

## DERLEMELER

# Korneanın Ektatik Hastalıklarının Tedavisinde Kollajen Çapraz Bağlama

Canan Aslı Utine (\*), Hanefi Çakır (\*\*), Muhsin Altunsoy (\*)

### ÖZET

Kollajen çapraz bağlama, son yıllarda korneanın ektatik hastalıklarının tedavisinde yaygınlaşmıştır. Bu yöntem fotosensitize edici madde olan riboflavin ve ultraviyole A (UVA) ışınlarının kombine etkisi ile stroma kollajen liflerinin fotopolimerizasyonunu sağlar. Kornea epiteli kaldırıldıktan ve riboflavin damla ile sature edildikten sonra 30 dakika boyunca 3 mW/cm<sup>2</sup> UVA (toplam 5.4J/cm<sup>2</sup> yüzey dozu) uygulaması yapılır. Sonuçta bir fotooksidatif mekanizma (oksidatif dezaminasyon) ile intra-fibriller kovalent bağlar artar. Ayrıca, tedavi sonrası daha kalın çaplı ve enzimatik degradasyona daha dirençli yeni kollajen oluşmaktadır. Böylece, stroma kollajenini "dondurmak" ve korneanın biyomekanik kararlılığını artırmak amaçlanır. Bu tedavi, keratokonus veya iyatrojenik keratektazi yanısıra kornea içi halkaların etkisinin güçlendirilmesi, korneada erime, büllöz keratopati ve hidrops tedavisinde de denenmektedir. Tedaviden hemen sonra anterior ve orta stromada keratositlerin tama yakın kaybı ile beraber stroma ödemi izlenir. Postoperatif 3. ayda keratositler yeniden oluşmaya ve ödem kaybolmaya başlar. Hücre yoğunluğu postoperatif dönemde ilerleyici olarak artar ve yaklaşık 6. ayda keratositlerin yeniden çoğalması tamamlanır, beraberinde stroma lifleri yoğunluğunda da artış olur. Ortalama tedavi derinliği ~320 µm'dir. 400 µm'den kalın stromaya uygulanan tedavi sonrası endotel hasarı gözlenmemektedir. Topografik olarak ortalama keratometri değerinin azalması ile birlikte ortalama sferik eşdeğerde yaklaşık 2.5 D azalma, morfolojik simetrideki iyileşme, kornea aberasyonlarında azalma saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ektazi, keratokonus, kollajen çapraz bağlama, riboflavin

### SUMMARY

#### Collagen Cross Linking in the Treatment of Corneal Ectatic Diseases

Collagen crosslinking has been widely used in ectatic disease of the cornea. This method causes photopolymerisation of the stromal collagen fibers with the combined effect of the photosensitizing substance riboflavin and ultraviolet A (UVA) beam. After removal of the corneal epithelium ve saturation with riboflavin drops, 3 mW/cm<sup>2</sup> UVA (total 5.4J/cm<sup>2</sup> surface dosage) is applied for 30 minutes. As a results of a photooxidative mechanism (oxidative desamination), intra-fibrillary covalent bonds increase. After the treatment, new collagen with thicker diameter and resistance to enzymatic degradation is formed. By this way, "freezing" the stromal collagen and increase in corneal biomechanical stability are aimed. Beside keratoconus and iatrogenic keratectasia, this treatment has been tried for reinforcing the effect of intracorneal rings, treatment of corneal melting, bullous keratopathy ve hydrops. Immediately after the treatment, al-

(\*) Yrd. Doç. Dr., Yeditepe Üniversitesi Göz Hastanesi, İstanbul

(\*\*) Op. Dr., Türkiye Hastanesi, Göz Kliniği, İstanbul

**Yazışma adresi:** Yard. Doç. Dr. Canan Aslı Utine, Şakir Kesebir Sok. No: 28, Balmumcu - Beşiktaş, İstanbul E-posta: cananutine@gmail.com

*Mecmuaya Geliş Tarihi: 10.10.2008*

*Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 24.12.2008*

*Kabul Tarihi: 30.01.2009*

most complete loss of keratocytes in the anterior and mid-stroma and stromal edema are seen. At the postoperative 3rd month, keratocytes begin to regenerate and edema begin to disappear. The cell density increase progressively in the postoperative period and around 6th month, regeneration of the keratocytes is complete, together with the increase in the stromal fiber density. The mean treatment depth is ~320 µm. After treatment in stroma thicker than 400 µm, endothelial damage is not seen. Together with the topographic decrease in mean keratometry value, approximately 2.5 D decrease in mean spherical equivalent, improvement in morphological symmetry and decrease in corneal aberrations were detected.

**Key Words:** Ectasia, keratoconus, collagen crosslinking, riboflavin

## GİRİŞ

Keratokonüs ve refraktif cerrahi sonrası iyatrojenik kornea ektazisi, korneanın biyomekanik direncinde azalma ve benzer patofizyolojik mekanizma sonucu korneada incelleme ve dikleşme ile karakterize hastalıklardır. Tedavide bugüne kadar sert kontakt lensler (1), radyal keratotomi (2), kornea içi halkalar (3) ve keratoplasti (4) farklı başarı oranları ile uygulanmıştır. Kollajen çapraz bağlama ise, etyopatogeneze yönelik bir tedavi yöntemi olarak geliştirilmiş ve son yıllarda korneanın ektatik hastalıklarının tedavisinde yaygınlaşmıştır.

Keratokonüs insidansı genel toplumda 2000'de 1 olarak bildirilmiştir (5) ve olguların %20'sinde progresif seyrederek. Korneanın biyomekanik yapısı, kollajen liflerinin özellikleri (6), kollajen lifleri arası bağlar (7) ve uzaysal-yapısal dağılımlarına bağlıdır (8). Keratokonüs, kollajen liflerinde muhtemelen azalmış intra- ve interfibril çapraz-bağları nedeniyle dokunun biyomekanik direncinde azalma ile birliktedir (9). Keratokonusta, merkezi anterior stromada ve Bowman tabakasında yoğun / sınırlı olarak kornea kollajen yapısında (6), organizasyonunda (7) ve interselüler matrikste (8) değişiklikler kadar keratositlerin apoptozu (10) ve nekrozu (11) da bildirilmiştir.

Genç yaşlarda, korneada daha yüksek seviyelerde reaktif oksijen türleri (serbest radikaller) oluşturma eğilimi vardır. Superoksit dismutaz ve diğer enzimler, bu serbest radikallerin birikimini tipik olarak engeller. Ancak bazı hastalar, bu koruyucu enzimleri üretememektedir. Sonuç olarak, korneanın yapısal bütünlüğüne zarar veren serbest radikaller birikir (12). Bunu, korneada incelleme ve zayıflama takip edebilir, doku üzerinde göz içi basıncı (GİB) ile indüklenen gerginlik sonucu kornea fıtıklaşabilir ve dikleşebilir. Diğer bir deyişle keratokonüs gelişir. Korneadaki serbest radikallerin güneş ışığında ve göz kaşıma ile arttığı (13) ve özellikle vernal konjunktivit zemininde gelişen keratokonüsün hızlı ilerlediği bildirildiği için keratokonüs hastalarının koyu renkli güneş gözlüğü takmaları ve gözlerini kaşımamaları önerilir.

İyatrojenik kornea ektazisi de, keratokonusa benzer mekanik patofizyolojiye sahip, laser ile korneanın biyo-

mekanik direncinin azaltılması sonucu oluşmaktadır. Patofizyolojide GİB'in rolü, ektazinin erken dönemlerde, sadece anti-glokomatöz damlalarla dahi nasıl geri döndürebildiğini açıklar (14).

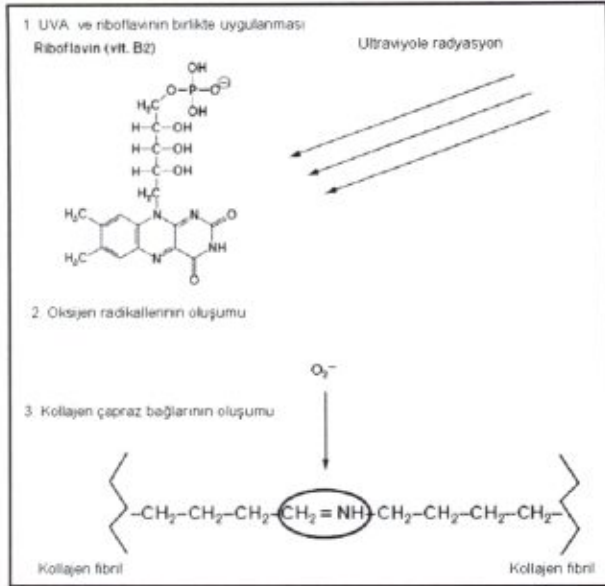
## Kollajen çapraz bağlama

Kollajen çapraz bağlama tekniği, bir fotosensitize edici madde / kromofor (riboflavin, vitamin B2) ve ultraviyole A (UVA) ışınlarının kombine etkisi ile stroma liflerinin fotopolimerizasyonundan oluşur (15). 370 nm UVA ve fotosensitize edici riboflavin kullanıldığında, fotosensitize edici madde üçlü (triplet) duruma geçerek uyarılır ve reaktif oksijen türleri (ROS) (çoğunlukla tekli oksijen ve daha az miktarda superoksit anyon radikalleri) üretir. ROS çeşitli moleküllerle reaksiyona girerek kollajen liflerinin amino gruplarını köprüleyen kimyasal kovalent bağlar oluşturur (Tip II fotokimyasal reaksiyon) (Şekil 1). 370 nm dalgaboyu, riboflavinin absorpsiyon zirvesi olduğu için seçilmiştir (16). Fotopolimerizasyon kornea kollajeninin çapını (17) rijiditesini ve keratektaziye direncini artırır (18).

Bu konuda fotobiyolojideki ilk çalışmalar 1990'ların başlarında başlamıştır. Stroma kollajeninin direncini artırmak için ısı veya ışık ile aktive olabilecek biyolojik yapıştırıcılar belirlenmeye çalışılmıştır (19). Yapıştırıcı etkinin hidroksil radikal salınımı ile ilişkili olarak bir oksidatif mekanizma sayesinde olduğu keşfedilmiştir. Ayrıca çapraz bağlama, polimer endüstrisinin maddeleri sertleştirmede ve biyo-mühendislikte doku stabilizasyonu için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Örneğin, glutealdehit ile kimyasal çapraz bağlama protetik kalp kapakçıklarının hazırlanmasında ve UVA ile fiziksel çapraz bağlama diş hekimliğinde dolgu maddelerin sertleştirilmesinde kullanılır (16). Benzer olarak, patolojide doku örnekleri glutealdehit veya formaldehit ile korunur ve sertleştirilir.

Kollajen liflerinin sertleşmesi ve kalınlaşmasında benzer bir mekanizma korneanın yaşlanmasında gösterilmiştir (20). Bu mekanizma yaşa-bağlı tropokollajen moleküllerinin aktif glikozilasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca diyabetes mellitusta, "ileri glikasyon son ürünleri" ("advanced glycation end products") tarafından kollajen çağ-

**Şekil 1.** UVA ve riboflavin etkisi ile kollajen çapraz bağlama



(Kaynak: Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17:356-60.)

raz bağlarının çokluğu nedeniyle keratokonus çok nadirdir (21,22). Yaşa bağlı ve diyabetik kornea kollajen çapraz bağlamada kimyasal enzimatik reaksiyon (lipooksijenaz ve Maillar reaksiyonu) mevcuttur. Terapötik kornea kollajen çapraz bağlamada ise artan intra-fibriller kollajen bağları bir fotooksidatif mekanizma (fotodinamik tip II reaksiyon - oksidatif dezaminasyon) ile oluşur.

Bu yaklaşımın keratokonus tedavisinde kullanımı fikri 1990'larda Almanya'da Dresden Teknik Üniversitesindeki araştırma gruplarında benimsenmeye başlanmıştır (15). Bu yaklaşımın klinik ve bilimsel desteği, genç diyabetik hastalarda hiçbir zaman keratokonus gelişmesi ve nadir olgularda, diyabetin başlangıcından önce keratokonus başladıysa da, bu hastalarda kornea direncini artıran glukozun doğal çapraz-bağlayıcı etkisi nedeniyle progresyon göstermemesindeydi (21).

Korneada çapraz-bağlama, stroma kollajeninin "dondurmak" ve korneanın biyomekanik kararlılığını artırmak amacıyla uygulanır (9). Çapraz bağlama tedavisinin korneayı belirgin biçimde sertleştirdiği ve biyomekanik gücünü in vivo tavşan kornealarında 1.4, ex vivo insan kornealarında 4.5 kat artırdığı gösterilmiştir (18, 23).

Kollajen ömrü yaklaşık 2-3 yıldır. Korneada kollajen çapraz bağlama tekniği, keratokonusun progresyonunu en azından geçici olarak durduracaktır. Bu nedenle, bazı hastalarda işlemin tekrar edilmesi gerekebilecektir. Erken klinik sonuçlar da, çapraz-bağlamanın keratoko-

nusun ilerlemesini, tedaviden sonra 3-5 yıla kadar durduğunu göstermiştir (24, 25). Ancak, bu operasyon sonrası klinik stabilite sadece korneada çapraz bağlamanın kendisi ile ilgili olmayabilir; ayrıca, geç postoperatif dönemde in vivo konfokal mikroskopide gösterilen yeni iyi-yapılanmış kollajenin biyosentezi ve daha sıkı lameller bağlantılarla ilgili de olabilir. Ayrıca, çevresel çapraz-bağlama güçleri (UV ışık, kan şekeri), tekrar UVA/riboflavin tedavisi gereksinimini engelleyecek şekilde etki edebilirler (26).

### Kornea çapraz bağlama endikasyonları

Kornea kollajen çapraz bağlama tedavisi, primer olarak keratokonusun erken evrelerinde ve progresyonun hızlı olduğu genç hastalarda endike olup, kornea şekil değişikliklerini ve düzensizliklerini engelleyebilir. Yaşa bağlı kornea kollajen çapraz bağlama (20) nedeniyle 35 yaş üzeri hastalarda bu tedaviye ihtiyaç azdır. Tedavi endikasyonları aşağıdaki gibi sayılabilir:

1. Keratokonus veya iyatrojenik keratektazi nedeniyle korneada ilerleyici dikleşme (9,15,16). Özellikle vernal konjunktivit zemininde gelişen keratokonus hızla ilerlediği için, bu hastalarda çapraz bağlama tedavisi daha erken yaşlarda (15 yaş gibi) gerekebilir.

2. Kornea içi halkaların etkisinin güçlendirilmesi (27) (Bu endikasyonun kanıtlanması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır).

3. Korneada erime - en ince noktasında epitel dahil 450 µm'dan daha kalın olan kornealarda, çapraz bağlanmış kornea kollajeni proteinazlara daha dirençli olduğu için uygulanmaktadır (28).

4. İnce veya şüpheli kornealarda yüzey ablasyonu-na izin vermek için (29) (Bu endikasyonun kanıtlanması için daha uzun dönem çalışmalara ihtiyaç vardır).

5. Büllöz keratopati, keratokonus ve keratoglobusta hidrops tedavisinde, kornea ödemi çözme, korneanın biyomekanik direncini artırmak, ağrı ve fotofobi gibi belirtileri azaltmak ve yeni ödem ataklarını önlemek için. (Bu uygulamada önce topikal gliserin uygulaması ile korneanın dehidrate edilmesi, daha sonra yıkama ile gliserin uzaklaştırıldıktan sonra çapraz bağlamanın uygulanması önerilmektedir (30) (Bu endikasyonun kanıtlanması için daha uzun dönem çalışmalara ihtiyaç vardır).

### Kornea çapraz bağlama kontraendikasyonları (26)

1. Epiteli kaldırdıktan sonra 400 µm'dan daha ince kornealarda, endotele toksik olan 0.35 mW/cm<sup>2</sup> enerjiye ulaşma riski nedeniyle uygulanmamalıdır (Şekil 2). Ancak, kısmi hipotonik solüsyonlarla stroma kalınlığı 400 µm'a artırılabilirse işlem uygulanabilir.

2. Daha önce insizyonel refraktif cerrahi geçirilmiş olması, özellikle transvers insizyonlar, kornea lamellerinin kontraksiyonu ile açılmaya (yarılmaya) meyillidir. Geçici kornea sütürasyonu uygulanırsa, kornea sikatrizasyonundan sonra iyi sonuçlar elde edilebilir.

3. Gebelik veya emzirme
4. Merkezi kornea kesafeti
5. Kornea tekrar epitelizasyonunu engelleyebilecek şiddetli kuru göz
6. Sistemik kollajen hastalık

### **Korneada çapraz bağlama tedavisi nasıl uygulanır?**

Çapraz bağlama işleminden 3 hafta önce sert kontakt lens kullanımının kesilmesi önerilmektedir. Ayrıca eğer hasta vitamin C tedavisi alıyorsa, vitamin C'nin serbest radikal kovucu özelliği ile tedavi etkinliğini azaltma riski nedeniyle, operasyondan 1 hafta önce bu tedavinin kesilmesi önerilmektedir. Her tedavi öncesi cihazın UVA radyasyon yayımının güç-metre ile ölçülmesi ve kalibrasyonun tekrar edilmesi gereklidir.

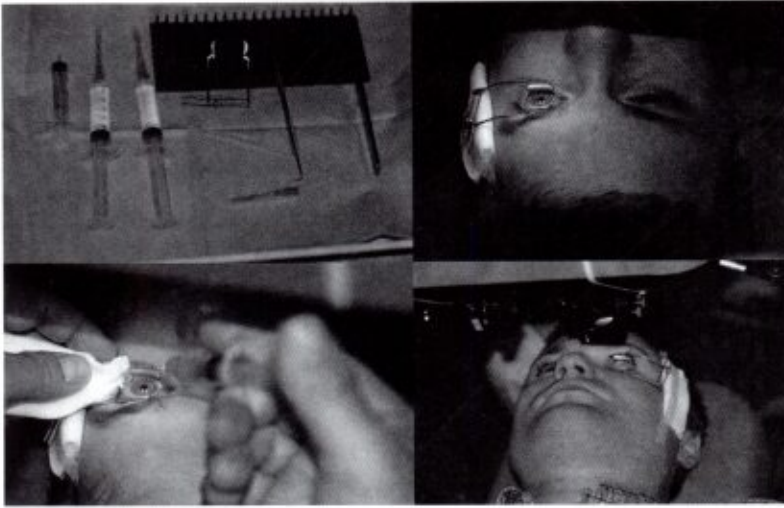
Çapraz bağlama tedavisi, lokal anestezi altında pakimetri ölçümleri tekrar edildikten sonra merkezi 8-9 mm çaplı alanda epitel kaldırıldıktan sonra yapılmaktadır (Şekil 3). Riboflavin molekülü epitel tabakasındaki sıkı bağlantılar arasından geçmek için çok büyük olduğu için, ilk dönemlerde trans-epitelyal yapılan tedaviye göre, epitel soyulduktan sonra yapılan tedavinin çok daha başarılı sonuç verdiği gösterilmiştir (31). Epitel uzaklaştırılması için LASEK operasyonundaki gibi %20'lik alkol uygulanması yapılabilir. Ancak burada, epitel tabakasını bir bütün olarak kaldırmak amacıyla olmadığımız için %20'lik alkolün en fazla 10 saniye bekletilmesi yeterli olur. Epitel tabakası, flep olarak değil de merkezden periferde doğru açılır ve 9 mm çaplı alan etrafında biriktirilirse, riboflavin damlanın limbuse ve konjunktivaya fazla yayılmadan kornea üzerinde göllenmesi ve daha etkin penetrasyonu sağlanabilir. Daha sonra %0.1 riboflavin - %20 dextran izotonik solüsyonu (Medio-Cross™), 30 dakika boyunca her 2 dakikada bir damla damlatılır. Bu süre sonunda biyomikroskopide kobalt mavisi ışıkla ön kamaranın hafifçe sarı renk alıp almadığı, yani riboflavinin ön kamaraya geçişi kontrol edilir. Aköz hümede sarımsı renk farkedilmezse, UVA uygulamasına geçmeden önce, riboflavinin ön kamaraya geçişi gerçekleşene kadar damla damlatılmasına devam edilmelidir. Epitelsiz en ince kornea kalınlığının 400 µm'nin altında olduğu durumlarda ise, %0.1 riboflavin - NaCl hipotonik solüsyon damlatılır ve UVA uygulamasına geçmeden önce mutlaka korneanın şişerek en ince stroma kalınlığının 400 µm üzerine çıktığı kontrol edilir.

Daha sonra cihaz açılarak ışın çıkışı ile göz arasında yaklaşık 5 cm mesafe kalacak şekilde pozisyon verilir ve ışın demetinin kornea merkezinde net olarak odaklanması sağlanır. 3 mW/cm<sup>2</sup> UVA uygulamasına 30 dakika boyunca devam edilirken, her 2 dakikada bir riboflavin damla damlatılmaya devam edilir. Böylece korneaya uygulanan standard yüzey dozu toplam 5.4J/cm<sup>2</sup> olmaktadır. Tedavi süresinde, UVA ışın demetinin epitel uzaklaştırılmış olan kornea merkezine yerleşimine ve limbal kök hücrelerinin korunmasına dikkat edilmelidir.

Tedavi bitiminde zaman ayarlı UV cihazı kendiliğinde duracaktır. Cihaz uzaklaştırıldıktan sonra kornea yüzeyi yıkanır ve hasta, bandaj yumuşak kontakt lens yerleştirilerek eve gönderilebilir. Postoperatif tedavi, esas olarak PRK uygulamalarından sonra yapılanla aynıdır; bir hafta süreyle antibiyotik ve steroid damlalar kullanılabilir. Epitelizasyon tamamlandığında yumuşak kontakt lens çıkartılır. Rutin olarak uygulanan bu yöntem alternatif olarak, tedavi sonrası gözün antibiyotik, fluorometalon gibi zayıf bir kortikosteroid ve vitamin A pomadları ile göz kapatılırsa, kornea epitelizasyonunun 24 saat kadar hızlı bir sürede tamamlandığını gözledik. Epitelizasyon tamamlandıktan sonra steroid damla 2x1 ve suni gözyaşı tedavisine 1 ay daha devam etmek uygun olur.

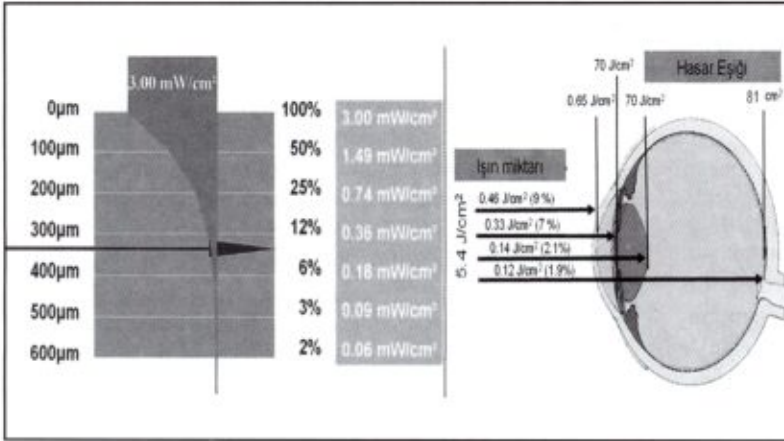
Postoperatif ağrı kontrolü için oral antiinflatuar ve analjezik ajanlar kullanılabilir. Yeterli olmaması durumunda oral γ-aminobütirik asit (GABA) analoglarının da ağrı eşiğini ve konforu artırıcı etkisi vardır. Gabapentin (Neurontin®) 300 mg bid veya pregabalin (Lyrica®) 150 mg bid cerrahiden 1-2 gün önce başlayıp 1-2 gün sonrasına kadar devam edilebilir. Meperidin, tramadol veya kodein gibi güçlü opioid oral analjezikler de gerekli olabilir; fakat bu durumda phenargan gibi bir antiemetik kullanımı opioid-indüklenen bulantıya karşı koymak için gerekebilir (26).

Topikal steroid olmayan anti-inflatuar ilaçlar, ağrıyı kesmek için 2-3 günden fazla olmamak kaydıyla çok dikkatli olarak kullanılabilir; fakat fazla kullanımı durumunda korneanın tekrar epitelize olmasını engelleyebilirler (32). Steroidler, tahmini olarak kollajen döngüsünü azaltarak, hidroskliprolin kollajen çapraz bağlamayı destekler (33). Dolayısıyla, korneada kollajen çapraz bağlama sonrası ilk 3-4 hafta için ve komplikasyonların yönetimi için geçerli bir alternatif tedavi olarak düşünülebilir. Fakat deneysel olarak mdx faresinin diyafram kasındaki kollajen üzerinde prednizon etkisi ve steroidin kollajen birikimini engelleyici etkinliği saptanmıştır (33). Bu nedenle, bu olgularda steroidler önerilmektedir fakat kollajen sentezini inhibe etmesinin engellenmesi için bir aydan daha uzun verilmemelidir (34).

**Şekil 2.** Korneada kollajen çapraz bağlama tedavisinin uygulanışı

(Alıntı: Iseli HP., 2nd International Congress of Corneal Crosslinking, Zurich, Switzerland, 8-9 Dec. 2006).

**Şekil 3a,b.** Çapraz bağlama tedavisinde uygulanan enerji yoğunluğunun kornea tabakalarından ve gözden geçişi. **a)** 400  $\mu\text{m}$  ve üzerindeki stroma kalınlıklarında, endotel tabakasında toksik olan  $0.35 \text{ mW/cm}^2$  eşik değere ulaşılmamaktadır. **b)** Kataraktojenik doz olan  $70 \text{ J/cm}^2$  sitotoksik endotelial dozun 122 katı; retinal toksisite  $81 \text{ J/cm}^2$  ise sitotoksik endotelial dozun 142 katıdır.



(Alıntı: Iseli HP., 2nd International Congress of Corneal Crosslinking, Zurich, Switzerland, 8-9 Dec. 2006).

Daha önce herpes epizodu atağı bulunmayan olgularda dahi, çapraz bağlama sonrası herpetik keratit olgularını bildirdiği için (35), operasyondan 1-3 gün önce başlayarak ve 7 gün boyunca devam ederek oral asiklovir (1200 mg / gün) tavsiye eden yayınlar vardır (26).

Operasyondan 1 hafta sonra epitel iyileşene kadar geçici kornea ödemi olabilir. Çapraz bağlanan anterior stroma ile tedavi uygulanmayan posterior stroma arasındaki (yaklaşık 300  $\mu\text{m}$  derinlikte) demarkasyon çizgisi,

olguların çoğunda operasyondan 2 hafta sonra biyomikroskopik olarak belirgin hale gelir (36). Bu, tedavi edilen ve edilmeyen kornea arasında ya refraktif indisite ya da refleksiyon özelliklerinde bir değişikliği gösterir.

### Kollajen çapraz bağlama tedavisinin etkileri ve riboflavinin rolü

Klinik çalışmalar, çapraz bağlama tedavisinden sonra konfokal mikroskopik olarak anterior stromada yaklaşık 350  $\mu\text{m}$  derinliğindeki keratositlerde neredeyse tamamen kaybolma, UVA uygulanan bölgenin hemen komşuluğunda ise preoperatif seviyelerde keratosit varlığı gösterdi. Hayvan çalışmalarında, keratositlerde maksimum sitotoksik hasarın ilk 24 saatte ortaya çıktığı görülmüştür (37). Bu, UVA radyasyonu sonrası tarif edilene benzer, "gecikmiş tipte apoptozis"tir (38); epitel kazınması sonrası gözlenen keratosit apoptozisinden farklıdır (39).

Masif keratosit kaybının klinik önemi belli değildir çünkü keratosit kaybı genellikle komşu korneadan göç eden keratositlerle yeniden çoğalma ile tamir edilir (40). Keratosit korunmasında apoptozis inhibitörü olan çinko klorid uygulanması da yardımcı değildir, çünkü istenen çapraz-bağlama etkisini zayıflatır (40). Keratosit apoptozisi, sadece riboflavin ile ıslatmadan önce epitel uzaklaştırıldıysa mümkün olmaktadır ve anterior midstromada hücrelerin ve kollajenin yer değiştirmesi için şart görünmektedir (41).

Fotosensitizasyon amacıyla kullanılan riboflavin bir esansiyel vitamindir ve doğal olarak vücutta bulunan bir bileşiktir. 500 nm altındaki dalgalı boylarındaki ışıkta dekompoze olur. İşlem süresinde riboflavin damlanının 3 temel görevi olmaktadır:

Bunlar, UVA ışını ile etkileşerek çapraz bağlama etkisinin başlatılması, UVA ışınlarını emerek endotel, lens ve makülanın korunması ve tedavi süresinde korneanın nemli kalmasının sağlanmasıdır.

Postoperatif dönemde, fotosensitize edici ajan olan riboflavinin radikal oluşumu etkisi ile anterior ve orta stromada fibriller arasındaki kovalent bağlarda artışa neden olması yanısıra, korneadaki antikollajenaz aktivitedeki artış nedeniyle pepsin yıkımına olan dirençte artış

olur. Ex vivo histolojik incelemelerde, kollajen liflerinin çapında bir artış, enzim yıkımına daha yüksek direnç (anti-kollejenaz etki), anterior ve orta stromada keratositlerin apoptozu ve takibinde derin keratositlerin tedrici tekrar çoğalması saptanmıştır (40).

Metalloproteinazlar ve inflamatuvar süreçlere dahil olan diğer enzimlerin, keratokonus patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (42). Bu nedenle çapraz bağlama ile uyarılan inflamasyonun, kollajenin enzimatik degradasyonu da dahil, kötüleşmeye neden olabileceği öne sürülebilir (42). Ancak, çapraz bağlama yapılan kollajenin enzimatik degradasyona, doğal kornea kollajeni-ne göre, daha dirençli olduğu bildirilmiştir (24).

Korneadaki riboflavin tarafından emilim nedeniyle ışık transmisyonundaki akut değişiklikler kısa sürelidir; klinikte tedaviden sonra açıkça görülen korneanın sarı boyanması 24 saat sonra şeffaflaşır (31). İlginç olarak, endojen riboflavin ile aynı sistem insan lensinde de, retinayı UVA-ışıklarından korumak için mevcuttur; fakat, uzun dönemde kristalin proteinlerinin çapraz bağlanması ile lensin sarımsı renk değişimi ve katarakt oluşumu gerçekleşir (43). Çapraz bağlama tekniğinde riboflavinin siper ve absorbe edici etkisi nedeniyle UVA ve riboflavin kombinasyonunun zarar verici eşiğinin sadece UVA uygulamasına göre 10 kat daha düşük olduğunu gösterilmiştir (0.35 vs 4 mW/cm<sup>2</sup>) (44). UVA ışığının <math><10\%</math>u korneayı tamamen penetre edebildiği ve aköz çok az miktarda riboflavin içerdiği için, ön kamarada serbest radikaller oluşturma ihtimali çok azdır. Diğer taraftan, aközde bulunan yüksek konsantrasyon askorbat radikal kovucu olarak görev yapar (44).

Refraktif etki, topografik olarak ortalama keratometri (40) değerinin azalması ile de doğrulanan, ortalama sferik eşdeğerde yaklaşık 2.5 D azalmadan oluşur. Ayrıca, morfolojik simetrideki iyileşme, 1. ayda koma aberasyonlarında anlamlı bir azalma ve kornea hemimeridyenlerindeki anizorefraktansta azalma (yani, kusur ile düzeltici lens arasında daha büyük ve simetrik koherans) oluşturur.

#### **Kollajen çapraz bağlama tedavisi sonrası konfokal mikroskopisi**

Mazzotta ve ark, çapraz bağlama sonrası konfokal mikroskopisi değişikliklerini incelemişlerdir (45). Epitel debridmanı, 50-60 µm derinlikteki keratositlerde nekroza yol açabilse de (46), çapraz bağlamanın anlamlı sitotoksik etkisi, riboflavinin UVA'yı yüksek derecede absorbe edebilmesinden ötürü korneanın anterior 350 µm kısmına sınırlı gözükmektedir.

Tedaviden hemen sonra anterior ve orta stromada keratositlerin tama yakın kaybı ile beraber stroma ödemi

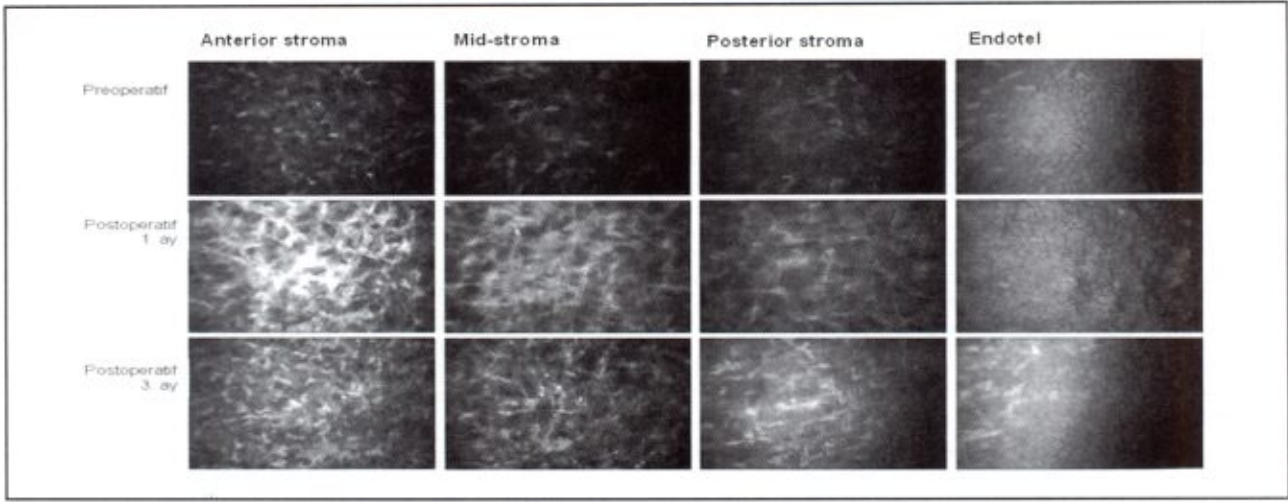
izlenir. Konfokal mikroskopik olarak sadece keratositlerden yoksun bölgelerde subklinik, sünger veya balpeteği görünümüne stroma ödemi olması, radyasyonun anlamlı derecede dejeneratif etkisi olduğunu; ve tedavi edilen bölgeler ve komşu bölgelerde inflamatuvar hücre olmaması da inflamatuvar fenomenin yokluğunu gösterir. Operasyondan sonra 3. ayda merkezi tedavi edilen alanda keratositlerin yeniden oluşumu ve ödemin kayboluşu saptanır. Trabeküler görünümdeki yoğun fibriller ağ içinde, muhtemelen apoptotik olan, ödem ile maskelenmiş, hayalet hücre cisimleri ve muhtemelen nekrotik keratosit kaynaklı olan uzamış nukleuslar görülür (45). Aktive keratositler, stromanın derin tabakalarından, postoperatif 2.-3. aydan başlayarak tekrar çoğalırlar; tüm orta ve anterior stroma tabakalarında aktive hücre nukleusları olarak görülürler. Hücre yoğunluğu postoperatif dönemde ilerleyici olarak artar ve yaklaşık 6. ayda keratositlerin yeniden çoğalması tamamlanır, beraberinde stroma lifleri yoğunluğunda da artış olur. Operasyondan 3 ay sonra başlayan ekstraselüler matrikste artmış yoğunluk ile birlikte, mikroskopik olarak saptanabilir fakat görme derecesini bozmayan kornea bulanıklığı görülebilir (45). Konfokal mikroskopisi ile değerlendirilen ortalama tedavi derinliği ~320 µm'dir (aralık 270-350 µm). İnce kornealarda hipotonik solüsyon ile stroma kalınlığı 400 µm'ye çıkarıldıktan sonra yapılan uygulamalarda, postoperatif dönemde geçici endotel ödemi görülebilir. Ancak, kalıcı endotel hasarı hiçbir zaman gözlenmemiştir (Şekil 4).

Preoperatif olarak geniş koyu mikrostriaları ve derin stromal Vogt striaları olan olgularda konfokal mikroskopide subklinik yara iyileşmesi görülür. Aktive keratosit nukleusları ve artmış stroma reflektansı, subklinik olan ve mikroskopik olarak saptanabilen haze ile uyumludur. Özellikle koyu mikrostria ve Vogt stria olan, yani daha ileri keratokonus hastalarında bir stromal skar bileşeni gözlenmesi nedeniyle (45); bazı yazarlar klinikte Vogt stria olsun veya olmasın, in vivo konfokal mikroskopide retiküler hipo-reflektif mikrostria saptanmasının, postoperatif dönemde geç stroma skatrizasyonu gelişimi için yüksek risk oluşturduğunu ve korneada riboflavin-UVA ile çapraz-bağlama tedavisi için göreceli bir kontraendikasyon sayılabileceğini söylemektedirler (47).

#### **Kollajen Çapraz Bağlama Tedavisinde Gelecekte Beklenen Gelişmeler**

Kollajen çapraz bağlama tedavisinin, sayılan endikasyonlarda gösterdiği başarı sonrası yeni uygulama yöntemleri ve alanları araştırılmaya başlanmıştır. Kornea ödemi için uygulanan çapraz bağlama tedavisinde femtosaniye laser ile oluşturulan kornea içi cebe riboflavinin intrastromal verilmesi (48), riboflavin yerine daha

**Şekil 4.** 400 µm'dan ince kornealı bir gözde hipotonik solüsyon ile stroma kalınlığı artırılarak yapılan çapraz bağlama tedavisi öncesi ve postoperatif 1. ve 3. ayda konfokal mikroskopi görüntüleri (Yeditepe Üniv. Göz Hastanesi Arşivinden).



etkin fotosensitize edici ve çapraz bağlayıcı madde olarak kısa zincirli alifatik  $\beta$ -nitro alkollerin kullanılması (49), bir hidrojel olan polivinil pirrolidon ile sadece 30 saniyede UVA ile "ani-bağlama" (50) ve dejeneratif miyopi tedavisinde 465 nm mavi ışık ile skleral çapraz bağlama (51) girişimleri gelecek için ümit vermektedir.

#### KAYNAKLAR

- İskeleli G, Eroğlu E, Onur U, Özkan Ş. Conflex-air™ 100 UV keratokonus lenslerinin semptomlar ve komplikasyonlar yönünden araştırılması. T Oft Gaz 2004; 34(1): 14-9.
- Utine CA, Bayraktar S, Kaya V, Kucuksumer Y, Eren H, Perente İ, Yılmaz OF. Radial Keratotomy for the optical rehabilitation of mild to moderate keratoconus - more than 5 years' experience. Eur J Ophthalmol 2006; 16(3):376-84.
- Ertan A, Colin J. Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia. J Cataract Refract Surg 2007;33(7):1303-14.
- Doğanay S, Doğanay Z, Bahadır M, Doğan ÖK. Keratokonus ve keratoplasti. MN Oftalmoloji 1998;5(3):229-32.
- Rabinowitz YS. Keratoconus. Surv Ophthalmol 1998;42(4):297-319.
- Cheng E, Maruyama I, SundarRaj N, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of type XII collagen and hemidesmosome-associated proteins in keratoconus corneas. Curr Eye Res 2001;22(5):333-40.
- Radner W, Zehetmayer M, Skorpik C, Mallinger R. Altered organization of collagen in the apex of keratoconus corneas. Ophthalmic Res 1998;30(5):327-32.
- Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ, Ljubimov AV. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. Cornea 1997;16(3):345-51.
- Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen. Preliminary refractive results in an Italian study. J Cataract Refract Surg 2006;32(5):837-45.
- Wilson SE, Kim WJ. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39(2):220-6.
- Kaldawy RM, Wagner J, Ching S, Seigel GM. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. Cornea 2002; 21(2):206-9.
- Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. J Histochem Cytochem 2002;50(3):341-51.
- Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in diseases of the human cornea. Free Radic Biol Med 2008;45(8):1047-55.
- Hiatt J, Wachler BS, Grant C. Reversal of laser in situ keratomileusis-induced ectasia with intraocular pressure reduction. J Cataract Refract Surg 2005;31(8):1652-5.
- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. Am J Ophthalmol 2003;135(5):620-7.
- Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. Curr Opin Ophthalmol 2006; 17(4):356-60.
- Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. Cornea 2004;23(5):503-7.
- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced crosslinking. J Cataract Refract Surg 2003;29(9):1780-5.
- Khadem J, Truong T, Ernest JT. Photodynamic biologic tissue glue. Cornea 1994;13(5):406-10.
- Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39(3):644-8.

21. Seiler T, Huhle S, Spoerl E, Kunath H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238(10):822-5.
22. Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;214(3):793-7.
23. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998;66(1):97-103.
24. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004;29(1):35-40.
25. Kohlhaas M, Spoerl E, Speck A, Schilde T, Sandner D, Pillunat LE. [A new treatment of keratectasia after LASIK by using collagen with riboflavin/UVA light cross-linking] *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005;222(5):430-6.
26. Abad JC, Panesso JL. Corneal collagen cross-linking induced by UVA and riboflavin (CXL). *Techniques in Ophthalmology* 2008;6(1):8-12.
27. Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(1):75-80.
28. Schnitzler E, Spoerl E, Seiler T. [Irradiation of cornea with ultraviolet light and riboflavin administration as a new treatment for erosive corneal processes, preliminary results in four patients] *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2000;217(3):190-3.
29. Kanellopoulos AJ, Binder PS. Collagen cross-linking (CCL) with sequential topography-guided PRK: a temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea* 2007 Aug;26(7):891-5.
30. Bellini LP. New uses for collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2008 Jun ;34(6):879-880.
31. Hayes S, O'Brart DP, Lamdin LS, Douth J, Samaras K, Marshall J, Meek KM. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *J Cataract Refract Surg* 2008;34(4):657-61.
32. Mian SI, Gupta A, Pineda R. Corneal ulceration and perforation with ketorolac tromethamine (Acular) use after PRK. *Cornea* 2006;25(2):232-4.
33. Hartel JV, Granchelli JA, Hudecki MS, Pollina CM, Goselin LE. Impact of prednisone on TGF-beta1 and collagen in diaphragm muscle from mdx mice. *Muscle Nerve* 2001;24(3):428-32.
34. Tani E, Katakami C, Negi A. Effects of various eye drops on corneal wound healing after superficial keratectomy in rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 2002;46(5):488-95.
35. Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, Suh LH, Pallikaris AI, Markomanolakis M, Yoo SH. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2007;33(11):1982-4.
36. Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea* 2006;25(9):1057-9.
37. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg* 2003 Sep;29(9):1786-90.
38. Godar DE, Miller SA, Thomas DP. Immediate and delayed type apoptotic cell death mechanisms: UVA versus UVB and UVC radiation. *Cell Death Differ* 1994;1(1):59-66.
39. Wilson SE, He Y-G, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996;62(4):325-37.
40. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* 2004;23(1):43-9.
41. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi O, Bovone C, Sparano MC, Balestrazzi A, Caporossi A. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: Early and late modification. *Am J Ophthalmol* 2008 Oct;146(4):527-33.
42. Rehany U, Lahav M, Shoshan S. Collagenolytic activity in keratoconus. *Ann Ophthalmol* 1982;14(8):751-4.
43. Krishna CM, Uppuluri S, Riesz P, Zigler JS Jr, Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem Photobiol* 1991;54(1):51-8.
44. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007;26(4):385-9.
45. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C, Caporossi A. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen. Ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea* 2007;26(4):390-7.
46. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Sergio P, Caporossi T, Caporossi A. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uva-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation. *Eur J Ophthalmol* 2006;16(4):530-5.
47. Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S, Traversi C, Caporossi A. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007 Aug;35(6):580-2.
48. Krueger RR, Ramos-Esteban JC, Kanellopoulos J. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: Laboratory investigation and first clinical case. *J Refract Surg* 2008;24(7):S730-6.
49. Paik DC, Wen Q, Braunstein RE, Trokel SL. Short chain aliphatic  $\beta$ -nitro alcohols for corneascleral cross-linking: Corneal endothelial toxicity studies. *J Refract Surg* 2008;24(7):S741-7.
50. Rocha KM, Ramos-Esteban JC, Qian Y, Herekar S, Krueger RR. Comparative study of riboflavin-UVA cross-linking and "Flash-linking" using surface wave elastometry. *J Refract Surg* 2008;24(7):S748-51.
51. Iseli HP, Spoerl E, Wiedemann P, Krueger RR, Seiler T. Efficacy and safety of blue-light scleral cross-linking. *J Refract Surg* 2008;24(7):S752-5.