

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

**KERATOKONUS TEDAVİSİNDE KULLANILAN CROSSLINKİNG
CİHAZININ DENEYSEL OLARAK ÜRETİLMESİ, GÜVENİRLİLİĞİNİN VE
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Bülent ÇÜÇEN

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2011

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

**KERATOKONUS TEDAVİSİNDE KULLANILAN CROSSLİNKİNG
CİHAZININ DENEYSEL OLARAK ÜRETİLMESİ, GÜVENİRLİLİĞİNİN VE
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Bülent ÇÜÇEN

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özgül ALTINTAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

Etik Kurul Onayı ilk tarihli KOÜ/HADYEK – 10/06/2008
Etik Kurul Onayı son tarihli KOÜ/HADYEK – 24/11/2009

İçindekiler Dizini

<u>Konu Başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
İç kapak sayfası	2
İçindekiler dizini	3
Simgeler ve kısaltmalar dizini	6
Şekiller dizini	8
Tablo ve denklem dizini	10
1. AMAÇ VE KAPSAM	11
GENEL BİLGİLER	
2. KERATOKONUS	13
2.1. EPİDEMİYOLOJİ	13
2.2. KERATOKONUSUN ETYOPATOGENEZİ	14
2.2.1. Heredite	14
2.2.2. Mekanik travma	15
2.2.3. Enzimatik değişiklikler	15
2.2.4. Keratokonusta korneal incelme mekanizmaları	15
2.3. HİSTOPATOLOJİ	18
2.3.1. Epitel	18
2.3.2. Bazal membran	18
2.3.3. Sinir lifleri	18
2.3.4. Bowman tabakası	19
2.3.5. Stroma	19
2.3.6. Descement membranı	19

2.3.7.	Endotel	19
2.4.	KLİNİK ÖZELLİKLER	20
2.4.1.	Semptomlar	20
2.4.2.	Bulgular	20
2.5.	SINIFLANDIRMA	21
2.6.	AYIRICI TANI	22
2.7.	TEDAVİ	23
2.7.1.	Gözlük ile refraktif düzeltme	23
2.7.2.	Kontakt Lens ile refraktif düzeltme	23
2.7.3.	İntastromal korneal ring uygulaması	23
2.7.4.	Penetran, lameller keratoplasti ve epikeratofaki	24
2.7.5.	Termokeratoplasti	24
2.7.6.	Kollajen Cross-linking (CXL) Tedavi	25
2.7.6.1.	Tarihçe	25
2.7.6.2.	Kollajen çapraz bağlanmanın biyokimyası	26
2.7.6.3.	Teknik	28
2.7.6.4.	Tedavi Endikasyonları	30
2.7.6.5.	Tedavi Kontrendikasyonları	30
2.7.6.6.	Sonuçlar	30
2.7.6.7.	Güvenlik	32
2.7.6.8.	Komplikasyonlar	32
2.7.6.9.	Tedavinin bilinmeyenleri ve hedefler	32
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1.	Deneysel crosslinking cihazının tasarımı ve üretilmesi	34
3.2.	Denekler	36

3.3.	Crosslinking uygulaması	37
3.4.	Histopatolojik inceleme	38
3.5.	Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneğinin hazırlanması	39
3.6.	İstatistiksel Değerlendirme	44
4.	BULGULAR	45
4.1.	Histopatolojik değerlendirme bulguları	45
4.2.	Biyomekanik test bulguları	49
5.	TARTIŞMA	56
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7.	ÖZET	68
8.	ABSTRACT	70
9.	KAYNAKLAR	72

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

CXL	: Kollajen crosslinking
LATARUM	: Kocaeli Üniversitesi Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi
UV	: Ultraviyole
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
TIMP	: Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
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	: Tumor Growth Factor
PMMA	: Poly Methyl Methacrylate
PK	: Penetran Keratoplasti
O₃	: Ozon
HBA1C	: Hemoglobin A1c
C3-R	: Epitel kapalı kollajen crosslinking tedavi
FDA	: Food and Drug Administration
GİB	: Göz içi basıncı
LED	: Light Emitting Diode

DETAB	: Deneysel Tıbbi Araştırmalar Birimi
NA	: Sayısal açıklık
CMOS	: Complementary Metal Oxide Semiconductor
PTNT	: Patentli cihaz grubu
DNYS	: Deneysel cihaz grubu
KNTR	: Kontrol grubu
TBS	: Tris Buffered Saline
H&E	: Hematoksilen-Eozin
F	: Kuvvet-Yük
ΔL	: Uzama miktarı
L	: İlk boy
b	: Kalınlık
ϵ	: Gerilim-mukavemet
Θ	: Gerinim
E	: Elastiklik modülü-Young modülü

Şekiller Dizini

<u>Şekil numarası ve başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
<u>Şekil 1:</u> Keratokonusta korneadaki histopatolojik değişiklikler	20
<u>Şekil 2:</u> Riboflavin UVA etkileşimi ile çapraz kovalent bağların oluşumu	27
<u>Şekil 3:</u> LED ışık kaynağı, akım devresi ve ışık kaynağının yayılım spektrumu	35
<u>Şekil 4:</u> Deneysel crosslinking cihazının tasarımı	35
<u>Şekil 5:</u> Deneysel crosslinking cihazının alttan görünümü	36
<u>Şekil 6:</u> CXL tedavi düzeneği ve uygulama	38
<u>Şekil 7:</u> Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği	40
<u>Şekil 8:</u> Test düzeneğinin şematik görünümü	40
<u>Şekil 9:</u> Test düzeneği için hazırlanmış programa ait kullanıcı ara yüzü	41
<u>Şekil 10:</u> σ - ϵ eğrisi ve E'nin tespiti	43
<u>Şekil 11:</u> Biyomekanik test düzeneğinde çeneler arasına sıkıştırılmış korneal şerit	43
<u>Şekil 12:</u> Maksimum gerilme değerine ulaşan dokuda deformasyon anı	44
<u>Şekil 13:</u> Postoperatif 3. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	45
<u>Şekil 14:</u> Postoperatif 7. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	46
<u>Şekil 15:</u> Postoperatif 28. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	46

<u>Sekil 16:</u>	Postoperatif 42. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesitler	47
<u>Sekil 17:</u>	Gruplar arası ortalama " σ_{max} " değerlerinin kıyaslaması	51
<u>Sekil 18:</u>	Gruplar arası ortalama " ϵ_{max} " değerlerinin kıyaslaması	53
<u>Sekil 19:</u>	Gruplar arası "E" değerlerinin kıyaslaması	54
<u>Sekil 20:</u>	Gruplar arası " σ - ϵ " eğrilerinin karşılaştırılması	55
<u>Sekil 21:</u>	2 diodlu LED ışık kaynağı	58
<u>Sekil 22:</u>	UV-X Illumination System ve 2 diod LED'e ait kornea yüzeyi ışık dağılım paternleri	59
<u>Sekil 23:</u>	Newport Beam Profiler ile alınmış UVA şiddet dağılım görüntüleri	60

Tablolar ve Denklemler Dizini

<u>Denklem-Tablo numarası ve başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
<u>Denklem 1:</u> Gerinim miktarının hesaplanması	42
<u>Denklem 2:</u> Gerilme miktarının hesaplanması	42
<u>Denklem 3:</u> Elastiklik modülünün hesaplanması	42
<u>Tablo 1:</u> Deney gruplarına ait histopatolojik verileri gösteren tablo	48
<u>Tablo 2:</u> Postoperatif ilk 7 gün deneklerine (erken dönem) ait histopatolojik verileri gösteren tablo	48
<u>Tablo 3:</u> Postoperatif 7. gün sonrası (geç dönem) deneklere ait histopatolojik verileri gösteren tablo	49
<u>Tablo 4:</u> Kontrol, patentli ve deneysel cihaz grupları için biyomekanik test verileri	50
<u>Tablo 5:</u> Patentli cihaz ve kontrol gruplarına ait test veri ortalamalarının karşılaştırması	51
<u>Tablo 6:</u> Deneysel cihaz ve kontrol gruplarına ait test veri ortalamalarının karşılaştırması	52
<u>Tablo 7:</u> Patentli ve deneysel cihaz gruplarına ait test veri ortalamalarının karşılaştırması	52

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, pellucid marjinal dejenerasyon ve iyatrojenik keratektazilerdir.¹

Keratokonus korneanın bilateral, asimetric ve non-inflamatuvar ilerleyici bir dejenerasyonudur. İnsidansı, genel populasyonda 1/2000'dir.² Genellikle ergenlik çağında başlar ve gözlerin % 20'sinde penetran keratoplasti endikasyonu koyduracak seviyede ilerleme gösterir.³

Keratokonusta diğer tedavi seçenekleri ise; gözlük, sert kontakt lens kullanımı, termokeratoplasti⁴, intrakorneal ring segment uygulaması⁵, epikeratoplasti⁶ ve lameller keratoplastidir.⁷ 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 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.⁸

Yakın zamanda, CXL tedavi ile ilgili yeni endikasyon alanları da doğmuştur; refraktif cerrahi sonrası gelişen iyatrojenik keratektazinin hem proflaksi hemde tedavisinde^{9, 10}, korneal melting formları¹¹, pellucid marjinal dejenerasyonda¹², yüzeysel korneal ülserler¹³ ve büllöz keratopatide^{14, 15} uygulanarak başarılı sonuçlar alınabilmektedir.

Kocaeli Üniversitesi Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (LATARUM) araştırmacılarıyla ortaklaşa yaptığımız bu çalışmayla, keratokonus ve diğer korneal ektazilerin tedavisinde kullanılmakta olan ‘‘UV-X İllumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)’’ benzeri bir crosslinking cihazının, güvenlik parametreleri gözetilerek üretilebileceğini ortaya koymayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2. KERATOKONUS

Keratokonus, korneanın dikleşme ve incilmesiyle karakterize, ilerleyici, noninflamatuvar bir dejenerasyonudur. 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 myopik 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.¹⁶

Keratokonus, ileri dönemlerinde kornea stromasında bir incelleme bölgesi ile birlikte, korneanın lokalize konikal öne protrüzyonu ile karakterizedir. Keratokonusta, konik deformite, santral yada 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 Dioptri) kadar öne protrüze 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 populasyonda 50-230/100000 civarındadır, yani yaklaşık 1/2000'lik insidans tanımlanmaktadır.² Prevelansı ise 54.5/100.000'dir.¹⁷ 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 görülebilsede Down Sendromu, Marfan Sendromu, Ehlers-Danlos Sendromu, Leber'in konjenital amarozisi ve Retinitis Pigmentoza gibi hastalıklarla birlikteliği daha sık bildirilmiştir.¹⁸⁻²⁰

Keratokonus, genellikle bir gözde 16-18 yaşlarında başlar ama 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.²¹ Keratokonuslu bir çok hastanın hikayesinde sebep ve etki ilişkisi ispat edilememiş olmasına rağmen, bu hastaların gözlerini kuvvetli kaşıdıkları bilinmektedir.²²

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 ‘‘cascade’’ hipotezi ileri sürülmüştür.²³

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 keratokonus¹⁷, dominant, resesif ve herediter olmayan geçişte gösterebilir. Birinci derece akrabalarda keratokonus prevalansı %3.34 olarak belirtilmiştir ki, bu genel popülasyondan 15-16 kat daha fazladır.²⁴

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.²⁵ Hayvan çalışmalarında, kornea epitelinin kronik, tekrarlayan biçimde kaldırılmasının stromal apoptozisi uyardığı gösterilmiştir.^{26, 27} Bu bulgu önemlidir, zira keratokonuslu olgularda, sert gaz geçirgen kontakt lens kullanımına bağlı yada 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.^{28, 29}

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.³⁰⁻³²

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 yada hücre yapısı veya fonksiyonunun bozulmasına ve apoptozise sebep olmaktadır.²³

Keratokonuslu kornealarda serbest radikallerin oluşum mekanizmaları:

Keratokonuslu kornealarda oluşan oksidatif hasarın nedeni olarak, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumuna yol açan bir mekanizma ileri sürülmektedir.²³ Lipid peroksidasyonu ve Nitrik Oksit (NO) yolu ile ortaya çıkan sitotoksik ürünlerin, keratokonuslu kornealarda biriktiğini gösteren deliller vardır.^{33, 34}

Kornea, UV-B ışığının yaklaşık %80'inin emiliminden sorumludur.³⁵ Ultraviyole ışık, serbest radikalleri ve ROS'u oluşturur. Tipik olarak serbest radikaller ve ROS, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler ile biokimyasal etkileşime girerek ortamdaki uzaklaştırılırlar. Alternatif olarak kalan serbest radikaller, lipid peroksidaz ile aldehit formuna geçebilirler ki bunların bir kısmı dehidratif 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.³⁶

Süperoksit Dismutaz, serbest radikaller ve ROS'un uzaklaştırılmasından sorumlu bir antioksidandır.³⁴ Keratokonusta, süperoksit dismutaz düzeyinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar vardır.³⁷ Keratokonuslu kornealarda, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan sitotoksik bir aldehid olan Malondialdehid (MDA) ve NO yoluyla oluşan sitotoksik özellikteki Nitrotirozin (NT) birikimi gösterilmiştir.^{33, 38} Peroksinitritler, dokuda destrüktif olabilirler. Nitrotirozine spesifik antikorlar, doku içinde peroksinitritlerde lokalize olabilirler. Laboratuvar deneylerinde, keratokonuslu kornealarda Nitroazine 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.³⁸

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 uyarıldığı gösterilmesi önemli bir bulgudur.^{26, 27} 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 matriks 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.²³

Keratokonuslu 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. Tumor 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 duraklarsa, proteolitik enzimlerin derin stroma tabakalarına hatta Descement

membranına ulaşması önlenmiş olur. Kollajen liflerin kaybindan dolayı santral kornea incilir 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.²³

2.3. HİSTOPATOLOJİ:

Keratokonuslu kornealarda görülen histopatolojik değişiklikler şunlardır (Şekil 1);

2.3.1. Epitel:

Keratokonuslu kornealarda yapılan ex vivo histolojik analizler ile, korneal epitelde önemli derecede incelmeye tespit edilmiştir. Scroggs ve ark. keratokonusta, çıkarılmış kornealarda santral epitelyal incelmeler göstermişlerdir.³⁹ 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.⁴⁰ Bu in vivo değişiklikler, bazal epitelyal bütünlüğün bozulduğunu göstermektedir. Keratokonik kornea örneklerinde, epitelyal seviyede apoptotik değişikliklerde izlenmektedir.⁴¹

2.3.2. Bazal membran:

Keratokonusta, bazal membranda düzensiz bir görüntü ve lokalize kırılmalar gözlenir.⁴² Laminin 1 ve Laminin 5 ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda, defektli bölgelerde bazal membranda kalınlaşmalar ve düzensiz bir görüntü izlenmektedir.⁴³ 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.⁴⁴

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.⁴⁵

2.3.4. Bowman tabakası:

Keratokonik kornealarda, santral kısımda Bowman tabakasındaki defektler ve yapısal anomaliler iyi bir şekilde dökümante edilmiştir. Elektronmikroskopik çalışmalarda, Bowman tabakasında keskin kenarlı defektler ve rüptür alanları izlenmektedir.⁴⁶

2.3.5. Stroma:

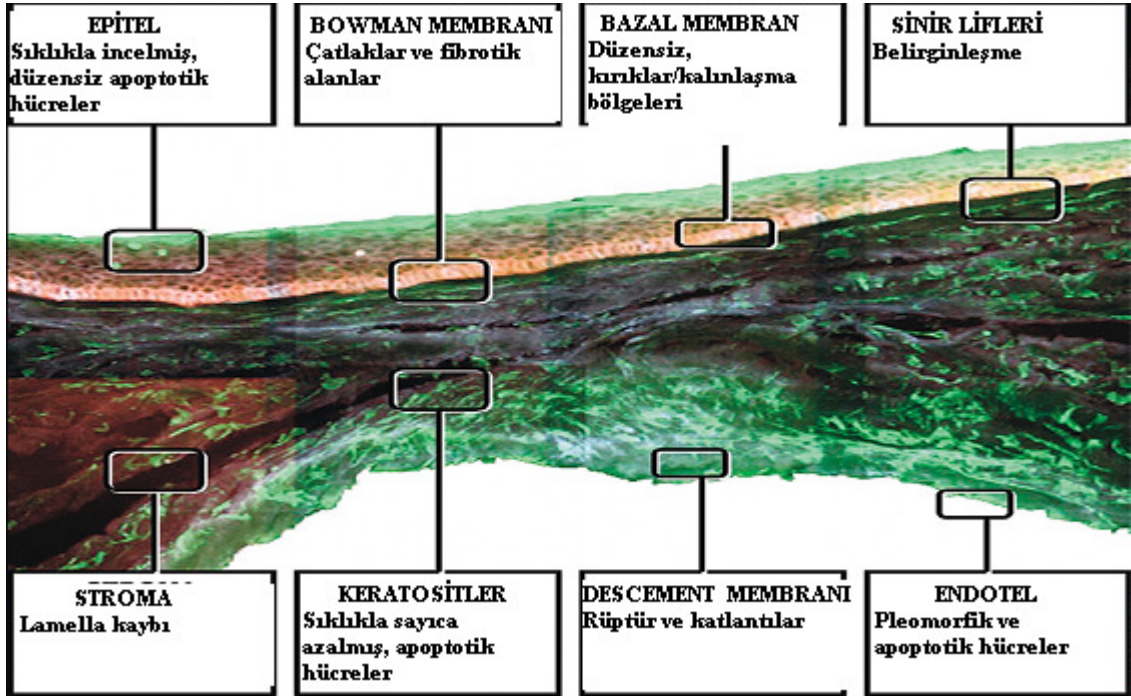
Keratokonuslu kornealarda normallere göre, kollajen tabaka sayısı daha az ve incedir.⁴⁷ Kollajen ve total protein düzeylerinin keratokonuslu kornealarda azaldığı gösterilmiştir.⁴⁸ Konfokal mikroskop ile keratokonuslu kornealarda, keratosit yoğunluğunun normallere göre % 12 daha az olduğu gösterilmiştir.⁴⁹

2.3.6. Descement membranı:

Keratokonusta, Descement membran katlanmaları ve rüptürleri çok yaygın görülen bir özelliktir.⁴² Descement membranındaki bu değişikliklerin çevresel faktörlerle ilişkili olabileceği (göz ovuşturma gibi) öne sürülmüştür.⁴³

2.3.7. Endotel:

Robinowitz, keratokonusta endotelin genellikle normal görünümde olduğunu, fakat intrasellüler koyu yapılar, pleomorfizm ve hücrelerde uzama gibi değişikliklerin görülebileceğini bildirmiştir.²



Şekil 1: Keratokonusunda korneadaki histopatolojik değişiklikler.⁵⁰

2.4. KLİNİK ÖZELLİKLER:

Keratokonus 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 veya 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 myopik 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 (Dış) 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;⁵¹

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 veya eniyi düzeltilmiş görme keskinliğinde hafif azalma

Keratokonus şüphesi

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

Normal biyomikroskopik muayene bulguları

En iyi düzeltilmiş görme keskinliğinin Log Mar Eşelinde, 4 m'den \geq 55 harf olması

Hafif keratokonus

Keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi bulguları

Düz keratometri değerinin < 51 D olması

Fleischer halkası veya Voght 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 \geq 8 D astigmatizma olması

Fleischer halkası veya Voght 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 \leq 45 harf)

Ciddi keratokonus

Belirgin dikleşme alanları gösteren, keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi bulguları

Düz keratometri değerinin > 56.01 D olması

Fleischer halkası veya Voght 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 veya sert kontakt lens verilir. Daha ileri vakalarda ise girişimsel yöntemlere başvurulur.

2.7.1. Gözlük ile refraktif düzeltme: Hafif veya 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. Soft torik lenslerin keratokonusun tedavisinde yeri sınırlıdır. Gözlükle düzeltme sağlanabilen dönemde myopi ve astigmatizmayı (-3.25 D'ye kadar) düzeltebilirler.

Sert gaz geçirgen kontakt lens kullanım amacı ise, mümkün olan eniyi görme keskinliğini sağlamak ve korneal fizyolojiye enaz müdahale etmektir. Buda, kontakt lensi daha güçlü bir yatak olan periferik kornea üzerine yerleştirmek, apikal skar oluşumunu şiddetlendirmemek için koni apeksine enaz teması sağlamak ve gözyaşı göllenmesini enaza 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 arttırır ve keratoplasti ihtiyacını geciktirebilmektedir. Çeşitli kalınlıklarda halka kullanımı, bir veya 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 micrometre (μm) olması gerekliliğidir.⁵²

2.7.4. Penetran, lameller keratoplasti ve epikeratofaki: Kontakt lens intoleransı geliştiğinde, kontakt lens ile yeterli görsel iyileşme sağlanamadığında veya santral korneal skara bağlı görme kaybı geliştiğinde tedavide keratoplasti yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Geleneksel penetran keratoplastinin (PK) uzun dönem sonuçları oldukça iyidir.⁵³ 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 hızı 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.⁵⁴

Epikeratofaki, temel olarak 3 mm çapındaki planolameller donör greft ile koninin sıkıştırılması esasına dayanır, böylece düzensiz astigmatizma ve myopi azaltılmış olur.⁵⁵

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 incelmeye olan ve koni apeksi pupiller aks

üzerinde olan hastalarda uygulanabilir. Keratoplastinin zor ve tehlikeli olduğu mental retarde hastalarda alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.⁵⁶

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.⁸

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.⁵⁷ Yine yapay kalp kapakları, gluteraldehit kullanılarak sertleştirilmektedir.

İlk kez 1968 de Christopher Foote, biyolojik sistemlerde ışık duyarlılaştırıcı oksidasyonun mekanizmalarını yayınlamıştır.⁵⁸ 1988 de Fujimori, üçüncü bir mekanizma ile Ozon (O₃) veya UV ışık ile fotooksidasyon neticesinde Tip 1 kollajen fibriller arasında çapraz bağlanmaların meydana geldiğini göstermiştir.⁵⁹

1997 de Spörl ve ark. domuz kornealarında yeni çapraz bağlanmaları gösterdikleri çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır.⁶⁰ 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 solusyonu (% 0.1, 10 dk) uygulanmış. Karnovsky solusyonu, 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 solusyonu kullanılan gruplarda, kontrollere göre

korneal sertliğin arttığı gösterilmiştir. Bir sonraki aşamada, riboflavin-UVA (365 nm) ve gluteraldehit (% 0.075) potansiyel adaylar olarak tavşanlarda invivo olarak test edilmiş. Sonuğa, riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonunun insan çalışmaları için umut vaadettiği gösterilmiştir.⁶¹ Riboflavin-UVA (365 nm) kombinasyonu ile insanlar üzerindeki pilot çalışmalar, 1998 de Dresden’de başlamış ve ilk sonuçlar 2003’de yayınlanmıştır.⁸

2.7.6.2. Kollajen apraz 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 l helikal konformasyon henüz oluşmamıştır. Zincir sonlanma bölgelerindeki hidroksilizin rezidüleri çapraz bağlanma oluşumuna katılırlar. Çapraz bağlanmalar, kollajen telopeptitlerindeki lizin veya hidroksilizin aminoasitlerinin, lizil oksidaz enzimi ile -amino gruplarının oksidatif deaminasyonu neticesinde meydana gelir. Doğal süreçte kollajen telopeptitleri arasında gerçekleşen bu çapraz bağlanmalar, kollajen fibrillerin l helikal konfigürasyonunu tahsis eder.

İkinci bir çapraz bağlanma yolağı yaşlanma sürecinde oluşur. (daha büyük lde 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 (rneğin, HbA1c gibi) dönüşür. Sürecin devamında, diğer protein moleküllerinin amino grupları ile glukoz derive moleküller (pentozidin gibi) arasında ilave yavaş reaksiyonlar ile moleküller arası çapraz bağlanmalar meydana gelir. Bu glukoz derive moleküller glikasyon son ürünleri olarak adlandırılırlar.⁶² Bu durum, 1912 de Maillard veya sarı kahverengi renk değişimi nedeniyle esmerleşme reaksiyonu olarak tanımlanmıştır.⁶³

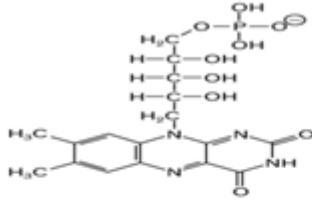
Aynı yaş grubundaki diabetik kornealar ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, pentozidin (kollajenin arjinin ve lizin rezidüleri arasında çapraz bağlantılar

oluşturan glikasyon son ürünüdür) düzeylerinin diyabetik kornealarda daha yüksek olduğu bulunmuştur.⁶⁴ Yaşlanma ile birlikte korneal sertlikteki artış, gerinim-gerilme testleri ile gösterilmiştir.⁶⁵ 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.⁶⁶ 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.^{67, 68}

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.⁵⁸ 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 desaminasyon ve hidrojen bağ formasyonu oluşturur. (Şekil 2)

1. Kombine riboflavin UVA uygulaması

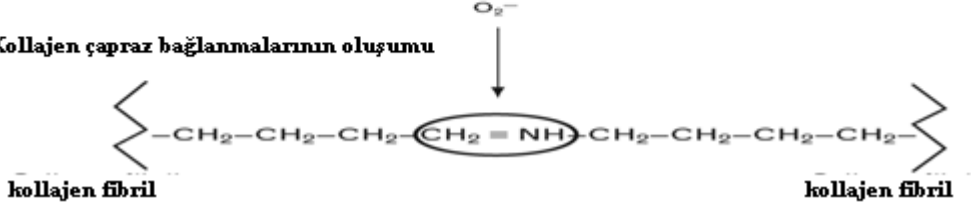


Ultraviyole ışınları



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)⁶⁹

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 göziçi yapıların hasarına karşı koruma sağlanır. Aynı mekanizmayla riboflavin, lensin ve retinanın doğal yapısında bulunarak UVA'nın hasar verici etkisinden korumaktadır. Güvenlidir, kolayca elde edilebilir ve ucuzdur. 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 solusyonu (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 ± 0.3 mW/cm² düzeyindedir.

Topikal anestezi sonrası (proxymetacaine % 0.5) ultrasonik pakimetre ile korneal kalınlık birkaç noktadan ölçülür. Tüm noktalarda korneal kalınlık 400 µm'nin üzerinde olmalıdır. Korneal epitel, santralde 7-8 mm çapında ucu kör bir spatül veya % 20'lik alkol solusyonu ile kaldırılır.⁷⁰ Bir başka yöntem ise, yoğun topikal anestetik uygulaması ile intakt olan epitelde gevşeme sağlamak ve ardından riboflavin solusyonu uygulamaktır.⁷¹ (C3-R) Ancak bu yöntem tartışmalıdır. Epitelin kaldırılmasının ardından, % 0.1'lik riboflavin solusyonu (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.⁷² Bu aşamada korneal kalınlık tekrar ölçülür, tüm noktalarda kalınlık 400 µm'nin üzerinde olmalıdır. Aksi takdirde, hipotonik % 0.1'lik riboflavin solusyonu (Medio-Cross hypotonic, Peschke Meditrade GmbH, Switzerland) her 10 saniye (sn)'de bir, 2 damla damlatılarak stromanın şişmesi ve korneal kalınlığın 400 µm'nin üzerine çıkması sağlanır. Bu uygulamayla genellikle 3 dk'da kornea kalınlığı 350 µm'den 400 µm'ye ulaşmaktadır. Bu aşamadan sonra UV-X ışık kaynağı, kornea yüzeyine 5 cm mesafede homojen UVA spotu oluşturacak şekilde yerleştirilir. Cihazın spot büyüklüğu, potansiyel limbal tosisiteye neden olmayacak şekilde ayarlanır. (Genellikle orta spot çapı tercih edilir) UVA ışığı, 3 mW/cm² dozunda (5.4 Joul/cm²), 30 dk boyunca uygulanır. Bu arada her 5 dk'da bir riboflavin solusyonu 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)⁷³ 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.⁷² 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 iyleşmesini 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 epizotu geğirmiş vakalarda profilaktik olarak, preoperatif 1-3. günlerde 1200 mg\gün dozunda peroral acyclovir başlanıp, postop 7.günde tedavi kesilebilir.⁷⁴

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^{9, 75}
- İntrakorneal ring etkinliğini arttırmak amacıyla⁷¹
- Korneal melting ve yüzeysel korneal ülserlerde incelmeyi durdurma amacıyla¹¹
- Büllöz keratopatide ağrı kontrolü amacıyla^{14, 76}

2.7.6.5. Tedavi Kontrendikasyonları:

CXL tedavi şu durumlarda kontrendikedir;⁷⁰

- Kornea, 400 µm'den ince ise (epitel kaldırıldıktan sonra), eğer korneal kalınlık hipotonik solusyon 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.⁷⁷ Sonraki çalışmalarda, sertleştirici etkinin uygulama derinliğine bağımlı olduğu ve esas olarak ön stromada gerçekleştiği gösterilmiştir.⁷⁸ Tavşan kornealarında, tedavi etkinliğinin en yüksek olduğu ön stromada, kollajen fibril çaplarının % 12.2 (3.96 nm) oranında arttığı gösterilmiştir.⁷⁹ Yapılan termomekanik testlerde, ön stromada hidrotermal büzülme etkisinin 75°C de, arka stromada ise 70°C de gerçekleştiği gözlenmiştir.⁸⁰

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.⁸¹ Tedavi uygulanan kornealarda, jel elektroforezi ile molekül ağırlığı en az 1000 kiloDalton (kDa) olan yoğun polimer bantlar saptanmıştır. Bu bantların, merkaptolanol, pepsin ve ısıya dirençli olduğu bulunmuştur.⁸² 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'de yayınlamışlardır.⁸³ 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 hastalığıdaki 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.⁸ 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 göme keskinliği artışı, farklı derecelerde K değerlerinde azalma ve farklı takip süreleri bildirilmiştir. Çalışmalarda hiçbir ciddi komplikasyon ile karşılaşmamıştır. 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.⁸ Mazotta ve ark.'nın 44 hasta ve 3 yıl takipli çalışmalarında, in vivo konfokal mikromorfolojik analiz sonuçlarına göre, epitelyal rejenerasyonun 4 günde tamamlandığı ve limbal toksisitenin gelişmediği gösterilmiştir.⁸⁴ Tedavi ile birlikte yok olan ön midstromal ve subepitelyal sinir lifleri, postoperatif birinci aydan itibaren, subepitelyal 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.⁸⁵ Endotel hasarı riski nedeniyle, 400 µm'dan ince kornealarda CXL tedavi önerilmemektedir.⁸⁶ İnsan korneasında, kızılötesi termal kamera ile CXL tedavi esnasındaki ısı değişimi ölçülmüş ve ısının stabil olarak termal hasar eşiğinin altında kaldığı gösterilmiştir.⁸⁷

2.7.6.8. Komplikasyonlar:

CXL tedavide literatürde çeşitli postoperatif komplikasyonlar bildirilmiştir. Bir hastada, yavaş gerileyen diffüz subepitelyal opasifikasyon⁸⁸ Tedavi sonrası tüm

hastalarda gelişen ve tam iyileşmesi postoperatif 12. aya kadar uzayabilen değişen derecelerde stromal bulanıklık⁸⁹, bakteriyel keratit⁹⁰, Acanthamoeba keratiti⁹¹, Herpetik keratit öyküsü bulunmayan bir hastada, tedavi sonrası 5. günde jeografik ülser ve iritis⁷⁴, post LASİK ektazi nedeniyle CXL tedavi uygulanan bir hastada, evre 3 diffüz lameller keratit bildirilmiştir.⁹²

2.7.6.9. Tedavinin bilinmeyenleri ve hedefler:

Keratokonus, hastaların % 20'sinde penetran keratoplasti endikasyonu koyduracak seviyede ilerleme göstermektedir.³ 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 ilede 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 olmaktadır. (yaşlanmayı hızlandırmaktadır) Çünkü, zaten yaşlanma ile birlikte kollajen lifler arasında çapraz bağlanmalar meydana gelmektedir. Dahada kötüsü bazı vakalarda geç dönemde gelişebilecek diyabet nedeniyle non enzimatik glikasyonda olaya dahil olacak ve tedavi etkisi dahada artacaktır. Tasarım ve yöntem kaygıları, yeterli takip süresi, stabil etki süresi gibi sorulara cevap verecek kadar uzun takip süreli çalışma henüz bulunmamaktadır.

UVA görünür ışığın emisyon spektrumu içinde kalmaktadır. Polimerizasyon, bir UVA ışık kaynağı kullanılmaksızın (UVA'nın zararlı etkileri enaza indirilerek) görünür ışık uygun çözücüler kullanılarak gerçekleştirilebilir.⁹³ Fruktoz gibi şekerler, çapraz bağlanmaları (fruktuasyon) teşvik için umut vaad etmektedirler. Bu şekerlerin insan dokularında sorbitol yolağında rolleri bulunmaktadır.⁹⁴ Bu ajanlar, riboflavin-UVA yöntemi sınırlamalarının üstesinden gelebilirler.⁹⁵

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

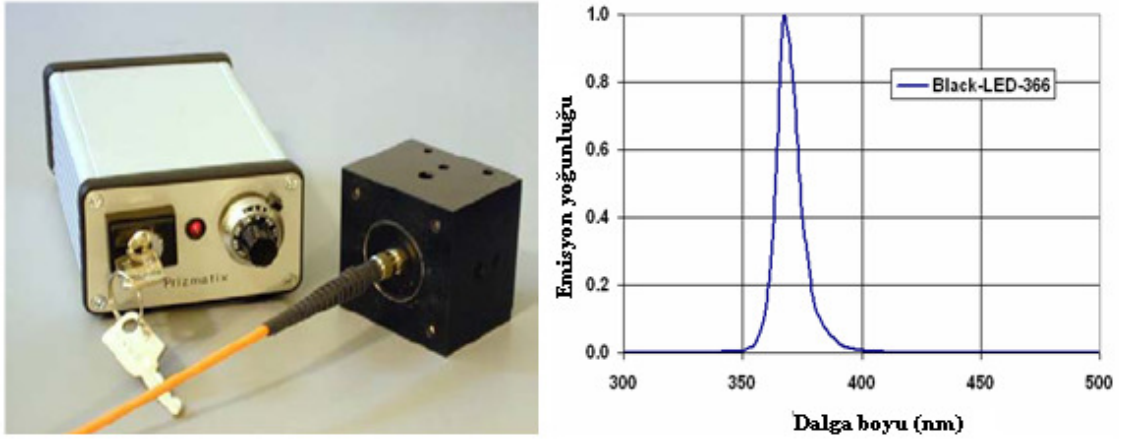
Bu deneysel çalışmada; deneysel crosslinking cihazının tasarımı ve üretilmesi, Kocaeli Üniversitesi Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (LATARUM) bünyesinde, crosslinking uygulaması, sakrifikasyon işlemi ve denek kornealarından şeritlerin hazırlanması Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Biriminde (DETAB), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler ve görüntüleme işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, bilgisayar destekli biyomaterial test düzeneğinin hazırlanması ve biyomekanik testler Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Makina Eğitimi Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

Çalışma 2 aşamalı olarak planlanmıştır. Birinci aşamada, deneysel crosslinking cihazının tasarım ve üretimi ile histopatolojik güvenlik testleri yapılmıştır. İkinci aşamada ise biyomekanik testler ile cihazın tedavi etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

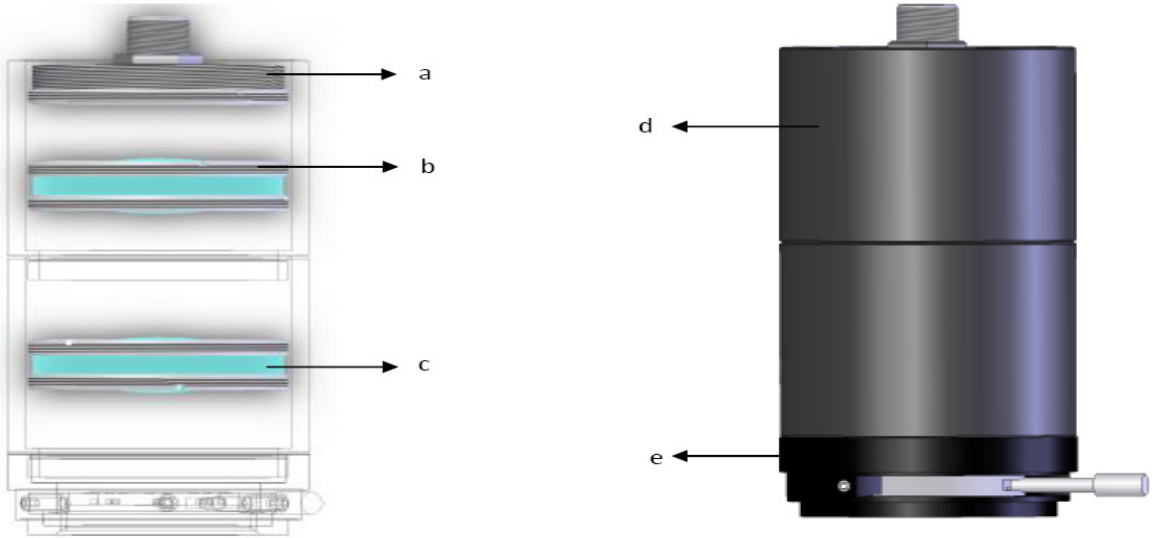
3.1. Deneysel crosslinking cihazının tasarımı ve üretilmesi:

Patentli "UV-X Illumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)" ile benzer özelliklere sahip deneysel crosslinking cihazı, LATARUM bünyesinde tasarlanarak üretilmiştir. Sistem en basit ve en efektif olacak şekilde tasarlanmıştır. LED kaynaktan çıkan UVA ışık, 150 cm uzunluğundaki optik fiber kablo ile optik sisteme taşınmıştır. (Şekil 3) Sayısal açıklığı (NA) 0.5 olan optik fiberden çıkan UV-A ışık ışınları, optik eksen boyunca ilerleyerek odak uzaklıkları 32 mm olan iki adet mercekten geçerler. Fused silica materyalden üretilmiş olan bu mercekler, kızıl ötesinden derin UV bölgesine değin tüm dalga boyları için en iyi optik geçirgenliği sağlamaktadırlar. Merceklerden geçen ışık, istenilen çalışma spot çaplarına ayarlanmak üzere (7 ile 9.8 mm aralığında) bir adet iris diafram ile şekillendirilir. (Şekil 4) NA, yayılan ışınların optik eksenle yaptığı açıyı tanımlamaktadır. Optik fiber için NA değeri, sistemde

maksimum şiddet ve verimle taşınabilecek ışık miktarını ifade ettiğinden en büyük fiber çapı tercih edilmiştir. Bu sistem için NA değeri, 30°'dir. Bu açı fiberden sonra kullanılacak merceklerin seçimini belirler. Cihazın üzerine, uygulamada UVA spotunun lokalizasyonu takip etmek amacıyla CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) kamera konumlandırılmıştır. (Şekil 5)



Şekil 3: Prizmatix firmasından temin edilen, çıkış gücü 42 mW olan UV Led ışık kaynağı (Black Led) ve akım devresi (sol), ışık kaynağının yayılım spektrumu (sağ)



Şekil 4: Deneysel crosslinking cihazının tasarımı a) Fiber kablo bağlantısı b) Mercek tutma halkası c) UV geçirgenliği yüksek, Fused Silica'dan üretilmiş odak uzaklığı 32 mm olan, 25.4 mm (1 inch) çapındaki mercek d) Mercek tüpü e) İris diyafram



Şekil 5: Deneysel crosslinking cihazının alttan görünümü, CMOS kamera (sol), iris diyafram (sağ)

Deneysel crosslinking cihazının özellikleri:

- 365 nm dalga boyunda, 7-9.8 mm aralığında, homojen UVA spotu üretebilmektedir
- 1-12 mW/cm² aralığında enerji seçenekleri bulunmaktadır
- Çalışma mesafesi 50 mm'dir
- 11×5.5 ×5.5 cm ebatlarındadır
- Ağırlığı 1.1 kg'dir
- Maliyet, 3000 Amerikan Doları

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
- Maliyet, 24000 Amerikan Doları

3.2. Denekler:

Çalışmamızda, birinci ve ikinci aşamalarda toplam 20 adet, sağlıklı Avustralya-Yeni Zelanda Irkı, Chinchilla türü (3000-3500 gr) albino dişi tavşan kullanılmıştır. Deneysel hayvanları, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) kendileri için özel üretmiş olan tavşan kafeslerinde, tek yada ikili gruplar halinde, istedikleri kadar yem ve su alarak, ısı (21±2°C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00–18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

Birinci aşamada, 12 (N=24) tavşanın sağ gözlerine (N=12) histopatolojik çalışmalarla güvenilirliği kanıtlanmış patentli "UV-X Illumination System" (PTNT) ile, sol gözlerine (N=12) ise deneysel cihaz (DNYS) ile standart tedavi parametrelerini⁸ içeren CXL tedavi uygulandı. Uygulamayı takiben 3, 7, 28 ve 42. günlerde sakrifikasyon sonrası, denek kornealarından hazırlanan kesitler, rutin ve immunohistokimyasal yöntemlerle boyama sonrası histopatolojik olarak değerlendirildi.

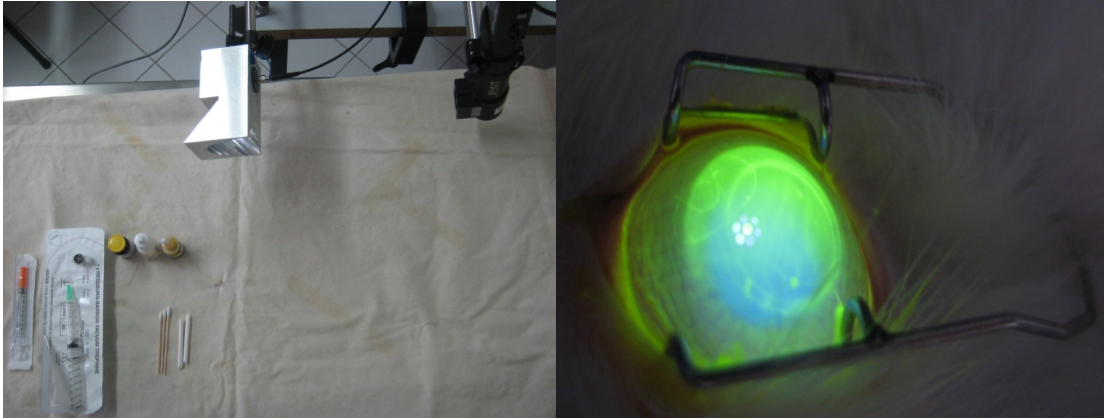
İkinci aşamada, 8 (N=16) denek 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (PTNT) (N=6) ve Grup 2 (DNYS) (N=6) de 3'er tavşanın heriki gözüne sırasıyla PTNT ve DNYS cihaz ile standart tedavi parametrelerini içeren crosslinking tedavi uygulandı. Grup 3 (Kontrol-KNTR) (N=4)'deki 2 deneye ise sadece epitelyal debridman yapıldı. Sakrifikasyon sonrası denek kornealarından, heriki uçta 1'er mm skleral doku ile birlikte ortalama 14×4 mm boyutlarında şeritler hazırlandı. Korneal şeritler, Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Makina Eğitimi Bölümünde hazırlanan bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği ile biyomekanik testlere tabi tutuldu.

3.3. Crosslinking uygulaması:

Deneklere, 1.5 ml Ketamine Hydrochloride (Ketasol % 10; Richter Pharma AG, 35 mg/kg) ve 0.5 ml Xylazine Hydrochloride'ün (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. % 0.1'lik riboflavin solüsyonu (10 ml % 20 Dextran T500 çözücüsünde, 10 mg riboflavin-5-phosphate)

damlatılarak 5 dk beklendi. UVA uygulama öncesi, cihazların spot enerjileri kalibre edildi. Kornea yüzeyine 5 cm mesafeden 3 mw/cm² dozunda (5.4 Joul/cm²) UVA ışığı 30 dk boyunca uygulandı. (Şekil 6) Bu esnada, her 5dk da bir % 0.1'lik riboflavin solusyonu damlatıldı. Uygulamaya, denek gözlerine Lomefloxacin (Okacin 3 mg/5 ml; Novartis) damlatılarak son verildi. Crosslinking uygulama, deneklerin sağ ve sol gözlerinde aynı gün içerisinde gerçekleştirildi.

Denekler, birinci aşamada postoperatif 3, 7, 28 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 enüklüe edildi.



Şekil 6: CXL tedavi düzeneği ve uygulama

3.4. Histopatolojik inceleme:

Globalar, 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'luk 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 antikoruna anti-smooth muscle actin (1:400; Dako, Glostrup, Denmark) ile oda ısısında bir gece inkübe edilip, TBS ile 2 kez 5'er dk yıkandı.

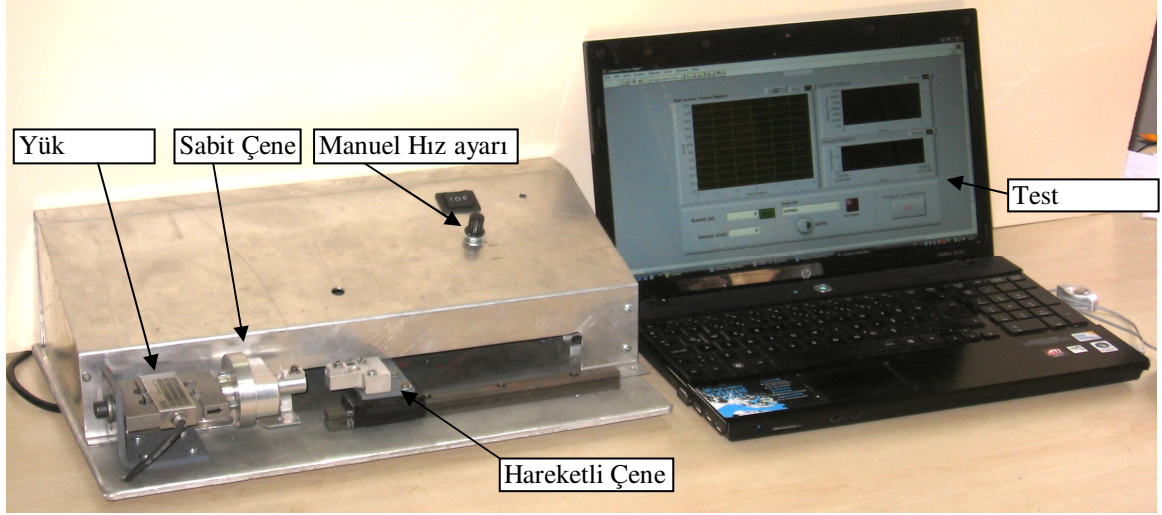
Sekonder antikor işlemleri için sırasıyla streptavidin-biotin (Lab Vision, Biotinylated Goat Anti-Mouse, Lot:MBN11206A, CA, USA) ve streptavidin-peroksidaz (Lab Vision Streptavidin Peroxidase, Lot:SHR11210) solusyonlarında 15'er dk inkübe edildi. Ardından kromojen olarak diaminobenzen (Lab Vision, Lot:AHD21119, CA, USA) solusyonunda 15 dk bekletilip su ile yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra deiyonize su ile yıkanarak % 95 ve % 100'lük alkollerden, sonra ksilden geçirildi ve kurutularak kapatıldı. İmmunohistokimyasal boyama ile birlikte, tüm kesitlere Hematoksilin-Eozin (H&E: Hematoxylin-Eosin) boyamada 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. Korneal ödem için yapılan skalada, "+1" ödem: hafif, "+2" ödem: ılımlı, "+3" ödem: ciddi olarak kabul edildi.

3.5. Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneğinin hazırlanması:

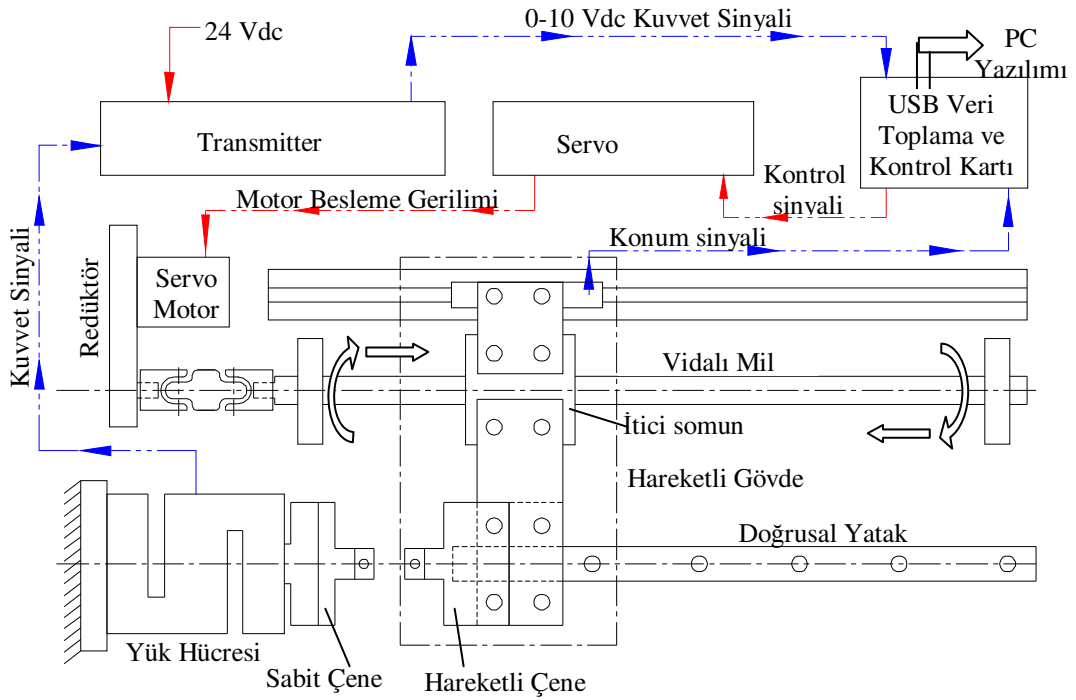
Deneyde kornealara ait biyomekanik test değerlerinin elde edilebilmesi için, Şekil 7'de görülen bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği kullanıldı. Test düzeneği ile çeşitli büyüklüklere ait veriler bilgisayara aktarılabilir. Bunlar; kuvvet-yük (F) [Newton, N], uzama miktarı (ΔL) [mm], kornea 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 düzelterek 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.



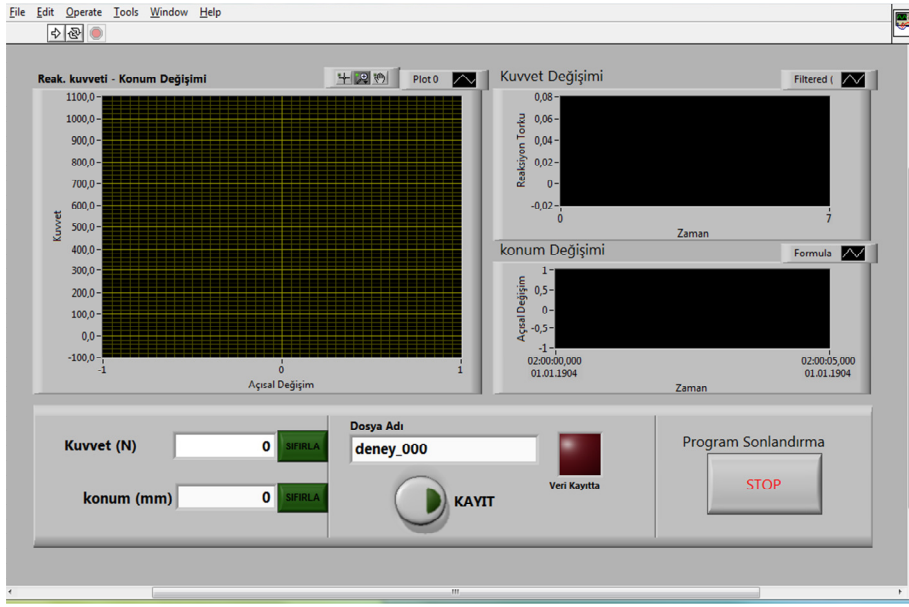
Şekil 7: Bilgisayar destekli biyomateryal test düzeneği

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 düzenele ile elde edilen veriler, Microsoft Excel (Microsoft Office Pack 2003) programı ile işlenmiştir. Böylece korneanın biyomekanik özelliklerini ifade eden; Birim Deformasyon Oranı-Gerilim (ϵ), Gerilme Mukavemeti-Gerilim (σ) ve bu iki değerin 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 % gerilim miktarı, Denklem 1 ile hesaplanmaktadır.

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

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 alanına sahip yapılarda ölçülen farklı kuvvet değerlerinin anlamlı bir şekilde yorumlanması sağlanabilmektedir. Yani, ölçülen kuvvetin kesit alanına bölünmesi ile birim alanına 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.

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

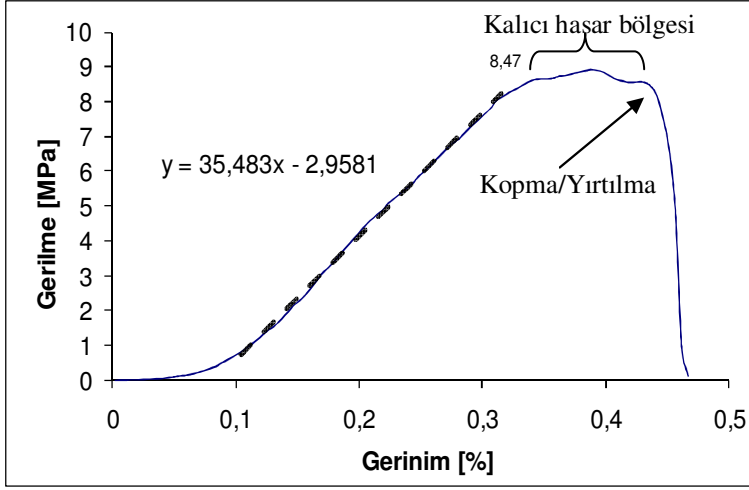
Denklem 2: σ : Gerilme (Mega Pascal, MPa), F : Yük (Newton, N), A : Birim kesit alan (mm^2)

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

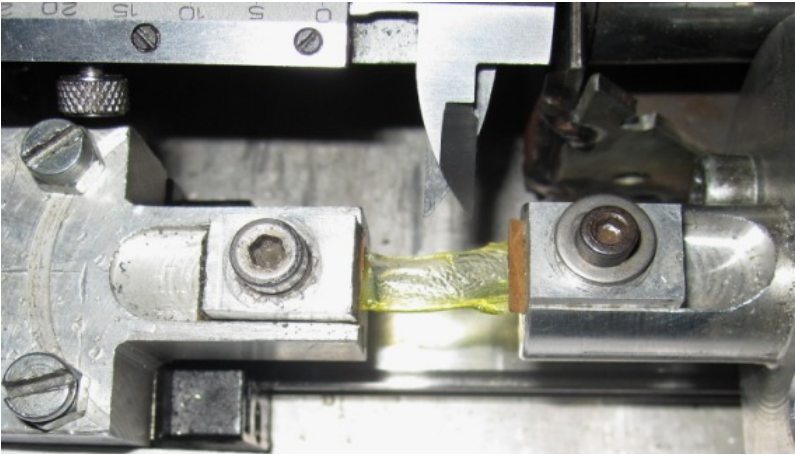
Şekil 10’da deney düzeneğinden elde edilen verilerin, Denklem 1 ve Denklem 2 kullanılarak Microsoft Excell programında işlenmesi sonucu, numunenin test süresince gösterdiği gerilme-gerinim karakteristiğinin belirlenmesine ait örnek bir çalışma görülmektedir.



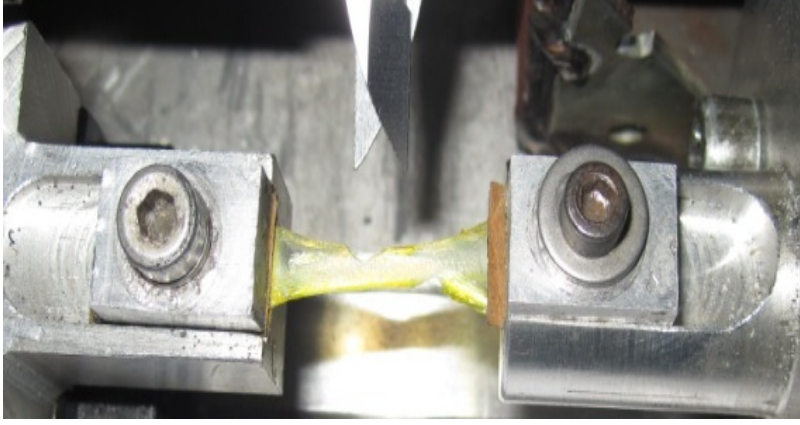
Şekil 10: σ - ϵ eğrisi ve E'nin tespiti.

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

3.6. İstatistiksel Değerlendirme:

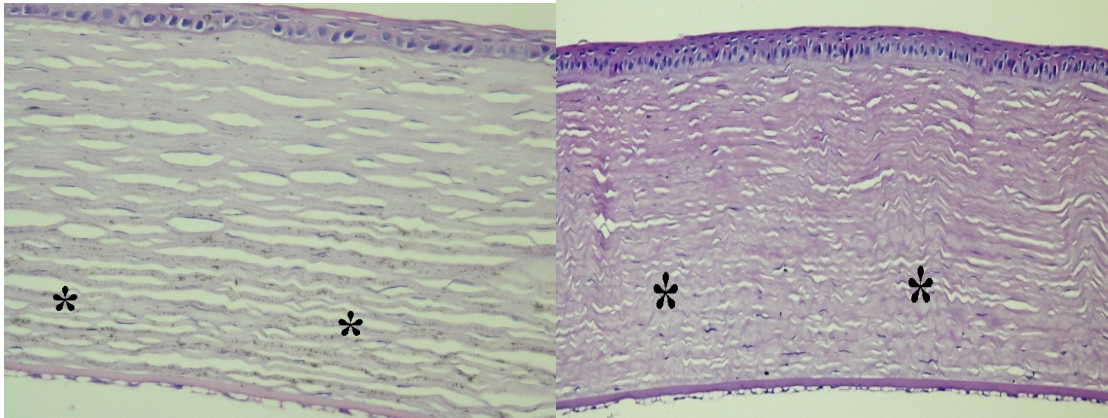
Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi “SPSS for Windows version 13” yazılımı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde, değişkenlerin karşılaştırılmasında gruplar arası farklılık olup olmadığı nonparametrik Kruskal-Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi ile belirlendi. Farklılığı yaratan grupları bulmak için ise, 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.

4. BULGULAR:

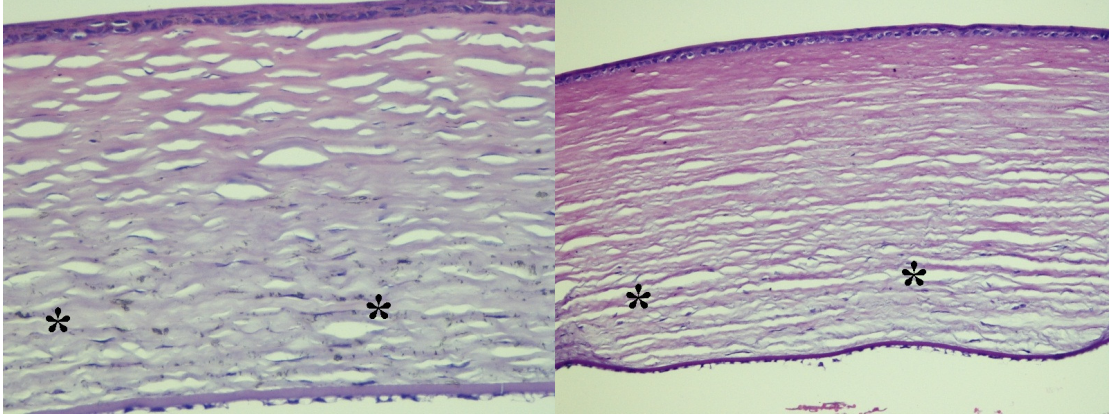
4.1. Histopatolojik değerlendirme bulguları:

Değerlendirmelerde 6. deneğin sol göz örneğinde (DNYS grubu), geçirilmiş korneal ülser bulguları saptanması üzerine çalışma dışında bırakıldı. Bu denek dışında, her iki grupta (PTNT ve DNYS) postoperatif 3, 7, 28 ve 42. günlerde sakrifiye edilen deneklere ait korneal kesit incelemelerinde inflamasyon bulgusuna rastlanmadı, korneal epitel ve endotel bütünlüğü intakt olarak değerlendirildi.

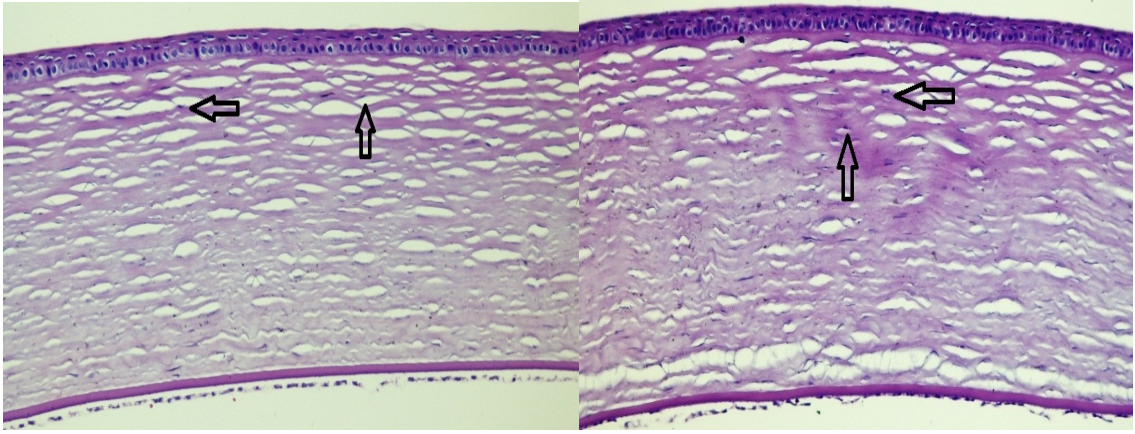
Histopatolojik kesitler niteliksel olarak değerlendirildiğinde, postoperatif 3. ve 7. gün deneklerinde, her iki grupta (PTNT-DNYS) ön stroma düzeyinde keratositlerin kaybolduğu, ancak arka stromada keratosit yoğunluğu ve dağılımının normal olduğu (Şekil 13,14), 28. gün deneklerinde ön stromada keratosit sayısının artmaya başladığı (Şekil 15), 42. gün deneklerinde ise tüm stroma katlarında keratositlerin normal dağılım gösterdiği saptandı. (Şekil 16)



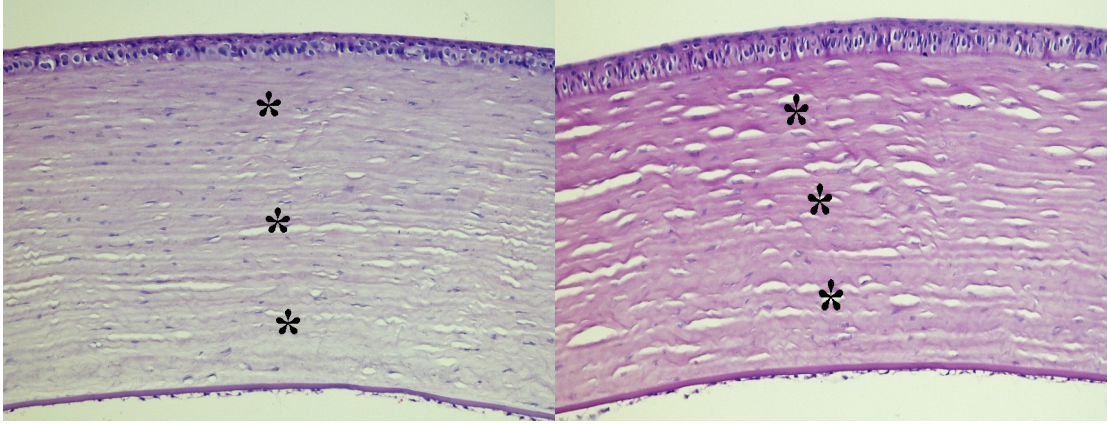
Şekil 13: Postoperatif 3. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri, sağ fotoğraf PTNT cihaz grubuna ($\times 200$), sol fotoğraf DNYS cihaz grubuna ($\times 400$) aittir, yıldızlar arka stromada normal keratosit yoğunluğunu göstermektedir



Şekil 14: Postoperatif 7. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri, sağ fotoğraf PTNT cihaz grubuna ($\times 200$), sol fotoğraf DNYS cihaz grubuna ($\times 400$) aittir, yıldızlar arka stromada normal keratosit yoğunluğunu göstermektedir



Şekil 15: Postoperatif 28. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri, sağ fotoğraf PTNT cihaz grubuna ($\times 200$), sol fotoğraf DNYS cihaz grubuna ($\times 200$) aittir, oklar ön stromada yoğunluğu artan keratositleri göstermektedir



Şekil 16: Postoperatif 42. gün deneklerine ait H&E ile boyanmış histopatolojik kesit örnekleri, sağ fotoğraf PTNT cihaz grubuna ($\times 200$), sol fotoğraf DNYS cihaz grubuna ($\times 200$) aittir, yıldızlar tüm stroma katlarında normal keratosit dağılımını göstermektedir

İmmunohistokimyasal değerlendirmede, 5. deneğin sol gözünde (DNYS grubu), 6 ve 7. deneklerin sağ gözlerinde (PTNT grubu), belirgin bir dağılım paterni göstermeyen, tek tük α -aktin (+) hücreler (myofibroblastlar) görüldü.

Niceliksel değerlendirmede ise, keratosit sayısı, korneal kalınlık ve ödem gruplar arasında (PTNT-DNYS) karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı. ($P > 0.05$) (Tablo 1)

Postoperatif erken (ilk 7 gün) ve geç dönem (7.gün sonrası) deneklerinde, keratosit sayısı, korneal kalınlık ve ödem gruplar arasında (PTNT-DNYS) karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. ($P > 0.05$) (Tablo 2,3)

Grup	Postop süre(gün)	Göz sayısı(N)	Ortalama keratosit sayısı(\pm SD)	Ortalama kornea kalınlığı(\pm SD)(μ M)	Korneal ödem(\pm SD)
PTNT	3	3	107 \pm 17	350 \pm 90	1.3 \pm 0.6
DNYS		3	95.7 \pm 7	253.3 \pm 20	1
PTNT	7	3	94.3 \pm 25	380 \pm 72	1.3 \pm 0.6
DNYS		2	73.5 \pm 20	382.5 \pm 166	1.5 \pm 0.7
PTNT	28	3	97.6 \pm 22	391.6 \pm 76	0.7 \pm 0.6
DNYS		3	86 \pm 9	440 \pm 126	1 \pm 0.9
PTNT	42	3	63 \pm 15	463.3 \pm 81	1
DNYS		3	76 \pm 29	475 \pm 43	1
P			0.73	0.95	0.94

Tablo 1: Deneysel gruplarına ait histopatolojik verileri gösteren tablo, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu, P<0.05; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık

Grup	Postop süre(gün)	Göz sayısı(N)	Ortalama keratosit sayısı(\pm SD)	Ortalama kornea kalınlığı(\pm SD)(μ M)	Korneal ödem(\pm SD)
PTNT	Postoperatif ilk 7 gün denekleri(erken dönem)	6	100.6 \pm 20	365 \pm 75	1.6 \pm 0.5
DNYS		5	86.8 \pm 17	305 \pm 110	1.2 \pm 0.4
P			0.36	0.23	0.55

Tablo 2: Postoperatif ilk 7 gün deneklerine (erken dönem) ait histopatolojik verileri gösteren tablo, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu, P<0.05; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık

Grup	Postop süre(gün)	Göz sayısı(N)	Ortalama keratosit sayısı(\pm SD)	Ortalama kornea kalınlığı(\pm SD)(μ M)	Korneal ödem(\pm SD)
PTNT	Postoperatif 7. gün sonrası	6	80.3 \pm 25	427.5 \pm 80	0.83 \pm 0.2
DNYS	denekler(geç dönem)	6	81 \pm 20	457.5 \pm 86	1 \pm 0.2
P			0.75	0.57	0.6

Tablo 3: Postoperatif 7. gün sonrası (geç dönem) deneklere ait histopatolojik verileri gösteren tablo, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu, $P < 0.05$; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık

4.2. Biyomekanik test bulguları:

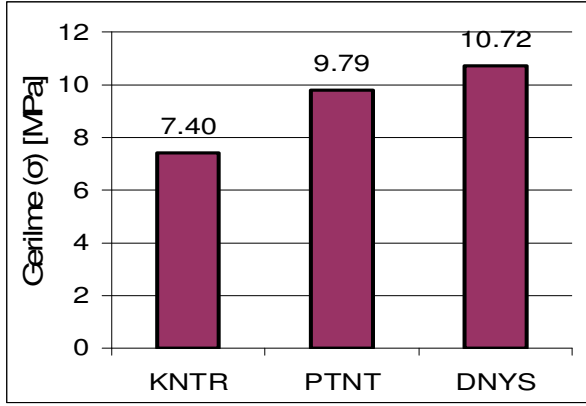
Gruplara (PTNT, DNYS, KNTR) ait denek kornealarının biyomekanik testler sonucu elde edilen maksimum gerilme (σ), Elastiklik modülü (E) ve maksimum gerilme değerleri için ölçülmüş maksimum gerinim (ϵ) değerleri toplu biçimde Tablo 4'de gösterilmiştir. Bu değişkenler için gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, gruplar arası istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmıştır. ($P < 0.05$)

	Denek No	Göz	KNTR	PTNT	DNYS	P
Maksimum Gerilme(σ , MPa)	1	Sol	6.9	9.03	12	0.016*
		Sağ	5.96	10.48	11.94	
	2	Sol	8.86	11.5	10.16	
		Sağ	7.88	8.26	8.4	
	3	Sol		9,95	10.6	
		Sağ		9.53	11.23	
	Ortalama değer		7.40	9.79	10.72	
Standart sapma(SD)						
			1.25	1.13	1.35	
Maksimum Gerinim(ϵ , %)	1	Sol	0.348	0.358	0.222	0.012*
		Sağ	0.296	0.298	0.192	
	2	Sol	0.377	0.278	0.289	
		Sağ	0.58	0.258	0.266	
	3	Sol		0.294	0.247	
		Sağ		0.245	0.25	
	Ortalama değer		0.40	0.29	0.24	
Standart sapma(SD)						
			0.12	0.04	0.03	
Elastiklik modülü(E, MPa)	1	Sol	39	50.93	63.5	0.06*
		Sağ	18.06	51.43	71.33	
	2	Sol	32.16	63.58	53.1	
		Sağ	27.26	53.3	53.16	
	3	Sol		49.05	65.55	
		Sağ		57.62	64.84	
	Ortalama değer		29.12	54.32	61.91	
Standart sapma(SD)						
			8.81	5.39	7.31	

Tablo 4: Kontrol (KNTR), patentli cihaz (PTNT) ve deneysel cihaz (DNYS) grupları için biyomekanik test verileri, $P < 0.05$; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık (*)

Deney gruplarına ait maksimum gerilme değerleri Şekil 17’de kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. Bu incelemeye göre, KNTR grubu denek kornealarında maksimum gerilme değeri ortalama 7.40 ± 1.25 MPa, PTNT grubunda 9.79 ± 1.13 MPa, DNYS grubunda ise 10.72 ± 1.35 MPa olarak tespit edilmiştir. KNTR grubuna göre, PTNT grubunda % 32, DNYS grubunda ise % 45’lik bir mukavemet artışı gerçekleşmiştir. Bu veriler ışığında ikili gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, PTNT-KNTR ve DNYS-KNTR grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($P < 0.05$)

(Tablo 5,6), ancak PTNT-DNYS grupları arasında bir fark bulunmadığı görülmüştür. (P>0.05) (Tablo 7)



Şekil 17: Gruplar arası ortalama ‘ σ_{max} ’ değerlerinin kıyaslaması, ‘ σ_{max} ’: Maksimum gerilme, KNTR: Kontrol grubu, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu

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)
PTNT	6	9.79 \pm 1.13	0.29 \pm 0.04	54.32 \pm 5.39
KNTR	4	7.40 \pm 1.25	0.40 \pm 0.12	29.12 \pm 8.81
P		0.019*	0.055	0.011*

Tablo 5: PTNT (patentli cihaz) ve KNTR (kontrol) gruplarına ait test veri ortalamalarının karşılaştırması, 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)
DNYS	6	10.72 \pm 1.35	0.24 \pm 0.03	61.91 \pm 7.31
KNTR	4	7.40 \pm 1.25	0.40 \pm 0.12	29.12 \pm 8.81
P		0.019*	0.011*	0.011*

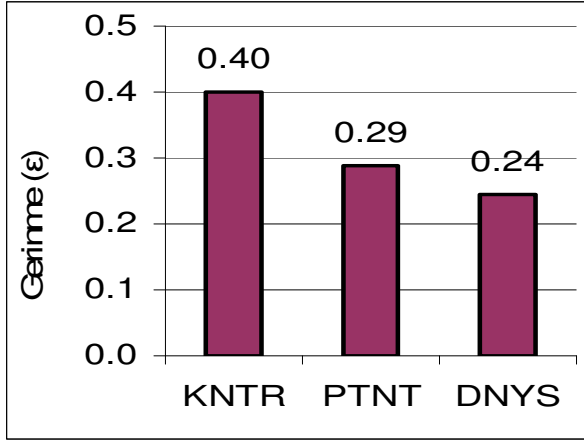
Tablo 6: DNYS (deneysel cihaz) ve KNTR (kontrol) gruplarına ait test veri ortalamalarının karşılaştırması, P<0.05; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık (*)

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)
PTNT	6	9.79 \pm 1.13	0.29 \pm 0.04	54.32 \pm 5.39
DNYS	6	10.72 \pm 1.35	0.24 \pm 0.03	61.91 \pm 7.31
P		0.150	0.78	0.78

Tablo 7: PTNT (patentli cihaz) ve DNYS (deneysel cihaz) gruplarına ait test veri ortalamalarının karşılaştırması, P<0.05; gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık

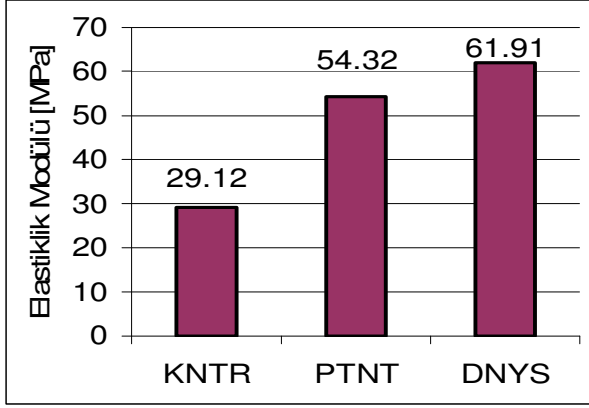
Grupların ortalama maksimum gerilme değerlerine (σ_{\max}) karşılık gelen ortalama maksimum gerinme (ϵ_{\max}) değerleri, Şekil 18'de kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. Ortalama " ϵ_{\max} ", KNTR grubunda 0.40 \pm 0.12, PTNT grubunda 0.29 \pm 0.04, DNYS grubunda 0.24 \pm 0.03 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, PTNT grubunda KNTR grubuna göre maksimum birim uzamada % 28, DNYS grubunda ise % 40 oranında azalma gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre, ikili gruplar istatistiksel olarak

karşılaştırıldığında, DNYS-KNTR grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($P<0.05$) (Tablo 6), ancak PTNT-KNTR ve PTNT-DNYS grupları arasında bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. ($P>0.05$) (Tablo 5,7)



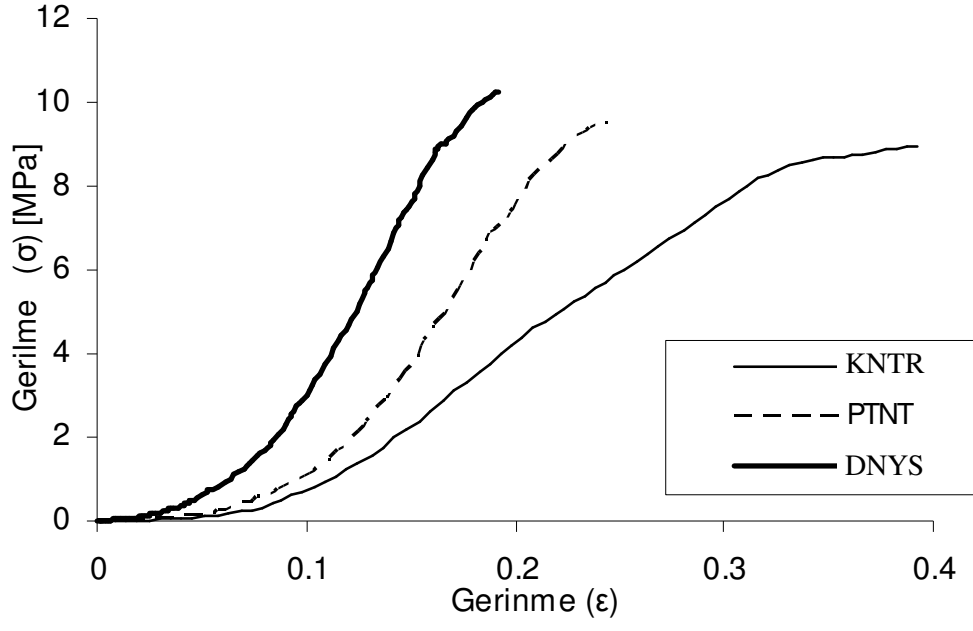
Şekil 18: Gruplar arası ortalama " ϵ_{max} " değerlerinin kıyaslaması, " ϵ_{max} ": Maksimum gerinme, KNTR: Kontrol grubu, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu

Grupların, " σ - ϵ " eğrilerinden elde edilen Elastiklik modülü (E) değerleri Şekil 19'da kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. 'E' değeri, KNTR grubunda $29,12\pm 8,81$ MPa, PTNT $54,32\pm 5,39$ MPa, DNYS grubunda ise $61,91\pm 7,31$ MPa olarak bulunmuştur. Dolayısıyla Elastiklik modülünün, PTNT grubunda KNTR grubuna göre % 87, DNYS grubunda ise % 113 oranında arttığı görülmüştür. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise, PTNT-KNTR ve DNYS-KNTR grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğu ($P<0.05$) (Tablo 5,6), ancak PTNT-DNYS grupları arasında bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. ($P>0.05$) (Tablo 7)



Şekil 19: Gruplar arası Elastiklik modülü (E) değerlerinin kıyaslaması, KNTR: Kontrol grubu, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu

Şekil 20, deney grupları için “ σ - ϵ ” eğri karakteristiklerini göstermektedir. Seçilen eğriler kendi grupları içerisinde, bulunduğu grubun ortalama karakteristiğini sergilemektedir. Şekil 20’de gösterildiği ve önceki değerlendirmelerde bahsedildiği gibi, KNTR grubunun deformasyona yatkın olduğu ve diğer gruplardan daha az gerilme değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Grafikte, PTNT ve DNYS gruplarında eğim oranlarının birbirine yaklaştığı, maksimum gerilme ve gerilme miktarları arasında küçük farklılıkların olduğu izlenmektedir. Deney gruplarının Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19’daki bar grafik kıyaslamaları ile Şekil 20’de verilen “ σ - ϵ ” eğrilerinin birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 20: Gruplar arası “σ-ε” eğrilerinin karşılaştırılması, KNTR: Kontrol grubu, PTNT: Patentli cihaz grubu, DNYS: Deneysel cihaz grubu

5. TARTIŞMA

Korneal kollajen crosslinking araştırmalarının başından beri tedavi güvenliği çalışmaların 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 alıřması⁸ öncesinde, riboflavin konsantrasyonu, UVA ışık yoğunluk ve süresi, gerekli kornea kalınlığı düzeyide dahil tüm CXL tedavi parametreleri, hem tedavi etkinliğini, hemde oküler yapılar da gelişebilecek hasarı değerlendirmek amacıyla zaman ve doz bağımlı hayvan deneyleri ile belirlenmiştir.^{8, 77, 96, 97} Sonuçta, kornea endoteli ve derin oküler yapıların (iris, lens, retina) korunması zorunludur ve bu standart bir protokol ile sağlanır.

Wollensak ve ark⁸ UVA-riboflavin ile yapılan standart CXL tedavide şu güvenlik kriterlerini önermektedirler; korneal kalınlık en az 400 μm olmalı, UVA enerjisi 3mW/cm^2 (370 nm), UVA uygulama öncesi ve uygulanması esnasında kornea devamlı riboflavin solusyonu ile kaplı tutularak, perde etkisi sağlanmalıdır.⁹⁸

UV ışınları canlı dokular için toksiktir. UV'nin tetiklediği keratosit hasarı ve bu hasarın UV dalga boyu ve dozuna bağlı olduğu çalışmalarda bildirilmiştir.^{45, 47} 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' stroma tarafından absorbe edilmektedir.³⁵ Bu yüzden tavşan kornealarının, UV-A'ya maruz bırakılmalarını takiben masif keratosit hasarı özellikle n stromada gözlenir.^{39, 40} Sitotoksik etki, UVA'nın oksidan etkisinden kaynaklanır ve riboflavin, UVA'nın korneal stromada absorpsiyonunu arttırarak (yaklaşık % 30'dan⁹⁹ % 95'e⁸⁶) bu etkiyi güçlendirmektedir.

UVA'nın indüklediği hücresel hasar, ROS retimi nedeniyle meydana gelir. ROS, biyotoksiktir ancak aynı zamanda kollajen fibriller arasında çapraz köprüleri oluşturarak crosslinking tedavinin esasını teşkil ederler.⁶⁹ 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.⁷² 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.

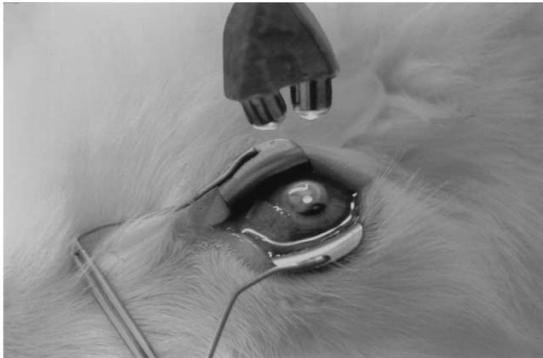
Yapılan in vivo tavşan çalışmalarında, riboflavin/UVA uygulaması ile keratositler için sitotoksik UVA eşik düzeyinin 0.5-0.7 mW/cm², endotel hücreleri için ise 0.35 mW/cm² olduğu gösterilmiştir.^{86, 100} Bu durumda, relatif olarak ince olan tavşan korneasında (~300 µm) 3mW/cm²'lik yüzeysel ışın dozunda (standart tedavi dozu⁸), keratosit ve endotel hücreleri için sitotoksik eşik doza ulaşılır, masif keratosit ve endotel hücre hasarı meydana gelir.^{86, 97} Aynı doz (3 mW/cm²) keratokonus hastalarının tedavisinde kullanılır, ancak endotel hücre hasarına yol açmaz. Çünkü, insan korneası daha kalındır. (≥400 µm)^{41, 43} Tavşanlarda retinal hasar için UVA doz eşiği ise 4.3 mW/cm²'dir.⁴⁴⁻⁴⁶ Bu eşik değere standart tedavi dozuyla ulaşamaz.

Tavşanlar üzerinde deneysel crosslinking cihazının güvenliğini karşılaştırmalı histopatolojik örneklerle göstermek istediğimiz çalışmamızda, postoperatif 3. ve 7. gün deneklerinde, her iki grupta da (PTNT-DNYS) ön stroma düzeyinde keratosit kaybı olduğu, ancak arka stromada keratosit yoğunluğu ve dağılımının normal olduğunu, 28. gün deneklerinde, ön stromada keratosit sayısının artmaya başladığını, 42. gün deneklerinde ise tüm stroma katlarında keratositlerin normal dağılım gösterdiğini saptadık. Tüm deneklerde epitel ve endotel tabakalarının intakt olduğunu, geçirilmiş korneal ülser bulguları olan ve çalışma dışı bıraktığımız denek haricinde inflamasyon bulgusunun olmadığını gördük.

Her iki gruba ait verileri niceliksel olarak karşılaştırdığımızda, ortalama keratosit sayısı, ortalama kornea kalınlığı ve korneal ödem açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunmadığını saptadık. Denekleri erken (postoperatif ilk 7 gün denekleri) ve geç (postoperatif 7. gün sonrası) dönem olarak gruplandırdığımızda ise, yine aynı değişkenler açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığını gördük.

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.¹⁰¹ 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.

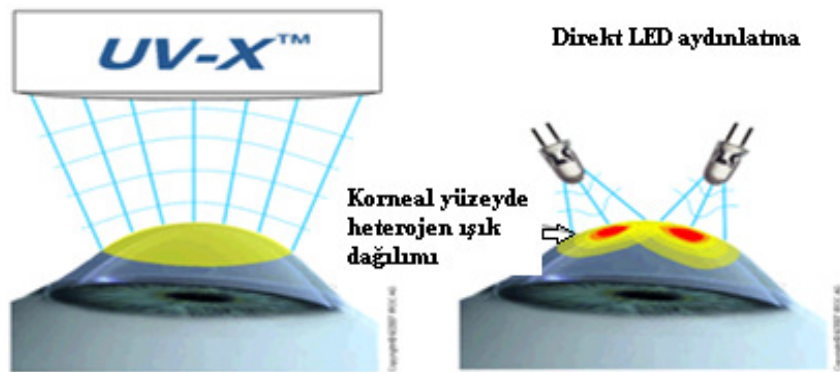
Literatürde, tavşanlarda riboflavin/UVA uygulaması (standart tedavi parametreleri ile) sonrası erken postoperatif dönemde, tam kat keratosit ve endotel hücre apoptozunu histopatolojik olarak gösteren başka çalışmalarda bulunmaktadır.^{86, 97, 102} Bu çalışmalarda, Wollensak ve ark.'nın çalışmasına¹⁰¹ 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.¹⁰³



Şekil 21: 2 diodlu LED (Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria) ışık kaynağı⁸⁶

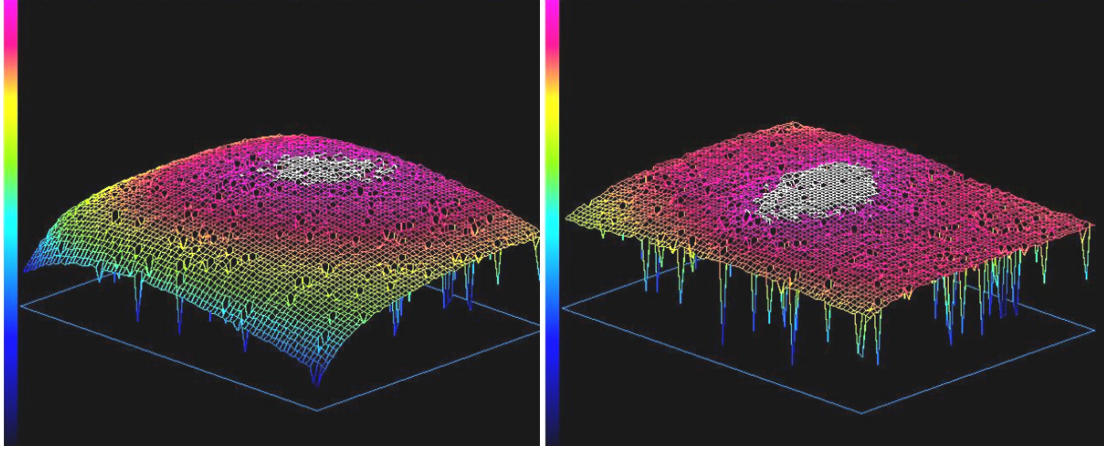
CXL tedavi ile ilgili tüm güvenlik konuları, UVA uygulama alanında homojen bir UV ışınımı oluşturma esasına dayanmaktadır. Ancak sıcak noktalar gibi optik heterojeniteler, ışınım 3 mW/cm^2 'nin altında bile olsa, lokalize endotel hasarına yol açabilirler. Bu nedenle, klinik olarak kullanılan ışık kaynakları, ışınlanan alan boyunca mükemmel homojeniteyi garanti etmelidirler.¹⁰⁴ UVA aydınlatma sistemi, pik ışınım dalga boyu 365 nm olan UV LED'leri temeline dayanır. Bir ışın yolu, Koehler'e¹⁰⁵ göre, kornea üzerinde homojen bir ışınım sağlamak için, mikro düzeyde homojenize özel bir ışın¹⁰⁶ 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.¹⁰⁷

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

Tedavi güvenliğini kanıtlamaya çalıştığımız deneysel cihazımız ise, uygun maliyet açısından tek UVA diodu barındırmakta, ancak direkt LED aydınlatma esasına dayanmamaktadır. UVA ışık optik fiber kablo aracılığı ile sisteme taşınmaktadır. Newport Beam Profiler (Newport Corp, Irvine CA, USA) ile patentli ve deneysel crosslinking cihazlarına ait UVA şiddet dağılım profilleri Şekil 23’de gösterilmiştir.



Şekil 23: Newport Beam Profiler (Newport Corp, Irvine CA, USA) ile alınmış UVA şiddet dağılım görüntüleri, solda patentli ‘UV-X Illumination System’'e, sağda deneysel olarak ürettiğimiz crosslinking cihazına ait UVA şiddet dağılım profili görülmektedir, dikdörtgen alan tedavi sahasını temsil etmektedir

Newport Beam Profiler, CCD üzerinde piksel başına düşen ışık gücünü, dolayısıyla UVA ışığın şiddet dağılımını ölçmektedir. Sonuçlar, 3 boyutlu olarak sunulmaktadır. Görüldüğü üzere deneysel cihaz, patentli cihaza kıyasla daha homojen bir UVA dağılımı sağlamıştır.

CXL tedavi sonrası erken dönemde literatür örneklerinde görülen, ancak çalışmamızda her iki cihaz grubundada 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 cihaz grubundada ön stromada 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.¹⁰¹ Biz çalışmamızda hiçbir

denekte endotel hücre kaybına rastlamadık. Ancak, deneklerimizde korneal ödemi subjektif olarak sınıflandırdık ve santral kornea kalınlığını formaldehit ile tespit edilmiş dokularda ışık mikroskobu ile ölçtük. Her iki grupta da (PTNT-DNYS), erken (ilk 7 gün) ve geç (7. gün sonrası) dönem denekler arasında korneal ödem açısından bir fark tespit etmememize rağmen, korneal kalınlığı pre ve postoperatif dönemde ultrasonik pakimetri ile ölçerek değerlendirebilirdik.

Esquenazi ve ark.'nın tavşanlarda riboflavin/UVA uygulama sonrası, TUNEL boyama ile keratositlerdeki ultrastrukturel 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.¹⁰⁸ Kullanılan UVA ışık kaynağının belirtilmediği bu çalışmada, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde postoperatif erken dönemde gelişen keratosit hasarı ön stroma ile sınırlı kalmış ve endotel hücre kaybı gelişmemiştir. Çalışmamızda her iki grupta da, Wollensak ve ark.'nın¹⁰¹ çalışmasında olduğu gibi postoperatif 42. günde keratosit repopulasyonunun tüm stroma katlarında tamamlandığını ve sürecin tümüyle normale döndüğünü gözlemledik. Ancak bu çalışmada, keratosit repopulasyonunun postoperatif 10. haftaya kadar uzadığı bildirilmektedir. Her üç çalışmada da ortak sonuç, keratosit repopulasyonunun arka stromadan başlayıp kademeli olarak ön stromaya ulaşmış olmasıdır. 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 travması¹⁰⁹, LASİK ve PRK gibi refraktif cerrahi prosedürlerden sonrada gösterilmiştir.¹¹⁰ Keratosit apoptozu, korneal yara iyileşme cevabının tetikçisi olarak düşünülür ve kompleks yara iyileşme kaskadını başlatmaktadır.¹¹¹ CXL tedavide, apoptotik hücre ölümü tipik olarak UVA hasarı sonrasında meydana gelmektedir.¹¹² 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 düşünülen bu hastalıkta sorun olabilir. Ancak, keratokonuslu hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, 4 yıllık takiplerde keratosit kaybına bağlı stromal skar veya korneal incelme bulgusuna rastlanmamıştır.⁸

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.⁸⁵

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 ulaşamaz.⁸⁶ Keratokonuslu hastalarda, CXL tedavi sonrası endotel hücre hasarının konfokal mikroskop^{73, 85} ve endotelial speküler mikroskop¹¹³ 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.'nın¹⁰⁸ çalışma sonuçlarına benzer şekilde, tedavi sonrası her iki grupta hiçbir denekte endotel hücre hasarı gözlemedik.

LASIK ve PRK sonrası α -aktin (+) hücreler (myofibroblastlar), korneal yara iyileşme sürecinde gösterilmiştir.¹¹⁴ Myofibroblastların, yara yeri kontraksiyonu, korneal bulanıklıkta artış, artan miktarlarda disorganize kollajen üretmek gibi refraktif cerrahi etkilerini azaltıcı fonksiyonları bulunmaktadır.^{115, 116} Keratokonusta, CXL tedavi sonrası hastaların % 50'sinde görülen keratometri değerindeki hafif düzelmeye⁸ (~ 2 D), myofibroblastik aktivite, stromal yeniden yapılanma¹¹⁶ ve fibröz doku artışı¹¹⁵ ile kısmen açıklanabilmektedir. Çalışmamızda immunohistokimyasal değerlendirmede, 6 ve 7. deneklerin sağ gözlerinde (PTNT grubu), 5. deneğin sol göz örneğinde (DNYS grubu) 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 görülmüştür.¹⁰¹ 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 görüldüğü bildirilmektedir.¹⁰⁸ Çalışmamızda, postoperatif dönemde ortaya çıkıp bir süre sonra kaybolan bu hücreleri değerlendirmede denek sayılarının yetersiz kaldığını düşündük. Gruplardaki denek sayıları artırılıp, postoperatif değerlendirme aralıkları kısaltılarak daha sağlıklı sonuçlar alınabilirdi.

Deneysel crosslinking cihazının tedavi etkinliğini değerlendirdiğimiz ikinci aşamada, CXL tedavi sonrası hem patentli hemde deneysel cihaz ile denek kornealarında önemli bir sertleşme olduğunu tespit ettik. Korneal sertliğin bir ifadesi olan Young modülü, KNTR grubuna göre PTNT grubunda % 87, DNYS grubunda ise % 113 artış gösterdi. Denek kornealarına ait maksimum gerilim (mukavemet) değerleri, KNTR grubuna göre PTNT grubunda % 32, DNYS grubunda ise % 45 artış gösterdi. Gruplara ait maksimum gerilim değerleri karşılaştırıldığında ise, KNTR grubuna göre PTNT grubunda % 28, DNYS grubunda ise % 40'lık bir azalma gerçekleşti.

İstatistiksel değerlendirmede, gruplar değişkenler açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir farklılığın olduğunu, ikili gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, PTNT-DNYS grupları arasında farklılık olmadığını gördük. Maksimum gerilim değerleri için PTNT-KNTR grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptamadık, bu durumun 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.¹¹⁷ Keratokonuslu gözlerde ise korneal mukavemet yaklaşık % 36 oranında azalmaktadır.¹¹⁸ 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 artışının⁷⁹, enzimatik sindirime karşı direnç artışının⁸¹, keratosit apoptozunun⁸⁶ ve biyomekanik sertleştirici etkinin⁷⁸ ilk 350 µm'lik esas olarak ilk 242 µm'lik korneal stromada gerçekleştiği¹¹⁹, bunun riboflavinin UVA'yı büyük oranda ön stromada absorbe etmesi nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür.⁷⁸ Normal gözler üzerinde yapılan çalışmalarda, ön stromanın doğal yapısının daha sert olduğu ve bu durumun, korneal kurvatürün korunmasında önemli bir etken olduğu bildirilmiştir.¹²⁰ Keratokonus hastalarında ise, CXL tedavi ile maksimum crosslinking etkinin ön stromada ortaya çıkmasının bu anlamda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.⁷⁷

Wollensak ve ark.'nın domuz ve insan korneaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, CXL tedavi ile hem insan hemde 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.⁷⁷

Wollensak ve ark.'nın tavşan korneaları üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada, denekler 3 gruba ayrılmış, 1. gruba standart CXL tedavi, 2. gruba korneal epitel kaldırılmadan koruyucu içerikli topikal anestezi kullanılarak, 3. gruba ise korneal epitel kaldırılmadan koruyucu içermeyen topikal anestezi kullanılarak CXL tedavi uygulanmış. Korneal örnekler biyomekanik testlere tabi tutulmuş. Young modülündeki artış, 1. grupta % 102, 2. grupta % 21 olarak gerçekleşirken, grup 3 de kontrollere göre bir fark saptanmamış. Maksimum mukavemet değerlerindeki artış, 1. grupta % 141, 2. grupta % 26 olurken, 3. grupta artış saptanmamış. Gruplara ait maksimum gerinim değerlerinde ise, 1. grupta % 0.50'lik bir azalma gözlenirken, 2. grupta % 3 ve 3. grupta % 2'lik bir artış saptanmış. Sonuçta ortaya çıkan bu farkın, epitel kaldırılmayan gruplarda riboflavinin homojen olmayan stromal dağılımına bağlı olduğu öne sürülmüş.¹⁰² Çalışmamızda, her iki cihaz ile yaptığımız uygulamalarda, bu çalışmadaki standart tedavi grubuyla benzer Young modülü artış oranları saptadık. Ancak, deneklerimize ait kornealardaki gerinim azalması, her iki cihaz grubundada bu çalışmadaki değerlerden daha yüksek oranlarda gerçekleşti.

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.¹²¹ Çalışmamızda, her iki cihaz grubu ile elde ettiğimiz Young modülü artış oranları bu çalışma ile yakın düzeylerde gerçekleşmiştir.

Verilen literatür örneklerinde, CXL tedavi sonrası in vitro şartlarda korneanın biyomekanik özelliklerinin değerlendirilebileceği gösterilmiştir. İn vivo şartlarda ise korneal biyomekanik özellikler çeşitli cihaz ve parametreler ile değerlendirilmektedir. Ocular Response Analyzer (ORA; Reichert, Inc, Buffalo,

NY), in vivo şartlarda kornal biyomekanik özellikleri 2 parametre ile değerlendirmektedir. Bunlar, korneanın viskozite özelliğini yansıtan korneal histerezis (CH) ve korneal rezistans faktör (CRF)'dür.¹²² Keratokonusu, CH ve CRF değerlerinde azalma olduğu¹²³ ve bu değişimin başlıca korneanın proteoglikan ve glikozaminoglikan içeriğindeki azalmaya bağlı olduğu gösterilmiştir.¹²⁴ Keratokonuslu hastalarda CXL tedavi sonrası ORA ile korneal biyomekanik değişikliklerin değerlendirildiği klinik çalışmalarda, postoperatif 6-12 aylık takiplerde CH ve CRF'de istatistiksel anlamlı bir farklılığın ortaya çıkmadığı saptanmıştır.¹²⁵⁻¹²⁸ Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada, cihaza yüklenen yeni bir yazılım ile farklı parametreler kullanılarak keratokonuslu kornealardaki biyomekanik değişikliklerin gösterilebileceği bildirilmiştir.¹²⁹

Klinik olarak korneal biyomekanik özellikleri değerlendirmede kullanılabilecek diğer yöntemler, Holographic interferometry¹³⁰, Electronic Speckle Pattern İnterferometry¹³¹ ve Dynamic Corneal İmaging¹³², dir. Ancak, bu yöntemleri kullanarak yapılmış bir klinik çalışma bulunmamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

CXL tedavi güvenlik parametreleri gözetilerek üretilen ‘‘UV-X Illumination System’’ ile deneysel crosslinking cihazının, kornea yüzeyinde homojen bir ışınım oluşturması ve istatistiksel olarak farklı olmayan histopatolojik değişiklikleri göstermesi, deneysel cihazında tedavide güvenle kullanılabilmesini göstermektedir. Preoperatif dönemde UVA uygulama öncesi her denekte enerji kalibrasyonu yapılmasına rağmen, tedavi süresince kornea yüzeyindeki ısı değişimlerinin ölçülmesi, histopatolojik örneklerde limbal hücre toksisitesinin araştırılması, postoperatif dönemde göziçi basıncının takibi ve elde edilen verilerin patentli cihaz ile kıyaslanması ileride yapılacak çalışmalar ile değerlendirilebilir.

CXL tedavi sonrası biyomekanik testlerde, her iki cihaz grubu ile kontrollere göre % 28-40 aralığında gerçekleşen gerinim azalması, dokuların esneme kabiliyetlerindedeki 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 cihaz grubu içinde söyleyebiliriz. Patentli ve deneysel cihaz gruplarında, % 87-113 aralığında gerçekleşen ve gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılığın olmadığı korneal sertlik artışı, literatürde tanımlanan CXL tedavi sonrası ‘‘korneal donma’’ etkisini açıklamaktadır. CXL tedavi 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.

Üniversitemizde, multidisipliner bir yaklaşımla üretilen deneysel crosslinking cihazının, etkinlik ve maliyet kriterleri göz önüne alındığında cost efektif olduğunu söyleyebiliriz. Ancak, crosslinking cihazı üreten patent sahibi firmaların, cihaz maliyetinin yanısıra AR-GE faaliyetleri ve satış sonrası teknik destek gibi maliyet gerektiren konularada ciddi yatırımlar yaptıklarını bilmekteyiz. Sağlık harcamalarının son 10 yılda 10 kattan fazla arttığı ülkemizde, göreceli olarak sık görülen ve morbidite

oranı yüksek olan bu grup hastalıkta, yerli üretim crosslinking cihazı kullanılmasının ülke ekonomisine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7. ÖZET

KERATOKONUS TEDAVİSİNDE KULLANILAN CROSSLINKİNG CİHAZININ DENEYSEL OLARAK ÜRETİLMESİ, GÜVENİRLİLİĞİNİN VE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç ve Kapsam: Keratokonus ve diğer korneal ektazilerin tedavisinde başarıyla kullanılmakta olan ‘‘UV-X İllumination System (Peschke Meditrade GmbH, Switzerland)’’ benzeri bir crosslinking cihazının, güvenlik parametreleri gözetilerek uygun maliyetlerle üretilbileceğini ortaya koymak

Gereç ve Yöntem: Kocaeli Üniversitesi Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (LATARUM) bünyesinde, patentli ‘‘UV-X İllumination System’’ ile benzer özelliklere sahip deneysel crosslinking cihazı üretildi. Çalışma iki aşamalı olarak planlandı. İlk aşamada, 12 tavşanın sağ gözlerine histopatolojik çalışmalarla güvenilirliği kanıtlanmış patentli cihaz (PTNT) ile, sol gözlerine deneysel cihaz (DNYS) ile kollajen crosslinking (CXL) tedavi uygulandı. Uygulamayı takiben 3, 7, 28 ve 42. günlerde enükleasyon sonrası denek kornealarından histopatolojik kesitler hazırlanarak, ışık mikroskobu altında keratosit apoptozu, korneal ödem, korneal kalınlık, myofibroblastik aktivite ve inflamasyon değerlendirildi. İkinci aşamada 8 tavşan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (PTNT) ve Grup 2 (DNYS) de 3'er tavşanın heriki gözüne sırasıyla, PTNT ve DNYS cihaz ile CXL tedavi uygulandı. Grup 3 (KNTR)'deki 2 denek kontrol olarak kullanıldı. Denek kornealarından hazırlanan korneal şeritler, bilgisayar destekli biyomateryal test cihazı ile biyomekanik testlere tabi tutuldu.

Bulgular: Histopatolojik değerlendirmede, heriki cihaz grubunda CXL tedavi sonrası erken dönemde ön stroma düzeyinde keratosit kaybı görüldü. Arka stromada keratosit yoğunluğu normaldi ve endotel hücre hasarı görülmeydi. 6. hafta sonunda 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,

PTNT grubunda % 87, DNYS grubunda % 113 oranında artış gösterdi. Ancak, gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. ($P>0.05$)

Tartışma ve Sonuç: CXL tedavi güvenlik parametreleri gözetilerek üretilen ‘‘UV-X Illumination System’’ ile deneysel crosslinking cihazının kornea yüzeyinde homojen bir ışınım oluşturması ve istatistiksel olarak farklı olmayan histopatolojik değişiklikleri göstermesi, deneysel cihazında tedavide güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Biyomekanik testlerde, heriki cihaz ile tedavi sonrası etkileyici düzeyde korneal sertlik artışı saptanmıştır. Üniversitemizde üretilecek yerli crosslinking cihazının, etkinlik-maliyet kriterleri göz önüne alındığında cost efektif olduğunu ve bu tür girişimlerin ülke ekonomisine katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Keratokonus, deneysel crosslinking cihazı, güvenlik, etkinlik

8. ABSTRACT

EXPERIMENTAL PRODUCTION, EVALUATION OF RELIABILITY AND EFFECTIVENESS OF CROSSLINKING DEVICE USED IN THE KERATOCONUS TREATMENT

Purpose: To demonstrate cost-effective production of a crosslinking device like “UV-X Illumination System (Meditrade Peschke GmbH, Switzerland)” used successfully in keratoconus and other corneal ectasias considering the appropriate security parameters.

Materials and Methods: Experimental crosslinking device that has similar properties with patented “UV-X Illumination System” was produced in Kocaeli University Laser Technologies Research and Application Center (LATARUM). Study was planned as two stages. At the first stage, collagen crosslinking (CXL) treatment was given to right eyes of 12 rabbits using patented device (PTNT) with histopathologically proven reliability and to the left eyes using the experimental device (DNYS). Keratocyte apoptosis, corneal edema, corneal thickness, myofibroblastic activity and inflammation were evaluated under light microscope preparing histopathological sections from corneas of subjects after enucleation in 3, 7, 28 and 42. days. 8 rabbits were used at the second stage. The subjects were divided into 3 groups. CXL treatment was performed in both eyes of three rabbits from Group 1 (PTNT) and Group 2 (DNYS) with the PTNT and DNYS devices, respectively. Corneal strips prepared from the corneas of subjects were tested with biomechanic tests using computer-controlled biomaterial testing device.

Results: Keratocyte loss was seen at the anterior of the stroma in histopathological evaluation early after CXL treatment with both groups of devices. Keratocyte density was normal at the posterior of the stroma and there were no damages on endothelial cells. At the end of the sixth week, 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 87% increase in PTNT group and 113% increase in DNYS group compared to

the controls in biomechanical evaluation. However, no statistically significant difference was found between the groups ($P>0.05$).

Conclusion: CXL treatment is safe to use in experimental device, because of creating a homogeneous radiation on the surface of the cornea with "UV-X Illumination System" by considering the security parameters and with the experimental crosslinking device, not showing statistically different histopathological changes. An impressive increase in corneal rigidity has been identified in biomechanical tests after treatment with both devices. We think that local crosslinking device produced in our university may be cost effective and such initiatives will contribute to the economy of our country.

Keywords: Keratoconus, experimental crosslinking device, security, efficiency

9. KAYNAKLAR

- [1] Tan DT, Por YM. Current treatment options for corneal ectasia. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007;**18**: 284-9.
- [2] Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;**42**: 297-319.
- [3] Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology*. 1994;**101**: 439-47.
- [4] Arentsen JJ, Laibson PR. Thermokeratoplasty for keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1976;**82**: 447-9.
- [5] 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*. 2006;**22**: 764-71.
- [6] Vajpayee RB, Sharma N. Epikeratoplasty for keratoconus using manually dissected fresh lenticules: 4-year follow-up. *J Refract Surg*. 1997;**13**: 659-62.
- [7] Amayem AF, Anwar M. Fluid lamellar keratoplasty in keratoconus. *Ophthalmology*. 2000;**107**: 76-9; discussion 80.
- [8] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;**135**: 620-7.
- [9] 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*. 2007;**33**: 2035-40.
- [10] 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*. 2010;**26**: 486-97.
- [11] Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea*. 2008;**27**: 590-4.
- [12] Spadea L. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in pellucid marginal degeneration. *J Refract Surg*. 2010;**26**: 375-7.
- [13] 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*. 2009;**25**: S803-6.
- [14] Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res*. 2009;**41**: 114-7.
- [15] 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*. 2008;**24**: S730-6.
- [16] Duke-Elder S. LA. Diseases of the outer eye. *System of ophthalmology*. 1965;**8**: 964-97.
- [17] Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1986;**101**: 267-73.
- [18] Austin MG, Schaefer RF. Marfan's syndrome, with unusual blood vessel manifestations. *AMA Arch Pathol*. 1957;**64**: 205-9.
- [19] Kuming BS, Joffe L. Ehlers-Danlos syndrome associated with keratoconus. A case report. *S Afr Med J*. 1977;**52**: 403-5.
- [20] Elder MJ. Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1994;**31**: 38-40.

- [21] Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;**39**: 2537-46.
- [22] Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol.* 2000;**84**: 834-6.
- [23] Cristina Kenney M, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye.* 2003;**26**: 139-46.
- [24] Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet.* 2000;**93**: 403-9.
- [25] Edwards M, McGhee CN, Dean S. The genetics of keratoconus. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2001;**29**: 345-51.
- [26] Kim WJ, Shah S, Wilson SE. Differences in keratocyte apoptosis following transepithelial and laser-scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg.* 1998;**14**: 526-33.
- [27] Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea.* 2000;**19**: S7-12.
- [28] Sawaguchi S, Yue BY, Sugar J, Gilboy JE. Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1989;**107**: 1507-10.
- [29] 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.* 1998;**39**: 1117-24.
- [30] Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, Wilson PM, Sugar J, Chan SK. Alpha-1 proteinase inhibitor levels in keratoconus. *Exp Eye Res.* 1990;**50**: 549-54.
- [31] Sawaguchi S, Twining SS, Yue BY, et al. Alpha 2-macroglobulin levels in normal human and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;**35**: 4008-14.
- [32] 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.* 2005;**46**: 823-32.
- [33] Kenney MC, Brown DJ, Rajeev B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *CLAO J.* 2000;**26**: 10-3.
- [34] Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;**39**: 471-5.
- [35] Tsubai T, Matsuo M. Ultraviolet light-induced changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of porcine corneas. *Cornea.* 2002;**21**: 495-500.
- [36] Gondhowiardjo TD, van Haeringen NJ, Volker-Dieben HJ, et al. Analysis of corneal aldehyde dehydrogenase patterns in pathologic corneas. *Cornea.* 1993;**12**: 146-54.
- [37] Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brannstrom T, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;**42**: 2293-6.
- [38] Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002;**50**: 341-51.
- [39] Scroggs MW, Proia AD. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea.* 1992;**11**: 553-9.
- [40] 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.* 1996;**5**: 518-25.
- [41] Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res.* 1999;**69**: 475-81.

- [42] Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: I. *Am J Ophthalmol.* 1963;**55**: 18-47.
- [43] Tuori AJ, Virtanen I, Aine E, Kalluri R, Miner JH, Uusitalo HM. The immunohistochemical composition of corneal basement membrane in keratoconus. *Curr Eye Res.* 1997;**16**: 792-801.
- [44] 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.* 2001;**22**: 333-40.
- [45] Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res.* 2003;**77**: 515-24.
- [46] Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Kaiya T, Sugar J, Yue BY. Three-dimensional scanning electron microscopic study of keratoconus corneas. *Arch Ophthalmol.* 1998;**116**: 62-8.
- [47] Takahashi A, Nakayasu K, Okisaka S, Kanai A. [Quantitative analysis of collagen fiber in keratoconus]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 1990;**94**: 1068-73.
- [48] Critchfield JW, Calandra AJ, Nesburn AB, Kenney MC. Keratoconus: I. Biochemical studies. *Exp Eye Res.* 1988;**46**: 953-63.
- [49] Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). *Am J Ophthalmol.* 2002;**134**: 689-95.
- [50] Sherwin T, Brookes NH. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2004;**32**: 211-7.
- [51] McMahon TT, Szczotka-Flynn L, Barr JT, et al. A new method for grading the severity of keratoconus: the Keratoconus Severity Score (KSS). *Cornea.* 2006;**25**: 794-800.
- [52] Jhanji V, Sharma N, Vajpayee RB. Management of keratoconus: current scenario. *Br J Ophthalmol.* 2011;**95**: 1044-50.
- [53] Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology.* 2006;**113**: 1633-8.
- [54] Richard JM, Paton D, Gasset AR. A comparison of penetrating keratoplasty and lamellar keratoplasty in the surgical management of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1978;**86**: 807-11.
- [55] Kaufman HE, Werblin TP. Epikeratophakia for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1982;**93**: 342-7.
- [56] Gasset AR, Kaufman HE. Thermokeratoplasty in the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1975;**79**: 226-32.
- [57] Sompuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol.* 2004;**121**: 190-9.
- [58] Foote CS. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science.* 1968;**162**: 963-70.
- [59] Fujimori E. Cross-linking of collagen CNBr peptides by ozone or UV light. *FEBS Lett.* 1988;**235**: 98-102.
- [60] Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res.* 1998;**66**: 97-103.
- [61] Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, Seiler T, Knuschke P. [Studies on the stabilization of the cornea in rabbits]. *Ophthalmologe.* 2000;**97**: 203-6.
- [62] Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006;**29**: 1420-32.

- [63] John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond)*. 1993;**7** (Pt 2): 230-7.
- [64] Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;**214**: 793-7.
- [65] 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*. 2007;**32**: 11-9.
- [66] 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*. 1992;**1138**: 222-8.
- [67] Seiler T, Huhle S, Spoerl E, Kunath H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000;**238**: 822-5.
- [68] Kuo IC, Broman A, Pirouzmanesh A, Melia M. Is there an association between diabetes and keratoconus? *Ophthalmology*. 2006;**113**: 184-90.
- [69] Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;**17**: 356-60.
- [70] Abad JC. Corneal Collagen Cross-linking Induced by UVA and Riboflavin (CXL). *Techniques in Ophthalmology*. 2008: 8-12.
- [71] Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2007;**33**: 75-80.
- [72] Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 2007;**26**: 385-9.
- [73] 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*. 2006;**32**: 837-45.
- [74] 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*. 2007;**33**: 1982-4.
- [75] 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*. 2009;**147**: 774-8, 78 e1.
- [76] Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol*. 2008;**86**: 549-51.
- [77] 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*. 2003;**29**: 1780-5.
- [78] 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*. 2006;**32**: 279-83.
- [79] Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*. 2004;**23**: 503-7.
- [80] Spoerl E, Wollensak G, Dittert DD, Seiler T. Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea. *Ophthalmologica*. 2004;**218**: 136-40.
- [81] Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. 2004;**29**: 35-40.
- [82] Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea*. 2008;**27**: 353-6.
- [83] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. [Treatment of keratoconus by collagen cross linking]. *Ophthalmologe*. 2003;**100**: 44-9.

- [84] 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.* 2008;**146**: 527-33.
- [85] 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.* 2007;**26**: 390-7.
- [86] Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg.* 2003;**29**: 1786-90.
- [87] 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.* 2007;**33**: 1005-8.
- [88] Herrmann CI, Hammer T, Duncker GI. [Hazeformation (corneal scarring) after cross-linking therapy in keratoconus]. *Ophthalmologie.* 2008;**105**: 485-7.
- [89] Raiskup F, Hoyer A, Spoerl E. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;**25**: S824-8.
- [90] Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J Cataract Refract Surg.* 2009;**35**: 588-9.
- [91] 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.* 2009;**35**: 788-91.
- [92] 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.* 2007;**33**: 2135-7.
- [93] Koziol J, Knobloch E. The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin. *Biochim Biophys Acta.* 1965;**102**: 289-300.
- [94] Fujimori E. Cross-linking and fluorescence changes of collagen by glycation and oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1989;**998**: 105-10.
- [95] Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br J Ophthalmol.* 2010;**94**: 965-70.
- [96] Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg.* 2007;**33**: 516-21.
- [97] Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea.* 2004;**23**: 43-9.
- [98] Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Pillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res.* 2003;**35**: 324-8.
- [99] 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**: 105-14.
- [100] Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (Lond).* 2004;**18**: 718-22.
- [101] Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, Herbst H. Wound healing in the rabbit cornea after corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Cornea.* 2007;**26**: 600-5.
- [102] Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *J Cataract Refract Surg.* 2009;**35**: 540-6.

- [103] 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*. 2010;**29**: 409-11.
- [104] Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, Raiskup F. Corneal cross-linking and safety issues. *Open Ophthalmol J*. 2011;**5**: 14-6.
- [105] A K. "Gedanken zu einem neuen Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke". *Germany: Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*. 1893.
- [106] 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: 28-33.
- [107] 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: 1-11.
- [108] Esquenazi S, He J, Li N, Bazan HE. Immunofluorescence of rabbit corneas after collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A. *Cornea*. 2010;**29**: 412-7.
- [109] Ambrosio R, Jr., Kara-Jose N, Wilson SE. Early keratocyte apoptosis after epithelial scrape injury in the human cornea. *Exp Eye Res*. 2009;**89**: 597-9.
- [110] Wilson SE. Everett Kinsey Lecture. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. *CLAO J*. 1998;**24**: 181-5.
- [111] Bilgihan K, Bilgihan A, Adiguzel U, et al. Keratocyte apoptosis and corneal antioxidant enzyme activities after refractive corneal surgery. *Eye (Lond)*. 2002;**16**: 63-8.
- [112] Podskochy A, Gan L, Fagerholm P. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea*. 2000;**19**: 99-103.
- [113] 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*. 2008;**24**: S720-5.
- [114] Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*. 2003;**76**: 71-87.
- [115] Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res*. 1999;**18**: 311-56.
- [116] Dupps WJ, Jr., Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res*. 2006;**83**: 709-20.
- [117] WH. MGS. *Principles of Medical Biochemistry*. 2nd ed. St Louis: MO: Mosby Co.; 2006.
- [118] Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*. 1980;**31**: 435-41.
- [119] Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Ophthalmol*. 2009;**87**: 193-8.
- [120] Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol*. 2001;**85**: 437-43.
- [121] Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol*. 2009;**87**: 48-51.
- [122] Luce DA. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg*. 2005;**31**: 156-62.

- [123] Shah S, Laiquzzaman M, Bhojwani R, Mantry S, Cunliffe I. Assessment of the biomechanical properties of the cornea with the ocular response analyzer in normal and keratoconic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;**48**: 3026-31.
- [124] Akhtar S, Bron AJ, Salvi SM, Hawksworth NR, Tuft SJ, Meek KM. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2008;**86**: 764-72.
- [125] Goldich Y, Barkana Y, Morad Y, Hartstein M, Avni I, Zadok D. Can we measure corneal biomechanical changes after collagen cross-linking in eyes with keratoconus?--a pilot study. *Cornea.* 2009;**28**: 498-502.
- [126] Sedaghat M, Naderi M, Zarei-Ghanavati M. Biomechanical parameters of the cornea after collagen crosslinking measured by waveform analysis. *J Cataract Refract Surg.* 2010;**36**: 1728-31.
- [127] AlbèE. Measuring corneal biomechanical properties in keratoconic eyes undergoing crosslinking. *Cataract & Refractive Surgery Today Europe*; 2008:333-34.
- [128] Vinciguerra P, Albe E, Mahmoud AM, Trazza S, Hafezi F, Roberts CJ. Intra- and postoperative variation in ocular response analyzer parameters in keratoconic eyes after corneal cross-linking. *J Refract Surg.* 2010;**26**: 669-76.
- [129] Spoerl E, Terai N, Scholz F, Raiskup F, Pillunat LE. Detection of biomechanical changes after corneal cross-linking using Ocular Response Analyzer software. *J Refract Surg.* 2011;**27**: 452-7.
- [130] Kasprzak H, Forster W, von Bally G. Measurement of elastic modulus of the bovine cornea by means of holographic interferometry. Part 1. Method and experiment. *Optom Vis Sci.* 1993;**70**: 535-44.
- [131] Jaycock PD, Lobo L, Ibrahim J, Tyrer J, Marshall J. Interferometric technique to measure biomechanical changes in the cornea induced by refractive surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2005;**31**: 175-84.
- [132] Grabner G, Eilmsteiner R, Steindl C, Ruckhofer J, Mattioli R, Husinsky W. Dynamic corneal imaging. *J Cataract Refract Surg.* 2005;**31**: 163-74.