

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

**RAT KORNEALARININ KORNEA SAKLAMA
SOLÜSYONUNDA ZAMAN İÇERİSİNDEKİ DEĞİŞİMİNİN
RAMAN SPEKTROFOTOMETRİSİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. BURAK AKBAY**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. HÜSEYİN KAYA**

DENİZLİ - 2022

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

**RAT KORNEALARININ KORNEA SAKLAMA
SOLÜSYONUNDA ZAMAN İÇERİSİNDEKİ DEĞİŞİMİNİN
RAMAN SPEKTROFOTOMETRİSİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. BURAK AKBAY**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. HÜSEYİN KAYA**

DENİZLİ - 2022

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan, tez dönemimde emeğini, desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Hüseyin KAYA'ya;

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük katkısı olan Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Makine Mühendisliği Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÜNAL'a;

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübeleriyle desteğini, hoşgörüsünü ve sabrını esirgemeyen tüm değerli hocalarıma;

Birlikte çalıştığımız, uzmanlık eğitimim boyunca dostluk ve arkadaşlıklarını esirgemeyen, çalışmalarımnda desteklerini gördüğüm değerli tüm asistan arkadaşlarıma, değerli hemşirelerimize, iyi ve kötü günleri hep birlikte geçirdiğimiz tüm mesai arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan aileme;

Bana her zaman koşulsuz destek veren ve yanımda duran sevgili eşim Merve AKBAY ve biricik oğlum Arda Bulut AKBAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KORNEA	3
Anatomi.....	3
Giriş	3
Gelişimi	3
Boyutlar.....	4
Genel Bilgiler.....	4
Epitel	4
Bowman Tabakası.....	4
Stroma	5
Descemet Membranı	6
Endotel	6
Korneanın Damarlanması ve İnnervasyonu	7
Kornea Embriyolojisi	7
Kornea Biyomekaniği	8
KERATOPLASTİ	8
Tarihçe	8
Keratoplasti Teknikleri	10
Yüzeysel Lameller Keratoplasti	10
Derin Anterior Lameller Keratoplasti (DALK)	10
Descemet Soymalı Endotelial Keratoplasti (DSEK)	10
Descemet Membran Endotelial Keratoplasti (DMEK).....	10
Bowman Zarı Transplantasyonu	11

Penetran Keratoplasti.....	11
Keratoplasti Endikasyonları.....	11
Optik Keratoplasti	11
Tektonik Keratoplasti.....	11
Terapötik Keratoplasti	12
Kozmetik Keratoplasti.....	12
Preoperatif Hasta Değerlendirme	12
Donöre Ait Özellikler	12
Donör kornea greftin alınması.....	14
Greftin Saklanması	14
Donör korneasının ameliyat öncesinde değerlendirilmesi	15
Penetran keratoplasti cerrahisi	15
Cerrahi Hazırlık	15
Donör Korneanın Trepanizasyonu.....	16
Alıcı Korneanın Hazırlanması	16
Cerrahi	16
Penetran Keratoplasti Komplikasyonları.....	17
İntraoperatif Komplikasyonlar	17
Postoperatif Komplikasyonlar	18
Cerrahi Sonrası Bakım.....	18
Prognoz ve Grefon Reddi.....	19
Erken Greft Yetmezliği.....	19
Geç Greft Yetmezliği.....	19
Epitelyal Greft Reddi.....	19
Stromal Greft Reddi	19
Endotelyal Greft Reddi.....	20
Greft Reddinin Tedavisi.....	20
RAMAN SPEKTROSKOPİSİ	20
Genel Bilgiler.....	20
Tarihçesi	21
Raman Spektroskopisi Genel Prensipleri.....	22
Kullanım Alanları.....	24

Raman Spektroskopisi ve Kornea	25
GEREÇ VE YÖNTEM	28
Kullanılan Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması	28
Kornea Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması.....	28
Kornea örneklerinin Raman Spektroskopisinde Analizi ve Verilerin Hesaplanması	29
İstatistiksel Analiz	31
BULGULAR	32
TARTIŞMA	53
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

DALK	: Derin Anterior Lameller Keratoplasti
DMEK	: Descemet Membran Endotelyal Keratoplasti
DSAEK	: Descemet soymalı otomatize endotelyal keratoplasti
DSEK	: Descemet Soymalı Endotelyal Keratoplasti
GİB	: Göz içi basıncı
GİL	: Göz içi lens
PKP	: Penetran keratoplasti
VIPO4	: Fosfat



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Raman Spektrumundaki Pik Seviyeleri	26
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Raman ve Rayleigh Saçılmasının Şematik Gösterimi	23
Şekil 2. 488 nm lazer ile uyarılan CCl ₄ 'ün Raman spektrumu	23
Şekil 3. Eksize edilmiş tavşan korneasının raman spektrumları	27
Şekil 4. Kornea çıkarımı öncesi rat.....	29
Şekil 5. Renishaw inVia raman mikroskobu	30
Şekil 6. Raman mikroskobu ve metal levha üzerindeki kornea.....	30
Şekil 7. Ölçümler sırasında oda sıcaklığı ve nem seviyesi	31
Şekil 8. 1.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	32
Şekil 9. 2.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	33
Şekil 10. 3.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	33
Şekil 11. 7.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	34
Şekil 12. 8.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	34
Şekil 13. 9.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	35
Şekil 14. 12.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	35
Şekil 15. 13.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	36
Şekil 16. 14.gün alınan korneaların ortalama ölçümü	36
Şekil 17. 1 ve 7.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.....	37
Şekil 18. 1 ve 8.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.....	38
Şekil 19. 1. ve 9.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.....	39
Şekil 20. 1. ve 12.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.....	40
Şekil 21. 1. ve 13.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.....	41
Şekil 22. 1. ve 14. gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.....	42
Şekil 23. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1670/1640 oranları	43
Şekil 24. 1670/1640 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması	44
Şekil 25. Solüsyonda kalma sürelerine göre 938/925 oranlarının karşılaştırılması... ..	45
Şekil 26. 938/925 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması	46
Şekil 27. Solüsyonda kalma sürelerine göre 858/877 oranlarının karşılaştırılması... ..	47
Şekil 28. 858/877 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması	48
Şekil 29. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1248/1043 oranlarının karşılaştırılması	49
Şekil 30. 1248/1043 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması	50
Şekil 31. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1275/1247 oranlarının karşılaştırılması	51
Şekil 32. 1275/1247 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması	52
Şekil 33. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1033/1450 oranlarının karşılaştırılması	52

ÖZET

Rat kornealarının kornea saklama solüsyonunda zaman içerisindeki değişiminin RAMAN spektrofotometrisi ile değerlendirilmesi

Dr. Burak Akbay

Kornea hastalıklarının sebep olduğu görme kayıplarının tedavisinde kornea nakli önemli bir tedavi yöntemidir. Donörden alınan kornea dokularını saklamak amacıyla günümüze kadar birçok yöntem kullanılmıştır. Günümüzde alınan kornea dokusunu saklamak için en yaygın kullanılan solüsyon Optisol'dür. Donörden alınan kornea dokuları saklama solüsyonları içinde 14 güne kadar ve özellikle ilk 7 gün oldukça korunabilmektedir. Raman spektroskopisi lazer tabanlı bir analiz tekniğidir ve Raman spektroskopisinde, biyolojik dokuların kimyasal ve biyofiziksel özellikleri dokunun içine girilmeden belirlenmektedir. Raman spektroskopisi örnekler için herhangi bir hazırlığa ihtiyaç olmaksızın, dokunun biyolojik içeriklerini çok hızlı bir şekilde belirlemektedir ve her bileşen için belli spektrumlar vermektedir. Non-invaziv olarak canlı hayvanlarda kullanılabilir. Raman spektroskopisinin son yıllarda tıpta kullanımıyla ilgili çalışmalar yaygınlaşmaktadır. Çalışmamızda rat kornealarının kornea saklama solüsyonu Optisol içinde zaman içerisindeki değişiminin Raman spektroskopisi ile incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda 18 adet ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen, üç aylık *Rattus norvegicus* türü Wistar cinsi yetişkin dişi sıçanın 36 adet korneası kullanılmıştır. 1,2,3,7,8,9,12,13,14. günlerde her gün 2 adet sıçan korneası sterilizasyon altında alınmıştır. Alınan tüm kornealar, her solüsyon kabında 1 adet olacak şekilde konulup tüm solüsyonlar alındığı gün, grup ve gözün yönüne göre gruplandırılmıştır, ayrıca 12,13,14.gün alınanlar erken dönem, 7,8,9.gün alınanlar orta dönem, 12,13,14.gün alınanlar geç dönem olarak isimlendirilmiştir. Alınan kornealar +4°C'de ölçüm anına dek saklanmıştır. 14.gün son korneanın alınımından sonra alınan korneaların analizi Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Renishaw inVia raman microscope cihazı ile yapılmıştır. Tüm kornealardan ölçümler alınmış, birbirleriyle karşılaştırılmış, anlamlı sonuçlar görülmesi üzerine, kollajen ve proteoglikanlara denk gelen spektrum bölgeleri üzerine yoğunlaşmış ve 1670/1640, 1275/1247, 938/925, 858/877, 1033/1450, 1248/1043 oranları karşılaştırılmıştır. Kollajen ölçümlerini gösteren 1670/1640, 938/925, 858/877 bölgelerinde geç

dönemlerde erken dönemlere göre istatistiksel anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır ($p<0.001$). Ancak 938/925, 858/877 bölgelerinde erken ve orta dönem arası istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). 1670/1640 bölgesinde orta dönemde erken döneme göre kollajen yapısında istatistiksel olarak anlamlı bozulma görülmüştür ($p<0.001$). Proteoglikan ölçümlerini gösteren 1248/1043 bölgelerinde geç dönemde erken ve orta döneme göre proteoglikan yapısında istatistiksel anlamlı bozulma görülmüştür ($p<0.05$). Ancak bu ölçümde orta dönem proteoglikan yapısı erken döneme göre daha olumlu sonuç vermiştir ($p<0.05$). Yapılan son yayınlarda 1033/1450 oranının matrikste bulunan kollajen oranını gösterdiği söylenmektedir. Bu oranın artması kollajen yapısındaki bozulmalara işarettir. Çalışmamızda 2.gün ve sonraki ölçümlerde bu oranda anlamlı artışlar görülmüştür ($p<0.05$). Sonuç olarak donörden alınan kornea dokuları saklama solüsyonlarında zaman içinde değişime uğramaktadır, kornea dokuları 14 güne kadar ve özellikle ilk 7 gün oldukça korunabilmektedir. Raman spektroskopunun tıbbi alanlardaki kullanımı arttıkça canlı ve cansız dokulardaki biyokimyasal yapıların analizlerinin daha iyi olması umut edilmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda denek sayısının artırılması, ölçüm sayılarının artırılması, sadece solüsyonun ve solüsyona konulmadan önce korneanın ölçümlerinin alınması daha faydalı sonuçlar verebilir.

Anahtar kelimeler: Kornea, Keratoplasti, Optisol, Raman, Kollajen

SUMMARY

Evaluation of the change of rat corneas in corneal storage solution over time by RAMAN spectrophotometry

Dr. Burak Akbay

Corneal transplantation is an important treatment method in the treatment of vision loss caused by corneal diseases. Many methods have been used to preserve the corneal tissues taken from the donor. Today, the most widely used solution to preserve corneal tissue is Optisol. Corneal tissues taken from the donor can be preserved in storage solutions for up to 14 days and especially for the first 7 days. Raman spectroscopy is a laser-based analysis technique, and in Raman spectroscopy, the chemical and biophysical properties of biological tissues are determined without penetrating the tissue. Raman spectroscopy determines the biological contents of the tissue very quickly without the need for any preparation for the samples and gives specific spectra for each component. It can be used in live animals non-invasively. Studies on the use of Raman spectroscopy in medicine have become widespread in recent years. In our study, it was aimed to examine the change of rat corneas over time in the corneal storage solution Optisol by Raman spectroscopy. In our study, 18 pieces of weight were 200-250 gr. 36 corneas of a three-month-old *Rattus norvegicus* species Wistar adult female rat were used. On days 1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, 14 each day 2 rat corneas were taken daily under sterilization. All the collected corneas were placed as 1 in each solution container and all the solutions were grouped according to the day, group and eye direction. Also, those taken on the 12th, 13th, 14th days are named the early period, those taken on the 7th, 8th, 9th days are named the mid-term, 12, 13, 14. days taken are named as late period. The collected corneas were stored at +4°C until the measurement. The analysis of the corneas taken after the last cornea removal on the 14th day was made with the Renishaw inVia raman microscope device in Konya Necmettin Erbakan University Science and Technology Research and Application Center. Measurements were taken from all corneas, compared with each other, and when significant results were seen, the spectrum regions corresponding to collagen and proteoglycans were concentrated and the ratios of 1670/1640, 1275/1247, 938/925, 858/877, 1033/1450, 1248/1043 were compared. Statistically significant

results were obtained in the late periods compared to the early periods in regions 1670/1640, 938/925, 858/877 showing collagen measurements ($p < 0.001$). However, there was no statistically significant difference between the early and mid-terms in the 938/925, 858/877 regions ($p > 0.05$). In the 1670/1640 region, a statistically significant deterioration was observed in the collagen structure in the mid-term compared to the early period ($p < 0.001$). Statistically significant deterioration was observed in the proteoglycan structure in the late period compared to the early and mid-term in 1248/1043 regions showing proteoglycan measurements ($p < 0.05$). But, in this measurement, the mid-term proteoglycan structure gave a more positive result than the early period ($p < 0.05$). In recent publications, it is said that the ratio of 1033/1450 indicates the ratio of collagen in the matrix. An increase in this rate indicates deterioration in the collagen structure. In our study, significant increases were observed in this rate in the 2nd day and subsequent measurements ($p < 0.05$). As a result, corneal tissues taken from the donor undergo changes over time in storage solutions, corneal tissues can be preserved for up to 14 days and especially for the first 7 days. It is hoped that the analysis of biochemical structures in living and non-living tissues will be better as the use of Raman spectroscopy in medical fields increases. In future studies, increasing the number of subjects, increasing the number of measurements, measuring only the solution and the cornea before it is put into the solution may give more useful results.

Keywords: Cornea, Keratoplasty, Optisol, Raman, Collagen

GİRİŞ

Hasarlanmış ve şeffaflığını yitirmiş korneanın sağlıklı şeffaf kornea ile değiştirilmesi işlemine kornea transplantasyonu ya da keratoplasti denmektedir. Penetran keratoplasti (PKP), şeffaflığını yitirmiş olan kornea dokusunun tam kat olarak çıkarılıp yerine tam kat sağlıklı kornea dokusunun nakledilmesi operasyonudur. Kornea nakli doku transplantasyonlarının içinde en eskilerden ve en başarılı olanlardan biridir. Zirm tarafından 1905 yılında ilk başarılı penetran keratoplasti gerçekleştirilmiştir (1).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2021 yılı içinde 79.641 kornea nakli gerçekleştirilmiştir. Bu sayı 2020' de 66.278, 2019'da 85.601'dir (2). PKP uzun yıllardır en sık kullanılan kornea nakli yöntemi olmasına rağmen gelişmiş ülkelerde son 15 yıl içinde lameller cerrahilerin sayısı PKP cerrahisi ile yarışır hale gelmiştir (3,4,5). Günümüzde ülkemizde 49 adet kornea bankası ve 613 adet kornea nakil merkezi bulunmaktadır. 2021 yılında ülkemizde 2812 kornea nakli gerçekleştir ve bu sayı pandemi öncesi dönemlerde 2019'da 3789, 2018'de 4141'dir (6). Ülkemizde uygulanan ana kornea nakli yöntemi PKP' dir.

Kornea dokusunun eksize edilip özel solüsyonlar içinde bekletilmesine 1970'li yıllarda başlanılmıştır (7,8). Yıllar içinde farklı yöntemler ve solüsyonlar bu amaç için kullanılmıştır. Günümüzde çoğunlukla dekstran ve kondroitin sülfat içeren optisol kullanılmaktadır ve korneanın 14 güne kadar saklanmasına olanak verir (9,10).

Raman spektroskopisinde, biyolojik dokuların kimyasal ve biyofiziksel özellikleri dokunun içine girilmeden belirlenmektedir ve Raman spektroskopisi lazer tabanlı bir analiz tekniğidir (11). Lazer etkileşimi ile saçılmış olan fotonlar bir dedektörde toplanmaktadır. Dedektörler de moleküllerin özgün titreşimlerine göre, saçılan ışık dalga boylarını belirten spektrumlar gösterir. Bu spektrumlarda dokunun içeriğine bağlı bantlar ve tepe (pik) noktaları bulunmaktadır. Her bir tepe noktası dokunun kendine has bileşenlerini göstermektedir. Raman spektroskopisi örnekler için herhangi bir hazırlığa ihtiyaç olmaksızın, dokunun biyolojik içeriklerini çok hızlı bir şekilde belirlemektedir (12).

Raman spektroskopisinin başlıca kullanım alanları jeolojide silikat cam ve eriyiklerin analizi, adli tıpta uyuşturucu ve patlayıcı maddelerin tanımlanması, tarihi yapıların üzerindeki boya ve pigmentlerin analizidir. Taze olması veya dokuların fikse olması fark etmeksizin non-invaziv olarak doku ve organlarda kullanılabilir. Raman spektroskopisinin son yıllarda tıpta kullanımıyla ilgili çalışmalar yaygınlaşmaktadır (13).

Çalışmamızda Raman spektroskopisi yardımıyla sıçan kornealarının kornea saklama solüsyonunda zaman içindeki değişimlerini incelenmesi amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

KORNEA

Gözün dış yapıları vücudun dünyaya açılan önemli bir kısmını oluşturur. Sağlıklı bir göz, olumsuz çevre koşullarından korunmaya yönelik yapı ve fonksiyona sahip bir denge içerisindedir. Gözün hem embriyogenez hem de büyüme dönemlerinde belirleyici olan unsurlar genetik ve beslenmedir (14). Sağlam vasküler sistem metabolizmanın düzenini sağlarken, denetimini immün sistem sağlar.

Anatomi

Giriş

Korneanın koruyucu işlevinin yanında gözün optik gücünün çoğunluğuna sahiptir. Sağlıklı bir korneada kan damarı bulunmaz. Beslenme ve metabolik ürünlerin uzaklaştırılması gözyaşı ve arka kısımda ise aköz hümör yolu ile sağlanmaktadır. Kornea yoğun innervasyona sahiptir. Subepitelyal ve daha derin stromal sinir pleksusu trigeminal sinirin birinci bölümü tarafından innerve edilir. Bu yüzden korneada oluşabilecek sıyrıklar veya büllöz keratopati gibi durumlarda şiddetli ağrı, refleks lakrimasyon ve fotofobi gelişir (14,15).

Gelişimi

Göz gestasyonun 4.haftasında nöroektodermden gelişmeye başlar. 5.haftada yüzey ektoderminden kornea, konjonktiva epiteli lens plağı ve kapak epidermisi meydana gelir. 5-6. Haftalarda yüzey ektodermine nöral krest hücrelerinden ilk mezenkimal hücreler kornea endotelini oluşturmak üzere epitel altına limbustan itibaren yayılır. Sonraki nöral yarık kökenli mezenkimal hücreler 7.haftada kornea stroması ve sklerayı oluşturmaya başlarlar. Gestasyonun 2.ayından sonra oküler yüzey epiteli farklılaşır ve 3.ayda korneanın tüm katları bowman tabakası hariç ortaya çıkar. Bowman tabakası, skleral mahmuzla birlikte 4.ayda ortaya çıkış olur. Yeni doğan bir bebeğin gözü ,erişkin gözü boyutunun yaklaşık %80 boyutundadır (16-18).

Boyutlar

Korneanın çapı yatay olarak 12mm, vertikal olarak 11.5 mm'dir. Santral kornea kalınlığı kişiler arasında değişiklik gösterse de ortalama 540 µm'dir. Çevreye doğru kalınlık artış gösterir (14,19).

Genel Bilgiler

Kornea saydam, avasküler, asferik bir yapıdadır. Korneanın kırıcılık gücü gözün toplam kırıcılık gücü olan 58 diyoptrinin 43 diyoptirisini içermektedir. Ayrıca astigmatizmanın da temel kaynağı korneadır. Korneanın beslenmesi gözyaşı yoluyla difüzyona uğrayan oksijen ve hümör aközden difüzyona uğrayan glikoza bağlıdır. Limbus dolaşımından sağlanan oksijenle de kornea periferi beslenir. Kornea vücutta en çok sinir sonlanmasına sahip dokulardandır ve duyarlılığı konjonktivadan yaklaşık 100 kat fazladır. Katekolaminler, asetilkolin, substans P, nöropeptit Y, kalsitonin gen bağımlı peptit, galanin, intestinal peptit ve metyonin-enkefalin korneadaki başlıca nörotransmitterlerdir (14).

Epitel

Kornea epiteli toplam kalınlığının %5'idir(0,05mm) ve çok katlı skuamoz epitelden oluşur. Yüzey epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar gözyaşının stromaya geçişini engeller. Limbus çevresi bazal epitel hücreleri devamlı çoğalarak, yüzeysel hücrelere farklılaşacak olan diğer tabakaları oluşturur. Bu hücreler olgunlaşınca en dışta mikrovillus ile kaplanır, sonrasında gözyaşına dökülürler. Bu farklılaşma 7-14 günde tamamlanır. Bazal epitel hücreleri sürekli olarak tip 4 kollajen, laminin ve diğer proteinlerden oluşan bazal membran sekresyonunu oluşturur (14,20).

Bowman Tabakası

Bowman tabakası 8–14 µm kalınlığında, kollajenler ve proteoglikanların rastgele düzenlenmesiyle oluşan, epitel ile stroma arasında uzanan bir tabakadır (21). Bu tabakada bulunan temel kollajenler tip 1 ve tip 3 kollajenlerdir ve hücre içermez. Fibrilleri stromadaki kollajenden daha küçüktür. Mikroorganizmalar ve tümör

hücrelerinin korneaya invazyonuna karşı korur. Mitotik aktivitesi yoktur, hasarı skar ile sonuçlanır (14,22).

Stroma

İdeal bir kornea için, kornea yüzeyi düzenli, epitel ve gözyaşı film tabakasının sağlıklı olması gerekir. Saydam bir korneada, eşit derecede refraktif indeks, beraberinde en az seviyede ışık saçılımı olacak şekilde epitel hücrelerinin birbirleriyle sıkıca bağlanması gerekir. Ayrıca makromoleküller ve stroma hücrelerinin de düzenli bir halde dizilmesi gerekir. Stromada bulunan keratosit sayısı ve boyutu çeşitlilik gösterir ve keratositler korneada spiral şeklinde 3 boyutlu ağ yapı oluşturur. Kollajen lamelleri arasında yassı fibroblastlar halinde keratositler bulunurlar. Bu fibroblastlar stromal molekülleri devamlı olarak üretilip sindirirler. Keratositlerin sayısı zamanla giderek azalır ancak bu azalma endotel hücrelerindeki düşüşten daha az olmaktadır. Korneayla ilgili olan cerrahilerde de keratosit sayısında azalma olur ve keratosit sayısı cerrahi öncesine bir daha erişemez (23).

Aselüler Bowman tabakası altındaki kornea stromasında proteoglikanlar ve kollajenlerin oluşturduğu ekstrasellüler matriks bulunur. Tip 6 kollajen flamanları, tip 1 ve tip 5 kollajen fibrillerini sarmalamış halde bulunur. Lumikan (keratan sülfatla ilişkili) ve dekorin (dermatan sülfatla ilişkili) korneanın ana proteoglikanlarıdır (24). Proteoglikanların birbirine oranları ve konsantrasyonları önden arkaya doğru değişiklik gösterir. Korneanın arka stroması ön stromasına göre daha çok su içerir (3.85mg vs 3.04mg) (25). Lens kristallerinin eşdeğeri olan suda çözünen diğer proteinler kornea optiğinin kontrolünde rol oynar. Keratositler tarafından salgılanabilen bu proteinler epitel hücrelerinin içinde bulunur. Ön stroma lamelleri kısa ve dardır, aralarında geniş boşluk bulunmaktadır. Arka stroma lamelleri geniş, uzun ve kalındır. Bu lameller limbusda bir uçtan diğer uca uzanır, aralarında interlameller bağlantıları bulunur. İnsan korneasında elastikiyet oldukça azdır, normal GIB'de %0,25 oranında esneyebilir (26,27).

Ekstrasellüler matrikste gömülü bulunan kollajen fibrillerinin kafes şekli dizilimi korneanın saydamlığından kısmi olarak sorumludur. Bu dizilimleri, yıkıcı interferans sonucunda oluşan ışık saçılımında azalmaya yol açar ve bu dizilimleri bir

tür saçılım düzeltici olarak görev yapar. Epitelde 1.401 olup arkaya doğru azalan yüksek refraktif indeks, saçılımın önde daha fazla olmasından kaynaklanır. Bu indeks stromada 1.380 ve daha arkada 1.373'tür. Kafes şeklindeki fibrillerin boyutları görülebilen ışık dalga boyundan küçük olduğu için kornea saydamdır. Bu saydamlık aynı zamanda stromada %78 oranda su bulunmasına da bağlıdır. Kornea hidrasyonunun büyük kısmı sağlam epitel, sağlam endotel bariyer ve sağlam endotel pompa fonksiyonunca kontrol edilir. Endotelde bulunan pompa fonksiyonu ısıya duyarlı Na-K-ATPaz enzimleriyle kontrol edilmekte olan iyon transport sistemlerince sağlanır. Bunun yanında stromada bulunan eksi yüklü glikozaminoglikanlar da birbirlerini itme eğilimleriyle şişme basıncı (swelling pressure) (SP) meydana getirirler. GİB tarafında da korneaya basınç uygulandığı için kornea stromasındaki imbibisyon (emme) basıncı GİB-SP'ye eşittir. Toplam transendotelial osmotik kuvvet, endotelial transport kanalları tarafından oluşturulan çeşitli elektrolit gradyanları ile imbibisyon basıncının toplamıdır. Önden arkaya kornea hidrasyonu değişmektedir ve endotele doğru yaklaştıkça hidrasyon artar. Stromadaysa suyun yana hareketlerine direnç artar (14).

Descemet Membranı

Stroma ve endotelin arasında, endotel kökenli olan özelleşmiş bir bazal membrandır. İki tabakası vardır. Ön desme 3 µm olup farklı proteoglikan dizilimleri sayesinde arka desmeye oranla daha kompakttır. Descemet membran kalınlığı yeni doğanda yaklaşık 3 µm'dir. Endotel varlığı devam ettiği sürece bu kalınlık yaşla birlikte artar, yetişkinlerde 10-12 µm olur. Ön descemet ömür boyu sabit kalırken arka descemet yaşla birlikte kalınlaşır (28). Dua tabakası 2013 yılında Dua ve ark. (29) tarafından pre-desme membran olarak tanımlanmıştır. Korneanın 6. tabakası olarak kabul görmüştür. Descemet membranı ve stroma arasında bulunup, kalınlığı 15 µm kadardır. Stromanın diğer bölgelerine göre daha güçlü ve hava geçirmez yapıdadır.

Endotel

Yenidoğan döneminde kübik ve yüksek hücrelerden oluşurken yetişkinde çoğunluğu altıgen şekilde, parmaksı sıkı uzantıları olan hücrelerin mozaik patern

göstererek dizilmesiyle meydana gelir. İnsanda endotel hücreler in vivo olarak çoğalamaz ancak hücre kültüründe bölünebilirler. Son çalışmalar periferik korneada endotelial kök hücre varlığını her ne kadar gösterse de endotel hücrelerin miktarı zamanla giderek azalır (30). Özellikle travma ve cerrahiye sekonder gelişen hücre kaybı, komşuluklarındaki hücrelerin hasarlı bölgeyi örtmek için genişlemesine, hücrelerin bu alana doğru göç etmesine neden olur. Endotel hücre sayısı, yüzey boyunca değişkenlik gösterir, normalde sayı periferde en çoktur (14).

Korneanın Damarlanması ve İnnervasyonu

Kornea damarsız bir dokudur ve lenfatik drenajı yoktur. Limbusta epitel altında yüzeyel marjinal pleksus bulunur. Yüzeyel marjinal pleksus ön siliyer damarların episkleral dallarından gelen damarlar tarafından oluşturulur. Limbus epiteli altında lenfatik ağ bulunur. Kornea innervasyonu duyuşal sinirlerle olur ve oldukça zengindir. Duyarlılığı deriden 300-600 kat daha fazla olup 0.1 mm'sinde yaklaşık 100 adet sinir sonlanması bulunur (31,32). Trigeminal sinirin oftalmik dalından gelen, limbus çevresinde sinir halkası oluşturan uzun siliyer sinir, periferik stromaya deriden ve radyal olarak girer, girdikten kısa bir süre sonra miyelinsiz bir hal alır, incelemek devam ettirdiğı radyal uzanımı bir süre sonra öne doğru yön değıştirir. Bowman tabakasını deldikten sonra pleksus oluşturur ve kornea epitelinin kanat hücreleri seviyesinde sonlanır. Endotel ve Descemet membranı sinir lifi bulundurmamaktadır. Santralde duyarlılık periferden daha fazladır. Kornea erozyonları, büllöz keratopati gibi kornea hastalıklarında sinir uçlarının açıkta kalması, ağrı, göz yaşarması ve fotofobiye neden olur (14).

Kornea Embriyolojisi

Korneanın oluşumu gestasyonun 5-6. haftalarında başlar. Lens vezikülünün yüzey ektoderminden oluşur ve ektodermden ayrılır. Gelişen korneanın üzerindeki ektodermal tabaka epiteli oluşturur. Başlangıçta kornea, stroma epitel ile lens ön yüzeyi arasında kalan kollajen fibrillerden oluşur. Altıncı haftada yüzey ektodermi ile lens vezikülü arasında giren nöral krest kaynaklı mezenşim hücreleri endoteli oluşturur. Kırkıncı günden sonra yine nöral krest hücrelerinden kaynaklanan korneal

fibroblastlar stromaya migrasyon gösterirler. Dördüncü ayda endotel hücreleri Descemet membranını oluşturur. Bowman tabakası ise primer asellüler stromanın kalıntısıdır. Sinirler üçüncü ayın sonunda kornea stromasına, beşinci ayda ise epitele ulaşırlar (33,34).

Kornea Biyomekaniği

Kornea kollajen fibrillerinden oluşan kompleks bir materyaldir. Kollajen fibriller, birbirlerine paralel bir biçimde dizili lamellere sarılmış halde limbusta bir uçtan öbür uca uzanır. Bu lamellerse glikozaminoglikanlardan oluşmuş olan ekstrasellüler matrikse gömülü bulunur. Bu katmanlar birbiri üzerinde kayabilir, ancak stroma esnek olmayan yapıda ve anizotropiktir, gerilim stresini kornea hidrasyonuna göre, kalınlığı boyunca düzenli olmayan şekilde dağıtır.

Kornea dehidrate kaldığında, stres öncelikle arka tabakalara yayılır ya da tüm tabakalar boyunca sabit şekilde yayılır. Sağlıklı ya da ödemli olduğundaysa stresi ön lamelde hapseder.

Kornea rijiditesi GIB ölçümleri de etkilenir. Hava kuvvetiyle yapılan ölçümler korneanın üzerinde basınç oluşturur, böylece kornea rijiditesi ölçülebilir (korneal histerezis). Bu çeşit ölçümler kornea biyomekaniğinde sadece santral fakometre değil beraberinde bölgesel fakometre, biyoelastisite, hidrasyon, viskosite ve muhtemel diğer faktörlerin de olduğunu gösterir (14,35).

KERATOPLASTİ

Hasarlanmış ve şeffaflığını yitirmiş korneanın sağlıklı şeffaf kornea ile değiştirilmesi işlemine kornea transplantasyonu ya da keratoplasti denmektedir. Korneanın tam kat değiştirilmesi işlemine penetran keratoplasti denmektedir (1).

Tarihçe

Kornea cerrahisinin ilk kavramları Galen'e dayanmaktadır. Gerçek bilimsel ve cerrahi deneyler ise 19.yüzyılda başlamıştır. Deneysel olarak hayvanlarda kornea

naklini başlatan Franz Reisinger 1818 yılında bu işleme keratoplasti ismini vermiştir (36).

İnsanda başarılı olan ilk kornea nakli Eduart Zirm tarafından 1905 senesinde gerçekleştirilmiştir. Verici sklera travması nedeni ile gözü enükle edilen bir çocuk, alıcı ise kimyasal yanık nedeni ile korneası opaklaşmış bir erişkindi. İlk başarılı nakli takip eden 30 yıl boyunca yaşayan vericilerin enükle edilmiş gözlerinden alınan kornealar keratoplasti girişimlerinde kullanıldı (36,37).

Donör kornea olarak kadavra gözlerinin kullanılabilceğini 1923- 1955 yılları arasında Filatof göstermiştir (38). Donörün ölümünden sonraki birkaç saat içinde aldığı dokuları 20-56 saat + 4- 6 C°'de saklayarak kullanmıştır. İlk göz bankasını 1945'te Paton kurmuştur (36,37).

McCarey'nin 1974'te donör dokusunu orta süreli saklanmayı Kaufman tekniği ile gerçekleştirmesi, kornea bankacılığında bir devrim olmuştur (39,40).

Türkiye'de ilk keratoplasti 1937'de Prof. Dr. Joseph Igersheimer tarafından İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde uygulanmıştır (41).

İlk başarılı penetran keratoplastinin yapılması sonrasında PKP özellikle 2.Dünya Savaşı'ndan sonra topikal antibiyotik ve steroidlerin yaygın kullanımına başlanması ve 1950'lerde kullanılmaya başlanan ince sütürler sayesinde yaklaşık bir asır boyunca temel kornea nakli tekniği olmuştur (42).

Uzun yıllar boyunca PKP popülerliğini devam ettirse de son 15 yıldır ön lameller keratoplasti ve endotelial keratoplasti uygun endikasyonlarda penetran keratoplastiye alternatif haline gelmiştir (43,44).

Modern lamellar keratoplasti Melles ve arkadaşları tarafından 2000 yılların başında posterior lameller keratoplasti olarak tarif edilmiştir. Melles descemet membranı ve endotelini Descemetorhexis tekniği ile soyma fikrini ortaya atmıştır. Bu yeni teknik descemet soyucu endotelial keratoplasti (DSEK) olarak yeniden adlandırılmıştır. Daha sonra descemet soyma otomatik endotelial keratoplasti (DSAEK) tanımlanmıştır (45,46).

Melles 2006 yılında descemet membranının ve endotel greftinin nakline izin veren descemet membran endotelisel keratoplasti (DMEK) olarak bilinen ve endotelial yetmezliği olan olgularda hastalıklı dokunun tam anatomik olarak değiştirilmesini sağlayan bir tekniği tanımladı. Tekniklerin kullanım sıklığı ülkelerin coğrafi konum ve gelişmişlik düzeylerine göre değişebilmekle birlikte dünyada halen en sık kullanılan teknik PKP'dir (45,46).

Keratoplasti Teknikleri

Yüzeyel Lameller Keratoplasti

Kornea epitel ve stromanın parsiyel kalınlıkta eksizyonunu içerir; endotel ve derin stroma değişmez (47).

Derin Anterior Lameller Keratoplasti (DALK)

DALK'ta Descemet membranı tabakasına kadar tüm opak kornea dokusu uzaklaştırılır. DALK kararı verilebilmesi için Descemet membranında yırtık ya da skar olmamalıdır. Avantajları; endotel red riski yoktur. Penetran keratoplasti ile karşılaştırıldığında daha az astigmatizma ve yapısal olarak daha dirençli glob bütünlüğü mevcuttur. Ancak cerrahi zor ve zaman alıcıdır (47).

Descemet Soymalı Endotelial Keratoplasti (DSEK)

DSEK kornea-skleral veya korneal insizyondan yaklaşık 9 mm çapında Descemet membran ve endotel kompleksinin çıkarılıp, sağlıklı donör doku ile yer değiştirilmesi tekniğidir. Bu prosedürün başka bir versiyonu da Descemet soymalı otomatize endotelial keratoplasti (DSAEK)'dir. DSAEK'de donörün hazırlanması otomatik mikrokeratomla yapılmaktadır (47).

Descemet Membran Endotelial Keratoplasti (DMEK)

Alıcının Descemet membranı ve endotel tabakası çıkarıldıktan sonra, yalnızca Descemet membranı ve endotel içeren donör grefti implante edilir. DSAEK yönteminden farklı olarak donör greftte arka stromal doku yoktur (47).

Bowman Zarı Transplantasyonu

İleri keratokonus hastalarında ektazi progresyonunu durdurabileceği düşünölen yeni bir tekniktir. Nispeten daha az invaziv bir yöntemle hastalarda kontakt lens ile daha stabil görme elde edilir (47).

Penetran Keratoplasti

Son zamanlarda kornea greftinin tabaka komponentlerinin kullanımı artmakla birlikte tam kalınlıktaki korneanın kullanıldığı keratoplasti hala en sık uygulanan yöntem olma ünvanına sahiptir ve korneanın tüm tabakalarını tutan hastalıkları için uygundur (47).

Keratoplasti Endikasyonları

Endikasyonlar optik, tektonik, terapötik ve kozmetik amaçlı olmak üzere dört ana başlıkta incelenebilir.

Optik Keratoplasti

Keratoplastide asıl amaç görme keskinliğini artırılmasıdır. En sık keratoplasti endikasyonları optik amaçlı olanlardır. En sık optik keratoplasti nedenleri bakıldığında farklı coğrafyalarda farklı sebepler göze çarpsa da çoğunlukla büllöz keratopatiler, enfeksiyöz ve non enfeksiyöz skarlar, greft yetmezliği, korneal distrofiler, korneal dejenerasyonlar ve konjenital korneal opasitelerdir (48).

Tektonik Keratoplasti

Görme artışı beklentisi ikinci plandadır. Korneanın bozulmuş anatomik yapısının düzeltilmesi asıl amaçtır. Korneal perforasyon, doku kaybı, korneal erime ve korneal incelme vb. durumlarda tercih edilir (49).

Terapötik Keratoplasti

Genellikle antibiyotik tedaviye yeterli yanıt vermeyen, keratitli, enfeksiyöz yükün fazla olduğu durumlarda tercih edilir. En sık tedaviye yanıtızsız fungal keratitler ve akanthamoeba keratitlerinde uygulanır. Aktif hastalıklı kornea dokusu tedavi amaçlı çıkarılır. Görme artışı ikincil plandadır (50).

Kozmetik Keratoplasti

Korneanın normal kozmetik görünümünü tekrar kazandırmak amacıyla, görme potansiyeli olmayan ya da çok az olan gözlerde yapılan keratoplastidir (51).

Preoperatif Hasta Değerlendirme

Donöre Ait Özellikler

Yaş: Endotel hücre yoğunluğu yaşla birlikte azalmaktadır (52). Kornea doku alımında alt yaş sınırı net olmamakla birlikte iki yaşın altındaki kornea dokusunun kullanılması teknik olarak zordur. Donörün 18 ay altında olması miyopi ve ektazi riskini arttırabilir. Yaşla birlikte kornea greft başarısının düşebileceği öngörülmektedir fakat çoğu çalışmada çok ileri yaşlara rağmen greft sağkalımı üzerinde anlamlı etki bulunamamıştır (47).

Ölüm Sebebi: Donör seçimiyle ilgili kriterler, 1980 yılında Amerikan Göz Bankası Komisyonunda belirlenmiş ve 2016'da güncellenmiştir.

Bu kılavuzda PKP için başlıca kontrendikasyonlar:

- 1) Sebebi bilinmeyen ölümler
- 2) Tanısı konulamamış nörolojik hastalıklara bağlı ölümler
- 3) Creuzfeldt-Jacob hastalığı
- 4) Progresif multifokal lökoensefalit
- 5) Subakut sklerozan panensefalit
- 6) Konjenital rubella

- 7) Reyes sendromu
- 8) Aktif viral ensefalit, nedeni bilinmeyen ensefalit veya progresif ensefalitler
- 9) Aktif septisemiler (bakteriyemi, fungemi, viremi)
- 10) Aktif bakteriyel veya fungal endokardit
- 11) Aktif viral hepatit
- 12) Kuduz
- 13) Göz içi hastalıklar
 - a. Retinoblastom
 - b. Ön segmentteki malign tümörler veya gözde primer/metastatik adenokarsinom
 - c. Aktif oküler inflamasyonlar (konjonktivit, sklerit, iritis, üveit, vitritis, koroidit, retinit)
 - d. Yapılacak girişim sonucunu olumsuz etkileyebilecek doğumsal veya edinsel bozukluklar, santral korneada skar, keratokonus, keratoglobus
 - e. Pterjium veya diğer konjonktival yüzey bozuklukları
 - f. Kornea optik alan yüzeyini ilgilendiren bozukluklar
- 14) Ön segmente cerrahi geçirilmiş olması
- 15) Lösemi
- 16) HIV seropozitif vericiler
- 17) Hepatit B yüzey antijeni pozitif olan donörler
- 18) Hepatit C seropozitif olan donörler
- 19) HTLV-I veya HTLV-II enfeksiyonu
- 20) Aktif yaygın lenfoma
 - a. Hodgkin hastalığı
 - b. Malign lenfoma

- c. Burkitt lenfoma
- d. Multipl myelom
- e. Mikozis fungoides
- f. Makroglobulinemi
- g. Ağır zincir hastalıkları

21) 1963-1985 yılları arasında insan kaynaklı pitiuter büyüme hormonu kullananlar (53,54)

Donör kornea greftin alınması

Taşınabilir yarık lamba mikroskobu ya da ışık kaynağı ile göz muayene edilir, epitel defekti, kornea ödemi, arkus senilis, ön segment bozuklukları ve geçirilmiş ön segment cerrahisinin bulguları açısından kornea değerlendirilir.

Asepsi-antisepsi kurallarına uyarak ve dokulara zarar vermeden kornea dokusu çıkarılır (47).

Greftin Saklanması

Kornea dokusunun endotel fonksiyonunun korunarak saklanması greft başarısı için çok önemlidir. Kornea saklama yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde günümüzde kornea bankaları kurulmuş ve yaygınlaşmıştır.

Dokuyu salin ile nemlendirilmiş saklama kabında +4 derecede tutmak en basit ve ucuz metottur. 1974 yılında çıkarılan McCarey-Kaufman (MK) saklama solüsyonu korneanın +4 °C'de 4 gün saklanmasına olanak sağlamıştır (39).

Ülkemizde genellikle kısa-orta süreli saklama solüsyonları kullanılmaktadır. Optisol solüsyonu ile 14 güne kadar saklama yapılabilmektedir. Dexol ve K-sol'ün hibrid şekli olup dextran ve %2 kondroitin sülfat içerir. 14 güne kadar greft başarısı üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı bazı çalışmalarca gösterilmiştir (9,10).

Kornea dokusunu uzun süreli saklamak için organ kültürüne ihtiyaç vardır. Organ kültürleri sayesinde dört haftaya kadar saklama yapılmaktadır (40). Daha uzun

sürelî saklama kriyoprezervasyon ile sağlanabilir; ancak bu yöntem diğerlerine göre daha pahalıdır.

Donör korneasının ameliyat öncesinde değerlendirilmesi

Kornea endotelinin yapısının bozulup bozulmadığı ve korneal ödemin kabul edilebilir seviyede olduğu mikroskop ile değerlendirilmelidir. Optisol, pH indikatörü içermektedir. Pembe renkte olması ortam pH'nın uygun sınırlar içinde olduğuna, sarı veya koyu kırmızı renkte olması ortam pH'nın uygun olmadığına ve kornea dokusunun nakil için kullanmaya uygun olmadığına işaret eder.

Donör korneasının endotel tabakası speküler mikroskopi ile kantitatif ve kalitatif olarak ölçülebilir. Aynı zamanda hücre morfolojisiyle ilişkili ayrıntılı bilgiler sunabilir ve mm'de bulunan endotel hücre yoğunluğu ölçülebilir (47).

Endotel sayısı nakil sonrasında yıllar içinde hem fizyolojik olarak hem de patolojik sebeplerle azalmaktadır. Preoperatif endotel sayısındaki yükseklik greft başarısını arttıran bir faktör olabilmektedir (55).

Penetran keratoplasti cerrahisi

Cerrahi Hazırlık

Mümkünse hastalar preoperatif muayene edilmeli, göz içi basınçlara bakılmalıdır. Genel yaklaşım olarak intraoperatif lens protrüzyonunun engellenmesi ve vitre kaybını azaltmak amacıyla preoperatif mannitol verilmektedir (56).

Anestezi tercihi hasta ve cerraha göre değişiklik gösterebilir ve en çok seçilen yöntem operasyonun genel anestezi altında yapılmasıdır. Anestezik ilaç seçiminde göz içi basıncı artırmayacak etkenler öncelikle seçilmelidir. Göz kapakları ve cerrahi alanların temizliği %10'luk povidon iyodin ile sağlanır ve üzeri steril örtü ile örtülür.

Takılan kapak spekulumunun globa bası yapmaması önemlidir, spekulum gözde distorsiyona ve göz içi basınç yükselmesine neden olmamalıdır. Flieringa halkası episkleraya sütüre edilir, skleral destek halkasıdır ve operasyon sırasında skleral dokunun kollapsını engellemektedir (47).

Donör Korneanın Trepanizasyonu

Donör kornea farklı trepan çeşitleriyle kesilebilir. Alıcı yatak hazırlanmasından önce donör korneanın kesilmesi daha uygundur. Son zamanlarda femtosaniye lazer kesimler de tariflenmiştir.

Alıcı Korneanın Hazırlanması

Kornea sütür yerleri ve kornea santralinin işaretlenmesi postoperatif astigmatizmayı azaltmak, açığı hasarını ve doku reddi riskini arttıran desantralize grefonu engellemek için önemlidir.

Alıcı korneayı ayırmak için basit manuel trepan, vakum trepan veya motorize trepan kullanılabilir. Öncelikle trepanla epitelde bir iz oluşturulur. Oluşturulan iz işaretlenen noktanın santralindeyse sağa-sola hareketlerle korneanın %85-90 derinliğine ulaşacak kadar kesilir. Elmas bıçak yardımı ile oluşturulan yara yerinden ön kamaraya girilip manuel olarak makas ile hasarlı kornea dokusu çıkarılır. Genel olarak kullanımda olan trepanların çapları 7,25-8,5 mm arasında değişmektedir. 6,5 mm'den küçük olan grefonların postoperatif başarısı düşükken, 8,5 mm üzeri olan grefonlarda glokom, vaskülarizasyon ve periferik ön sineşi gelişebilmektedir. Alıcı yatak genellikle 0,25-0,50 mm daha küçük kesilmektedir ve bu uygulama ön kamara derinliği ve normal korneal kurvatürün oluşması için önemlidir (57).

Cerrahi

İlk olarak donör kornea işaretlenip kesildikten sonra, kesifleşmiş olan alıcı korneasının santrali ve sütür yerleri işaretlenir. Trepanla alıcı kornea dokusu yeterli kalınlıkta kesildikten sonra, kalan kısım elmas bıçak ve makas yardımıyla manuel olarak kesilip çıkarılır. Viskoelastik madde iris lens diyaframının önüne konulur. Pupil daraltıcı (miyotik) ilaçlar (asetilkolin, karbakol), iris lens diyaframı öne itilir ise lensin önüne mekanik bir bariyer oluşturarak lens ve vitrenin protrüde olmasını engeller. Globa bası oluşturulabilecek ve glob basıncını arttıracı durumlar ekarte edilmelidir. Donör kornea dokusu alıcı yatağa yerleştirilip 10/0 naylon sütür ile

birbirine dik dört kardinal sütür konulur. Sonrasında önce alıcı korneadan geçilerek ve kornea %85-90 kalınlığına ulaşarak tek tek ya da süreğen 10/0 naylon sütürle strasyona devam edilir. Korneadan tam kat geçilir ve ön kamara sızıntısı olursa bu bölgeler bakteri geçişi için risk oluşturur.

Süreğen sütürlerin atılması, operasyonun süresini kısaltır. Tek tek sütürler atıldığında ise düğüm yerleri iyi gömülmelidir, aksi takdirde açıkta kalmış olan düğümler sekresyonları biriktirerek enfeksiyonlar ve korneal vaskülarizasyon açısından risk oluştururlar. Sütürler genel olarak yaklaşık 12 ay sonrasında alınır (58). Operasyonun sonunda n kamarada kalan viskoelastik maddeler dengeli tuz çözeltileri (BSS gibi) yardımıyla uzaklaştırılıp ön kamara sıvı ile oluşturulmalıdır. İşlem sırasında periferik iridektomi, pupilloplasti, n vitrektomi, ve sineşiyotomi vaka durumuna göre yapılabilir.

Penetran Keratoplasti Komplikasyonları

İntraoperatif Komplikasyonlar

1. Düzensiz trepanizasyon
2. Yetersiz vitrektomi
3. Lens veya iriste trepan, makas ya da diğer cerrahi aletlerin hasarı
4. Alıcı yatakta yetersiz grefon santralizasyonu
5. Vaskülarize korneanın yara yerinde oluşan aşırı kanama
6. Yara yerinde iris prolapsusu
7. Suprakoroidal hemoraji (59)
8. Yara yeri kaçağı
9. Donör endoteline hasar
10. n kamara kollapsı
11. Sütürlerin kopması
12. Gz içi lens (GİL) drop
13. Nükleus drop
14. Greftin ters yüzünün yerleştirilmesi (60)

Postoperatif Komplikasyonlar

1. Sıg 6n kamara
2. Persistan epitel defekti
3. Glokom
4. Kornea 6demi
5. Yara yeri sızıntısı ve ayrılması
6. Primer hastalığın n6ks6 (61)
7. S6t6re bağlı problemler
8. Endoftalmi
9. İris prolapsusu
10. Periferik anterior sineşı oluşumu
11. Y6ksek astigmatizma
12. Retrokorneal fibr6z membran (62)

Cerrahi Sonrası Bakım

Operasyonun sonrasında topikal antibiyotik tedavisi mutlaka verilmektedir. 6zellikle postoperatif ilk ayda yara yerlerinin tamamen kapanmasına kadar antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Topikal tedavi olarak genel kullanım şekli moksifloksasin i6eren damlanın g6nde 6 kez bir damla pozoloji ile uygulanmasıdır. Hasta enfeksiy6z sebeplerden dolayı opere olduysa etkenlere y6nelik topikal tedaviler verilir. Perforasyon sonrasında ya da enfeksiyon sonrasında yapılmış olan tektonik keratoplastilerde topikal tedaviye ek olarak sistemik tedavi de tercih edilir. Herpes vir6s nedeniyle nakil yapılmış hastalarda postoperatif oral asiklovir profilaktik olarak tedaviye eklenir.

Kortikosteroid tedavi %1 topikal prednizolon asetat ya da %1 deksametazon fosfat olarak 6x1 ya da 4x1 pozoloji ile başlanır. Red riski y6ksek olanlarda medikasyon sıklığı arttırılabilir. Sistemik steroid, topikal steroid ile kontrol edilemeyen ya da topikal steroid kullanımını uygun olmayan hastalarda kullanılabilir.

Sikloplejik ve midriyatik ajanlar siliyer spazma bağlı ağrıyı azaltmada ve enflamasyona sekonder olan posterior sineşinin gelişimini engellemede etkilidir.

Epitel fonksiyonu d6zg6n olmayan ve kuru g6z6 olan hastalarda suni g6zyaşları 6x1 ya da 4x1 pozoloji ile kullanılabilir.

Red riski yüksek olarak öngörülen hastalarda topikal %0,05 siklosporin tedavisi 4x1 ya da 2x1 pozoloji ile kullanılabilir (63).

Prognoz ve Grefon Reddi

Günümüzde greft reddi yeni geliştirilmiş olan sütür çeşitleri ve sütürasyon teknikleri, topikal ve sistemik steroid tedavileri, topikal ve sistemik immün süpresif tedavilere rağmen tamamiyle önlenememektedir (64,65).

Erken Greft Yetmezliği

Cerrahi sonrası 1. günden itibaren başlayan greft bulanıklığı görülür. Kusurlu olan donör korneanın epitelinden ya da cerrahi travmayla ortaya çıkan endotel fonksiyonunun bozukluğundan kaynaklanır (66).

Geç Greft Yetmezliği

Greft yetmezliğinin başlıca nedeni alıcı dokuda donör kornea dokusuna karşı gelişen immünolojik bir reaksiyondur. Nakil sonrasında 10-14 gün saydamlığını korumuş olan korneanın daha sonrasında saydamlığının azalması ve kesifleşmesiyle greft reddinin tanısı konulabilir.

Greft reddinin tipleri greftin tutulan tabakasına göre farklı adlandırılır. Bu tipler; endotelyal, stromal ve epitelyal tiplerdir. Greft reddi tek çeşit olarak da ortaya çıkabildiği gibi çoğunlukla birkaç tabakanın beraber tutulduğu kombine tip olarak görülmektedir (67).

Epitelyal Greft Reddi

Reaksiyon alıcı ve donör korneanın birleştiği yerden başlar ve santrale doğru ilerler. Genellikle ilk 3 ay içinde görülür. Subepitelyal red, daha da geç ortaya çıkan tipidir ve Bowman tabakasına doğru da infiltrasyon oluşturmaktadır. Endotel reddine kadar ilerleyebilir (68).

Stromal Greft Reddi

Genellikle epitelyal ya da endotelyal redle birliktelik bulunur. Stromada infiltrasyon bulunmaktadır ve greft bulanıklaşır (68).

Endotelyal Greft Reddi

Donör korneanın endoteline karşı gelişmiş olan immun reaksiyon sonucunda meydana gelmektedir. İritis ve beraberinde keratik presipitatlar (Khodadoust hattı) mevcuttur. İvedilikle tedavi başlanmalıdır, geç kalındığı durumda geri döndürülemez greft yetmezliği gelişir (69,70).

Greft Reddinin Tedavisi

Reddin tanısı konulduğu gibi hastaya zaman kaybetmeden yüksek doz topikal steroid tedavisi kontrendikasyon yok ise verilmelidir. Eğer topikal steroid kullanımı için engel oluşturan bir durum mevcutsa sistemik steroid tedavisi verilmelidir. Topikal tedaviler özellikle epitelyal redde etkilidir. Stromal veya endotelyal red olduğunda ise tedaviye sistemik yüksek doz steroidler eklenebilir (71).

RAMAN SPEKTROSKOPİSİ

Genel Bilgiler

İnsan da dahil olmak üzere daha gelişmiş türlerin gözleri, ortam ışığını retina dokusunun ışık algılayıcı hücrelerine getirmek için optik saydam yapılardan yapılmıştır. Retina hücreleri, ışığı bir elektrik sinyaline dönüştürür ve bu sinyal optik sinir yoluyla beyin dokusuna taşınır. Gözde bulunan her yapı yaşlanma, lokal veya sistemik hastalıklar ve travma gibi olaylar nedeniyle değişen durumların gelişmesinde rol oynar. Ön segmentten başlayarak iyi bilinen birkaç örnek: kalıtsal veya dahili hastalıklar, travma ve yüksek göz tansiyonu nedeniyle kornea opasiteleri oluşması; aköz hümörün biyokimyasal yapısının diyabet gibi hastalıklar nedeniyle değişmesi, üveitte Tyndall etkisi (protein birikimi) göstermesi; lenste yaşlanma, farmakolojik maddeler (örn. kortikosteroidler) ve travma nedeniyle katarakt gelişmesi; vitreusun diyabet gibi sistemik hastalıklar nedeniyle değişmesi ve son olarak retina dokusunun yaşa bağlı (yaşa bağlı makula dejenerasyonu), diyabet veya hipertansiyon gibi sistemik hastalıklar (diyabetik veya hipertansiyon retinopatisi) ve travma nedeniyle değişiklikler göstermesidir . Vitreus, özellikle yırtık veya dekolman cerrahisinden sonra, proliferatif vitreoretinopati geliştirebilir. Yukarıda bahsedilen göz dokularının

tümünde, bakteri veya virüslerin neden olduğu bir enfeksiyon, ilgili dokunun temel bileşimini değiştirebilir (73).

Kornea hücre katmanlarını incelemek için speküler mikroskopi ve konfokal mikroskopi, korneanın eğriliğini ölçmek için kornea topografisi ve retinal kan akışını incelemek ve sıvı dinamiğindeki değişiklikleri saptamak için floresein anjiyografi dahil olmak üzere ışık kullanan çeşitli tanı teknikleri mevcuttur. Lazer flare metre, ön kamaradaki toplam protein miktarı hakkında bilgi verir, optik koherens tomografi, farklı göz yapılarının görüntülenmesini ve ölçülmesini sağlar, lazer taramalı oftalmoskop, retinal kan akışı veya optik sinir değişiklikleri hakkında bilgi sağlar. Tanı amaçlı olarak kullanılacak diğer görüntüleme yöntemleri, gözle sınırlı olmamakla birlikte, ultrason, manyetik rezonans görüntüleme ve bilgisayarlı tomografiyi içerir. Bunlarla birlikte, doku bileşimi veya içerdiği kimyasallar hakkında nicel bilgi, ancak biyopsi veya iğne aspirasyonu yoluyla materyal toplama ve örneklerin in vitro olarak incelenmesi gibi invaziv tekniklerle elde edilebilir. Bu bilgilerin invaziv olmayan bir şekilde elde edilmesi, bulaşıcı hastalıkların yayılma riskini sınırlamak, incelenen göze enfeksiyon (endoftalmi) girmesini önlemek ve yerinde hızlı bilgi almak gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Spektroskopi veya ışığın herhangi bir maddeyle etkileşimi, bu amaca ulaşmak için olanaklar sunar. Spektroskopik teknikler daha önce birçok dokuda kullanılmıştır. Madde ile etkileşime giren ışık emilebilir, yayılabilir veya saçılabilir. Günümüzde absorpsiyon, floresan ve saçılma spektroskopileri en yaygın olarak kullanılmaktadır. Işınlara saçılmasına bağlı bir teknik olan Raman spektroskopisi, suyun zayıf kızılötesi geçirgenliği nedeniyle absorpsiyon spektroskopisinin daha az kullanışlı olduğu sulu ortamlarda moleküllerin araştırılmasına izin verir. Güçlü bir monokromatik ışık kaynağına ihtiyaç duyan Raman spektroskopisi, 1960' da lazerin piyasaya sürülmesinden ve 1970'lerde daha hassas foton dedektörlerinin geliştirilmesinden sonra ortaya çıkmıştır. Her yıl Raman spektroskopisi ile ilgili önemli miktarda literatür yayınlanır ve Raman spektroskopisinin tıbbi, biyolojik, teknik ve çevresel disiplinlerde sayısız uygulaması vardır (73).

Tarihçesi

1928 yılında Hintli fizikçi C.V. Raman, belirli moleküllerce saçılan ışığın ufak bir kesrinin görünür alandaki dalga boyunun, gelen ışığın dalga boyundan farklı

olduğunu buldu. Ayrıca dalga boylarındaki kaymaların, saçılmadan sorumlu moleküllerin kimyasal yapısına bağlı olduğunu da keşfetti. Bu buluşundan ve olguyu sistematik incelemesinden dolayı 1931 yılında Nobel Fizik Ödülü'nü aldı (74).

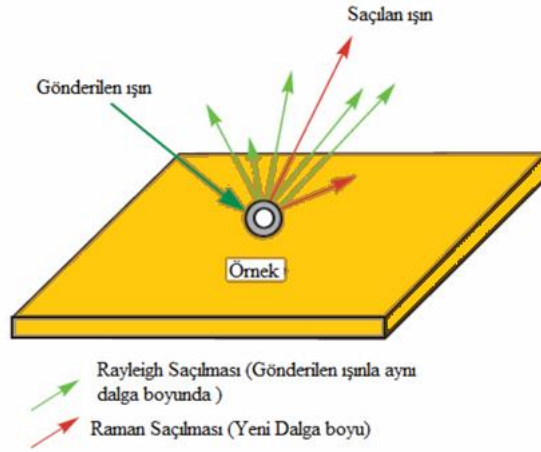
Raman Spektroskopisi Genel Prensipleri

Raman Spektroskopisi bir numunenin monokromatik ışıktan oluşan güçlü bir lazer kaynağıyla ışınlanmasıyla saçılan ışının belirli bir açıdan ölçümüne dayanır. İlk çalışmalarda bir civa arki kullanılmıştır. Günümüzde yüksek şiddetli gaz veya katı lazer kaynakları kullanılmaktadır. Işınlandırma süresince saçılan ışının spektrumu uygun bir görünür bölge spektrofotometre yardımıyla, çoğunlukla 90° açıda ölçülür. Raman hatlarının şiddetleri çoğu zaman kaynağın %0.01'i kadardır. Bu durum algılama ve ölçmelerde bazı deneysel sorunlarla karşılaşılmasına neden olur (75,76).

Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi esnasında ışık absorpsiyonu olayı gerçekleşmiyorsa ışık saçılması olayı meydana gelir (77).

Işık saçılması sırasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur ve bu tür elastik saçılma olayına *Rayleigh saçılması* denir ($\lambda_{\text{yansıyan}} = \lambda_{\text{lazer}}$). Elastik saçılma olayının yanı sıra saçılan ışığın çok az bir kısmı elastik olmayan saçılma ise bu da *Raman saçılması* adını alır ($\lambda_{\text{yansıyan}} > \lambda_{\text{lazer}}$). Raman spektroskopisi yönteminde molekül ile etkileşen ışığın dalga boyuna göre saçılan ışığın dalga boyunda oluşan farklar ölçülür. Bu farklar *Raman kayması* olarak adlandırılır. Moleküller ile etkileştirilen ışığın kaynağı olarak özellikle son yıllarda genellikle lazer türü kaynaklar kullanıldığından bu yöntem Lazer Raman Spektroskopisi adı da verilir (78-80).

Ramana göre ışın, geçirgen bir ortamdan geçerken, ortamdaki türler, gelen ışın demetinin bir kısmını çeşitli yönlere doğru saçarlar. Raman saçılmasının diğer saçılma türlerinden farkı, saçılan ışının bir bölümünün frekans değişimlerine uğramasıdır. Bu değişimler, moleküllerdeki titreşim ve enerji geçişleriyle meydana gelir.



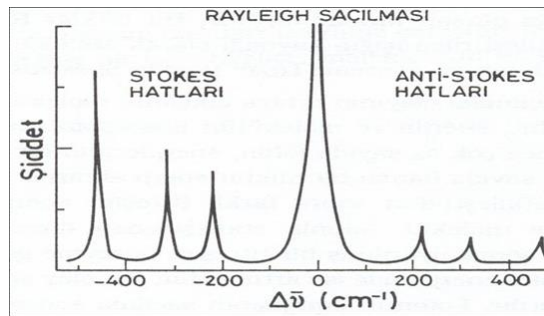
Şekil 1. Raman ve Rayleigh Saçılmasının Şematik Gösterimi

Ramanda yayınlanan ışın üç tiptir:

- 1- Stokes saçılımı
- 2- Anti-Stokes saçılımı
- 3- Rayleigh saçılımı: Dalga boyu, uyarıcı kaynağın dalga boyuyla tamamen aynı olup bu saçılım diğer iki tipten belirgin bir şekilde daha şiddetlidir.

Dalga boyu, uyarıcı kaynağın dalga boyuyla tamamen aynı olup diğer iki tipten daha belirgin bir şekilde şiddetli olan saçılmalar *Rayleigh* saçılmalarıdır.

Etkileşmeden sonra molekülün titreşim enerjisi artıyorsa bu tür saçılan ışımalara *Stokes* hatları denir. Tersini oluşuyorsa *Anti Stokes* hatları denir (78-80).



Şekil 2. 488 nm lazer ile uyarılan CCl₄'ün Raman spektrumu

Raman spektrofotometre 3 ana bileşenden oluşur. Bir (ışın) lazer kaynağı, bir numune aydınlatma sistemi ve uygun bir spektrometre. Raman saçılma sinyali Rayleigh saçılma sinyalinden zayıf olduğundan spektrometrenin iyi olması gerekir.

Raman avantajları:

- Maddenin üç hali için de uygulanabilir.
- Hiçbir numune hazırlama işlemine gerek duyulmaz.
- Her bir maddeden elde edilen spektrum benzersiz olduğu için maddelerin tanınması için kullanılabilir.
- Moleküllerin üzerinde bozucu bir etkisi yoktur.
- Vakum ortamında çalışmayı gerektirmez.
- Kısa zaman aralıklarında Raman spektrumları kaydedilebilir.
- Sulu ortamlarda spektrumlar kolayca kaydedilebilir. IR de bu özellik yoktur.
- Cam kaplar kullanılabilir (Normal Raman)
- Fiber optik kablolar kullanılarak spektrum alınabilir.
- Hızlı analiz sağlar.

Raman dezavantajları:

- Metaller ve alaşımlar için kullanılamaz.
- Raman etkisi çok zayıftır. Bu yüzden düşük duyarlılığa sahiptir, bu durumda düşük konsantrasyondaki numune spektrumu alımında zorluk yaşanır.
- Bazı maddelerin floresans özelliği spektrum almayı engelleyebilir.
- Renkli numuneler Lazer ışığını absorplar ve yanar.
- Pahalıdır.

Kullanım Alanları

Raman spektroskopisi genel olarak inorganik, organik ve biyolojik sistemlerin kalitatif ve kantitatif analizinde uygulanır. Silikat cam ve eriyiklerin yapısal incelemesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem kızılötesi hem de Raman Spektroskopileri Alüminyum silikat eriyikleri ve camlarda H₂O, CO₂ ve H₂ gibi uçucuların erime mekanizmalarını incelemek için kullanılır. Daha farklı uygulamalar adli tıp uzmanları tarafından uyuşturucu ve patlayıcıların tanımlanması ve hassas şekilde restore edilmelerini sağlamak amacı ile tarihi sanat yapılarının üzerindeki boya ve pigmentlerin analizlerini kapsamaktadır (13).

Raman Spektroskopisi ve Kornea

Kornea, insan gözünün kırma gücünün yaklaşık %70'ini oluşturur ve bu nedenle optimal görüşün korunmasında önemli bir rol oynar. Kornea, su içeriğinin dışında çoğunlukla bir alifatik amino asit olan glisin ve tek siklik amino asit olan prolinden oluşan yaklaşık %15 oranında kollajen proteini içerir. Raman spektroskopisinin katkıda bulunabileceği alanlar arasında korneada bulunan kollajen proteinlerinin, kornea hidrasyon durumunun ve topikal olarak uygulanan oküler ilaçlarının farmakokinetiğinin araştırılması yer alır (13).

Konvansiyonel Raman spektroskopisi ile kornea kollajen proteinlerinin yüksek kaliteli Raman spektrumlarını elde etmek, dahili otofloresan tepkilerinden gelen güçlü interferanslar ve aşırı yüksek lazer uyarma seviyeleri nedeniyle zordur. Ancak Fourier tabanlı IR ve Raman spektroskopi tekniklerinin geliştirilmesinden sonra bu alanda bazı ilerlemeler meydana geldi. Bu teknikler, floresansın spektrum üzerindeki etkisinden kaçınır ve ayrıca daha yüksek hassasiyete sahiptir. Hayvan Raman spektrumlarını saf tip I kollajen ve proteoglikanlar, hyaluronik asitler, kondroitin sülfatlar ve keratin sülfatlar gibi diğer bağ dokusu bileşenlerinininkilerle karşılaştırarak, hayvan spektrumlarının gözlemlenen amid I ve III tepkilerini atamak mümkün oldu. Ayrıca kornea kollajeninin nispeten büyük miktarda fenilalanin amino asit içeriğine sahip olduğu bulundu. Bauer ve ark. ve Erckens ve ark. canlı tavşan korneasının hidrasyon durumunu ve ilaca bağlı değişikliklerini araştırmak için konfokal Raman spektroskopisini kullandı. Farmakokinetik uygulamalar sayesinde, gelecekte ilaçların kornea epiteline yapışması, farklı kornea katmanlarına nüfuz etme yetenekleri ve bu katmanların hidrasyon durumu gibi soruları incelemek mümkün olabilir. Yöntemin gerektirdiği aşırı lazer eksitasyon ışık seviyeleri nedeniyle sağlıklı canlı insan gözünde Raman bazlı kornea hidrasyon ölçümleri henüz mümkün olmamakla birlikte, yasal olarak kör hastalarda kornea hidrasyon durumu başarıyla ölçülmüştür (13).

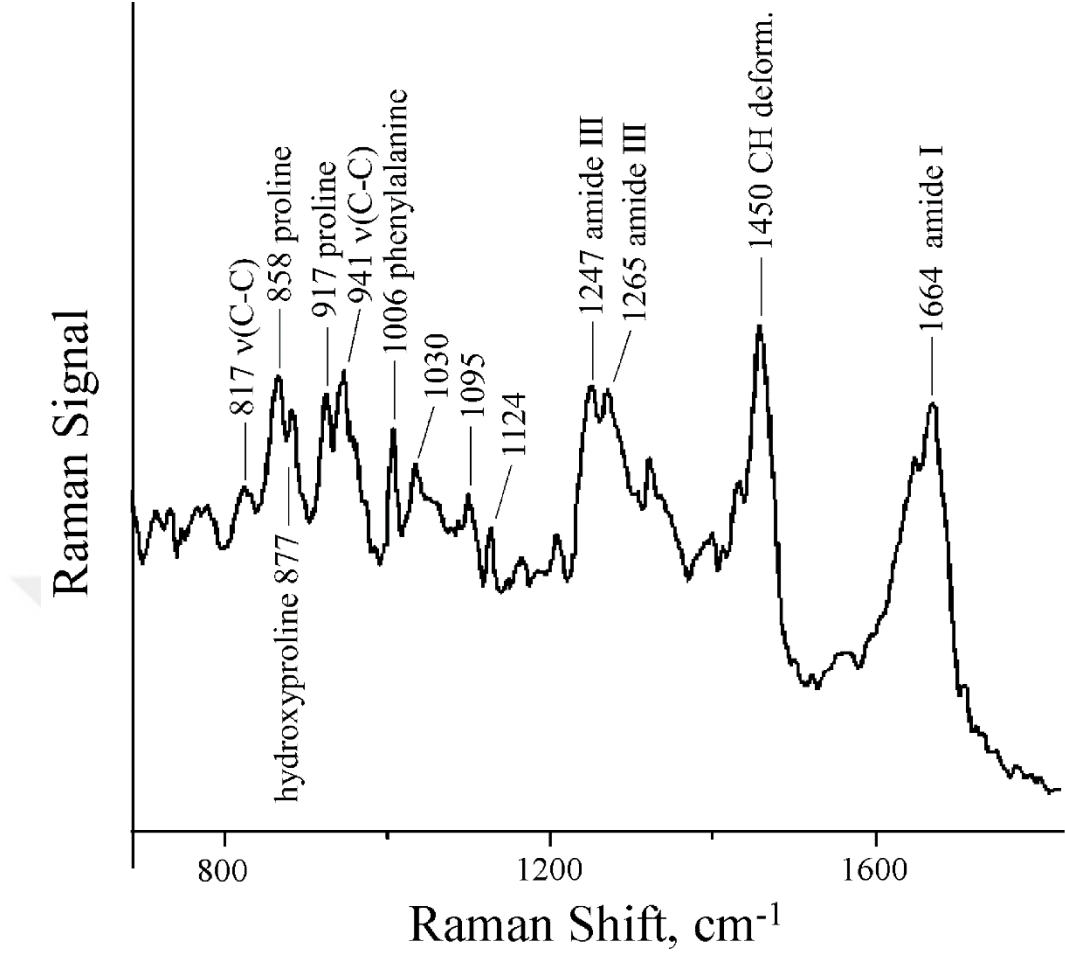
Raman spektrumunda 500–1700 cm^{-1} bölgesinde çok sayıda farklı protein bileşeninin ölçülebildiği bölgeler bulunmaktadır (81). Aromatik amino asitlerden fenilalaninin (Phe) 1004 cm^{-1} 'de, triptofanın (Try) 760 cm^{-1} 'de ve 600-900 cm^{-1} 'de

birkaç çeşidi olan tirozinin (Tyr) iyi ölçülebilen bölgeleri vardır (11). 959 cm⁻¹'de fosfat bandı, karbon içeren bileşenler hakkında bilgi verir. Kollajen için en sık kullanılmakta olan bant Amide I bandıdır (82,83). Bu bandda bulunan en önemli değerler 1660 cm⁻¹ ve 1690 cm⁻¹ dir (84). Amide I'in tepe değerleri olan I1670/1640 ve I1670/ 1690 oranları kollajen hakkında önemli bilgiler vermektedir 85,86). I1670/1640 değeri kollajenin helikal şekli ile ilgili, dolayısıyla kollajenin kalitesi ile ilgili bilgi verir (87,88).

Genel olarak dokularda, fosfat bandının 959 cm⁻¹'da bulunan değeri, mineral içeriklerini ifade etmektedir.1660 cm⁻¹'deki Amide I değeri, 1450 cm⁻¹'deki CH₂ değeri, 858 cm⁻¹ deki Prolin ve 877 cm⁻¹ deki Hidroksiprolin değerleri Raman spektroskopisinde sıklıkla kullanılır (81,88). 1800 ve 2500 cm⁻¹ arasındaki spektral bölge, kayda değer bir Raman tepkisi göstermez (81,89).

Tablo 1. Raman Spektrumundaki Pik Seviyeleri

Dalga boyu (cm ⁻¹)	Deneysel karşılığı
954	α-heliks, prolin, valin
1005	fenilalanin
1115	D-mannoz
1186	tirozin
1311	nükleik asit bazları
1449	fosfolipidler
1580	fenilalanin, asetoasetat, riboflavin
1657	α-heliks, kollajen



Şekil 3. Eksize edilmiş tavşan korneasının raman spektrumları (90)

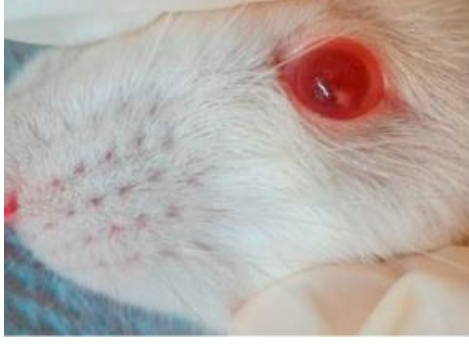
GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun 06.04.2021 tarih ve 04 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının temini, bakım ve beslenmeleri Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanmıştır. Deneyde 18 adet ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen, üç aylık *Rattus norvegicus* türü Wistar cinsi yetişkin dişi sıçanlar kullanılmıştır. Tüm sıçanlar çalışma süresince standart sıçan yemi ve su ile beslenmiştir. İlk gün tüm sıçanlar randomize şekilde 1,2,3,7,8,9,12,13,14.günlerde korneaları çıkarılacak şekilde ve her gün için 2 sıçan olmak üzere gruplandırılmıştır, 18 adet sıçandan toplam 36 adet kornea alınmıştır. Ayrıca 12,13,14. Günler alınan kornealar solüsyon içinde bekleme sürelerine göre erken dönem, 7,8,9.günlerde alınanlar orta dönem, 1,2,3.günlerde alınan kornealar geç dönem olarak adlandırılmıştır.

Kornea Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması

Etik kurul başvuru ve kararında belirtildiği gibi 1,2,3,7,8,9,12,13,14. günlerde her gün 2 adet sıçana öncelikle Ketamin HCL 87mg/kg İ.M ve Ksilazin HCL 13mg/kg İ.M verilerek anestezi altında kalpten kan alınma(kansızlaştırma) yöntemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gerekli sterilizasyonun ardından no10 bistüri ucu ile korneal giriş açılmış, vannas makas ile kornea dokusu uzaklaştırılmıştır. Alınan doku, kornea saklama solüsyonu optisol içine konulmuş ve diğer göz için de aynı işlem gerçekleştirilmiştir. Alınan tüm kornealar, her solüsyon kabında 1 adet olacak şekilde konulup kornealar solüsyonda bekleme süresi, grup ve gözün yönüne göre gruplandırılmıştır. İşlemler sırasında kornea dokusunun zedelenmemesine ve sterilizasyonun bozulmamasına özellikle dikkat edilmiştir, kornea çıkarımı sırasında herhangi bir komplikasyon yaşanmamıştır. Alınan kornealar +4°C'de ölçüm anına dek saklanmıştır.



Şekil 4. Kornea çıkarımı öncesi rat

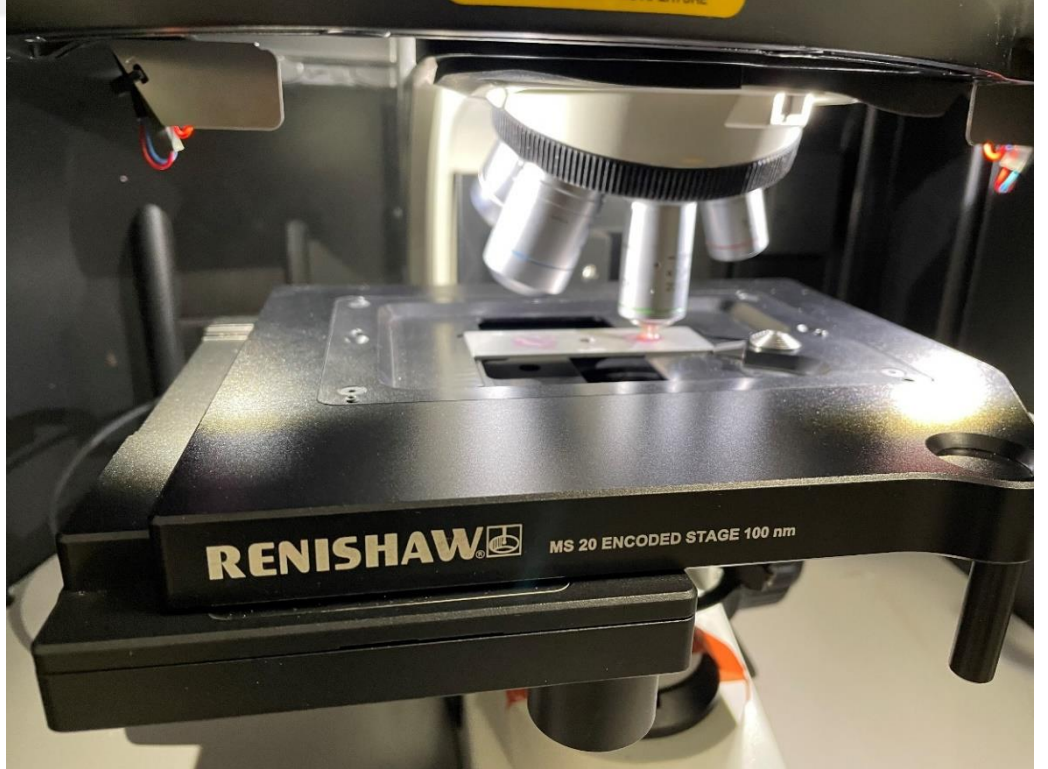
Kornea örneklerinin Raman Spektroskopisinde Analizi ve Verilerin

Hesaplanması

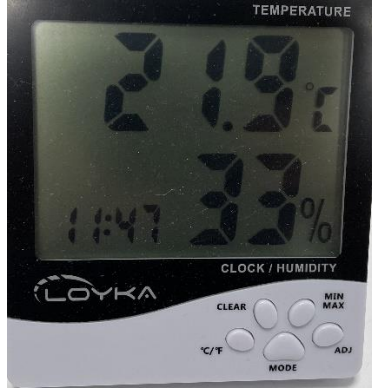
14.gün son korneanın alımından sonra alınan korneaların analizi Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Renishaw inVia raman microscope cihazı ile yapılmıştır. Raman spektroskopisinin kullanımından önce kalibrasyonu yapılmıştır. Spektrumların elde edilmesi sürecinde de özellikle heterojen bir ortamda gürültü filtrelemesi, düzleştirme, normalleştirme ve floresans arka plan kaldırma gibi işlemler uygulanmıştır. Solüsyondan çıkarılan kornealar ölçüm sırasında parlamayı önleyecek metal bir levha üzerine alınarak katlanmış ve mikroskobun altına yerleştirilmiştir. Raman spektroskopisinde bulunan mikroskop ile kornea üzerine odaklanılmış ve görüntü net olarak alındıktan sonra ölçümler yapılmıştır. Numunelerin incelenmesi süresince 785nm dalga boyuna sahip olan lazer kullanılmış ve istenen spektrumlar elde edilmiştir. Ölçüm sırasında objektif 20x, ekspozür süresi 5sn ve lazer gücü 10mW olarak kullanılmıştır. Ölçümler sırasında oda sıcaklığı 21,9°C ve nem seviyesi %33 olarak ölçüldü. Tüm numuneler 0-1800 cm^{-1} spektrum aralığında tarandı. Her korneadan 3 adet ölçüm alınmıştır.



Şekil 5. Renishaw inVia raman mikroskobu



Şekil 6. Raman mikroskobu ve metal levha üzerindeki kornea



Şekil 7. Ölçümler sırasında oda sıcaklığı ve nem seviyesi

Alınan tüm ölçümler NGS LabSpec uygulamasında değerlendirilmiş, 877 nm'de Hidroksiprolin, 858 nm'de Prolin, 959 nm'deki ν 1PO₄, 1072 nm'deki CO₃, 1275 nm'deki Amide III, 1450 nm'deki CH₂, 1660' deki Amid I ile 1635 ve 1690 bantlarındaki değerler ölçülmüştür. Zaman içinde korneadaki bozulma oranlarını gösterebilmek için özellikle kollajen ve proteoglikanları gösteren 1670/1640, 1275/1247, 938/925, 858/877, 1033/1450, 1248/1043 oranları hesaplanmıştır (81,82,87). Ayrıca her göz için yapılan 3 ölçümün ortalaması, gün gün tüm korneaların ortalamaları ve erken-orta-geç dönemlerin ortalamaları alınmıştır.

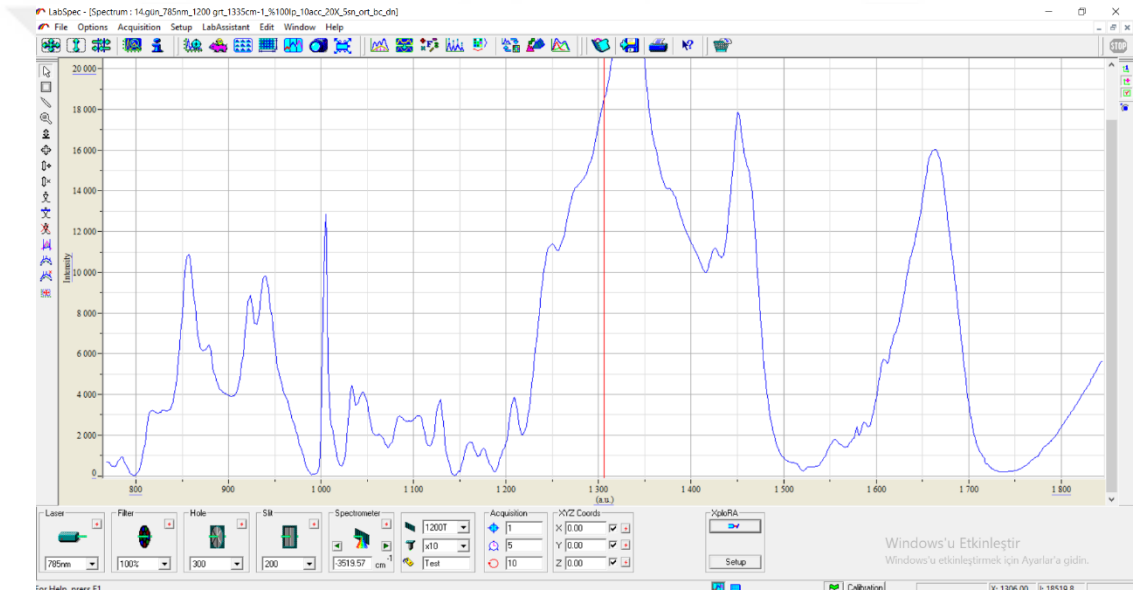
İstatistiksel Analiz

Raman spektroskopisinde elde edilen ölçüm ve oranların istatistiksel analizi için ANOVA testi kullanılmıştır. ANOVA testi yardımıyla gruplar arasındaki farkın anlamlılığına bakılmıştır, normal dağılıma uymayan verilerde ise Kruskal Wallis testi yapılmıştır ayrıca gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu durumlarda farkı yaratan grubun saptanması için Post-hoc analizi yapılmıştır. Sonuçların istatistiksel analizleri için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

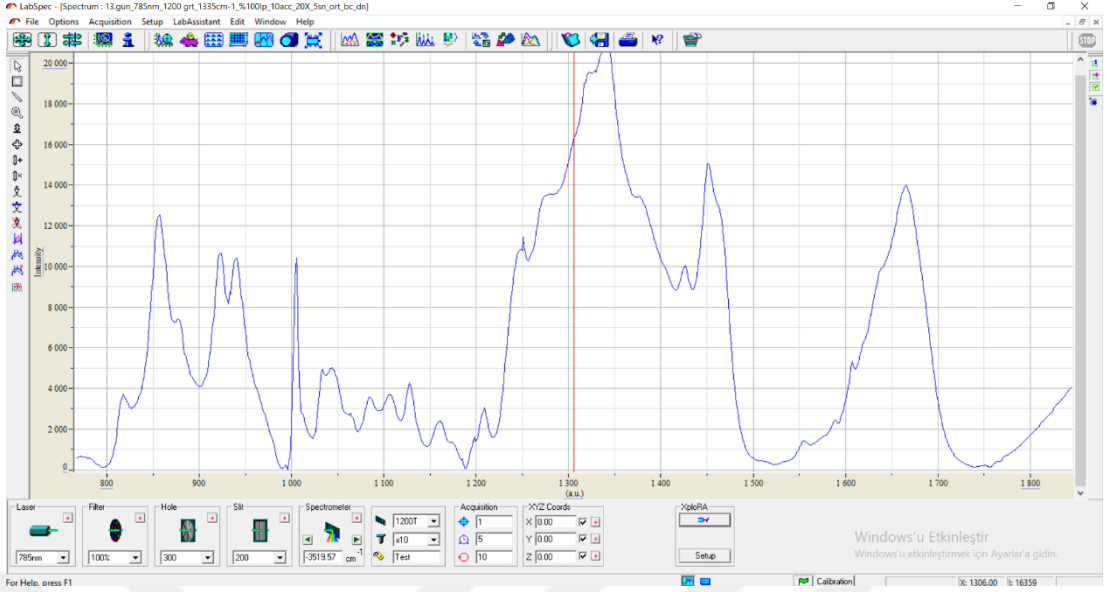
BULGULAR

Çalışmada sıçan kornealarının kornea saklama solüsyonunda zaman içerisindeki değişimi raman spektrofotometrisi ile incelenmiştir.

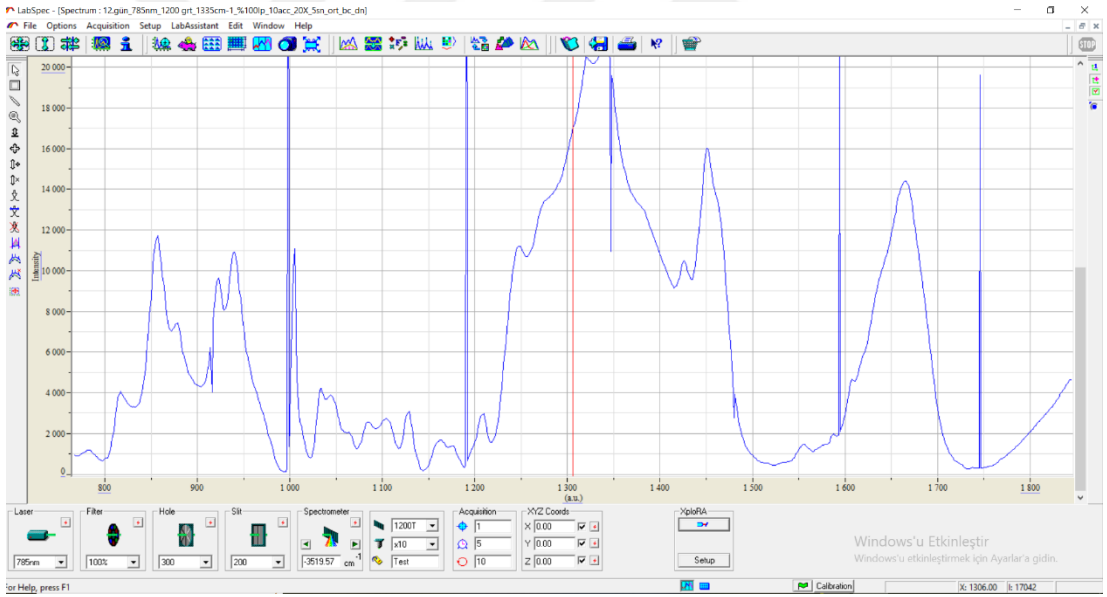
Deneyde 18 adet ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen, üç aylık *Rattus norvegicus* türü Wistar cinsi yetişkin dişi sıçanın 36 adet korneası kullanılmıştır. 1,2,3,7,8,9,12,13,14.günlerde her gün 2 adet sıçanın sağ ve sol korneaları alınmıştır. Her korneadan 3 adet ölçüm alınmıştır. Alınan 3 ölçümün ortalaması alınmış, kornealar birbiriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca kornealar gün gün ortalamalarına göre ve erken-orta-geç döneme göre karşılaştırılmıştır.



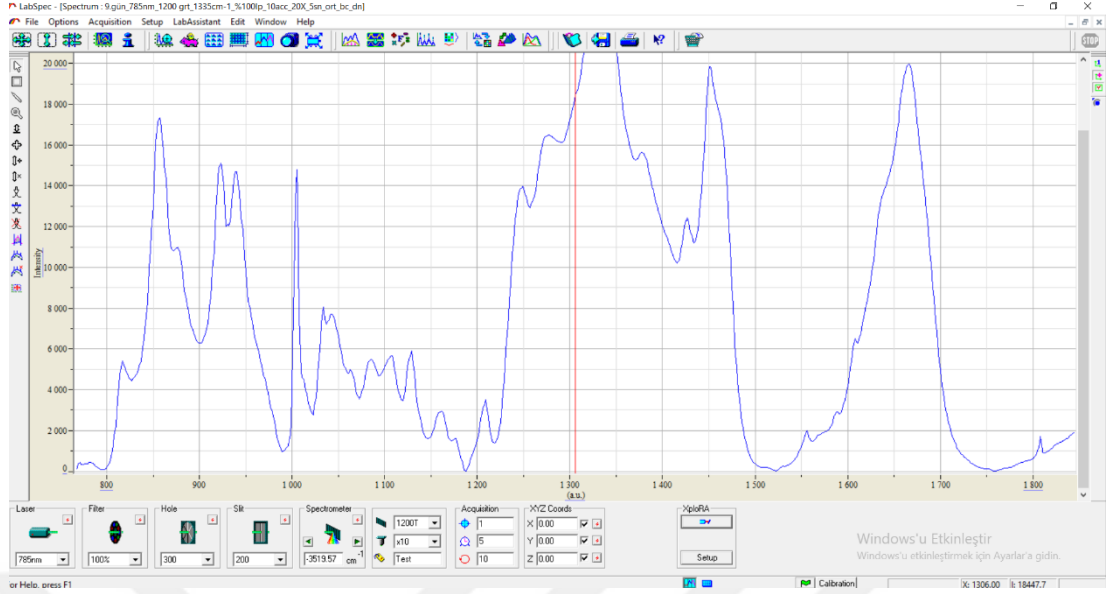
Şekil 8. Solüsyonda 1 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü



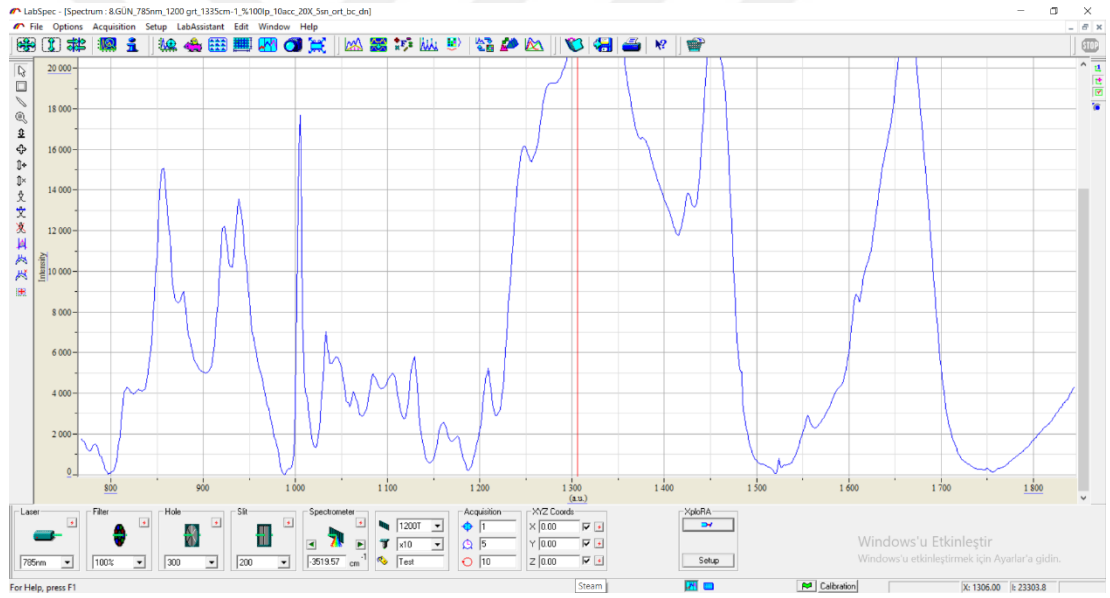
Şekil 9. Solüsyonda 2 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü



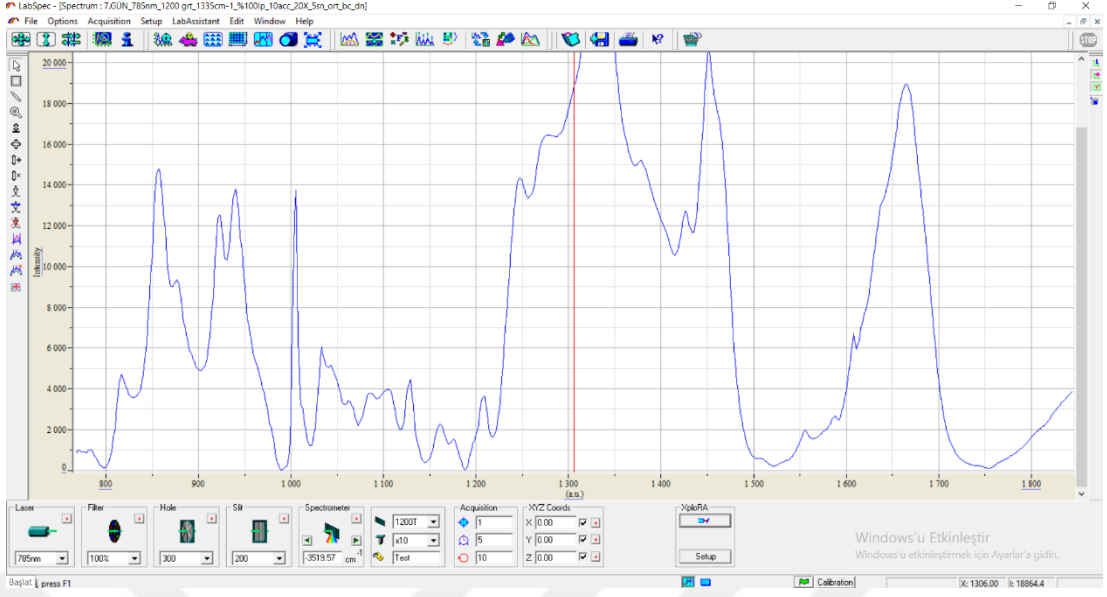
Şekil 10. Solüsyonda 3 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü



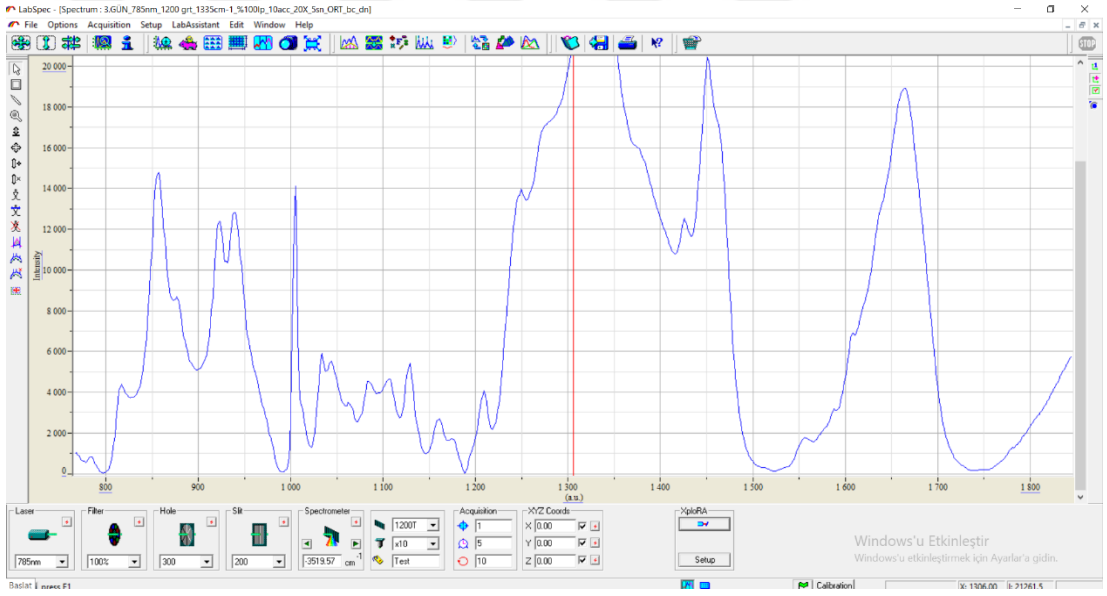
Şekil 11. Solüsyonda 6 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü



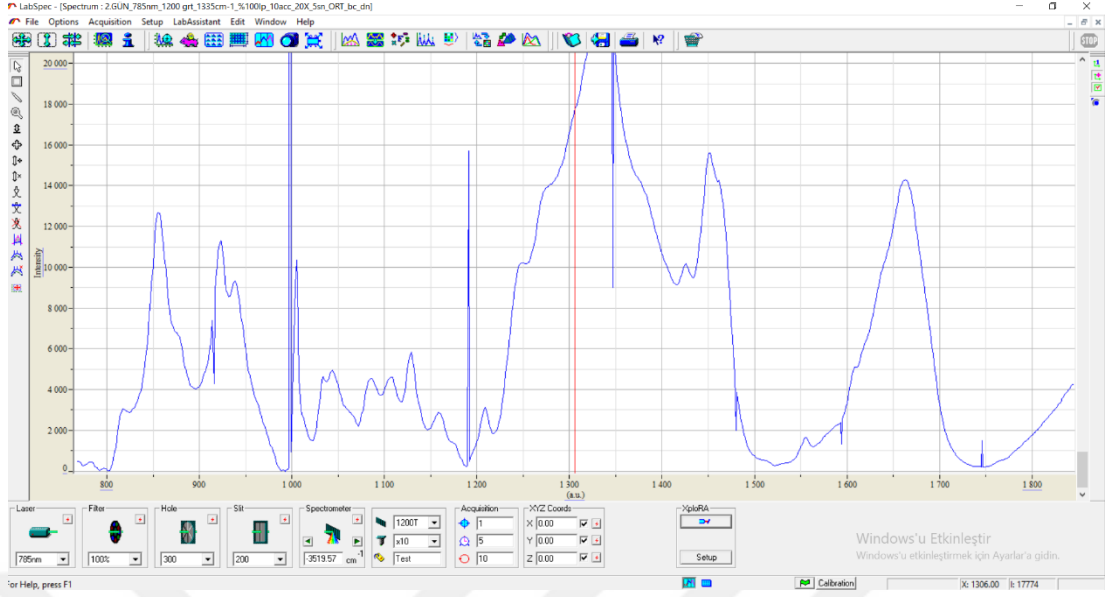
Şekil 12. Solüsyonda 7 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü



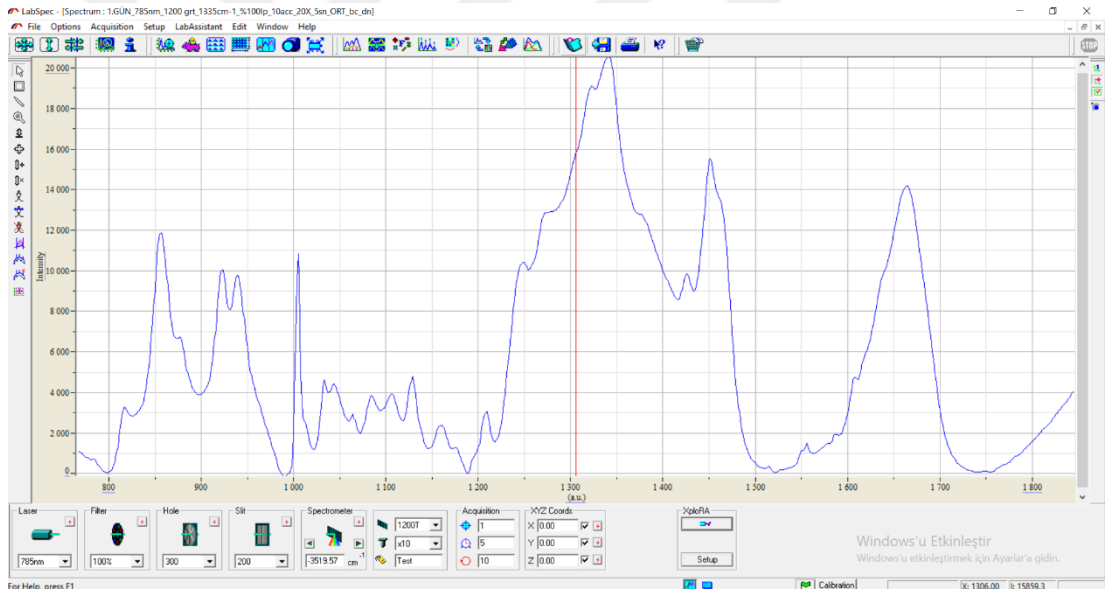
Şekil 13. Solüsyonda 8 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü



Şekil 14. Solüsyonda 12 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü

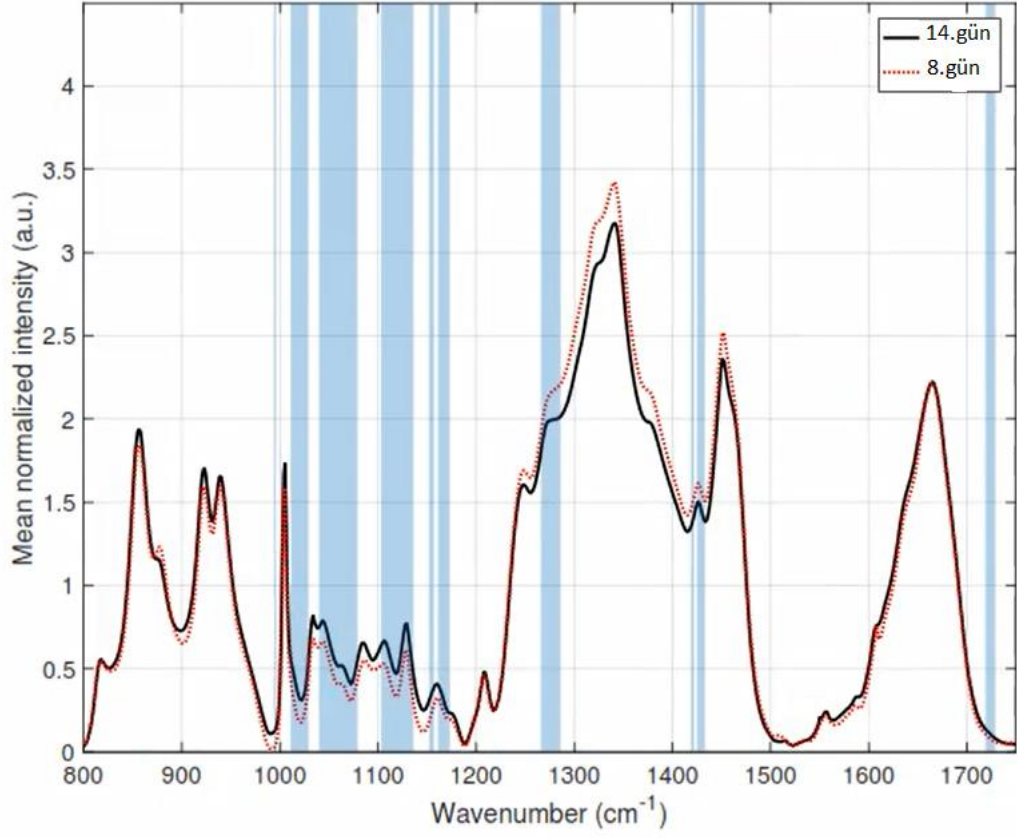


Şekil 15. Solüsyonda 13 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü

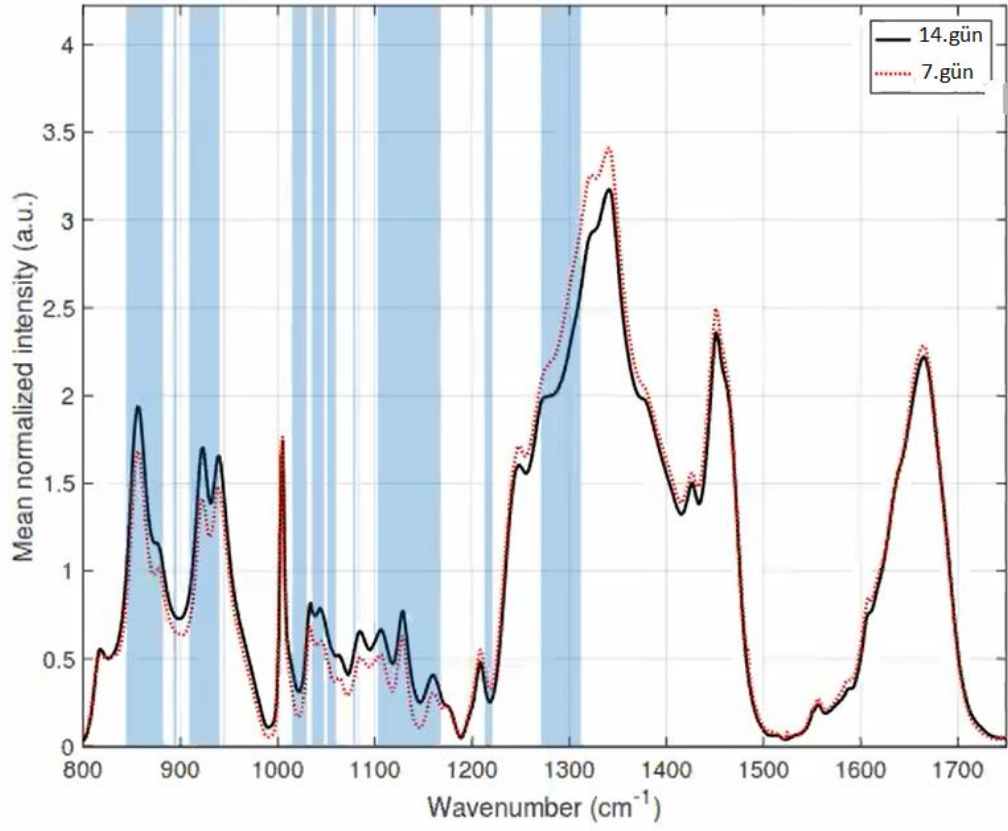


Şekil 16. Solüsyonda 14 gün beklemiş korneaların ortalama ölçümü

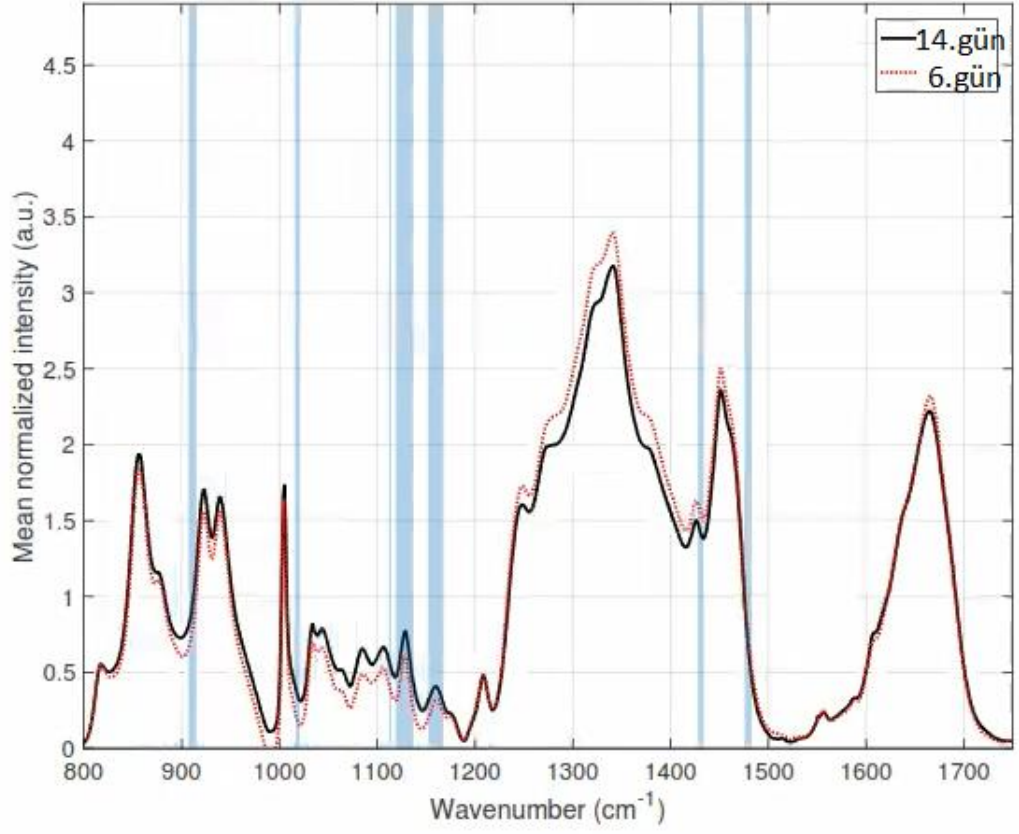
Raman spektroskopisinde elde edilen spektrumlar birbirleriyle karşılaştırılmış ve kollajen ve proteoglikan piklerine karşılık gelen bölgelerde anlamlı farklar izlenmiştir.



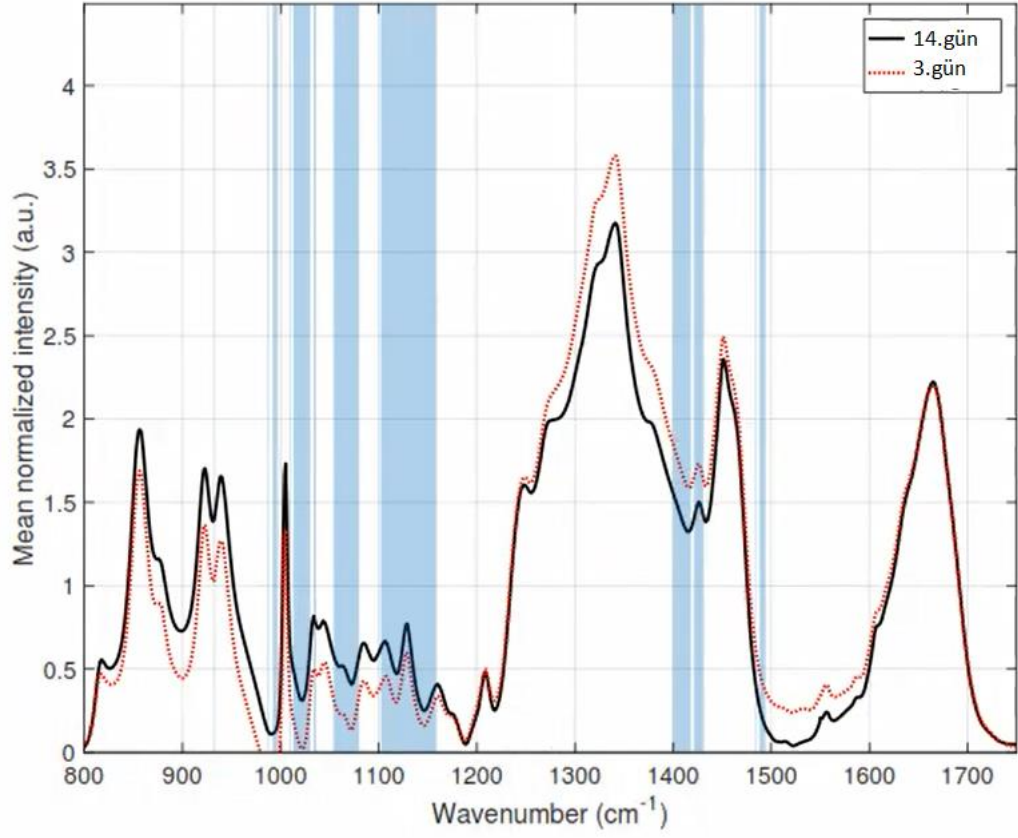
Şekil 17. Solüsyonda 8 ve 14.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.



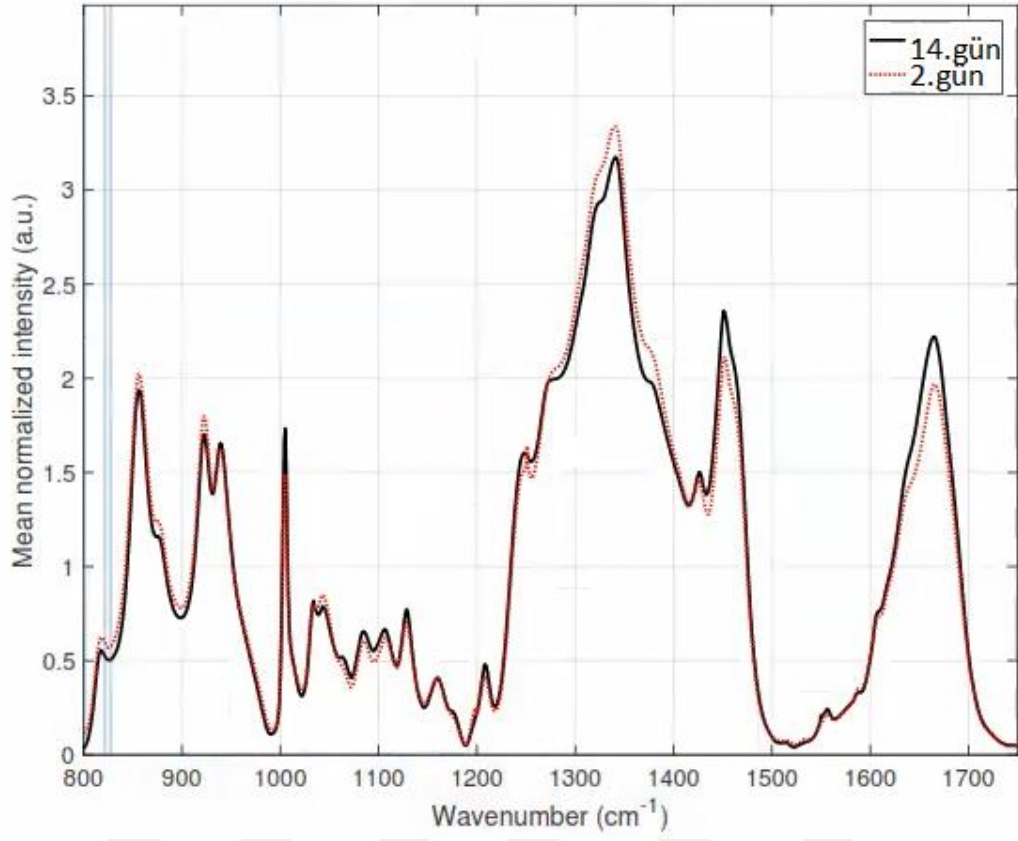
Şekil 18. Solüsyonda 7 ve 14.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.



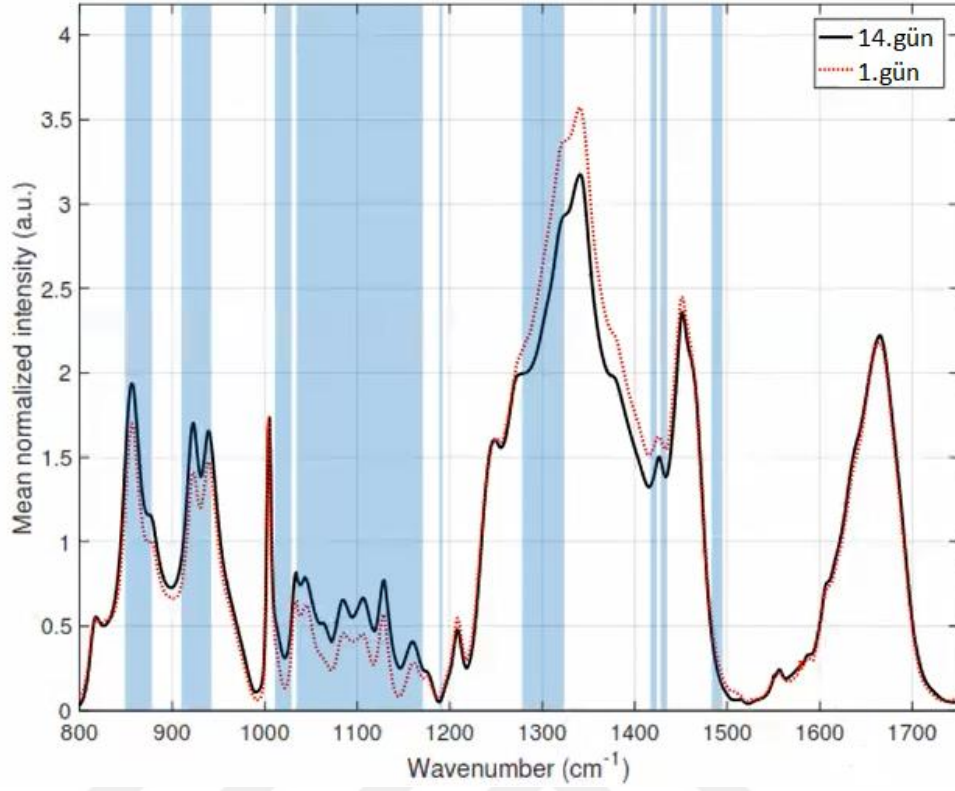
Şekil 19. Solüsyonda 6 ve 14.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.



Şekil 20. Solüsyonda 3. ve 14.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.

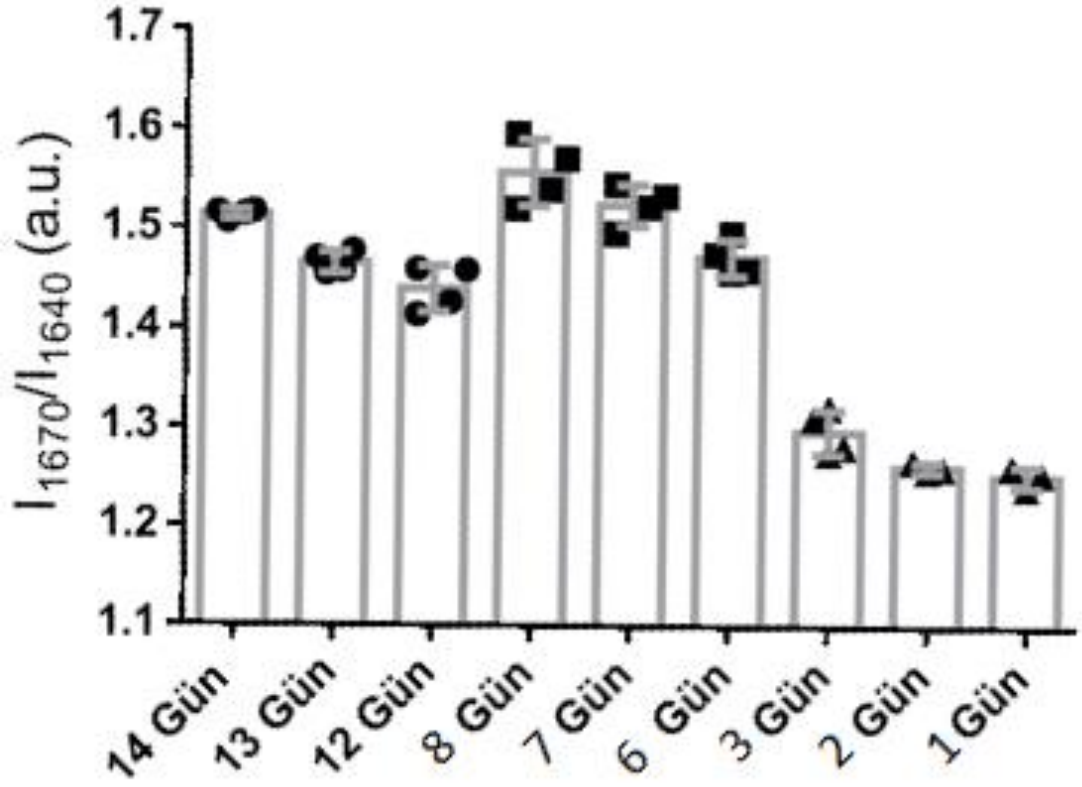


Şekil 21. Solüsyonda 2. ve 14.gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.



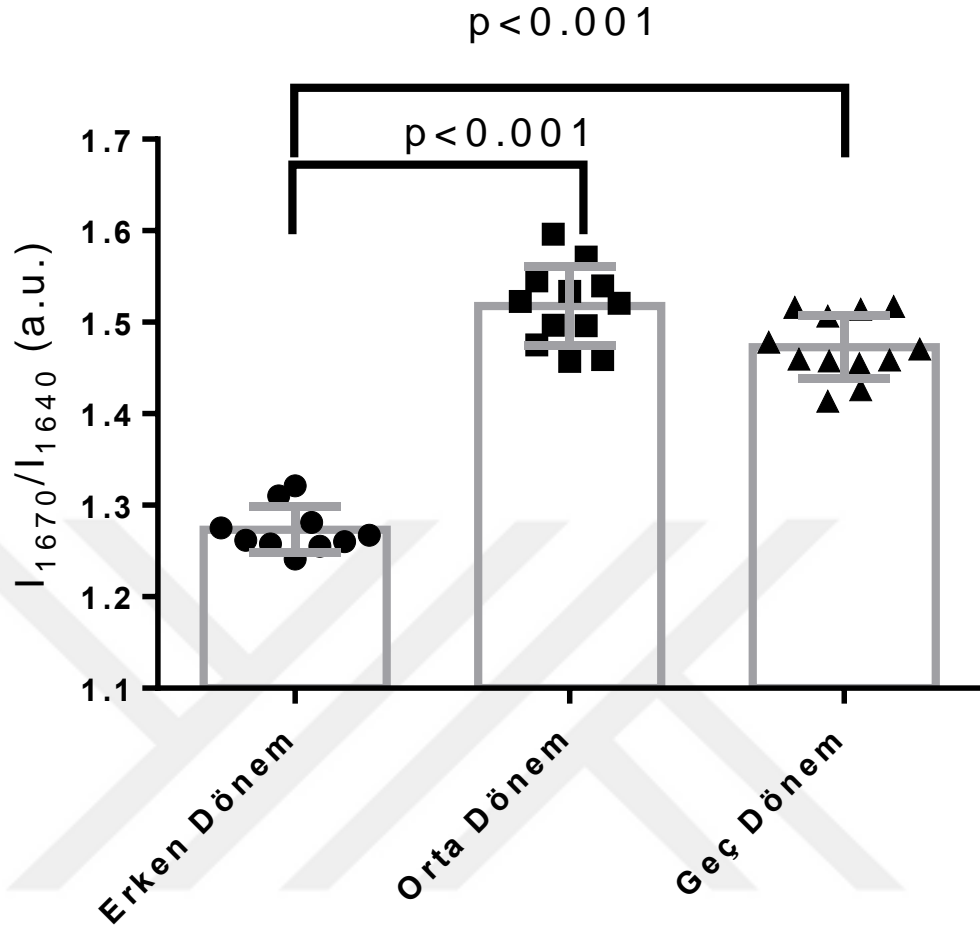
Şekil 22. Solüsyonda 1. ve 14. gün arası değerler normalize edildiğinde anlamlı fark olan bölgeler mavi alan ile gösterilmiştir.

Bu ölçümler sonucu spektrumda kollajen ve proteoglikanlara denk gelen bölgeler üzerine yoğunlaşmış ve 1670/1640, 1275/1247, 938/925, 858/877, 1033/1450, 1248/1043 oranları karşılaştırılmıştır (91-95).



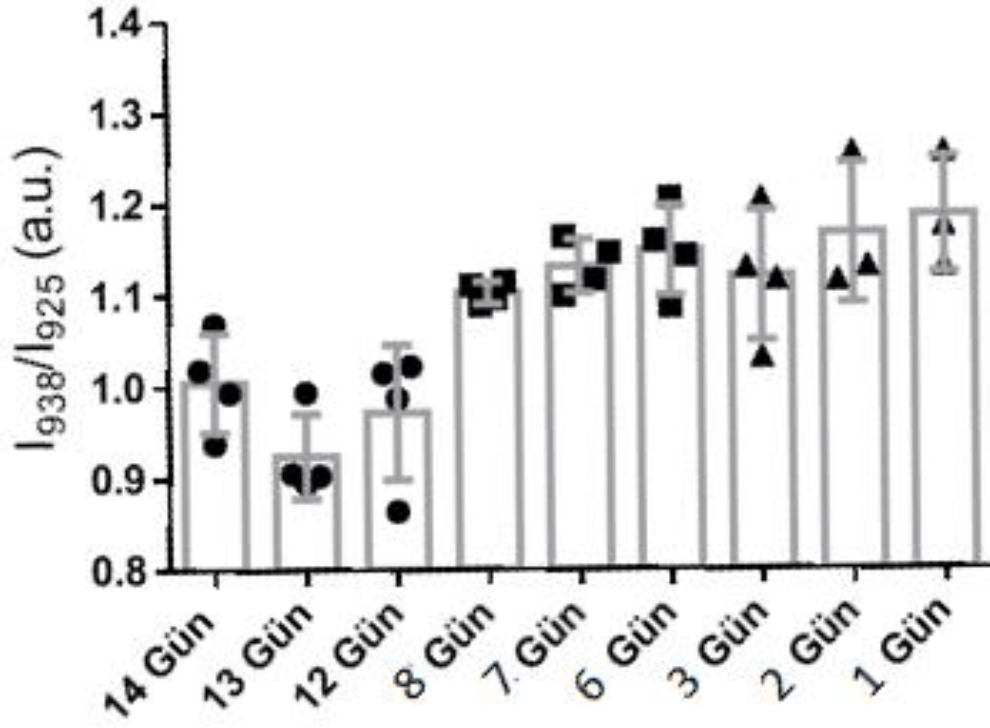
Şekil 23. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1670/1640 oranları

Şekil 23 korneaların solüsyonda kalış sürelerine göre düzenlenmiştir ve 1670/1640 oranının artması yapısal kollajenlerde bozulmayı göstermektedir. 1,2,3 gün solüsyonda bekleyen kornea ölçümlerinin kendi içinde oranda artış eğilimi olmasına rağmen istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). 6,7,8 gün solüsyonda kalan ve 12,13,14 gün solüsyonda kalan kornealarda kendi içlerindeki artış eğilimi devam etmektedir. 12,13,14 solüsyonda beklemiş kornea ölçümlerinin 6,7,8 gün beklemiş kornea ölçümlerine göre daha olumlu olması kornealar arası varyasyon olabileceğine ve ölçüm alınan bölgeler arası farklar olabileceğine bağlanmıştır.



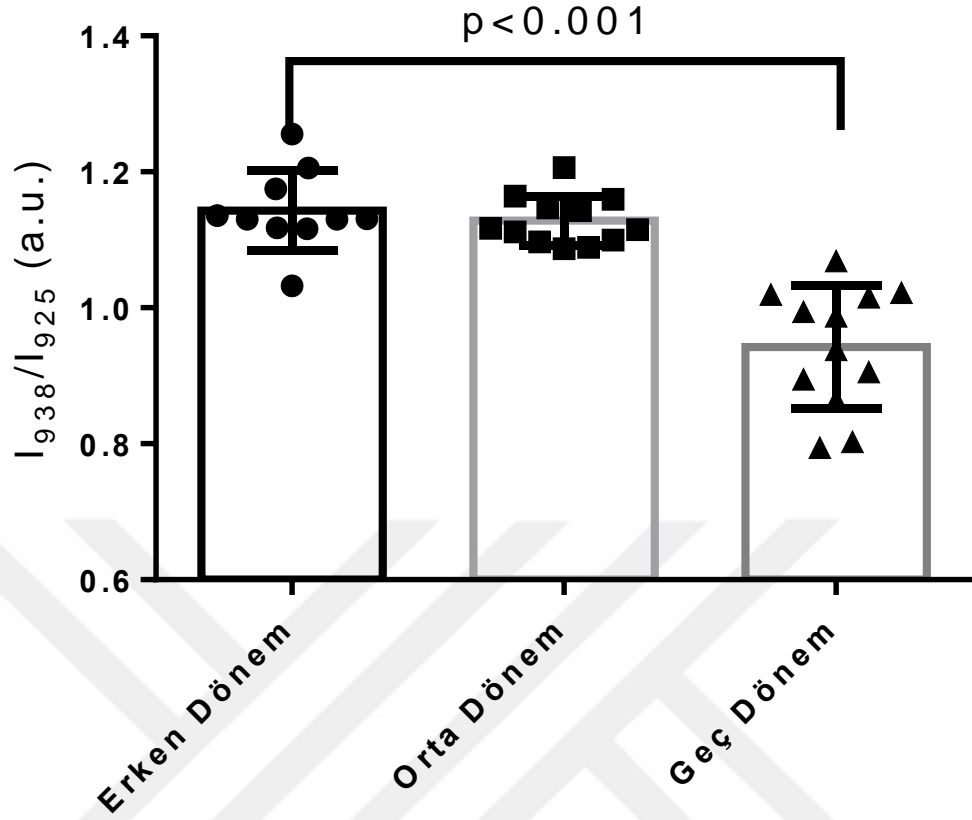
Şekil 24. 1670/1640 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması

1670/1640 oranının artması yapısal kollajenlerde bozulmayı göstermektedir. Orta ve geç dönemde erken döneme göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmektedir ($p < 0.001$). Orta ve geç dönem arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0,05$).



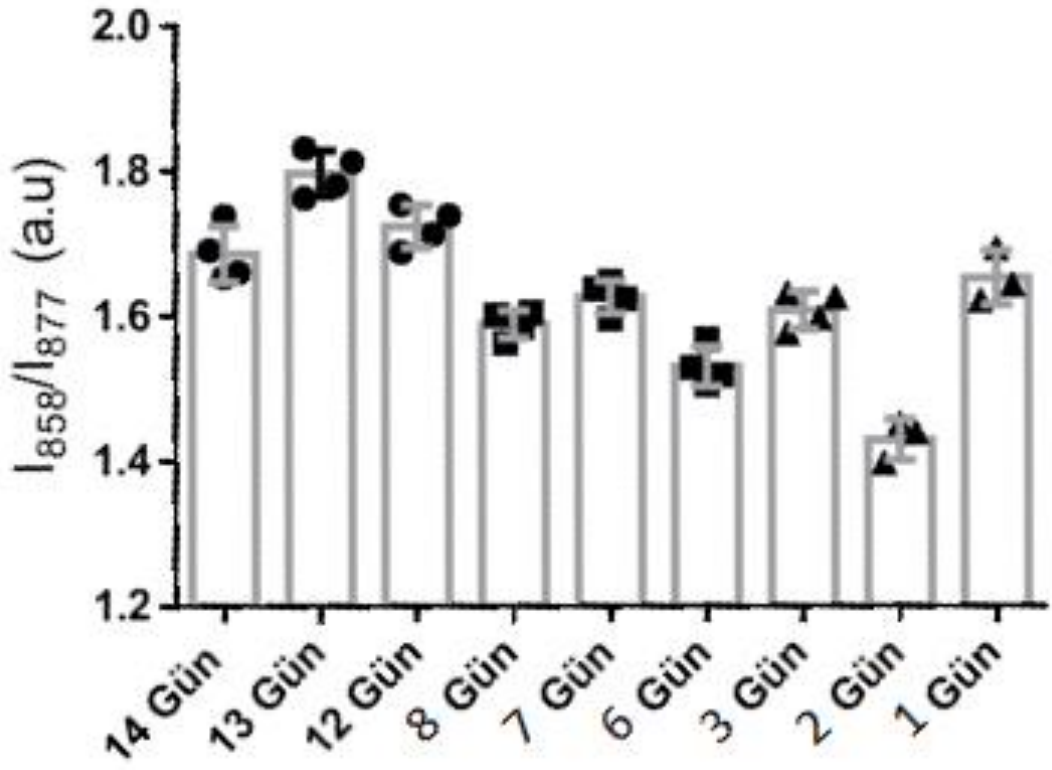
Şekil 25. Solüsyonda kalma sürelerine göre 938/925 oranlarının karşılaştırılması

Şekil 25 korneaların solüsyonda kalış sürelerine göre düzenlenmiştir ve 938/925 oranının azalması kollajenin aminoasit yapısındaki yapıda bozulmayı göstermektedir. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1,2,3. günlerdeki ölçümlerde ve 6,7,8.gün ölçümlerinde kendi aralarında istatistiksel anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Ölçümlerde 8.gün sonrasındaki istatistiksel anlamlı azalmalar dikkat çekmektedir ($p < 0.001$).



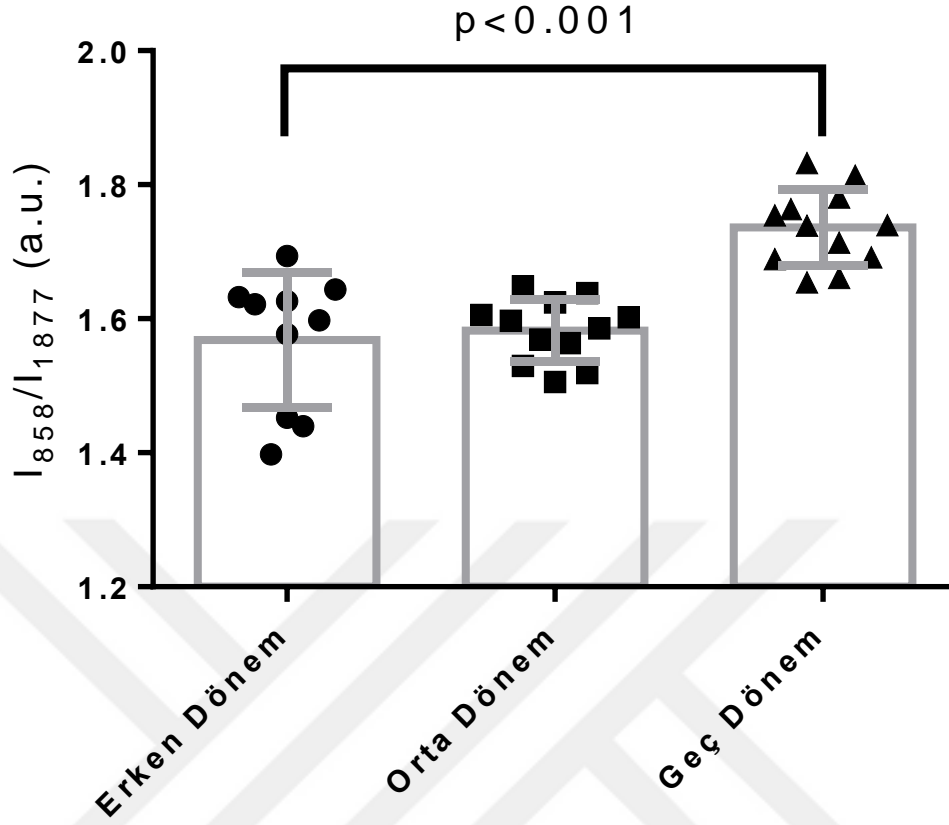
Şekil 26. 938/925 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması

938/925 oranının azalması kollajenin aminoasit yapısındaki yapısında bozulmayı göstermektedir. Geç dönemde orta ve erken döneme göre istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0.001$). Erken ve orta dönem arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0,05$).



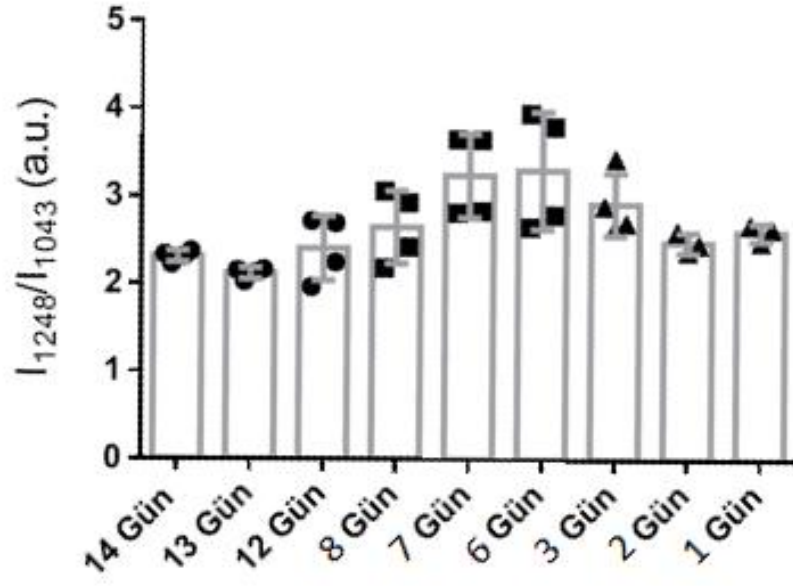
Şekil 27. Solüsyonda kalma sürelerine göre 858/877 oranlarının karşılaştırılması

Şekil 27 korneaların solüsyonda kalış sürelerine göre düzenlenmiştir ve 858/877 oranının artması kollajen yapısında bozulmayı göstermektedir. 2.günden itibaren bir artış eğilimi görülmektedir.



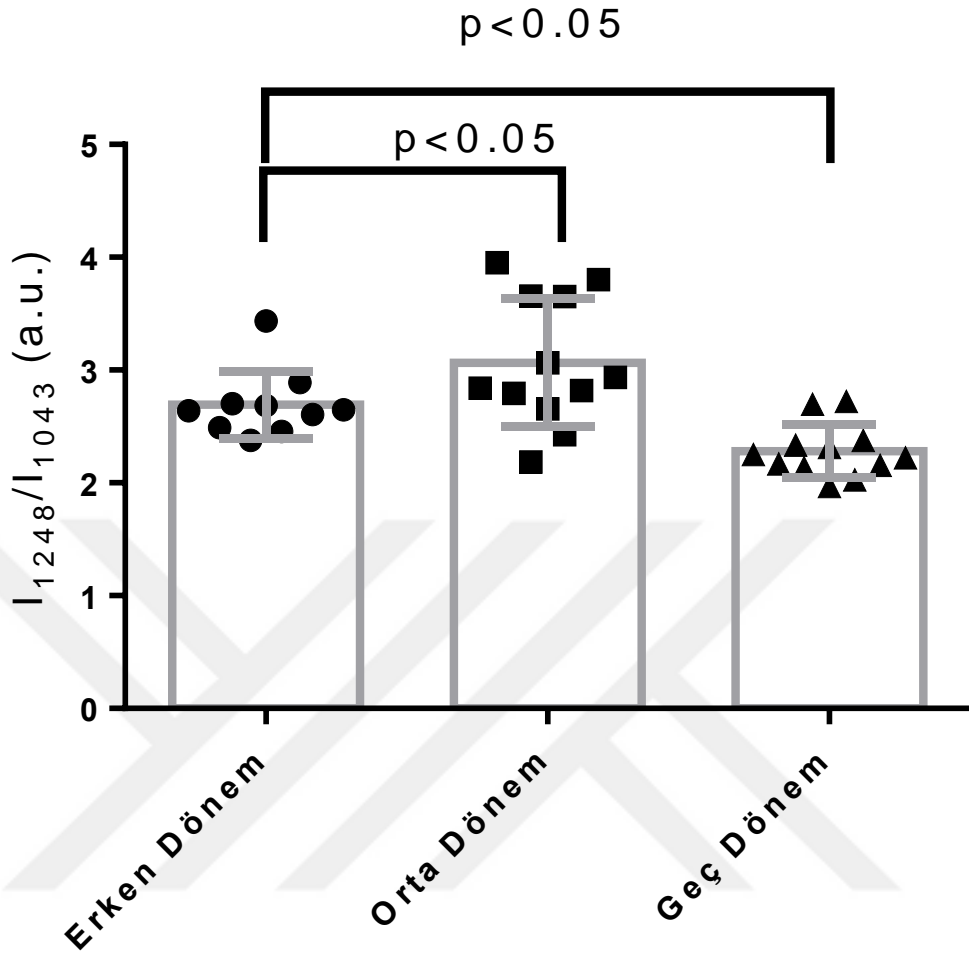
Şekil 28. 858/877 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması

858/877 oranının artması kollajen yapısında bozulmayı göstermektedir. Geç dönemde erken ve orta döneme göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p < 0.001$). Erken ve orta dönem arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0.05$).



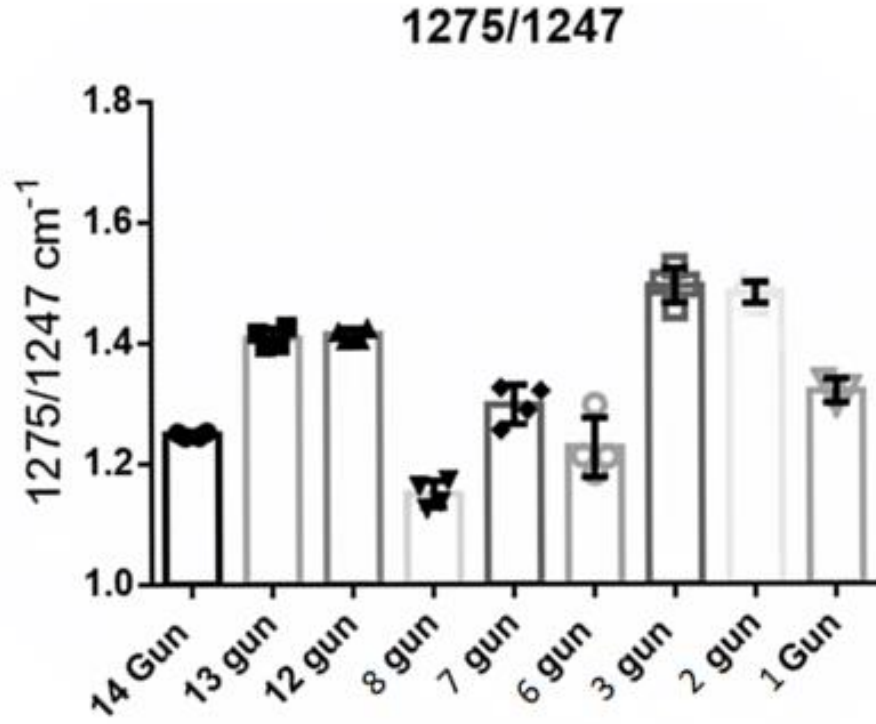
Şekil 29. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1248/1043 oranlarının karşılaştırılması

Şekil 29 korneaların solüsyonda kalış sürelerine göre düzenlenmiştir ve 1248/1043 oranında azalma proteoglikanların yapısında bozulmayı göstermektedir. 6.gün ve sonrasındaki ölçümlerde azalma eğilimi dikkat çekmektedir.

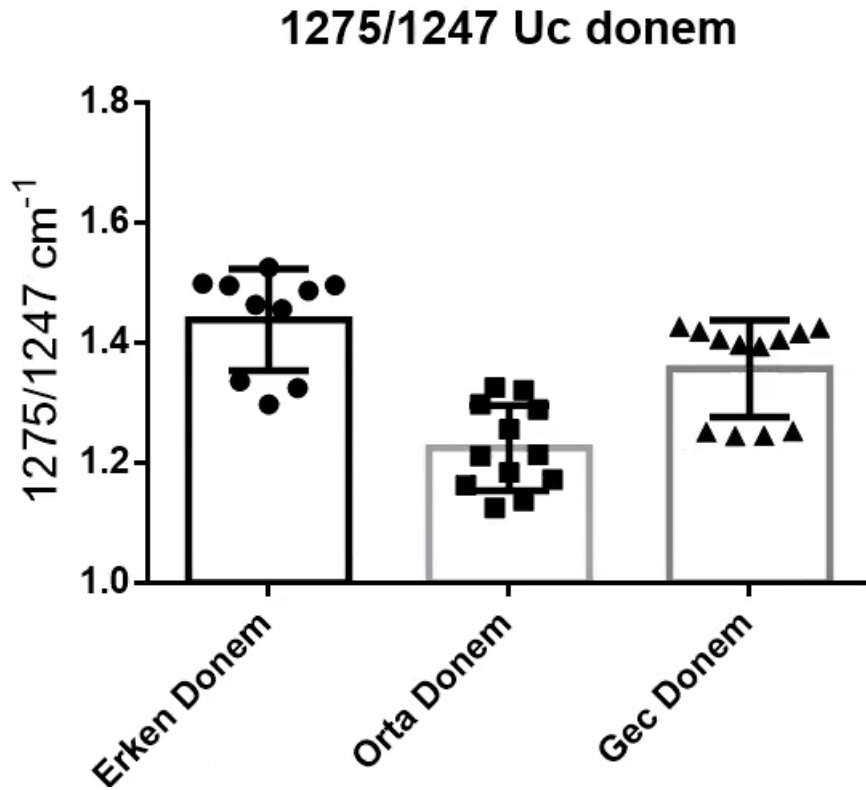


Şekil 30. 1248/1043 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması

1248/1043 oranında azalma proteoglikanların yapısında bozulmayı göstermektedir. Geç dönemde erken ve orta döneme göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Orta dönemde de erken döneme göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p < 0.05$).

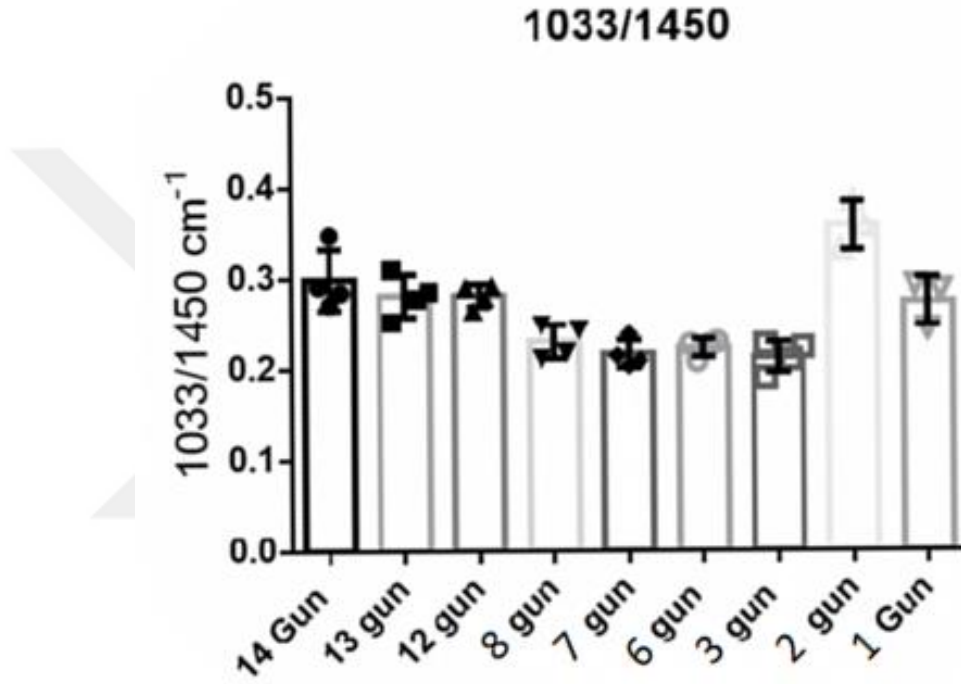


Şekil 31. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1275/1247 oranlarının karşılaştırılması



Şekil 32. 1275/1247 oranının erken, orta ve geç dönem karşılaştırılması

1275/1247 oranı kollajen yapısında bozulmayı göstermektedir ve bu bölgede sülfatla ilgili pikler bulunmaktadır. Erken, orta ve geç dönem arasında beklenen oranlar saptanmamıştır. Bu durum kornea saklama solüsyonu içinde bulunan kondroitin sülfata ve ölçüm öncesi kornea dokusunun yıkanmamasına bağlanmıştır.



Şekil 33. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1033/1450 oranlarının karşılaştırılması

1033/1450 oranının yapılan son yayınlarda matrikste bulunan kollajen oranını gösterdiği söylenmektedir (96). 1033/1450 oranında artma olması kollajen içeriğinde azalmaya işaret eder. 3.gün ve sonrasında oranlarda artış eğilimi görülmüştür ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Kornea nakli doku transplantasyonlarının içinde en eskilerden ve en başarılı olanlardan biridir. Zirm tarafından 1905 yılında ilk başarılı penetran keratoplasti gerçekleştirilmiştir (1).

Kornea dokusunun eksise edilip özel solüsyonlar içinde bekletilmesine 1970'li yıllarda başlanılmıştır. Daha önceki dönemlerde kornea dokusu yerine göz alınmakta ve enükleasyon yapılmış olan gözler nemli bir ortamda +4°C'de bekletilmekteydi (7,8). Nemli bir ortamda bekletme metodu, üveal dokuların ve ön segmentte bulunan diğer yapıların beslenememesi sebebiyle oluşan ve hümör aközde biriken yıkım ürünlerinin endotel üzerine toksik etkileri sebebiyle 48 saatten daha kısa saklama süresine sahipti (36,37). Bu kısa saklama süresi HİV ve hepatit virüslerine yönelik tarama yapılması için de yetersizdi (97,98). 1974 yılında McCarey-Kaufman (M-K) ortamı geliştirilmiştir ve bu yöntemde kornea, skleral kenarı 2-3mm içerecek şekilde eksise edilerek kornea endotelinin yıkım ürünlerinden maruziyetinin azaltılması amaçlanmıştır. M-K ortamı ilk kornea saklama solüsyonudur ve içeriğinde dekstran, doku kültür ortamı-199 (tissue culture medium-199), bikarbonat ve gentamisin bulundurmaktadır (39,40). Bu yöntem korneanın +4°C'de 4 gün boyunca saklanmasına izin vermektedir. 1960'lı yıllarda kondroitin sülfatın saklama ortamlarındaki önemi anlaşılınca 1985'te Kaufman ve ark. tarafınca K-sol adıyla çıkarıldı ve kornea dokusunun 14 güne kadar saklanmasına olanak tanıdı. K-sol de M-K ortamı gibi antibiyotik olarak gentamisin içermekteydi. 1988 artık kenar (korneoskleral rim) dokularının propionibacterium acnes ile kontamine olduğu gösterildi ve ilk ticari saklama solüsyonu olan K-sol piyasadan toplatıldı (7). Doku kültür ortamı-199'un yerine, minimum esansiyel ortamın temel olarak tercih edilmesi ve bazı aminoasitlerin de eklenmesiyle 1985'te kondroitin sülfat ortamı, 1988 yılında ise bunlara antioksidan ilavesiyle deksol ortamı oluşturulmuştur. Deksol ortamına askorbik asit gibi antioksidan maddelerin, vitamin B12'nin, adenosine triphosphate (ATP) ve gentamisinin yanına streptomisinin de eklenmesiyle 1992 yılında Optisol GS üretilmiştir. Günümüzde de gentamisin dışında streptomisin içeren tek solüsyon Optisol GS'dir ve ülkemizde çoğunlukla kullanılan kornea saklama solüsyonu

dekstran ve kondroitin sülfat içeren optisoldür (7). Optisol korneanın 14 güne kadar saklanmasına izin vermektedir (9,10).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2021 yılı içinde 79.641 kornea nakli gerçekleştirilmiştir. Bu sayı 2020' de 66.278, 2019'da 85.601'dir (2). PKP uzun yıllardır en sık kullanılan kornea nakli yöntemi olmasına rağmen gelişmiş ülkelerde son 15 yıl içinde lameller cerrahilerin sayısı PKP cerrahisi ile yarışır hale gelmiştir. Günümüzde ülkemizde 49 adet kornea bankası ve 613 adet kornea nakil merkezi bulunmaktadır. 2021 yılında ülkemizde 2812 kornea nakli gerçekleştir ve bu sayı pandemi öncesi dönemlerde 2019'da 3789, 2018'de 4141'dir (6). Ülkemizde uygulanan ana kornea nakli yöntemi PKP' dir.

Raman spektroskopisinde, biyolojik dokuların kimyasal ve biyofiziksel özellikleri dokunun içine girilmeden belirlenmektedir ve Raman spektroskopisi lazer tabanlı bir analiz tekniğidir. Lazer etkileşimi ile saçılmış olan fotonlar bir dedektörde toplanmaktadır (99). Dedektörler de moleküllerin özgün titreşimlerine göre, saçılan ışık dalga boylarını belirten spektrumlar gösterir. Bu spektrumlarda dokunun içeriğine bağlı bantlar ve tepe (pik) noktaları bulunmaktadır. Her bir tepe noktası dokunun kendine has bileşenlerini göstermektedir. Raman spektroskopisi örnekler için herhangi bir hazırlığa ihtiyaç olmaksızın, dokunun biyolojik içeriklerini çok hızlı bir şekilde belirlemektedir (100,101).

Taze olması veya dokuların fikse olması fark etmeksizin non-invaziv olarak canlı hayvanlarda kullanılabilir. Raman spektroskopisinin son yıllarda tıpta kullanımıyla ilgili çalışmalar yaygınlaşmaktadır (102).

Sıçan kornealarının kornea saklama solüsyonunda zaman içindeki değişikliklerini araştırdığımız çalışmamızda 18 adet ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen, üç aylık *Rattus norvegicus* türü Wistar cinsi yetişkin dişi sıçanın 36 gözü kullanılmıştır ve Raman spektroskopisinde, kornea saklama solüsyonundaki korneanın değişimlerini inceleyen literatürdeki ilk çalışmadır. Literatürde raman spektroskopisinin gözde kullanımıyla ilgili henüz çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Ermakov ve ark. oküler dokuların ramanda incelenmesiyle ilgili yaptığı çalışmada kornea, lens, sklera, retina ve vitreus üzerinde ölçümler yapmış, bu bölgeler

üzerine spektrumlar göstermiştir (103). Çalışmamızda elde ettiğimiz kollajen spektrumları, kollajen yapısındaki aminoasitleri gösteren spektrumlar ve proteoglikan spektrumları diğer çalışmalarla korelasyon göstermektedir (103,104).

Hu ve ark. 2016'da yaptığı çalışmasında da sıçan korneasında keratomikoz ve sağlıklı kornealarla ilgili değerlendirmeler yapmış ve sağlıklı kornealarda kollajen ve proteoglikan yapısında çalışmamıza benzer spektrumlar ve pikler elde etmiştir (104).

Means ve ark. yaptığı çalışmada optisol içindeki korneanın bozulmasını incelemiş ve epitel hasarının 7.gün sonrası başladığı, 12.günden itibaren ciddi epitel hasarı olduğunu göstermiştir (105,106). Çalışmamızda da 7 ve 8.günlerden itibaren kollajen ve proteoglikan yapılarında bozulmayı gösteren 1670/1640, 938/925, 858/877, 1033/1450, 1248/1043 bölgelerinde anlamlı değişiklikler görülmüş, özellikle de 12.gün ve sonrasında Raman spektrumundaki kollajen ve proteoglikan ölçümlerinde daha ciddi bozulmalar elde edilmiştir. Kornea epiteli yapısında da kollajen ve proteoglikan bulunmaktadır ve 7.gün sonrası epitel yapısında bozulmalar, çalışmamızdaki kollajen ve proteoglikan ölçümlerindeki negatif değişikliklerle uyum göstermektedir.

Kurpakus ve ark. yaptıkları çalışmada korneanın kollajen ve proteoglikan yapısı hakkında bilgiler elde etmişlerdir (110). Kornea yüzey epitelinde lipid, glikoprotein, kollajen yapısı, Stromanın özellikle tip 1 kollajen içerdiği, kondroidin sülfat ve keratan sülfattan zengin olduğu gösterilmiştir (110). Farklı çalışmalarda da bowman tabakasının tip1 kollajen liflerinden oluştuğu, epitel tabakasını alttaki bağ dokusuna bağladığı (111), Stromanın kalınlığın %90'ını oluşturduğu tip1 kollajenin yanında tip 5 de içerdiği ve bu kollajen liflerinin travma ve deformasyona karşı direç sağladığı (111,112), desme membranının endotel tarafından oluşturulduğu, tip 8 kollajenden zengin olduğu gösterilmiştir (112).

Raman spektroskopisiyle ilgili diğer çalışmalarda 1670/1640, 1275/1247, 938/925, 858/877, 1033/1450, 1248/1043 bölgeleri ve oranlarının yapıların kollajen ve proteoglikan içerikleri hakkında bilgi verdiği gösterilmiştir (81,82,87).

Çalışmamızda 1275/1247 bölgesinde anlamlı sonuç çıkmaması o bölgenin kondroitin sülfata ilgili pikler veren bölge olup (107,108), solüsyondan çıkarılan

korneaların yıkanmadan ölçüm yapılmasına ve solüsyonun kondroitin sülfat içermesine bağlanmıştır. İleriki çalışmalarda örnek sayısının artırılması ve bu bölgeye denk gelen ölçümler için öncesinde korneaların yıkanması daha anlamlı sonuçlar için yardımcı olabilir.

Kollajen ölçümlerini gösteren 1670/1640, 938/925, 858/877 bölgelerinde geç dönemlerde erken dönemlere göre istatistiksel anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır ($p<0.001$). Ancak 938/925, 858/877 bölgelerinde erken ve orta dönem arası istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir. 1670/1640 bölgesinde orta dönemde erken döneme göre kollajen yapısında istatistiksel olarak anlamlı bozulma görülmüştür ($p<0.001$).

1670/1640 oranının artması yapısal kollajenlerde bozulmayı göstermektedir. 1,2,3 gün solüsyonda bekleyen kornea ölçümlerinin kendi içinde oranda artış eğilimi olmasına rağmen istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). 6,7,8 gün solüsyonda kalan ve 12,13,14 gün solüsyonda kalan kornealarda kendi içlerindeki artış eğilimi devam etmektedir. 12,13,14 solüsyonda beklemiş kornea ölçümlerinin 6,7,8 gün beklemiş kornea ölçümlerine göre daha olumlu olması kornealar arası varyasyon olabileceğini ve ölçüm alınan bölgeler arası farklar olabileceğini düşündürmektedir.

Ermakov ve ark. çalışmasında 938/925 bölgelerindeki piklerin kollajenin aminoasit yapısını gösterdiğini ve 938/925 oranının azalması kollajenin aminoasit yapısındaki bozulmaya işaret olduğunu göstermiştir (103). Çalışmamızda solüsyonda kalma sürelerine göre 1,2,3. günlerdeki ölçümlerde ve 6,7,8.gün ölçümlerinde kendi aralarında istatistiksel anlamlı azalma görülmüştür ($p<0.05$). Ölçümlerde 7.gün sonrasındaki istatistiksel anlamlı azalmalar dikkat çekmektedir ($p<0.001$).

Mandair ve ark. çalışmasında 858/877 bölgelerindeki piklerin kollajen yapısındaki prolin-hidroksiprolin ile ilgili olduğunu ve 858/877 oranının artmasıyla kollajen yapısının bozulduğunu göstermiştir (11). 1.günden itibaren bu bölgelerde bir artış eğilimi görülmektedir ($p<0.001$).

Hücre matriksini oluşturan başlıca iki ana ekstrasellüler protein bulunmaktadır. Bunlar fibröz proteinler ve proteoglikanlardır. Proteoglikanlar, kovalent bağla bağlanmış glikozaminoglikanlar içeren peptid zincirleridir. Yapılarında %95 oranında karbonhidrat ve %5 oranında protein içerirler. Hyalüronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat I ve II, heparin, heparan sülfat ve dermatan sülfat olmak üzere yedi çeşit

glikozaminoglikan (GAG) bulunmaktadır. GAG zincirleri ekstraselüler boşlukların büyük kısmını doldurur ve dokuya mekanik destek vermesinin yanında bağ dokusu stabilizasyonu, kollajen organizasyonu, sitokinlerle etkileşim, enflamasyonun önlenmesi, bağışıklık düzenlenmesini sağlar, suda çözünebilir moleküllerin difüzyonunu hızlandırır ve ayrıca hücrelerin göçü ve fagositozunu sağlar (113,114). Mandair ve ark. çalışmasında 1248/1043 bölgesinin proteoglikan piklerine karşılık geldiğini ve 1248/1043 oranında azalmanın proteoglikanların yapısında bozulmaya işaret olduğunu göstermiştir (11). 6.gün ve sonrasındaki ölçümlerde azalma eğilimi dikkat çekmektedir. Bu azalma eğilimi 6.gün sonrasında solüsyon içinde proteoglikan görevlerinde aksamalar olabileceğini düşündürmektedir.

Proteoglikan ölçümlerini gösteren 1248/1043 bölgelerinde geç dönemde erken ve orta döneme göre proteoglikan yapısında istatistiksel anlamlı bozulma görülmüştür ($p<0.05$). Ancak bu ölçümde orta dönem proteoglikan yapısı erken döneme göre daha olumlu sonuç vermiştir ($p<0.05$). İleride yapılacak çalışmalarda denek sayısının artırılması, kornealarda yapılan ölçümlerin sayısının artırılması sapmaların giderilmesi ve bu bölgede daha anlamlı sonuçlar için faydalı olabilir.

Yapılan son yayınlarda 1033/1450 oranının matrikste bulunan kollajen oranını gösterdiği söylenmektedir (109). Bu oranın artması kollajen yapısındaki bozulmalara işaretir. Çalışmamızda 3.gün ve sonraki ölçümlerde bu oranda anlamlı artışlar görülmüştür ($p<0.05$). Bu sonuç, solüsyonda zaman içinde matrikste bulunan kollajenin azalmasına bağlı olarak kollajenlerin görevi olan hücre adezyonunun düzenlenmesi ve doku gelişiminin yönetiminde sorunlar olabileceğini düşündürmektedir. 1 ve 2.gün ölçümlerinde alınan yüksek pikler olası bir varyasyon ya da ölçüm alınan bölgeyle ilgili bir sorun olabileceğini düşündürmektedir. Daha fazla denek sayısı ve ölçüm sayısının artırılması sonraki çalışmalar için yol gösterici olabilir.

Optisol günümüzde en yaygın kullanılan kornea saklama solüsyonudur (115). Farklı çalışmalarda 21 güne kadar kornea dokusunun saklanabildiği söylenmektedir (116,117). Orta döneme kadar koruyucu solüsyonlar üzerine yapılan bir çalışmada etkisi Sinasol ile karşılaştırılmış ve optisol içeren solüsyonda stromal ödem ve desme foldunun 7.günde daha az olduğu gösterilmiştir (118). Eusol-C ile optisol karşılaştırıldığı bir çalışmada korneaların speküler mikroskopi ile incelenmesi

yapılmış ve optisol endotel hücre dansitelerinde yine daha olumlu sonuçlar vermiştir (119). Çalışmamızda kollajen ve proteoglikan gösteren bölgelerde özellikle ilk 7 gün sonrasında görülen bozulma dikkat çekicidir. Literatürdeki diğer çalışmalar da optisol içinde kornea dokularının 7-14 gün içinde kullanılması gerektiğini göstermektedir (9,10).

Çalışmamız sonucunda genel olarak literatür ile uyumlu veriler elde edildi. Ancak çalışmadaki bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Bunlar; denek sayısında yetersizlik, denekler arası olası varyasyonlar, ölçülen dokunun saydam ve küçük olması, bazı ölçümlerde lazer ışığının kornea santrali yerine perifer kornea ve limbus komşuluğundan olması olabilir.

Kornea hastalıklarının sebep olduğu görme kayıplarının tedavisinde kornea nakli önemli bir tedavi yöntemidir. Donörden alınan kornea dokuları saklama solüsyonları içinde 14 güne kadar ve özellikle ilk 7 gün oldukça korunabilmektedir. Raman spektroskopunun tıbbi alanlardaki kullanımı arttıkça canlı ve cansız dokulardaki biyokimyasal yapıların analizlerinin daha iyi olması umut edilmektedir. Denek sayısının artması ve ölçüm sayılarının artırılması, sadece solüsyondan yapılan ölçümler ve solüsyona konmadan önce kornealardan Raman spektroskopuyla yapılacak ölçümler alınması sonraki çalışmalar için daha anlamlı sonuçlar verebilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda 18 adet *Rattus norvegicus* türü Wistar cinsi yetişkin dişi sıçan kullanılmıştır. İlk gün tüm sıçanlar randomize olarak 1,2,3,7,8,9,12,13,14.günlerde korneaları çıkarılacak şekilde ve her gün için 2 sıçan olmak üzere gruplandırılmıştır. Alınan tüm kornealar kornea saklama solüsyonu optisol içinde bekletilmiştir. 18 adet sıçandan toplam 36 adet kornea alınmıştır. Ayrıca 12,13,14. Günler alınan kornealar solüsyon içinde bekleme sürelerine göre erken dönem, 7,8,9.günlerde alınanlar orta dönem, 1,2,3.günlerde alınan kornealar geç dönem olarak adlandırılmıştır. Alınan tüm kornealar 14.gün sonunda Raman spektroskopisiyle değerlendirilmiş ve spektrumlar elde edilmiştir. Alınan ölçümlerde kollajen ve proteoglikan piklerine karşılık gelen bölgelerde anlamlı sonuçlar bulundu.

2. 1670/1640 oranının artması yapısal kollajenlerde bozulmayı göstermektedir. 1,2,3 gün solüsyonda bekleyen kornea ölçümlerinin kendi içinde oranda artış eğilimi olmasına rağmen istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). 6,7,8 gün solüsyonda kalan ve 12,13,14 gün solüsyonda kalan kornealarda kendi içlerindeki artış eğilimi devam etmektedir. Orta ve geç dönemde erken döneme göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmektedir ($p<0.001$). Orta ve geç dönem arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

3. 938/925 oranının azalması kollajenin aminoasit yapısındaki yapısında bozulmayı göstermektedir. Solüsyonda kalma sürelerine göre 1,2,3. günlerdeki ölçümlerde ve 6,7,8.gün ölçümlerinde kendi aralarında istatistiksel anlamlı azalma görülmüştür ($p<0.05$). Ölçümlerde 7.gün sonrasındaki istatistiksel anlamlı azalmalar dikkat çekmektedir ($p<0.001$). Geç dönemde orta ve erken döneme göre istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p<0.001$). Erken ve orta dönem arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

4. 858/877 oranının artması kollajen yapısında bozulmayı göstermektedir. Geç dönemde erken ve orta döneme göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p<0.001$). Erken ve orta dönem arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$).

5. 1248/1043 oranında azalma proteoglikanların yapısında bozulmayı göstermektedir. 6.gün ve sonrasındaki ölçümlerde azalma eğilimi dikkat çekmektedir. Geç dönemde erken ve orta döneme göre istatistiksel olarak anlamlı azalma

görülmüştür ($p<0.05$). Orta dönemde de erken döneme göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p<0.05$).

6. 1275/1247 oranı kollajen yapısında bozulmayı göstermektedir ve bu bölgede sülfatla ilgili pikler bulunmaktadır. Erken, orta ve geç dönem arasında beklenen oranlar saptanmamıştır. Bu durum kornea saklama solüsyonu içinde bulunan kondroitin sülfata ve ölçüm öncesi kornea dokusunun yıkanmamasına bağlanmıştır.

7. 1033/1450 oranının yapılan son yayınlarda matrikste bulunan kollajen oranını gösterdiği söylenmektedir (96). 1033/1450 oranında artma olması kollajen içeriğinde azalmaya işaret eder. 3.gün ve sonrasında oranlarda artış eğilimi görülmüştür ($p<0.05$).



KAYNAKLAR

1. Crawford AZ, Patel DV, McGhee CN. A brief history of corneal transplantation: From ancient to modern. *Oman J Ophthalmol.* 2013;6(Suppl 1):S12-7.
2. EBAA, <https://restoresight.org/statistical-report/2021>
3. Glasser DB. Changing Trends in Keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 2011;151(3):394-6.
4. Matthaei M, Sandhaeger H, Hermel M, Adler W, Jun AS, Cursiefen C, vd. Changing Indications in Penetrating Keratoplasty: A Systematic Review of 34 Years of Global Reporting. *Transplantation.* 2017;101(6):1387-99.
5. Bigan G, Puyraveau M, Saleh M, Gain P, Martinache I, Delbosc B, vd. Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: A 12-year review. *Eur J Ophthalmol.* 2018;28(5):535-40.
6. ORGANKDS, https://organkds.saglik.gov.tr/dss/PUBLIC/Transplant_Cornea.aspx# 2022
7. Wilson SE, Bourne WM: Corneal Preservation for Penetrating Keratoplasty. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, editors. *The Cornea Second Edition On CD-ROM.* Woburn, MA: Butterworth-Heinemann, 1999.
8. Doughman DJ: Tissue Storage. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, Palany DA, editors. *Cornea Text & Atlas on CD-ROM.* St-Louis, MO: Mosby, Inc., 1998.
9. Kapur N, Gunda S, Dixit S, Chauhan L, Acharya M, Mathur U. Effect of transfer of donor corneal tissue from McCarey-Kaufmann medium to Optisol-GS on corneal endothelium. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(2):219-222. doi:10.4103/ijo.IJO_677_17.
10. Bcatrice E, Frueh, Mattias Böhnke, PhD. Prospective, randomized clinical evaluation of optisol-GS vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 2000; 118:757-60).
11. Mandair, G. S. and M. D. Morris. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *Bonekey Rep* 2015;4: 620.

12. Hibben, J.H. The Raman Effect And Its Chemical Application. Reinhold Publishing Corporation, New York 1939.
13. Butler, H. J., L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, P. L. Martin-Hirsch, M. J. Walsh, M. R. McAinsh, N. Stone and F. L. Martin. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat Protoc* 2016; 11(4): 664-687.
14. Aydın P. Çeviri Editörü. Amerikan Göz Akademisi Temel ve Klinik Bilimler Kursu, Cilt 8, Yüzey Hastalıkları ve Kornea, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2011; 6-9.
15. Marfurt, C.F., et al., Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*, 2010. 90(4): p. 478-92.
16. Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res*. 1970;10:107–8.
17. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2941–8.
18. Conrad GW, Funderburgh JL. Eye development and the appearance and maintenance of corneal transparency. *Trans Kans Acad Sci*. 1992;95:34–8.
19. Rufer F, Schroder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* 2005;24:259–61.
20. Farjo A MM, Soong HK. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. In: Yanoff M DJ, eds, *Ophthalmology*, 3rd ed. St. Louis M, Mosby, 2008, 203–208.
21. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell E *Histology of the human eye*. Philadelphia: WB Saunders; 1971:55–111.
22. M. S. Sridhar, *Anatomy of cornea and ocular surface*, c. 66, sy 2, s. 5, 2018;66: 2-5.
23. Zhang L, Anderson MC, Liu C. The role of corneal stroma: A potential nutritional source for the cornea. 2017;3(8).
24. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2244-58.

25. Bron AJ. The architecture of the corneal stroma. *Br J Ophthalmol* 2001;85:379–81.
26. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2004;78:503–12.
27. Newton RH, Meek KM. The integration of the corneal and limbal fibrils in the human eye. *Biophys J.* 1998;75:2508–12.
28. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(12):1402–1415.
29. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human Corneal Anatomy Redefined. *Ophthalmology.* 2013;120(9):1778-85.
30. Olsen EG, Davanger M, Moen T. The role of microfilaments in the healing of the corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1985;63(1):104–108
31. Belmonte C, Giraldez F. Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol.* 1981;321:355–68.
32. Tanelian DL, Beuerman RW. Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Exp Neurol.* 1984;84:165–78.
33. Akova Y, Yağmur M. Kornea Hastalıkları. *Temel Göz Hastalıkları*, 1. Baskı, Aydın P, Akova YA eds, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001. Bölüm 7. ss:145-180.
34. Güllülü G. Gözün Embriyolojisi. *Temel Göz Hastalıkları*, 1. Baskı, Aydın P, Akova YA eds, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001; Bölüm 2. ss:29-35.
35. Roberts, Cynthia J. Importance of accurately assessing biomechanics of the cornea, *Current Opinion in Ophthalmology*: 2016;27:4 p 285-291
36. Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf THh: Centennial review of corneal transplantation, *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2005; 33: 642–657
37. Laibson PR: History of corneal transplantation. In: McDonnel PJ, McGhee CHJ, Farjo AA, Serdarevic ON; eds. *Corneal Surgery Theory, Technique and Tissue*. 4th ed. Mosby Pr, 2009: 1-7
38. Filatov VP. Transplantation of the cornea from preserved cadavers'eyes. *Lancet* 1937; 1: 1395–7.
39. McCarey B, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974; 13: 165–73

40. Doughman DJ, Harris JE, Schmidt MK. Penetrating keratoplasty using 37oC organ-cultured corneas. *Trans Am Acad Ophthalmol Otol* 1976; 81: 778–93
41. Bengisu N. Keratoplasti. *Türk Oftalmoloji Gazetesi* 1941, 3: 515-535
42. Singar Özdemir E. Wound Dehiscence After Penetrating Keratoplasty. *Turk J Trauma Emerg Surg* [Internet]. 2018; Erişim adresi: https://www.journalagent.com/travma/pdfs/UTD-44450-CLINICAL_ARTICLE-SINGAR-OZDEMIR.pdf
43. Brockmann T, Brockmann C, Maier A-K, Gundlach E, Schroeter J, Bertelmann E, vd. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty for Graft Failure After Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: Clinical Results and Histopathologic Findings. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(7):813.
44. Price MO, Gupta P, Lass J, Price FW. EK (DLEK, DSEK, DMEK): New Frontier in Cornea Surgery. *Annu Rev Vis Sci*. 2017;3(1):69-90.
45. Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision; *Ophthalmology*. 2000 Oct;107(10):1850-6; discussion 1857.
46. Melles GRJ, Eggink FAGJ, Lander F, Pels E, Rietveld FJR, Beekhuis WH, vd. A Surgical Technique for Posterior Lamellar Keratoplasty: *Cornea*. 1998;17(6):618.
47. Aydın P. Çeviri Editörü. *Amerikan Göz Akademisi Temel ve Klinik Bilimler Kursu*, Cilt 8, Yüzey Hastalıkları ve Kornea, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2011; 413-447
48. Hyman L, Wittpen J, Yang C. İndications and techniques of penetrating keratoplasties. *Cornea* 1992; 11:573.
49. Severin M. Perforiende keratoplastik. 1996; s.117-123
50. Killingsworth DW, Stern GA, Driebe WT. The results of therapeutic penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1993; 100:534-541 Vajpayee RB. *Corneal transplantation*. First edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd, 2002:3-128)

51. Stewart RM, Jones MN, Batterbury M, Tole D, Larkin DF, Kaye SB. Effect of glaucoma on corneal graft survival according to indication for penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2011;151: 257–62 e251.
52. Lee JG, Ko MK, Kay EP. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1beta-induced FGF-2 in corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2012; 95: 35–39.
53. European Eye Bank Association. www.Europeaneyebanks.org
54. Eye Bank Association of America Medical Advisory Board. Medical Standarts. Washington DC: Eye Bank Association of America; November 2008
55. Lass JH, Benetz BA, Patel SV, Szczotka-Flynn LB, O'Brien R, Ayala AR, vd. Donor, Recipient, and Operative Factors Associated With Increased Endothelial Cell Loss in the Cornea Preservation Time Study. *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(2):185.
56. Feibel R. Current consepts in retrobulber anesthesia. *Surv Ophthalmol*. 1985;30:102.
57. Miller A. Routine management. In: Krachmer J, Mannis M, Holland E, eds. *Cornea: Surgery of the Cornea and Conjuntiva*. 2nd edition. St.Louis: Mosby; 2005:1499-1511.
58. Rintelen R. Zur geschichte der keratoplastik. *Klin Monatsbl Augenheild*. 1974;165:214-222.
59. Bandivadekar P, Gupta S, Sharma N. Intraoperative Suprachoroidal Hemorrhage After Penetrating Keratoplasty: Case Series and Review of Literature. *Eye Contact Lens Sci Clin Pract*. 2016;42(3):206-10.
60. Leigh A. Intraoperative Complications. In: Leigh A, ed. *Corneal Transplantation*. Great Britain: Blackwell Scientific Publications; 1966:131-135
61. Moyes A, Sugar A, Musch D, Barnes R. Antiviral therapy after penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis. *Arch Ophtalmol*. 1994;112:601- 607.
62. Wagoner MD, Ba-Abbad R, Al-Mohaimed M, Al-Swailem S, Zimmerman MB. Postoperative complications after primary adult optical penetrating

- keratoplasty: prevalence and impact on graft survival. *Cornea* 2009; 28: 385–94.
63. Javadi MA, Feizi S, Karbasian A, Rastegarpour A. Efficacy of topical ciclosporin A for treatment and prevention of graft rejection in corneal grafts with previous rejection episodes. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(11):1464-7.
 64. Barraquer RI, Pareja-Aricò L, Gómez-Benlloch A, Michael R. Risk factors for graft failure after penetrating keratoplasty: *Medicine (Baltimore).* 2019;98(17):e15274.
 65. Pedersen IB, Ivarsen A, Hjortdal J. Graft rejection and failure following endothelial keratoplasty (DSAEK) and penetrating keratoplasty for secondary endothelial failure. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 2015;93(2):172-7.
 66. Duran P. The Complications After Keratoplasty. *Keratoplasties - Surg Tech Complicat.* 2012;101-116.
 67. Streilein J. New thoughts on the immunology of corneal transplantation. *Eye.* 2003;17(8):943-948.
 68. Wilson S, Kaufman H. Graft failure after penetrating keratoplasty. *Surv Ophthalmol.* 1990;34(5):325-356.
 69. Arentsen J. Corneal transplant allograft reaction: possible factors. *Trans Ophthalmol Soc.* 1983;81:361-402
 70. Hodkin M. Complications of penetrating keratoplasty. In: Kaufman H, Barron B, McDonald M, eds. *The Cornea.* 2nd edition. St.Louis: MO:Butterworth-Heinemann; 1998:369.
 71. Kharod-Dholakia B, Randleman JB, Bromley JG, Stulting RD. Prevention and Treatment of Corneal Graft Rejection: Current Practice Patterns of the Cornea Society (2011). *Cornea.* 2015;34(6):609-14.
 72. Tasman W, Jaeger E. *Duane's Clinical Ophthalmology.* Hagerstown MD: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
 73. Erckens RJ, Jongsma FH, Wicksted JP, Hendrikse F, March WF, Motamedi M. Raman spectroscopy in ophthalmology: from experimental tool to applications in vivo. *Lasers Med Sci.* 2001;16(4):236-52.
 74. Hibben, J.H., (1939). *The Raman Effect And Its Chemical Application.* Reinhold Publishing Corporation, New York.

75. Ramaseshan S. Scientific papers of C.V. Raman, Vol.1: Scattering of Light. Bangalore: Indian Academy of Sciences, 1988.
76. Lyon L, Keating C, Fox A, Baker B, He L, Nicewarner S, et al. Raman spectroscopy. *Anal Chem* 1998;70:341R–61R.
77. Carey PR. Biomedical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. New York: Academic Press, 1982.
78. Battey D, Slater J, Wludyka R, Owen H, Pallister D, Morris M. Axial transmissive f/1.8 imaging Raman spectrograph with volume-phase holographic filter and grating. *Appl Spectrosc* 1993;47:1913–9.
79. Kim M, Owen H, Carey P. High-performance Raman spectroscopic system based on a single spectrograph, CCD, notch filters, and a Kr⁺ laser ranging from the near-IR to near-UV regions. *Appl Spectrosc* 1993;47:1780–3.
80. Puppels G, de Grauw C, te Plate M, Greve J. Chevrontype dielectric filter set for efficient narrow-band laser line rejection in Raman microspectrometers. *Appl Spectrosc* 1994;48:1399–402.
81. Morris, M. D. and G. S. Mandair. "Raman assessment of bone quality." *Clin Orthop Relat Res* 2011;469(8): 2160-2169.
82. Unal, M. Raman spectroscopic determination of bone matrix quantity and quality augments prediction of human cortical bone mechanical properties. *J Biomech* 2021;119: 110342.
83. Iriyama K, Mizuno A, Ozaki Y, Itoh K, Matsuzaki H. An application of laser Raman spectroscopy to the study of a hereditary cataractous lens; on the Raman band for a diagnostic marker of cataractous signatures. *Curr Eye Res* 1982/1983;2:489–92.
84. Itoh K, Ozaki Y, Mizuno A, Iriyama K. Structural changes in the lens proteins of hereditary cataracts monitored by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 1983;22:1773–8.
85. N.J. Bauer, J.P. Wickstedt, F.H.M. Jongsma, W.F. March, F. Hendrikse, M. Motamedi, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998;39, 831
86. R.J. Erckens, F.H.M. Jongsma, J.P. Wickstedt, F. Hendrikse, W.F. March, M. Motamedi, *J. Raman Spectrosc.* 2001;32, 733

87. Unal, M., S. Uppuganti, S. Timur, A. Mahadevan-Jansen, O. Akkus and J. S. Nyman. Assessing matrix quality by Raman spectroscopy helps predict fracture toughness of human cortical bone. *Sci Rep* 2019;9(1): 7195.
88. Boskey, A. L. Assessment of bone mineral and matrix using backscatter electron imaging and FTIR imaging. *Curr Osteoporos Rep* 2006;4(2): 71-75.
89. N. J. C. Bauer, F. Hendrikse and W. F. March,. *In vivo*confocal Raman spectroscopy of the human cornea., *Cornea*, 1999;18:483-488.
90. A. Mizuno, M. Tsuji, K. Fujii, K. Kawauchi, Y. Ozaki, *Jpn. J. Ophthalmol.* 1994;**38**, 44
91. Goheen SC, Lis LJ, Kauffman JW. Raman spectroscopy of intact feline corneal collagen. *Biochim Biophys Acta* 1978;536:197–204.
92. Stone N, Stavroulaki P, Kendall C, Birchall M, Barr H. Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results. *Laryngoscope* 2000;110:1756–1763.
93. Uzunbajakava N, Lenferink A, Kraan Y, Willekens B, Vrensen G, Greve J. Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells. *Biopolymers* 2003;72:1–9.
94. Andrade PO, Bitar RA, Yassoyama K, Martinho H, Santo AME, Bruno PM, et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1643–1648.
95. Lyng FM, Faolain EO, Conroy J, eMeade AD, Knief P, Duffy B, et al. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Exp Mol Pathol* 2007;82:121–9.
96. F.R. Paolillo, V.S. Mattos, A.O. de Oliveira, F.E.G. Guimarães, V.S. Bagnato, J.C. de Castro Neto, Noninvasive assessments of skin glycated proteins by fluorescence and Raman techniques in diabetics and nondiabetics, *J. Biophoton.* 2019;12.
97. Lee WB, Jacobs DS, Musch DC, Kaufman SC, Reinhart WJ, Shtein RM. Descemet’s stripping endothelial keratoplasty: safety and outcomes: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2009; **116**: 1818–30.

98. Shaw EL, Aquavella JV. Pneumococcal endophthalmitis following grafting of corneal tissue from a (cadaver) kidney donor. *Ann Ophthalmol* 1977. 9: 435.
99. D. Zhang, Y. Xie, M. F. Mrozek, C. Ortiz, V. J. Davisson and D. Ben-Amotz, Raman detection of proteomic analytes, *Anal. Chem.*, 2003;75:5703-5709.
100. D. Zhang, M. F. Mrozek, Y. Xie and D. Ben-Amotz, "Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition," *Appl. Spectrosc.*, 58:929-933, 2004.
101. R. C. Lord and N.T. Yu, "Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules: I. Native lysozyme and its constituent amino acids," *J.Mol.Biol.*, 50:509-524, 1970.
102. T. G. Spiro(Ed.), *Biological Application of Raman Spectroscopy*, New York:John Wiley & Sons, 1988.
103. Ermakov, I.V., Sharifzadeh, M., Gellermann, W. Raman Spectroscopy of Ocular Tissue. In: Matousek, P., Morris, M. (eds) *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010:285–314
104. Jianzhang Hu, Fujin Wu, Zufang Huang, Shuting Ma, Jingjin Zhang, Juan Yang, Xiaoli Han & Guoxing Xu. Raman Spectroscopy Analysis of the Biochemical Characteristics of Experimental Keratomycosis, *Current Eye Research*, 2016;41:11, 1408-1413.
105. Teresa I. Means, D.V.M., Dayle H. Geroski, Ph.D., Nancy L'Hernault, M.A., Hans E.Grossniklaus, M.D., Terry Kim, M.D., and Henry F. Edelhauser, Ph.D. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. *Cornea*1996;15:6 599-605.
106. Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edelhauser HF. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol* 1995;113:805-9.
107. L. P. Choo-Smith, H. G. M. Edwards, H. P. Endtz, J. M. Kros, F. Heule, H. Barr, J. S. Robinson, H. A. Bruining and G. J. Puppels, Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation, *Biopolymers*, 2002;67: 1-9.

108. E. B. Hanlon, R. Manoharan, T. W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari and M. S. Feld, "Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy," *Phys. Med. Biol.*, 45:R1, 2000.
109. Deinsberger J, Felhofer M, Kläger JP, Petzelbauer P, Gierlinger N, Weber B. Raman spectroscopy reveals collagen and phospholipids as major components of hyalinosis in the arteriolosclerotic ulcer of Martorell. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021 Nov;35(11):2308-2316.
110. Kurpakus Wheeler, M., Kernacki, K.A., and Hazlett, L.D. Corneal cell proteins and ocular surface pathology. *Biotech. Histochem.* 74:146–159, 1999.
111. Demir R. (çeviri ed.), *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş.* Palme Yayıncılık. İstanbul 2006; 227-50.
112. Fawcett DW. Bloom and Fawcett. *A Textbook of Histology.* 12th Edn., Chapman & Hall. New York 1994: 872-918.
113. Scott, J.E., (1992) Supramolecular Organization of Extracellular Matrix Glycosaminoglycans, *in Vitro and in The Tissues.* The FASEB Journal, 6(9), 2639-2645.
114. Pelosi, P., Rocco, P.R.M., Negrini, D., Passi, A., (2007) The Extracellular Matrix of the Lung And its Role in Edema Formation. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 79(2), 285-297.
115. Patel Dh (2017) Eye banking. In: I notes ophthalmology PG exam notes, cornea (eBook), 1st edn. 'DB' Da Books, p 27
116. Wilson SE, Bourne WM (1989) Corneal preservation. *Surv Ophthalmol* 33:237–259
117. Jeng BH (2006) Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophthalmol* 17:332–337
118. Javadi, M.A., Rezaeian Akbarzadeh, A., Chamani, T. *et al.* Sinasol versus Optisol-GS for cold preservation of human cornea: a prospective *ex vivo* and clinical study. *Cell Tissue Bank* 22, 563–574 (2021).
119. Kanavi MR, Javadi MA, Chamani T, Fahim P, Javadi F (2015) Comparing quantitative and qualitative indices of the donated corneas maintained in Optisol-GS with those kept in Eusol-C. *Cell Tissue Bank* 16:243–247