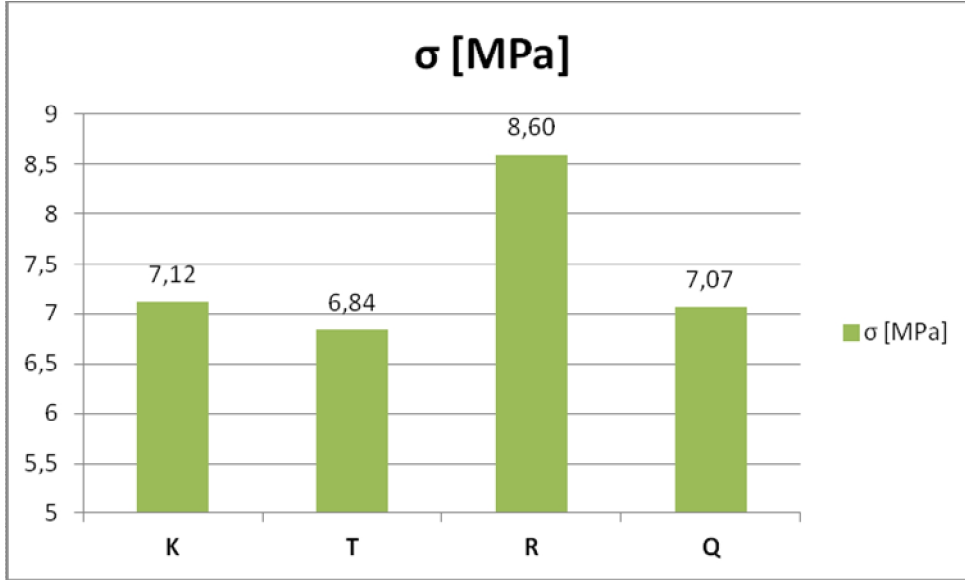
		Maksimum Gerilme (σ , MPa)			
		K	T	R	Q
Göz No	1	7.23	7.32	9.7	
	2	5.95	6.25	7.76	7.66
	3	7.92	6.42	9.2	6.27
	4	7.39	7.72	7.75	6.79
	5	7.12	6.46	8.58	7.54
Ortalama değer		7.12	6.83	8.59	7.06
Standart sapma(SD)		0.64	0.58	0.77	0.56

Maksimum Gerinim (ϵ , %)					
		K	T	R	Q
Göz No	1	0.36	0.378	0.2	
	2	0.41	0.27	0.279	0.157
	3	0.29	0.241	0.314	0.484
	4	0.28	0.37	0.14	0.24
	5	0.37	0.3	0.282	0.29
Ortalama değer		0.34	0.31	0.24	0.29
Standart sapma(SD)		0.04	0.05	0.06	0.12

Elastiklik modülü (E, MPa)					
		K	T	R	Q
Göz No	1	38.31	31.92	54.47	
	2	13.35	21.68	42.58	51.56
	3	37.98	30.88	42.04	20.32
	4	35.50	31.79	51.51	36.79
	5	29.03	34.36	39.88	36.79
Ortalama değer		30.83	30.13	46.09	36.36
Standart sapma(SD)		9.35	4.37	5.77	11.05

Tablo 3: Deneç gruplarına ait biyomekanik test verilerini gösteren tablo. K: Kontrol grubu, T: Tween 20 buffer ve tris buffer solüsyon grubu, R: Riboflavin grubu, Q: Quercetin grubu

Deneç gruplarına ait maksimum gerilme değeri Şekil 17’de kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. Bu incelemeye göre, K grubu denek kornealarında maksimum gerilme değeri ortalama $7,12 \pm 0,64$ MPa, T grubunda $6,83 \pm 0,58$ MPa, R grubunda $8,59 \pm 0,77$ MPa, Q grubunda ise $7,06 \pm 0,56$ MPa olarak tespit edilmiştir. K grubuna göre, R grubunda %21’lik bir mukavemet artışı gerçekleşmiştir. Q grubunda ise değışiklik görülmemiştir. Bu veriler ışığında ikili gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, K-R ve R-Q grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($p < 0.05$) (Tablo 4,5), ancak K-T ve K-Q grupları arasında bir fark bulunmadığı görülmüştür. ($p > 0.05$) (Tablo 4)



Şekil 17: Gruplar arası ortalama "σ_{max}" değerlerinin kıyaslaması, "σ_{max}": Maksimum gerilme, K: Kontrol grubu, T: Tween 20 buffer ve tris buffer solüsyon grubu, R: Riboflavin grubu, Q: Quercetin grubu

Grup	Göz sayısı (N)	Ortalama maksimum gerilme(±SD) (σ _{max} , MPa)	Ortalama maksimum gerinim(±SD) (ε _{max} , %)	Elastiklik modülü(±SD) (E, MPa)	P1	P2	P3
K	5	7.12±0.64	0.34±0.04	30.83±9.35			
T	5	6.83±0.58	0.31±0.05	30.13±4.37	0.60	0.53	0.46
R	5	8.59±0,77	0.24±0.06	46.09±5.77	0.02*	0.04*	0.009*
Q	4	7.06±0.56	0.29±0.12	36.36±11.05	1.00	0.38	0.32

Tablo 4: Deney gruplarına ait biyomekanik test veri ortalamalarının karşılaştırması.

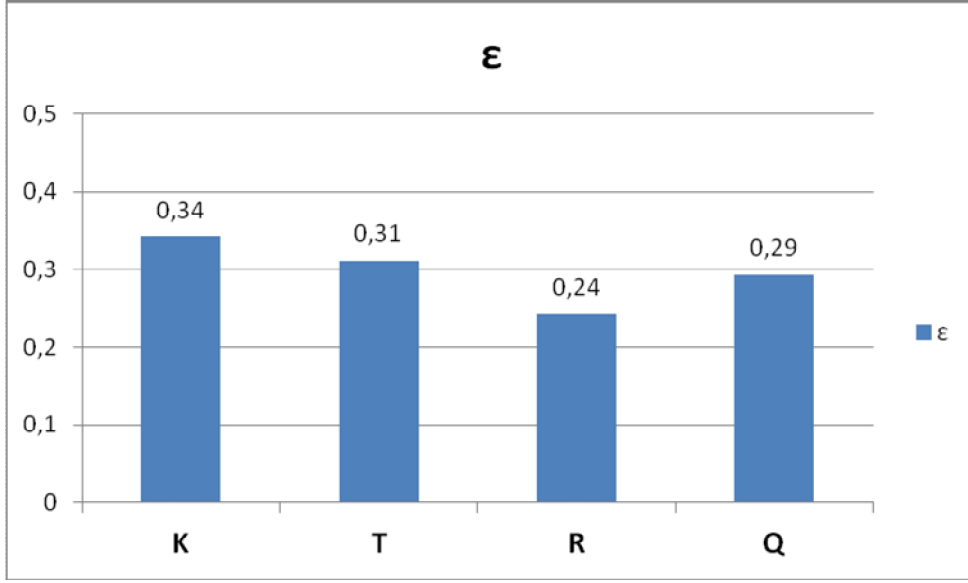
P1: Ortalama maksimum gerilme değerleri için kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farklılık, P2: Ortalama maksimum gerinim değerleri için kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farklılık, P3: Elastiklik modülü değerleri

için kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farklılık, $P < 0.05$; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık (*)

Grup	Göz sayısı(N)	Ortalama maksimum gerilme(\pm SD) (σ_{max} , MPa)	Ortalama maksimum gerinim(\pm SD) (ϵ_{max} , %)	Elastiklik modülü(\pm SD) (E, MPa)
R	5	8.59 \pm 0,77	0.24 \pm 0.06	46.09 \pm 5.77
Q	4	7.06 \pm 0.56	0.29 \pm 0.12	36.36 \pm 11.05
P		0.01*	0.62	0.14

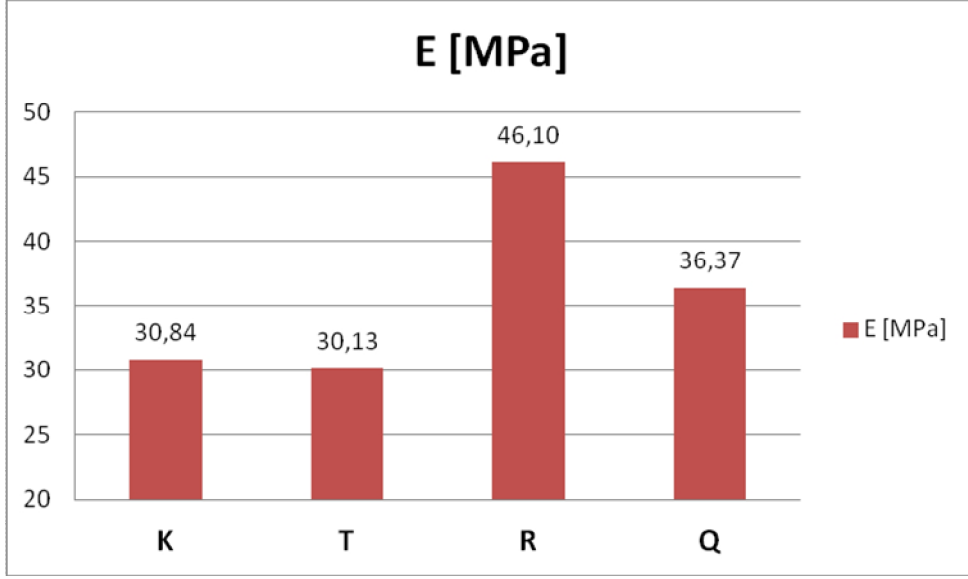
Tablo 5: Riboflavin ve quercetin gruplarına ait biyomekanik test veri ortalamalarının karşılaştırması, $P < 0.05$; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık (*)

Grupların ortalama maksimum gerilme değerlerine (σ_{max}) karşılık gelen ortalama maksimum gerinim (ϵ_{max}) değerleri, Şekil 18’de kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. Ortalama ‘ ϵ_{max} ’, K grubunda 0.34 \pm 0.04, T grubunda 0.31 \pm 0.05, R grubunda 0.24 \pm 0.06, Q grubunda ise 0.29 \pm 0.12 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, R grubunda K grubuna göre maksimum birim uzamada % 30, Q grubunda ise % 15 oranında azalma gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre, ikili gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, K-R grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($p < 0.05$) (Tablo 4), ancak K-T, K-Q ve R-Q grupları arasında bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. ($p > 0.05$) (Tablo 4,5)



Şekil 18: Gruplar arası ortalama " ϵ_{max} " değerlerinin kıyaslaması, " ϵ_{max} ": Maksimum gerinim, K: Kontrol grubu, T: Tween 20 buffer ve tris buffer solüsyon grubu, R: Riboflavin grubu, Q: Quercetin grubu

Grupların, " σ - ϵ " eğrilerinden elde edilen Elastiklik modülü (E) değerleri Şekil 19'da kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. "E" değeri, K grubunda 30.83 ± 9.35 MPa, T grubunda 30.13 ± 4.37 MPa, R grubunda 46.09 ± 5.77 MPa, Q grubunda ise 36.36 ± 11.05 MPa olarak bulunmuştur. Dolayısıyla Elastiklik modülünün, R grubunda K grubuna göre % 50, Q grubunda ise % 18 oranında arttığı görülmüştür. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise, K-R grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($p < 0.05$) (Tablo 4), K-T, K-Q ve R-Q grupları arasında bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. ($p > 0.05$) (Tablo 4,5)



Şekil 19: Gruplar arası Elastiklik modülü (E) değerlerinin kıyaslaması, K: Kontrol grubu, T: Tween 20 buffer ve Tris buffer solüsyon grubu, R: Riboflavin grubu, Q: Quercetin grubu

6.3. Klinik bulgular

Tüm deneklerin CXL tedavisi öncesi ve sakrifikasyon öncesi ultrasonik pakimetre ile ölçülen kornea kalınlıkları ve TonoPen XL aplanasyon tonometresi (Mentor, Norwell, MA, USA) ile ölçülen göz içi basınçları, ikili gruplar arasında (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. ($p>0.05$) Ayrıca gruplar kendi içerisinde preoperatif ve postoperatif karşılaştırıldığında da istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmedi. ($p>0.05$)

7. TARTIŞMA

Keratokonus, hastaların % 20'sinde penetran keratoplasti endikasyonu koyduracak seviyede ilerleme göstermektedir.⁴ Bu hastalıkta transplantasyon cerrahisi ihtiyacını azaltacak herhangi bir uygulama, özellikle 3. dünya ülkeleri gibi sağlık harcamaları kısıtlı ülkeler açısından büyük önem taşımaktadır. CXL tedavisi, hastalığa bağlı morbiditeyi azaltan başarılı bir tedavi yöntemi olmasının yanı sıra, tedavi maliyetlerinin düşük olması ile de ön plana çıkmaktadır. Ancak uzun dönem tedavi etkinliği ve güvenlik üzerine bilimsel verilerin yetersizliği, tedavinin kaygı verici yönleridir.

CXL tedavi korneada erken yaşlanmaya neden olmakta, yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Yaşlanma ile birlikte kollajen lifler arasında çapraz bağlanmalar meydana gelmektedir.^{63,64} Bazı vakalarda geç dönemde gelişebilecek diyabet nedeniyle non enzimatik glikasyon da olaya dahil olacak ve tedavi etkisi daha da artacaktır.⁶⁵⁻⁶⁸ Yeterli takip süresi, stabil etki süresi gibi sorulara cevap verecek kadar uzun takip süreli çalışma henüz bulunmamaktadır. Tasarım ve yöntem kaygıları hala devam etmektedir.

Korneal kollajen CXL araştırmalarının başından beri tedavi güvenliği çalışmalarının ilgi odağı olmuştur. Çünkü bu uygulama, izole kollajen yapılar üzerindeki bir doku mühendisliği uygulaması değildir. Bu nedenle, korneada yeterli biyomekanik etkiye ulaşılacak, endotel, lens ve retinal hasardan kaçınacak şekilde tedavi parametreleri optimize edilmiştir. İnsanlarda ilk CXL tedavi çalışması⁹ öncesinde, riboflavin konsantrasyonu, UVA ışık yoğunluk ve süresi, gerekli kornea kalınlığı düzeyi de dahil tüm CXL tedavi parametreleri, hem tedavi etkinliğini, hem de oküler yapılarda gelişebilecek hasarı değerlendirmek amacıyla zaman ve doz bağımlı hayvan deneyleri ile belirlenmiştir. Sonuçta, kornea endoteli ve derin oküler yapıların (iris, lens, retina) korunması zorunludur.^{9,88,143,144}

CXL tedavisinde, riboflavin ve UVA etkileşime girer ve korneal stromada ROS oluşumuna neden olurlar. ROS, intrahelikal, interhelikal ve intermikrofibriller seviyede kollajen zincirlerinin aminoasitleri arasında oksidatif desaminasyon ve hidrojen bağ formasyonu oluşturur.⁷⁰ Dolayısıyla CXL tedavisi için solid bir kaynaktan gelen UVA

ve ışığa duyarlılaştırıcı riboflavin gibi bir ajanın kombine etkisi ile korneada, stromal kollajen liflerde fotopolimerizasyon oluşmalıdır.

Bir flavonoid olan quercetin'in 1985 yılında Takahama ve ark.¹³¹ tarafından fotooksidatif özelliği ve oksidasyonun O_2^- (süperoksit anyonu) bağımlı mekanizması yayınlanmıştır. 2010 yılında Montana ve ark.¹³⁸, 2013 yılında Li ve ark.¹³⁹ tarafından fotosensitizatör etkisi gösterilmiştir. 2009 yılında Fahlman ve ark.¹³² ise quercetin'in, UVA ve UVB'nin indüklediği oksidasyon ürünlerini göstermişlerdir. Ayrıca 2010 yılında Zhai ve ark., domuz kalp kapak ekstraselüler matriksi üzerinde, quercetin'in kimyasal CXL etkilerini değerlendirdikleri çalışmayı yayınlamışlardır.¹³⁷ CXL sonrası mekanik özellikler, stabilite ve kalsifikasyon değerlendirilmiş, sonuçlar glüteraldehit ile kıyaslanmıştır. Quercetin ile CXL sonrası ekstraselüler matriksin mukavemetinin daha yüksek olduğu, termal denatürasyon sıcaklığının belirgin olarak arttığı, enzimatik degradasyona karşı direncinin arttığı, quercetin'in glüteraldehitten daha etkin ve daha güvenilir bir kimyasal CXL ajanı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile quercetin'in biyoprostetik kalp kapak ksenofragtları için yeni bir çapraz bağlayıcı reaktif olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak kimyasal CXL yaptığı gösterilmiş olan quercetin'in UV aracılı CXL yapacağını da düşündük.

Kullanılan CXL ajanının fotooksidatif ve fotosensitif özellikte olmasının yanı sıra UV'yi maksimum oranda absorbe etmesi gerekir. Çünkü kornea stromasına etki ederken kornea endotel hücrelerinin, lensin ve retinanın UV'nin zararlı etkilerinden korunması gereklidir. Riboflavin'in 370 nm'deki UV absorbansı % 90 civarındadır.⁹⁴ Quercetin'in UV absorbansı da 370 nm'de maksimum düzeydedir.¹³⁰⁻¹³² Ayrıca quercetin'in maksimum eksitasyon değeri 380 ve 440 nm dalga boylarındadır¹²⁹, bu da riboflavin'in flöresans spektrumu ile oldukça benzerdir.

CXL tedavisinde ışığa duyarlılaştırıcı ajanın kornea stromasına difüzyonu gereklidir. İntakt epitelyum riboflavin'in absorpsiyonunu yavaşlatan bir bariyerdir ve intakt epitelyum varlığında riboflavin'in penetrasyonu tam olmaz. Tavşan modellerinde epiteli korumanın CXL etkisini 5 kat azalttığı bildirilmiştir.¹⁴⁰ Bu nedenle CXL tedavisinde epitelyum debride edilir. Yüksek molekül ağırlıklı maddelerin kornea stromasından geçişi sınırlıdır. 376,37 g/mol molekül ağırlıklı riboflavin'in kornea stromasına geçişi bilinmektedir. Bu nedenle 302,24 g/mol molekül ağırlıklı quercetin bu yönden

avantajlıdır. Çalışmamızda, hardal sarısı renkte katı toz olan quercetin %10'luk Tween 20 buffer ve %5'lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde çözünmüştür. Tween 20'nin ilaçların korneadan geçişini arttırdığı bilinmektedir.¹⁴¹ Ayrıca Haynes ve ark.'nın 1989 yılında yaptıkları çalışmada¹²⁷, aynı zamanda bir lipooksijenaz inhibitörü olan quercetin, kornea yüzeyine topikal uygulanması sonucu, korneal neovaskülarizasyon üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Quercetin %10'luk Tween 20 buffer ve %5'lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisinde çözülmüş ve solüsyonun korneada etkili olduğu ve korneal neovaskülarizasyonu geriletmediği gösterilmiştir. Yine Kernacki ve Berk'in 1994 yılında yaptıkları çalışmada¹⁴⁵, bir antiinflamatuvar ajan olan quercetin etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da topikal quercetin solüsyonu, Tween 20 buffer ve tris buffer solüsyonu ile hazırlanmış ve korneada prednizolon ile benzer etki gösterdiği gösterilmiştir. Her iki çalışmada da topikal quercetin tedavisi ile korneal bütünlük ve saydamlık korunmuştur. Tavşan korneasında quercetin/UVA ile CXL tedavisi uyguladığımız çalışmamızda da deneklere ait korneal kesit incelemelerinde inflamasyon bulgusuna ve korneal ödeme rastlanmadı, kornea epitel ve endotel bütünlüğü intakt olarak değerlendirildi.

UV ışınları canlı dokular için toksiktir. UV'nin tetiklediği keratosit hasarı ve bu hasarın UV dalga boyu ve dozuna bağlı olduğu çalışmalarda bildirilmiştir.^{46,48} UV-C (100-290 nm) korneal yüzey tarafından tamamen absorbe edilirken, UV-B (290-315 nm)'nin % 80'i kornea epiteli tarafından absorbe edilmekte (fotokeratit ile ilişkilidir), UV-A (315-400 nm)'nin ise % 25-34'ü stroma tarafından absorbe edilmektedir.³⁶ Bu yüzden tavşan kornealarının, UV-A'ya maruz bırakılmalarını takiben masif keratosit hasarı özellikle ön stromada gözlenir.^{40,41} Sitotoksik etki, UVA'nın oksidan etkisinden kaynaklanır ve riboflavin, UVA'nın korneal stromada absorpsiyonunu artırarak (yaklaşık % 30'dan¹⁴⁶ % 95'e¹) bu etkiyi güçlendirmektedir.

UVA'nın indüklediği hücre hasarı, ROS üretimi nedeniyle meydana gelir. ROS, biyotoksiktir ancak aynı zamanda kollajen fibriller arasında çapraz köprüleri oluşturarak CXL tedavisinin esasını teşkil ederler.⁷⁰ İnsan, domuz ve tavşan çalışmalarıyla ispatlanmış olan riboflavinin koruyucu etkisi, standart tedavi parametreleri uygulandığında, stroma arkasındaki tüm yapıların (endotel, lens, retina) 1 joul/cm²'lik hasar eşik değerinin altında ışına maruz kaldıkları anlamına gelmektedir.⁷³ Sonuç olarak, CXL tedavide kullanılan riboflavin, UVA'nın korneal stromada absorpsiyonunu

arttırarak stroma gerisindeki göz içi yapıları (endotel, iris, lens, retina) korurken, stromada hücrel hasarın artmasına neden olmaktadır.

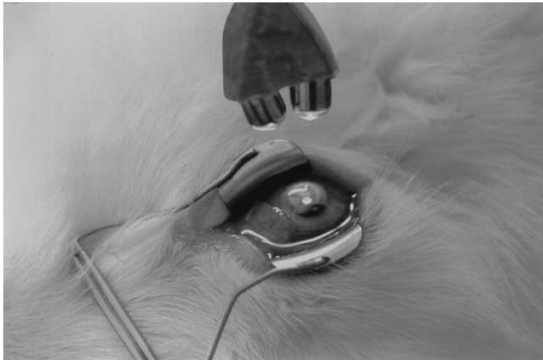
Yapılan in vivo tavşan çalışmalarında, riboflavin/UVA uygulaması ile keratositler için sitotoksik UVA eşik düzeyinin 0.5-0.7 mW/cm², endotel hücreleri için ise 0.35 mW/cm² olduğu gösterilmiştir.^{1,147} Bu durumda, relatif olarak ince olan tavşan korneasında (~300 µm) 3mW/cm²'lik yüzeysel ışın dozunda (standart tedavi dozu⁹), keratosit ve endotel hücreleri için sitotoksik eşik doza ulaşılır, masif keratosit ve endotel hücre hasarı meydana gelir.^{1,144} Aynı doz (3 mW/cm²) keratokonus hastalarının tedavisinde kullanılır, ancak endotel hücre hasarına yol açmaz. Çünkü, insan korneası daha kalındır (≥400 µm).^{42,44} Tavşanlarda retinal hasar için UVA doz eşiği ise 4.3 mW/cm² dir.⁴⁵⁻⁴⁷ Bu eşik değere standart tedavi dozuyla ulaşamaz.

Tavşanlar üzerinde quercetin/UVA ile CXL tedavisi uyguladığımız ve tedavinin güvenliğini karşılaştırmalı histopatolojik örneklerle göstermek istediğimiz çalışmamızda, H&E ile boyanmış korneal kesitler niteliksel olarak değerlendirildiğinde, postoperatif 7. ve 42. gün deneklerinde, tüm gruplarda tüm stroma katlarında keratositlerin normal dağılım gösterdiğini saptadık. Niceliksel değerlendirmede, postoperatif 7. gün deneklerinde, keratosit sayısının T, R ve Q gruplarında K grubuna göre azaldığını, gruplar arasında, (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırıldığında, K-R ve K-Q grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğunu, K-T ve Q-R grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığını gördük. Postoperatif 42. gün deneklerinde ise, keratosit sayısının T, R ve Q gruplarında K grubuna göre azaldığını ancak ikili gruplar arasında (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farklılık olmadığını gördük. Ayrıca postoperatif 7. ve 42. gün deneklerinde, korneal kalınlığı ikili gruplar arasında (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırdığımızda, istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit etmedik.

Wollensak ve ark.'nın tavşan kornealarında riboflavin/UVA uygulama sonrası yara iyileşmesini değerlendirdikleri benzer bir çalışmada, postoperatif 3. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış korneal kesitlerde, epitel hasarının iyileştiği, tam kat keratosit ve endotel hücre apoptozu ile birlikte ciddi bir korneal ödem ve tedavi alanına komşu stromada orta düzeyli bir inflamatuvar reaksiyon olduğu görülmüş. Postoperatif 7. gün kesitlerinde, epitel ve endotel tabakalarının intakt olduğu, korneal ödemin azaldığı ve

arka stromadan başlayan bir keratosit repopulasyonu olduğu izlenmiş. Postoperatif 28. gün örneklerinde, aynı bulgulara ilave olarak ön stromaya varan keratosit repopulasyonu görülmüş. Postoperatif 42. gün deneklerinde ise, stromadaki keratosit dağılım paterninin tamamen normale döndüğü gözlenmiş.¹⁴⁸ Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak, erken dönemde apoptozis endotelde dahil olmak üzere tüm kornea katlarında gerçekleşmiş, ciddi korneal ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmüştür.

Literatürde, tavşanlarda riboflavin/UVA uygulaması (standart tedavi parametreleri ile) sonrası erken postoperatif dönemde, tam kat keratosit ve endotel hücre apoptozunu histopatolojik olarak gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır.^{1,140,144} Bu çalışmalarda, Wollensak ve ark.'nın çalışmasına¹⁴⁸ benzer sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmalar gereç ve yöntem açısından çalışmamızla karşılaştırıldığında, standart tedavi parametreleri dışında kullanılan UVA ışık kaynağının ve uygulama mesafesinin farklı olduğu görülmektedir. 2 diodlu LED (Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria) ışık kaynağı, kornea yüzeyine ortalama 1-1.5 cm mesafede kullanılmıştır. 2 diodlu LED (Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria) 2 ışık hüzmesi kullanan orjinal bir sistemdir. (Şekil 21) Bu sistemin, kornea üzerinde istenmeyen sıcak noktalar oluşturarak endotel hasarına neden olabileceği bildirilmiştir.¹⁴⁹

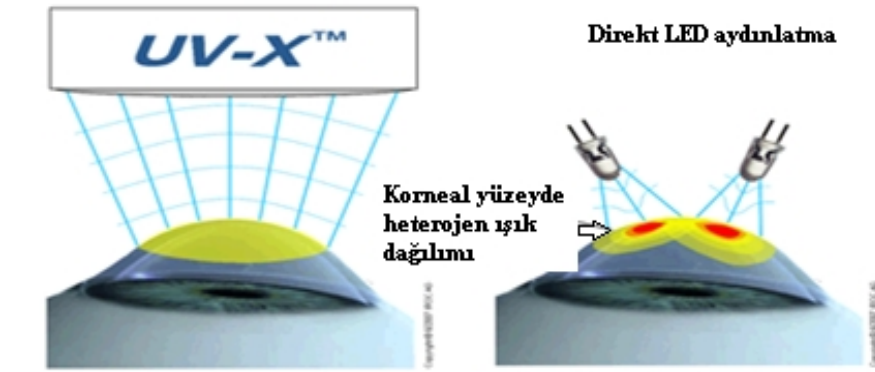


Şekil 20: 2 diodlu LED (Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria) ışık kaynağı¹

CXL tedavi ile ilgili tüm güvenlik konuları, UVA uygulama alanında homojen bir UV ışınımı oluşturma esasına dayanmaktadır. Ancak sıcak noktalar gibi optik heterojeniteler, ışınım 3 mW/cm^2 'nin altında bile olsa, lokalize endotel hasarına yol açabilirler. Bu nedenle, klinik olarak kullanılan ışık kaynakları, ışınlanan alan boyunca mükemmel homojeniteyi garanti etmelidirler.¹⁵⁰ UVA aydınlatma sistemi, pik ışınım dalga boyu 365 nm olan UV LED'leri temeline dayanır. Bir ışın yolu, Koehler'e¹⁵¹

göre, kornea üzerinde homojen bir ışınım sağlamak için, mikro düzeyde homojenize özel bir ışın¹⁵² kornea üzerine değişken bir diafram ile odaklanmalıdır. Koehler'e göre dizayn edilmiş UV ışık diaframı, ışığı kornea ön yüzeyine düşürür, bunun sonucunda UV ışık kornea ön yüzeyinde güçlü bir şekilde odaklanır ve kornea arkasındaki göz içi yapılara seyreltilerek ulaşır. Böylece göz içi yapıların maruz kaldığı ışınım sürekli en düşük seviyede kalır. Homojenize UVA ışık kaynağı kullanılarak yapılan tedavilerde, gerçek göz içi ışınım miktarını değerlendirmek üzere domuz gözlerinde retinal planda maruz kalınan ışın düzeyi ölçülmüştür.¹⁵³

“UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)”, bu optik sistemi kullanarak (Koehler optics) UVA ışığı yayar. Bu optik sistem, uygulama mesafesindeki küçük değişikliklere daha az duyarlıdır. Bu yolla, aşırı dozda ışına maruziyet riski en aza indirilmiş olur. Bu sistemde, ışık yayan 7 diod uygulama alanında bir çiçek deseni oluşturur. Bu desen, kornea üzerinde homojen bir ışık dağılımı meydana getirir. (Şekil 22)



Şekil 21: UV-X Illumination System (sol) ve 2 diod LED'e (sağ) ait kornea yüzeyi ışık dağılım paternleri, resim ‘’www.irocmedical.com’’ internet sitesinden alınmıştır.

CXL tedavi sonrası erken dönemde literatür örneklerinde görülen, ancak çalışmamızda R/UVA ve Q/UVA olmak üzere iki grupta da tespit etmediğimiz tam kat keratosit ve endotel hücre kaybının, kullanılan UVA ışık kaynağı ve uygulama mesafesi ile ilişkili olabileceğini düşündük. CXL tedavinin bir yan etkisi olan hücre hasarının, her iki grupta da sınırlı kalmasını bir avantaj olarak değerlendirdik.

Wollensak ve ark.'nın çalışmasında, erken dönemde görülen ciddi korneal ödemin endotel hücre kaybına bağlı olduğu ve postoperatif 7. gün deneklerinde endotel hücre rejenerasyonu ile birlikte ödemin gerilediği bildirilmiştir.¹⁴⁸ Biz çalışmamızda hiçbir denekte endotel hücre kaybına ve korneal ödeme rastlamadık. Santral kornea kalınlığını formaldehit ile tespit edilmiş dokularda ışık mikroskobu ile ayrıca preoperatif ve postoperatif ultrasonik pakimetre ile ölçtük. Yine göz içi basıncını preoperatif ve postoperatif tonopen ile ölçtük. Korneal kalınlığı ve göz içi basıncını ikili gruplar arasında (K-T, K-R, K-Q, R-Q) karşılaştırdığımızda, ayrıca grupları kendi içinde preoperatif ve postoperatif olarak karşılaştırdığımızda istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit etmedik. ($p>0.05$)

Esquenazi ve ark.'nın tavşanlarda riboflavin/UVA uygulama sonrası, TUNEL boyama ile keratositlerdeki ultrastruktürel değişiklikleri değerlendirdikleri çalışmada, postoperatif 1. ve 3. günler arasında ön 250 μm 'lik korneal stromada keratosit apoptozunu gördüklerini, ancak arka stromada hala etkilenmemiş keratositlerin bulunduğunu ve endotel hücre hasarının gelişmediğini bildirmişlerdir.¹⁵⁴ Kullanılan UVA ışık kaynağının belirtilmediği bu çalışmada, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde postoperatif erken dönemde gelişen keratosit hasarı sınırlı kalmış ve endotel hücre kaybı gelişmemiştir. Çalışmamızda R/UVA ve Q/UVA olmak üzere iki grupta da, Wollensak ve ark.'nın¹⁴⁸ çalışmasında olduğu gibi postoperatif 42. günde tüm stroma katlarında normal keratosit dağılımı olduğunu ve sürecin tümüyle normale döndüğünü gözlemledik. Ancak bu çalışmada, keratosit repopulasyonunun postoperatif 10. haftaya kadar uzadığı bildirilmektedir. Biz örneklerde, H&E boyama ile etkilenmemiş veya çoğalan keratositleri gösterdik, ancak bu çalışmada olduğu gibi TUNEL boyama ile apoptotik hücre nükleuslarını gösterebilirdik.

Değişken derecelerde keratosit apoptozisi, epitel travması¹⁵⁵, LASIK ve PRK gibi refraktif cerrahi prosedürlerden sonrada gösterilmiştir.¹⁵⁶ Keratosit apoptozu, korneal yara iyileşme cevabının tetikçisi olarak düşünülür ve kompleks yara iyileşme kaskadını başlatmaktadır.¹⁵⁷ CXL tedavide, apoptotik hücre ölümü tipik olarak UVA hasarı sonrasında meydana gelmektedir.¹⁵⁸ Tedavi sonrası meydana gelen keratosit eksikliği, komşu stromadan keratosit göçü ve mitotik proliferasyon ile haftalar içinde tamamlanmaktadır. Keratokonusta CXL tedavi sonrası keratosit kaybı, zaten

patogenezinde keratosit apoptozunun rolü olduğu düşünölen bu hastalıkta sorun olabilir. Ancak, keratokonuslu hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, 4 yıllık takiplerde keratosit kaybına bağlı stromal skar veya korneal incelme bulgusuna rastlanmamıştır.⁹ Keratokonuslu hastalarda konfokal mikroskop ile CXL tedavi sonrası korneal iyileşme sürecinin değerlendirildiği bir çalışmada, postoperatif 2.-3. aylar arasında stromanın derin katlarından itibaren keratosit repopulasyonunun başladığı, operasyondan 6 ay sonra repopulasyonun tamamlandığı gösterilmiştir.⁹⁶

UVA'nın doğrudan etkisiyle veya serbest radikaller yoluyla hasara uğrayabilecek en kritik hücre grubu endotel hücreleridir. Bu hücreler, tavşan korneasında rejenerasyon yeteneğine sahipken, insan korneasında bu yetenekleri oldukça sınırlıdır. CXL tedavide, kornea kalınlığı ≥ 400 μm ise standart tedavi parametreleri ile sitotoksik endotelial doza ulaşılamaz.¹ Keratokonuslu hastalarda, CXL tedavi sonrası endotel hücre hasarının konfokal mikroskop^{74,96} ve endotelial speküler mikroskop¹⁵⁹ ile değerlendirildiği çalışmalarda, endotelial morfoloji ve yoğunlukla ilgili herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Çalışmamızda insan korneasına göre rölatif olarak daha ince olan tavşan kornealarında, Esquenazi ve ark.'nın¹⁵⁴ çalışma sonuçlarına benzer şekilde, tedavi sonrası hiçbir grupta endotel hücre hasarı gözlelemedik.

LASIK ve PRK sonrası α -aktin (+) hücreler (myofibroblastlar), korneal yara iyileşme sürecinde gösterilmiştir.¹⁶⁰ Myofibroblastların, yara yeri kontraksiyonu, korneal bulanıklıkta artış, artan miktarlarda disorganize kollajen üretmek gibi refraktif cerrahi etkilerini azaltıcı fonksiyonları bulunmaktadır.^{161,162} Keratokonusta, CXL tedavi sonrası hastaların % 50'sinde görölen keratometri değerindeki hafif düzelme⁹ (~ 2 D), myofibroblastik aktivite, stromal yeniden yapılanma¹⁶² ve fibröz doku artıřı¹⁶¹ ile kısmen açıklanabilmektedir. Çalışmamızda immunohistokimyasal değerlendirmede, T,R ve Q gruplarında tedavi alanına komşu stromada, belirgin bir dağılım paterni göstermeyen tek tük α -aktin (+) hücreler gördük. Literatür örneklerine bakıldığında, Wollensak ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, postoperatif 4-6. haftalar arasında özellikle CXL tedavi sahasına komşu stromada α -aktin (+) hücrelerin bulunduğu görölmüştür.¹⁴⁸ Tavşanlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise myofibroblastik aktivitenin, CXL tedavi sonrası erken dönemde başlayıp, postoperatif 5. haftaya kadar tedavi alanı altında ve tedavi alanına komşu stromada göröldüğü bildirilmektedir.¹⁵⁴ Çalışmamızda, postoperatif dönemde ortaya çıkıp bir süre sonra kaybolan bu hücreleri değerlendirmede

denek sayılarının yetersiz kaldığını düşündük. Gruplardaki denek sayıları arttırılıp, postoperatif değerlendirme aralıkları kısaltılarak daha sağlıklı sonuçlar alınabilirdi.

Tedavi etkinliğini değerlendirdiğimiz ikinci aşamada, hem ribofilavin/UVA hem de quercetin/UVA ile CXL sonrası denek kornealarında sertleşme olduğunu tespit ettik. Korneal sertliğin bir ifadesi olan Young modülü, K grubuna göre R grubunda % 50, Q grubunda ise % 18 oranında artış gösterdi. Denek kornealarına ait maksimum gerilim (mukavemet) değerleri, K grubuna göre R grubunda % 21 artış gösterdi. Q grubunda ise K grubuna göre farklılık görülmedi. Gruplara ait maksimum gerinim değerleri karşılaştırıldığında ise, K grubuna göre R grubunda % 30, Q grubunda ise % 15 oranında azalma gerçekleşti.

İstatistiksel değerlendirmede ikili gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, elastiklik modülü için K-R grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğunu, ancak K-T, K-Q ve R-Q grupları arasında bir fark bulunmadığını gördük. Maksimum gerilme değerleri için K-R ve R-Q grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğunu gördük, ancak K-T ve K-Q grupları arasında bir fark saptamadık. Ortalama maksimum gerilme değerlerine karşılık gelen ortalama maksimum gerinim değerleri için K-R grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğunu, ancak K-T, K-Q ve R-Q grupları arasında bir fark bulunmadığını gördük. Bu sonuçların denek sayılarındaki yetersizlikle ilişkili olabileceğini düşündük.

Korneanın kollajen fibriller sayesinde olağanüstü bir biyomekanik gücü olduğu, örneğin; 1 mm çaplı kollajen fibrilin 10 kg'lık yükü taşıyabileceği gösterilmiştir.¹⁶³ Keratokonuslu gözlerde ise korneal mukavemet yaklaşık % 36 oranında azalmaktadır.¹⁶⁴ CXL tedavi ile korneal stromada intra ve interfibriller yeni çapraz kovalent bağların oluşması neticesinde korneal mukavemet önemli ölçüde artmaktadır. Yapılan çalışmalarda, CXL tedavi sonrası kollajen fibril çap artışının⁹⁰, enzimatik sindirime karşı direnç artışının⁹², keratosit apoptozunun¹ ve biyomekanik sertleştirici etkinin⁸⁹ ilk 350 µm'lik, esas olarak ta ilk 242 µm'lik korneal stromada gerçekleştiği¹⁶⁵, bunun riboflavinin UVA'yı büyük oranda ön stromada absorbe etmesi nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür.⁸⁹ Normal gözler üzerinde yapılan çalışmalarda, ön stromanın doğal yapısının daha sert olduğu ve bu durumun, korneal kurvatürün korunmasında önemli bir etken olduğu bildirilmiştir.¹⁶⁶ Keratokonus hastalarında ise, CXL tedavi ile maksimum

crosslinking etkinin ön stromada ortaya çıkmasının bu anlamda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.⁸⁸

Wollensak ve ark.'nın domuz ve insan korneaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, CXL tedavi ile hem insan hem de domuz kornealarında önemli bir sertlik artışı gerçekleştiğini, korneal mukavemetin domuz kornealarında % 71.9, insan kornealarında ise % 328.9 oranında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Mukavemet artışındaki bu farkın, maksimum crosslinking etkinin olduğu 300 µm'lik ön stromanın, insan korneasında (ortalama kalınlık 550 µm) domuz korneasına göre (ortalama kalınlık 850 µm) tüm korneal kalınlığın daha büyük bölümünü oluşturması nedeniyle meydana geldiğini öne sürmüşlerdir.⁸⁸

CXL tedavinin uzun dönemde korneanın biyomekanik sertliğini artırıcı etkisi yapılan bir çalışma ile değerlendirilmiştir. Tavşan korneaları üzerinde yapılan bu çalışma sonuçlarına göre, CXL tedaviden hemen sonra kontrollere kıyasla Young modülündeki artış % 79, postoperatif 3. ayda % 78 ve postoperatif 8. ayda % 87 oranında gerçekleşmiştir.¹⁶⁷ Çalışmamızda, riboflavin grubu ile elde ettiğimiz Young modülü artış oranları bu çalışma ile yakın düzeylerde gerçekleşmiştir ancak quercetin grubu ile bu değerlere ulaşamamıştır.

Quercetin/UVA ile CXL yaptığımız çalışmamızda, etkinliği arttırmak için quercetin farklı konsantrasyonlarda ve/veya UVA farklı güç ve sürelerde uygulanabilir. Absorbsiyon spektrumundaki değişiklikler ışınlama sırasında kaydedilebilir. Quercetin'in çözücüsü olarak kullandığımız %10'luk Tween 20 buffer ve %5'lik 0,2 M tris buffer solüsyonu içerisine dekstoz eklenebilir ya da farklı çözücüler geliştirilebilir. Quercetin'in 3. C atomuna bağlı -OH grubuna bir şeker molekülü olan rutinozun konjugasyonu ile oluşan bir flavonoid olan rutin¹⁰⁷ ile CXL denenebilir.

Bir flavonoid olan quercetin'in her ne kadar prooksidan özelliklerden söz edilse de belki de antioksidan özellikleri daha ağırlıklı olarak rol oynamaktadır. Dolayısıyla quercetin'in radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel keratokonus gibi pek çok hastalıktan korunmada etkin rol oynayabileceği düşünülebilir.

Keratokonuslu kornealarda oluşan oksidatif hasarın nedeni olarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açan bir mekanizma ileri sürülmektedir.²⁴ Lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit (NO) yolu ile ortaya çıkan sitotoksik ürünlerin, keratokonuslu kornealarda biriktiğini gösteren deliller vardır.^{34,35} Quercetin gibi flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit (O_2^-), lipid alkoksil (RO^-) ve peroksil (ROO^-), nitrik oksit (NO) radikal temizleme fonksiyonları vardır.^{106,108-111} Ayrıca fenolik antioksidanlar, lipid radikallere, hızla H^+ vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksi (ROO^-) ve alkoksil (RO^-) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır.¹²²

Kornea, UV-B ışığının yaklaşık %80'inin emiliminden sorumludur.³⁶ Ultraviyole ışık, serbest radikalleri ve ROS'u oluşturur. Tipik olarak serbest radikaller ve ROS, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon reduktaz gibi antioksidan enzimler ile biokimyasal etkileşime girerek ortamdaki uzaklaştırılırlar. Alternatif olarak kalan serbest radikaller, lipid peroksidaz ile aldehit formuna geçebilirler ki bunların bir kısmı degradatif ve toksiktir. Normal olarak kornea kendisini, Aldehit Dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile bu aldehitlerden korur. Göz içindeki ALDH'nın yaklaşık %78'i korneada bulunur ve ALDH Tip 3 kornea içindeki esas enzimdir. Gondhowiadjo ve ark. keratokonuslu kornealarda, normale göre ALDH Tip 3'ün azaldığını ve buna ikincil olarak destrüktif aldehid seviyesinin artabileceğini ileri sürmüşlerdir.³⁷

Süperoksit dismutaz, serbest radikaller ve ROS'un uzaklaştırılmasından sorumlu bir antioksidandır.³⁵ Keratokonusta, süperoksit dismutaz düzeyinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar vardır.³⁸ Keratokonuslu kornealarda, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan sitotoksik bir aldehid olan malondialdehid (MDA) ve NO yoluyla oluşan sitotoksik özellikteki nitrotirozin (NT) birikimi gösterilmiştir.^{34,39} Peroksinitritler, dokuda destrüktif olabilirler. Nitrotirozine spesifik antikorlar, doku içinde peroksinitritlerde lokalize olabilirler. Laboratuvar deneylerinde, keratokonuslu kornealarda nitroze spesifik antikorlarla epitel bazal membranında normal korneaya göre belirgin olarak artmış boyanma gözlenmiştir. Bu bulgu, keratokonuslu korneada ilave destrüktif yapı olarak düşünülen peroksinitritin varlığını kuvvetlendirmektedir.³⁹ Quercetininin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği^{133,134}, UVA'nın neden olduğu süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerindeki düşmeyi parsiyel olarak önlediği,

sitotoksik bir aldehid olan malondialdehid (MDA) seviyesini belirgin olarak azalttığı^{132,135,136} gösterilmiştir.

Bu bulgulardan yola çıkarak quercetin'in keratokonus hastalarında, progresyonu durdurmak amaçlı CXL tedavisine ek olarak topikal formda kullanımının muhtemel koruyucu etkisi ileri çalışmalarda araştırılabilir. Gelecekte biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılması ile quercetin'in kullanım alanlarının genişletilmesi sağlanabilir.



8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Quercetin ile CXL tedavisinin, korneal ödeme, inflamasyona, epitel ve endotel toksisitesine neden olmaması, standart CXL tedavi ile istatistiksel olarak farklı olmayan histopatolojik değişiklikler göstermesi, postoperatif dönemde göz içi basıncında farklılığa neden olmaması, quercetin flöresans spektrumunun riboflavin ile oldukça benzer olması ve UV absorbanasının 370 nm’de maksimum düzeyde olması dolayısıyla kornea endotel hücrelerini, lensi ve retinayı UV’nin zararlı etkilerinden koruması, quercetin keratokonus tedavisinde güvenle kullanılabilceğini göstermektedir. TUNEL boyama ile apoptotik hücre nükleuslarının gösterilmesi ileride yapılacak çalışmalar ile değerlendirilebilir.

CXL tedavi sonrası biyomekanik testlerde, riboflavin grubunda kontrole göre % 30, quercetin grubunda ise % 15 oranında gerçekleşen gerinim azalması, dokuların esneme kabiliyetlerinde de aynı oranlarda azalmayı ifade etmektedir. Bu durum, CXL tedavi ile kollajen fibriller arasında yeni oluşan kovalent bağların uzamayı kısıtlayıcı bir etken olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre, korneal ektazi ile seyirli hastalıklarda patolojik sürecin durdurulabileceğini her iki grup için de söyleyebiliriz. Riboflavin grubunda % 50, quercetin grubunda ise % 18 oranında gerçekleşen, iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmayan korneal sertlik artışı, literatürde tanımlanan CXL tedavi sonrası “korneal donma” etkisini açıklamaktadır. CXL tedavisi sonrası korneadaki biyomekanik değişimlerin in vivo şartlarda değerlendirilmesi amacıyla, klinik çalışmaları yapılmamış olan Holographic interferometry, Electronic Speckle Pattern İnterferometry ve Dynamic Corneal İmaging yöntemleri klinik çalışmalarla hayata geçirilebilir.

Lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, UVA’nın neden olduğu süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerindeki düşmeyi parsiyel olarak önlediği, sitotoksik bir aldehid olan malondialdehid (MDA) seviyesini belirgin olarak azalttığı gösterilen quercetin çalışmamızda her ne kadar prooksidan özellikleri üzerinde durulduysa da belki de antioksidan özellikleri daha ağırlıklı olarak rol oynamaktadır. Dolayısıyla quercetin radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel keratokonus gibi pek çok hastalıktan korunmada etkin rol oynayabileceği düşünülebilir. Bu bulgulardan yola çıkarak

quercetin'in keratokonus hastalarında, progresyonu durdurmak amaçlı CXL tedavisine ek olarak topikal formda kullanımının muhtemel koruyucu etkisi ileri çalışmalarda araştırılabilir. Gelecekte biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılması ile quercetin'in kullanım alanlarının genişletilmesi sağlanabilir.



9. ÖZET

CROSS-LİNKİNG TEDAVİSİNDE, RİBOFLAVİNE ALTERNATİF OLABİLECEK QUERCETİNİN TAVŞAN KORNEASINDA ETKİNLİĞİNİN VE GÜVENİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç ve Kapsam: Cross-linking (CXL) tedavisinde, riboflavine alternatif olabilecek fotooksidatif ve fotosensitif ajan olan quercetin'in tavşan korneasında etkinliğinin ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi.

Gereç ve Yöntem: 60 adet Avustralya-Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanılarak, birinci aşamada 30 göze UVA ile standart CXL tedavisi uygulandı. 10 gözde % 0,1 riboflavin, 10 gözde % 1 quercetin, 10 gözde quercetin'in çözücüsü olan % 10'luk tween 20 buffer-%5'lik 0,2 M tris buffer solüsyonu kullanıldı. Kontrol grubunu oluşturan 10 göze ise sadece epitelyal debridman yapıldı. Uygulamayı takiben 7. ve 42. günlerde enükleasyon sonrası denek kornealarından histopatolojik kesitler hazırlanarak, ışık mikroskobu altında keratosit apoptozu, korneal ödem, korneal kalınlık, myofibroblastik aktivite ve inflamasyon değerlendirildi. Tüm deneklerin tedavi öncesi ve enükleasyon öncesi kornea kalınlığı ve göz içi basıncı ölçüldü. İkinci aşamada 15 göze CXL tedavisi uygulandı. 5 gözde % 0,1 riboflavin, 5 gözde % 1 quercetin, 5 gözde % 10'luk tween 20 buffer-%5'lik 0,2M tris buffer solüsyonu kullanıldı. Kontrol grubunu oluşturan 5 göze ise sadece epitelyal debridman yapıldı. Denek kornealarından hazırlanan korneal şeritler, bilgisayar destekli biyomateryal test cihazı ile biyomekanik testlere tabi tutuldu.

Bulgular: Histopatolojik değerlendirmede, riboflavin ve quercetin grubunda CXL tedavi sonrası 7.günde hafif düzeyde keratosit kaybı görüldü. İnflamasyon bulgusu ve endotel hücre hasarı görülmedi. 42. günde tüm denek kornealarının keratosit repopulasyonu ile normale döndüğü gözlemlendi. Gruplar arasında histopatolojik değerlendirme parametreleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı. ($p>0.05$) Biyomekanik değerlendirmede, Young modülü kontrollere göre, R grubunda % 50, Q grubunda % 18 oranında artış gösterdi. Q grubundaki artış, R grubu düzeyinde olmasa

da her iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.05$) Ayrıca R grubunda kontrole göre % 30, quercetin grubunda ise % 15 oranında gerinim azalması gerçekleşti. Yine her iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.05$)

Sonuç: Quercetin ile CXL tedavisi güvenilir olmakla birlikte, etkisi yetersizdir. Etkisini arttırabilmek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: keratokonus, cross-linking, riboflavin, quercetin, elastiklik modülü



10. ABSTRACT

EVALUATION OF EFFICIENCY AND RELIABILITY OF QUERCETIN AS AN ALTERNATIVE OF RIBOFLAVIN IN CROSS-LINKING TREATMENT ON RABBIT CORNEA

Purpose: The evaluation of the efficiency and reliability of quercetin that is a photooxidative and photosensitive agent as an alternative of riboflavin in Cross-linking (CXL) treatment on rabbit cornea.

Materials and Methods: 60 Australia-New Zealand race of rabbits were been used in the research. In the first stage, standard CXL treatment applied with UVA to 30 eyes. %0,1 riboflavin was applied to 10 eyes. %1 quercetin was applied to 10 eyes. %10 tween 20 buffer- %5 0,2 M tris buffer solution that is the solvent of quercetin was applied to 10 eyes. Only epithelial debridement is applied to 10 eyes as the control group. In the 7. and 42. days following the administration of CXL, keratocyte apoptosis, corneal edema, corneal thickness, myofibroblastic activity and inflammation were evaluated under light microscope by preparing corneal histopathological sections. Before treatment and enucleation corneal thickness and intraocular pressure of all the subjects has been measured. On the second stage CXL treatment is applied to 15 eyes. %0,1 riboflavin is applied to 5 eyes. %1 quercetin is applied to 5 eyes. %10 tween 20 buffer-%5 0,2 M tris buffer solution is applied to 5 eyes. Only epithelial debridement is applied to 5 eyes that is the control group. Corneal strips prepared from the corneas of rabbits were tested by biomechanic tests using computer-controlled biomaterial testing device.

Results: Mild grade keratocyte loss was seen in histopathological evaluation early after 7. day of CXL treatment with both riboflavin and quercetin groups of devices. Inflammation symptom and endothelial cell damage were not observed. In the 42. day, corneas of all subjects returned to normal with keratocyte repopulation. No statistically significant difference was found between the groups according to histopathological

evaluation parameters. ($p>0.05$) Young's modulus showed 50% increase in R group and 18% increase in Q group compared to the controls in biomechanical evaluation. No statistically significant difference was found between the groups. ($p>0.05$) Also 30% decrease of strain in R group and 15% decrease of strain in quercetin group was occurred compared to the control groups. However, no statistically significant difference was found between the groups. ($p>0.05$)

Conclusion: Although CXL treatment by using quercetin is reliable, the effect of it is insufficient. Additional studies are needed to enhance the efficiency.

Keywords: keratoconus, cross-linking, riboflavin, quercetin, young modulus



11. KAYNAKLAR

1. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg.* Sep 2003;29(9):1786-1790.
2. Tan DT, Por YM. Current treatment options for corneal ectasia. *Curr Opin Ophthalmol.* Jul 2007;18(4):284-289.
3. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* Jan-Feb 1998;42(4):297-319.
4. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology.* Mar 1994;101(3):439-447.
5. Arentsen JJ, Laibson PR. Thermokeratoplasty for keratoconus. *Am J Ophthalmol.* Sep 1976;82(3):447-449.
6. Rabinowitz YS, Li X, Ignacio TS, Maguen E. INTACS inserts using the femtosecond laser compared to the mechanical spreader in the treatment of keratoconus. *J Refract Surg.* Oct 2006;22(8):764-771.
7. Vajpayee RB, Sharma N. Epikeratoplasty for keratoconus using manually dissected fresh lenticules: 4-year follow-up. *J Refract Surg.* Nov-Dec 1997;13(7):659-662.
8. Amayem AF, Anwar M. Fluid lamellar keratoplasty in keratoconus. *Ophthalmology.* Jan 2000;107(1):76-79; discussion 80.
9. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* May 2003;135(5):620-627.
10. 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.* Dec 2007;33(12):2035-2040.
11. Vinciguerra P, Camesasca FI, Albe E, Trazza S. Corneal collagen cross-linking for ectasia after excimer laser refractive surgery: 1-year results. *J Refract Surg.* Jul 2010;26(7):486-497.
12. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea.* Jun 2008;27(5):590-594.
13. Spadea L. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in pellucid marginal degeneration. *J Refract Surg.* May 2010;26(5):375-377.
14. 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.* Sep 2009;25(9):S803-806.
15. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):114-117.
16. Krueger RR, Ramos-Esteban JC, Kanellopoulos AJ. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *J Refract Surg.* Sep 2008;24(7):S730-736.
17. Duke-Elder S. LA. Diseases of the outer eye. *System of ophthalmology.* 1965;8:964-997.

18. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. Mar 15 1986;101(3):267-273.
19. Austin MG, Schaefer RF. Marfan's syndrome, with unusual blood vessel manifestations. *AMA Arch Pathol*. Aug 1957;64(2):205-209.
20. Kuming BS, Joffe L. Ehlers-Danlos syndrome associated with keratoconus. A case report. *S Afr Med J*. Aug 27 1977;52(10):403-405.
21. Elder MJ. Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. Jan-Feb 1994;31(1):38-40.
22. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec 1998;39(13):2537-2546.
23. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol*. Aug 2000;84(8):834-836.
24. Cristina Kenney M, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye*. Sep 2003;26(3):139-146.
25. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet*. Aug 28 2000;93(5):403-409.
26. Edwards M, McGhee CN, Dean S. The genetics of keratoconus. *Clin Experiment Ophthalmol*. Dec 2001;29(6):345-351.
27. Kim WJ, Shah S, Wilson SE. Differences in keratocyte apoptosis following transepithelial and laser-scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg*. Sep-Oct 1998;14(5):526-533.
28. Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea*. May 2000;19(3 Suppl):S7-12.
29. Sawaguchi S, Yue BY, Sugar J, Gilboy JE. Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol*. Oct 1989;107(10):1507-1510.
30. Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jun 1998;39(7):1117-1124.
31. Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, Wilson PM, Sugar J, Chan SK. Alpha-1 proteinase inhibitor levels in keratoconus. *Exp Eye Res*. May 1990;50(5):549-554.
32. Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, et al. Alpha 2-macroglobulin levels in normal human and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov 1994;35(12):4008-4014.
33. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 2005;46(3):823-832.
34. Kenney MC, Brown DJ, Rajeev B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *CLAO J*. Jan 2000;26(1):10-13.
35. Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 1998;39(3):471-475.
36. Tsubai T, Matsuo M. Ultraviolet light-induced changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of porcine corneas. *Cornea*. Jul 2002;21(5):495-500.

37. Gondhowiardjo TD, van Haeringen NJ, Volker-Dieben HJ, et al. Analysis of corneal aldehyde dehydrogenase patterns in pathologic corneas. *Cornea*. Mar 1993;12(2):146-154.
38. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brannstrom T, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Sep 2001;42(10):2293-2296.
39. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem*. Mar 2002;50(3):341-351.
40. Scroggs MW, Proia AD. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea*. Nov 1992;11(6):553-559.
41. Somodi S, Hahnel C, Slowik C, Richter A, Weiss DG, Guthoff R. Confocal in vivo microscopy and confocal laser-scanning fluorescence microscopy in keratoconus. *Ger J Ophthalmol*. Nov 1996;5(6):518-525.
42. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res*. Nov 1999;69(5):475-481.
43. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: I. *Am J Ophthalmol*. Jan 1963;55:18-47.
44. Tuori AJ, Virtanen I, Aine E, Kalluri R, Miner JH, Uusitalo HM. The immunohistochemical composition of corneal basement membrane in keratoconus. *Curr Eye Res*. Aug 1997;16(8):792-801.
45. Cheng EL, Maruyama I, SundarRaj N, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of type XII collagen and hemidesmosome-associated proteins in keratoconus corneas. *Curr Eye Res*. May 2001;22(5):333-340.
46. Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res*. Oct 2003;77(4):515-524.
47. Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Kaiya T, Sugar J, Yue BY. Three-dimensional scanning electron microscopic study of keratoconus corneas. *Arch Ophthalmol*. Jan 1998;116(1):62-68.
48. Takahashi A, Nakayasu K, Okisaka S, Kanai A. [Quantitative analysis of collagen fiber in keratoconus]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. Nov 1990;94(11):1068-1073.
49. Critchfield JW, Calandra AJ, Nesburn AB, Kenney MC. Keratoconus: I. Biochemical studies. *Exp Eye Res*. Jun 1988;46(6):953-963.
50. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). *Am J Ophthalmol*. Nov 2002;134(5):689-695.
51. Sherwin T, Brookes NH. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol*. Apr 2004;32(2):211-217.
52. McMahon TT, Szczotka-Flynn L, Barr JT, et al. A new method for grading the severity of keratoconus: the Keratoconus Severity Score (KSS). *Cornea*. Aug 2006;25(7):794-800.
53. Jhanji V, Sharma N, Vajpayee RB. Management of keratoconus: current scenario. *Br J Ophthalmol*. Aug 2011;95(8):1044-1050.
54. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology*. Sep 2006;113(9):1633-1638.
55. Richard JM, Paton D, Gasset AR. A comparison of penetrating keratoplasty and lamellar keratoplasty in the surgical management of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. Dec 1978;86(6):807-811.

56. Kaufman HE, Werblin TP. Epikeratophakia for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* Mar 1982;93(3):342-347.
57. Gasset AR, Kaufman HE. Thermokeratoplasty in the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* Feb 1975;79(2):226-232.
58. Sompuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol.* Feb 2004;121(2):190-199.
59. Foote CS. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science.* Nov 29 1968;162(857):963-970.
60. Fujimori E. Cross-linking of collagen CNBr peptides by ozone or UV light. *FEBS Lett.* Aug 1 1988;235(1-2):98-102.
61. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res.* Jan 1998;66(1):97-103.
62. Sporl E, Schreiber J, Hellmund K, Seiler T, Knuschke P. [Studies on the stabilization of the cornea in rabbits]. *Ophthalmologe.* Mar 2000;97(3):203-206.
63. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* Jun 2006;29(6):1420-1432.
64. John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond).* 1993;7 (Pt 2):230-237.
65. Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 25 1995;214(3):793-797.
66. Elsheikh A, Wang D, Brown M, Rama P, Campanelli M, Pye D. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr Eye Res.* Jan 2007;32(1):11-19.
67. Malik NS, Moss SJ, Ahmed N, Furth AJ, Wall RS, Meek KM. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochim Biophys Acta.* Mar 20 1992;1138(3):222-228.
68. Seiler T, Huhle S, Spoerl E, Kunath H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Oct 2000;38(10):822-825.
69. Kuo IC, Broman A, Pirouzmanesh A, Melia M. Is there an association between diabetes and keratoconus? *Ophthalmology.* Feb 2006;113(2):184-190.
70. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol.* Aug 2006;17(4):356-360.
71. Abad JC. Corneal Collagen Cross-linking Induced by UVA and Riboflavin (CXL). *Techniques in Ophthalmology.* 2008(6):8-12.
72. Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* Jan 2007;33(1):75-80.
73. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea.* May 2007;26(4):385-389.
74. 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.* May 2006;32(5):837-845.
75. Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* Nov 2007;33(11):1982-1984.

76. Bottos KM, Schor P, Dreyfuss JL, Nader HB, Chamon W. Effect of corneal epithelium on ultraviolet-A and riboflavin absorption. *Arq Bras Oftalmol*. Sep-Oct 2011;74(5):348-351.
77. Ghanem VC, Ghanem RC, de Oliveira R. Postoperative pain after corneal collagen cross-linking. *Cornea*. Jan 2013;32(1):20-24.
78. Filippello M, Stagni E, O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. *J Cataract Refract Surg*. Feb 2012;38(2):283-291.
79. Zhang ZY, Zhang XR. Efficacy and safety of transepithelial corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. Jul 2012;38(7):1304; author reply 1304-1305.
80. Dahl BJ, Spotts E, Truong JQ. Corneal collagen cross-linking: an introduction and literature review. *Optometry*. Jan 2012;83(1):33-42.
81. Kling S, Ginis H, Marcos S. Corneal biomechanical properties from two-dimensional corneal flap extensimetry: application to UV-riboflavin cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(8):5010-5015.
82. Coskunseven E, Jankov MR, 2nd, Hafezi F. Contralateral eye study of corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus. *J Refract Surg*. Apr 2009;25(4):371-376.
83. Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypotonic riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg*. Apr 2009;35(4):621-624.
84. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, Kounis GA, Panagopoulou SI, Grentzelos MA. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas. *Am J Ophthalmol*. Jan 2012;153(1):24-28.
85. Lanchares E, del Buey MA, Cristobal JA, Lavilla L, Calvo B. Biomechanical property analysis after corneal collagen cross-linking in relation to ultraviolet A irradiation time. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Aug 2011;249(8):1223-1227.
86. Kymionis GD, Diakonis VF, Kalyvianaki M, et al. One-year follow-up of corneal confocal microscopy after corneal cross-linking in patients with post laser in situ keratosclerosis ectasia and keratoconus. *Am J Ophthalmol*. May 2009;147(5):774-778, 778 e771.
87. Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol*. Aug 2008;86(5):549-551.
88. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg*. Sep 2003;29(9):1780-1785.
89. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg*. Feb 2006;32(2):279-283.
90. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*. Jul 2004;23(5):503-507.
91. Spoerl E, Wollensak G, Dittert DD, Seiler T. Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea. *Ophthalmologica*. Mar-Apr 2004;218(2):136-140.
92. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. Jul 2004;29(1):35-40.

93. Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea*. Apr 2008;27(3):353-356.
94. Wollensak G, Sporn E, Seiler T. [Treatment of keratoconus by collagen cross linking]. *Ophthalmologe*. Jan 2003;100(1):44-49.
95. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol*. Oct 2008;146(4):527-533.
96. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea*. May 2007;26(4):390-397.
97. Mencucci R, Mazzotta C, Rossi F, et al. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking: in vivo thermographic analysis of the corneal surface. *J Cataract Refract Surg*. Jun 2007;33(6):1005-1008.
98. Herrmann CI, Hammer T, Duncker GI. [Hazeformation (corneal scarring) after cross-linking therapy in keratoconus]. *Ophthalmologe*. May 2008;105(5):485-487.
99. Raiskup F, Hoyer A, Spoerl E. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg*. Sep 2009;25(9):S824-828.
100. Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J Cataract Refract Surg*. Mar 2009;35(3):588-589.
101. 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*. Apr 2009;35(4):788-791.
102. Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonou VF, Portaliou DM, Pallikaris AI, Yoo SH. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg*. Dec 2007;33(12):2135-2137.
103. Koziol J, Knobloch E. The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin. *Biochim Biophys Acta*. May 25 1965;102(1):289-300.
104. Fujimori E. Cross-linking and fluorescence changes of collagen by glycation and oxidation. *Biochim Biophys Acta*. Oct 5 1989;998(2):105-110.
105. Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br J Ophthalmol*. Aug 2010;94(8):965-970.
106. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. Dec 1995;33(12):1061-1080.
107. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim Biophys Acta*. Jun 29 1984;799(3):313-317.
108. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-956.
109. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(1):19-21.
110. Tsujimoto Y, Hashizume H, Yamazaki M. Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds. *Int J Biochem*. Apr 1993;25(4):491-494.

111. Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, et al. Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer*. May 28 1993;54(3):462-466.
112. Lindahl M, Tagesson C. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation*. Oct 1993;17(5):573-582.
113. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(5):749-760.
114. Middleton E, Jr., Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol*. Mar 17 1992;43(6):1167-1179.
115. Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*. Mar 1991;32(3-4):283-288.
116. Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*. May 1 1994;54(9):2424-2428.
117. Scambia G, Panici PB, Ranelletti FO, et al. Quercetin enhances transforming growth factor beta 1 secretion by human ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. Apr 15 1994;57(2):211-215.
118. Meloni F, Ballabio P, Gorrini M, et al. Effects of 3'-hydroxyfarrerol (IdB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products. *Inflammation*. Dec 1995;19(6):689-699.
119. Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol*. Oct 20 1992;44(8):1603-1608.
120. Cushman M, Nagarathnam D, Burg DL, Geahlen RL. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues. *J Med Chem*. Feb 1991;34(2):798-806.
121. Hodnick WF, Bohmont CW, Capps C, Pardini RS. Inhibition of the mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzyme Q oxido-reductase) enzyme system by flavonoids: a structure-activity study. *Biochem Pharmacol*. Sep 1 1987;36(17):2873-2874.
122. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1992;32(1):67-103.
123. Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem*. Aug 1994;27(4):245-248.
124. Gaspar J, Laires A, Monteiro M, Laureano O, Ramos E, Rueff J. Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis*. Jan 1993;8(1):51-55.
125. Siess MH, Guillermic M, Le Bon AM, Suschetet M. Induction of monooxygenase and transferase activities in rat by dietary administration of flavonoids. *Xenobiotica*. Dec 1989;19(12):1379-1386.
126. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(5):861-870.
127. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul 1989;30(7):1588-1593.

128. Kernacki KA, Berk RS. Characterization of arachidonic acid metabolism and the polymorphonuclear leukocyte response in mice infected intracorneally with *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jan 1995;36(1):16-23.
129. Baran I, Katona E, Ganea C. Quercetin as a fluorescent probe for the ryanodine receptor activity in Jurkat cells. *Pflugers Arch*. Aug 2013;465(8):1101-1119.
130. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*. Jun 2 1997;409(1):12-16.
131. Takahama U. O₂-dependent and -independent photooxidation of quercetin in the presence and absence of riboflavin and effects of ascorbate on the photooxidation. *Photochem Photobiol*. Jul 1985;42(1):89-91.
132. Fahlman BM, Krol ES. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. *J Photochem Photobiol B*. Dec 2 2009;97(3):123-131.
133. Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett*. Mar 19 1997;114(1-2):139-140.
134. Sakanashi Y, Oyama K, Matsui H, et al. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment. *Life Sci*. Aug 1 2008;83(5-6):164-169.
135. Erden Inal M, Kahraman A, Koken T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol*. Sep 2001;26(6):536-539.
136. Erden Inal M, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*. Nov 23 2000;154(1-3):21-29.
137. Zhai W, Lu X, Chang J, Zhou Y, Zhang H. Quercetin-crosslinked porcine heart valve matrix: mechanical properties, stability, anticalcification and cytocompatibility. *Acta Biomater*. Feb 2010;6(2):389-395.
138. Montana MP, Massad WA, Criado S, Biasutti A, Garcia NA. Stability of flavonoids in the presence of riboflavin-photogenerated reactive oxygen species: a kinetic and mechanistic study on quercetin, morin and rutin. *Photochem Photobiol*. Jul-Aug 2010;86(4):827-834.
139. Li H, Li J, Wang W, Yang Z, Xu Q, Hu X. A subnanomole level photoelectrochemical sensing platform for hexavalent chromium based on its selective inhibition of quercetin oxidation. *Analyst*. Feb 21 2013;138(4):1167-1173.
140. Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *J Cataract Refract Surg*. Mar 2009;35(3):540-546.
141. Marsh RJ, Maurice DM. The influence of non-ionic detergents and other surfactants on human corneal permeability. *Exp Eye Res*. Jan 1971;11(1):43-48.
142. Greenstein SA, Shah VP, Fry KL, Hersh PS. Corneal thickness changes after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: one-year results. *J Cataract Refract Surg*. Apr 2011;37(4):691-700.
143. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg*. Mar 2007;33(3):516-521.
144. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea*. Jan 2004;23(1):43-49.

145. Kernacki KA, Berk RS. Characterization of the inflammatory response induced by corneal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ocul Pharmacol*. Spring 1994;10(1):281-288.
146. Tessem MB, Midelfart A, Cejkova J, Bathen TF. Effect of UVA and UVB irradiation on the metabolic profile of rabbit cornea and lens analysed by HR-MAS 1H NMR spectroscopy. *Ophthalmic Res*. 2006;38(2):105-114.
147. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (Lond)*. Jul 2004;18(7):718-722.
148. Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, Herbst H. Wound healing in the rabbit cornea after corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Cornea*. Jun 2007;26(5):600-605.
149. Goldich Y, Marcovich AL, Barkana Y, Avni I, Zadok D. Safety of corneal collagen cross-linking with UV-A and riboflavin in progressive keratoconus. *Cornea*. Apr 2010;29(4):409-411.
150. Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, Raiskup F. Corneal cross-linking and safety issues. *Open Ophthalmol J*. 2011;5:14-16.
151. A K. "Gedanken zu einem neuen Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke". *Germany: Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*. 1893.
152. Semchishen VA MM, Seminogov VN, Panchenko VY, Seiler T. Light beam shaping and homogenization (LSBH) by irregular microlens structure for medical applications. *SPIE Proc*. 1998(3251):28-33.
153. Bueller M SE, Seiler T, Mrochen M. UV collagen crosslinking of the cornea – safety aspects and design of a UV illumination system. *Progress in Biomedical optics and Imaging – Proc SPIE*. 2008(6844):1-11.
154. Esquenazi S, He J, Li N, Bazan HE. Immunofluorescence of rabbit corneas after collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A. *Cornea*. Apr 2010;29(4):412-417.
155. Ambrosio R, Jr., Kara-Jose N, Wilson SE. Early keratocyte apoptosis after epithelial scrape injury in the human cornea. *Exp Eye Res*. Oct 2009;89(4):597-599.
156. Wilson SE. Everett Kinsey Lecture. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. *CLAO J*. Jul 1998;24(3):181-185.
157. Bilgihan K, Bilgihan A, Adiguzel U, et al. Keratocyte apoptosis and corneal antioxidant enzyme activities after refractive corneal surgery. *Eye (Lond)*. Jan 2002;16(1):63-68.
158. Podskochy A, Gan L, Fagerholm P. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea*. Jan 2000;19(1):99-103.
159. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *J Refract Surg*. Sep 2008;24(7):S720-725.
160. Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*. Jan 2003;76(1):71-87.
161. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res*. May 1999;18(3):311-356.
162. Dupps WJ, Jr., Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res*. Oct 2006;83(4):709-720.

163. WH. MGS. *Principles of Medical Biochemistry*. 2nd ed. St Louis: MO: Mosby Co.; 2006.
164. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*. Oct 1980;31(4):435-441.
165. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Ophthalmol*. Mar 2009;87(2):193-198.
166. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol*. Apr 2001;85(4):437-443.
167. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol*. Feb 2009;87(1):48-51.

