

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İYONTOFOREZ DESTEKLİ ROSE BENGAL VE
YEŞİL IŞIK KORNEAL ÇAPRAZ BAĞLAMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. ATİKE BURÇİN TEFON

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. M. KAMİL BİLGİHAN

ANKARA

EYLÜL 2019

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**İYONTOFOREZ DESTEKLİ ROSE BENGAL VE
YEŞİL IŞIK KORNEAL ÇAPRAZ BAĞLAMA**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ATİKE BURÇİN TEFON

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. M. KAMİL BİLGİHAN

ANKARA

EYLÜL 2019

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, tez danışmanım Prof. Dr. Kamil BİLGİHAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca emeğini benden hiç esirgemeyen ve asistanlığımın her aşamasında bana büyük katkıları olan değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Gökhan GÜRELİK, Prof. Dr. Rüştü Fikret AKATA, Prof. Dr. Şengül ÖZDEK, Prof. Dr. Onur KONUK, Doç. Dr. Ahmet Murat HONDUR, Doç. Dr. Bahri AYDIN, Doç. Dr. Zeynep AKTAŞ, Doç. Dr. Celal Murat HASANREİSOĞLU, Doç. Dr. Mehmet Cüneyt ÖZMEN'e,

Tez sürecim sırasında hep destek olan, hep motive eden ve bu süreçte de her duraksadığımda yardımına yetişen Dr.Öğr.Üyesi Tuba ATALAY'a ve Dr.Öğr.Üyesi. Betül Seher UYSAL'a ,

Kendisiyle çok kısa çalışma fırsatı bulduğum sayın Dr.Öğr.Üyesi Berçin Tarlan'a

Kliniğimizin kurucu öğretim üyesi Prof. Dr. Berati HASANREİSOĞLU'na teşekkür ederim.

GÜDAM Merkez sorumlusu Şeyda DİKER'e, araştırma sorumlusu Elif ERGÜVEN KAYA'ya tüm zorlukları aşmama yardımcı oldukları ve verdikleri destekten dolayı;

Tez sürecinde tanıştığım, her zaman güleryüzüyle bana her zaman yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Biyomekanik Bölümü araştırma görevlisi sevgili Burcu SARIKAYA'ya;

Tüm deney sürecinde daha önce ülkemizde örnekleri olmayan cihaz desteğini hiçbir maddi çıkar beklemeden yaratıcı bir şekilde ortaya çıkaran sayın Yusuf Coşkun'a;

Tüm yoğunluğuna rağmen yardımlarını hiç esirgemeyen Şenay ÇAY’a, Şengül Orak’a, Suat Avcı’ya, Aynur Kartal’a, Esin Tekin’e, Havva Gökçe’ye, Müge Çamurlu, Hidayet Arda ve Erol Tuncay’a;

Ayrıca burayı ailem gibi hissetmeme neden olan tüm hemşire, sekreter, teknisyen ve personelimize teşekkür ederim.

Her şeyimi borçlu olduğum, her konuda destekçim sevgili annem Yıldız TEFON’a, babam Abdulkadir TEFON’a, abim Veli TEFON’a, canım ablam Burcu TEFON’a ve hayatıma neşe katan biricik yeğenim Uzay ÖZTÜRK’e varlıklarıyla hayatımı güzelleştirdikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Destegi ve sevgisiyle hep yanımda olan, kendimi çok şanslı hissetmemi sağlayan Yavuz Kemal ARIBAŞ’a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 KORNEA	4
2.1.1 Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi.....	4
2.1.2. Kornea innervasyonu	9
2.1.3. Kornea Vaskülarizasyonu	9
2.1.4. Kornea'nın Optik Özellikleri	10
2.2 KERATOKONUS	10
2.2.1. Etiyopatogenez	11
2.2.2. Keratokonus Tanımı	12
2.2.3. Klinik Bulgular.....	13
2.2.4. Topografi Tanımlamaları;	14
2.2.6. Demarkasyon hattı.....	16
2.2.7. Keratokonus Sınıflama	17
2.2.8. Görüntüleme Yöntemleri	21
2.2.10. Keratokonus Ayırıcı Tanısı ve Diğer Ektatik Hastalıklar	24
2.2.11. Keratokonus Tedavi.....	26
3. YÖNTEM VE GEREÇLER	38
3.1.Deney Planı	38
3.1.1.Dokunun Hazırlanması	38

3.1.2. Işık Kaynağı	39
3.1.3. Çapraz Bağlama ve İyontofarez Prosedürü.....	40
3.1.4. Optik Koherens Tomografi ile Boya Derinliğinin Tespiti.....	43
3.1.5. Tek Eksenli Tansiyometre (Stres-Germe Testi).....	44
3.1.6. Lazer Güç Ölçer ile Güvenlilik Testleri	47
3.2. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	66
7. REFERANSLAR	67
8. ÖZET	73
9. ABSTRACT	75
10. ÖZGEÇMİŞ	77

KISALTMALAR

KKÇB	: Korneal Kollajen Çapraz Bağlama
PACK CXL	: Enfeksiyöz Keratitlerin Tedavisinde Fotoaktif Kromofor Uygulaması/ Photoactivated Chromophore For Infectious Keratitis
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
Na-K ATPaz	: Sodyum- Potasyum Adenin Trifosfataz
SAI	: Yüzey Asimetri İndeksi- Surface Asymmetry Index
S.H	: Standart Hata
SRI	: Yüzey Regülerite İndeksi- Surface Regularity Index
OCT	: Optik Koherens Tomografisi- Optical Coherence Tomography
I-SV	: Inferior- Süperior Değerleri- Inferior Superior Value
SRAX	: Çarpık Radyal Aks- Skewed Radial Axes
AB/SRAX	: Asimetrik Papyon/ Çarpık Radyal Aks- Asymmetric Bowtie/ Skewed Radial Axes
CLEK	: Colloborative Longitudinal Evolution of Keratoconus Study Group
D	: Dioptri
PMD	: Pellusid Marjinal Dejenerasyon
PK	: Penetran Keratoplasti
INTACS	: İntrakorneal Halka Segmentleri
LK	: Lameller Keratoplasti
PRK	: Fotorefraktif Keratektomi
Kmax	: Maksimum Keratometrik Değer
Kmin	: Minimum Keratometrik Değer
UVA	: Ultraviyole A
GÜDAM	: Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tarafımızca oluşturulan korneanın oturmasını sağlayan yuvarlak düzenek, bağlantılı olduğu lazer güç ölçer ve 532 nm yeşil ışık lazer sistemi , lazer sisteminin endoprobunun bağlandığı tarafımızca oluşturulan mercek düzeneği. ...39	
Şekil 2. Epi-on rose bengal çapraz bağlama tedavisi sonrası kornea ve ön segment OCT görüntüleri.....41	
Şekil 3. Enükleer gözlerde rose bengal iyontoforez uygulaması43	
Şekil 4. Standart korneal şeritler elde etmek adına kullanılan dikdörtgen bıçak sistemi45	
Şekil 5. Tek eksenli tansiyometre sistemi ve ilişkilendiği bilgisayar sistemi46	
Şekil 6. Tek eksenli tansiyometre çeneleri arasına yerleştirilmiş testin farklı evrelerindeki korneal şeritler46	
Şekil 7. 532 nm yeşil ışık lazer ile ışınlanan korneada, korneayı aşan iridasyon miktarının lazer güç ölçer tarafından tespiti48	
Şekil 8. Uygulamalar sonrası ön segment OCT ile korneal boya derinlikleri53	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tek Eksenli Tansiyometre ile Korneal Biyomekanik Özelliklerin Değerlendirilmesi.....	50
Tablo 2. Korneal 532nm Yeşil Işık Lazer Geçirgenliğinin Lazer Güç Ölçer Aracılığıyla Ölçümü.....	51
Tablo 3. Ön Segment OCT’de Rose Bengal Boya Diffüzyon Değerleri	52

1. GİRİŞ

Korneal kollajen çapraz bağlama (KKÇB), korneanın mekanik ve biyomekanik direncini artırarak korneal ektatik hastalıkların tedavisinde kullanılan önemli bir minimal invazif tedavi yöntemidir. [1, 2] Biyomekanik direnci artıran bu tedavi antimikrobiyal etkileri sayesinde dirençli keratitlerin tedavisinde [3, 4] kullanıldığı gibi deneysel çalışmalarda test edilen doku yapıştırıcı özelliği ile de [5] sütürsüz cerrahi yöntemlerinin geliştirilmesi alanında umut vadetmektedir.

Riboflavin ve Ultraviyole-A (UVA) kullanılarak uygulanan KKÇB, ilk olarak 1998 yılında Seiler ve ekibi tarafından tanımlanmıştır.[6] Bu yönteme göre riboflavinin, UVA ile etkileşmesi sonucu gelişen oksijen bağımlı tepkimelerle kollajen lifleri arasındaki çapraz bağlar güçlendirilerek kornea daha dirençli hale getirilmektedir.[7] Başta keratokonus olmak üzere korneanın tüm ektatik hastalıkların tedavisinde kullanılan bu yöntem sayesinde, sadece semptomları tedavi eden diğer yöntemlerin aksine hastalığın patofizyolojik temelleri tedavi edilip, progresyonun önlenmesi sağlanabilmektedir.[8]

İyontoforez, elektrik akımı kullanılarak çeşitli iyonların dokuya geçişini artırmak için kullanılan noninvaziv bir yöntemdir ve oftalmolojide özellikle kornea epitelini geçemeyen iyonik büyük moleküllerin geçişini kolaylaştırıcı özelliğinden faydalanılmaktadır. [9, 10] Çapraz bağlama tedavisinde riboflavinin iyontoforez ile uygulanması sayesinde korneal geçişinin oldukça artırılabilceği böylelikle korneal riboflavin miktarının artırılarak fotoduyarlılaştırıcı miktarının azaltılabileceği de çalışmalarca gösterilmiştir. [11-13] İyontoforez yardımı ile yapılan transepitelyal KKÇB tedavisinin standart yöntem kadar etkili olmasının

yanısıra transepitelyal uygulama sayesinde hastalar için oldukça konforlu bir yöntem olduğu gösterilmiştir. [9]

Günümüzde standart veya klasik KKÇB olarak bilinen, riboflavin ve UVA ile uygulanan bu yöntem etkili bir tedavi yöntemi olmasına rağmen; keratosit toksitesi, uzun uygulama süresi, ince kornealarda uygulama kısıtlılığı gibi dezavantajlara sahiptir. [6, 14-16] [17] [18] Bu nedenle keratositler üzerine daha az toksik özellik gösteren, ektatik hastalıklarda asıl patolojik bölge olan anterior stromaya sınırlı etki gösterebilen ve bu sayede özellikle ince kornealarda güvenle uygulanabilecek daha güvenli alternatif bir çapraz bağlama yöntemine yönelik araştırmalar hızlanmıştır. Bunlardan biri son yıllarda üzerinde oldukça durulan rose bengal ve 532 nm yeşil ışık aracılığıyla uygulanan çapraz bağlama tedavisidir.[19, 20] Bu yöntemde fotoduyarlastırıcı olarak riboflavinin yerine rose bengal boyası ve aktivatör ışın olarak da UVA yerine 532 nm yeşil ışık kullanılmaktadır. Rose bengal ve yeşil ışık uygulamasının 3 temel özelliği dikkat çekmektedir: Doku yapıştırıcı etkisi, antimikrobiyal etkisi ve çapraz bağlama özelliği.[21-23] Rose bengal ve yeşil ışık kavramının ortaya çıkışında daha çok doku yapıştırma özelliği denenmiştir.[21] Uygulama ile doku yapıştırılması sırasında daha az inflamasyona gözlenmekte bu sayede de kornea cerrahisinin en önemli kısıtlayıcılarından olan neovaskülarizasyon ve suture ilişkili diğer komplikasyonlar azaltılabilmektedir. [24, 25] Dirençli bakteriyel keratitlerin tedavisinde riboflavin/UVA aracılığıyla uygulanan ‘enfeksiyöz keratitlerin tedavisinde fotoaktif kromofor’ tedavisine (photoactivated chromophore for infectious keratitis- PACK CXL) oldukça etkili bir alternatif olarak rose bengal

ve yeşil ışık uygulaması kullanılabileceği klinik çalışmalarda gösterilmiştir.[26, 27] Hatta dirençli fungal izolatlarda riboflavin PACK CXL'den üstün olduğu ve oldukça önemli bir klinik problem yaratan akantomoeba kistleri üzerine de tedavi edici özelliğinin olduğu in vitro çalışmalarla gösterilmiştir.[22, 27] Doku yapıştırıcı etkileri yanı sıra rose bengal ve yeşil ışık uygulamasının çapraz bağlama etkisi ile korneal sertliği artırdığı ve korneal ektatik hastalıkların tedavisi için umut veren bir tedavi yöntemi olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.[28, 29] Rose bengal çapraz bağlamanın özellikle anterior stromada daha yüzeyel bir tutulum gösteriyor olması, keratosit, endotel ve iris toksisitesinin olmaması gibi özellikleri nedeniyle altın standart olan riboflavin/ UVA çapraz bağlamaya iyi bir alternatif olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. [20, 23, 29] Yüzeyel anterior stromayı etkilemesi özellikle 400 mikrondan ince kornealar ve pediatrik hasta grubu için umut vermektedir.[29]

Tüm bu özelliklerinden dolayı umut vadeden, dikkat çeken ve oldukça yeni bir uygulama olan Rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisinin güvenilirliği ve etkinliği yapılan çalışmalar sayesinde günbegün daha iyi anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, etkinliği in vivo olarak kanıtlanmış olan rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisi iyontoforez yardımı ile uygulanmış ve bu iki farklı tedavi yöntemi arasındaki, kornea boya doygunluğu, biyomekanik direnç artışı ve korneayı aşarak ön segmente ulaşan toksik ışık miktarının düzeyi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KORNEA

2.1.1 Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi

2.1.1.1. Gözyaşı

Kornea yüzeyini örten gözyaşı, lakrimal bez ve yardımcı gözyaşı bezleri (Krause, Wolfring) tarafından salgılanmaktadır. Fonksiyonu oküler yüzeyde optik olarak saydam ve düzgün epitel yüzey devamlılığının sağlanmasıdır ayrıca korneayı dehidratasyondan korur. Gözyaşı filminin ortalama kalınlığı 7 μm ve hacmi $6,5 \pm 0,3 \mu\text{l}$ 'dir. Gözyaşı; en üstte yüzeyel lipid tabakası (0,1 μm), ortada aköz tabaka ($\sim 6 \mu\text{m}$) ve en altta da müsin tabakası (0,02- 0,05 μm) olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Gözyaşının %98'den fazlası sudur. Gözyaşı biyolojik olarak önemli olan elektrolitler, glukoz, immünoglobulin, laktoferrin, lizozom, albümin ve oksijen gibi birçok faktör içerir. Bu nedenle gözyaşı sadece lubrikan bir kaynak olmayıp aynı zamanda kornea epitelinin devamı ve tamirinde de yer alan düzenleyici faktörleri sağlayan önemli bir nutrisyonel kaynaktır.

2.1.1.2 Epitel

Kornea epiteli, gestasyonel 5-6. haftalarda yüzey ektoderminden köken alır. Nonkeratinize, nonsekretuar, 5-7 tabaka çok katlı yassı epitelden oluşur 40-50 μm kalınlığındadır. Kornea epiteli 3 tip hücreden meydana gelir:

1- *Bazal hücreler*: tek sıra silindirik yapıdadır ve bazal membrana hemidesmozomlarla, çevrelerindeki hücelere ise desmozomlarla bağlanmışlardır. Limbus çevresindeki bazal epitel hücreleri sürekli kendini yenileyebilme yeteneğine sahiptir ve bunlar 'limbal kök hücreler' olarak adlandırılırlar. Ayrıca bazal epitel hücreleri 50 nm

kalınlığında, tip IV kollajen, laminin ve diğer proteinlerden oluşan epitelyal bazal membranı sentezler.

2- *Kanatsı hücreler*: Poligonal yapıda kanat benzeri uzantıları olan, birbirleriyle sıkı bağlantıları bulunan 2-3 sıra halinde dizilen hücrelerdir.

3- *Yüzeyel hücreler*: En yüzeyde yer alan hücrelerdir. Yassı yapıda ve 2-3 sıra halinde dizilim gösterirler. Bazal hücrelerin farklılaşp çoğalması ile yüzeyel hücreler oluşturulur. Yüzey epitel hücre yüzeyinde mikrovilluslar yer alır ve bu mikrovilluslar gözyaşının içindeki müsinin epitel hücrelerine daha iyi yapışmasını sağlar. Yüzeyel epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar gözyaşının ve mikroorganizmaların kornea stromasına geçişini engeller. Kornea epitelium hücreleri yaşlanınca değişime uğrarlar ve apoptozis veya dökülme ile uzaklaştırılırlar (7-14 gün).

Perilimbal kornea epitelinde bu üç hücre grubunun yanı sıra immunolojik olarak aktif antijen sunan dendritik makrofajlar (langerhans hücreleri) da bulunmaktadır.

Epitel tabakası, kornea tabakaları içinde enerji ihtiyacı en yüksek olan tabakadır. Glukoz ihtiyacı hümör aközden sağlanırken; oksijen ihtiyacı ise konjonktival damarlardan ve atmosferdeki serbest oksijenden sağlanmaktadır.

2.1.1.3. Bowman katı

Embriyonik hayatta stromanın ön yüzeyine yerleşmiş olan keratositler tarafından oluşturulan epitel ve stroma arasında yerleşen, bazal membran fonksiyonu gören katmandır. 8-10 mikron kalınlıktadır, hücre içermeyen bu tabaka kollajen fibrillerden oluşmaktadır. Temel olarak tip I ve tip III kollajenden oluşur. Ön yüzeyinde aksonların geçişini sağlayan porlar bulunmaktadır; arka yüzey sınırı stromadan net olarak ayırt edilemez. Epiteldeki patolojilerin stromaya yayılmasını önleyen önemli bir bariyerdir. Rejenerasyon yeteneği yoktur.

2.1.1.4 Stroma

Korneanın yaklaşık %90'lık kısmını oluşturan en kalın tabakadır (500 µm). Stromayı oluşturan elemanlar ekstraselüler matriks, keratositler (kornea fibroblastları) ve sinir lifleridir. Hücresel komponent toplam stroma hacminin %2-3'ü kadarını oluşturur. Geri kalan büyük kısmı esas olarak kollajen ve ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Stromadaki ana kollajen tip I kollajen iken daha az miktarda tip III, V ve VI kollajen yer almaktadır. Stromadaki kollajen liflerinin hemen hemen hepsinin boyutları karakteristik olarak birbirine benzemektedir (22,5- 35 nm) [30, 31]. Kollajen fibriller arası mesafe de benzer ve sabit özelliktedir (41,4 ±0,5 nm). Kollajen fibrillerin bu düzenli dizilimi korneanın şeffaf özellikte olmasında önemli faktörlerden biridir. Kollajen fibriller arasındaki mesafe ve kollajen fibrillerin diziliminin bozulduğu herhangi bir durumda (stroma ödemi, kornea skarı) şeffaflık kaybolur.

Stromadaki temel glikozaminoglikan türü keratan sülfattır (%65). Diğerleri; kondroitin sülfat ve dermatan sülfattır. Glikozaminoglikanlar önemli miktarda su absorpsiyonu ve retansiyonu özelliğine sahiptir. Korneanın homeostatik dengesinde glikozaminoglikanlar büyük rol oynar.

Lameller arası yerleşmiş olan keratositler stromanın başlıca hücresel yapı elemanıdır. Keratositler arası sinyal iletişimde görevli 'gap- junction'lar hücreler arasındaki bağlantılardır. Keratositler kollajen molekülleri (prokollajen olarak) ve glikozaminoglikanları üretir ve böylelikle ekstraselüler matriks komponentlerinin devamını sağlar. Ayrıca kollajen yıkımında görevli enzimler olan matriks metalloproteinazları (MMPs) da sentezleyerek ekstraselüler matriksin yapısal ve biyokimyasal dengesini sağlar. Keratositlerin sağlıklı fonksiyon göstermeleri ekstraselüler matriks tarafından düzenlenir. Çeşitli travmalar sonucunda keratosit aktivasyonu değişir ve bu da korneal düzeyde değişikliklere neden olur.

2.1.1.5. Dua tabakası

2013 yılında Dua tarafından tanımlanmış bu tabaka, predesmetik stroma içerisinde yer alır. Aselüler, esas olarak tip 1 kollajenden oluşan iyi sınırlı bir tabakadır. Ortalama kalınlığı $10,15 \pm 3,6 \mu\text{m}$ 'dur.[32]

2.1.1.6 Desme membranı

Kornea endotel hücreleri için bazal lamina görevi görmektedir ve yaklaşık $7 \mu\text{m}$ kalınlığındadır. Esas olarak tip 4 kollajen ve lamininden oluşan bir membrandır. Matriks metalloproteinazlarla enzimatik sindirime karşı dirençlidir. Kornea stromasının arka yüzeyine komşudur ve stromanın şekil değişikliklerini kolayca yansıtır. Stroma ödemlendiğinde desme membranında 'desme katlantıları' görülür. Desme membranının rejenerasyon yeteneği yoktur ancak desmede bir travma olduğunda, açıkta kalan stroma üzerine endotel hücreleri göç etmeye başlar, desme membranı rüptüre olan bölgeyi örter ve stromal ödem giderek azalır.

2.1.1.7. Endotel

Desme membranının arka yüzeyini örten, mozaik paternde dizilmiş poligonal çoğunlukla da altıgen şekilli tek sıra hücrelerden oluşur. Kalınlığı 5 μm ve genişliği 20 μm 'dir. Erişkinlerde yoğunluğu yaklaşık 2,500-3,000 hücre/ mm^2 'e düşer ve bu hücrelerin çoğalma yeteneği sınırlıdır.

Endotel hücreleri nükleus, mitokondri, endoplazmik retikulum, serbest ribozomlar ve golgi cisimciği gibi çok sayıda belirgin hücre elemanına sahiptir çünkü bu hücreler metabolizma ve sekresyon açısından oldukça aktif hücrelerdir. Endotel hücrelerinin Desme tarafına bakan yüzeyi pürüzsüzdür ancak aköz humore bakan yüzeyi girintili çıkıntılı özelliğinden sorumlu mikrovilluslardan oluşur. Hücreler arasında zonula okludens, maküla okludens ve makula adherens gibi kompleks bağlantılar mevcut olup bu bağlantılar küçük moleküllerin, elektrolitlerin alışverişine ve hücreler arası sinyal iletimine izin verir.

Kornea endotelinin en önemli fizyolojik fonksiyonu, stromasının su homeostazını sürdürebilmektir. Bu fonksiyonu, endotel hücrelerinin bazolateral membranında bulunan sodyum potasyum adenin trifosfataz pompası (Na-K ATPaz) sayesinde gerçekleştirir. Na-K ATPaz enzimi ile hücreler arası aralığa Na iyonu, hücre içine ise K iyonu taşınır. Hücre sitoplazmasında bulunan karbonik anhidraz enzimi ile de $\text{H}-\text{CO}^3$ (bikarbonat) anyonları oluşturulur. Endotel hücrelerinden ön kamaraya aktif olarak $\text{H}-\text{CO}^3$ ve Na iyonları salınır. Stromada Na iyon konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanan bir ozmotik gradiyent oluşturulur ve endotel hücrelerinden ön kamaraya pasif su akışı gerçekleşir.

Normal, sağlıklı korneada endotel sayısı yaşla birlikte azalır. Katarakt cerrahisi gibi göz içi cerrahiler de endotel sayısında azalmaya neden olabilir. Endotel hücre sayısında tolere edilemeyecek bir azalma gerçekleşir ise stromal su

oranı artar, sonucunda kornea ödemlenir ve saydamlığı azalır. Bu nedenle cerrahi sırasında kornea endotelini korumak ve ön kamaradaki inflamasyonun kontrolünü sağlamak endotel kaybını önlemek açısından önemlidir. Yanı sıra travma, enfeksiyon, inflamasyon gibi durumlar da benzer şekilde endotel sayısının azalmasına sebep olabilirler.

2.1.2. Kornea innervasyonu

Kornea sinir sonlanımlarının vücutta en yoğun bulunduğu dolayısıyla en sensitif dokulardan biridir. İnervasyonu trigeminal sinirin oftalmik dalından kaynaklanan silier sinirlerin duysal lifleri ile olur. Uzun silier sinirler perilimbal sinir halkasını oluşturur. Sinir lifleri korneada miyelin kılıflarını kaybeder ve miyelinsiz sinir hücreleri olarak devam gösterirler. Sinir lifleri korneayı derin periferel stroma tabakasından radyal olarak penetre eder ve anteriora doğru yönlendirilerek subepitelyal sinir pleksusunu oluşturur. Lifler Bowman tabakasını penetre eder ve kanat hücrelerinin bulunduğu seviyede sonlanır. Yüzeyel epitel hücrelerinin kaybı ile giden durumlar subepitelyal sinir pleksusunu açığa çıkaracağı için şiddetli ağrı ile sonuçlanır.

2.1.3. Kornea Vaskülarizasyonu

Korneanın önemli özelliklerinden biri de avasküler olmasıdır. Çeşitli korneal hastalıklarda bu avasküler özellik bozularak patolojiler karşımıza çıkmaktadır. Oftalmik arterden kaynaklanan anterior silier arter limbus bölgesinde vasküler bir ark yapar. Bu ark eksternal karotis arterin fasiyal arter dalı ile bir anastomoz yapar. Yani korneanın kanlanması hem eksternal hem de internal karotis arterden sağlanmış olur.

2.1.4. Kornea'nın Optik Özellikleri

Korneanın horizontal çapı 11-12 mm, vertikal çapı 10-11 mm'dir. Refraktif indeksi 1,376'dır. Asferik yapıda olup, santral korneanın eğrilik yarıçapı ortalama 7,8 mm'dir (6,7- 9,4 mm). Gözün total kırıcılık gücü 58,60 dioptri (D) olup, 43,25 D kırıcılık gücü ile (%74) en fazla kırıcılığa sahip ortamı oluşturur. Ayrıca optik sistemdeki fizyolojik astigmatizmanın majör kaynağı da korneadır.

2.2 KERATOKONUS

Keratokonus, korneanın ilerleyici stromal incelmesi ve protrüzyonu sonucu gelişen görme azlığı ile karakterize ektatik bir hastalıktır. Görme azlığının asıl sebebi düzensiz astigmatizma ve refraktif miyopi gelişimidir. Toplumdaki sıklığı yaklaşık 20/100.000'dir. %6-8 oranında aile öyküsü mevcudiyeti izlenmektedir. Hastalık genellikle puberte ile başlar yavaş bir progresyon gösterir ve 30-40'lı yaşlarda stabilize olur. Hastalık başlangıcı ve progresyonu bilateral ancak asimetrik tutulum gösterir.

Keratokonus birçok oftalmik ve sistemik hastalıkla birlikte görülebilir. Down sendromu, Turner sendromu, Ehlers-Danlos, Angelman Sendromu ve Marfan sendromu, atopi, osteogenezis imperfekta ve mitral valv prolapsusuyla birlikteliği gösterilmiştir. Vernal keratokonjonktivit, mavi sklera, aniridi, ektopia lentis, Leber'in konjenital amarozis ve retinitis pigmentosa ise ilişkilendirildiği oküler hastalıklardan bazılarıdır. Ayrıca uzun süreli sert kontakt lens kullanımı, atopi, alerjik konjonktivit zemininde devamlı göz kaşıma özellikle hastalığın hızlı progresyon gösterdiği yaş grubunda önemli predispozan faktörler olarak kabul edilmiştir.[33]

2.2.1. Etiyopatogenez

Keratokonusla en güçlü ilişkili durumun göz kaşıma olduğu bildirilmiş ve hatta progresyonu hızlı olan gözlerde kaşımanın daha sık olduğu tespit edilmiştir. Göz kaşımanın neden olduğu mikrotravma, epitel hasarına ve sitokin salınımına neden olur. Sitokinler myofibroblast diferansiyasyonuna ve biyomekanik kuvvetlerde değişmeye sonuç olarak da hastalığın progresyonuna yol açar. [33, 34]

Atopi de keratokonus patofizyolojisinde suçlanan faktörlerden biri olmakla birlikte ilişkisi olup olmadığı farklı çalışmalarda farklı şekilde yorumlanmıştır. [35, 36]

Yapılan çalışmalarla genetik faktörlerin patogeneizde etkili olabileceği ihtimali kuvvetlenmiştir. Keratokonuslu bireylerde kollajen, proteinaz sistemi, proteinaz inhibitörleri ve interlökin-1 sistemiyle ilgili genlerde bozukluk gösterilmiştir. [37]

Non-inflamatuvar bir hastalık olarak bilinmesine rağmen son yıllarda hastalığın etyopatogenezinde proteinazlar ve inflamatuvar sitokinlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir.[38] Özellikle gözyaşında artmış proinflamatuvar sitokinler olan İL-6, TNF α ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP -9) seviyeleri tespit edilmiştir.[39] Kornea stromasındaki aşırı degradasyon, proteaz ve diğer katabolik enzim aktivitesindeki artış veya α 2-makroglobulin ve α 1-antiproteaz gibi proteinaz inhibitörlerinin aktivitesindeki azalma da patogeneizde rol oynayan diğer faktörlerdir.[40] Yani keratokonuslu hastalarda inhibitör enzim aktivitelerinde azalma, yıkım enzim aktivitelerinde ise artma görülmektedir. Yıkım enzimleri ve inhibitörleri arasındaki dengenin yıkım yönüne kayması ile ekstrasellüler matriks yapıları yıkıma uğratarak, keratokonusun karakteristik özelliği olan Bowman

tabakasında yırtıklar ve stromada incelme meydana gelir. Keratokonus hastalığında tipik olarak gözlenen stromal incelmenin asıl sebebi lamel sayısındaki azalmadan kaynaklanmaktadır.[41] Bu duruma eşlik eden keratosit sayısı azalması ve fibroblastik dejenerasyon da patolojide rol oynar. Lamellar dizilim bozukluğu ve anormal dağılımı, özellikle kornea apeksinde daha belirgin izlenmektedir.[41] Histopatoloji çalışmaları, Bowman katmanının kopması veya yokluğunu, kollajen düzensizliğini, yara izini ve incelmeyi göstermektedir. Desme ve endotel ise hastalık sürecinde nadiren etkilenir. [42] Hidrops esnasında desme yırtılması ve takiben endotel hasarı görülebilir ki bu durum kornea ödemi ile sonuçlanmaktadır. Keratokonus hastalarında biyomikroskopik olarak ve konfokal mikroskopide subepitelyal sinir liflerinin görünürlüğü artmıştır. [43]

2.2.2. Keratokonus Tanımı

Rabinowitz, keratokonus subtiplerini tanımlamak için klinik bulgulara ve topografi verilerine dayanarak bir klasifikasyon sistemi geliştirmiştir.[44] Keratokonus biyomikroskopik muayene ile tespit edilebilen belirgin klinik bulgulara (stromal incelme) tipik topografik bulguların (asimetrik papyon) da eşlik etmesi ile tanısı konabilen klinik bir hastalıktır. 'Erken keratokonus'ta herhangi bir klinik bulgu varlığından bağımsız olarak retinoskop ile yapılan muayenede önemli bir bulgu olan 'makas refleksi' belirgindir. 'Forme fruste keratokonus' veya 'topografik keratokonus' ise biyomikroskopik muayenede bir bulgu ya da retinoskopik değerlendirmede herhangi bir bulguya rastlanmaksızın tipik topografik paternin (asimetrik papyon gibi) bulunduğu durumu ifade eder. 'Keratokonus şüphesi (keratoconus suspect)' denen durum ise santral veya inferiorda normalden

daha dik kornea kurvatürünün bulunduğu her türlü durumu ifade eder ve subklinik keratokonustan farklıdır. Çünkü subklinik keratokonus progresyon gösterirken, keratokonus şüphesi olan hastaların çoğu uzun süreli takiplerinde progresyon göstermez.

2.2.3. Klinik Bulgular

Orta ve ileri evre keratokonus tanısı ise biyomikroskopik bulgulara bakarak kolayca konulabilmekte ancak erken evre hastalıkta tanı konulurken ek tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Artan tanı testleri ve bunların erken hastalık düzeyinde de oldukça sensitif olması sayesinde son yıllarda keratokonus tanısı alan hasta sayısı oldukça artmıştır.

Tanıda, yüksek astigmatizmatik düzeltmeye rağmen düşük görme keskinliği ve keratometrik anormallikler, korneal stromal incelme ve korneal incelme ile birlikte karakteristik biyomikroskopik bulgular oldukça önemlidir.

Rizzutti Bulgusu: Kornea temporalinden ışık tutulduğunda nazal sklerada ışığın görülmesidir.

Fleischer Bulgusu: Kon tabanında derin bazal epitel hücrelerinde ferritin parçacıklarının birikimine bağlıdır. En iyi kobalt mavisinde görülebilen renkli halka görünümüdür.

Munson Bulgusu: Hastanın aşağı bakış pozisyonunda korneanın apikal protrüzyon alanı alt göz kapağını aşağı doğru iterek kapak kenarının V şeklini almasına sebep olur. Genellikle orta ve ileri keratokonus hastalarında gözlenen klinik bulgudur.

Vogt Çizgileri: Kon apeksinde korneanın inceliş öne doğru protruzyonu ile birlikte derin stromada ve descemet membranının önünde ince parlak vertikal çizgiler şeklinde ortaya çıkan gerilme izleridir.

Yağ Damlacığı Reflesi: Dilate edilmiş pupillada karşı 90 derece açı ile ışık verildiğinde ‘yağ damlacığı’ reflesi tespit edilir.

Düzensiz Makaslanma Reflesi: Dilate edilmiş pupillada retinoskopide uygulanması esnasında retina yansımada tespit edilir. Keratokonusa spesifik bir bulgu olmayan bu durum Munson bulgusunun aksine hafif hastalıkta bile izlenebilir.

Akut Korneal Hidrops: Hasta ani ve ağırlı görme kaybı ile başvurur. Aşırı korneal gerilme ve incelmeye bağı olarak descemet membranı yırtılır, endotelyal hasara bağı olarak kornea stroması ve epitelde yoğun ödem izlenir.

2.2.4. Topografi Tanımlamaları;

2.2.4.1. Normal Bireylerde Korneal Topografi:

Aynı bireyin iki gözünün topografik paternleri birbirinin ayna izdüşümüdür. Bu fenomene ‘enantiyomorfizm’ denir. Rabinowitz ve arkadaşları normal gözlerde aksiyel kurvatür haritalarından yola çıkarak topografik paternlerin dağılımını çıkarmışlardır. [44] Bunlar: Simetrik papyon, inferior dikleşmeyle beraber asimetrik papyon, süperior dikleşmeyle beraber asimetrik papyon, çarpık radyal aksla beraber asimetrik papyon (SRAX) paternleridir. Çarpıklaşma 30°’den fazla ise anlamlı olarak anormal kabul edilir. [45]

2.2.4.2. Keratokonusta Korneal Topografi:

Keratokonus hastalığı tespitinde tipik olan ve normal bireylerde görülmesi beklenmeyen üç karakteristik özellik mevcuttur:

1. Kırıcılık gücü gittikçe azalan konsantrik halkalarla çevrilmiş korneal alanın boyutunda artış, inferior süperior güç asimetrisi,
2. Horizontal meridyenin yukarısı ve aşağısında kalan en dik meridyenin çarpıklaşması,
3. Radyal çarpıklaşmayla beraber asimetric papyon (AB/SRAX). (AB/SRAX paterni normal popülasyonun yalnızca %0,05'inde görülürken keratokonusta yaygın olarak görülür.)

Bu üç bulgunun topografik olarak tespiti keratokonus hastalığı açısından tanı koydurucudur.

Rutinde sıklıkla kullanılan diğer indeksler ise Rabinowitz/Mc Donnel, Maeda/Klyce, Rabinowitz/Rasheed's KISA yüzdesi indeksleridir. Rabinowitz/Mc Donnel indeksi iki adet topografi tabanlı indeksin kombinasyonundan oluşmaktadır.[46] Bu değerlerden biri santral K değerinin > 47.2 olması diğeri ise Inferior-Superior asimetri değerinin (IS değeri) >1.4 dioptri olmasıdır. Rabinowitz/Rasheed's ise keratokonusu tanımlamak için KISA% indeksini tanımlamışlardır. KISA% indeksi aksiyel haritalardaki dört indeks kullanılarak hesaplanır.[46] KISA yüzdesi >%100 olması yüksek ihtimalle keratokonus olduğunu düşündürür. Ancak Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu indeksle yapılan değerlendirme ile erken veya şüpheli keratokonusu yakalama oranının ancak %68,9 olduğu bildirilmiştir.[47]

2.2.5. Keratokonusta Ön Segment Optik Koherens Tomografi:

Optik koherens tomografi (OCT) oküler yapıların in-vivo olarak non-kontakt ve hızlı değerkendirilmesini sağlayan ve günümüzde oldukça sık kullanılan bir görüntüleme yöntemidir.[48] Retina ve koroidal yapıların değerlendirmesinde adeta rutin olarak kullanılan bu görüntüleme yöntemi, gözün ön segment yapılarının değerlendirilmesinde de önemli bir araçtır.[49] keratokonusun hem erken evrelerinde tanı koymakta hem de evreler arası epitelyal değişiklikleri incelemede kullanılabilen yöntem Fourier Domain OCT'dir.[50] OCT aynı zamanda kollajen çapraz bağlama gibi birtakım cerrahi müdahalelerden sonra korneanın optik değişikliklerini incelemek için de kullanılabilir. Çalışmalarda ön segment OCT ile çapraz bağlama tedavisi sonrası demarkasyon çizgisinin birinci aydan itibaren belirgin olarak izlenebildiği ve bu yöntemle güvenilir, gözlemciler arası tutarlı bir değerlendirmenin mümkün olduğu gösterilmiştir. [51] OCT aynı zamanda geçirilmiş Desme rüptürü açısından da bilgi sağlamaktadır ve bu durum uygulanması planlanan cerrahinin türünü belirleyicidir (derin anterior lameller keratoplasti veya parsiyel penetran keratoplasti gibi).

2.2.6. Demarkasyon hattı

Korneal çapraz bağlama tedavisi sonrası tedavi edilmiş anterior stroma ile edilmemiş posterior stroma arasında tedaviye bağlı yapısal değişiklikler sonucu gelişen bir hattır. İlk olarak konfokal mikroskopi ile tanımlanmış olup hemen sonrasında ise Seiler ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile tedavi sonrası yaklaşık ikinci haftada biyomikroskopik olarak görülebileceği bildirilmiştir. [52] Demarkasyon hattının izlenmesi ile korneal çapraz bağlama tedavisinin etkisi ve ulaştığı stromal derinliğin değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Topografi ile

indirek olarak gözlenen korneal biyomekanik değişiklikler için kolay ve erken dönemde bir ipucu olarak değerlendirilebilir. Sıklıkla birinci ayın sonunda en belirgin olarak görülebilen, bazı bireylerde nadiren 6-12 aya kadar seçilebildiği söylenmektedir.

2.2.7. Keratokonus Sınıflama

2.2.7.1. Morfolojik Sınıflama

Morfolojik olarak 3 tip kon bulunur:

1. *Nipple (sivri) kon:* ≤ 5 mm, genelde alt nazalde yerleşimli
2. *Oval kon:* 5-6 mm, genelde elipsoid ve inferotemporal yerleşimli
3. *Globus kon:* >6 mm korneanın yaklaşık %75'ini kaplar ve kornea oldukça incedir.

2.2.7.2. Amsler Krumeich Sınıflaması

Keratokonus ön sagittal eğrilik haritasındaki ortalama K değerine, hastanın refraksiyon kusuruna, korneanın en ince yerinin kalınlığına ve korneada skar dokusu olup olmamasına bağlı olarak 4 evreye ayrılır.[53]

Evre 1

- Ekzantrik dikleşme
- Miyopi ve/veya <5 D astigmatizma
- Ortalama santral keratometri değeri <48 D'dir.

Evre 2

- Miyopi ve/veya 5 -8 D arasında indüklenmiş astigmatizma
- Ortalama santral keratometri değeri <53 D

- En ince kornea kalınlığının $>400\mu\text{m}$ 'dir.

Evre 3

- Miyopi ve/veya 8 -10 D arasında indüklenmiş astigmatizma
- Ortalama santral keratometri değeri ≥ 53 D
- En ince kornea kalınlığının 300-400 μm 'dir.

Evre 4

- Refraksiyon ölçülemez
- Ortalama santral keratometri değeri >55 D
- Santral korneal skar mevcudiyeti
- En ince kornea kalınlığı $<300 \mu\text{m}$ 'dir.

2.2.7.3. CLEK Çalışma Grubu Kriterlerine Göre Sınıflandırma

CLEK (Colloborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus Study Group) çalışma grubu keratokonus hastalarının yaşam kalitesi, görme düzeyi, kornea değişiklikleri, progresyon düzeyleri ile ilgili çeşitli yayınlar yapmaktadır.[54] Bu çalışma grubu, wavefront analizlerinden elde edilen verilere göre keratokonus ciddiyet skorlaması yayımlamışlardır. Bu skorlamaya göre 4 evre vardır:

Normal:

- Normal biyomikroskopi
- Topografide düzenli aksiyel astigmatizma
- Düzeltilmiş görme keskinliği logMar eşelinde 4 m'den ≥ 55 harf

Atipik Normal:

- Biyomikroskopik muayene veya anamnez ile açıklanamayan normalin dışında aksiyel topografi bulguları (kontakt lens warpage sendromu, keratokonusa özgü olmayan korneal skar, refraktif cerrahi hikayesi)

- Normal en iyi düzeltilmiş görme keskinliği ya da hafif azalma

Keratokonus Şüphesi

- Normal biyomikroskopi

- Şüpheli Aksiyel Topografi [santral dikleşme ($>48D$)]

- Düzeltilmiş En iyi Görme Keskinliği (EİDGK) LogMar Eşelinde 4 m'den >55 harf

Hafif keratokonus

- Keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi

- Fleischer halkası veya Vogt striası

- Flat keratometri değerleri $<51D$

- Korneal skar izlenmez

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

Orta Keratokonus:

- Keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi

- Flat keratometri değerleri $51.25-56.00 D$ veya $\geq 8 D$ astigmatizma

- Fleischer halkası veya Vogt striası

- Korneal skar görülebilir (keratokonus ile uyumlu, iyi sınırlı stromal skar)

- En iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde azalma (logMar eşelinde 4 m'den <45 harf)

Ciddi Keratokonus:

- Belirgin dikleşme alanları gösteren keratokonus ile uyumlu aksiyel topografi >56.00 D
- Fleischer halkası veya Vogt striası
- Korneal skar görülebilir (keratokonus ile uyumlu her türlü dense/opak skar)
- Düzeltilmiş görme keskinliğinde azalma (logMar eşelinde 4 m'den <30 harf)

Progresyon:

Hastalığın progresyon değerlendirmesi oldukça değişkendir ve neredeyse gün içindeki diüurnal korneal değişikliklere göre bile farklılıklar gösterebilmektedir. Keratokonus daha çok çocuk ve adölesan yaşta hızlı progresyon göstermekte ve ileri yaş gruplarında nadiren progresyon ile karşılaşmaktadır. Gore ve ark. hastalığa dair yapılan çalışmaların sonucunda değişen hastalık kavramı ve tedavi modalitelerinden yola çıkarak 2003 yılında bir derleme yayınlamıştır. [55] Bu derlemeye göre progresyon kriterlerini

- Maximum K (Kmax) değerinin ≥ 1 D artışı,
- Maximum ve minumum K değerlerinin farkının (Kmax-Kmin) ≥ 1 D artışı
- Kornea apex gücünün ≥ 1 D artışı
- Ortalama K değerinin $\geq 0,75$ D artışı
- Manifest refraktif sfirik eşdeğerin $>0,5$ D artışı
- Santral kornea kalınlığında $\geq \%2$ azalma olması olarak belirlemişlerdir.

2.2.8. Görüntüleme Yöntemleri

Bilgisayar Destekli Videokerataskopi/ Plasido Disk Tabanlı Kornea Topografisi/ Scheimpflug kameralar

Gelişen teknolojiyle birlikte kornea ve refraktif cerrahi alanlarında cerrahi öncesi ve sonrasında bilgisayar destekli videokeratografilerin kullanım sıklığı artmıştır. Klinikte pratikte en sık kullanılan plasido disk prensibine dayanan topografilerdir. Kornea üzerindeki gözyaşı filminden yansıyan Plasido imajlarının santralde yerleşen kamera tarafından yakalanması ve bilgisayar tabanlı sisteme aktararak analiz edilmesi şeklinde çalışmaktadır. Plasido disk tabanlı kornea topografileri korneanın ön yüzünü tarayarak ön elevasyon haritaları hakkında bilgi verirler. Scheimpflug kameralar ise kornea arka yüzeyini de tarayarak ön elevasyon yanı sıra arka elevasyon ve kornea kalınlığını hakkında da bilgi verirler. Keratokonus erken dönemde topografik olarak arka elevasyon haritalarında bulgu vereceği için Plasido disk tabanlı kornea haritaları ile Scheimpflug kamera sistemlerinin kombinasyonu ile çalışan topografi cihazları hastalığın daha erken aşamada yakalanmasına katkıda bulunur.

Topografi Skalaları:

Kornea topografisinde görülen sıcak renkler (kırmızı, turuncu), o bölgelerde korneanın keratometrik dioptrik gücünün yüksek olduğunu yani korneanın daha dik olduğunu gösterir. Soğuk renkler (mor/mavi) ise dioptrik gücün daha düşük olduğu düz bölgeleri temsil eder. Ancak aynı korneada farklı basamak aralıkları kullanıldığında farklı görüntüler elde edilebilir ve kıyaslamak zorlaşır. Bu nedenle topografi haritalarını sadece renk ve paternleri esas alarak değerlendirmek doğru olmayacaktır.

Mutlak (absolü) veya Standardize Topografi Haritası:

Absolü topografi haritaları bir cihaz için hep aynı renk kodlama sistemine sahiptir, aynı renk hep aynı dioptrik gücü temsil eder. Farklı haritalar arasında (örn; progresyon analizi) kıyaslama imkanı sunması ve majör patolojileri değerlendirme imkanı tanınması en büyük avantajıdır. Fakat basamaklar arasında geniş artışlar temsil edildiğinden (bazı cihazlarda 1,5 D) erken ve minör değişikliklerin atlanma olasılığı vardır.

Normalize veya Rölatif Skalalar:

Normalize haritalarda, her haritaya ait değişik renk skalaları üzerinden otomatik olarak minimum ve maksimum dioptrik güç saptanır ve otomatik olarak renk aralığı tüm harita yüzeyine aktarılır. Bu haritalar yüksek aralıkta topografik detayı gösterme açısından avantajlıdır ancak aynı korneayı karşılaştırırken bile aynı renkler farklı basamakları ifade edebileceği için direk olarak kıyaslama yapmak mümkün değildir, yani renkler üzerinden karşılaştırma bu haritalarda yapılamaz.

Kurvatür/Güç Haritaları: Aksiyel/ Sagittal Güç Haritaları:

En sık kullanılan haritalardır. Santral korneaya göre aksiyel yönde herhangi bir noktada kornea yüzeyinin kurvatürünü ölçer bu sebeple korneanın total yapısını değerlendirmek yönünden avantajlıdır. Bu harita yönteminin en önemli avantajı o haritanın hangi paterne uyduğunun direk olarak izlenmesi ve normal/anormal olarak sınıflandırabilmesidir. Bu haritalarla korneanın bazı hastalıklarına özgü topografik paternlerin belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Bunlara örnek olarak; çarpık radyal aksla birlikte asimetrik papyon görüntüsü keratokonus için tipikken, kelebek ya da yengeç kısıncı şeklindeki görüntü pellusid marjinal dejenerasyon için

tipik bir görüntüdür. Bu yöntemin dezavantajı ise minör ya da lokalize defektleri atlayabilmesi ve periferik kurvatür ölçümünde hassas olmamasıdır.

Tanjansiyel/ Meridyonel Kurvatür Haritaları:

Belirli bir halkaya göre meridyonel yönde herhangi bir noktada kornea yüzeyinin kurvatürünü ölçer. Bu haritalar, aksiyel haritalara oranla lokal ve erken kurvatür değişikliklerini saptamada daha hassas özelliktedir. Korneanın periferik patolojilerinin değerlendirmesinde de aksiyel haritalardan daha hassastır. Bu haritaların önemli bir dezavantajı ise lokalize değişiklikler için daha fazla varyasyon göstermesi sebebiyle aynı hastalıkta dahil tekrarlayan tutarlı topografik görüntüler alınamayabilir ve tipik bir patern bu haritalarda gözlenmeyebilir.

Elevasyon Haritaları:

Kornea üzerindeki herhangi bir noktanın referans alınan yüzeye göre mikron cinsinden yüksekliğini gösterir. Bu referans yüzey birçok cihazda sferik olmakla birlikte elipsoid, torik-elipsoid de olabilmektedir. Yüzey ortalama elevasyon değerleri yazılımlar programları tarafından hesaplanır ve yaklaşık bir değer ortaya çıkar. Bu değer 'best fit sphere- en uygun sferik değer'olarak adlandırılır. Bu değer kurvatür yarıçapı veya büyüklüğü, farklı referans yüzeyler esas alındığında aynı bireyde bile ölçümden ölçüme değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle iki elevasyon haritasını birbiri ile kıyaslamak çok objektif olmayacaktır. İki farklı harita arasında x-y hizalanması yapabilen bazı elevasyon tabanlı topografiler bu karşılaştırmayı yapabilmektedir. Elevasyon haritalarında eğer kornea üzerinde ölçülen nokta referans noktaya göre yüksekse ise artı değerler, aşağıda ise eksi değerler elde edilmektedir. Ön elevasyon haritalarında referans

küreye göre elevasyon miktarının $>7\text{ }\mu\text{m}$, arka elevasyon haritasında ise $>15\text{ }\mu\text{m}$ olması keratokonus açısından önemli bir bulgudur.

2.2.9. İstatistiksel İndeksler:

Ticari olarak birçok farklı indeks ortaya konulmuş olsa da hepsinin temel mantık ve değerlendirme yöntemleri aynıdır. Bunlardan en sık kullanılanları; Simule keratometri (SimK); Keratometri tarafından elde edilen değerlere eş değerler sağlar. En dik meridyenin gücünü ve lokalizasyonu ile 3 mm'lik zonda buna 90° uzaklıktaki meridyenin gücünü belirler. MinK; En düz meridyenin gücünü ve yerleşimini ifade eder. Yüzey asimetri indeksi- Surface asymmetry index (SAI); aynı halka üzerinde birbirinden 180° uzaklıktaki meridyenlerin korneal güçleri arasındaki farkı ifade eder. Bu değer ne kadar yüksekse irregülerite o kadar yüksektir. Yüzey regülarite indeksi- Surface regularity index (SRI); 4,5 mm'lik santral alandaki noktaların çevrelerindeki noktalarla kıyaslandığında ortaya çıkan indekstir. Yüksek değerler yüksek irregüleriteyi temsil eder. İnferior-süperior superior value (I-SV); 3 mm'lik santral alanda süperior ve inferiordaki beş noktanın 30° intervallerle aralarındaki güç farkını gösteren değerdir.

2.2.10. Keratokonus Ayırıcı Tanısı ve Diğer Ektatik Hastalıklar

2.2.10.1. Pellusid Marjinal Dejenerasyon

Alt periferik korneada bant şeklinde incelme ve bu incelme alanının kenarındaki kornea ektazi ile karakterize progresif bir hastalıktır. Nadir görülen bu hastalık progresif ve idiyopatik bir korneal dejenerasyon olup sıklıkla ailesel geçiş göstermemektedir. Etyolojisi bilinmemekle birlikte keratokonustaki gibi kollajen anormallikleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Genellikle klinik 20-40'lı yaşlarda

ortaya çıkar. Düzeltilmemiş görme keskinliği oldukça düşüktür, kurala aykırı astigmatizmaya rastlanır ve pinhol kullanılarak görme keskinliği değerlendirilirse normale yakın görme elde edilmesi mümkündür ancak sferosilindirik kombine lensler kullanılarak yapılan düzeltmede görme keskinliği artmaz. Bazen akut hidrops atakları ve perforasyon nedeniyle görme keskinliği belirgin olarak azalabilmektedir. Topografik olarak ön yükseklik haritasında tipik ‘öpüşen kuşlar görüntüsü’ ya da ‘yengeç eli’ görüntüsü izlenebilir. Keratokonustan ayırımı noktasında dikkat edilmesi gereken husus; keratokonusta dikleşme tam olarak maksimum incelme noktasından olurken pellusid marjinal dejenerasyonda alt ya da üst kadranda maksimum incelme noktasının üzerindeki bölgeden olur.

2.2.10.11. Keratoglobus

Korneanın bütün olarak anormal incelme olduğu, nadir, bilateral konjenital korneal ektazidir. Diğer konjenital hastalıklar olan konjenital glokomdan kornea ödemi olmaması, megalokorneadan ise belirgin korneal incelme olması ile ayırt edilebilmektedir. Keratoglobusta incelme en fazla limbusta belirgindir ve 360° dairesel olarak uzanır. Bu bulgu keratoglobusun KK’nin globus şeklinden ayırımını sağlamaktadır. KK’de görülen bölgesel incelmenin ve PMD’deki inferior paralimbal incelmenin aksine tüm kornea bombeleşmiştir.

Keratoglobusta gözlük tashihi iyi bir görme sağlar ve travmalara karşı koruyucu etkisi vardır bu nedenle başlangıç tedaviyi oluşturmaktadır. Kontakt lensler ve özellikle skleral lensler de iyi bir görme keskinliği için faydalıdır ancak takılıp çıkarılması esnasındaki travmatize etkisi nedeniyle pek önerilmemektedir. Cerrahi de hem perforasyon durumunda hem de hastalığın tedavisi açısından

uygulanabilir bir seçenek olmakla birlikte, cerrahi prosedürün prognozu diğer etkazilerdekine oranla daha düşüktür.[56]

2.2.11. Keratokonus Tedavi

Keratokonusa yaklaşım hastalık şiddetine göre değişir. Hafif vakalarda gözlükle vizüel rehabilitasyon yeterli olurken, orta-ileri vakalarda kontakt lensler, daha şiddetli vakalarda ise keratoplasti gibi cerrahi yaklaşımlar ön planda değerlendirilebilir. Diğer cerrahi yaklaşımlar ise hastalığın progresyonunu önlemeye yönelik korneal kollajen çapraz bağlama ve astigmatizmayı düzeltmeye yönelik yapılan lazer prosedürleri (fotorefraktif keratektomi, fototerapotik keratektomi, lazer in situ keratomileusis)'dir.

2.2.11.1 Gözlük ile düzeltme

Erken dönem keratokonus hastalarında düzenli miyop astigmatizma gözlük tashihi ile tedavi sağlanabilir. Ancak keratokonusta refraksiyon muayenesi özellik taşıır. Rutinde muayene için kullanılan otorefraktometre ile ölçülen değerler oldukça yanıltıcı olabilir. Genellikle net görememekten yakınan ve akomodasyon eğilimi de bulunan genç yaştaki bu hasta grubunda muayenede yanıltıcı olarak aşırı myopik değerlerle karşılaşılabilir. Hastalık ilerledikçe düzeltilemeyen düzensiz astigmatizma nedeniyle yeterli vizüel rehabilitasyon sağlanamaz.

2.2.11.2. Kontakt lensle düzeltme

Keratokonus hastalığı tedavisi için kontakt lenslerin kullanımı ilk kez 1888 yılında Fick tarafından tanımlanmıştır.[57] Yüzyılı aşkın süredir kontakt lens erken- orta evre keratokonusun tedavisinde en sık kullanılan ve en başarılı olan tedavi yöntemi olmuştur. Türkiye'den Bilgin ve arkadaşları tarafından 518 hastanın

1004 gözünün değerlendirildiği bir çalışmada keratokonuslu gözlerin 30 yıllık takiplerinde, kontakt lens kullanımının %99 hastada keratoplastiyi geciktirdiği ve etkili bir görsel düzeltme sağladığı gösterilmiştir. [58] Keratokonusda kullanılan kontakt lensler; yumuşak (hidrojel, silikon hidrojel), sert gaz geçirgen ve hibrid kontakt lenslerdir. Yumuşak kontakt lenslerin keratokonus hastalarında kullanımı oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda sferik sert kontakt lenslerin yüksek sıralı aberasyonların düzeltilmesinde ve vizüel performansın artırılmasında yumuşak kontakt lenslere oranla oldukça üstün oldukları gösterilmiştir.[59] Bu nedenle yumuşak kontakt lensler ancak forme- fruste keratokonus hastalarında ya da oldukça erken evre hastalarda kullanılmaktadırlar. Ancak yine de bu kontakt lensler sert lenslere oranla daha konforlu olmaları nedeniyle, sert kontakt lensi tolere edemeyen hastalarda ve gözlüğe göre çok daha iyi vizüel performans sağlaması nedeniyle de genç ametropik bireylerde tercih sebebi olabilmektedir.[60, 61]

Yüksek düzeyde irregüler astigmatizma için en sık kullanılan kontakt lensler ‘sert gaz geçirgen kontakt lensler’dir. Sert gaz geçirgen kontakt lensler, korneanın ön yüzeyini örterek sferik bir optik yüzey oluşturmaktadırlar. Böylece düzensiz astigmatizma ve ektatik korneaya bağlı optik bozuklukların düzeltilmesini sonuç olarak da vizüel kapasitenin artmasını sağlarlar. Bazı yayınlarda sert gaz geçirgen kontakt lensler ile sadece düşük sıralı aberasyonlarda değil yüksek sıralı aberasyonlarda da düzelme olduğu bildirilmiştir.[62]

Üç tür sert kontakt lens uygulama prensibi vardır;

1. Apikal açıklık (apikal clearance):

Lens korneal apeksle temas etmediğinden daha az travmaya sebep olur. Ayrıca apikal açıklıkta(vault belirgin olup) oksijen ve gözyaşı

değişiminin kolay olması avantajlıdır. Merkezi veya görme aksından hafifçe aşağıda olan koni apekslerinde tercih edilir. Lens çapı (8 mm) ve optik zonları (5,8 mm) küçüktür. Bu teknik küçük konilere daha iyi uygulanır. Tekniğin dezavantajı; gözyaşı göllenmesi ve lens altında biriken baloncuklar nedeniyle görme keskinliği azalmasıdır.

2. Apikal dayanma (Apical bearing):

Bu teknik santral olmayan konilerde faydalıdır. Apeks aşağıda olduğundan uygulamada lens aşağıda duracağından daha geniş çaplı lensler tercih edilmelidir (9-10 mm). Dezavantajı; daha geniş bir merkezi dokunma (≥ 4 mm) olacağından merkezi skar veya erozyon olasılığı fazladır ve lensin kendisi de progresyona neden olabilir.[63]

3. Üç noktadan temas (Three point touch):

Lenslerin çapı genelde 7,80-8,50 mm'dir. 2-3 mm çaplı merkezi temas alanı ve genellikle yatay meridyende kornea -midperiferinde 2 temas alanı bulunur. Bu temas alanları lensin ağırlığını tüm korneaya dağıtır. Apikal temas 2-3 mm'yi aşmamalıdır, noktavi boyanma ve kornea erozyonu oluşabilir. Geniş çaplı veya ileri derecede aşağı yer değiştirmiş kornealarda bu teknik kullanılmamalıdır, çünkü lensin merkezileşmesi istenen şekilde olamaz.[63]

Günümüzde multikörv, tek ya da değişken asferisiteye sahip asferik dizaynı ve sıkça kullanılan lensler Rose K lensleridir (Menicon Co., Ltd., Nagoya, Japan).[64] SoftPerm (Ciba Vision, Duluth, Georgia, USA)[65], Solotica (Solotica, Brazil) [66] ve son zamanlarda Synergeyes (SynergEyes, Carlsbad, CA, USA) [67] gibi hibrid lensler de keratokonus tedavisinde

kullanılmaktadır. Bu lensler kullanım konforu için ortası sert kenarları yumuşak lens yapısında tasarlanmıştır. Ancak standart gaz geçirgen lenslere oranla daha pahalıdır. Piggy-back sistemler, altta yani korneaya temas eden yüzde yumuşak kontakt lens ve onun üzerinde de sert kontakt lens olmak üzere iki lensten oluşan kontakt lenslerdir. Alttaki yumuşak kontakt lens hem kullanım kolaylığı ve konforu sağlar hem de sert kontakt lensin uygulanacağı alanın daha düzenli olmasına neden olur. Ancak oksijen geçirgenliği yüksek olan lensler kullanılmadığı sürece korneal hipoksi riski taşırlar.

2.2.11.3. Cerrahi prosedürler

2.2.11.3.1. İntrakorneal halka segmentleri (INTACS)

Polimetilmetakrilattan üretilen 150 derecelik halka şeklindeki segmentlerdir. İnsizyonun yapılacağı kornea bölgesinde $\geq 450\mu$ korneal kalınlık cerrahinin sağlıklı olması ve postoperatif komplikasyonların önlenmesi için gereklidir. Dikleşip öne doğru bombeleşen yumuşak konik dokuyu düzleştirip santral kornea şeklini daha normale yakın hale getirdiği düşünülmektedir. Bu sayede refraktif hata, düzensiz astigmatizma ve aberasyonları azaltıp, görme keskinliği ve kontakt lens toleransını arttırmak hedeflenmektedir. Böylelikle prosedüre uygun vakalarda keratoplastiyi geciktirmek veya gereksinimi ortadan kaldırmak mümkün olabilmektedir.[68, 69]

2.2.11.3.2. Keratoplasti

2.2.11.3.2.1. Penetran Keratoplasti:

Penetran keratoplasti keratokonus hastalığı yönetminde uzun yıllardır uygulanan bir yöntemdir.[70, 71]. Keratokonus ise günümüzde hala penetran

keratoplasti endikasyonları arasında önemli bir paya sahiptir. [72] Özellikle erken başlangıçlı, 60 D'den büyük keratometri değerlerine ulaşmış, santral skarlı, kontakt lensi tolere edemeyen, kornea kalınlığı 400 mikrondan daha ince ve çapraz bağlama tedavileri için uygun olmayan kornealarda penetran keratoplasti gerekebilmektedir. Penetran keratoplasti intraoküler bir cerrahidir ve cerrahi sırasında ekspulsif hemoraji, sonrasında da uzun dönem steroid kullanımına sekonder katarakt ve glokom gibi birçok ciddi komplikasyona neden olabilir. Ancak penetran keratoplastinin en önemli komplikasyonlarının temelinde alıcı endotelinin korunmaması yatmaktadır. Bu durum erken ve geç rejeksiyonların tetiklenmesinde önemli rol oynamakta ve greft devamlılığını oldukça azaltmaktadır. Bu durum ise lamellar cerrahinin keratokonus hastalığında popülaritesinin artması ve uygun olan vakalarda penetran keratoplastinin önüne geçmesiyle sonuçlanmıştır.[73, 74]

2.2.11.3.2.2. Lameller Keratoplasti:

Lamellar keratoplasti ile korneanın sadece patolojik olan kısmı eksize edilir, ancak alıcının sağlıklı dokularına dokunulmaz ve bu sağlıklı dokular bırakılır. Lamellar keratoplasti cerrahisi günümüzde alıcı endotelindeki önemsenmeyecek kadar az kayıp olması, düşük rejeksiyon oranı ve uzun greft ömrü nedeniyle keratokonus ve diğer durumlarda sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Femtosaniye lazer ve mikrokeratom teknikleri ile işlem daha kolay uygulanır hale getirilmeye çalışılmaktadır. Muhtemelen yakın gelecekte gelişmiş femtosaniye lazer teknikleri ile lameller keratoplasti, keratokonus tedavisinde önemli bir yer tutacaktır.

Endikasyonlar: K-maks 65 D'den büyük, en ince noktada kornea kalınlığı 350 mikron'dan küçük, 6 D'den fazla sferik ve/veya slindirik hata, ön kornea skarlı ve stres çizgileri olan ilerlemiş hastalık tablosunda uygulanabilir. [73, 75]

LK ile ilgili problemler: Teknik PK'den daha zor, ameliyat süresi uzun, greft-alıcı yüzeyinde komplikasyon, yüksek sıralı ve tilt aberasyon fazla, postoperatif myopi PK'dan fazladır.

2.2.11.3.3. Fotorefraktif Keratektomi (PRK):

Excimer lazer prosedürlerinden fotorefraktif keratektomi (PRK), kornea stromasından küçük miktarda ablasyon yaparak anterior santral korneanın kalıcı şekil değişikliğine neden olur. Bazı çalışmalarda, erken keratokonuslu olgularda kon progresyonunu yavaşlattığı ve aynı zamanda görme keskinliğinde artış sağladığı ve yüksek sıralı aberasyonları azalttığı gösterilmiştir.[76, 77] Excimer lazer cerrahisinin de yaygın olarak kullanılmasıyla birlikte postlazer ektaziye yol açmaması için KKÇB ile kombine bir teknik olan 'LASİK Xtra' kavramını öneren ve uygulayan cerrahlar mevcuttur. [5, 6]

2.2.11.3.4. Korneal kollajen çapraz bağlama (KKÇB)

Her ne kadar çapraz bağlanma, polimerler oluşturmak için kimya, kalp protezleri için tıbbi mühendislik ve dişçilik gibi farklı endüstrilerde halihazırda kullanılan bir yöntem olsa da, bu yöntemin oftalmoloji alanında kullanımı Seiler ve ekibi tarafından sağlanmıştır.[78] Kollajen çapraz bağ yöntemi her türlü kornea ektazisi ve özellikle de keratokonus tedavisinde umut verici olmuştur. Bu süreçten önce hastalığın patofizyolojisine yönelik bir tedavi modalitesi bulunmamaktaydı.

Dört çapraz bağlama tipi bulunmaktadır:

1.Enzimatik KKÇB; lizin oksidaz enzimi ile kollajen liflerinin maturasyon süreci içinde doğal yollardan çapraz bağlanması bu yolla olur. Belirli aminoasitlerin amino gruplarını aldehide çevirip diğer aminoasitlerin amino grupları arasında kovalan bağ oluşumunu sağlar.

2. Kimyasal KKÇB (gluteraldehid /formaldehid ile aldehyd reaksiyonları) patoloji spesimenlerinin fiksasyonunda kullanılır.

3. Enzimatik olmayan glikasyon doğal yaşlanma süreci sırasında ve diabetiklerde görülür. İleri glikasyon son ürünleri kollajen,elastin ve proteoglikanlar arasında çapraz bağları artırır. Uzun süre monosakkaridlere maruz kalmak indirgenen şeker ve proteinlerin amino grupları arasında spontan kovalan çapraz bağ oluşumuna yol açar.

4. Fotosensitizer varlığında (Riboflavin) foto kimyasal KKÇB

Çapraz bağlama prosedürünün ilk defa 1998 yılında Dresden Üniversitesi'nde Seiler ve ekibi tarafından ektatik kornea hastalıklarının tedavisinde kullanımı öne sürülmüştür.[78] Yapılan çalışmada 160 domuz gözünde UV ışık ve bu ışığa karşı duyarlılaştırıcı özellikte olan riboflavin çeşitli doz ve sürelerde uygulanmıştır. Bu yöntemle kollajen-kollajen arası çapraz bağlarının gelişmesi sağlanarak, korneanın gerinim kuvvetinin önemli ölçüde artırılabilirdiği gösterilmiştir. [78]

Tedavinin ana kullanım alanları progresif keratokonus, korneal ülser ve keratit tedavisi, excimer lazer tedavisi öncesi postoperatif iyatrojenik keratektazi riskinin azaltılmasıdır.[3, 6, 16, 79]

2003'te Wollensak ve arkadaşları riboflavin ve ultraviyole A (UVA) kullanılarak yapılan KKÇB metodunun etkinliğini ve güvenilirliğini araştıran çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar metodun klinik uygulanmasında çok önemli yere sahiptir. Tavşan ve domuz gözlerinde bu prosedürün uygulaması sırasındaki endoteli koruyucu uygun doz ve süreyi değerlendirmişlerdir. [6, 17, 18]

370 nm UVA, riboflavin üzerine uygulandığında riboflavin reaktif oksijen moleküllerine ayrılır (single oksijen ve süperoksit anyonu). Reaktif oksijen molekülleri kollajen lifleri ve diğer stromal makromoleküller arasında kovalent bağların gelişmesini indükler. Oluşan polimerizasyon kornea kollajeninin rijiditesini artırarak daha sert bir kornea gelişmesini dolayısıyla da korneanın keratektaziye karşı direncini artırır. Kollajenler arası çapraz bağlama etkisi tüm kornea derinliği üzerinde homojen dağılmaz. Sertleşme etkisi riboflavinin yoğunlaştığı ve dolayısıyla ultraviyole A emiliminin yüksek olduğu anterior stromada daha belirgindir. Riboflavin tarafından maksimum absorpsiyon 370 nm dalga boyunda olduğu için bu dalga boyunda UVA seçilmiştir.

Teknik:

Topikal anestezi altında 7 mm santral korneal epitel spatül yardımıyla kaldırılır. UVA uygulanmasından 5 dakika önce başlayarak UVA süresince 5 dakikada bir % 0.1 riboflavin 30 dakika boyunca uygulanır. Hastanın korneası 1 cm uzaklıktan UV-A diyotları (370 nm) ile 30 dakika boyunca 3mW/cm² şiddetinde ışınlanır. Bu ışınlama prosedürü ile toplam uygulanan enerji dozu 5,4 J/cm² olmaktadır.

0.36 mW/cm² üzerindeki irradiasyonun endotele toksik olduğu ve 400µm'den ince stroması olanlarda bu değerin endotele ulaşabileceği

gösterilmiştir. Bu nedenle işlem sırasında endotel güvenliği açısından, stroma kalınlığının 400µ üzerinde olması gerektiği vurgulanmaktadır. [17, 18]

Aynı ekibin 2007 yılında yaptığı bir yayında, standart prosedürdeki UVA ışınlaması öncesinde epitel debridmanı sonrası, 5 dakika süre ile uygulanan %0,1 riboflavin uygulamasının süresi artırılarak 30 dakika çıkarılmıştır. Bu sayede riboflavin difüzyonu daha da arttırılmıştır. [80]

Yapılan çalışmalarda KKÇB yönteminin progresyonun önlendiği, keratometrik değerlerde düzleşme sağladığı ve görme keskinliğinde bir miktar artışa neden olduğu gösterilmiştir (90-92).

Standart KKÇB olarak adlandırılan bu yöntemin bu kadar etkili olmasına rağmen çok ince (<400 µm) kornealarda endotel hasarı yapması, işlem sonrası ağrı, geç iyileşme dönemi, işlem süresinin uzun olması, keratometrik ve refraktif düzeltmenin yetersiz olması, çocuklarda uygulama zorluğu, enfeksiyöz komplikasyonlar gibi dezavantajları da vardır. İnce kornealar için hiperosmolar riboflavin solüsyonları ya da daha kısa irridasyon süresi gibi yöntemler geliştirilmeye çalışılsa da bu yöntemlerin de etkinlikleri kısıtlı olmaktadır.[81]

2.2.11.3.5. Rose Bengal ve Yeşil Işık Korneal Kollajen Çapraz Bağlama

Rose bengal ilk olarak Alman bir biliminsanı Ghnem tarafından 1882 yılında patent almış bir boya olmasına rağmen üzerine yapılan çalışmalar çok daha eski yıllara dayanmaktadır. Medikal alanda kullanımı ilk olarak 1914'te Römer ve arkadaşları tarafından oküler pnömokoksik enfeksiyon tedavisinde antiseptik olarak kullanılmıştır. Rose Bengal, kuru göz ve benzeri gözyaşı film bozukluğuna sekonder hasarlı oküler yüzey hücrelerinin tespitinde oftalmolojik olarak sıklıkla kullanılan bir boyadır.[82] 1920-1945 yılları arası ise oküler lezyonların tespiti için

en sık kullanılan boya olmuştur.[83] Aslında temel olarak flöreseinden türemiş olan bir boyadır. [84] pH 4-11.6 arasında sodyum fosfat tamponu içerisinde yaklaşık 550 nm dalga boyunda pik spektral absorpsiyon özelliğine sahiptir.[85] Özellikle bu dalga boyunda yüksek absorpsiyon özelliği sebebiyle 532 nm yeşil ışık ile boyanın fotoduyarlılaştırıcı etkisini aktive etmek mümkün olmaktadır. Rose bengal aracılı çapraz bağlama uygulamasında fotoduyarlılaştırıcı olarak rose bengal boyası kullanılırken, ışın olarak ise 532 nm yeşil ışık kullanılmaktadır.[28] Son dönemlerde popüler olan rose bengal ve 532 nm yeşil ışık kullanılarak çapraz bağlama kavramında; yaklaşık 532 nm dalga boyunda ışın uygulandığında bu ışının etkisiyle serbest radikal oluşturmak üzere rose bengal molekülü kollajenden bir elektron alacak şekilde aktive olur. Böylelikle ekstraselüler matriksteki kollajenler birbirlerine ve diğer yapılara bağlanır. [25] Bu yöntem sütürsüz cerrahi uygulamalarında [86], amniyotik bandaj tedavisi sırasında korneal yapışmayı sağlamak amacıyla [87], intraoküler lens implantasyonu sırasında kapsüler yatak desteğinin sağlamlaştırılması amacıyla [88] deneysel modellerde kullanılmaya ve geliştirilmeye çalışılmıştır. Farklı dokularda sağladığı kollajen kovalent bağlama içeren bu uygulamalara benzer şekilde, rose bengal ve yeşil ışık uygulaması korneal kollajen fibrillerde de çapraz bağlar oluşturarak riboflavin UVA tedavisindekine benzer şekilde korneayı sertleştirir.[29] Rose bengal ve kollajen arasındaki çapraz bağlama, riboflavine göre çok güçlüdür. Bu durum in vitro kültür hücrelerine hem rose bengal hem riboflavin toksikken[14, 15], rose bengalin deneysel çalışmalarda in vivo neden toksik olmadığını açıklamaktadır. Bu güçlü bağlanma sayesinde interselüler matrikste serbest rose bengal miktarı oldukça azalmakta ve keratositler içine olan diffüzyon dolayısıyla da toksisite azalmaktadır.[29] Rose bengalin

kollajene bağlanma Özellikle korneal sertlik artışı amacıyla araştırıldığı çalışmalar 100 µm kadar anterior stromadaki kollajen fibriller üzerine etkili olduğunu göstermiş, bu nedenle oldukça anterior stromal etkisi olduğunu belirtmişlerdir. [29] Rose bengalin yüksek negatif yüklü olması ve kollajenin ise üzerinde taşıdığı yoğun pozitif yüklü lizin, hidrokisprolin ve arjinin moleküllerinin yüksek güçle bağlanmasının kornea yüzeyinde yoğun negatif bir yük oluşturur.[89] Cherfan ve arkadaşları kornea yüzeyindeki yoğun negatif yüklenmenin sonucunda, stromaya derinlerine ilerleyebilecek rose bengal miktarının azalabileceğini düşünmektedirler.[29] Bu durum özellikle rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlamanın ince kornealar için uygun çapraz bağlama yöntemi olabileceğini düşündürmektedir.

Rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama sadece korneal direnç artışı sağlamakla kalmayıp antimikrobiyal özelliği sayesinde enfeksiyonların tedavisinde de kullanılabilecek bir tedavi yöntemidir. Dirençli bakteriyel keratitlerin tedavisinde riboflavin/UVA aracılığıyla uygulanan ‘enfeksiyöz keratitlerin tedavisinde fotoaktif kromofor’ tedavisine (photoactivated chromophore for infectious keratitis- PACK CXL) oldukça etkili bir alternatif olarak rose bengal ve yeşil ışık uygulaması kullanılabileceği klinik çalışmalarda gösterilmiştir.[26, 27] Hatta dirençli fungal izolatlarda riboflavin PACK CXL’den üstün olduğu ve oldukça önemli bir klinik problem yaratan akantomoeba kistleri üzerine de tedavi edici özelliğinin olduğu in vitro çalışmalarla gösterilmiştir.[22, 27]

Tüm bu özellikleri sayesinde rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama birçok alanda üzerinde çalışılan ve oldukça umut vadeden bir yöntem olarak gözükmektedir.

2.2.11.3.6. İyontoforez:

Riboflavinin transepitelyal yolla stromaya geçişini artırmak için iyontoforez yardımcı KKÇB uygulanmaya başlanmıştır. İyontoforez, elektrik akımı kullanılarak çeşitli iyonların dokuya geçişini artırmak için kullanılan noninvaziv bir yöntemdir. Bir asırdan fazla süredir oftalmolojide transkonjonktival ve transkorneal ilaç uygulamasında kullanılmaktadır. İyontoforez oftalmolojide özellikle non enfeksiyöz üveitlerin, oküler enfeksiyonların, kuru gözün ve başka hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. İyontoforez yardımı ile yapılan transepitelyal KKÇB tedavisinin etkili ve hastalar için konforlu bir yöntem olduğu gösterilmiştir.[9]

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmada, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) ötanazi yapılmış tavşanlara ait enükle gözler kullanılmıştır. Çalışma için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır. Çalışma basamakları ve sonlandırılması, GÜDAM'da ve Göz Hastalıkları Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Örneklerin biyomekanik özelliklerini değerlendirmek için yapılan tek eksenli tansiyometre (stress-strain) testi Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.Deney Planı

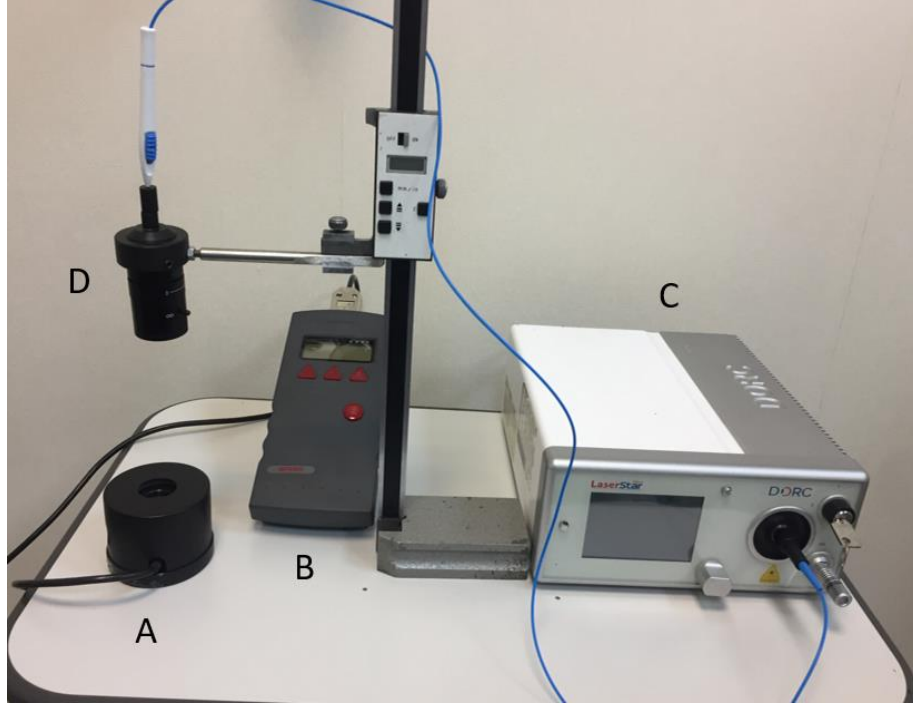
Çalışmada, GÜDAM bünyesinde yeni ötanazi yapılmış, erişkin, ötanazi anında 2.5-3 kg ağırlığındaki 36 Yeni Zelanda tavşan kadavrasına ait 45 adet taze enükle edilmiş göz kullanılmıştır. Bu gözler deneyin uygulanacağı güne kadar -80°C buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.1.1.Dokunun Hazırlanması

Donmuş enükle tavşan gözlerinin, deneyin uygulanması esnasında oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Kornea ödemi azaltmak amacıyla %15 mg/ml dekstran (moleküler ağırlık: 450,000–600,000; Sigma, St. Louis, MO, ABD) içeren fosfat tamponlu salin (PBS) (PBS; Fisher Bioreagents, Fair Lawn, NJ, ABD) çözeltisi 1 damla/dakika olacak şekilde 10 dakika süreyle damlatıp ve pakimetri ile kornea kalınlığı $\leq 500 \mu\text{m}$ olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.1.2. Işıık Kaynağı

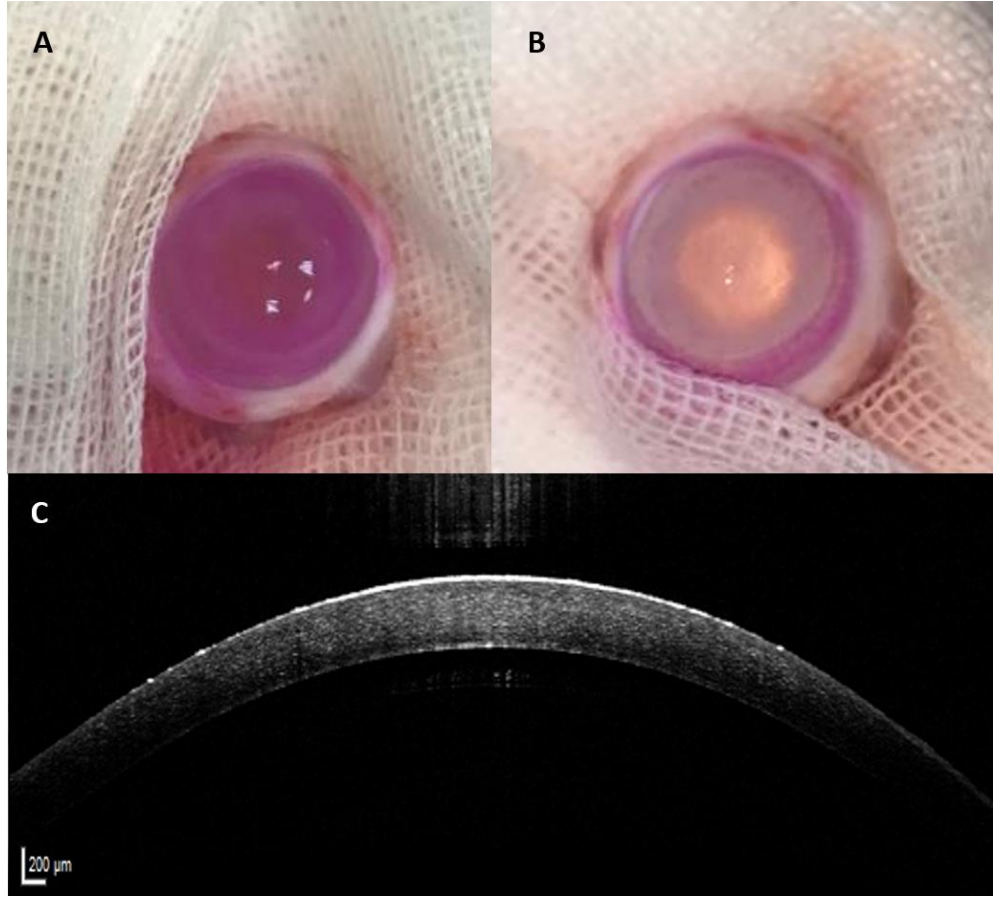
532 nm yeşil ışık lazer (LaserStar, DORC, Hollanda) kaynağı ve bu cihaza ait 23 G standart lazer probu kullanılmıştır. (Şekil 1C) Lazer ışığının hedef alanında 1.2 cm çapa genişletilmesi amacıyla endoprobun ucuna 650 mm ışık geçirgenliği ve kaplamasız optik lens bloğu (Yuratek) yerleştirilmiş ve kornea üzerindeki uygulama alanı büyütülmüştür (Varifokal 3.5-8mm f:1.2 lens kullanıldı) (Şekil 1D). Her uygulama öncesi lazer güç ölçer (Nova, P/N 7Z01500, Ophir, North Andover, MA) ile 250 miliwatt irridasyon sağlanacak şekilde güç kalibrasyonu yapılmıştır (Şekil 1A).



Şekil 1. Tarafımızca oluşturulan korneanın oturmasını sağlayan yuvarlak düzenek (A), bağlantılı olduğu lazer güç ölçer (B) ve 532 nm yeşil ışık lazer sistemi (C), lazer sisteminin endoprobunun bağlandığı tarafımızca oluşturulan mercek düzeneği (D).

3.1.3.Çapraz Bağlama ve İyontofarez Prosedürü

Tez öncesinde yapılan literatür incelemesinde, rose bengal boyasının iyontofarez yöntemi uygulanmasının etkinliğini araştıran herhangi bir çalışma bulunamamıştır, literatür desteği bulunmadığı için araştırmamız deneyler sırasında elde edilen sonuçlara göre şekillenmiştir. Buna göre transepitelyal iyontofarez aracılığı ile 10 dakika 1.3 miliamper akımla %0.1 rose bengal çözeltisi uygulaması sonrası sadece epitelde boyanma gözlenmesine rağmen, epitel kazınması sonrası stromada hiç boya tutulumu olmadığı görüldü (Şekil 2 A ve B). Teyit için alınan ön segment OCT incelemesinde de stromada hiç boya tutulumu olmadığı sadece yüzeysel epitelde boyanma olduğu görülmüştür (Şekil 2 C). Bundan dolayı rose bengalin iyontofarez ile epitelde boyanma geçişinin olmadığı görülmüş ve deneysel yaklaşımımız epi-off iyontofarez yapılması yönünde şekillenmiştir.

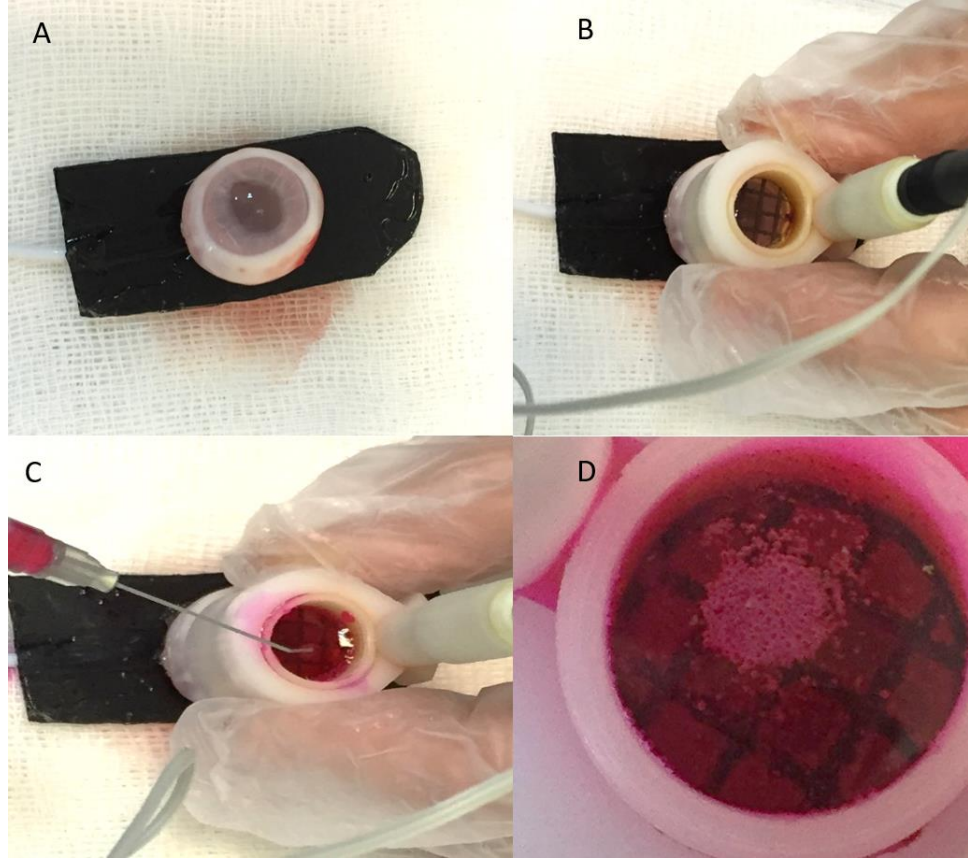


Şekil 2. Epi-on rose bengal çapraz bağlama tedavisi sonrası kornea ve ön segment OCT görüntüleri

A. İyontoforez sonrası epitelyal boyanma görülmekte, B. Epitel kazınması sonrası hiç stromal boyanma olmadığı görülmekte, C. Ön segment OCT’de sadece epitelyal düzeyde boyanma olduğu, stromaya hiç boya geçmediği görülmekte

0.1 gram rose bengal (Sigma) 100 ml distile suda çözülüp (%0.1), pH ölçülmüş ve konsantre NaOH ve HCl ile konsantrasyon pH 6.6-6.8 arası değerde olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm enükleer gözlerin epitelleri yarım ay (crescent) bıçak (Katena, Denville, NJ, ABD) ile kazınmıştır. Gözler 4 gruba ayrılmıştır; birinci grup (n: 8) kontrol, ikinci grup (n: 8) sadece %0.1’lik rose bengal uygulaması yapılan grup, üçüncü grup (n:7) epi- off yöntemle %0.1’lik rose bengal çapraz bağlama uygulanan grup, dördüncü grup (n:7) epi-off yöntemle iyontoforez aracılığıyla %0.1’lik rose bengal çapraz bağlama uygulanan grup olarak belirlenmiştir. Birinci gruptaki gözlere herhangi bir uygulama yapılmamıştır. İkinci grupta gözlere %0.1’lik rose bengal solüsyonu 10 dakika boyunca her 30 saniyede

bir damlatılmıştır. Üçüncü gruptaki gözler %0.1'lik rose bengal solüsyonu ile her 30 saniyede bir damla tekrarlanarak 10 dakika boyunca muamele edilmiştir. Takiben her 150 saniyede 60 saniye ara verilerek 250 miliwatt irridasyon gücünde yeşil ışık 7 dakika boyunca uygulanmıştır (250 miliwatt/cm² yeşil ışık 7 dakika boyunca uygulanmış olup toplamda her bir kornea 100 Joule/cm² gücünde enerjiye maruz bırakılmıştır). Dördüncü gruptaki globlara ise iyontoforez yardımı ile %0.1'lik rose bengal solüsyonu uygulanmıştır. Pozitif elektrot globun altına serilmiş ve globun posteriorundan globa yapıştırılmış oldu (Şekil 3A). Rose bengal solüsyon pH'ı 6,6-6,8 olarak ayarlandığı için ortasında negatif elektrot olan 8 mm'lik iyontoforez havuzu, havuzun içinde %0,1'lik rose bengal solüsyonu olacak şekilde korneaya sabitlenmiştir (Şekil 3B). Havuz %0.1'lik rose bengal solüsyonu ile doldurulduktan sonra (Şekil 3C) yüksek hassasiyetli ayarlı güç kaynağı (Yuratek) ile 10 dakika boyunca 1,3 mA sürekli bir akım uygulanmıştır. Elektrik akımı başladıktan sonra negatif elektrot üzerinde baloncuklar oluştuğu görülmüştür (Şekil 3D). Akım devamlılığı korunarak beşinci dakikada hazne içerisindeki rose bengal solüsyonu yenilenmiştir. İyontofarez işlemi tamamlandıktan sonra her 150 saniyede 60 saniye ara verilerek 250 miliwatt irridasyon gücünde yeşil ışık 7 dakika boyunca uygulanmıştır (250 miliwatt/cm² yeşil ışık 7 dakika boyunca uygulanmış olup toplamda her bir kornea 100 joule/cm² gücünde enerjiye maruz bırakılmıştır).



Şekil 3. Enükle gözlerde rose bengal iyontoforez uygulaması

A. Pozitif elektrodun globun altına serildiği, B. Havuzun glob üzerine yerleştirilmesi, C. Havuzun rose bengal ile doldurulması, D. Elektrik akımı sırasında oluşan baloncuklar görülmektedir.

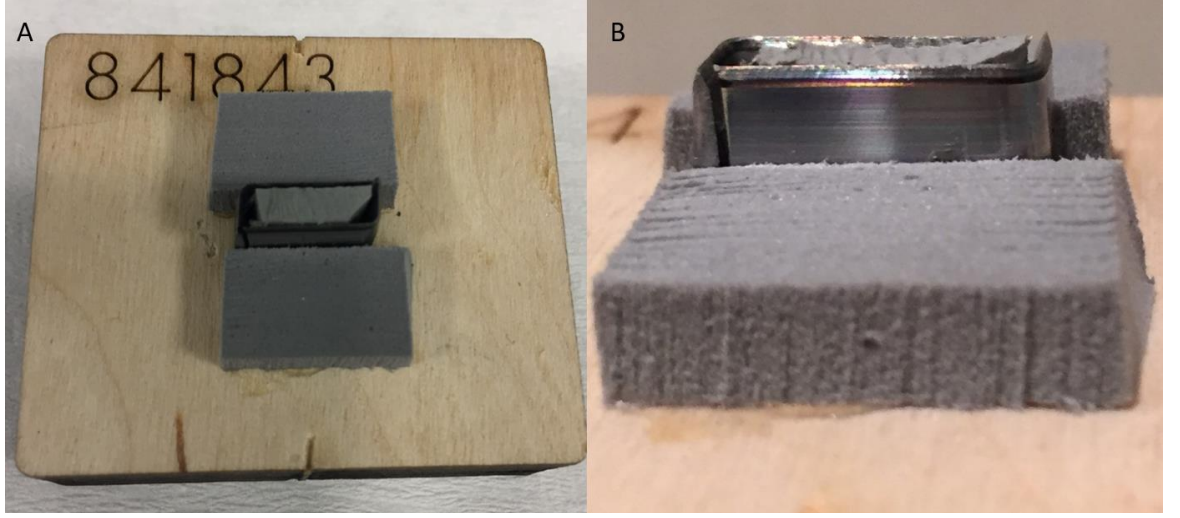
3.1.4. Optik Koherens Tomografi ile Boya Derinliğinin Tespiti

Çapraz bağlama tedavisinin uygulandığı iki grup olan grup 3 ve grup 4'teki globlara işlem sonrası ön segment OCT (Heidelberg Engineering GmbH) çekilmiştir. Her glob için alınan ön segment OCT görüntülerinden santral kesitler seçilmiş ve inceleme bu santral kesitler üzerinden yapılmıştır. Image J (Image J versiyon 1.47, National Health Institute, Bethesda, Maryland, ABD) programı yardımıyla bu görüntüler üzerinden her göz için 1 adet santral korneal kesit seçilmiştir. Bu kesit üzerinde nazal-temporal doğrultuda, santral 3000 μm 'lik alan içerisinde 3 farklı

alandan boyanın ulaştığı derinlik ve total kornea kalınlığı ölçülerek bunların yüzdesel oranları değerlendirilmiştir, böylelikle boyanın korneada ulaştığı derinlik değerlendirilmiştir. Daha sonra bu değerlerin istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

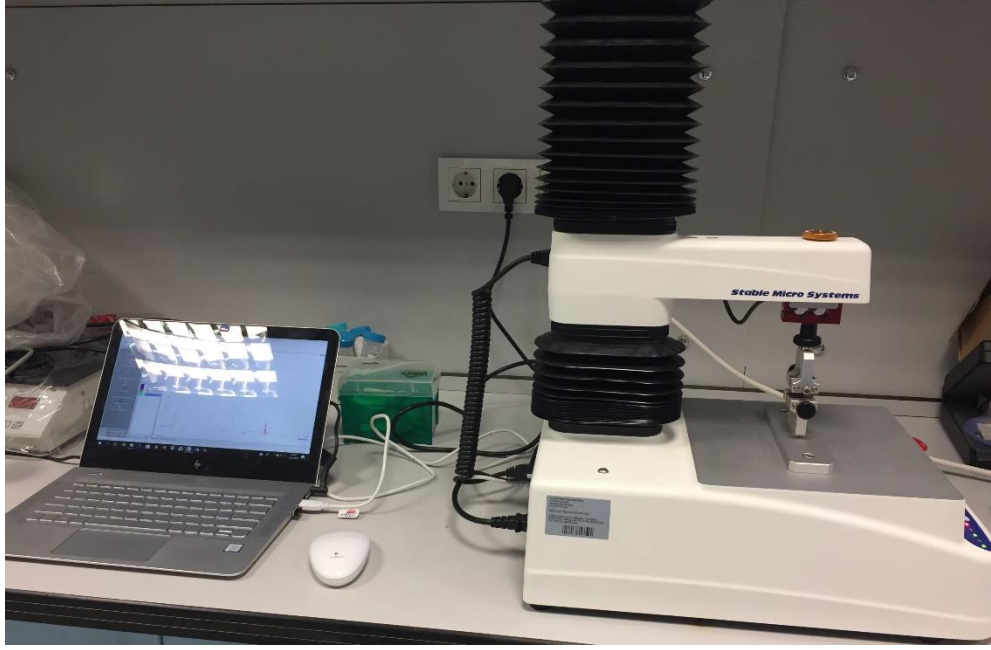
3.1.5. Tek Eksenli Tansiyometre (Stres-Germe Testi)

Uygulama yapılmış gözlerin korneal kalınlıkları pakimetri ile ölçülmüş ve kornea kalınlıkları ≤ 550 μm olacak şekilde %15 mg/ml dekstran (moleküler ağırlık: 450,000–600,000; Sigma, St. Louis, MO, ABD) içeren PBS (PBS; Fisher Bioreagents, Fair Lawn, NJ, ABD) çözeltisi 1 damla/dakika damlatılmıştır. Standart korneal şeritler oluşturmak için keskin bistüriler kullanılarak dikdörtgen bir bıçak sistemi oluşturulmuştur (5mm x 10 mm) (Yuratek) (Şekil 4). Bunun yardımıyla temporal-nazal yönde eni 5 mm, boyu 10 mm olacak şekilde standart santral korneal şeritler oluşturulmuştur.

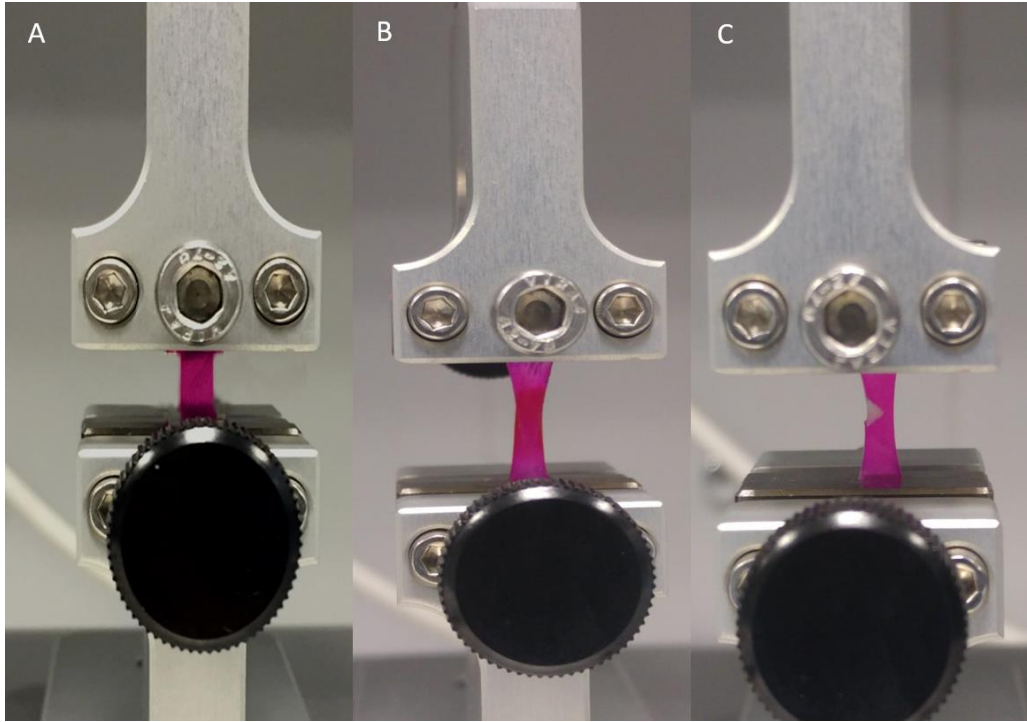


Şekil 4. Standart korneal şeritler elde etmek adına kullanılan dikdörtgen bıçak sistemi (A ve B).

Tek eksenli tansiyometrenin (TA.XTPlus, Texture Analyser, Stable Micro Systems, USA) (Şekil 5) çeneleri arasına 5mm X10mm kornea şeritleri yerleştirilmiş ve iki çene arasına sıkıştırılmıştır. Her iki arasında 2'şer mm kornea sıkışacak ve çeneler arası mesafe 6 mm olacak şekilde ayarlanmıştır. Gerginlik, hızı dakikada 1,5 mm olacak şekilde ayarlanmış ve stres değerleri ise şeritte kısmi yırtılma olana kadar ölçülmeye devam edilmiştir (Şekil 6). Korneal direnç (stiffness), %10 uzama anındaki güç değerinin korneal uzamaya bölümüyle elde edilmiştir (force/displacement). Elastik modülü (Young's modülü)değeri ise %10 uzama değerindeki, stres değerinin şeritteki gerginlik değerine bölünmesiyle hesaplanmıştır (stress/strain).



Şekil 5. Tek eksenli tansiyometre sistemi ve ilişkilendiği bilgisayar sistemi



Şekil 6. Tek eksenli tansiyometre çeneleri arasına yerleştirilmiş testin farklı evrelerindeki korneal şeritler

A. Başlangıç aşaması, B. Bir miktar gerim uygulanmış evre, C. Korneal şeritte yırtılmanın tespiti görülmektedir.

3.1.6. Lazer Güç Ölçer ile Güvenlilik Testleri

Hiç işlem uygulanmamış olan enükleer tavşan gözlerinin (n: 15) kornea epitelleri kresent bıçak (Katena, Denville, NJ, USA) ile kazınmıştır. Daha önce tanımlandığı gibi kornea kalınlıkları, %15 dekstran-PBS solüsyonu aracılığı ile ≤ 500 μm olarak ayarlanmıştır. 5 göz kontrol grubu olarak belirlendi, bu gözlerin korneaları 360 derece korneaskleral bileşkeden eksize edilip lazer güç ölçer (Nova, P/N 7Z01500, Ophir, North Andover, MA) ile bağlantılı tarafımızca oluşturulmuş olan sistemin üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 7). Yerleştirme sonrası 532 nm 250 miliwatt yeşil ışık ile 7 dakika süre ile ışınlanmıştır. Işınlama süresince 0. dakika, 3. dakika, ve 7. dakikalarda korneanın altına geçebilen iridasyon miktarı lazer güç ölçer tarafından tespit edilmiştir. Sadece damla uygulaması değerlendirilecek olan gözlere (n:5) %0.1'lik rose bengal solüsyonu her 30 saniyede 1 damla tekrarlanarak ile 10 dakika boyunca damlatıldı ve ardından daha önce tanımlandığı gibi kornealar eksize edilmiştir. Eksize edilen rose bengal ile boyalı kornealar sistem üzerine yerleştirilip 532 nm 250 miliwatt yeşil ışık ile 7 dakika süre ile ışınlanmıştır. Işınlama süresince 0.dakika, 3.dakika, ve 7.dakikalarda korneanın altına ulaşan iridasyon miktarı lazer güç ölçer tarafından tespit edilmiştir. İyontoforez uygulamasının değerlendirileceği gözlerde ise (n:5) iyontoforez yardımı ile rose bengal uygulandıktan sonra (daha önce detaylı olarak tanımlanmış olduğu gibi) kornealar uygun şekilde eksize edilip, sistem üzerine yerleştirilmiştir. 532 nm 250 miliwatt iridasyon gücünde yeşil ışık ile 7 dakika süre ile ışınlanmıştır. Işınlama süresince 0. dakika, 3. dakika, ve 7. dakikalarda korneanın altına ulaşan iridasyon miktarı lazer güç ölçer tarafından tespit edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. 532 nm yeşil ışık lazer ile ışınlanan korneada, korneayı aşan irradyasyon miktarının lazer güç ölçer tarafından tespiti

3.2. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri için SPSS 22 istatistik paket programı kullanılmıştır.

Tanımlayıcı istatistikler kısmında kategorik değişkenler sayı, yüzde verilerek; sürekli değişkenler ise ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca (en küçük-en büyük değer) ile sunulmuştur. Yapılan normallik analizleri sonucu sürekli değişkenlerin normal dağılım göstermediği bulunmuştur. Normal dağılım göstermeyen verilerde Kruskal Wallis varyans, ikili karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma gruplarında tek eksenli tansiyometre ile değerlendirilen elastik modülü ve korneal sertlik değerleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 1). Sonuçlara bakıldığında iyontoforez aracılığı ile rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama yapılan grup 4'ün elastik modülü ve korneal sertlik değeri diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Ayrıca grup 3'ün elastik modülü ve korneal sertlik değerinin de grup 1'e oranla istatistiksel anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($P:0.023$). Ancak ışınlama olmaksızın rose bengal damlatılan grup 2 ve grup 1 arasında herhangi bir fark edilmemiştir ($P:0.125$).

Tablo 1. Tek Eksenli Tansiyometre ile Korneal Biyomekanik Özelliklerin Değerlendirilmesi

	Grup 1 n:8	Grup 2 n:8	Grup 3 n:7	Grup 4 n:7
Kornea Kalınlığı(mm) Ortalama $\pm$ ss Medyan (Min-Maks)	0,499 $\pm$ 0,013 0,504(0,486-0,524)	0,501 $\pm$ 0,011 0,500(0,485-0,520)	0,491 $\pm$ 0,012 0,492(0,478-0,514)	0,504 $\pm$ 0,013 0,501(0,492-0,530)
Elastik Modülü(MPa) Ortalama $\pm$ ss Medyan (Min-Maks)	1,32 $\pm$ 0,84 1,29(0,1-2,5)	1,49 $\pm$ 0,77 1,54(0,175-2,52)	3,07 $\pm$ 1,79 3,11(0,43-6,08)	6,34 $\pm$ 3,47 4,38(3,56-12,5)
Kornea Sertliği(N/mm) Ortalama $\pm$ ss Medyan (Min-Maks)	0,34 $\pm$ 0,22 0,32(0,25-0,65)	0,37 $\pm$ 0,2 0,381(0,04-0,65)	0,76 $\pm$ 0,44 0,77(0,1-1,49)	1,59 $\pm$ 0,84 1,16(0,89-3,08)
<i>P</i>Kornea Kalınlığı*	<i>G1 vs G2:0.574</i> <i>G1 vs G3:0.189</i> <i>G1 vs G4:0.779</i>		<i>G2 vs G3: 0.281</i> <i>G2 vs G4:0.694</i> <i>G3 vs G4:0.073</i>	
<i>P</i>Elastik Modülü*	<i>G1 vs G2:0.645</i> <i>G1 vs G3:0.040</i> <i>G1 vs G4: 0.001</i>		<i>G2 vs G3: 0.054</i> <i>G2 vs G4: 0.001</i> <i>G3 vs G4:0.017</i>	
<i>P</i>Kornea Sertliği*	<i>G1 vs G2:0.645</i> <i>G1 vs G3:0.040</i> <i>G1 vs G4: 0.001</i>		<i>G2 vs G3: 0.054</i> <i>G2 vs G4: 0.001</i> <i>G3 vs G4: 0.017</i>	

*: Mann Whitney U testi

Çalışmamızda rose bengal ve 532 nm yeşil ışık uygulaması sırasında endoteli aşan, daha derin dokulara ulaşan ışın miktarının tespiti amacıyla lazer güç ölçer yardımıyla iridasyon ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüm sonuçları hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu, sadece 10 dakika damla uygulanarak boyanan ve 10 dakika boyunca iyontoforez uygulanarak boyanan kornealar arasında karşılaştırılmıştır (Tablo 2). İyontofarez uygulaması ile boyanan kornealarda işlem boyunca korneayı aşan ve lazer güç ölçere ulaşan ortalama iridasyon miktarı 5.74 ± 0.17 miliwatt olarak bulunmuştur. Bu değer kontrol grubu ve damla ile boyanan korneaların ortalamaları ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur. (P_1 : 0.008, P_2 : 0.008) Yine damla aracılığıyla boyanan kornealarda da ortalama iridasyon değeri (13.16 ± 2.17 miliwatt) kontrol grubuna göre (184.78 ± 1.45 miliwatt) anlamlı düşük bulunmuştur. (P : 0.008)

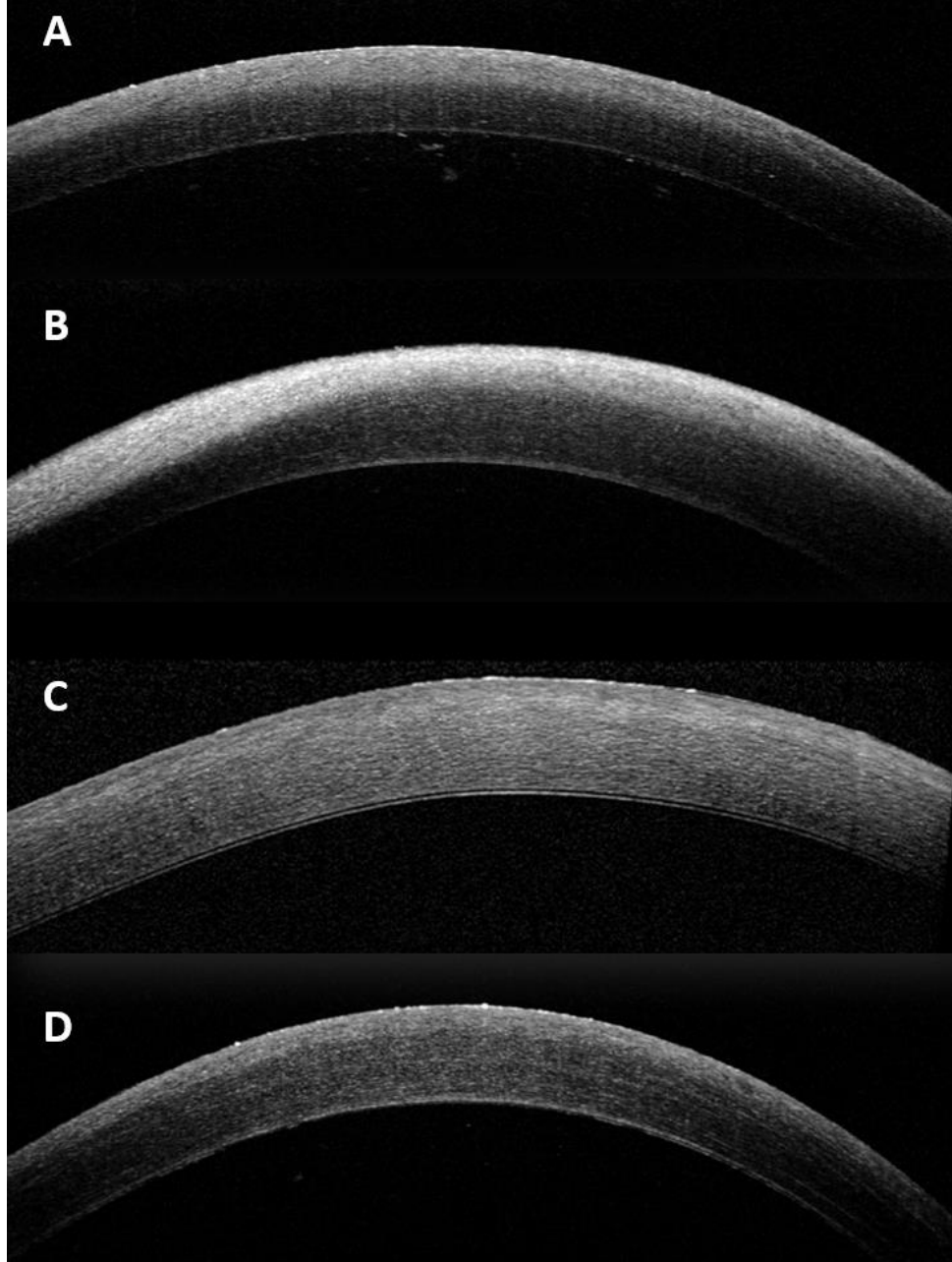
Tablo 2. Korneal 532nm Yeşil Işık Lazer Geçirgenliğinin Lazer Güç Ölçer Aracılığıyla Ölçümü

	1. dakika (miliwatt)	3.dakika (miliwatt)	7.dakika (miliwatt)	Ortalama (miliwatt)
Kontrol (n:5)				
Ortalama ±ss	187.4±3.04	183.74±1.13	182.66±1.21	184.78±1.45
Damla ile boyanma (n:5)				
Ortalama ±ss	3.42±1.09	14.91±3.1	21.16±4.02	13.16±2.17
İyontoforez yardımı ile boyanma (n:5)				
Ortalama ±ss	0.81±0.19	6.38±0.73	10.01±0.8	5.74±0.17
P değeri*	Damla ile boyanma vs Kontrol: 0.008** İyontofarez yardımı ile boyanma vs Kontrol: 0.008** İyontofarez yardımı ile boyanma vs Damla ile boyanma: 0.008** 3'lü:0,002***			
*: Ortalama değerlerin karşılaştırılması için **: Mann-Whitney U Testi ***: Kruskall-Wallis Testi				

Ön segment OCT aracılığıyla korneal boya diffüzyon derinliğini değerlendirildiğinde iyontoforez destekli rose bengal uygulaması sonrası çapraz bağlama yapılan gözlerde korneanın boyanma derinliği $\%42.22 \pm 4.77$ bulunurken, 10 dakika rose bengal damla uygulaması sonrası çapraz bağlama yapılan gözlerde ise bu oran $\%26.63 \pm 3.84$ bulunmuştur (Tablo 3). Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.001$). Ayrıca ön segment OCT aracılığıyla boya diffüzyonları değerlendirilirken gözlemsel olarak dikkat çeken bir bulgu da iyontoforez uygulanan gözlerde çok daha diffüz ve parlak bir boyanma hattı görülmesidir (Şekil 8.)

Tablo 3. Ön Segment OCT’de Rose Bengal Boya Diffüzyon Değerleri

	Rose Bengal Çapraz Bağlama n:7	İyontofarez + Rose Bengal Çapraz Bağlama n:7	<i>P Değeri</i>
Kornea Rose Bengal Diffüzyon Derinliği (Boyanmış KK/ Santral KK)			
Ortalama $\pm$ ss	$\%26.63 \pm 3.84$	$\%42.22 \pm 4.77$	$<0.001^*$
*: Mann Whitney U testi KK: Kornea Kalınlığı			



Şekil 8. Uygulamalar sonrası ön segment OCT ile korneal boya derinlikleri

A. İyontoforez sonrası kornea kesiti (ışınlama yapılmamış) B. İyontofarez aracılı rose bengal çapraz bağlama yapılan kornea kesiti(ışınlanmış), C. Rose bengal damla sonrası kornea kesiti (ışınlama yapılmamış), D. Rose bengal damla sonrası çapraz bağlama yapılmış kornea kesiti (ışınlanmış)

5. TARTIŞMA

Kimya mühendisliğinde polimer yapıların çapraz bağlamasının tetiklenmesi ve bu sayede materyalin elastik modülünün artırılabilmesi kavramı 1980'lerden itibaren bilinen ve üzerinde çalışılan bir kavramdır. [90] Biyolojik sürecin işlemesi sırasında da metabolizmada birçok alanda çapraz bağlama faaliyetleri devam etmektedir. Yaşlanma esnasında bağ dokusunda görülen [91] ve diabet hastalarında kardiyovasküler dokuda gerçekleşen non-enzimatik glikolizasyon sırasında gelişen çapraz bağlanma bunun en güzel örneklerindendir.[92] Medikal alanda çapraz bağlama tedavisi, biyomekanik mühendislerince kollajen stabilitesinin artırılması ve biyoyıkımının azaltılması ile daha dayanıklı biyoprotezler elde edilmesi ve bunların erken kalsifikasyonunun önlenmesi gibi amaçlarla üzerinde oldukça çalışılan bir yöntemdir.[93-95] Yöntemin korneal kollajen üzerine adapte edilmesinin temelleri ise ilk olarak, Prof. Theo Seiler'in, kendi diş tedavisinde kullanılan dolgu materyalinin, mavi ışıkla aktive edilmesi prosedüründen ilham almasıyla ortaya çıkmıştır. İlk olarak Seiler ve ekibi, 1998 yılında riboflavin/UVA kullanarak korneal çapraz bağlama tedavisi ile korneal direncin artırılabilceğini hayvan modelinde göstermişlerdir.[78] Günümüzde keratokonus yönetiminde hastalığın patofizyolojisine yönelik bir tedavi yaklaşımı olan ve özellikle genç hasta grubunda hastalığın progresyonunu önlemede etkin olan KKÇB oldukça önemli bir yer tutmaktadır.[8] Bu tedavi yöntemi keratokonus gibi primer ektatik hastalıkların tedavisinde önemli olduğu gibi PRK ve LASIK sonrası ektaziler gibi sekonder ektatik hastalıkların önlenmesinde de önemli bir yöntem olarak görülmektedir, ki bu alanda aslında çapraz bağlama tedavisinin yapıştıracı etkisinin olduğunu da ileri sürmek mümkündür.[96, 97]

Çapraz bağlama tedavisi sadece korneal ektatik hastalıkların tedavisinde değil korneal enfeksiyöz keratitlerinin tedavisinde de oldukça öneme sahip bir yöntemdir. Enfeksiyöz keratitte ilk CXL kullanımı, 2008 yılında Iseli ve arkadaşları tarafından geleneksel tedaviye cevap vermeyen 5 mikobakteriyel ve fungal korneal erime vakasının standart Dresden protokolü ile tedavi edilmesinin yayınlanması ile gerçekleşmiştir.[98] PACK-CXL terimi ilk olarak Dublin’de yapılan 9. Çapraz Bağlama Kongresi’nde (9(th) CXL congress in Dublin) enfeksiyöz keratitlerin tedavisinde alternatif bir tedavi yöntemi olarak ortaya atılmıştır (2013).Yöntemin ilerleyen zamanlarda sadece bakteriyel keratitlerde değil dirençli fungal keratitlerde bile iyi bir tedavi seçeneği olabildiği gösterilmiştir. [4, 26] Korneal çapraz bağlamanın alternatif bir kullanım alanı da psödotakik büllöz keratopati hastalarında korneal ödem tedavisidir.[99] Bu amaçla kullanımdaki temel mantık çapraz bağlama ile kollajen lifler arası bağlantıların artırılması sonucu stromal sıvı akümüülasyonunun önüne geçilerek ödemin artışının önlenmesidir.[100] Bu hasta grubunda çapraz bağlama tedavisi ile oküler konfor problemlerinin azaltılması, görme keskinliğinin artırılması ve keratoplastiye gidişin geciktirilmesinin sağlanabileceği öne sürülmektedir. Böylesine önemli bir tedavi protokolü olması nedeniyle de sürekli geliştirilmeye çalışılması kaçınılmaz hale gelmiştir.

Korneanın biyomekanik davranışı kornea şekline, kalınlığına, mikroyapıların durumuna ve doku mekaniğine bağlı olarak değişmektedir. Bu biyomekanik davranışı anlayabilmek için birçok teknik tasarlanmıştır. *In vivo* değişiklikleri tespit amacıyla ‘ORA(Ocular Response Analyzer), yırtılma dalga kuvveti (shear wave) görüntüleme, Corvis tonometre gibi yeni yöntemler tanımlanmıştır. [101-103] Ex vivo biyomekanik değişikliklerin tespiti amacıyla ise

tek eksenli ekstansiyometri, bulge/inflation, indentasyon testleri, atomik force mikroskopisi tanımlanmıştır. [104] Corvis tonometre, günlük pratikte sıklıkla kullandığımız *in vivo* bir ölçüm aracı olmasına rağmen, korneal biyomekanik hakkındaki temel bilgilerimiz *ex vivo* insan ve tavşan gözü çalışmalarına dayanmaktadır. [103, 105] Tavşan korneaları, insanlarınkine nazaran daha düşük rijiditeye sahip olmasına rağmen insan kornealarının [102] skarlaşmaya daha meyilli olması, temininin zorluğu gibi sebeplerle birçok çalışmada korneal biyomekanik değerlendirmeler tavşan kornealarında uygulanmaktadır. [106] Daha düşük rijiditelerine rağmen tavşan korneası genel yapı olarak insan korneasına oldukça benzemektedir. Birçok modalite ile ölçülebilen ve korneal biyomekaniği göstermede iyi bir parametre olan Young's modülü değeri literatürde oldukça geniş bir aralıkta sonuç bulmuştur (0.57–41 MPa).[29, 78, 104, 107-109] Yapılan bir çalışmada kornea elastik modülünün korneal hidrasyon durumu ve kornea kalınlığı arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir. [110] Korneanın dehidratasyonu ve incelendiği durumlarda Young's modülünün arttığı yine aynı çalışmada gösterilmiştir.[110] Ancak literatürdeki başka çalışmalarda %20 dextran ile kornea kalınlığı azalan korneaların dirençlerinin de azaldığını göstermiştir yani korneal kalınlık ve direnç parametreleri arasında pozitif bir ilişki tanımlamışlardır. [104, 108] Çalışmamızda da literatürde birçok *ex vivo* korneal çalışmada olduğu gibi iyi bir model olan tavşan gözleri kullanılmıştır. Buna göre taze donmuş gözlerdeki kornea kalınlığı uygulama gününde %15 dextran-PBS çözeltisi ile $\leq 450 \mu\text{m}$ seviyesine düşürülüp, tek eksenli tansiyometre ile yapılacak ölçümler öncesi de yine %15 dextran-PBS yardımıyla korneal kalınlık $\leq 550 \mu\text{m}$ 'e düşürülmüştür. Böylelikle kornealar arası, kornea kalınlığına bağlı ışınlama ve çekme testi

sırasında gelişebilecek farklılıkların önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Ancak bu gözler taze enükle edilmeleri sonrası -80 °C’de bekletilip tekrar %15 dekstran çözeltisinde tutulmuş, yani taze dokudan bir miktar da olsa farklılık gösterebilecek özelliktedir. Bu koşulların deneyde kullanılan tüm gözler açısından eşit olmasıyla gruplar arası farklılıkların önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlamanın korneal sertliği arttırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir.[20, 23, 29] Zhu ve arkadaşları tarafından tavşan gözlerinde yapılan bir çalışmada rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisi ile 150 j/cm² uygulama sonrası, kontrol grupları ile karşılaştırılan gözlerde 1.günde korneal sertlikte, 28. günde ise Young’s modülü değerlerinde istatistiksel anlamlı fark izlenmiştir.[23] Yine aynı çalışmada rose bengal ve 150 j/cm² yeşil ışık tedavisi uygulanan grupta 1.günde korneal sertlik kontrol grubuna göre 1.9 kat, 29. günde ise 2.8 kat artmıştır. Benzer şekilde Cherfan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da rose bengal ve 100 j/cm² yeşil ışık çapraz bağlama yapılmış grupta Young’s modülünde kontrole göre 2.7 kat ve 150 j/cm² enerji uygulanan grupta ise 4.4 kat bir artış izlenmiştir.[29] Bizim çalışmamızda da benzer şekilde rose bengal ve 100 j/cm² yeşil ışık çapraz bağlama tedavisi uygulanmış olan gruplarda elastik modülü değerinde diğer gruplarla kıyaslandığında iyi biyomekanik sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle iyontoforez destekli rose bengal ve 100 j/cm² yeşil ışık uygulanan grupta (grup 4) elastik modülü değerinde (4.38 MPa) kontrol grubu (grup 1) (1.29 MPa) ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir artış elde edilmiştir. (*P*:0.001). Grup 4’teki ortalama elastik modül değeri (6,34±3,47 MPa) grup 1’dekinin (1.32±0.84) yaklaşık 4.8 katıdır. Yine rose bengal ve 100 j/cm² yeşil ışık çapraz bağlama

yapılan grupta (grup 3) da elastik modülü (3.11 MPa) kontrol grubuna (grup 1) (1.29 MPa) göre istatistiksel anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur ($P:0.040$). Grup 3'teki ortalama elastik modül değeri (3.07 ± 1.79) grup 1'dekinin (1.32 ± 0.84) ise yaklaşık 2.3 katıdır. İyontoforez ile rose bengal ve 100 j/cm^2 yeşil ışık uygulanan grup (grup 4) ile damla yoluyla rose bengal ve 100 j/cm^2 yeşil ışık uygulanan grup (grup 3) elastik modülü değerleri karşılaştırıldığında ise iyontoforez sonrası istatistiksel anlamlı bir artış gözden kaçmamaktadır ($P:0.017$). Grup 4 ve grup 3 korneaların ortalama elastik modül değerleri kıyaslandığında ise yaklaşık 2 kat bir artış elde edilmektedir. Yine aynı gruptaki korneal sertlik artışına bakıldığında ise iyontoforez destekli rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisi uygulanan grupta oldukça iyi sonuçlar göze çarpmaktadır. Özellikle iyontoforez destekli rose bengal ve 100 j/cm^2 yeşil ışık uygulanan grupta (grup 4) kornea sertliği değerinde (1.16 N/mm) kontrol grubu (grup 1) (0.32 N/mm) ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir artış elde edilmiştir. ($P:0.001$). Grup 4'teki ortalama kornea sertlik artış değeri ($1.59 \pm 0.84 \text{ N/mm}$) grup 1'dekinin ($0.34 \pm 0.22 \text{ N/mm}$) yaklaşık 4.7 katıdır. Yine rose bengal ve 100 j/cm^2 yeşil ışık çapraz bağlama yapılan grupta (grup 3) da kornea sertlik artış değeri (0.77 N/mm) kontrol grubuna (grup 1) (0.32 N/mm) göre istatistiksel anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur ($P:0.040$). Grup 3'teki ortalama kornea sertlik değeri ($0.76 \pm 0.44 \text{ N/mm}$) grup 1'dekinin ($0.34 \pm 0.22 \text{ N/mm}$) ise yaklaşık 2.2 katıdır. İyontoforez destekli rose bengal ve 100 j/cm^2 yeşil ışık uygulanan grup (grup 4) ile damla yoluyla rose bengal ve 100 j/cm^2 yeşil ışık uygulanan grup (grup 3) elastik modülü değerleri karşılaştırıldığında ise iyontoforez sonrası istatistiksel anlamlı bir artış gözden kaçmamaktadır ($P:0.017$). Grup 4 ve grup 3 korneaların

ortalama elastik modül değerleri kıyaslandığında ise yaklaşık 2 kat bir artış elde edilmektedir. Yani iyontoforez destekli rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama grubu sadece kontrol grubuna göre üstün olmakla kalmayıp literatürde uygulanan standart tedavi olan damla yoluyla rose bengal uygulaması sonrası yeşil ışıkla yapılan çapraz bağlama tedavisine göre de istatistiksel anlamlı korneal direnç artışı sağlamıştır ($P:0.017$). Bu durum oldukça önemlidir, çünkü yıllardır çapraz bağlama tedavisi ve ilaç uygulama amacıyla güvenle uygulanan ‘iyontoforez yöntemi’ ile yeni ama umut vaadeden ‘rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama’ tedavisinin uygulanabilirliğini ilk defa gösterilmiş olmakla kalmayıp, bu uygulamanın çapraz bağlama yönteminin etkinliğini artırmada oldukça önemli bir yol olduğu da bu sayede gösterilmiştir.

Riboflavin UVA çapraz bağlama tedavisinde en önemli sorunlardan biri ‘keratosit apoptozisi’ sorunudur. Sadece riboflavinin hücreler üzerine toksik etkisi olmamakla birlikte riboflavin ile UVA kombinasyonu keratosit apoptozisi tetiklenmektedir.[15] Bilindiği gibi riboflavin UVA kombinasyonu ile sadece UVA uygulamasına göre 10 kata kadar daha düşük dozlarda toksik etki in vitro olarak gösterilmiştir.[15] Keratosit apoptozisi aslında kabul edilebilir bir bulgudur ve çoğunlukla 6-12 aylık süreçte keratosit repopülasyonu olmaktadır.[16, 80] Ancak endotel, iris, lens ve retina üzerine olan toksik etkiler çoğunlukla geri dönüşsüzdür ve oldukça sıkıntılı durumlara yol açabilir.[80] Wollensak ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada özellikle güvenli yüzey irradyasyon sınırı UVA için 3.0 mW/cm^2 olarak belirtilmektedir.[17] En önemlisi $400 \mu\text{m}$ ’den düşük kornea kalınlıklarında, korneal endotelyal hasar gelişme ihtimali oldukça yüksektir ve bu sebeple ince kornealarda standart çapraz bağlama yöntemleri önerilmemektedir. [15, 18, 80,

111] İnce kornealarda çapraz bağlama tedavisi için hipoozmolar solüsyonlar ile kornea kalınlığının artırılmasına yönelik yayınlar olmakla birlikte, bu yaklaşımların klinik yansımaları yeterince etkili olmadığı için rutin uygulamada bir standart haline gelememiştir.[112] Hafezi tarafından yapılan bir vaka değerlendirmesinde çapraz bağlamanın uygulanabileceği preoperatif minimum korneal kalınlığı 323 µm olarak önerilmiştir. [112] Aslında rose bengal çapraz bağlama tedavisinin iyi bir alternatif olarak ortaya çıkışındaki temel dayanaklarından biri rose bengalin anterior stromada riboflavine oranla çok daha yüzeyel bir tutulum yapmasıdır.[29] Cherfan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise korneanın rose bengal ile boyanması değerlendirilmiş ve rose bengalin anterior stromada sadece 100 µm kadar yüzeyel bir alanı boyadığı göstermiştir.[29] Bu çalışmada boyama sonrası 4. saatte bile konfokal mikroskopi ile bakıldığında boyada çok az miktarda silinme olduğu, büyük bir yoğunlukta boyanmanın devam ettiği görülmüştür. Aynı çalışmada boyanın korneaya ne güçte bağlandığının tespiti amacıyla kornea PBS solüsyonu içinde tutulmuş ve 40. dakika sonunda boya yoğunluğunda sadece %20’lik bir azalma olup bu oran 160. dakikanın sonuna kadar değişmemiştir. Yani bu boyanmanın oldukça kalıcı olduğu da yine aynı çalışmacı tarafından özellikle belirtilmiştir.[29] Literatürde bu gibi rose bengalin korneaya ne oranda ulaştığı bu şekilde birçok yolla gösterilmiş olmasına rağmen oldukça kolay ve non-kontakt bir yöntem olan ön segment OCT ile rose bengal diffüzyonunu değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda ön segment OCT ile teyit edilen rose bengal boya derinliği, sadece damla yoluyla rose bengal uygulanan grupta kornea kalınlığının 26.63 ± 3.84 iken, iyontoforez destekli rose bengal uygulanan grupta 42.22 ± 4.77 olarak bulunmuştur ($p: <0.001$). Rose bengalden oldukça farklı

olarak, literatürde de yerini almış olduğu gibi, riboflavin anterior stromada yaklaşık 300 μm 'lik bir alana ulaşır ki bu da total stromal kalınlığın %75'ine denk gelmektedir.[112] Görülmektedir ki; rose bengalin hem iyontoforez hem de damla yoluyla uygulanması durumunda çapraz bağlama reaksiyonları riboflavine oranla çok daha anterior stromada gerçekleşmektedir. Bu durumun ince kornealarda bile endotelial harabiyetten koruyucu rol oynayabileceği düşünülmektedir.[29] Fakat çapraz bağlama sürecini daha anteriora sınırlandırırken gözden kaçırılmaması gereken önemli bir nokta da çapraz bağlamanın gerçekleştiği alanın ancak belirli bir limitin üzerinde olması halinde ektatik sürecin önüne geçmenin mümkün olabilmesidir.[112] Hafezi'nin bir vaka sunumunda belirttiği ve iyatrojenik keratektazi ilkelerinde de gösterilmiş olduğu gibi ektaziyi önleyebilmek adına en az 250 μm 'lik bir alanda çapraz bağlama olması gerekmektedir.[112] Ancak rose bengal çapraz bağlama üzerine yapılan birçok çalışmada ve bizim çalışmamızda olduğu gibi standart olarak rose bengalle doyurulan kornealarda boyanın yaklaşık 100 μm 'lik bir alana ulaştığı bulunmuştur.[29] Literatürde de gösterildiği üzere bu yüzeysel boyanma bile korneal dirençte iyi bir artış yaratmaktadır.[20, 23] Ancak çalışmamızda gördüğümüz gibi iyontoforez sayesinde rose bengal, standart yöntemle göre daha diffüz olarak ve daha derin bir şekilde, dolayısıyla da geniş bir alanı boyamaktadır ki bu da daha çok kollajene etki etmek ve daha fazla çapraz bağlanma kapasitesine ulaşmak demektir. Yani riboflavin UVA çapraz bağlama tedavisinin en önemli uygulama kısıtlaması da olan 'ince ya da pediatrik kornealarda (<400 μm) çapraz bağlama' açısından rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama umut vadetmektedir. Ayrıca iyontoforez aracılı rose bengal uygulaması ile

de boya diffüzyon ve konsantrasyonu artırılarak daha fazla çapraz bağlama ve dolayısıyla da daha sert bir kornea elde etmek mümkün olacaktır.

Rose bengalin kültür hücreleri üzerine sitotoksik özellikte olduğunu belirten çalışmalar olmakla birlikte, Cherfan ve arkadaşlarının çalışmasına bakıldığında sadece rose bengal uygulanan, rose bengal uygulanıp 100 j/cm^2 ve 200 j/cm^2 yeşil ışık ile ışınlanan kornealarda 24. saat sonunda keratosit sayıları benzer bulunmuştur.[29] Yine aynı çalışmada riboflavin UV-A uygulanan kornea gruplarında ise ışınlanan grupta, ışınlanmayana oranla keratositlerde belirgin kayıp gözlenmiştir.[29] Zhu ve arkadaşlarının *in vivo* tavşan gözlerinde yaptığı çalışmalarında ise rose bengal çapraz bağlama tedavisi sonrası 1.gün kontrole göre anlamlı bir keratosit kaybı gözlenmekle birlikte 28.gün sonunda kontrol ve tedavi grupları arasında keratosit dansiteleri benzer bulunmuştur.[23] Çalışmada izlenen keratosit kaybı anterior stromada $125\mu\text{m}$ 'lik bölgede yani rose bengal çapraz bağlamanın asıl etki gösterdiği alandadır. Riboflavin UVA çapraz bağlamaya göre oldukça sınırlı izlenen ve yine riboflavine göre çok daha erken dönemde repopülasyonla düzelen bu geçici apoptozis rose bengal açısından oldukça önemli bir avantaj olarak düşünülmektedir. Bu durum rose bengalin kollajene olan bağlanmasının, riboflavine oranla çok daha fazla ve güçlü olması ile açıklanmaktadır. Böylelikle hücreler arası dokuda rose bengal kollajene bağlı olarak kalır ve keratositler içine geçemeyip, apoptozisi indükleyemez. [23] Çalışmamızda keratosit apoptozisinin değerlendirilmesini sağlayan histokimyasal bir değerlendirme yapılmamakla birlikte rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlamanın keratositler üzerine olan geri döndürülebilir etkiler sergilemesinin yöntemin oldukça önemli avantajlarından birisi olduğunu düşünmekteyiz.

İris yüksek oranda melanosom içeren bir oküler dokudur ve bu nedenle yeşil ışık absorpsiyon oranı da oldukça yüksek beklenmektedir. Bu durum termal hasarla sonuçlanabileceğinden bunun değerlendirilmesi önemlidir. Enükleer tavşan gözlerinde yapılan bir çalışmada rose bengal yeşil ışık uygulamalarında, 100 j/cm^2 enerji ile ışınlama sonrası iris posterior yüzeyinde 5°C 'den daha az bir ısı artışı elde edilmiştir.[23] Bu ısı artışı *in vivo* modellerde o bölgedeki kan akışı tarafından daha da düşürüleceği için oldukça ihmal edilebilir düzeylere ineceği düşünülebilir.[23] Termal hasar tespiti için iyi bir marker olan formazan ürünleri, iriste termal hasar varlığını göstermek amacıyla oküler çalışmalarda da kullanılmıştır.[113] Negatif ısı kontrol molekülü olan bu formazan moleküllerinin sitoplazmada tespiti hücrede ısı hasarı olmadığını göstermektedir. Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da *ex vivo* tavşan gözlerinde iris hücre sitoplazmasında normal kontrollerdekine benzer olarak koyu mavi renkte formazan ürünler görülmüştür.[23]

Rose bengal ile boyanmış kornea %70-90 oranında yeşil ışık absorpsiyonu sağlamasına ve pupiller aralığının da ışığa karşı önemli bir bariyer olmasına rağmen bir miktar yeşil ışık retinaya ulaşabilmektedir.[23] Bu ışınlara özellikle RPE hücrelerindeki melanosomlar ve vasküler yapıdaki hemoglobinin hassastır. Bu retinal termal hasar, kan retina bariyerinde bozukluk ve sonucunda optik disk ve vasküler yapılarda sızıntı ile sonuçlanır. Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan aynı çalışmada tavşan gözlerindeki kan retina bariyeri ve vasküler yapılardaki bozulma fundus anjiyografi ile değerlendirilmiştir.[23] Buna göre rose bengal ile boyanan kornealar 100 j/cm^2 yeşil ışık ile ışınlığında herhangi bir sızıntı dolayısıyla da retinal hasar izlenmemiştir. Ayrıca bu çalışmada ışın mikroskop ile yapılan değerlendirmede de ışınlanmış gözlere ait retina ve ışınlanmamış olanlarda

herhangi bir farklılık ya da dış nükleer tabaka kalınlığında bir değişiklik izlenmemiştir.

Çalışmamızda da 7 dakika boyunca 250 miliwatt irridasyon uygulaması süresince korneayı geçip derin dokulara ulaşabilen ortalama irridasyon düzeyi, rose bengal ile boyanan kornealarda ortalama 13.16 ± 2.17 miliwatt ölçülürken; işlem uygulanmamış kornealarda bu ortalama 184.78 ± 1.45 miliwatt bulunmuştur ($p < 0,008$). Asıl dikkat çekici durum ise iyontoforez uygulanan globlarda, korneayı geçebilen ortalama irridasyon miktarı dikkat çekici düzeyde azalmaktadır (5.74 ± 0.17). Bu değerler daha önce rose bengal ve yeşil ışık uygulamalarında, Zhu ve arkadaşlarının tanımladığı değerlere benzer düzeydedir ve retinaya toksik değerler oldukça altında yer almaktadır.[23] Bu durum rose bengalin yeşil ışığı yüksek düzeyde absorbe edebilme yeteneği ve özellikle tüm boyanın anterior stromada tutulmuş olması ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle iyontoforez grubunda bu değerlerin oldukça düşük izlenmesi bize göre 2 nedenle açıklanabilir: Birincisi, iyontoforez işlemi sayesinde gözle görülür düzeyde eşit, diffüz ve yoğun bir korneal boyanma elde edilmiştir; ikincisi, rose bengalin korneal derinliği arttırılmıştır ki bu da daha fazla miktarda boya geçişini temsil etmektedir. Ön segment OCT ile de takip edebildiğimiz gibi boyanın kornea içine diffüzyon yoğunluğu ve derinliği iyontoforez yöntemi ile belirgin olarak artmakta yani korneaya ulaşan rose bengal miktarı da dolayısıyla arttırılmaktadır. Bu durumun özellikle *in vivo* uygulamalarda iris, lens ve retina toksisitesini önleyebilmek için koruyucu olabilecek bir özellik olacağını umut etmekteyiz. Korneada sağlanan yoğun rose bengal bariyeri sayesinde uygulanan ışınların büyük kısmı korneada tutulacak, derin oküler dokulara yansıyan enerji miktarı ise daha sınırlı olabilecektir.

Çapraz bağlama tedavisi sonrası ön segment OCT ile kornea kesitlerindeki boya yoğunluğundaki farklılık ayrıca işlem sırasındaki bir gözlemimizle de örtüşebilir; ‘ışınlama sırasında boya solması (photobleaching) değerlerindeki farklılık’. Işınlama sırasında ve hemen işlem bitişinde gözlemsel olarak dikkatimizi çeken bir nokta iyontoforez destekli rose bengal uygulanmış kornealarda ışınlama sırasında neredeyse hiç renk değişikliği ya da solma gözülmezken, damla ile doyurulan kornealarda uygulama sırasında farklı oranlarda solma olmasıdır. Bu durum iyontoforez ile daha yüksek konsantrasyonlarda rose bengal boyasının korneaya geçmesi ile açıklanabilir.

6.SONUÇ

Literatürde iyontoforez aracılığı rose bengal çapraz bağlama tedavisinin etkinliği ve güvenliğini değerlendiren araştırma henüz yoktur. Çalışmamızda iyontoforez destekli rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlamanın, literatürde tanımlanmış olan damla aracılı rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlamaya göre korneal biyomekanik parametrelerde yaklaşık 2 kat artış sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte iyontoforez yardımcı tedavide korneayı aşan yeşil ışık miktarının önemli oranda azaldığı (% 40 dan fazla) gösterilmiştir ki bu durumun iris, lens, retina gibi derin dokularda oluşabilecek toksisite probleminin önlenmesinde önemi büyüktür. İyontoforez sonrası ön segment OCT ile de teyit edilen anterior stromal boya derinliği ve yoğunluğu artırılmıştır. Bu durumun hem biyomekanik hem de güvenilirlik parametrelerini etkileyen temel etkenlerden biri olduğunu düşünülmüştür.

Sonuç olarak rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisinin daha sınırlı toksisite gibi avantajlarının yanısıra korneal direnci artırarak korneal ektatik hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek güvenli bir tedavi seçeneği olabileceğini ve iyontoforez ile bu yöntemin etkinliğinin artırılıp, toksik etkilerinin önemli oranda azaltılabileceği gözlemlenmiştir.

Yapılacak olan canlı hayvan ve insan çalışmaları sonrasında bu tedavi yönteminin klinik uygulamaya gireceğini umut etmekteyiz.

7. REFERANSLAR

1. Spoerl, E., et al., *Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea*. Ophthalmologica, 2004. **218**(2): p. 136-40.
2. Wollensak, G., E. Spoerl, and T. Seiler, *Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking*. J Cataract Refract Surg, 2003. **29**(9): p. 1780-5.
3. Hafezi, F. and J.B. Randleman, *PACK-CXL: defining CXL for infectious keratitis*. J Refract Surg, 2014. **30**(7): p. 438-9.
4. Ozdemir, H.B., et al., *Comparison of corneal collagen cross-linking (PACK-CXL) and voriconazole treatments in experimental fungal keratitis*. Acta Ophthalmol, 2019. **97**(1): p. e91-e96.
5. Seiler, T.G., et al., *Interface Bonding With Corneal Crosslinking (CXL) After LASIK Ex Vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017. **58**(14): p. 6292-6298.
6. Wollensak, G., E. Spoerl, and T. Seiler, *Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus*. Am J Ophthalmol, 2003. **135**(5): p. 620-7.
7. Wollensak, G. and E. Iomdina, *Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking*. Acta Ophthalmol, 2009. **87**(1): p. 48-51.
8. Samaras, K.E. and D.B. Lake, *Corneal collagen cross linking (CXL): a review*. Int Ophthalmol Clin, 2010. **50**(3): p. 89-100.
9. Bikbova, G. and M. Bikbov, *Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin*. Acta Ophthalmol, 2014. **92**(1): p. e30-4.
10. Cassagne, M., et al., *Iontophoresis Transcorneal Delivery Technique for Transepithelial Corneal Collagen Crosslinking With Riboflavin in a Rabbit Model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(2): p. 594-603.
11. Novruzlu, S., et al., *Can Riboflavin Penetrate Stroma Without Disrupting Integrity of Corneal Epithelium in Rabbits? Iontophoresis and Ultra-performance Liquid Chromatography With Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Cornea, 2015. **34**(8): p. 932-6.
12. Lombardo, M., et al., *Novel Technique of Transepithelial Corneal Cross-Linking Using Iontophoresis in Progressive Keratoconus*. J Ophthalmol, 2016. **2016**: p. 7472542.
13. Vinciguerra, P., et al., *Transepithelial iontophoresis corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus: initial clinical outcomes*. J Refract Surg, 2014. **30**(11): p. 746-53.
14. Wollensak, G., et al., *Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment*. Cornea, 2004. **23**(1): p. 43-9.
15. Wollensak, G., et al., *Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro*. Eye (Lond), 2004. **18**(7): p. 718-22.
16. Kruger, A., et al., *Combined nonlinear and femtosecond confocal laser-scanning microscopy of rabbit corneas after photochemical cross-linking*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(7): p. 4247-55.
17. Wollensak, G., et al., *Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit*. J Cataract Refract Surg, 2003. **29**(9): p. 1786-90.
18. Wollensak, G., et al., *Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro*. Ophthalmic Res, 2003. **35**(6): p. 324-8.

19. Mulroy, L., et al., *Photochemical keratodesmos for repair of lamellar corneal incisions*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3335-40.
20. Fadlallah, A., et al., *Corneal Resistance to Keratolysis After Collagen Crosslinking With Rose Bengal and Green Light*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(15): p. 6610-6614.
21. Gallego-Munoz, P., et al., *Corneal Wound Repair After Rose Bengal and Green Light Crosslinking: Clinical and Histologic Study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017. **58**(9): p. 3471-3480.
22. Atalay, H.T., et al., *Effect of Riboflavin/Rose Bengal-Mediated PACK-CXL on Acanthamoeba Trophozoites and Cysts in Vitro*. Curr Eye Res, 2018. **43**(11): p. 1322-1325.
23. Zhu, H., et al., *Corneal Crosslinking With Rose Bengal and Green Light: Efficacy and Safety Evaluation*. Cornea, 2016. **35**(9): p. 1234-41.
24. Gu, C., et al., *Photochemical tissue bonding: a potential strategy for treating limbal stem cell deficiency*. Lasers Surg Med, 2011. **43**(5): p. 433-42.
25. Tsao, S., et al., *Light-activated tissue bonding for excisional wound closure: a split-lesion clinical trial*. Br J Dermatol, 2012. **166**(3): p. 555-63.
26. Tabibian, D., O. Richoz, and F. Hafezi, *PACK-CXL: Corneal Cross-linking for Treatment of Infectious Keratitis*. J Ophthalmic Vis Res, 2015. **10**(1): p. 77-80.
27. Arboleda, A., et al., *Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates*. Am J Ophthalmol, 2014. **158**(1): p. 64-70.e2.
28. Bekesi, N., I.E. Kochevar, and S. Marcos, *Corneal Biomechanical Response Following Collagen Cross-Linking With Rose Bengal-Green Light and Riboflavin-UVA*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(3): p. 992-1001.
29. Cherfan, D., et al., *Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(5): p. 3426-33.
30. Komai, Y. and T. Ushiki, *The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(8): p. 2244-58.
31. Abahussin, M., et al., *3D collagen orientation study of the human cornea using X-ray diffraction and femtosecond laser technology*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(11): p. 5159-64.
32. Dua, H.S., et al., *Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)*. Ophthalmology, 2013. **120**(9): p. 1778-85.
33. Yenziad, B., N. Alparslan, and K. Akarcay, *Eye rubbing as an apparent cause of recurrent keratoconus*. Cornea, 2009. **28**(4): p. 477-9.
34. Kaya, V., et al., *Evaluation of the corneal topographic characteristics of keratoconus with orbscan II in patients with and without atopy*. Cornea, 2007. **26**(8): p. 945-8.
35. Sharma, N., et al., *Ocular allergy and keratoconus*. Indian J Ophthalmol, 2013. **61**(8): p. 407-9.
36. McMonnies, C.W., *Inflammation and keratoconus*. Optom Vis Sci, 2015. **92**(2): p. e35-41.
37. Alio, J.L., et al., *One or 2 Intacs segments for the correction of keratoconus*. J Cataract Refract Surg, 2005. **31**(5): p. 943-53.
38. Galvis, V., et al., *Keratoconus: an inflammatory disorder?* Eye (Lond), 2015. **29**(7): p. 843-59.
39. Lema, I. and J.A. Duran, *Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus*. Ophthalmology, 2005. **112**(4): p. 654-9.

40. Fukuchi, T., et al., *Lysosomal enzyme activities in conjunctival tissues of patients with keratoconus*. Arch Ophthalmol, 1994. **112**(10): p. 1368-74.
41. Meek, K.M., et al., *Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(6): p. 1948-56.
42. Weed, K.H., et al., *Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising in vivo confocal microscopy*. Eye (Lond), 2007. **21**(5): p. 614-23.
43. Ramirez Fernandez, M., E. Hernandez Quintela, and R. Naranjo Tackman, *Comparison of stromal corneal nerves between normal and keratoconus patients using confocal microscopy*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2014. **89**(8): p. 308-12.
44. Rabinowitz, Y.S., et al., *Videokeratography database of normal human corneas*. Br J Ophthalmol, 1996. **80**(7): p. 610-6.
45. Matalia, H. and R. Swarup, *Imaging modalities in keratoconus*. Indian J Ophthalmol, 2013. **61**(8): p. 394-400.
46. Rabinowitz, Y.S., J. Garbus, and P.J. McDonnell, *Computer-assisted corneal topography in family members of patients with keratoconus*. Arch Ophthalmol, 1990. **108**(3): p. 365-71.
47. Li, X., H. Yang, and Y.S. Rabinowitz, *Keratoconus: classification scheme based on videokeratography and clinical signs*. J Cataract Refract Surg, 2009. **35**(9): p. 1597-603.
48. Hee, M.R., et al., *Optical coherence tomography of the human retina*. Arch Ophthalmol, 1995. **113**(3): p. 325-32.
49. Ang, M., et al., *Anterior segment optical coherence tomography*. Prog Retin Eye Res, 2018. **66**: p. 132-156.
50. Sandali, O., et al., *Fourier-domain optical coherence tomography imaging in keratoconus: a corneal structural classification*. Ophthalmology, 2013. **120**(12): p. 2403-2412.
51. Kymionis, G.D., et al., *Correlation of the corneal collagen cross-linking demarcation line using confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography in keratoconic patients*. Am J Ophthalmol, 2014. **157**(1): p. 110-115.e1.
52. Seiler, T. and F. Hafezi, *Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line*. Cornea, 2006. **25**(9): p. 1057-9.
53. Krumeich, J.H. and G.M. Kezirian, *Circular keratotomy to reduce astigmatism and improve vision in stage I and II keratoconus*. J Refract Surg, 2009. **25**(4): p. 357-65.
54. McMahon, T.T., et al., *A new method for grading the severity of keratoconus: the Keratoconus Severity Score (KSS)*. Cornea, 2006. **25**(7): p. 794-800.
55. Gore, D.M., A.J. Shortt, and B.D. Allan, *New clinical pathways for keratoconus*. Eye (Lond), 2013. **27**(3): p. 329-39.
56. McGhee, C.N., *2008 Sir Norman McAlister Gregg Lecture: 150 years of practical observations on the conical cornea--what have we learned?* Clin Exp Ophthalmol, 2009. **37**(2): p. 160-76.
57. Fick, A.E., *A contact-lens. 1888 (translation)*. Arch Ophthalmol, 1988. **106**(10): p. 1373-7.
58. Bilgin, L.K., et al., *30 years of contact lens prescribing for keratoconic patients in Turkey*. Cont Lens Anterior Eye, 2009. **32**(1): p. 16-21.
59. Jinabhai, A., et al., *Visual performance and optical quality with soft lenses in keratoconus patients*. Ophthalmic Physiol Opt, 2012. **32**(2): p. 100-16.
60. Koliopoulos, J. and M. Tragakis, *Visual correction of keratoconus with soft contact lenses*. Ann Ophthalmol, 1981. **13**(7): p. 835-7.

61. Pesudovs, K., E. Garamendi, and D.B. Elliott, *A quality of life comparison of people wearing spectacles or contact lenses or having undergone refractive surgery*. J Refract Surg, 2006. **22**(1): p. 19-27.
62. Kosaki, R., et al., *Magnitude and orientation of Zernike terms in patients with keratoconus*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(7): p. 3062-8.
63. Downie, L.E. and R.G. Lindsay, *Contact lens management of keratoconus*. Clin Exp Optom, 2015. **98**(4): p. 299-311.
64. Betts, A.M., G.L. Mitchell, and K. Zadnik, *Visual performance and comfort with the Rose K lens for keratoconus*. Optom Vis Sci, 2002. **79**(8): p. 493-501.
65. Rubinstein, M.P. and S. Sud, *The use of hybrid lenses in management of the irregular cornea*. Cont Lens Anterior Eye, 1999. **22**(3): p. 87-90.
66. Leal, F., et al., *[Hybrid material contact lens in keratoconus and myopic astigmatism patients]*. Arq Bras Oftalmol, 2007. **70**(2): p. 247-54.
67. Sherwin, T. and N.H. Brookes, *Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis*. Clin Exp Ophthalmol, 2004. **32**(2): p. 211-7.
68. Ertan, A. and J. Colin, *Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia*. J Cataract Refract Surg, 2007. **33**(7): p. 1303-14.
69. Colin, J., et al., *Correcting keratoconus with intracorneal rings*. J Cataract Refract Surg, 2000. **26**(8): p. 1117-22.
70. Castroviejo, R., *Keratoplasty in treatment of keratoconus*. Arch Ophthal, 1949. **42**(6): p. 776-800, illust.
71. Coster, D.J., et al., *A comparison of lamellar and penetrating keratoplasty outcomes: a registry study*. Ophthalmology, 2014. **121**(5): p. 979-87.
72. Jaycock, P.D., et al., *Outcomes of same-sizing versus oversizing donor trephines in keratoconic patients undergoing first penetrating keratoplasty*. Ophthalmology, 2008. **115**(2): p. 268-75.
73. Fogla, R. and P. Padmanabhan, *Results of deep lamellar keratoplasty using the big-bubble technique in patients with keratoconus*. Am J Ophthalmol, 2006. **141**(2): p. 254-259.
74. Feizi, S., et al., *Deep anterior lamellar keratoplasty in patients with keratoconus: big-bubble technique*. Cornea, 2010. **29**(2): p. 177-82.
75. Yuksel, B., et al., *Comparison of visual and topographic outcomes of deep-anterior lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in keratoconus*. Int J Ophthalmol, 2017. **10**(3): p. 385-390.
76. Bahar, I., S. Levinger, and I. Kremer, *Wavefront-supported photorefractive keratectomy with the Bausch & Lomb Zyoptix in patients with myopic astigmatism and suspected keratoconus*. J Refract Surg, 2006. **22**(6): p. 533-8.
77. Alpins, N. and G. Stamatelatos, *Customized photoastigmatic refractive keratectomy using combined topographic and refractive data for myopia and astigmatism in eyes with forme fruste and mild keratoconus*. J Cataract Refract Surg, 2007. **33**(4): p. 591-602.
78. Spoerl, E., M. Huhle, and T. Seiler, *Induction of cross-links in corneal tissue*. Exp Eye Res, 1998. **66**(1): p. 97-103.
79. Tabibian, D., C. Mazzotta, and F. Hafezi, *PACK-CXL: Corneal cross-linking in infectious keratitis*. Eye Vis (Lond), 2016. **3**: p. 11.
80. Spoerl, E., et al., *Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea*. Cornea, 2007. **26**(4): p. 385-9.
81. Hafezi, F., et al., *Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas*. J Cataract Refract Surg, 2009. **35**(4): p. 621-4.

82. Doughty, M.J., *Rose bengal staining as an assessment of ocular surface damage and recovery in dry eye disease-a review*. Cont Lens Anterior Eye, 2013. **36**(6): p. 272-80.
83. Murube, J., *Rose bengal: the second most commonly used surfocular vital stain*. Ocul Surf, 2014. **12**(1): p. 14-22.
84. Hull, D.S., S. Csukas, and K. Green, *Rose bengal induced corneal swelling: relation to inciting wavelength*. Curr Eye Res, 1981. **1**(8): p. 487-90.
85. Spikes, J.D., et al., *Photodynamic crosslinking of proteins. III. Kinetics of the FMN- and rose bengal-sensitized photooxidation and intermolecular crosslinking of model tyrosine-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers*. Photochem Photobiol, 1999. **70**(2): p. 130-7.
86. Yang, P., et al., *Light-activated sutureless closure of wounds in thin skin*. Lasers Surg Med, 2012. **44**(2): p. 163-7.
87. Verter, E.E., et al., *Light-initiated bonding of amniotic membrane to cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(13): p. 9470-7.
88. Marcos, S., et al., *Toward New Engagement Paradigms For Intraocular Lenses: Light-Initiated Bonding of Capsular Bag to Lens Materials*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(8): p. 4249-56.
89. Alarcon, E., et al., *Photophysics and photochemistry of dyes bound to human serum albumin are determined by the dye localization*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(1): p. 93-102.
90. Eyre, D.R., M.A. Paz, and P.M. Gallop, *Cross-linking in collagen and elastin*. Annu Rev Biochem, 1984. **53**: p. 717-48.
91. Sawaguchi, S., et al., *Age-related changes of sulfated proteoglycans in the human lamina cribrosa*. Curr Eye Res, 1993. **12**(8): p. 685-92.
92. Aronson, D., *Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes*. J Hypertens, 2003. **21**(1): p. 3-12.
93. Lim, H.G., et al., *Development of novel combined anticalcification protocols including immunologic modification for prolonged durability of cardiac xenograft: preclinical study using large-animal long-term circulatory models*. Asaio j, 2015. **61**(1): p. 87-95.
94. Neethling, W.M., A.J. Hodge, and R. Glancy, *Glutaraldehyde-fixed kangaroo aortic wall tissue: histology, crosslink stability and calcification potential*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2003. **66**(1): p. 356-63.
95. Ersek, R.A. and A.G. Delerm, *Processed irradiated bovine cartilage for nasal reconstruction*. Ann Plast Surg, 1988. **20**(6): p. 540-6.
96. Seiler, T.G., et al., *Superficial corneal crosslinking during laser in situ keratomileusis*. J Cataract Refract Surg, 2015. **41**(10): p. 2165-70.
97. Kanellopoulos, A.J. and G.J. Pamel, *Review of current indications for combined very high fluence collagen cross-linking and laser in situ keratomileusis surgery*. Indian J Ophthalmol, 2013. **61**(8): p. 430-2.
98. Iseli, H.P., et al., *Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts*. Cornea, 2008. **27**(5): p. 590-4.
99. Sharma, N., et al., *Outcomes of corneal collagen crosslinking in pseudophakic bullous keratopathy*. Cornea, 2014. **33**(3): p. 243-6.
100. !!! INVALID CITATION !!! {}.
101. Luce, D.A., *Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer*. J Cataract Refract Surg, 2005. **31**(1): p. 156-62.

102. Nguyen, T.M., et al., *Monitoring of cornea elastic properties changes during UV-A/riboflavin-induced corneal collagen cross-linking using supersonic shear wave imaging: a pilot study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(9): p. 5948-54.
103. Koprowski, R., *Open source software for the analysis of corneal deformation parameters on the images from the Corvis tonometer*. Biomed Eng Online, 2015. **14**: p. 31.
104. Dias, J. and N.M. Ziebarth, *Impact of Hydration Media on Ex Vivo Corneal Elasticity Measurements*. Eye Contact Lens, 2015. **41**(5): p. 281-6.
105. Elham, R., et al., *Keratoconus diagnosis using Corvis ST measured biomechanical parameters*. J Curr Ophthalmol, 2017. **29**(3): p. 175-181.
106. Thomasy, S.M., et al., *Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: epithelium to endothelium*. Acta Biomater, 2014. **10**(2): p. 785-91.
107. Wernli, J., et al., *The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(2): p. 1176-80.
108. Kling, S., et al., *Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(8): p. 3961-8.
109. Winkler, M., et al., *Nonlinear optical macroscopic assessment of 3-D corneal collagen organization and axial biomechanics*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(12): p. 8818-27.
110. Singh, M., et al., *Quantifying the effects of hydration on corneal stiffness with noncontact optical coherence elastography*. J Cataract Refract Surg, 2018. **44**(8): p. 1023-1031.
111. Gokhale, N.S., *Corneal endothelial damage after collagen cross-linking treatment*. Cornea, 2011. **30**(12): p. 1495-8.
112. Hafezi, F., *Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea*. Cornea, 2011. **30**(8): p. 917-9.
113. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., et al., *Anti-CD137 enhances anti-CD20 therapy of systemic B-cell lymphoma with altered immune homeostasis but negligible toxicity*. Oncoimmunology, 2016. **5**(7): p. e1192740.

8. ÖZET

Amaç: Enükleer tavşan gözlerinde rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisinin iyontoforez aracılığı ile uygulanmasının korneal biyomekanik parametreler, boya diffüzyon oranları, derin dokulara ulaşan yeşil ışık seviyeleri yönünden etkilerinin değerlendirilmesi ve standart rose bengal çapraz bağlama tedavisi ile bu parametreler yönünden kıyaslanması.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 45 adet enükleer taze dondurulmuş tavşan gözü kullanılmıştır. Korneal biyomekanik değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla kontrol, sadece %0,1'lik rose bengal damla uygulanan, %0,1'lik rose bengal ve 532 nm yeşil ışık uygulanan, iyontoforez destekli %0,1'lik rose bengal ve 532 nm yeşil ışık uygulanan tavşan gözlerinden 5x10 mm boyutlarında kornealar şeritler elde edilmiştir. Dokular tek eksenli ekstansiyometre ile biyomekanik açıdan değerlendirilmiştir. Korneal boya diffüzyonunun değerlendirilmesi için 0,1'lik rose bengal ve 532 nm yeşil ışık uygulanan ve iyontoforez destekli %0,1'lik rose bengal ve 532 nm yeşil ışık uygulanan globlardan işlem sonrası ÖS-OCT görüntüleri alınmış ve boya derinlik yüzdeleri (%boyanan kornea derinliği/total kornea kalınlığı) değerlendirilmiştir. Rose bengalin 532 nm yeşil ışığın ne kadarının korneada tutulduğunun tespiti amacıyla uygulama yapılmamış olan kontrol dokuları, 0,1'lik rose bengal uygulanan dokular ve iyontoforez destekli %0,1'lik rose bengal uygulanan kornealar eksize edilmiş, 250 miliwatt iridasyon gücüyle ışınlama sırasında korneayı aşan iridasyon miktarı 1,3 ve 7. dakikalarda lazer güç ölçer ile korneal dokuların altından ölçülmüştür.

Bulgular:

Özellikle iyontoforez destekli rose bengal ve yeşil ışık uygulanan grupta ortalama elastik modülü ve kornea sertlik değerleri kontrol grubuna göre yaklaşık 4.2 kat, rose bengal çapraz bağlama grubuna göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Rose bengal çapraz bağlama yapılan grupta da kontrol grubuna oranla ortalama elastik modülü ve kornea sertlik değerinin 2.2 kat artmış olduğu görülmüştür. Ön segment OCT ile korneal boyanma derinliğine bakıldığında 10 dakika boyunca damla uygulanması sonucunda rose bengal total korneal kalınlığın $26,63 \pm 3,84$ derinliğine ulaşmakta, iyontoforez uygulaması ile bu değer $42,22 \pm 4,77$ 'e yükselmektedir ($<0,001$). Lazer güç ölçer ile güvenilirlik değerlendirmesine bakıldığında iyontoforez sonrası uygulanan $100\text{j}/\text{cm}^2$ yeşil ışığın ortalama %98'i korneada tutulmaktadır ve korneayı geçebilen ışın miktarı hem kontrol hem de 10 dakika boyunca damla uygulanan gözlerle kıyasla istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,008$).

Tartışma ve Sonuç: İyontoforez aracılığıyla rose bengal ve yeşil ışık çapraz bağlama tedavisi korneal direnci arttırmakta oldukça faydalı, hızlı uygulanabilen, korneal boya diffüzyon miktarını artırmada oldukça etkili ve derin dokulara ulaşan toksik etkinin minimize edildiği bir yöntemdir. İyontoforezin rose bengal ve yeşil ışık tedavisinde ilk defa kullanılmakla birlikte, bu tedavi modalitesinin etkinliği ve güvenilirliğini artıran bir yöntem olarak iyi bir alternatif gibi gözükmektedir. Bu nedenlerle, korneal ektatik hastalıkların tedavisine yönelik araştırmalarda ön plana çıkan rose bengal ve yeşil ışık korneal çapraz bağlama modaliteleri içinde önemli bir yer alacağını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Rose bengal çapraz bağlama, iyontoforez, tek eksenli tansiyometre, elastik modül, optik koherens tomografi

9. ABSTRACT

Purpose: Evaluation of the effects of application of iontophoresis assisted rose bengal and green light crosslinking therapy on enucleated rabbit eyes in terms of corneal biomechanical parameters, dye diffusion rates, green light levels reaching deep tissues and comparison of these parameters with standard rose bengal crosslinking therapy.

Method: In this study 45 enucleated freshly frozen rabbit eyes were used. In order to evaluate corneal biomechanical changes, 5x10 mm corneal strips were obtained from rabbit eyes which divided into 4 groups according to the treatment method. These groups were 0.1% rose bengal drops group, 0.1% rose bengal and 532 nm green light, iontophoresis assisted group, 0.1% rose bengal group and 532 nm green light group. Tissues were evaluated biomechanically with uniaxial extensometer. To assess corneal dye diffusion, post-procedure AS-OCT (anterior segment optic coherence tomography) images were obtained from the globes and the dye depth percentages (stained corneal depth / total corneal thickness) were evaluated. The treated corneas were excised and the amount of irradiation passing through the cornea during the irradiation with 250 milliwatts irradiation power was measured under the corneal tissues with laser power meter at 1, 3 and 7 minutes.

Results: Especially in the iontophoresis assisted rose bengal and green light treated group, mean elastic modulus and corneal stiffness values were increased about 4.2 times compared to the control group and about 2 times higher than the rose bengal crosslinking group. In the rose bengal cross-linking group, mean elastic modulus and corneal stiffness values were increased by 2.2 times compared to the control group. When the corneal staining depth was examined with anterior

segment OCT, dye diffusion depth was $26.63 \pm 3.84\%$ of the total corneal thickness in the rose bengal drop group but this value was increased to $42.22 \pm 4.77\%$ in iontophoresis group (<0.001). When the safety evaluation with laser power meter was evaluated, an average of 98% of the $100\text{ j} / \text{ cm}^2$ green light applied after iontophoresis was kept in the cornea and the amount of beam that could pass through the cornea was found to be statistically lower compared to the both control and 10 minutes drops only groups ($p < 0.008$).

Discussion: Rose bengal and green light crosslinking therapy assisted with iontophoresis is a very useful method for increasing corneal resistance, highly effective in increasing the amount of corneal dye diffusion and minimizes the toxic effect reaching deep tissues. Although iontophoresis has been used for the first time in the treatment of rose bengal and green light, this seems to be a good alternative as a method to increase the efficacy and safety of the treatment modality. For these reasons, iontophoresis assisted rose bengal and green light corneal collagen crosslinking therapy may have an important role in the treatment of corneal ectatic diseases.

Keywords: Rose bengal crosslinking, iontophoresis, uniaxial tensiometer, elastic modulus, optical coherence tomography

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Atike Burçın Tefon

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara – 14.06.1990

Eğitim:

2004-2008 Ankara Atatürk Anadolu Lisesi, Lise

2008-2014 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Lisans

2014-2014 Kayseri Yeşilhisar İlçe Devlet Hastanesi, Pratisyen Hekim

2015-2019 Gazi Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Araştırma

Görevlisi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Oftalmoloji Derneği

BİLİMSEL YAYINLAR

Makaleler:

1. Serbest K, Tefon, A.B., Özdek Ş., Polipoidal Koroidal Vaskülopati Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Retina-Vitreus/Journal of Retina-Vitreous . jun2017, Vol. 26 Issue 2, p89-98. 10p.
2. Atalay HT, Dogruman-Al F, Sarzhanov F, Özmen MC, Tefon AB, Arıbaş YK, Bilgihan K. Effect of Riboflavin/Rose Bengal-Mediated PACK-CXL on Acanthamoeba Trophozoites and Cysts in Vitro. Curr Eye Res. 2018 Nov;43(11):1322-1325.
3. AKTAŞ Z, TEFON AB. Micro-invasive Glaucoma Surgery: Yesterday, Today and Tomorrow. Türkiye Klinikleri J Ophthalmol-Special Topics. 2018;11(1):83-90
4. Bilgihan K, Yesilirmak N, Altay Y, **Tefon AB**, Ozdemir HB, Ozdogan S, Kocamaz MF, Gurelik G. Evaluation of Long-Term Corneal Morphology After Photorefractive Keratectomy by In Vivo Confocal Microscopy and Specular Microscopy; 20-Year Follow-Up. Eye Contact Lens. 2019 May 29. doi: 10.1097

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Özeti Basılan Bildiriler:

1. Sun G.P., Taktuk S., **Tefon A.B.**, Uçar M. Sanat Terapisi, Tıpta İnsan Bilimleri Kongresi (13-14 Mayıs 2009, Ankara), Özet Kitabı s. 22 (Sözlü Sunum).
2. **Tefon A.B.**, Özdek Ş., Atalay H., FEVR Hastalarında Anatomik ve Fonksiyonel Sonuçlar, 50. TOD Ulusal Kongresi 9-13 Kasım 2016, Antalya (Sözlü Sunum)
3. **Tefon A.B.**, Altay Y., Yeşilırmak N., Özdemir H.B., Bilgihan K., Fotorefraktif Keratektomi sonrası 20. yılda In Vivo Konfokal Mikroskopik Muayene. 51. Ulusal Oftalmoloji Kongresi 25-29 Ekim 2017, Antalya (Sözlü Sunum)
4. **Tefon A.B.**, Bilgihan K., Kontakt Lens ve Kuru Göz Yönetimi, 10. Academy for EyeCare Excellence, 23-25 Mart 2018, İzmir (Sözlü Sunum)
5. **Tefon A.B.**, Özdek Ş., Fevr Hastalarının Asemptomatik Aile Bireylerindeki Periferik Retinal Değişikliklerin İncelenmesi, 52. Ulusal Oftalmoloji Kongresi 13-18 Kasım 2018, Antalya (Sözlü Sunum)
6. Özdek Ş., **Tefon AB.**, Investigation of Retinal Vascular Changes in Asymptomatic Family Members of Familial Exudative Vitreoretinopathy Patients. 2019 European Vitreoretinal Society (EVRs) Meeting (Sözel Sunum)