

171850

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

**LASEK (LASER SUBEPİTELYAL KERATOMİLEUSİS)'DE
KONFOKAL MİKROSKOPİK İNCELEME**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SİBEL ÖZDOĞAN**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. KAMİL BİLGİHAN**

ANKARA 2006

TEŞEKKÜR

Oftalmoloji eğitimim boyunca, bilgili ve iyi bir göz hekimi olma yolunda her türlü emeği ve özeni gösteren, aynı zamanda doğru olan her davranışın doğru şekilde geri yansıyacağını öğreten; başta Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Berati Hasanreisöğlü olmak üzere tüm hocalarıma, tezimin her aşamasında oldukça fazla destek ve yardımını gördüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kamil Bilgihan'a, birlikte çalışmaktan her zaman zevk duyduğum tüm arkadaşlarıma ve bugüne kadar eğitim hayatım boyunca sonsuz destekleri ve sevgileri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

I. GİRİŞ 1

II. GENEL BİLGİLER.....3

III. GEREÇ VE YÖNTEM.....38

IV. BULGULAR.....40

V. TARTIŞMA VE SONUÇ 48

VI. ÖZET 52

VII. KAYNAKLAR.....54

KISALTMALAR

LASEK: Laser subepitelyal keratomileusis

PRK: Fotorefraktif keratektomi

LASİK: Laser in situ keratomileusis

PTK: Fototerapötik keratektomi

NSAİ: Nonsteroid antiinflamatuvar

TSCM: Tandem-scanning konfokal mikroskop

CMTF: Confocal microscopy through focusing

IL-1: Interlökin-1

TGF-β1: Transforming growth faktör-beta 1

EGF: Epidermal growth faktör

PDGF: Platelet derivating growth faktör

TNF-α: Tümör nekrozis faktör-alfa

BMB: Kemik morfojenik protein

GİRİŞ

Laser subepitelyal keratomileusis, fotorefraktif keratektomi ve laser in situ keratomileusis'in avantajlarını kombine eden, nispeten yeni bir refraktif cerrahi tekniğidir. LASİK'teki gibi flep içerdiği için postoperatif dönemde hızlı görsel rehabilitasyon, daha az ağrı, azalmış stromal haze ve PRK'dan daha hızlı epitel iyileşme sürecine sahiptir. PRK'da olduğu gibi lazer ablasyonu stromanın ön yüzeyine yapıldığı için flebe ve interfaza ait sorunlar izlenmemektedir.

Düşük ve orta dereceli miyopide PRK ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Ancak yüksek miyopide görülen haze ve miyopik regresyon PRK'nın kullanımını kısıtlamaktadır (30). LASİK ise, flep ve interfaz komplikasyonları, keratektazi ile refraktif cerrahları korkutmaktadır. Bu üç farklı tekniğin birbirine olan üstün ve zayıf yönlerini ortaya çıkaran olay ise, korneanın bu üç farklı yöntemde farklı iyileşme cevapları sergilemesidir.

PRK'da yoğun bir keratosit aktivasyonu olduğu ve bunun sonucunda da fazla miktarda kollajen ve glikozaminoglikan sentezlendiği yapılan hayvan deneyleri ve pek çok in vivo konfokal mikroskopik incelemeler sayesinde ortaya konmuştur (55). LASİK sonrasında, yara iyileşmesinin ise yok denecek kadar az olduğu rapor edilmiştir (69). Konfokal mikroskopik çalışmalar da, LASİK'te anterior ve posterior flepte keratosit yoğunluğunda azalma olduğunu göstermiştir (49,66). LASEK geçiren olgularda, korneanın vermiş olduğu iyileşme cevabında ortaya çıkan keratosit apoptozisinin, myofibroblast transformasyonunun, kondroidin sülfat sentezinin daha az olduğu ise sadece in vitro çalışmalarla gösterilebilmiştir (24,41). PRK ve LASİK'te görülen hücresel cevapları incelemek için pek çok in vivo konfokal

mikroskopik çalışma bulunmasına rağmen, LASEK ile ilgili böyle bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, konfokal mikroskopi ile in vivo olarak miyopisi ve miyopik astigmatizması olan olgularda LASEK sonrasında morfolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

LASER SUBEPİTELİYAL KERATOMİLEUSİS (LASEK)

Fotorefraktif keratektomi (PRK) ve laser in situ keratomileusis (LASİK), refraktif cerrahinin uzun süredir bilinen ve geniş bir kullanım kitlesi bulunan iki temel tekniğidir. LASEK, PRK ve LASİK'in olumlu özelliklerini içeren, dezavantajlarını taşımayan hibrid bir refraktif cerrahi tekniktir. Bu teknikte, kornea epiteli dilue edilmiş alkol uygulamasını takiben bir flep şeklinde kaldırılmakta ve laser ablasyonu sonrasında eski yerine yayılmaktadır.

PRK, düşük ve orta düzeyde miyopi tedavisinde güvenilir ve emniyetli bir tekniktir. Ancak, kornea deepitelizasyonu nedeniyle postoperatif batma, sulanma ve yanma hissi yoğun, iyileşme dönemi uzun olmakta ve haze gelişebilmektedir. Yüksek diyoptrilerin tedavisinde haze ve miyopik regresyon sıklıkla görülmektedir.

LASİK'te laser ablasyonu stromadan kaldırılan flebin gerisine uygulandığı için kornea epiteli ve Bowman tabakası korunmaktadır. Epitelin ve Bowman tabakasının korunması oldukça konforlu ve hızlı bir iyileşme dönemi ve refraktif stabilite sağlamaktadır.

LASEK'in, LASİK'e benzer yönü bir flep (epitel flebi) oluşturulması ve lazer ablasyonu sonrasında flebin stroma üzerine tekrar yayılmasıdır (9). Epitelin varlığı postoperatif inflamasyonun ve batma, sulanma, yanma hissinin düşük düzeyde olmasını sağlamaktadır. Öte yandan, PRK'da olduğu gibi ablasyon kornea yüzeyinde yapıldığı için LASİK'in flep komplikasyonları ve uzun dönemde görme kalitesini azaltan olumsuzlukları engellenebilmektedir.

İlk LASEK uygulaması 1996 yılında Azar tarafından yapılmış ve "alkol destekli flepli PRK" diye adlandırılmıştır (3). Ancak, bu tekniğe popülarite kazandıran ve

LASEK olarak adlandırılan 1999 yılında Camellin olmuştur (8). PRK ve LASİK'in olumlu özelliklerini bir araya getirmesi ve wavefront bazlı eksimer laser uygulamalarının erken dönem sonuçlarının LASİK'e göre yüzey ablasyonu ile daha iyi olması nedeniyle LASEK tekniği refraktif cerrahi camiasında ilgi uyandırmıştır. LASEK tekniğinin mutlak endikasyonu korneanın ince olduğu veya flep travması riski olan gözlerdir. Ancak yüksek miyopi dahil olmak üzere pek çok olguda başarılı sonuçlar elde etmek mümkündür. Bunun yanısıra dar palpebral fissür aralığı, dik ve düz kornealar ve bazal membran distrofisi olan olgularda da uygulanabilmektedir.

Cerrahi Teknik

LASEK tekniği kornea epiteli ile Bowman tabakasının arasındaki bağların seyreltilmiş alkol uygulaması ile kimyasal olarak kırılmasına dayanır. Bu teknik özel aletler gerektirmez, ancak istikrarlı olarak epitel flebi oluşturmak için birkaç cerrahi basamağa dikkat etmek önemlidir (3).

Topikal anestezi, povidon iodin ile göz temizliği ve cerrahi örtmeyi takiben kapak spekülümü yerleştirilir. Kornea periferine daha sonra epitelin geri örtülmesini kolaylaştırmak amacıyla 3 mm çaplı dairesel işaretler konulabilir (3).

Epitel insizyonu 8-9 mm çapında üst 90 derecesi künt LASEK işaretleme trepanı ile yapılır. Trepanın üst 90 derecesinin künt olması epitel flebinin süperiorda bir menteşeye kadar sıyrılmasına olanak sağlar. Bu işlem için basit bir trepan veya keskin olmayan bir işaretleyici kullanılabileceği gibi, bu aşama için üretilmiş 8 mm çaplı, kenarı 270 derece boyunca 80 µm derinliğinde kesen özel bir işaretleme trepanı da vardır (Janach J2900). Trepan santralize olarak bastırılarak epitel insizyonu oluşturulur. Biraz daha büyük çaplı (8.5-10 mm) bir alkol haznesi, Janach

J2905 gibi, santralize olarak yerleştirilir. Bu aşamada bir öncekinde kullanılan işaretleme trepanı da alkol haznesi olarak kullanılabilir. Hazne, birkaç damla %18-20 etanol ile doldurularak 20-30 saniye beklenir. Bu sürenin sonunda alkol bir sponj ile emilir. Alkol haznesi kaldırılır ve kornea yüzeyi dengeli tuz çözeltisi (BSS) ile yıkanır ve sponj ile kurulanır.

Genç erkekler, postmenopozal kadınlar ve kontakt lens kullananlarda epitel flebi oluşturabilmek için daha uzun süre alkol uygulamak gerekebilir. Preoperatif %4 tetrakain uygulamasının flep oluşturmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir (3). Kornea epiteli gevşek bazı olgularda alkol uygulamadan da epitel flebi kaldırılabilirdiği bildirilmiştir. Tekrar LASEK cerrahilerinde epitel flebi oluşturmak aynı teknikle mümkündür.

Epitel insizyonunun kenarı özel bir epitel çapası (Janach J2915A) veya forceps ile kaldırılır. Eğer epitel kenarı kalkmıyorsa 15 saniye ek alkol uygulaması yapılır. Gevşemiş olan epitel özel bir spatül ile (Janach J2910A) veya kuru bir sponj ile süperiordaki menteşeye kadar sıyrılır.

Laser ablasyonu PRK'da olduğu gibi yapılır. Bazı cerrahlar ablasyon sonrasında stromayı ve epitel flebini hidrate etmek amacıyla BSS ile irrigasyon yapmaktadır. Irrigasyonun soğuk BSS ile yapılmasının postoperatif batma, sulanma, yanma hissini, inflamasyonu ve haze gelişimini azaltacağını düşünenler de vardır.

Rycroft kanülünün kenarı ile epitel flebi stroma üzerine yayılır. Epitel flebinin kuruyarak stromaya yapışması için 1-5 dk beklenir. Yumuşak bandaj kontakt lens yerleştirilerek cerrahi tamamlanır. Kontakt lensin soğutulmuş olmasının da soğuk BSS ile irrigasyon gibi postoperatif batma, sulanma, yanma hissini, inflamasyonu ve haze gelişimini azaltacağı düşünülmektedir. Kontakt lens yerleştirmeden önce

topikal antibiyotik, nonsteroid antiinflamatuvar (NSAİ) ve steroid damlatılabilir (3).

Postoperatif Takip

Kontakt lens kornea epiteli kapandıktan sonra çıkartılır. Epitelin kapanması genellikle üçüncü veya dördüncü, nadiren de beşinci günde gerçekleşir. Epitel tam olarak kapanana kadar hastalara topikal antibiyotik, suni gözyaşı ve NSAİ verilir. Epitel kapanmadan topikal steroid kullanımı konusunda bir fikir birliği yoktur. Kontakt lens ile birlikte açık bir epitel yüzeyinin, keratit riskini arttıracaklarını düşünen cerrahlar postoperatif steroid kullanmamaktadır. Ancak, kornea epiteli açık iken de steroid kullanan klinisyenler de vardır (3). Postoperatif batma, sulanma, yanma hissi yoğun olan hastalara oral NSAİ de verilebilir.

Epitel iyileşmesi tamamlandıktan sonra topikal antibiyotik ve NSAİ kesilir. Topikal steroid ve suni gözyaşı damlatmaya 2-8 hafta devam edilir (3).

KONFOKAL MİKROSKOPİ

Göz dokularının yüksek büyütmede mikroskopik incelenmesi yaklaşık 15 yıl öncesine kadar yalnızca ışık mikroskop veya elektron mikroskopla in vitro yapılan anatomik ve fizyolojik çalışmalarla mümkündü. Bu yöntemlerin dezavantajı doku fiksasyonu gerektirmeleri, artifakt oluşturmaları ve ilerleyen bir hastalığın zaman içinde takibini sağlayamamalarıdır.

1980'lerin sonlarında teknolojik ilerlemeler sonucu geliştirilen güçlü konfokal mikroskopik sistemler sayesinde, günümüzde artık yaşayan insan gözünün hücresel incelenmesi mümkündür. Günümüzde konfokal mikroskopik sistemler oftalmolojide, kornea hastalıklarının değerlendirilmesinde, erken tanı konmasında ve tedavinin görüntülenerek takip edilmesinde yerini almıştır.

Konvansiyonel ışık mikroskobunda en sınırlayıcı faktör, incelenen odak çevresindeki yapılardan geri yansıyan, böylece görüntü netliğini bozan ve kontrastı düşüren ışıktır. Bu nedenle biomikroskop gibi cihazlarda faydalı büyütme 40x ve çözünürlük 20μ ile sınırlıdır. Daha fazla büyütme ancak büyük ve bulanık görüntü oluşturur. Kornea, gelen ışığın ancak %1'ini yansıtan hemen hemen saydam bir doku olduğundan, bu dokunun incelenmesi ayrıca daha zordur (11,12,34,74).

Standart bir mikroskoba göre konfokal mikroskop bize iki önemli gelişme sunmaktadır;

- 1) Daha yüksek tranvers çözünürlük,
- 2) Daha yüksek aksiyal çözünürlük.

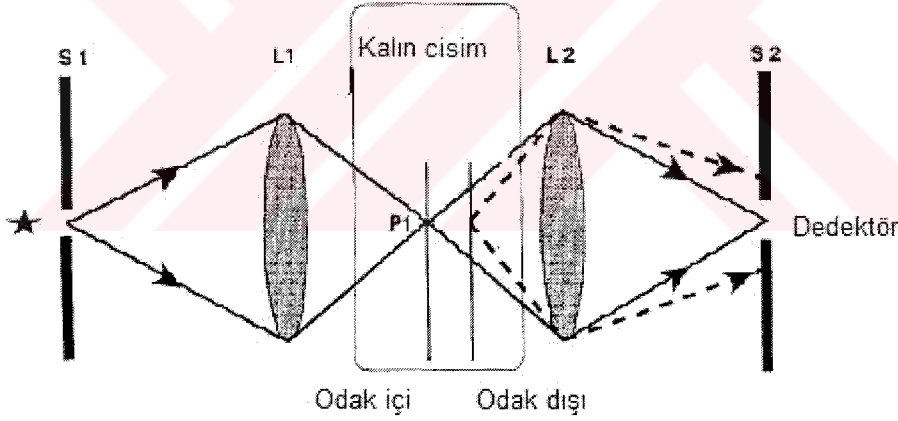
İlk avantajı incelenen örneğin düzleminde daha yüksek bir çözünürlük sağlar, ikincisi ise kalın ve yansıtıcılığı fazla olan bir örneğin optik kesitlerinin incelenmesi için muhteşem bir avantaj sağlar. Bu konfokal mikroskobun can alıcı noktasıdır.

Konfokal mikroskopi prensibini ilk kez 1957'de Minsky tarif etmiştir (48). Konfokal mikroskopta altta yatan fikir, fokal plan dışındaki dokulardan dağılan ışığı en aza indirerek kornea veya diğer dokuların ince katlar halinde optik kesitlerinin alınabilmesidir (11,12,34,74). Minsky, dağılmayı önlemek için hem aydınlatma, hem de inceleme (objektif) sistemlerinin bir gözlem noktası üzerine odaklanması gerektiğini (ortak fokal nokta = konfokal) bildirmiştir (48). Bu şekilde odak-dışı görüntü ekarte edilir, mikroskopun aksiyel (z) çözünürlük $5-10\mu$ lateral (x,y) çözünürlük $1-2\mu$ ' a kadar arttırılabilir. Bu da sistemin objektif lensinin aralığına bağlı olarak 600x büyütmeye olanak verir (34).

Konfokal Mikroskobun Optik Prensipleri

Konfokal mikroskop kornea gibi kalın cisimleri odaklanmış bir noktasal ışıkla

aydınlatan bir mikroskop tipidir. Cisimdeki P_1 noktasını aydınlatmak için kullanılan mikroskop objektifi aynı P_1 noktasından saçılan ve yansıyan ışığı toplamak için kullanılır. Işık geçiren bir objenin P_1 noktasına eşit uzaklıkta yerleştirilen iki mikroskoptan sol taraftaki P_1 noktasını aydınlatmak, sağdaki ise bu aydınlatılan noktayı tespit etmek için kullanılır. Soldaki mikroskopta S_1 noktasında ışık kaynağı mevcut olup bu ışık kaynağından giden ışık L_1 lensi ile P_1 noktasına odaklanır. L_2 adı verilen ikinci lens ise öyle yerleştirilmiştir ki onun odağı da P_1 noktasıdır yani aydınlatılan noktadır ve L_1 ve L_2 lensleri konfokaldır yani odakları aynıdır. L_2 lensi bu aydınlatılan P_1 noktasına ait imajı 2. mikroskobun S_2 noktasında oluşturacaktır yani L_2 'nin aydınlatılan P_1 noktasından topladığı ışık S_2 noktasına gelecek ve detektöre ulaşacaktır (Şekil 1) (7).



Şekil 1: Konfokal mikroskobun optik prensibi

Konfokal mikroskop fokal düzlemde olmayan bir ışığı nasıl ayırt eder?

Gerçekte kalın ve ışığı dağıtan bir objenin bir noktasında L_1 lensi tarafından odaklanan ışık en yoğun olarak odaksal düzlemde (yani fokal düzlemde) görülecektir fakat bu düzlemin her iki tarafında da daha düşük yoğunlukta ışık

olacaktır. Odak dışındaki düzlemlerden saçılan ışık kısmen L_2 lensi tarafından toplanacaktır ve bu ışığın sadece küçük bir kısmı S_2 noktasına erişecektir. Dolayısıyla odak dışı düzlemlerden gelen ışığın sadece küçük bir kısmı detektör tarafından algılanacaktır. Konfokal mikroskoptaki odak dışı noktaların güçlü bir şekilde ayırt edilebilmesi bu fiziksel temele dayanmaktadır.

Klinikte kullanılan konfokal mikroskoplar tek bir mikroskop objektifine sahiptir. Bu tek objektif cismin noktasal aydınlatması ve aynı zamanda aydınlatılan bu noktanın görüntüsünün ışık detektörü tarafından algılanabilmesine yarar. Konfokal kelimesinin kökeni de şudur; ışık kaynağının olduğu S_1 aralığı ve detektörün olduğu S_2 aralığı odaksal düzlemde aynı noktaya odaklanmışlardır yani konfokaldirler (7).

Günümüzde başlıca iki tip konfokal mikroskop sistemi kullanılmaktadır (11,12,34,74).

1. Tandem-scanning konfokal mikroskop (TSCM): hızlı dönen Nipkow disk teknolojisi kullanır.
2. Scanning-slit konfokal mikroskop (SSCM): konjuge hızlı tarayan ince optik slitler kullanır.

Konfokal mikroskopi ile boyamaya veya herhangi bir işleme gerek olmaksızın, yaşayan intakt korneanın değişik derinliklerinden gerçek-zamanlı yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilebilir. Teknik, aynı gözde kornea yara iyileşmesi morfolojisindeki değişikliklerin hücresel seviyede direkt görüntülenmesine olanak verir. Bu sayede hücresel cevaplar ve yapısal değişiklikler klinik gözlemlerle direkt olarak ve zaman içinde sırasıyla korele edilebilir (54,74).

Klinik Kullanımda Gerekli Şartlar

- Baş pozisyonu hastanın işlem sırasında rahat olacağı şekilde ayarlanmalı,
- Elektrik sistemi topraklanmalı,
- Alette hastanın ellerini yakacak sıcak bölgeler olmamalı,
- Işık yoğunluğu standart güvenlik sınırlarını aşmamalı,
- Işık fototoksik olmamalı,
- Işık kaynağı halojen lamba ya da diyot lasere benzer şekilde multidalga boylu kaynak olmalı,
- Zaman çözünürlüğü baş hareketlerinden etkilenmemeli,
- Alan çözünürlüğü korneanın en ince detaylarını görüntüleyebilmeli.

Klinikte Kullanım Şekli

Her iki konfokal mikroskopik sistem de, hastanın oturur pozisyonda alını ve çenesini yerleştirebilmesi için bir destek bölümü, objektif lensin takılmış olduğu cihazın hareketli kafa kısmı, objektif hareketini sağlayan bir kumanda bölümü, ekranı ile birlikte bir bilgisayar sisteminden oluşur. Fototoksisitenin önlenmesi amacıyla iki tip sistemde de, ultraviyole ve infrared filtrelerle inkoheren beyaz ışık kullanılır. Cihazların objektifleri doku penetrasyonu kısa olan yüksek aralıklı immersiyon objektifleri olduğundan ölçüm sırasında topikal anestetik ve ara madde kullanımı gereklidir. Göze bir damla topikal anestetik damlatıldıktan sonra, hasta çenesini ve alnını destek kısmına yerleştirir ve sabit olarak bir hedef ışığa bakar, objektif lens ucuna visköz bir ara madde konulup lens göze doğru ilerletilir. Lens ucu değil visköz ajan korneaya dokunur. Gerçek zamanlı görüntü monitörde izlenerek görüntülenilen alanın x-y eksenini kontrolü yapılır, endotelin tam monitör ekranını kaplayan görüntüsü izlendikten sonra, kumanda 50 mikron kadar ileri itilir ve ölçüm başlatılır.

Her ölçümün 2 dakikadan fazla sürmemesine dikkat edilir. Hassas ya da koopere olamayan hastalarda kayıt süresi tüm kornea katlarından en az 1000 kullanılabilir kesit alasıya kadar uzatılabilir. Lensin korneaya temas etmeden öne-geri hareketlerle tüm kornea katmanlarını tarayarak elde ettiği ve bu sırada monitörde izlenen görüntüler dijitalize edilir ve sistem hafızasına kaydedilir. Bu sayede görüntüler tekrar izlenebilir, seçilebilir ve morfolojik veya kantitatif olarak analiz edilebilir.

Konfokal mikroskobiden önce ve sonra rutin biomikroskopik muayene yapılmalıdır. Hasta alet konusunda bilgilendirilmelidir. Hızlı rutin incelemede 40'lık büyütme en iyi görüntüyü vermektedir. Yine de bu 50'lik büyütmede saptanan detayları kaçırabilir veya 25'lik büyütme kadar geniş görüş sağlamaz.

Sırayla şu işlemler yapılır;

- 1) Kornea ile optik kontakt kurulur ve bazal epitelyel tabakaya fokuslanır, yüzeye paralel görüntüler santralize edilir ve video tape çalıştırılır,
- 2) Superfisyal epitel hücreleri görüntülemek için alet geri çekilir,
- 3) Bazal hücre tabakasına doğru ilerletilir,
- 4) Subepitelyal sinir plexusunu görmek için bowman tabakasına ilerletilir,
- 5) Keratositler ilk defa görüldüğü anda 2. pozisyona geri alınır,
- 6) 2-5 arası prosedür epitelin yeterli kesitleri örneklenene dek tekrarlanır,
- 7) Bowman tabakasından endotele ilerlemede 1 sn'de 0,1-0,5 mm manuel hareketler yapılır,
- 8) Ön kamera önünde endotel ilk defa görüntülendiğinde gerekli ise mikroskop tekrar santralize edilip, descement membranı üzerinde görülen keratosit tabakasına geri dönülür,

- 9) Endotele ve ön kameraya endotelden kesitler alındığından emin olmak için geri dönülür,
- 10) 8. ve 9. prosedür tekrarlanır,
- 11) Epitele 7. prosedürdeki hareketle dönülür,
- 12) 2-11 arası prosedürler en azından 1 kere, gerekli ise daha fazla tekrarlanmalıdır.

Konfokal Mikroskopla Korneanın Görüntülenebilen Tabakaları

- 1) Epitelyal yüzey hücreleri
- 2) Epitelyal wing (intermediate) hücreleri
- 3) Epitelyal bazal hücreler
- 4) Subepitelyal sinir pleksusu / Bowman tabakası
- 5) İlk keratosit tabakası
- 6) Anterior stromal keratositler (Bowman tabakasının altında)
- 7) Intermediate stroma
- 8) Posterior stroma
- 9) Descement membranının hemen önünde posterior keratosit tabakası
- 10) Endotel tabakası

Kornea dışı görüntüler ;

- santral dışı korneal alanlar
- limbus
- konjonktiva' dan alınabilir.

Konfokal Mikroskopi ile Yapılabilecek Diğer İncelemeler

- 1) Slit lamp biomikroskopi (video ile)
- 2) Büyük büyütme ile slit lamp fotoğraflanması
- 3) Non-kontakt teknikle korneal pakimetri
- 4) Korneal topografi
- 5) Korneal endotelyal hücre mikroskobisi
- 6) Optik olarak düşük koherens interferometri ile korneal kalınlık ölçümü

Mikroskobik Görüntülerin Değerlendirilmesi

1) Morfolojik analiz

2) Morfometrik analiz



Bazal epitel hücre boyutu

Korneal sinir paterni

Keratosit dansitesi

Endotel boyutu

Stromadaki birikimlerin sayısı

Işık yoğunluğu (RI=haze miktarı)

Konfokal Mikroskop ile Klinik İnceleme

Normal Kornea Morfolojisi

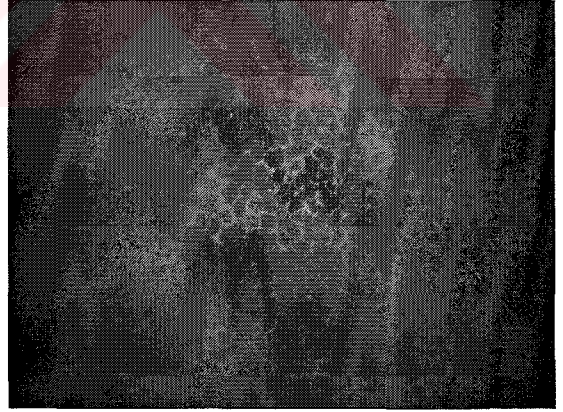
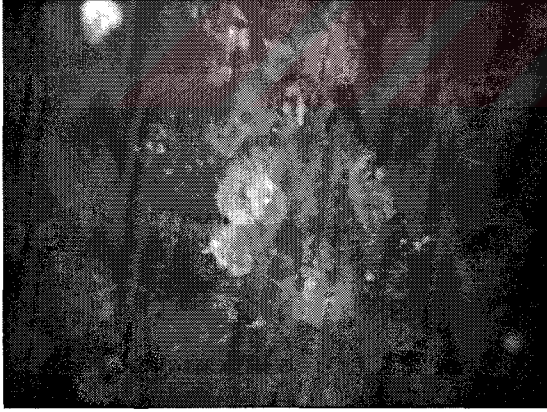
Standart histolojik kesitlerde ve slit lamp biomikroskopide korneanın sagittal görüntüleri alınırken, konfokal mikroskopide kornea yüzeyine paralel kesitler alınmaktadır.

Epitel: Santralde 50 μ kalınlığındadır.

Superfisyal hücreler: Çok köşeli yüksek ve düşük reflektivitesi olan hücreler şeklinde görülür (Resim 1) (7,59).

Intermediate (wing) hücreler: 3 tabakadan oluşur. Nükleusun az reflektif olması nedeniyle zor görünürler. En alt tabakada nükleus reflektif olmamasına rağmen özellikle hipoksik ya da ödemli kornealarda hücre sınırları reflektif olabilmektedir.

Bazal epitelyal hücreler: Bu hücreler bazal epitel yüzeyinde kayabilmekte ve proliferasyon olmaktadır. Wing hücrelerine de differansiyasyon olmaktadır. Epitelin yenilenme işleminde bazal epitel hücreleri bazal laminadan ayrılmakta ve wing hücrelerine differansiyasyon olmaktadır. Wing hücreleri de öne doğru yer değiştirmektedir. Bunlar yüzeyden deskuame olan superfisyal epitel hücrelerine dönüşmektedir. Konfokal mikroskop ile bazal hücreler reflektif poligonal hücre sınırları ile birlikte koyu, reflektif olmayan hücre gövdeleri sayesinde net bir şekilde görüntülenebilmektedir (Resim 2) (7,59).



Resim 1: Normal superfisyal epitel hücreleri **Resim 2:** Bazal epitelyal hücreler

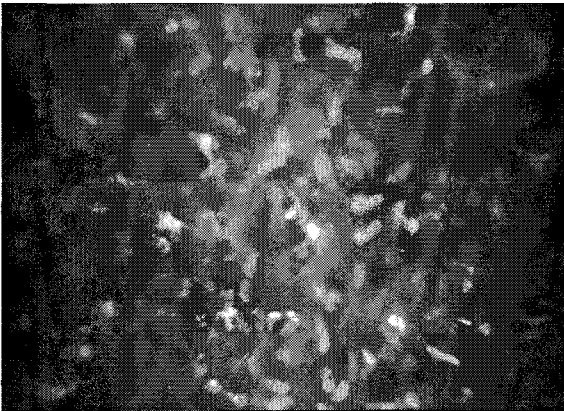
Bowman tabakası: 10-16 μ kalınlığındadır. Epiteli stromadan ayırmakta olup kendini delip geçen sinirler dışında aselülerdir. Epitelin bazal laminası bu tabaka üzerine yerleşmiştir. Konfokal mikroskopta nonreflektif bir tabaka üzerinde subepitelyal sinirlerin, önde bazal hücrelerin ve arkada ilk keratosit tabakasının kontrastlanması ile ayırte edilir. Bu keratosit tabakasındaki hücrelerin çekirdekleri diğer bölgelerdekilerden farklı izlenmektedir (7,59).

Stroma: 450 μ kalınlığındadır. Geniş sinirler, stromal keratositler ve kollajen fibrillerinin ortogonal tabakalarını içermektedir. Stromal keratositlerin şekilleri ve dizilişleri bulundukları lokalizasyona spesifiktir.

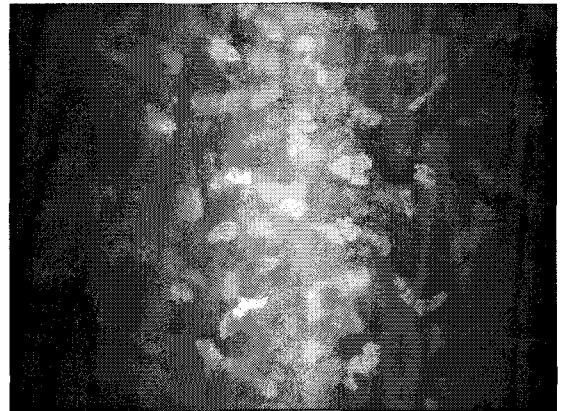
İlk keratosit tabakası; bowman tabakasının hemen altında olup çok açılı çekirdekleri ile farklılık göstermektedirler (7,59).

Anterior ve mid-stroma; konfokal mikroskopta oval ya da yuvarlak arasına girintiler yapan çekirdekler görülür. Hücre gövdeleri, keratosit çıkıntıları, stromal kollajen sağlıklı kornealarda görülmez. Kollajen fibrilleri arasında görülebilen boyutta olan dallanan sinir fibrilleri oldukça yüksek reflektivite ile görülebilir (Resim 3) (7,59).

Posterior stroma; ince, uzun çekirdekli keratositlerle karakterizedir (Resim 4).



Resim 3: Anterior stromal keratosit çekirdekleri



Resim 4: Posterior stromal keratosit çekirdekleri

Descement membranı: 15-20 μ kalınlığındadır. Bowman gibi reflektivitesi düşük olup desme önündeki keratositler ve endotelin kontrastlanmasına neden olur (7,59).

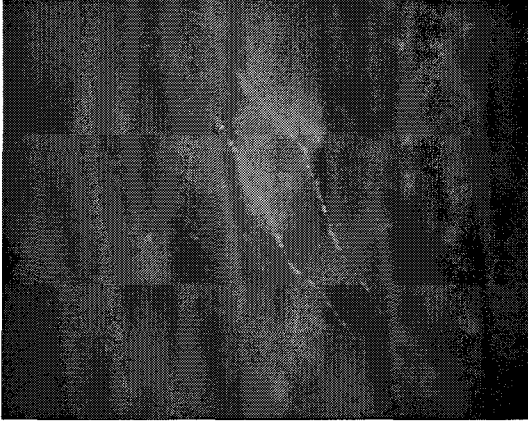
Endotel: Normal kornealarda bal peteği şeklindeki görünümü ile kolaylıkla fark edilebilmektedir. Özellikle düşük sayıda endotel hücresi olduğu zaman dar bir intersellüler mesafeyi işaret edecek şekilde endotelial intersellüler sınırlar çift kontur gibi görünmektedir. Bazen endotel hücreleri yüksek reflektivite veren intraselüler depozit olan fagosit edilmiş pigment granülleri içerebilir (Resim 5) (7,59).



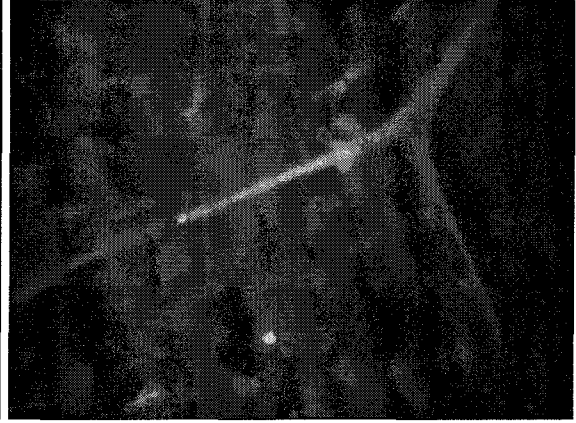
Resim 5: Endotel hücreleri

Korneal sinirler: Büyük sinirler ön stromada yerleşmişlerdir. Bunlar bowman tabakasının altında subepitelyal sinir plexusunu oluştururlar. Bowman tabakasından pek çok sinir bu tabakayı perfore ederek geçmektedir. Her bir perforasyon noktasında, hemen bazal membranın önünde bazal epitelyal sinir plexusunu oluşturmak üzere dallanırlar. Bu plexustan ayrılan dallar ise bazal epitelyal ve wing hücrelerinin arasına dağılır. Korneal epitelde dallanan sinirler hemen superfisyal hücrelerin altında gözlenebilen serbest sinir uçları şeklinde sonlanırlar. Bunlar ışık mikroskobu ile güçlükle seçilir. Büyük stromal sinir gövdeleri, subepitelyal sinir plexusu ve perforasyon noktaları haftalarca durağan görünüm verir. Bu nedenledir ki: subepitelyal sinir plexusları ve perforasyon noktaları korneanın, bazal epitel hücrelerinin ve wing hücrelerinin aynı bölgelerini tekrar lokalize etmede kullanılır.

Bunun tam tersi olarak, bazal epitelyal sinir pleksusunun dalları her gün 10–20µ arasında yer değiştirmektedir (Resim 6-7) (7,59).



Resim 6: Subepitelyal sinirler



Resim 7: Midstromal sinirler

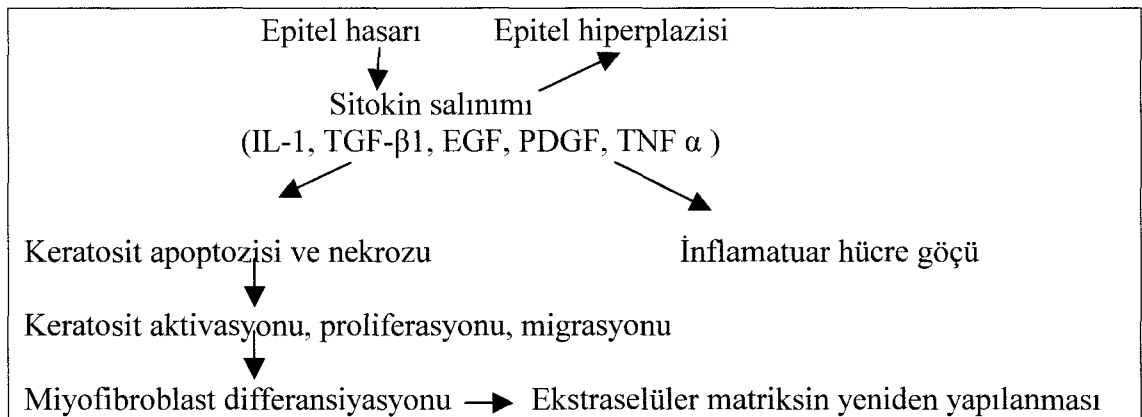
Konfokal mikroskoplarda kornea katmanlarının koronal kesitlerinin incelenebilmesinin yanı sıra, aksiyel ekseninde değişik kornea dokularının ışığı farklı yoğunlukta yansıtma özelliğine dayanarak geliştirilmiş yazılımlar sayesinde derinlik-yoğunluk eğrileri olan z-scan eğrileri de izlenebilir. Bu eğriler üzerinde cursor bir noktada tutulduğunda bu lokalizasyondaki kornea görüntüsü interaktif olarak incelenebilir veya eğri üzerinde herhangi iki nokta arasındaki mesafe ölçülebilir (11,12,34,74). TSCM üzerinde 1997'de geliştirilmiş 'confocal microscopy through focusing' (CMTF) tekniği 'in vivo' konfokal mikroskopi sistemleri içinde kornea ve kornea katmanlarının kalınlığının ölçümünde tekrarlanabilirliği en iyi olan sistemdir. Bu sistemde objektif lensin fokal planı korneayı 5-8 saniye gibi çok kısa sürelerde tarayarak 400-500 adet iki boyutlu görüntü oluşturur. Dijitalize edilip kaydedilen her görüntünün santralindeki yansıtıcılık piksel yoğunluğu olarak saptanıp derinliğe karşı kaydedilerek bir 'yoğunluk-derinlik' z-eğrisi oluşturulur. Bu eğri üzerindeki belirgin pikler, yüksek çözünürlüklü görüntülerde, yüzeyel epitel,

subepitelyal sinir ağı, birinci keratosit katmanı, endotel gibi anatomik yapılara denk gelir. Bu sayede diğer konfokal mikroskopi sistemlerinde kaydedilen iki görüntü arası aksiyel mesafe 9-15 μ iken, CMTF sisteminde bu mesafe 1.5-2.0 μ 'a kadar inebilir. Bu kadar kısa sürede tarama yapıldığında ölçümler, solunum gibi aksiyel kaymalardan da en az şekilde etkilenmiş olur. Dolayısıyla, daha güvenilir ve kesin kornea ve kornea katmanları kalınlık ölçümleri alınabilir (54-57,74). Bu teknikle, kornea reflektivitesinin ya da korneadan geri yansıyan ışığın kantifikasyonu da mümkündür (55,56,74). Piksel-yoğunluk profilinde haze piki altındaki alan, haze kalınlığı (pik genişliği) ve haze yoğunluğu (pik yüksekliği) ile ilgilidir ve ' μ m x piksel' yoğunluğu şeklinde ifade edilir. CMTF haze tahmini ile biomikroskopik subjektif haze evrelendirmesi arasında belirgin ilişki bildirilmiştir. CMTF ile haze saptanan bölgede, eş zamanlı olarak, haze bölgesindeki anormal ışık saçıcı yapıların yüksek rezolüsyonlu görüntüsünün izlenmesi de mümkündür. Elde edilen görüntülerden, özel yazılımlarla, 3 boyutlu kornea görüntü rekonstrüksiyonu da yapılabilir (11,12,34,74). Günümüzde mevcut konfokal mikroskopi sistemleri, birçok kornea dejenerasyon veya distrofinin erken tanı ve karakterizasyonunda, keratopati ve keratitlerde ayırıcı tanıda kullanıldığı gibi, bu sistemlerin en önemli kullanım alanlarından birisi de, refraktif cerrahi sonrası kornea yara iyileşmesinin incelenmesi ve takibinin yapılmasıdır.

REFRAKTİF CERRAHİDE KORNEA YARA İYİLEŞMESİ

Korneal yara iyileşmesi pek çok sitokin, büyüme faktörü ve kemokinlerin rolünün olduğu karışık bir işlemdir (32,83). Epitel-stromal-nöral-lakrimal gland ve immün hücreler bu cevabı belirlemektedir.

Refraktif cerrahi ile ortaya çıkan epitel hasarı, kornea yara iyileşmesini tetikleyen temel faktördür. Epitel hasarını takiben, kornea epitelinden ve epitel bazal membranından interlekin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktör (TNF) α , epidermal growth faktör (EGF), platelet derivating growth faktör (PDGF), kemik morfojenik protein 2 ve 4 (BMP) gibi sitokinler salınmaktadır (35,50-52,76,84,85). Bu sitokinlere verilen cevap döngüsü, stromada önemli değişikliklere yol açmaktadır (Şekil 2). Bu cevaplar, epitel hiperplazisi, keratosit apoptozisi ve nekrozu, keratosit aktivasyonu, migrasyonu ve myofibroblast transformasyonu ve inflamatuvar hücre göçüdür. Bu erken değişiklikler ise, epitel iyileşmesi, stromanın yeniden şekillenmesi, değişmiş ekstraselüler matriks üretimi, ve yara kontraksiyonuna yol açmaktadır (29,86,87). Tüm bu yara iyileşme süreçleri regresyon, haze, overkoreksiyon, underkoreksiyon ve refraktif instabilite gibi klinik sorunlara yol açmaktadır.



Şekil 2: Refraktif cerrahi sonrasında kornea yara iyileşme cevabı

LASEK’te Kornea Yara İyileşme Cevabı

LASEK’te epitel flebini kaldırmak için seyreltilmiş etanol ya da mekanik ayırma kullanılır. Mümkün olduğu kadar az epitel hücresinin ölmesi ve bazal membranın korunması epitelden salınan sitokin miktarını azaltıp yara iyileşmesi cevabını azaltacaktır. LASEK’te yara iyileşmesi cevabına ait bilgilerimiz yapılan deneysel hayvan çalışmalarına dayanmaktadır. Beyaz legorn civcivi modelinde, %20 konsantrasyonunda alkolün 30 saniye uygulanmasının civciv gözünde flep oluşturmak için yeterli olduğu gösterilmiştir. Bazal membran hasarının ve epitel hücresi apoptozisinin alkol uygulama süresine paralel olarak arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, LASEK sonrasında epitel flebinin keratosit apoptozisini minimal düzeyde tuttuğu ve bu düzeyin santral zonda perifer (flep kenarı) göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bunun, salgılanan sitokinlerin yalnızca flep kenarına ulaşabilmesine ve dolayısıyla epitel-stroma ilişkisinin flep kenarına sınırlanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (41).

Keratosit apoptozisinin, kornea yüzeyi ablasyonu sonrasında yara iyileşmesinin tetikleyici faktörü olduğu bilinmektedir. Yüksek myopik değerlerde LASEK’de keratosit apoptozisinin, myofibroblast transformasyonunun, kondroidin sülfat sentezinin daha az olduğu yapılan tavşan deneylerinde gösterilmiştir (24,38). Keratosit apoptozisinin azaltılmasının yara iyileşmesini sınırlandırarak LASEK sonrasında haze ve miyopik regresyon oranlarının PRK’dan düşük olmasını sağladığı düşünülmektedir. Epitel flebinin mekanik bir bariyer gibi davranarak, korneanın uğradığı mekanik travmayı azalttığı ve travmanın oluşturacağı yara iyileşmesini de azaltacağı belirtilmiştir. Ayrıca, mekanik travmanın azaltılmasının korneolakrimal refleksi azaltarak lakrimal bezden daha az sitokin salgılanmasını sağladığı

düşünülmüştür (41). Bu görüşü destekleyen bir başka çalışmada, LASEK sonrasında gözyaşında TGF-alfa düzeyi PRK'ya göre daha düşük bulunmuştur (42).

LASEK sonrasında epitel flebinin bu faydaları sağlayabilmesi canlı kalmasına bağlıdır. Epitel flebinin canlı kalması için 2 önemli nokta vardır. Birincisi, epitel flebinin ayrılma düzeyidir. Epitel flebinin bütünlüğünü koruyabilmesi için bazal membran desteği önemlidir. Espana, insan gözünde ayrılma düzeyinin, bazal membranın içinde lamina densa ve lamina lusida arasında olduğunu immünflöresan boyama ile göstermiştir (23). Elektron mikroskopi çalışmalarının sonuçlarına göre ise insan gözünde epitel flebinin ayrılma düzeyi bazal membranın içinde veya bazal membran ile Bowman tabakası arasında olmakta ve epitel adezyonunu sağlayan yapılar (hemidesmozomlar ve desmozomlar) korunmaktadır (3). Alkol yerine kornea epitel flebinin mekanik olarak oluşturulduğu gözlerde ayrılma düzeyinin bazal membran ile Bowman tabakası arasında ve daha düzgün bir şekilde olduğu ve bunun epitele daha iyi bazal destek sağlayabileceği öne sürülmüştür (62). Epitel flebinin canlı kalması açısından önemli diğer konu alkolün konsantrasyonu ve uygulama süresidir. Alkol konsantrasyonu ve uygulama süresinin artmasıyla daha az epitel hücrelerinin canlı kalabildiği gösterilmiştir (13,26,41). Yüzde yirmi konsantrasyonunda alkolün 15 saniye uygulanmasından hemen sonra insan gözünde epitel hücrelerinin yalnızca %8'i ölürken, 30 saniyede %21'i, 45 saniyede %54'ü, 60 saniyede ise %97'si ölmektedir (26). İnsan gözü kornea epiteli hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada alkol konsantrasyonu %25 ve uygulama süresi 30 saniye üzerinde olduğunda hücre ölümünde önemli artış olduğu gösterilmiştir (13). Tavşan gözünde kornea epiteli hücre ödeminin, mikrovillus ve interselüler bağ hasarının alkol uygulama süresine paralel olarak arttığı gösterilmiştir. Cıvıv gözünde de

epitel hücre apoptozisinin ve bazal membran hasarının süreye paralel olarak arttığı bildirilmiştir (41).

LASEK sonrasında yara iyileşmesi ile ilgili tüm bu in vitro çalışmalara ışık tutacak in vivo bir çalışma bulunmamaktadır.

KONFOKAL MİKROSKOPİK OLARAK REFRAKTİF CERRAHİDE

KORNEA YARA İYİLEŞMESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fotorefraktif keratektomi (PRK) ve Laser in-situ keratomileusis (LASİK) refraktif cerrahinin bilinen en eski ve en sık kullanılan yöntemleridir. Bu tekniklerle alınan sonuçlar oldukça yüzgüldürücü olmasına rağmen, başarıyı kısıtlayan üç konuya halen çözüm bulunamamaktadır, bunlar; 1) elde edilen düzeltmenin değişkenliği, 2) refraktif regresyon ve 3) haze (kornea bulanıklığı)'dır.

1) Gerek PRK, gerek LASİK sonrası elde edilen düzeltme kişiden kişiye çok değişken olabilmektedir. Çeşitli çalışmalarda, cerrahi sonrası birinci yılda, refraktif sonuçların, düşük miyoplarda %70-100, orta-dereceli miyoplarda %40-85, yüksek miyoplarda ise %20-67 oranında tahmin edilenin ± 1.00 D'si arasında olduğu bildirilmiştir. Bu değişkenlik için öne sürülen başlıca iki neden, her olguda cerrahi sırasında alınan doku miktarının tam olarak kontrol edilememesi ve yine her olguda ameliyat sonrası yara iyileşmesi cevabının kesin kontrolünün mümkün olmamasıdır(54).

2) PRK ve LASİK sonrası elde edilen düzeltme, zaman içinde kısmen, hatta kimi zaman tamamen kaybolabilmektedir. Başta yüksek refraksiyon kusurları olmak üzere, miyopik PRK veya LASİK'ten sonra refraksiyonda 0.5 ile 3.0 D arasında miyopik regresyon tipiktir (54,55). Bu nedenle tüm excimer laser algoritmeleri, tedavinin etkisinin zamanla azalacağı düşünülerek overkoreksiyon faktörleri ile

kurulur. Ancak, bu düzeltme faktörleri kornea katmanlarında yara iyileşmesinin direkt ölçümüne göre değil, klinik deneme sonuçlarında elde edilen ortalama refraktif sonuçlardan ampirik olarak uyarlanarak geliştirilir. Bu nedenle günümüzde fotoablasyon sonrası hangi olgunun aşırı refraktif değişiklikler göstereceğini tahmin etmenin bir yolu yoktur (54). Uzun dönem takipli çalışmalarda PRK sonrası 3-5 yıla kadar, LASİK sonrası ise 2 yıla kadar regresyonun devam ettiği gösterilmiştir (54,55). Sıklığına ve klinik önemine rağmen, regresyonun patojenik mekanizmasını araştıran çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu konudaki bilgilerimiz yakın zamana kadar özellikle in vitro hayvan çalışmaları ile sınırlı kalmıştır. Güvenilirliği oldukça şüpheli olan bu çalışmaların sonucunda, hem epitelyal, hem de stromal yara iyileşmesinin, fotoablasyon yapılan alana yeni doku ilavesi ile regresyona neden olabileceği düşünülmüşse de, bu iki komponentin rölatif etkilerinin derecesi anlaşılamamıştır.

3) Fotorefraktif keratektomi sonrası, ablasyon bölgesinde kornea saydamlığı kısmen kaybolur ve diffüz, retiküler bir subepitelyal haze gelişir. Biyomikroskopide haze birkaç hafta içinde belirginleşir, 3-6 ayda maksimum düzeye erişir ve 9-12 ayda düzelir. İyileşme evresinde haze, görme fonksiyonunu bozar ve kontrast duyarlılığı düşürür. Ancak, daha önemlisi, özellikle yüksek miyop olguların yaklaşık %3-5'i gibi bir bölümünde yoğun haze kalıcı olabilir. Günümüzde hangi olguda bu şekilde bir aşırı yara iyileşmesi cevabının gelişeceğini tahmin etmek imkansızdır. Haze gelişimi in vitro çalışmalarda stromal yara iyileşmesine bağlanmaya çalışılmışsa da haze'in gerçek nedeni ve lokalizasyonu yakın zamanda yapılan in vivo konfokal mikroskop çalışmalarına kadar bilinmemekte, objektif olarak kantifiye edilememekteydi (54-56,74).

Yukarıda belirtilen üç ana problemin altında yatan kesin mekanizmalar bilinmemekle birlikte, kornea yara iyileşmesindeki kişisel değişikliklerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir (17,27,70). O halde, kornea lazer refraktif cerrahisi sonrası gelişebilecek problemlere terapötik stratejiler getirilebilmesi için, yara iyileşmesi sırasında hücre biyolojisinde gelişen olayların daha iyi anlaşılması gereklidir. Konfokal mikroskopi, 3 veya 4 boyutlu (x,y,z,zaman) olarak refraktif cerrahi sonrası yara iyileşmesinin dinamik incelenmesi için idealdir.

Fotorefraktif Keratektomi (PRK)

Fotorefraktif keratektomide epitel, subepitelyal sinirler, Bowman tabakası ve çeşitli derinlikte kornea stroması excimer lazerle alınarak kornea ön yüzeyi refraksiyon kusurlarını düzeltmek amacıyla şekillendirilir.

Histopatolojik Çalışmalar: Fotorefraktif keratektomi sonrası yara iyileşmesi hakkındaki bilgilerimizin çoğu maymun ve tavşan kornealarında yapılan histopatolojik çalışmalara dayalıdır (10,16,25,28,61,70,73). Bu in vitro histolojik çalışmalara göre; tavşan kornealarında keratektomiden 3 saat sonra ön stromada büzüşmüş keratosit çekirdekleri görülür. Birinci günde bu bölgede piknotik, fragmente çekirdekler izlenir, inflamatuvar hücre ise görülmez. Epitel hızla iyileşir ancak kısa de-epitelize evrede, ön stromada, massif keratosit kaybını gösteren yaklaşık 40 μ 'luk bir aselüler zon oluşur. Epitel adezyon kompleksleri tavşanda 1-2 ay, maymunda 3 ayda gelişir. PRK uygulanan gözlerde, ablasyon bölgesi üzerinde iyileşmiş epitel hiperplazik olarak izlenir. Birkaç hafta içinde ablasyon bölgesinde dilate endoplasmik retikulumu olan aktive iğsi fibroblastik keratositler, bu bölgede çoğalırlar. Yine bu bölgede, hem tavşan hem maymun modellerinde yoğun,

disorganize, çeşitli çaplarda yeni kollajen ve yoğun, büyük proteoglikan birikimi olur. Ramirez-Florez ve Maurice, (67) yaptıkları bir çalışmada haze yoğunluğu ile fibroblast yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bildirirken, haze yoğunluğu ve yeni depolanmış, bağ dokusu kalınlığı arasında ilişki saptayamamışlardır. Tavşan çalışmalarında PRK'dan hemen sonra hiç epitelyal ya da subepitelyal sinir saptanamazken, epitelin 3 ay içinde tam olarak tekrar innerve olabildiği saptanmış, stromal sinirlerin ise bu dönemde halen anormal yapıda olduğu izlenmiştir. Bu çalışmalara göre, korneada şeffaflık kaybı ve retiküler haze'in nedeninin, anormal kompozisyon ve organizasyonlu yeni stromal ekstraselüler matriks depolanması; yüzeyel stromada vaküol veya membranöz inklüzyonların oluşumu; fokal ön stromal ödem, ablasyon yapılan stroma yüzeyinin düzensizliği ve ön stromada artmış aktif keratosit ve fibroblast yoğunluğu olabileceği düşünülmüştür (10,16, 25,28,57,61,67,70,73).

İnsanda bu konuyla ilgili yapılmış histopatolojik çalışmalar doğal olarak çok sınırlı, hatta imkânsızdır. İlk kez yüzey ablasyonundan sonra 12 gün içinde enükleee edilen, kör gözlerden alınmış 3 insan korneasını inceleyen L'Esperance ve arkadaşları (43) ablasyon zonu yakınında stromada hemen hemen hiçbir değişiklik saptayamamışlardır. Bunun dışındaki çalışmalar genellikle fototerapötik keratektomi (PTK) sonrası penetran karatoplasti ile alınmış kornealarla yapılmış çalışmalar olup, bu nedenle altta yatan kornea patolojisi veya başarısız PTK nedeniyle güvenilirlikleri tam değildir. Wu ve arkadaşları, (88) PTK'dan 6-15 ay sonra elde ettikleri 4 korneada ablasyon kenarında kesik kollajen liflerinin halen mevcut olduğunu, 10-15 μ derinlikte normal kollajen lamellar yapısının bozulmuş olduğunu ve bu bölgede aktif keratositlerin varlığını göstermiş, epitel bazal

membran komplekslerini ise 15. ayda dahi ancak %35 oranında tamir edilebildiğini bildirmişlerdir. Binder ve arkadaşları da (5), 12 korneada PTK'dan 5-15 ay sonra, ablasyon alanında epitelde fokal hiperplazi alanlarının ve anormal bazal epitel bağlantılarının olduğunu, subepitelyal stromal kollajen lamellerin disorganize olduğunu ve anormal, yeni sentezlenmiş, ince bir kollajen lif tabakasının mevcut olduğunu saptamışlardır. Dolayısıyla, genel anlamda, insan çalışmaları sonuçlarının, daha geniş olan hayvan histopatolojik çalışmaları sonuçlarına oldukça benzerlik gösterdiği düşünülebilir.

Konfokal mikroskopi: Möller-Pedersen ve arkadaşları (57) 12 tavşan korneası ile yaptıkları konfokal mikroskopi çalışmasında, önceden bildirilmiş histopatolojik çalışmaları destekleyen sonuçlar elde etmenin yanı sıra, çok önemli bazı yeni saptamalarda bulunmuşlardır. Altı milimetre çaplı, 9.0 D'lik PRK düzeltmesi sonrası 6 ay takipte yazarların bulguları özetle aşağıdaki gibidir:

Ameliyat sonrası 1. haftada epitelizasyon tamamlanır. Yüzeyel epitel hücreleri çok küçük izlenir, basal lamina ise izlenmez. Bu dönemde kalan stromada $86 \pm 24 \mu$ 'luk ciddi keratosit kaybını gösteren bir aselüler alan görülür. Bu alanda nadiren parçalanmış, piknotik keratosit çekirdekleri olduğu düşünülen hiperreflektif oluşumlar izlenebilir. Birinci ve 3. hafta arasında epitel normal morfolojisine ve kalınlığına tekrar erişir, alttaki keratositler aktifleşir, yara yerine doğru göçeder ve burada çoğalırlar. Bu fibroblastlar ablasyon alanında yaklaşık 50μ derinliğe kadar artmış ışık yansımalarına neden olur. Artmış yansıma, 3. haftada en üst düzeye erişir ve 6. aya kadar doğrusal olarak azalır. Üçüncü haftadan itibaren ön stromada normal reflektivitede keratositler görülmeye başlar. PRK' dan 2 hafta sonra, kornea ödemi geçer ve gerçek ablasyon kalınlığı (maksimum stroma incilmesi) $118 \pm 8 \mu$ olarak

ölçülebilir. İkinci haftadan itibaren ise stroma kalınlaşmaya devam eder ve PRK'dan 6 ay sonra ameliyat öncesi kalınlığının %98'ine erişir. Bu çalışmada, ameliyat öncesi kalınlığına 2 haftada erişen santral kornea epitelinde belirgin hiperplazi hiçbir kontrolde saptanmamıştır. Yedinci haftadan itibaren, rejenere olan subepitelyal sinirler bazı alanlarda görülmeye başlar.

Sonuç olarak; in vivo konfokal mikroskopi ile tavşan korneaları daha önceki çalışmalarda da görüldüğü gibi hızlı ve şiddetli bir yara iyileşmesi göstermiş, başta ki ablasyon etkisi yaklaşık tamamen regresyona uğramıştır. Bu regresyonun, inatçı epitel hiperplazisine değil, başlıca stromal kalınlaşmaya bağlı olduğu gösterilmiştir. Tavşanda haze gelişiminin başlıca biyolojik açıklaması, aktif keratositlerden ışık refleksiyonu olduğu saptanmıştır. Ablasyona bağlı stromal yüzey düzensizliğinin bir miktar etkisinin olabilirken, yeni ekstraselüler matriks depolanmasının etkisinin (ilk 3 haftada yaklaşık 20µ) ise çok az olduğu görülmüştür. Ameliyattan sonra 4. haftadan itibaren ekstraselüler matriks depolanmasının en yüksek seviyede olduğu (yaklaşık 90µ), ancak bu dönemde reflektivite ve haze'in artmadığı, aksine azaldığı bildirilmiştir. Üçüncü haftadan itibaren reflektivitenin azalmaya başlamasının nedeni, ablasyona uğramış stroma yüzeyinde yeni matriks depolanması ile tekrar modellenme ve normal sessiz keratositlerin tekrar ortaya çıkmasıdır. Yine de, çalışma 6. ayda sonlandırıldığında, stroma reflektivitesi normalin 6 katı olarak saptanmıştır.

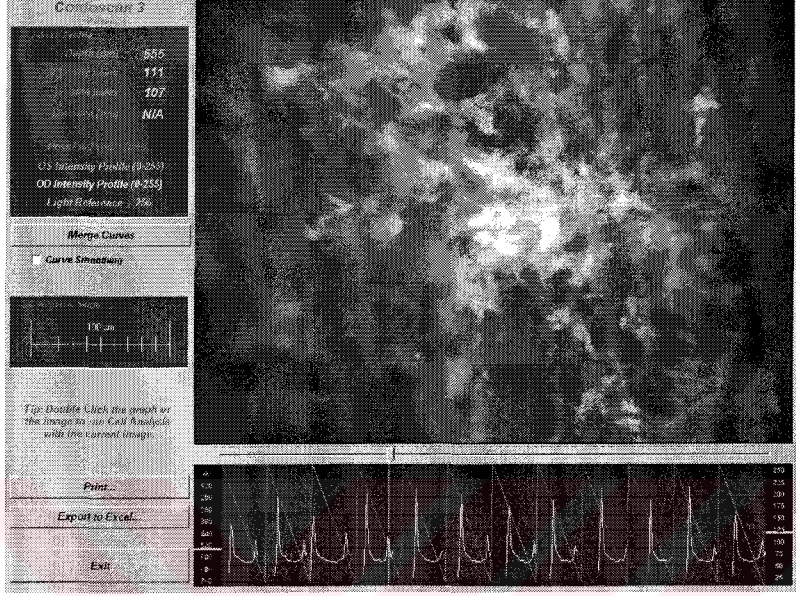
İnsanda yapılan konfokal mikroskopi çalışmalarında, PRK sonrası ilk birkaç gün içinde korneada morfolojisinde oluşan değişiklikler epitel defektinin mevcudiyeti, stroma ödemi ve genellikle bir bandaj kontakt lensin uygulanması nedeniyle çok az anlaşılabilmektedir. Yine bu dönemde, yalnız epitel değil, subepitelyal sinir pleksusu da

gelişmemiştir (6,18,74). Yine de Erie ve arkadaşları (18), PRK sonrası 5. günde ön stromanın %5-10'luk bölümünde keratosit yoğunluğunda belirgin azalma olduğunu göstermiş ve bu azalmanın apoptozla ilgili olabileceğine işaret etmişlerdir. Ameliyat sonrası 7. günde epitel hemen hemen normal görünümüne kavuşur (47,54). Möller-Pederson ve arkadaşlarının (54) düşük-orta miyopili 17 olguda (-2.8 ile -9.1 D) 6 mm optik zonda yaptıkları çalışmada, epitel kalınlığını PRK sonrası 1. ayda %6.6 oranında azalmış olarak saptarlarken, aynı yazarlar uzun takipte bu olgularda epitel kalınlığının giderek artarak, 3. ayda ameliyat öncesi düzeye eriştiğini ve 12. aya kadar bu kalınlıkta kaldığını bildirmişlerdir (55). Bu çalışmada yazarlar, epitelin kalınlaşması ile refraktif regresyon arasında herhangi bir ilişki saptamamışlardır (55). Ameliyat sonrası 1. ayda %53 olguda ince subepitelyal sinir lifleri izlenmeye başlamış, 3. ayda tüm olgularda yer yer ince sinir lifleri izlenirken, 12. ayın sonunda %47 olguda sinirlerin ameliyat öncesi morfolojilerini kazandığı gözlenmiştir (54,55). Erie ve arkadaşları (19) PRK reoperasyonu geçirmiş bir olgu gözünde, reoperasyondan 1 yıl sonra kornea hassasiyeti normal iken, in vivo konfokal mikroskopide düzensiz, aberran stromal sinirler saptamışlardır.

Konfokal mikroskopla, insan korneasında en erken keratosit aktivasyonu ve ekstraselüler matriks depolanması 7. günde görülebilmektedir (47). Birinci ayın sonunda, ön stromada normalden yüksek reflektiviteli ve daha fazla sayıda keratosit çekirdekleri izlenir. Altıncı ayın sonunda keratosit reflektivitesi azalmıştır, ancak yoğunluk halen yüksektir. Birinci yılın sonunda ise keratositler normal sayıda ve reflektivitede izlenir (7,15,53,55).

Z eğrisinde izlenen 4 pik, ameliyat öncesi yüzeyel epitel, subepitelyal sinir pleksusu, ön keratositler ve endotele bağlı iken, ameliyat sonrası yüzeyel epitel, rejenere

olmakta olan subepitelyal sinir lifleri veya subepitelyal haze alanındaki (Resim 8) ilk odaklanabilen görüntü ve endotele bağlıdır .



Resim 8: Z-eğrisi üzerinde postoperatif subepitelyal haze alanının görünümü

Ameliyat sonrası haze pikinin altındaki alanın hesaplanması ile haze ' $\mu\text{m} \times \text{piksel}$ yoğunluğu' olarak kantifiye edilebilmiştir. Buna göre konfokal 'haze tahmini' ile klinik 'haze evrelendirmesi' arasında anlamlı, korelasyon gözlenmiş, ayrıca klinik olarak haze saptanamayan olgular dahil tüm olgularda PRK sonrası 1. ayda yüksek subepitelyal reflektivite saptanmıştır (6,54-56). Konfokal mikroskopi ile haze tahmini'nin çok hassas bir ölçüm olduğu sonucuna varılmıştır. Üçüncü ayda pik düzeylere erişen haze'in, 12. aya kadar azalsa da ameliyat öncesi değerlerin 4 katı kadar bir düzeye inebildiği bildirilmiştir. Haze bölgesinde, ön stromada, 100μ 'a kadar inen bir alanda yüksek reflektiviteli çekirdekleri ve uzantılarıyla artmış sayıda aktif ön stromal keratositler izlenmiş, tıpkı tavşan kornealarında olduğu gibi haze'in

ekstraselüler matriks depolanması değil hücre bazlı refleksiyonlar nedeniyle olduğu anlaşılmıştır (6,54-56). Birinci ay sonunda kornea incelmesinin, elde edilen refraktif değişikliklerle direkt ilişkili olduğu ve teorik PRK algoritminde bildiğimiz gibi stroma ablasyonunun doğrusal olarak dioptri başına 10-15µ'luk bir incelmeye neden olduğu gösterilmiş, 1. aydan 12. aya kadar stromada ortalama 6.5µ'luk yeniden büyüme saptanmış ve bu büyümenin refraksiyondaki değişiklikler ve regresyonla korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (54-56). Stroma kalınlaşmasının gerçek ablasyon derinliği ile orantılı olarak arttığı gösterilmiştir ki, bu, yüksek refraktif düzeltme uygulanan olgularda refraktif dengesizlik ve regresyonun daha fazla oluşunu açıklamaktadır. Epitel kalınlığındaki hafif artış, refraktif bir değişiklik ile ilişkili olmadığından, PRK sonrası refraktif regresyonda epitelin rolünün olmadığı sonucuna varılmıştır (54-56). Birinci ve 12. aylar arasında refraktif değişiklik ve kümülatif haze ölçümü arasında bir ilişki saptanamamış, ancak kümülatif haze ölçümünün ablasyon derinliği ile korelasyon gösterdiği, dolayısıyla yüksek refraktif düzeltme uygulanan olgularda kornea opasifikasyonu ve haze'in daha fazla olduğu bildirilmiştir (54-56). Ancak, stroma kalınlaşması ile konfokal mikroskopi haze tahmini arasında bir ilişki saptanamamış, dolayısıyla haze ve regresyonun iki farklı yara iyileşmesi mekanizması ile geliştiği öne sürülmüştür (55). Bu da miyopik regresyonun kornea saydamlığında belirgin bir değişiklik olmaksızın gelişebileceğini göstermektedir (55). Erie ve arkadaşları (18), 24 miyopik gözde (-1.25 ile -5.75 D arası) PRK sonrası keratosit yoğunluklarındaki değişiklikleri incelemiş ve tüm kornea keratosit yoğunluğunun önce hafif azaldığını, 1. aydan itibaren artmaya başladığını, 3. ayda maksimum düzeye ulaştığını, 6. ayda PRK öncesi düzeylere indiğini ve 6. ayla 3. yıl arasında normal seviyede kaldığını saptamışlardır. Yazarlar, stromanın ön %10'unda keratosit yoğunluğunun 5. günden

itibaren alt kornea katmanlarına göre belirgin olarak azaldığını, bunun ardından 1. aydan itibaren ön, orta ve arka stromada keratosit proliferasyonunun başladığını, 3. ayda yoğunlukların pik yaptığını ve daha sonra 3. yıla kadar ön stromal keratosit yoğunluğunun yılda %5 azalırken, orta ve arka stromal keratosit yoğunluğunun 1. ve 3. yıllar arasında normale dönüp stabil kaldığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, PRK sırasında kısmen veya tamamen alınan yoğun ön stroma keratosit popülasyonunun PRK sonrası hiçbir zaman PRK öncesi düzeylere ulaşamadığını göstermektedir. Azalmış bir ön stromal keratosit yoğunluğunun, korneanın uzun dönem sağlığı için ne anlam taşıdığı henüz bilinmemektedir. Benzer azalmalar LASİK sonrası kornealarda (49,77) ve kontakt lens kullanan keratokonus olgularının kornealarında (20) da bildirilmiştir. Vesaluoma (77) ve Mitooka (49) keratosit yoğunluğunda azalmada kornea denervasyonunun neden olabileceğini öne sürmüşlerse de Erie ve arkadaşları (18) böyle bir ilişki saptayamamışlardır.

Histolojik çalışmalarda, insan korneasında, PRK sonrası 1. günde sinir rejenerasyonunun başladığı gözlenmişse de, (75) in vivo konfokal mikroskopi ile rejenere olan sinir lifleri en erken 7. günde saptanabilmiştir (47). Linna ve arkadaşları (46), 12. ay sonunda dahi sinirlerin tam olarak rejenere olmadığını bildirmişler, Moilanen ve arkadaşları (53) ise, rejenerasyonun 1 yılı geçtiğini hatta 5 yıla kadar uzadığını, bazı korneaların 5 yılda dahi normal innervasyon paternine sahip olamadığını bildirmişlerdir. Hiperopik PRK, periferik sinir liflerini daha fazla zedelediğinden, bunun miyopik PRK'ya göre daha fazla duyu denervasyonuna neden olabileceği öne sürülmüştür (74).

Sonuç olarak, PRK sonrası, in vivo konfokal mikroskopi ile epitel ve stroma kalınlık analizi yapılabilir, ablasyon derinliği (stroma kalınlığı) ölçülebilir, haze kalınlık ve yoğunluk analizi yapılabilir, stroma içi opasitelerin lokalizasyonu ve derinliği

anlaşılabilir, komeanın tüm katmanlarında hücre morfolojisindeki değişiklikler izlenebilir ve dokümente edilebilir. Bu yöntem sayesinde, PRK uygulanan olgularda haze gelişimi ve refraktif regresyonun patogenezi hakkında yeni bilgiler edinilmiştir. Regresyona stroma kalınlaşmasının neden olduğu gösterilmiş, haze gelişimini kontrol eden pekçok faktör olsa da, artmış sayıda aktif keratositlerden kaynaklanan hücresel refleksiyonların daha önce klinik çalışmalarda farkedilmemiş majör bir faktör olduğu saptanmıştır. Bu keratosit bağımlı yara iyileşmesinin daha iyi anlaşılması PRK'nın başarısının tahmin edilebilirliğini artırabilir veya hücre-kökenli saydamlık kaybının incelenmesi PRK sonrası komea opasifikasyonunun farmakolojik ajanlarla manipülasyonu için yeni ve etkili stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, bu bilgiler, olguların tek tek, ameliyat öncesi ve sonrası daha detaylı değerlendirilmesini sağlar ve belki de agresif yara iyileşmesi gösteren olguların önceden tahmininde faydalı olabilir.

Laser in-situ Keratomileusis (LASIK)

Histopatolojik çalışma sonuçlarına göre LASİK'te yara iyileşmesi PRK'ya göre daha az belirgindir (1,29,65) ve LASİK, PRK'ya oranla çok daha az stromal hücre apoptozu, keratosit proliferasyonu ve myofibroblast transdifferensiyasyonuna neden olur (74). Helena, (29) Wilson, (82) ve Wachtlin, (80) LASİK'te keratosit apoptozisinin özellikle flep kesisi komşuluğunda, flep alt yüzü ve stromal yatak ön yüzünde görüldüğünü bildirmişlerdir. Perez-Santonja (65) ve Latvala, (37) LASİK sonrası epitel ve stroma ilişkisinin yalnız flep kesisi kenarında olduğuna ve yara iyileşmesinin ve stromada yeniden şekillenmenin de hem tavşan hem insan komealarında bir tek flep kesisi kenarlarında belirgin olduğuna, dolayısıyla skarın da yalnız bu bölgede geliştiğine dikkat çekmişlerdir. Linna ve arkadaşları (44),

tavşanda LASİK sırasında kesilen subepitelyal sinirlerinin 2.5 ay sonra hemen hemen normale döndüğünü, derin stromal sinirlerin ise 5 ay sonra dahi anormal olduğunu bildirmişlerdir.

İnsanda LASİK sonrası yapılan konfokal mikroskopi çalışmalarında, epitel kalınlığının ameliyat sonrası 1. ayda %22 oranında arttığı ve 1 yıl süreyle değişmeden bu düzeyde kaldığı bildirilmiştir (21,72). Bu kalınlaşmanın duyu denervasyonla ilgili olabileceği öne sürülmüş (74), epitel kalınlığındaki değişme ile refraktif regresyon arasında bir ilişki saptanamamıştır (21). Bu konuda halen daha geniş serilere ihtiyaç vardır. Epitel kalınlığında bir miktar artış gösterilmişken, Erie ve arkadaşları (21), LASİK sonrası flep, stromal yatak veya tüm stroma kalınlığında 1 yıla kadar değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

LASİK sonrası insan çalışmalarının tümünde %92 ile %100 arasında değişen oranlarda Bowman tabakasında ince katlantılar (microfolds) gözlenmiştir (49,63,66,71,77). Klinik olarak anlamlı olmadığı düşünülen bu katlantıların cerrahi sırasında flepte çekintiler veya flebin yeni lazer ablasyonuna uğramış stromal yatağa uyumsuzluğuna bağlı olarak geliştiği, bazı çalışmalarda 2 yıl takipte aynı kaldığı (77), diğerlerinde ise 1 yıla kadar giderek azaldığı (49) gözlenmiştir. Linna ve arkadaşları (45), LASİK reoperasyonu ile bu katlantıların arttığını bildirmişlerdir.

Konfokal mikroskopide flep interfazı çok sayıda yüksek veya orta yansıtıcılıkta partikül depolanması nedeniyle çok kolay ayrılabilir. Hücresel metabolizma ürünleri, apoptotik keratosit kalıntıları, sünger sponge parçaları, gözyaşından lipid veya inflamatuvar hücre, mikrokeratom bıçağından metal parçaları olabileceği düşünülen bu partiküller insan konfokal mikroskopi çalışmalarında LASİK sonrası tüm gözlerde bildirilmiştir (45,49,63,66,71,77). Ivarsen ve arkadaşları, (33) 4 tavşan korneasını flep oluşturduktan sonra kimyasal yöntemlerle incelemiş ve interfazda

demir değil, plastik parçaları saptamışlardır. Bazı araştırmacılar, LASİK sonrası interfaz partikül yoğunluğunun zaman içinde azaldığını (63,66,77,79), diğerleri ise aynı kaldığını (33,49) bildirirken, LASİK reoperasyonlarından sonra partikül yoğunluğunun arttığı gösterilmiştir (45,71). Partikül yoğunluğu ile haze veya refraktif regresyon arasında ilişki saptanmamıştır (66). Yine tüm konfokal mikroskopi çalışmalarında, değişik mikrokeratomlarla, flep kalınlığı amaçlanan kalınlığa göre daha düşük saptanmıştır (21,63,66,77). Vesaluoma ve arkadaşları (77), flep kalınlığının 3. günde en ince olup, 6. aydan sonra biraz daha kalınlaştığını bildirmişse de, Erie ve arkadaşları (21), flep kalınlığının 1. haftadan itibaren 1 yıl takipte değişmediğini bildirmişlerdir.

Vesaluoma ve arkadaşları (45), ameliyat sonrası 3. günde gözlerin %86'sında flep interfazının altında, stromal yatakta ve %79'unda interfaz önünde keratosit izlenmeyen bir alan saptadıklarını bildirmişlerdir. Diğer LASİK konfokal mikroskopi çalışmalarının hemen tümünde (49,63,66) bu aselüler zon ilk ameliyat sonrası ölçüm olan 1. hafta ölçümünde bildirilmiş, Pisella ve arkadaşları (66), 8. günde bu aselüler alanın kalınlığını lameller kesinin önünde yaklaşık 5µ, arkasında yaklaşık 5-10µ olarak ölçmüşlerdir. Bu aselüler alanın histopatolojik çalışmalarda gösterilmiş olan hücre apoptozuna bağlı olduğu düşünülmüştür (29,58,82). Ablasyon arkasında hücre hasarında fotoakustik etkilerin, sekonder radyasyonun, ısının ve hidroksil radikal oluşumunun da etkisi olabilir (49). PRK ve LASİK sonrası haze oluşumunda farklılıkların, epitelyal sitokinlerin salınımıyla oluşan keratosit apoptozunda farklılıklara bağlı olabileceği öne sürülmüşse de (29,82), deneysel bir çalışmada, transepitelyal PRK sonrası haze'in aselüler bölge kalınlığı ile değil ablasyon hacmi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (58). Günümüzde keratosit apoptozunun haze patogenezindeki rolü halen tartışmalıdır. Tüm çalışmalarda,

ameliyat sonrası 3. günden 1-2. haftaya kadar, aselüler zon arkasında, stromal yatakta görülebilen ilk keratositlerin genellikle oval, parlak çekirdekli ve hücre uzantıları belirgin aktive keratositler olduğu bildirilmiştir (21,49,63,77). Bu keratositlerin kaynağının derin ve periferik keratositler olabileceği öne sürülmüştür. Klinik haze'e neden olan bu aktivasyon, PRK'dakinin aksine 1-2. haftadan itibaren azalır. LASİK sonrası haze'in Bowman ve epitelin cerrahi sırasında korunması ve/veya LASİK'te tedavi edilen bölgenin yüzeyden 130-180µm kadar derin olması nedeniyle, PRK'ya göre daha az olduğu düşünülmektedir. Pisella ve arkadaşları ince flepli gözlerde stromal yatakta ameliyat sonrası keratosit aktivasyonunun daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (66). Möller-Pedersen ve arkadaşları (58), en ön keratosit katmanı bütünlüğünün, refraktif cerrahi sonrası myofibroblast transformasyonu ve haze oluşumunu kontrol edebileceği hipotezini öne sürmüşlerdir. LASİK'te derin tedavinin, epitel hücreleri ve keratositler arasındaki moleküler ve hücresel ilişkiyi bozmuyor olabileceği, ayrıca, derin keratositlerin morfolojik ve histolojik özelliklerinin de yüzeysel keratositlerden farklı olabileceği öne sürülmüştür (49). Deneysel tavşan çalışmalarında LASİK sonrası santral korneada aktive keratosit izlenememişse de (65), bir insan korneasında ameliyattan 8 gün sonra bu hücreler izlenebilmiştir (37). Haze bölgesinde ekstraselüler matriks reflektivitesi arttığı ve keratosit çekirdekleri zor ayrılabilirdiği için kantitatif ölçüm kolay olmamakla birlikte, Mitooka ve arkadaşları (49), ameliyat sonrası 1. haftada bu bölgenin derinliği ile ablasyon derinliği arasında bir ilişki bulamamışlardır.

Keratosit yoğunluğunu inceleyen iki konfokal mikroskopi çalışmasında, flep önündeki stromal keratosit yoğunluğunda azalma bildirilmiştir. Mitooka ve arkadaşları (49), bu azalmanın 1. haftadan itibaren tüm kontrollerde görüldüğünü ve 12. ayda anlamlı hale geldiğini, Vesaluoma (77) ve Perez-Gomez (63) ise azalmanın

3. ayda farkedilip, 6. aydan 24. aya kadar anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Hücre azalmasının tam olarak nedeni bilinmemekle birlikte, LASİK flebinin oluşturulması sırasında stromal sinirlerin kesilmesinin keratosit denervasyonuna (49,77), bu esnada ön keratositler ile arka ve periferik keratositler arasındaki bağlantıların kesilmesine (81) veya kesi sonrasında keratositlerin perifere doğru tekrar düzenlenmesine bağlı olabileceği (63) düşünülmüştür. Keratositlerin stroma sinir liflerince direkt innervasyonu Müller ve arkadaşları (60) tarafından gösterilmişse de, flepte hücre azalması özellikle 3-6. aydan itibaren olurken, LASİK sonrası kornea sinirlerinin 6. aydan itibaren tekrar belirmeye başladığı konfokal mikroskopi çalışmalarında gösterilmiştir (49,63). Mitooka ve arkadaşları (49), flep interfazı komşuluğunda, ön retroablasyon bölgesindeki keratositlerde LASİK sonrası 3. ayda azalma olduğunu ve 12. aya kadar yoğunluğun düşük kaldığını, arka retroablasyon bölgesinde ve arka stromada ise keratosit yoğunluğunda 1. haftadan 12. aya kadar takipte değişme olmadığını bildirmişlerdir. Flep alt yüzünde 1. haftadan, stromal yatak ön yüzünde ise 3. aydan itibaren görülen ve 12 ay takipte düşük kalan, flebin üst katmanlarında ise 6-12. aydan itibaren belirgin olarak azalan keratosit yoğunluğunun nedeni henüz bilinmemekle birlikte, çalışma sonuçları LASİK sonrası stromal hasarla kaybolan keratositlerin insanda tam olarak yenilenemediğini göstermektedir.

LASİK sırasında hinge bölgesindeki sinirler hariç üst ve orta stromal kornea sinirleri kesilir (44). Perez-Santonja ve arkadaşları (64), LASİK sonrası kontakt estezyometri ile kornea hassasiyetinin 6 aydan uzun süre azalmış olduğunu göstermişler, Tervo ve Moilanen (74), ise bir non-kontakt estezyometri ile duyu bozuklukların 2 yıla kadar uzadığını saptamışlardır. Birçok araştırmacı (46,49,63,64), LASİK sonrası 1. haftada olgularının büyük çoğunluğunda hiç subepitelyal sinir lifi izlenmediğini, 6 aydan

itibaren ise tüm olgularda tek tek düzensiz sinir lifi rejenerasyon bölgelerinin izlenebildiğini bildirmişlerdir. Linna ve arkadaşları (45), santral korneada uzun sinir liflerinin ancak 12. aydan sonra izlenmeye başladığını saptamışlardır. Perez-Gomez ve arkadaşları (63), nazal hinge'li flep oluşturarak uyguladıkları LASİK sonrası, estezyometri ile ölçülen kornea hassasiyetinin 1. haftadan 6. aya kadar tüm ameliyat sonrası muayenelerde, santral veya temporal korneada, nazal korneaya göre daha azalmış olduğunu, ve kornea hassasiyeti ile konfokal mikrokopi ile ölçülen sinir lifi uzunluğu arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Linna ve arkadaşları (45), ise eski flep kaldırılarak yapılan LASİK reoperasyonlarından sonra subepitelyal sinir liflerinde azalmanın daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Pisella (66) ve Perez-Gomez (63), çalışmalarında endotel yoğunluğu veya hücre büyüklüğü için değişkenlik katsayısının LASİK sonrası tüm takiplerde normal olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, in vivo konfokal mikroskopı ile insanda LASİK'in endotele etkisi gösterilememiştir.

LASİK sonrası flep kenarında yara iyileşmesi ise lineer kesilerdeki iyileşme gibidir (81). Flep kenarında keratosit aktivasyonu izlenir. Bu bölgede debris ve ileri dönemlerde ise skar gözlenir (74).

In vivo konfokal mikroskopı ile flep interfazında epitel içe büyümesi varsa, tıpkı radyal keratotomi yaralarında veya gevşetici insizyonlarda görüldüğü gibi epitel hücreleri izlenebilir (74,78). Diffüz lamellar keratitte ise, akut evrede flep interfazında ovoid hücre birikimi, ve ardından bir miktar keratosit aktivasyonu saptanmıştır. Ovoid hücrelerin makrofaj veya bir çeşit karatosit olup zaman içinde aktive keratositlere dönüşebileceği öne sürülmüştür (14,77).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Refraktif Cerrahi Birimi'ne başvuran ve laser subepitelyal keratomileusis (LASEK) tekniği ile eksimer lazer tedavisi yapılan miyopik ve miyopik astigmatizmalı olgular dahil edildi. Daha önceden refraktif cerrahi geçirmiş olgular, ultrasonografik pakimetri ile santral kornea kalınlığının 490 µm ve altında olan olgular, kornea topografisinde keratokonus saptanan olgular, korneada yara iyileşmesini etkileyebilecek sistemik hastalığı bulunanlar (örneğin Kollagen Doku Hastalığı ve Diabetes Mellitus), kornea hastalığı, katarakt, glokom, retina hastalığı gibi oküler hastalığı olan olgular, gebelik ya da laktasyon durumu mevcut olan olgular çalışma dışı bırakıldı. Kontakt lens kullanan hastaların lensleri cerrahiden en az 1 ay önce çıkartıldı. Etik kurulu onayı alındıktan sonra çalışma kapsamına alınan tüm olgulardan bilgilendirilmiş onam formu alındı. Hastalara gözlüklü ve gözlüksüz refraksiyon, ön segment muayenesi, göz içi basınç ölçümleri ve fundus muayenesi yapıldı. Pupil dilatasyonu sonrasında otorefraktometre, korneal topografi, pakimetri ölçümleri yapıldı. Preoperatif dönemde, postoperatif 1., 3., ve 6. aylarda konfokal mikroskop incelemeleri yapıldı. Tüm hastalara tek bir cerrah tarafından ve aynı yöntemle LASEK cerrahisi uygulandı. Topikal anestezi, povidon iodin ile göz temizliği ve cerrahi örtmeyi takiben kapak spekülümü yerleştirildi. Alkol haznesi birkaç damla %20 etanol ile doldurularak 30 saniye beklendi. Bu sürenin sonunda alkol bir sponj ile emildi. Alkol haznesi kaldırıldıktan sonra sponj ile kurulandı. Epitel inferiordan başlanarak özel bir bıçak yardımıyla yukarıya doğru sıyrılıp kaldırıldı. Daha sonra hastaya uygun ablasyon miktarında eksimer lazer uygulandı (Mel 60, Aesculap-Meditec, Jena,

Germany) ve göz yüzeyi BSS solüsyonu ile irrije edildi. Rycroft kanülü ile epitel flebi stroma üzerine yayıldı. Yumuşak kontakt lens takılarak işleme son verildi. Kontakt lens kornea epiteli tamamen kapanınca (postoperatif 4. veya 5. gün) çıkartıldı. Hastalar ortalama 1 ay boyunca 5x1/gün topikal steroid damla, 5 gün 5x1/gün antibiyotik damla (çoğunda epitel kapanıncaya kadar) , 1 ay 1x1/gün gözyaşı jeli, 1 ay 7x1 suni gözyaşı kullandı. Konfokal mikroskop incelemeleri Confoscan 3 (NIDEK, Italy) ile yapıldı. Konfokal mikroskopik incelemeye, hasta alet konusunda detaylı bir şekilde bilgilendirildikten sonra başlandı. Her iki göze %0.5 propakain hidroklorid damlatıldıktan sonra, objektif lensinin ucuna bir damla visköz madde konuldu. Hastanın çenesi ve alını mikroskopun destek kısmına yerleştirildi. Hasta sabit şekilde mikroskop ışığına bakarken lens göze doğru ilerletildi. Lensin ucu değil, visköz ajanla korneaya dokunuldu. Endotelin tam monitör ekranını kaplayan görüntüsü izlendikten sonra, kumanda 50 mikron kadar ileri itilip ölçüm başlatıldı. Her ölçümün 2 dakikadan fazla sürmemesine dikkat edildi. Her hastanın sağ ve sol gözlerinden en az 3 çekim yapılarak kaliteli görüntüler elde edildi. Lensin korneaya temas etmeden öne-geri hareketlerle tüm kornea katmanlarını tarayarak elde ettiği ve bu sırada monitörde izlenen görüntüler sistem hafızasına kaydedildi. En iyi kalitede görüntüler seçilerek, konfokal mikroskopik olarak preoperatif dönemde, postoperatif 1, 3 ve 6. ayda kornea morfolojisi, subepitelyal haze miktarı ($RI = \text{ışık yoğunluğu}$) ve sinir rejenerasyon oranı değerlendirildi.

İstatistiksel analizler, Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi, Kolmogorov-Smirnov testi, Student T testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

LASEK yapılan toplam 26 olgunun 49 gözü çalışma kapsamına alındı. Olguların 21'i kadın, 5'i erkek idi. Ortalama yaşları 35.19 ± 7.3 yıl (21-50 yıl) idi. Refraksiyon miktarları ise sferik ortalama değer -5.29 ± 2.4 (-1.50 ile -12.0 D) ve silindirik ortalama değer ise -1.52 ± 1.10 (-0.50 ile -4.00 D) idi (Tablo 1). Sadece 3 hasta (6 göz) kontakt lens kullanmakta idi. Klinik olarak hiçbir hastada haze saptanmadı (Resim 9).

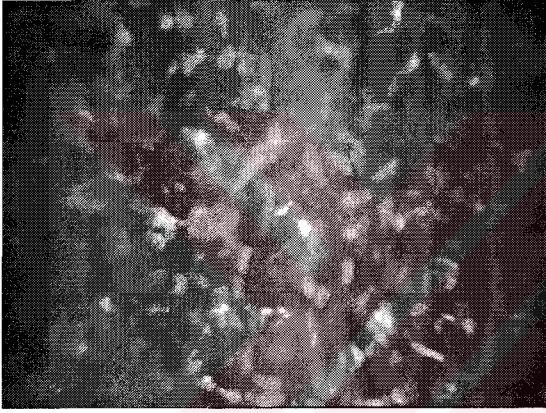


Resim 9: Postoperatif 3. ayda şeffaf kornea

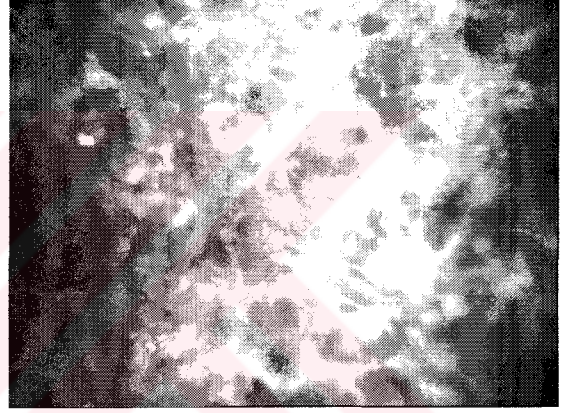
Tablo 1: Hasta sırasına göre sferik ve silindirik değerleri ile uygulanan ablasyon miktarları

Hasta Numarası	Göz	Sferik değer	Silindirik değer	Ablasyon Miktarı
1	Sağ	-5	-2	70
1	Sol	-5,5	-2	77
2	Sağ	-3,75	-0,5	47
2	Sol	-3,75	-0,5	47
3	Sağ	-4	-0,5	50
3	Sol	-4	-0,5	50
4	Sağ	-4,25	-0,75	55
4	Sol	-3,25	-1,75	55
5	Sağ	-2,5	-3,5	82
5	Sol	-4,75	-4	86
6	Sağ	-5,5	-1	67
6	Sol	-5	0	59
7	Sağ	-5	0	59
7	Sol	-5	0	59
8	Sağ	-5	0	65
8	Sol	-4	0	54
9	Sağ	-7	-1,75	88
9	Sol	-5	-1,5	67
10	Sağ	-5	0	53
10	Sol	-4,5	-0,5	53
11	Sağ	-7	0	79
11	Sol	-4,25	-0,75	55
12	Sağ	-5,5	-0,75	65
12	Sol	-5	-0,5	59
13	Sağ	-4,75	-0,5	57
13	Sol	-3,5	-0,75	51
14	Sağ	-3	-0,75	45
14	Sol	-3	0	40
15	Sağ	-4,5	-0,5	53
15	Sol	-4,5	-0,5	53
16	Sağ	0	-4	66
16	Sol	0	-3,75	62
17	Sağ	-4,5	-1,5	60
17	Sol	-3,5	-1,5	53
18	Sağ	-1,5	0	25
18	Sol	-1,5	0	25
19	Sağ	-5	0	60
19	Sol	-5	0	60
20	Sağ	-4	0	49
20	Sol	-4	0	49
21	Sağ	-11	-2	126
21	Sol	-11	-2	126
22	Sol	-6,5	0	76
23	Sağ	-9,5	0	115
23	Sol	-9,5	0	115
24	Sol	-12	0	129
25	Sağ	-10	-2,5	125
25	Sol	-9	-2,5	115
26	Sağ	-12	0	128

Konfokal mikroskopik olarak, preoperatif haze miktarı (RI) ortalama 82.25 ± 13.0 piksel (minimum 58-maksimum 109 piksel) (Resim 10), 1. ayda 149.6 ± 39.4 piksel (minimum 76-maksimum 216 piksel) (Resim 11), 3. ayda 115.6 ± 32.8 piksel (minimum 71-maksimum 181 piksel) (Resim 12) ve 6. ayda ise 104.6 ± 37.8 piksel (minimum 55-maksimum 214 piksel) (Resim 13) idi (Tablo 2, 3). Preoperatif dönemde 3 gözde, postoperatif 1. ayda 13 gözde, 3. ayda 5 gözde ve 6. ayda 5 gözde görüntü kalitesi iyi olmadığı için ışık yoğunluğu değerlendirilemedi (Tablo 2).



Resim 10: Preoperatif dönemde subepitelyal alanın konfokal mikroskopik görünümü RI= 99 piksel

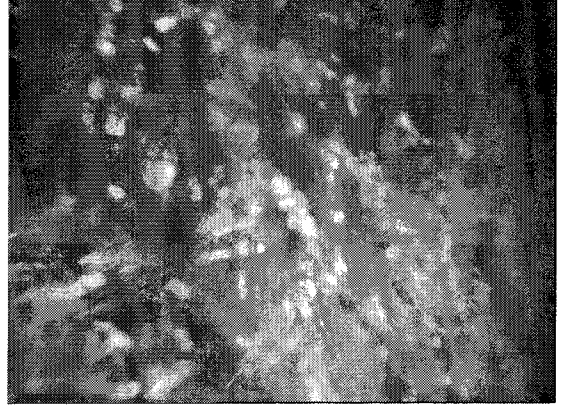
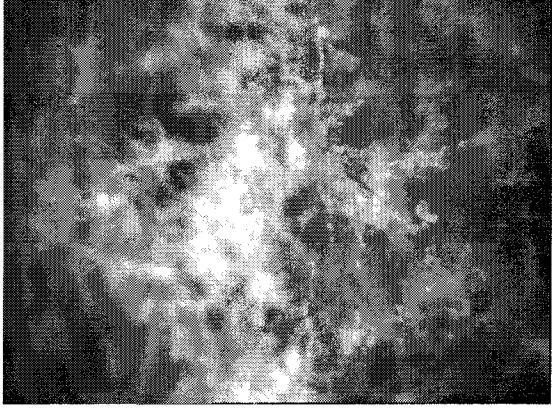


Resim 11: Postoperatif 1. ayda subepitelyal haze alanının konfokal mikroskopik görünümü RI= 208 piksel

Tablo 2: Hasta sırasına göre preoperatif dönemde, 1, 3 ve 6. aylarda haze miktarı

(RI=ışık yoğunluğu) (* görüntü kalitesi iyi olmayan gözlerde alınamayan ölçümü vermektedir)

Hasta Numarası	Preoperatif RI	1.ay RI	3.ay RI	6.ay RI
1	100	159	124	172
1	109	173	129	113
2	73	*	*	76
2	86	99	73	78
3	99	153	161	167
3	98	164	129	139
4	80	*	151	89
4	75	*	109	80
5	83	174	113	82
5	87	206	97	89
6	92	208	*	100
6	58	186	178	112
7	66	*	228	132
7	66	*	217	126
8	86	231	208	*
8	81	221	111	*
9	79	176	138	97
9	80	87	71	168
10	63	65	55	*
10	101	146	*	113
11	*	*	122	97
11	*	*	133	106
12	90	91	99	80
12	85	96	78	76
13	63	76	81	76
13	79	74	*	*
14	87	197	124	105
14	88	195	80	116
15	63	*	86	70
15	54	*	228	121
16	82	141	110	60
16	70	137	77	60
17	86	125	100	55
17	81	166	100	77
18	83	*	107	83
18	76	*	115	*
19	74	*	169	109
19	68	*	106	98
20	80	151	154	214
20	68	124	152	79
21	81	98	75	87
21	*	122	78	132
22	64	216	132	101
23	78	203	181	105
23	105	170	155	114
24	86	148	136	92
25	61	122	101	91
25	69	156	91	126
26	89	186	*	156



Resim 12: Postoperatif 3. ayda subepitelyal haze alanının konfokal mikroskopik görünümü RI= 138 piksel

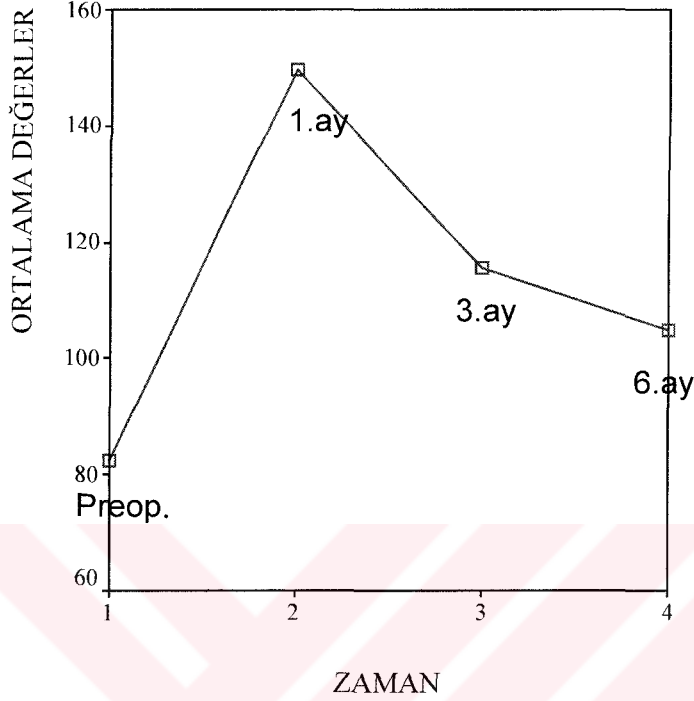
Resim 13: Postoperatif 6. ayda subepitelyal haze alanının konfokal mikroskopik görünümü RI= 99 piksel

Haze miktarları açısından preoperatif dönemle 1. ay arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p=0.000$) saptanırken (Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi), 1. ay ile 3. ay arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ($p=0.000$) mevcuttu (Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi). Üçüncü ay ve 6. ay arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.161$) (Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi) (Tablo 3).

Tablo 3: Preoperatif dönemde, 1, 3 ve 6. aylarda ortalama $\pm$ SD haze miktarları ve bu süreler arasındaki istatistiksel analizler (RI=ışık yoğunluğu, SD=standart deviasyon, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir, $p>0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını göstermektedir)

Süre	RI ort. (piksel)	p değeri
Preoperatif	82.25 ± 13.0	$p=0.000$
1. ay	149.6 ± 39.4	
3. ay	115.6 ± 32.8	$p=0.161$
6. ay	104.6 ± 37.8	

Grafik 1’de haze’in 1. ayda pik yaptığı, 3. aya doğru hızla azaldığı ve 6. ayda ise azalmaya devam ettiği görülmektedir.



Grafik 1: Zamana göre haze miktarındaki değişimi göstermektedir.

Olgular düşük-orta dereceli miyopi ve yüksek miyopi olarak 2 gruba ayrıldı. Grup 1’de -1.75 ile -6.0 D arasında sferik değeri olan 41 göz, Grup 2’de ise -6.5 ile -12.0 D arasında 8 göz mevcuttu. Grup 1’de RI ortalaması 56.37 ± 12.24 piksel, Grup 2’de 108.0 ± 22.96 idi. Gruplar Kolmogorow-Smirnov testi ile normal dağılıma uymakta idi. Her iki grup arasında haze miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Student T test, $p>0.05$). Her iki grup arasında ablasyon miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (Student T test, $p=0.000$).

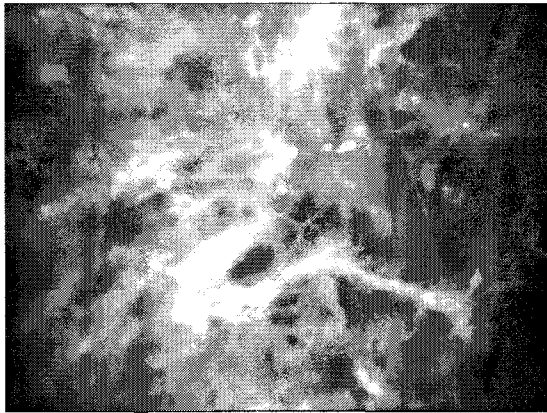
Olgulara uygulanan ablasyon miktarı ile preoperatif dönemle, 1. 3. ve 6. ayda ortaya çıkan haze miktarı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Student T test, $p>0.05$).

Konfokal mikroskopik olarak subepitelyal sinir rejenerasyonunun, 1. ayda toplam 36 gözün %27.8'inde, 3. ayda 45 gözün %71.1'inde ve 6. ayda 44 gözün %93.2'sinde geliştiği görüldü (Tablo 3).

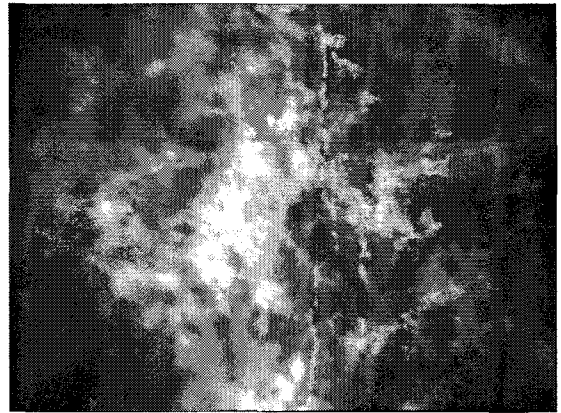
Tablo 3: Postoperatif 1, 3 ve 6. aylarda subepitelyal sinir rejenerasyon oranı

Takip süresi	Sinir rejenerasyon oranı	Göz sayısı
1. ay	%27.8	36
3. ay	%71.1	45
6. ay	%93.2	44

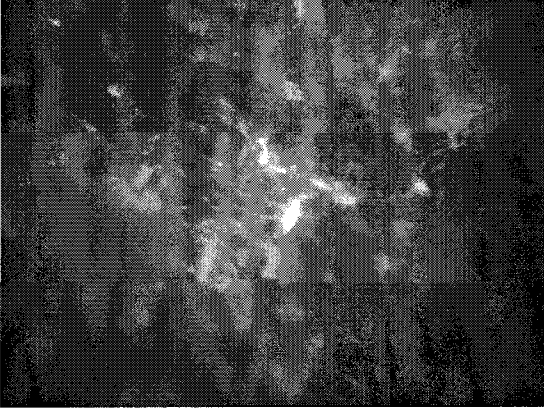
Bu rejenera olan subepitelyal sinirlerin, 1. ayda ince ve az sayıda sinir filizleri şeklinde olduğu (Resim 14), 3. ayda ise daha uzun ve belirgin yansıtıcılığı olan filizler olduğu (Resim 15) ve 6. ayda ise çoğu olguda morfolojik ve sayı olarak preoperatif görünümüne ve değerlerine benzediği izlendi (Resim 16). Grafik 2'de, 1. ayda olguların 1/3'ünde gözlenen subepitelyal sinir filizlerinin, 6. ayda neredeyse tüm olgularda ortaya çıktığı izlenmektedir.



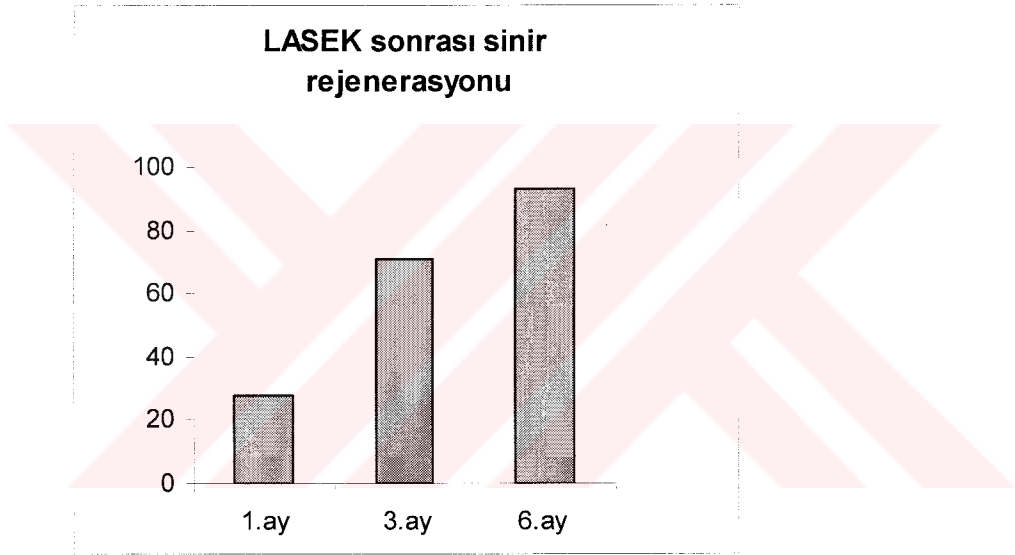
Resim 14: Postoperatif 1. ayda subepitelyal sinir görünümü



Resim 15: Postoperatif 3. ayda subepitelyal sinir görünümü



Resim 16: Postoperatif 6. ayda subepitelyal sinir görünümü



Grafik 2: Postoperatif dönemde zamana göre sinir rejenerasyon oranı

Ablasyon miktarı ve 1. ay sinir rejenerasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Student T test, $p=0.885$). Ablasyon miktarı ve 3. ay sinir rejenerasyon oranı arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı (Mann-Whitney U testi, $p=0.691$). Ablasyon miktarı ve 6. ay sinir rejenerasyon oranı arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Mann-Whitney U testi, $p=0.652$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Korneal yara iyileşmesi refraktif cerrahi prosedürlerinin etkinliğini ve güvenilirliğini etkileyen doku cevabı olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinik sonuçlar ve pekçok komplikasyon bu iyileşme süreci ve korneal hücre cevabı ile direk ilişkilidir. Refraktif cerrahide yara iyileşmesi konusundaki bilgilerimizin çoğunluğu tavşan, fare, maymun ve tavuklarda yapılan hayvan deneylerine dayanmaktadır. Son yıllarda konfokal mikroskopinin klinik kullanıma girmesi ile fotorefraktif keratektomi ve laser in-situ keratomileusis geçirmiş olgularda korneadaki iyileşme cevabı in vivo olarak incelenmeye başlanmıştır. PRK ve LASİK sonrasında konfokal mikroskopla in vivo olarak insan korneasını inceleyen pek çok çalışma bulunmasına rağmen, literatürde LASEK'in konfokal mikroskopik bulgularını inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Konfokal mikroskopik olarak PRK'da haze miktarını inceleyen çalışmalar sonucunda haze pikinin 3. ayda ortaya çıktığı, 12. ayda haze'in azaldığı ancak preoperatif değerlerin 4 katı kadar yüksek olduğu belirtilmiştir, ancak subepitelyal sinir rejenerasyonunun postoperatif 1. ayda ortaya çıktığı izlenmiştir (54,55). PRK'lı gözlerde keratosit yoğunluğunun ilk %10 stromal bölgede postoperatif 1. aydan başlayarak 3. yılda %45'lere varan oranda azaldığı bildirilmiştir (18). Subepitelyal sinir rejenerasyonunun PRK sonrası 5. yılda normal düzeylere ulaştığı, subepitelyal alanda yansıtıcılığın yüksek olduğu ancak bu artmış yansıtıcılığın preoperatif değerlerden istatistiksel olarak farklı olmadığı vurgulanmıştır. Yine bu çalışmada konfokal mikroskop haze miktarı ile ablasyon derinliği korele bulunmamış (53). PRK sonrası 10. yıldaki konfokal mikroskopik olarak anterior ilk %10'luk anterior stromada keratosit yoğunluğunda %50 oranında azalma, subepitelyal sinirlerin morfolojik ve sayısal olarak normal değerlere

döndüğü saptanmıştır (Özdoğan S, Deren Y, Öztürk S, Hasanreisoglu B, Bilgihan K. Long term effects of PRK on human cornea using confocal microscopy: a clinical study with 10 years postoperative follow-up. Avrupa Katarakt ve Refraktif Cerrahlar Cemiyeti XXIII. Kongresi Sözlü Sunum, Lizbon, Portekiz 2005:84.) Erie JC ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada subepitelyal sinirlerin PRK'dan sonra 2. yılda preoperatif değerlere ulaştığı, 3. ve 5. yılda aynı düzeyde kaldığı rapor edilmiştir, buna karşılık aynı çalışmada LASİK geçirmiş olgularda postoperatif 5. yılda subepitelyal sinirlerin preoperatif değerlere göre hala %24 oranında az olduğu ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Her iki grupta ablasyon derinliği ve sinir dansitesi arasında korelasyon izlenmediği de vurgulanmıştır (22). LASİK'li olgularda keratosit yoğunluğunu değerlendiren çalışmalarda ise, LASİK sonrası 1. yıl konfokal mikroskopik incelemede anterior ve posterior flepte yer yer %40'a varan oranlarda keratosit yoğunluğunda azalma, Bowman tabakasında biyomikroskopik olarak tespit edilemeyen mikrofolds ve flep arası partiküllerin oldukça sık olduğu rapor edilmektedir (49,66).

Möller-Pedersen ve arkadaşlarının yaptığı ve sferik değerlerin -2.88 ile -9.13 diyoptri arasında olduğu bir çalışmada fotorefraktif keratektomi geçirmiş olgularda haze pikinin postoperatif 3. ayda ortaya çıktığı, 12. ayda haze'in azaldığı ancak hala preoperatif değer 4 katında kaldığı bildirilmektedir. Subepitelyal sinir rejenerasyonunun ise erken dönemde ortaya çıktığı belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda -1.75 ile -12.0 diyoptri arasında sferik değerleri bulunan olgulara yaptığımız LASEK sonrasında, haze'in postoperatif 1. ayda pik yaptığı, 3. aya doğru hızla azaldığı, 6. ayda da normal değerlere yaklaştığı izlendi. Subepitelyal sinir rejenerasyonunun başlangıcı ise PRK'da olduğu gibi postoperatif erken dönemde

gözlendi. Konfokal mikroskopik haze miktarı ile ablasyon derinliğini karşılaştıran bir çalışmada ise bizim çalışmamızla uyumlu olarak bu iki parametre arasında korelasyon bulunamamıştır (53).

Klinik çalışmalarda postoperatif klinik olarak belirgin haze'in LASEK sonrasında daha az olduğu ortaya konmuştur. Bir göze LASEK, diğer göze PRK yapılan klinik çalışmalar sonucunda LASEK sonrasında ağrının belirgin olarak daha az olduğu ve haze düzeyinin postoperatif tüm dönemlerde PRK'dan düşük olduğu bulunmuştur (2,39,40). Bizim çalışmamızda da, klinik olarak hiçbir olguda haze saptanmazken, konfokal mikroskopik olarak izlenen haze'in de postoperatif erken dönemde hızla azaldığı gözlemlendi. Bilgihan K. ve arkadaşları, bizim çalışmamızdaki gibi yüksek miyopik değerleri (-6.0 ile -10.0 D) olan 36 olgunun 61 gözüne yaptıkları LASEK sonrasında, sadece 3 gözde grade 1 haze görmüşlerdir (4).

LASEK sonrasında gözyaşı sekresyonunun oldukça az oranda etkilendiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Herrmann WA ve arkadaşları, LASEK sonrasında gözyaşı sekresyonunun ve stabilitesinin postoperatif 1. ayda preoperatif değerlere ulaştığını rapor etmişlerdir (31). Bizim konfokal mikroskopik bulgularımız da bu klinik çalışmayı destekler şekilde, subepitelyal sinir rejenerasyonunun postoperatif 1. aydan başlayarak hızla geliştiğini göstermiştir.

Bildiğimiz kadarıyla laser subepitelyal keratomileusis geçirmiş olgularda korneal yara iyileşme cevabını konfokal mikroskop ile in vivo olarak inceleyen bir çalışma yayınlanmamıştır. Bu çalışmamızda, LASEK geçirmiş olgularda klinik olarak hiç haze saptanmasa da, konfokal mikroskopik olarak haze'in ortaya çıktığını ve bu haze'in postoperatif 1. ayda pik yaptığını, 3. aya doğru hızla azalmaya başladığını ve 3. ayla 6. ay arasında azalmaya devam ettiğini gördük. Düşük-orta dereceli miyopi ve

yüksek miyopi ablasyon miktarları birbirinden oldukça farklı bulunmasına rağmen, bu iki grupta konfokal mikroskopik olarak haze miktarları değişmemekte idi. Olguların postoperatif 1. ayda yaklaşık 1/3'ünde sinir rejenerasyonunun başladığını ve bu rejenerasyonun 6. ayda neredeyse tüm olgularda geliştiğini saptadık. Sonuç olarak, klinik çalışmalar sonucu ortaya konmuş olan LASEK'in düşük haze oranı ve gözyaşı sekresyonunun postoperatif erken dönemde stabilizasyonu gibi önemli avantajları, bu konfokal mikroskopik çalışmamız ile morfolojik boyutta kanıtlanmış olmaktadır. Bu konfokal mikroskopik bulgular, LASEK'in yüksek miyopisi ve kuru gözü bulunan olgularda güvenle kullanılabileceğini desteklemektedir.



ÖZET

LASEK, PRK ve LASİK'in avantajlarını özünde toplayan, dezavantajlarını taşımayan hibrid bir refraktif cerrahi tekniktir. LASİK'teki gibi flep kaldırılmakta ancak bu flep epitel flebi olmaktadır. PRK'daki gibi ise lazer ablasyonu stromanın ön yüzeyine yapılmaktadır. Bu farklı refraktif cerrahi tekniklerde kornea yara iyileşmesi de farklı olmaktadır. Bu çalışmada, konfokal mikroskopik olarak LASEK sonrasında korneada ortaya çıkan morfolojik değişikliklerin in vivo olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Miyopi ve miyopik astigmatizma nedeniyle LASEK yapılmış olgular konfokal mikroskop ile preoperatif dönemde, postoperatif 1, 3 ve 6. ayda incelendi. LASEK yapılan 21'i kadın, 5'i erkek toplam 26 olgunun 49 gözü çalışma kapsamına alındı. Ortalama yaşları 35.19 ± 7.3 yıl (21-50 yıl) idi. Refraksiyon miktarları ise sferik ortalama değer -5.29 ± 2.4 (-1.50 ile -12.0 D) ve silindirik ortalama değer ise -1.52 ± 1.10 (-0.50 ile -4.00 D) idi.

Klinik olarak hiçbir hastada haze saptanmadı. Konfokal mikroskopik olarak, preoperatif haze miktarı (RI) ortalama 79.8 ± 12.7 piksel, 1. ayda 151.1 ± 45.3 piksel, 3. ayda 124.1 ± 43.2 piksel ve 6. ayda ise 104.9 ± 33.0 piksel idi. Haze'in 1. ayda pik yaptığı, 1. ve 3. ay arasında hızlı bir ivmeyle azaldığı, 6. aya doğru ise azalmaya devam ettiği izlendi. Haze miktarı açısından preoperatif dönemle 1. ay arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0.05$) saptanırken, 1. ay ile 3. ay arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ($p<0.05$) mevcuttu. Üçüncü ay ve 6. ay arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

Olgular düşük-orta dereceli miyopi ve yüksek miyopi olarak 2 gruba ayrıldı. Grup 1' de RI ortalaması 56.37 ± 12.24 piksel, Grup 2'de 108.0 ± 22.96 idi. Her iki grup

arasında ablasyon miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark varken ($p<0.05$), haze miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Olgulara uygulanan ablasyon miktarı ile preoperatif dönemle, 1. 3. ve 6. ayda ortaya çıkan haze miktarı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Subepitelyal sinir rejenerasyonunun 1. ayda toplam 36 gözün %27.8'inde, 3. ayda 45 gözün %71.1'inde ve 6. ayda 44 gözün %93.2'sinde geliştiği görüldü.

LASEK, refraktif başarısının yüksek olması, haze miktarının düşük olması, ektazi riskinin olmaması gibi önemli avantajları sonucunda son yıllarda giderek artan oranda uygulanmaktadır. Yüksek miyopik değerlerde bile klinik olarak haze görülmediği ve bu gözlerde dahi konfokal mikroskopik olarak haze'in 1. ve 6. ay arasında azalma gösterdiği dikkati çekti. Subepitelyal sinir rejenerasyonunun postoperatif 1. ayda yaklaşık %30 olguda gelişmeye başladığı, 6. ayda ise neredeyse tamamına yakınında sinir rejenerasyonunun mevcut olduğu görüldü. Sonuç olarak, bu konfokal mikroskopik bulgular ışığı altında LASEK, yüksek miyopik değerlerde bile oluşturduğu düşük haze ve erken subepitelyal sinir rejenerasyonu oranı ile, yüksek miyopisi ve kuru gözü olan olgularda güvenle uygulanabilecek bir teknik gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alio JL, Perez-Santonja JJ, Tervo T, Tobbara KF, Vesaluoma M, Smith RJ, Maddox B, Maloney RK. Postoperative inflammation, microbial complications, and wound healing following laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 16:523-538,2000.
2. Autrata R, Rehurek J. Laser-assisted subepithelial keratectomy for myopia: Two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 29:661-668,2003.
3. Azar DT, Ang RT. LASEK. In: Yanoff M, Duker JS, editors. *Ophthalmology*. St. Louis, Mosby 2004:199-203.
4. Bilgihan K, Hondur A, Hasanreisoglu B. Laser subepithelial keratomileusis for myopia of -6 to -10 diopters with astigmatism with the MEL60 laser. *J Refract Surg* 20:121-6,2004.
5. Binder PS, Anderson JA, Rock ME, Vrabec MP. Human excimer laser keratectomy. *Ophthalmology* 101:979-989,1994.
6. Böhnke M, Thaer A, Schipper I. Confocal microscopy reveals persisting stromal changes after myopic photorefractive keratectomy in zero haze corneas. *Br J Ophthalmol* 82:1393-1400,1998.
7. Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 18:553-628,1999.
8. Camellin M, Cimberle M. LASEK technique promising after 1 year of experience. *Ocular Surgery News* 18:14-17,2000.
9. Camellin M. Laser epithelial keratomileusis for myopia. *J Refract Surg* 19:666-70,2003.
10. Campos M, Raman S, Lee M, McDonnell PJ. Keratocyte loss after different

- methods of de-epithelization. *Ophthalmology* 101:890-894,1994.
11. Cavanagh HD, El-Agha S, Petrol WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy and ultrasound microscopy. *Cornea* 19:712-722,2000.
 12. Cavanagh HD, Jester JV, Essapian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. Conrad Berens memorial lecture. *CLAO J* 16:65-73,1990.
 13. Chen CC, Chang JH, Lee JB, Javier J, Azar DT. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2593-602,2002.
 14. Chung MS, Pepose JS, Al-Agha S, Cavanagh HD. Confocal microscopic findings in a case of delayed-onset bilateral diffuse lamellar keratitis after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 28:1467-1470,2002.
 15. Corbett MC, Prydal JL, Verma S, Oliver KM, Pande M, Marshall J. An in vivo investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function. *Ophthalmology* 103:1366-1380,1996.
 16. Dohlman CH, Gasset AR, Rose J. The effect of corneal epithelium or endothelium on the stromal keratocytes. *Invest Ophthalmol* 7:520-534,1968.
 17. Dutt S, Steinert RF, Raizman MB, Puliafito CA. One-year results of excimer photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *Arch Ophthalmol* 112:1427-1436,1994.
 18. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in the human cornea after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 121:770-776,2003.

19. Erie J, Patel SV, Bourne WM. Aberrant nerve regeneration after PRK. *Cornea* 22:684-686,2003.
20. Erie J, Patel SV, McLaren JW, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. *Am J Ophthalmol* 134:689-695,2002.
21. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Ramirez M, Hodge DO, Maguire U, Bourne WM. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness. A confocal microscopy study. *Ophthalmology* 109:1447-1452,2002.
22. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of Corneal Subbasal Nerve Density After PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol* 140:1059-1064,2005.
23. Espana EM, Grueterich M, Mateo A, et al. Cleavage of corneal basement membrane components by ethanol exposure in laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 29:1192-7,2003.
24. Esquenazi S, He J, Bazan NG, Bazan HE. Comparison of corneal wound-healing response in photorefractive keratectomy and laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 31:1632-9,2005.
25. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 108:665-675,1990.
26. Gabler B, Winkler von Mohrenfels C, Dreiss AK, Marshall J, Lohmann CP. Vitality of epithelial cells after alcohol exposure during laser-assisted subepithelial keratectomy flap preparation. *J Cataract Refract Surg* 28:1841-6,2002.
27. Gartry DS, Kerr Muir MG, Marshall J. Excimer laser photorefractive

- keratectomy: 18 month follow-up. *Ophthalmology* 99:1209-1219,1992.
28. Hanna KD, Pauliquen YM, Waring GO, Savoldelli M, Cotter J, Morton K, Menasche M. Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 107:895-901,1989.
 29. Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE, Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:273-276,1998.
 30. Helmy SA, Salah A, Badaway TT, Sidky AN. Photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for myopia between 6.00 and 10.00 diopters. *J Refract Surg* 12:417-21,1996.
 31. Herrmann WA, Shah C, Gabler B, Winkler Von Mohrenfels C, Hufendiek K, Lohmann CP. Corneal sensation after laser epithelial keratomileusis for the correction of myopia. *Graefes Arch Clin exp Ophthalmol* 243:33-37,2005.
 32. Imanishi J. Expressions of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects. *J Biochem* 127:525-530,2000.
 33. Ivarsen A, Thogersen J, Keiding SR, Hjortdal JO, Möller-Pedersen T. Plastic particles at the LASIK interface. *Ophthalmology* 111:18-23,2004.
 34. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 87:225-236,2003.
 35. Jester JV, Huang J, Petrol WM, et al. TGF beta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 75:645-657,2002.
 36. Jester JV, Petroll WM, Feng W, Essepian J, Cavanagh HD. Radial keratectomy: 1, the wound healing process and measurement of incisional gape in two animal models using in vivo confocal microscopy. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci 33:3255-3270,1992.
37. Latvala T, Barraquer-Coll C, Tervo K, Tervo T. Corneal wound healing and nerve morphology after excimer laser in situ keratomileusis (LASIK) in human eye. J Refract Surg 12:677-83,1999.
 38. Laube T, Wissing S, Theiss C, Brockmann C, Steuhl KP, Meller D. Decreased keratocyte death after laser-assisted subepithelial keratectomy and photorefractive keratectomy in rabbits. J Cataract Refract Surg 30:1998-2004,2004.
 39. Lee JB, Seong GJ, Lee JH, et al. Comparison of laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. J Cataract Refract Surg 27:565-70,2001.
 40. Lee JB, Choe CM, Seong GJ, Gong HY, Kim EK. Laser epithelial keratomileusis for low to moderate myopia: 6 month follow-up. Jpn J Ophthalmol 46:299-304,2002.
 41. Lee JB, Javier JA, Chang JH, Chen CC, Kato T, Azar DT. Confocal and electron microscopic studies of laser subepithelial keratomileusis (LASEK) in the white leghorn chick eye. Arch Ophthalmol 120:1700-6,2002.
 42. Lee JB, Choe CM, Kim HS, Seo KY, Seong GJ, Kim EK. Comparison of TGF-beta 1 in tears following laser subepithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy. J Refract Surg 18:130-4,2002.
 43. L'Esperance FA Jr, Taylor DM, Warner JW. Human excimer laser keratectomy: Short term histopathology. J Refract Corneal Surg 4:118-124,1988.
 44. Linna TU, Perez-Santonja JJ, Tervo KM, Sakla HF, Alio y Sanz JL, Tervo

- TM. Recovery of corneal nerve morphology following laser in situ keratomileusis. *Exp Eye Res* 66:755-763,1998.
45. Linna TU, Vesaluoma MH, Petroll WM, Tarkkanen AHA, Tervo TMT. Confocal microscopy of a patient with irregular astigmatism after LASIK reoperation and relaxation incisions. *Cornea* 19:163-169,2000.
 46. Linna TU, Vesaluoma MH, Perez-Santonja JJ, Petroll WM, Alio J, Tervo TMT. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:393-397,2000.
 47. Linna TU, Tervo T. Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Current Eye Res* 16:640-649,1997.
 48. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *J Scanning* 10:128-138,1957.
 49. Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ, Erie J, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 133:307-314,2002.
 50. Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, et al. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res* 65:575-589,1997.
 51. Mohan RR, Kim WJ, Mohan RR, et al. Bone morphogenic proteins 2 and 4 and their receptors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2626-2636,1998.
 52. Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, et al. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kb. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1327-1334,2000.

53. Moilanen JAO, Vesaluoma MH, Müller JL, Tervo MTM. Long-term Corneal Morphology after PRK by In Vivo Confocal Microscopy Invest Ophthalmol Vis Sci 44:1064-1069,2003.
54. Möller-Pedersen T, Vogel M, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HF, Jester JV. Quantification of stromal thinning, and corneal haze after photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. Ophthalmology 104:360-368,1997.
55. Möller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy. A 1-year confocal microscopy study. Ophthalmology 107:1235-1245,2000.
56. Möller-Pedersen T. On the structural origin of refractive instability and corneal haze after excimer laser keratectomy for myopia. Acta Ophthalmol Scand 237:6-20,2003.
57. Möller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy Invest Ophthalmol Vis Sci 39:487-501,1998.
58. Möller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. Cornea 17:627-639,1998.
59. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy Cornea; 17 :485-92,1998
60. Müller I, Pels L, Vrensen GFJM. Ultrastructural organization of human

- corneal nerves. Invest Ophthalmol Vis Sci 37:476-488,1996.
61. Nakayasu K. Stromal changes following removal of epithelium in rat cornea. Ophthalmol 32:113-125,1988.
 62. Pallikaris IG, Naoumidi II, Kalyvianaki MI, Katsanevaki VJ. Epi-LASIK: comparative histological evaluation of mechanical and alcohol-assisted epithelial separation. J Cataract Refract Surg 29:1496-501,2003.
 63. Perez-Gomez I, Efron N. Change to corneal morphology after refractive surgery (myopic laser in situ keratomileusis) as viewed with a confocal microscope. Optom Vis Sci 80:690-697,2003.
 64. Perez-Santonja JJ, Sakla HF, Cardona C, Chipont E, Alio JL. Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy (PRK) and laser in situ keratomileusis (LASIK) for low myopia. Am J Ophthalmol 127:497 504,1999.
 65. Perez-Santonja JJ, Linna TU, Tervo KM, Sakla HF, Sanz JLA, Tervo T. Corneal wound healing after laser in situ keratomileusis in rabbits. J Refract Surg 14:602-609,1998.
 66. Pisella PJ, Auzerie O, Bokobza Y, Debbasch C, Pharm D, Baudouin C. Evaluation of corneal stromal changes in vivo after laser in situ keratomileusis with confocal microscopy. Ophthalmology 108:1744-1750,2001.
 67. Ramirez-Florez S, Maurice DM. Inflammatory cells, refractive regression, and haze after excimer laser PRK. J Refract Surg 12:370-381,1996.
 68. Ruckhofer J, Böhnke M, Alzner E, Grabner G. Confocal microscopy after implantation of Intrastromal Corneal Ring Segments. Ophthalmology 107:2144-51,2000.
 69. Rumelt S, Cohen I, Skandarani P, Delarea Y, Ben Shaul Y, Rehany U.

Ultrastructure of the lamellar corneal wound after laser in situ keratomileusis in human eye. *J Cataract Refract Surg* 27:1323-7,2001.

70. Seiler T, Holschbach A, Derse M, Jean B, Genth U. Complications of myopic photorefractive keratectomy with the excimer laser. *Ophthalmology* 101:153-160,1994.
71. Slowik C, Somodi S, Richter A, Guthoff R. Assessment of corneal alterations following laser in situ keratomileusis by confocal slit scanning microscopy. *Ger J Ophthalmol* 5:526-531,1996.
72. Spaeda L, Fasciani R, Necozone S, Ballestrazzi E. Role of the corneal epithelium refractive changes following laser in situ keratomileusis for high myopia. *J Refract Surg* 16:133-139,2000.
73. Steinart RF. Wound healing anomalies after excimer laser photorefractive keratectomy: Correlation of clinical outcomes, corneal topography, and confocal microscopy. *Trans Am Ophth Soc* 105:629-714,1997.
74. Tervo T, Moilanen J. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog Retin Eye Res* 22:339-358,2003.
75. Tervo T, Latvala TM, Tervo TM. Recovery of corneal innervation following photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 112:1466-1470,1994.
76. Tuominen IS, Tervo TM, Teppo AM, et al. Human tear fluid PDGF-BB, TNF-alpha and TGF-beta 1 vs corneal haze and regeneration of corneal epithelium and subbasal nerve plexus after PRK. *Exp Eye Res* 72:631-641,2001.
77. Vesaluoma MH, Perez-Santonja JJ, Petroll M, Alio JL, Tervo T. Corneal

- stromal changes induced by myopic LASIK. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:369-376,2000.
78. Vesaluoma MH, Petroll WM, Perez-Santonja JJ, Valle TU, Alio JL, Tervo TMT. Laser in situ keratomileusis flap margin: wound healing and complications imaged by in vivo confocal microscopy. Am J Ophthalmol 130:564-573,2000.
 79. Vinciguerra P, Torres I, Camesasca FI. Applications of confocal microscopy In refractive surgery. J Refract Surg 18:S378-S381,2002.
 80. Wachtlin J, Langenbeck K, Schröder S, Zhang EP, Hoffman F. Immunohistology of corneal wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. J Refract Surg 15:451-458,1999.
 81. Watsky MA. Keratocyte gap junctional communication in normal and wound rabbit corneas and human corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:2568-2576,1995.
 82. Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. Cornea 19:S7-12,2000.
 83. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. Prog Retin Eye Res 18:293-309,1999.
 84. Wilson SE, He YG, Weng J, et al. 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 62:325-327,1996.
 85. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, et al. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. Exp Eye Res 68:377-397,1999.

86. Wilson SE, Mohan RR, Ambrosio R, et al. Corneal injury - a relatively pure model of stromal-epithelial interactions in wound healing. *Prog Retin Eye Res* 20:625-637,2001.
87. Wilson SE. Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 100:411-433,2002.
88. Wu WCS, Stark WJ, Green WR. Corneal wound healing after 193 nm excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol* 109:1426-1432,1991.

