

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA SEFUROKSİMİN FARKLI SULANDIRMA
SOLÜSYONLARI İLE SULANDIRILDIKTAN SONRA
İNTRAKAMERAL UYGULAMA SONRASI KORNEA ÜZERİNE
LOKAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ferhan Yılmaz

İZMİR 2018

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA SEFUROKSİMİN FARKLI SULANDIRMA
SOLÜSYONLARI İLE SULANDIRILDIKTAN SONRA
İNTRAKAMERAL UYGULAMA SONRASI KORNEA ÜZERİNE
LOKAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ferhan Yılmaz

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Tülin Berk

ÖNSÖZ

Daima yeniliklere ve gelişmelere açık, araştırmaya meraklı ve kendisini sürekli geliştiren, bizlerin de bu yolda ilerlemesi için çaba gösteren saygıdeğer tez hocam Sayın Prof.Dr. Ayşe Tülin BERK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimdeki mikroskobik incelemeleri yapan ve mikroskopik görüntüleri sağlayan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Banu Kurtoğlu LEBE'ye, elektron mikroskopik incelemeleri yapan ve elektron mikroskopik görüntüleri sağlayan İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK'a ve İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'ne , Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Osman YILMAZ'a ve çalışmanın istatistiksel analizini gerçekleştiren Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Penbe KESKİNOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim boyunca oftalmoloji bilimini bana öğreten, deontolojik ve ahlaki değerlerini bana aktaran; başta Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof.Dr. F. Hakan ÖNER'e, değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet H. ERGİN'e, Prof. Dr. Süleyman KAYNAK'a, Prof. Dr. Ahmet MADEN'e, Prof.Dr. İsmet DURAK'a, Prof. Dr. Ali Osman SAATCI'ye, Prof.Dr. Üzeyir GÜNENÇ'e, Prof. Dr. Ayşe Tülin BERK'e, Prof.Dr. Meltem Söylev BAJİN'e, Prof. Dr. Zeynep ÖZBEK'e, Prof. Dr. Nilüfer KOÇAK'a, Prof. Dr. Aylin YAMAN'a, Doç. Dr. Gül ARIKAN'a, Yrd. Doç. Dr. A.Taylan Öztürk'e, Yrd. Doç. Dr. Mahmut Kaya'ya ve Uzm. Dr. Ziya AYHAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu güzel günleri birlikte geçirdiğim asistan arkadaşlarıma ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

DR. FERHAN YILMAZ

2018

İZMİR

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZETİ	vii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
BULGULAR	25
TARTIŞMA.....	40
SONUÇLAR	45
KAYNAKLAR.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR

BSS	:	Balance Salt Solution
SF	:	Serum Fizyolojik
MRSA	:	Metisilin Rezistan Staphylococcus aureus
MIK	:	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
D	:	Dioptri
Osm	:	Osmolarite
CV	:	Coefficient of Variation
HMDS	:	Hekzametildisilazan
SEM	:	Scanning Electron Microscope
TEM	:	Transmission Electron Microscope
USG	:	Ultrasonografi
SD	:	Standart Deviasyon
H&E	:	Hematoksilen-Eozin
µm	:	Mikrometre
CD	:	Cell Density
CV	:	Cell Variation
HEX	:	Hexagonal Cell Shape
AVE	:	Average Cell Densities

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Tablo-2: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

Tablo-3: Grupların Kornea Endotel Sayıları p Değerleri

Tablo-4: Grupların Kornea Endotel Sayıları Analizi

Tablo-5: Grupların Pakimetri Değerleri Analizi



RESİM LİSTESİ

- Resim-1:** Korneal Tabakalar ve Epitel Hücre Tabakası
- Resim-2:** Kornea Endotel Hücrelerinin Speküler Mikroskopik Görünümü
- Resim-3:** Grupların H&E Boyamada Stromal Kalınlık Görüntüsü
- Resim-4:** Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) SEM Görüntüsü
- Resim-5:** Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) SEM Görüntüsü
- Resim-6:** Grup III (kontrol grubu) SEM Görüntüsü
- Resim-7:** Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) Endotel Hücreleri Arasında Ayrılma Görüntüsü
- Resim-8:** Grup III (Kontrol) TEM Görüntüsü
- Resim-9:** Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) TEM Görüntüsü
- Resim-10:** Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) TEM Görüntüsü
- Resim-11:** Grup III (Kontrol) Speküler Mikroskopi Görüntüsü
- Resim-12:** Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) Speküler Mikroskopi Görüntüsü
- Resim-13:** Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) Speküler Mikroskopi Görüntüsü

ÖZET

Giriş: Dünyada ve ülkemizde katarakt cerrahisi yaygın olarak yapılmaktadır. Yaşam koşullarının iyileşmesi ve yaşlı insan nüfusunun giderek artması bu cerrahinin de artmasına sebep olmaktadır. Endoftalmi bu tür göz içi cerrahilerde görülen komplikasyonlardan biri olup, hem hasta için hem de hekim için üzücü bir tablodur. Endoftalminin önlenmesi için ameliyat öncesi ve sonrası bir takım önlemler alınmaktadır. Bu uygulamalardan birisi de operasyon sonunda intrakameral çeşitli antibiyotiklerin uygulanmasıdır. Sefuroksim bu antibiyotiklerden birisidir.

Amaç: Tavşanlarda sefuroksimin farklı sulandırma solusyonları ile sulandırıldıktan sonra intrakameral uygulama sonrası kornea üzerindeki lokal etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmaya, 2-2.5 kg'lık 14 adet Yeni Zelanda albino tavşanı dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tavşanlar 3 gruba ayrıldı. (grup-I: İntrakameral 1mg/0.1 ml SF ile sulandırılmış Aprokam® enjekte edilen grup, grup-II: İntrakameral 1mg/0.1 ml BSS ile sulandırılmış Aprokam® enjekte edilen grup, grup-III: İntrakameral enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu). Tavşanların gözleri bir hafta boyunca günlük takip edildi. İntrakameral enjeksiyonları yapılmadan önce ve yapıldıktan bir hafta sonra kornea kalınlıkları ultrasonik pakimetri yardımıyla ölçüldü. Korneaları alındıktan sonra tavşanlar sakrifiye edildi. Alınan kornealar speküler, ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için hazırlandı.

Sonuçlar: Speküler mikroskopik incelemelerde endotel hücre sayıları, sefuroksim sulandırılmasında SF kullanılan grupta BSS kullanılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı daha düşük saptandı ($p=0.040$). BSS grubunda kontrol grubuna göre endotel hücre sayılarında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0.948$). SF kullanılan grupta kontrol grubuna göre endotel sayısı istatistiksel anlamlı daha düşük saptandı. ($p=0.022$) Ultrasonik pakimetride enjeksiyon öncesi santral korneal kalınlıkların parametrik dağılmadığı görüldü ($p=0.127$). Her iki grupta enjeksiyon öncesi ve sonrası alınan pakimetri değerlerinde artış saptandı ve bu artışın istatistiksel anlamlı olduğu

hesaplandı.(p=0.038) Elektron mikroskopik incelemelerden SEM görüntülemeye her grupta kornea endotelinin hekzagonal yapılarının korunduğu görüldü.Endotel mikrovilluslarında her iki intrakameral enjeksiyon yapılan grupta kayıp olduğu bu kaybın SF uygulanmış grupta daha fazla olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise endotel mikrovilluslarının salim olduğu görüldü.SF uygulanan grup kornea endotelinde hücreler arasındaki sıkı bağlantılarda yer yer ayrışmalar olduğu saptandı.TEM görüntülemeye kontrol grubuna göre ilaç uygulanan her iki grupta mitokondrilerde şişme ,endoplazmik retikulumlarda kabalaşma, intrasitoplazmik belirgin vakuol oluşumları ve endotel hücre boyutlarında artış izlendi.Ancak her iki grup arasında TEM görüntülemeye belirgin bir bir farklılık saptanmadı. Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan mikroskopik incelemede Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) uygulanan grupta korneal stromanın Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) ve kontrol grubuna göre daha ödematöz ve kalın olduğu saptandı.

Tartışma: Tavşanlarda intrakameral uygulan sefuroksimin serum fizyolojik(SF) ile sulandırılmasının balance salt solution(BSS) ile sulandırılmasına göre endotel hücreleri üzerinde toksik etki oluşturarak endotel hücre sayısında azalmaya ve hücre içi ve hücrelerarası morfolojide değişikliklere sebep olabileceği saptanmıştır.İntrakameral olarak uygulanacak herhangi bir ilacın sulandırılmasında ön kamera sıvısına fizyolojik olduğu düşünülmeyen serum fizyolojinin(SF) kullanımında dikkatli olunması gerektiği ve literatürce ön kamera kullanımı için güvenilirliği kanıtlanmış balance salt solution(BSS) gibi diğer solusyonların tercih edilmesi korneal endotel fonksiyonlarının korunması açısından göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Sefuroksim, intrakameral antibiyotik, serum fizyolojik, balance salt solution, kornea endotel hücresi

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cataract surgery in our country and around the world is widespread. Improvement of the living conditions and increase elder population leads to an increase in this surgery. Endophthalmitis is a sad statement for both doctor and the patient, is a complication that seen in this type of intraocular surgery. For the prevention of endophthalmitis, several measures are taken before and after surgery. At the end of surgery intraocular various antibiotic injection is one of these measures. Cefuroxime is one of these antibiotics.

PURPOSE: We aim to compare the injections of intracameral cefuroxime with and without dilution within the context of its local effects on cornea.

METHOD: A total of 28 New Zealand white rabbit eyes were randomized to three groups: group A was injected intracamerally with 1 mg of cefuroxime diluted with 0.1 ml of normal saline (n=7), group B was injected with 1 mg of intracameral cefuroxime diluted with 0.1 ml of balanced salt solution (BSS), and group C received no treatment (control group; n=14). Corneal thickness was measured with pachymetry before and 1 week after the injection. Corneal samples were observed under light, specular and electron microscopes after the rabbits were sacrificed.

RESULTS: While mean endothelial cell count was lower in SF group compared to BSS group ($p=0.04$), there was no difference between BSS group and the control group ($p=0.1$) There was also a statistically significant difference lower in the normal saline compared to the control group ($p=0.02$). Although an increase in corneal thickness was found in treatment groups this was not the case for the control group ($p=0.03$) It was seen on scanning electron microscopy that the corneal endothelial preserved its hexagonal structure. While there was a loss of endothelial microvilli in the treatment groups, it was more prevalent in normal saline sub-group. In contrast, microvilli were preserved in the control group. Dissolution of tight junctions in corneal endothelium was observed in the normal saline group. While there was mitochondrial swelling, coarsening of endoplasmic reticulum, cytoplasmic vacuolization and increase in endothelial cell sizes in treatment groups compared to control, no difference was found between

subgroups of treatment. Hematoxylin and eosin staining showed thicker and more edematous corneal stroma in Group A compared to Group B and control group.

CONCLUSION: It was found that dilution of intracameral cefuroxime with balanced salt solution was superior to dilution with normal saline regarding toxicity of the endothelial cells and decline in the endothelial cell number causing changes to intracellular and intercellular morphology. Based on these findings, caution should be raised when using normal saline which is not considered isodense to anterior chamber, for the dilution of any medication that will be injected intracamerally. Instead, we recommend using of balanced salt solution or any other solution which have been proven safe in clinical studies for intracameral injections.

Keywords: Cefuroxime, intracameral antibiotic, normal saline, balanced salt solution, corneal endothelial cell

GİRİŞ VE AMAÇ

Endoftalmi katarakt cerrahisi sonrası potansiyel yıkıcı etkileri olan bir komplikasyondur. Değişik vaka serilerinde %0.04-0.2 oranında görülür.¹⁻³ Geçmişten bugüne bakteriyel endoftalmi gelişimini engellemek amacıyla preoperatif olarak topikal ve subkonjonktival antibiyotik uygulama ve povidon-iodine damlatma gibi pek çok kemoprofilaksi yöntemi uygulanmıştır.⁴⁻⁸ Giderek artan kanıtlar intrakameral antibiyotik uygulanmasının postoperatif endoftalmi gelişimini daha etkili bir şekilde engellediğini desteklemektedir.⁹⁻¹² Literatürde değişik vaka serileriyle güvenilirliği desteklenen moksifloksasin, sefalosporinler ve vankomisin gibi 3 farklı antibiyotik postoperatif endoftalmi gelişimini engellemek amacıyla off label intrakameral olarak uygulanmaktadır.¹³⁻¹⁸

Sefuroksim doz bağımlı olarak bakterisidal aktivite gösteren ikinci kuşak sefalosporin grubu bir antibiyotiktir. Diğer beta-laktam grubu antibiyotikler gibi hücre duvarı sentezini inhibe eder. Sefuroksimin bakterisidal aktivitesi konsantrasyon bağımlıdır ve minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIK) 4-5 katı dozunda bu etki ortaya çıkar. Etki spektrumu metisilin rezistan Staphylococcus aureus (MRSA) dışında birçok gram-pozitif ve gram negatif mikroorganizmaları kapsar. Sefuroksim sodyum etken maddesini içeren ve ülkemiz piyasasında yaygın olarak bulunabilen Aksef (Nobel), Cefaks (Deva), Cefurol (İE Ulagay), Enfexia (Bilim), Multisef (Mustafa Nevzat), Zinnat (GSK) ticari müstahzarlar serum fizyolojik (SF), ringer laktat ve BSS (Balance Salt Solution) gibi değişik solüsyonlar yardımıyla sulandırılarak 1 mg/0.1cc dozunda olacak şekilde katarakt cerrahisi sonrası ön kameraya uygulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada yukarıda ticari isimleri sırasıyla belirtilen 6 ilacın ortalama asidite ve osmolarite değerleri SF, BSS ve ringer laktat ile sulandırılma yapıldıktan sonra ölçüldüğünde ortalama asidite değerlerinde farklılık saptanmazken ortalama osmolarite değerlerinde farklılık saptanmıştır.¹⁹ Ön kameraya verilecek preparasyonların asiditeleri arasında anlamlı fark bulunmazken, osmolariteleri hazırlanmalarında kullanılan solüsyonlara göre belirgin farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu durum ön kameraya antibiyotik uygulanan katarakt cerrahileri sonrasında erken dönemde görülen ön segment reaksiyonlarının farklılığını açıklayabileceği düşünülmüştür.

Aynı zamanda bu preparatlar sistemik kullanım için hazırlanmış preparatlar olup ön kameraya uygulanması endikasyon dahilinde değildir. Özellikle katarakt cerrahisinin son aşamasında ön kameraya uygulanmak üzere piyasaya sefuroksim sodyum preparatı(Aprokam®, Thea Pharma) sürülmüştür.Bu preparatın prospektusunda %0.9'luk sodyum klorür (serum fizyolojik, SF) ile 1 mg / 0.1 cc dozunda olacak şekilde hazırlanıp uygulanması önerilmektedir.Yapılan bir çalışmada Aprokam® prospektüs bilgisinde yazdığı şekilde %0.9'luk sodyum klorür, BSS ve ringer laktat ile 1 mg / 0.1 cc dozunda olacak şekilde steril şartlarda sulandırılıp ön kamera sıvısının asidite ve osmolarite değerleri ile karşılaştırılmıştır. İlacın SF, BSS ve ringer laktat solüsyonları ile sulandırılması sonucu ortalama asiditesi sırasıyla 6.90, 6.93 ve 6.11 olarak ölçülmüştür. İlacın ortalama osmolarite değerleri incelendiğinde SF ile hazırlandığında 321.0 mOsm/kg, BSS solüsyonu ile hazırlandığında 347.0 mOsm/kg ve ringer laktat solüsyonu ile hazırlandığında 294.6 mOsm/kg olarak ölçülmüştür. Aköz humörün 7.2 civarında belirtilen pH değeri ve 330 – 345 mOsm/kg aralığında belirtilen osmolarite değerleri dikkate alındığında, ticari preparatın prospektüsünde yazıldığı aksine SF yerine BSS ile hazırlanmasının daha fizyolojik olacağı düşünülmüştür.²⁰

Bu çalışmada tavşanlarda ön kameraya spesifik olarak üretilmiş sefuroksim preparatının(Aprokam®, Thea Pharma), SF(Serum Fizyolojik) ve pratikte hem sefuroksimin hem de ön kameraya uygulanan diğer antibiyotiklerin sulandırılmasında literatürce desteklenmiş BSS(Balanced Salt Solution) ile sulandırıldıktan sonra; intrakameral uygulama sonrası kornea üzerindeki lokal etkilerini; ultrasonik pakimetri,sppeküler,ışık ve elektron mikroskopi yardımıyla araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1.Kornea

Kornea göz küresinin ön kısmında yer alan ve göz küresinin dış tabakasının ön 1/6'sını oluşturan ve çevresinde sklera ile devam eden şeffaf bir dokudur. Arka yüzden bakıldığında yuvarlak, ön yüzden bakıldığında oval görünümündedir. Embriyolojik olarak nöroektoderm ve mezenşim dokularından köken almaktadır. İlk olarak intrauterin hayatın 8. haftasında yüzey ektoderminden kornea epiteli ve Descemet membranı gelişmektedir. Sonrasında nöroektoderminden endotel oluşmaktadır. Beşinci ayda mezenşim dokusu göç eder ve kornea stromasını oluşturur. Stromanın ön yüzeyine yerleşmiş olan keratositler Bowman membranını oluştururlar. Kornea tabakalarından epitel ektoderm kökenli, diğer katlar mezenşim kökenlidir.²¹

Kornea, skleraya saat camı gibi yerleşmiş konveks bir yapıdır. Ön yüzünün eğriliği tüm korneada simetrik olmayıp, nazal perifer temporal perifer göre daha düzdür. +43 dioptri (D)'lik kırma gücü olan kornea optik görevinin yanında gözü dış ortama karşı koruyucu olarak da görev yapar.²¹

Korneanın kalınlığı santralde ortalama 520 μ , periferde 650 μ 'dur. Erişkinde yatay çapı

12.6 mm, dikey çapı 11.7 mm, ön eğrilik yarıçapı 7.8 mm, arka eğrilik yarıçapı 6.8 mm' dir

Korneanın kırma gücü ön yüzeyde +48 D, arka yüzeyde -5 D olmak üzere total +43 D'dir. Gözün total kırıcılığının % 74'ünü kornea sağlar. Yenidoğan döneminde dikey çap 10 mm ve kırıcılık gücü +51 D'dir. Bir yaşında erişkindeki değerlere ulaşır. Kornea gelişimi 6 yaşa kadar devam etmektedir. Kornea histolojik olarak ve önden arkaya doğru 5 ayrı tabakadan oluşur.²²

1. Epitel
2. Bowman membranı
3. Stroma
4. Descement membranı
5. Endotel

1.1.Epitel

Yenilenme özelliğine sahip olan korneanın epitel tabakası kırıcılığın büyük bölümünden sorumludur. Kornea epiteli 40-50 µm kalınlığında korneanın 1/10'unu oluşturan 5-7 tabaka hücreden meydana gelir. Çok katlı, keratinize olmayan ve sekresyon yapmayan bir yapıdır. İnsan vücudundaki en iyi düzenlenmiş epiteldir. Epitelin dış yüzü gözyaşı film tabakası ile örtülüdür.

Gözyaşı film tabakası dışta lipid, ortada aköz ve en içte müsin olan üç tabakadan oluşur.

Kornea epiteli gözyaşı filminin de katkısıyla mükemmel bir optik yüzey oluşturur.

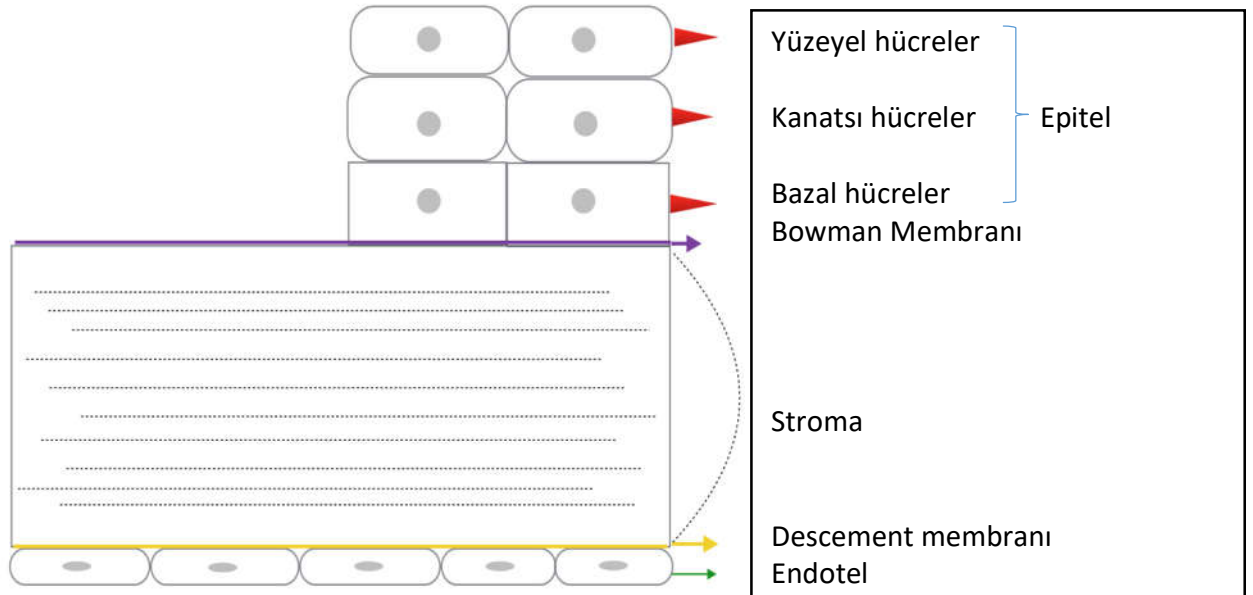
Kornea epiteli 3 tip hücreden oluşmuştur.

1-Bazal hücreler: Bu hücreler epitel katının 1/2'sini oluştururlar ve mitoz yeteneğine sahiptirler. Kaynağı limbus epitelidir. Bazal hücreler tek katlı silindirik yapıdadırlar. Bazal membrana hemidesmozomlarla, çevrelerindeki hücelere ise desmozomlarla bağlanmışlardır.

2-Kanatsı hücreler: Kanat benzeri uzantıları olan poligonal yapıda 2-3 sıra hücreden oluşmuşlardır. Birbirleri ile sıkı bağlantıları vardır.

3-Yüzeyel hücreler: 1-2 katlı yassı hücrelerden oluşur. Speküler mikroskopi ile bu hücrelerin genellikle 6 kenarlı, ancak farklı şekil ve büyüklükte poligonal hücreler olduğu gösterilmiştir. Dış yüzeyinde gözyaşının müsin tabakasının bağlanmasını arttıracak şekilde mikrovillus ve mikropikalar bulunmaktadır. Sadece yüzeyel hücreler arasında bulunan ve hücreyi tamamen çevreleyen zonula okludensler, komşu hücre membranlarının gerçek anastomozlarıdır; bunlar sayesinde korneal yüzey mikroorganizmalara, suya ve elektrolitlere geçirgenliği çok az olan semipermeabl bir membran gibi davranır. Kornea epitel hücreleri yaşlanınca değişime uğrarlar dökülme veya apoptozis ile uzaklaştırılırlar. Sadece bazal hücreler mitoz yeteneğine sahiptir. Limbustaki bazal epitele yerleşmiş olan kök hücreleri bazal hücrelerin sürekli çoğalmasını, merkeze ve yüzeye doğru hücrelerin ilerlemesini ve yüzeyel tabaka oluşumunu sağlarlar.²³ Yüzeyel hücreler olgunlaştıkça mikrovillusar ile kaplanır ve daha sonra dökülürler. Bu süreç 7-14 gün kadardır.

Korneada en fazla glukoz ve oksijen gereksinimi olan epitel tabakasıdır. Glukoz ihtiyacı ön kamera sıvısından ve difüzyonla limbal damarlardan sağlanırken, oksijen ihtiyacı ise kapaklar kapalı iken konjonktival damarlardan, kapaklar açıkken gözyaşı yoluyla atmosferden sağlanır.



Resim-1:Korneal Tabakalar ve Epitel Hücre Tabakası

1.2.Bowman Membranı

Kornea stroması ile epitel arasında yer alır. Kornea periferinde daha kalın olmak üzere 812 µm kalınlığındaki bu tabaka rastgele dizilmiş kollajen fibrillerden oluşmuştur. Sinir aksonları sonlanmaları dışında asellüler bir yapıdır. Tip I, III ve V kollejen ile bunların arasını dolduran tip VI kollajen filamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Tip VII kollejenden oluşan çapa fibrilleri de Bowman membranından geçerler ve hemen bu tabakanın altında bulunan çapa plaklarında sonlanırlar. Embriyonel hayatta stromanın ön yüzeyine yerleşmiş olan keratositler tarafından oluşturulur. Epitel bazal membranı Bowman tabakasına düzensiz liflerle sıkıca tutunur. Epiteldeki patolojilerin stromaya yayılmasını önleyen önemli bir bariyerdir. Kendini onarma yeteneği olmadığından hasarlanması skar oluşumuna neden olur.

1.3.Stroma

Korneal kalınlığının %90'ını oluşturur. Yaklaşık 500 µm kalınlığındadır ve % 78'i sudan oluşur. Keratositler, kollajen fibriller ve ekstrasellüler matriksten oluşur. Keratositler stromanın ana hücreleridir. Yassı ve uzun olup tüm korneada yaygın olarak bulunurlar. Kollajen ve mukoprotein sentezinden sorumludurlar. Yaralanmalarda fibrositlere dönüşürler. Sitoplazmalarında bulunan glikojen granülleri damarsız korneanın enerji deposunu oluşturur.

Kollajen lifler ekstrasellüler matriks içinde ağ şeklinde dizilmiş haldedirler. Birbirlerine paralel, eşit uzaklıkta, düzenli bir yerleşim gösterirler. Fibrillerin dizilişindeki anormallik kornea saydamlığını etkiler. Stromanın su içeriği de saydamlıkta önemlidir. Kornea, stromasında bulunan keratan sülfat, kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikanların osmotik etkisiyle su tutabilir. Korneanın hidrasyonu Na-K ATPaz gibi enzimlerce kontrol edilen endotel pompasının fonksiyonu ile sağlanır. Negatif yüklü glikozaminoglikanlar birbirini iterek germe basıncına neden olurlar. Ekstrasellüler matriks tip I, V, VI kollajenler, lumikan ve dekorin adlı proteoglikanları içerir.

Dua tabakası

İngiltere'nin Nottingham Üniversitesi'nde yapılan çalışmalar ile korneada daha önce varlığı bilinmeyen yeni bir tabaka keşfedildi. Profesör Harminder Dua tarafından keşfedildiği için Dua tabakası olarak adlandırıldı. Yeni keşfedilen Dua tabakası, kornea stroması ile Desme membranı arasında bulunur. Kalınlığı sadece 15 µm (0,015 milimetre) olmasına karşın son derece dayanıklı olan Dua tabakası 1,5-2 barlık basınca direnç gösterebilmektedir. Kornea grefti ve nakli ameliyatlarından çok daha iyi sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.²⁴⁻²⁶

1.4.Descemet Membranı

Stroma ile endotel arasında uzanan bazal laminadır. 10 µm kalınlıkta olup yaşlandıkça kalınlığı artar. İnce kollajen fibrillerden oluşur. Descemet membranı endotel hücrelerinden sentezlenir. Gebeliğin 4. ayında sentezi başlayan ve önde yer alan bantlı bölge ile yaşam boyunca endotel tarafından sentezlenen arkada yer alan bantsız bölge olmak üzere 2 tabakadan oluşur. Descemet membranı proteolitik enzimlere karşı direnci oldukça yüksek bir yapıdır; buna karşılık stromaya gevşek tutunduğu için stromadan kolaylıkla ayrılabilir. Aralarındaki tek bağlantı, stromadan descemete uzanan ve elektron mikroskobisinde görülebilen, bir mikrondan daha ince fibrillerden ibarettir.

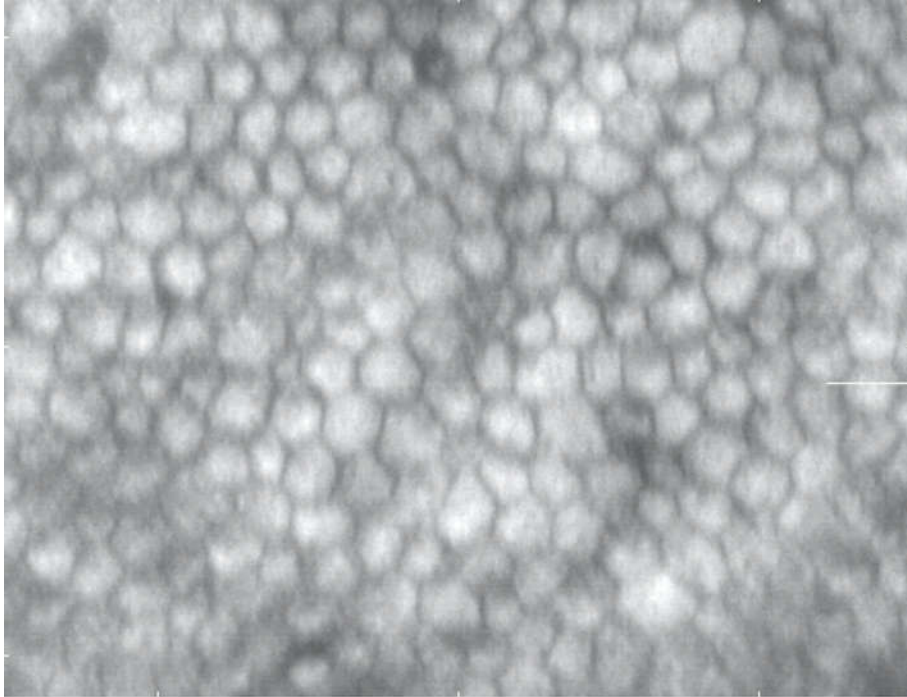
Kornea endotelinin yapısal hasarları Descemet membranının yapısında da değişikliklere yol açar. Descemet membranı limbusta sonlanır ve iridokorneal açıda Schwalbe hattını oluşturur.

1.5.Endotel

Korneanın arka yüzünde yer alan endotel tek sıra halinde dizilmiş yaklaşık 400 000 adet poligonal hücreden oluşmuştur. Endotel tabakasının kalınlığı doğumda 10 mikrondur. Endotel hücreleri yaşlanma ile yassılaşır ve erişkinde 5 µm kalınlığına ulaşır

(Resim 1). İntrauterin hayatta korneanın en iç tabakası nöral krestten köken alan tek katlı küboid hücrelerle kaplanmıştır. Hücreler önceki konumlarına göre daha düzleşirler ve bu hücre tabakasının önünde zaman içerisinde descemet membranını meydana getirecek homojen aselüler bir tabaka oluşur. Daha sonra endotel hücreleri trabeküler ağın hücreleri ile birleşirler ve tüm kornea arka yüzeyini kaplayan bir hücre tabakası haline gelirler. Descemet membranı da Schwalbe hattında trabeküler kolonla birleşir.

Genç erişkinde kornea endotel hücresi 5 μm yüksekliğinde ve 18-20 μm genişliğindedir. Endotel hücreleri, büyük nükleusları çok sayıda mitokondri ve diğer organelleri içeren stoplazmalarıyla metabolik olarak aktif hücrelerdir. Endotel hücresinin arka yüzü, uzunluğu 0,5 μm ile 0,6 μm arasında olan mikrovilluslarla kaplıdır. Bazı hücrelerde ise oligosiliyalar bulunur. Bu endotel hücrelerinin kenarları arasında gap junction ve tight junctionlar bulunur. Endotel hücrelerinin dış tabakalarında Na-K ATPaz pompaları yer alır. Endotel tabakası ile descemet membranı arasında ise hemidezmozomlar yer alır.



Resim-2: Kornea Endotel Hücrelerinin Speküler Mikroskopik Görünümü

Endotel tabakası h    r aközün stroma içine geçişine karşı bir bariyer oluşturur; ayrıca stromadaki mevcut birikmiş suyun dışarı pompalanmasını sağlar. Saydam bir kornea ancak sağlıklı bir endotel tabakası ile mümkündür. Çeşitli nedenlerle endotel kaybı meydana geldiğinde ve bu kayıp kritik oranda meydana gelirse, kornea normal su oranını koruyamaz ve geri d  n    ms  z olarak şişer; saydamlığı bozularak matla  ır böylece kırıcı özelliğini kaybeder. Hoffer ve arkadaşları endotel hücre sayısının 300/mm² nin altına düşerse korneal dekompanasyon gelişeceğini, hücre sayısı 300-500 arasında ise dekompanasyon riskinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.²⁷ Bir yüzeyi termodinamik olarak kapatabilmek için en uygun   ekil altıgendir. Endotel hücreleri mozaik paterni (arı kovanı) sayesinde bariyer fonksiyonlarını en iyi şekilde yerine getirmektedirler. Hekzagonal   ekil ile her bir hücrenin   evre alanı en aza indirilmiş ve birim alandaki pompa sayısı en fazla arttırılmış olur. Stromadan net sıvı   ıkı  ı göreceli olarak hipoozmotik olan stromadan hiperozmotik h    r ak  ze doğru olmaktadır. Bu hareket herhangi bir enerji gerektirmemektedir. Ozmotik farkı oluşturan hücre içi karbonik anhidraz ve membrana bağlı Na-K ATPaz iyon taşıma sistemlerinin çalışabilmesi için ise enerji gereksinimi vardır. Gerekli enerjiyi glikozdan ve hücrelerinde depolanmış olan glikojenden sağlamaktadır. Bu sistemler ile akım stromadan ak  ze doğru sağlanır. Endotelin bariyer fonksiyonu bir dereceye kadar geçirgen olması ve ozmotik farkı oluşturacak şekilde iyon akımına izin vermesi açısından   zg  nd  r.

Yenidoğanda kornea endotel hücre yoğunluğu 3500-4000/mm² olup hücre yoğunluğu ya  lanma ile birlikte azalma göstermektedir. Doğum sonrası endotel hücre yoğunluğunda ilk hızlı dışı hayatın birinci yılında olur ve korneanın sürekli büyümesi karşısında total endotel hücre sayısı sabit kalırken endotel hücreleri hipertrofi gösterir. Yirmili ya  larda endotel kaybı sonucu hücre yoğunluğunda daha az oranda azalma meydana gelir ve bundan sonra ya  lılık döneminde bu d       kademeli olarak devam eder. 20 ya  ından sonra hücre yoğunluğunda ortalama azalma yıllık olarak %0.52 civarında seyreder. Hücre yoğunluğu 3000-4000 hücre/mm² den 2600 hücre/mm² düzeyine iner. Kornea yüzey topografisi de yaşla birlikte değişmektedir ve endotelde altıgen hücrelerin oranı azalarak %75'den %65'e inmektedir.²⁸ Endotel hücrelerinin yenilenme yeteneği yoktur. Endotel hücreleri gelişen hasarlara migrasyon ve hipertrofi ile yanıt verirler. Köşk

travmalar da endotel hücreleri sadece kendi hacmini artırır yani hipertrofiye uğrar. Hücredeki bu değişikliklerin hücre içi mikroflamanlara bağlı olduğu düşünülmektedir.²⁷ Travma, hipoksi, hiperglisemi, çeşitli ilaçlar, ozmolarite veya cerrahi gibi nedenlerle kornea endotelinde hasar meydana geldiğinde hasarın tamiri için komşu endotel hücrelerin bu alanlara migrasyonu gerçekleşir. Bu olay hücre sitoplazması içinde bulunan f-aktin molekülü tarafından meydana getirilir. Bu sırada hücreler daha yassı bir hal alırlar. Bu şekilde, hücre büyüklüğünde artış olur. Hasarlı bölgelerde hücreler uzar ve on veya daha fazla kenarlı dev hücreler gözlenir. Endotel hücreleri arasındaki boşluk artar ve hücreler daha geçirgen bir duruma gelirler. Hücreler hasarlı bölgede toplandığı zaman diğer hücrelere bu yeni katılan hücrelerin teması ile migrasyon işlevi son bulur. Buna temas inhibisyonu adı verilmektedir. Ortalama endotel hücre alanındaki artış ve buna bağlı hücre yoğunluğundaki azalma kalıcıdır. Endotelin yeniden yapılanmasının mekanizmasının yüzey gerilim enerjisi ile bağlantılı olabileceği de bildirilmektedir.²⁹

1.5.1. Endotelyal Morfometri:

Hücre büyüklüğünün benzerlik derecesi, hücre popülasyonunun apikal membranının alanının ölçümü ile saptanır ve değişiklik katsayısı [“Coefficient of variation”, (CV)] hesaplanır (ortalama hücre alanının standart sapması/ortalama hücre alanı). Normal endotelde CV değeri yaklaşık 0.25’dir. Bu değerdeki artış hücre boyutundaki değişkenliği gösterir ve polimegatizm olarak ifade edilir. Yalnızca hücre yoğunluğunun ölçümü korneal endotelyal stabilitenin ölçümü için yeterli görülmemektedir.³⁰

Korneal endotelyal hücrelerin apikal yüzeyi bir mozaik görünümündedir. Genç ve sağlıklı kornealarda endotel hücrelerinin % 70-80’i hegzagonaldir. Hegzagonal hücrelerin azalıp hücre sayısının artmasıyla beraber hücre kenarlarının 6’dan az veya fazla sayıda olması pleomorfizm olarak bilinir ve endotelyal stresin bir işareti olabilir. Güncel çalışmalarda penetran keratoplasti sonrası şeffaf greftlerin 15-33 yıl izlenmesiyle endotelyal hücre sayısının 575-1243 hücre/mm² arasında değiştiği bildirilmiştir. Bourne, Nelson ve Hodge endotelyal hücre kaybı oranının cerrahi sonrası 3-5 yılda yıllık % 7.8 olduğunu rapor etmiştir.³⁰

1.5.2.Endotelial Fizyoloji:

Kornea stromasında yer alan proteoglikanların elektriksel yükü sebebiyle stroma, suyu içine çekme eğilimindedir. Buna rağmen normal durumlarda in vivo olarak stroma ödemi gelişmemektedir. İki faktör kornea stromasındaki ödemi önleyip stromanın su içeriğini % 78 seviyesinde tutar. Bunlar, endotelin bariyer ve pompa fonksiyonlarıdır.

Endotel çıkarıldıktan veya metabolik pompa inhibe edildikten sonra in vitro olarak korneanın ödemlenme oranları karşılaştırılmıştır. Endotel çıkarıldığı zaman kornea kalınlığının saatte 127 μm arttığı ve bu hücre katının önemli bir bariyer olduğu görülmüştür. Metabolik pompa inhibe edildiğinde kornea kalınlığı saatte 33 μm artar; bunun su ve iyonların aköz hümörden stromaya doğru intakt hücre katının sızdırma özelliği olan bariyerden kaynaklandığı gözlenmiştir. Stromaya doğru olan bu normal sızıntı korneanın vital fonksiyonlarını sağlamaktadır. Çünkü bu sızıntı sayesinde avasküler olan korneanın glukoz ve aminoasit gibi beslenme ihtiyaçları karşılanmaktadır.

29

Eğer stromadan sıvıyı çıkaracak mekanizma olmasaydı, suyun stroma içine devamlı hareketi ödeme yol açacak ve korneanın şeffaflığı kaybolacaktı. Normal kornea kalınlığı ve su içeriğinin sürdürülmesi sıcaklığa bağlıdır. Kornea soğutulduğu zaman ödemlenir ve sıcaklık normale getirildiğinde kornea da normal kalınlığına döner. Bu fenomen ısıyla ters dönme olayı ("temperature reversal") olarak bilinir. Bu durum soğutucuda beklediği süre içinde ödemlenen, nakil sonrasında normal kalınlık ve şeffaflığına kavuşan göz bankası kornealarında gözlenmiştir.^{29,31-33}

Isıyla ters dönme olayı kornea hidrasyonunun sağlanmasının metabolik enerji bağımlı bir süreç olduğu ve endotel tarafından stromadan aköz hümöre 6-8 ml/saat su taşındığı gösterilmiştir. Başlangıçta suyun kornea tarafından aktif olarak taşındığı varsayılmış ve buna da terminolojik olarak sıvı pompası adı verilmiştir. Günümüzde hücre zarlarının iyonlar, aminoasitler ve şekerler için taşıyıcılar içerdiği bilinirken, suyu taşıyan aktif bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı bilinmemektedir.

Su aktif transport mekanizmasından ziyade, iyonların aktif transportu sonucu oluşan gradyentle ozmotik olarak hareket eder. Bu yüzden sıvı pompasından ziyade metabolik pompa terimi kullanılmalıdır. Normal korneal hidrasyon, kornea endotelinden kaçak ile korneal şeffaflığı sağlayan aköz hümördeki ozmotik gradyent (bu ozmotik konsantrasyonu sağlayan major faktör sodyum iyonudur) ile sağlanan iyonların ve sıvının, endotelial metabolik pompayla dışarı atılması sonucu oluşan dengeyle sağlanır.²⁹

2.Sefuroksim ve Gözdeki Kullanımı

Sefuroksim oral ve parenteral kullanılabilen 2. kuşak sefalosporin grubu bir antibiyotiktir. Beta-laktamaz üreten mikroorganizmalar, sefuroksime karşı dirençlidir. Bakterisidal etkilerini hücre duvar sentezini inhibe ederek ve otolitik enzimleri aktive ederek yaparlar. Sefuroksim sodyum, beyazımsı-açık sarı renkte bir tozudur. Çözücü (enjeksiyonluk su) ile çözüldükten sonra çözücü hacmine göre gri-beyaz süspansiyon veya sarımsı bir çözelti verir.

Beta laktamaz üreten mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı oluşturduğu direnç, bakterinin dış membran geçirgenliğinin azalması, bakterideki penisilin bağlayan proteinlerin antibiyotiğe karşı ilgilerinin azalması, antibiyotiğin bakterinin oluşturduğu beta laktamaz enzimi tarafından parçalanması ve antibiyotiğin hücre dışına pompalanması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Klinikte beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinden sorumlu mekanizmalar içinde en önemlisi antibiyotiğin bakterinin ürettiği beta laktamaz enzimleri tarafından hidrolize edilmesi sonucunda aktivitesini yitirmesidir.³⁴

Antibiyotiğin hücre dışına pompalanmasına bağlı direnç hidrofilik yan zincirleri nedeniyle sefalosporinlere karşı az görülse de daha çok tetrasiklinler, kloramfenikol ve kinolonlar için tarif edilen mekanizmaların başında gelmektedir.³⁴

Sefuroksim diğerk 2. kuşak sefalosporinlere göre daha geniş etki aralığına sahiptir.

Pseudomonas türleri, metisiline dirençli Staphylococcus aureus, metisiline dirençli Staphylococcus epidermidis gibi bazı suşlara karşı etkili değildir.³⁵

İntramuskülör 1gr uygulamadan 1 saat sonra 32,2-39,1 µg/ml aralığında bulunmuştur. Serum yarılanma ömrü yaklaşık 70 dakikadır. Sefuroksim metabolize olmaz ve glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonla uzaklaştırılır. Aköz hümorede 1.5 gr dozdan sonra en yüksek 1,6 µg/ml konsantrasyonda saptanmıştır.

Sefuroksimin, 3 saat arayla 1.5 gr intramuskülör 2 doz uygulamadan 1saat sonra hümore aközdeki konsantrasyonu 4,1±1,98 µg/ml olarak bulunmuştur.³⁶

Sefuroksim 500 mg tablet olarak alındıktan 3-8 saat sonra aközden alınan örneklerde sonuç ortalama 0,48±0,13 µg/ml olarak bulunmuştur.³⁷

Tavşan gözlerinde konjonktiva altına verdiği sefuroksimin ön kameraya geçişinin iyi fakat vitreusa geçişinin zayıf olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca vitreusa verilen sefuroksimin 24 saate kadar etkin konsantrasyonda kaldığını bulmuşlar. Elektoretinografi çalışmalarında uygulamadan sonraki 55. günde retinada toksik değişiklik saptanmamıştır.³⁸⁻⁴⁰

Sefuroksimin intrakameral 1mg/0.1ml dozda verildikten 30 saniye sonra konsantrasyon 2742mg/l, 1 saat sonra 756 mg/l olarak saptanmıştır. Bu miktarlar mikroorganizmaların MİK90 değerinden kat kat yüksektir. Sefuroksimin 7.42 pH değeri ve 311 mOsm/kg osmolalitesiyle göz içi dokulara uygun olduğu bildirilmiştir.^{41,42}

3.Speküler Mikroskopi

Speküler mikroskop; pürüzsüz kornea yüzeyinin ayna gibi yansıtma özelliğine sahip olmasına dayanan, korneal doku yüzeyine yarık ışık düşürüp, yansıyan ışığı bir film düzlemi üzerine toplayarak, dokunun görüntüsünü sağlayan bir yansıyan ışık mikroskopudur. Endotelyal speküler mikroskopinin esası, endotelin görsel izlemine ve endotelyal görüntünün morfolometrik analizini mümkün kılmasıdır. Gençlerde speküler mikroskopide normal kornea endoteli hücrelerinin hemen hepsi benzer şekilde ve düzenli hegzagonal bir görünümündedir. Yaş, travma ve korneal hastalıklarla bu düzen bozulabilir.⁴³⁻⁴⁷

Klinik speküler mikroskopide esas önemli olan yansıma açısının gelme açısına eşit olduğu ayna görüntüsü şeklindeki ışıktır. Normal şeffaf kornea için görünür ışığın epitelyal yüzeyden büyük kısmının geçmesi beklenir. Işık korneal dokuya doğru ilerlerken bir kısmı doku tarafından absorbe edilebilir; bir kısmı ise sinir tabakası, keratositler ve diğer refraktif objeler tarafından yansıtılabilir. Normal korneanın stromasında ışığın çok büyük kısmı doku içine doğru ilerler; buna rağmen küçük miktarda ışık sellüler organeller ile absorbe edilir ve/veya saçılır. Korneal ödemdeki artışla ışığın saçılan kısmı artar ve baskın kısmı olabilir, böylece puslu ("hazy") kornea ortaya çıkar. Işık kornea arka yüzüne ulaştığında hemen hemen tamamı aköz hümöre geçer. Çünkü burada endotel-aköz hümör yüzeyinde kırıcılık indeksinde bir değişim vardır ve toplam yüzeye düşen ışığın yaklaşık % 0.022'si yansır. Bu yansıyan ışık klinik speküler mikroskopa endotelyal görüntü formunda yakalanır.

3.1 Speküler görüntünün kalitatif morfolometrik analizi

Kalitatif hücresel analiz, anormal korneal endotelyal yapıları tanımlar. Korneal endoteli, ayrıntılı görsel değerlendirme temelinde, anormal yapıların sayı veya boyutuna göre sınıflar. Kalitatif hücresel analizde esas olan, endotelin subjektif olarak değerlendirilmesini sağlamaktır. Bu sebeple speküler fotomikrografta kesin bir sayısal değer tespit edilemez. İnceleme bu şekli ile; göz içi cerrahilerin risklerinin değerlendirilmesinde, korneal endotelyal patolojilerin tanısının koyulmasında veya tedaviye karar verilmesinde endotelin hızlı klinik muayenesini sağlamaktadır. Tam

kalitatif inceleme için birkaç parametrenin değerlendirilmesi gerekir. Bu parametreler hücre benzerliği, hücre sınırları ve bunların kesişme yerleri, karanlık sınırın konfigürasyonu ile aselüler yapıların varlığıdır.⁴⁸

3.1.1 Hücre Benzerliği: Normal gözlü genç insanlarda santral endotelyal hücreler hegzagonal ve aşağı yukarı aynı boyuttadırlar. Hücre alanı dağılımı normaldir. Yaş ile ortalama hücre alanı artar; hücresel patern açıkça çok şekilli (pleomorfik) olur; hücre boyutu dağılımı daha büyük hücre alanlarına doğru giderek daha çarpık hal alır. Normal gözlü genç insanlarda hücre kenar uzunlukları tümünde hemen hemen eşittir. Yaşlı bireylerde kenar uzunluklarındaki bu düzen bozulur ve çeşitli varyasyonlar gözlenir; korneal endotelyumdaki bu varyasyonlar uzamış hücreler, yuvarlak hücreler, kare şeklinde ve üçgen hücrelerdir.

3.1.2 Çeşitli yapılar: Endotel içi ve endotel arası hücresel yapılar endotelyal fotoğrafta diğerlerinden karanlık veya aydınlık görünümde olabilir. Bunlar izole düzgün kabartılar (kornea guttata), çok sayıda birleşmiş kabartılar, hücre içi parlak yapılar, pigmente endotelyal depozitler, hücre içi karanlık yapılar, inflamatuvar hücre istilasına bağlı olabileceğine inanılan hücreler arası karanlık yapılardır.

3.2 Speküler görüntünün kantitatif morfometrik analizi

Kantitatif analizin amacı speküler fotomikrografta endotelyal durum hakkında bilgi verecek sayısal bir değerlendirme yapmaktır. Kantitatif değerlendirme için kullanılan çeşitli morfolojik parametreler hücre büyüklüğü (hücre alanı veya hücre yoğunluğu), polimegatizm (hücre büyüklüğündeki değişkenlik), pleomorfizm (hücre şeklindeki değişkenlik), hücre çevresi (perimeter), ortalama hücre kenar uzunluğu ve hücre şeklidir.

İki eşdeğer parametre endotelyal hücre büyüklüğünün nicelleştirilmesinde kullanılır. Bunlar ortalama hücre alanı ve yoğunluğudur (veya hücre sayısı). Hücre alanı hücrenin boyutunun mikrometrekare (μm^2) cinsinden ifadesiyle, hücre yoğunluğu ise her bir milimetrekareye (mm^2) düşen hücre sayısı ile belirlenir.

Ortalama hücre alanı ($\mu\text{m}^2/\text{hücre}$) = $1000000/\text{hücre yoğunluğu (hücre/ mm}^2)$ Sabit çerçeve analizi ve değişken çerçeve analizi gibi iki değişik metod hücre boyutunu gösteren bu iki parametreyi ölçmekte kullanılabilir.⁴⁸

3.2.1 Hücre boyutunun sabit çerçeve analizi: Sabit çerçeve analizinde bir çerçeve veya penceredeki sabit alan içinde bulunan hücrelerin sayısının hesaplaması yapılır. Çerçeve içinde duran hücrelerin tamamı bir bütün olarak sayılır. Çerçeve içinde kısmi olarak bulunan her bir hücre çerçeve içinde bulunan hücrelerin kısmi alanına bakmayarak yarım hücre olarak sayılırlar. Hücrelerin toplam sayısı, çerçeve içindeki yarım ve bütün hücrelerin sayısının toplamı olarak kabul edilir. Sayım işleminin hızını arttırmak için genellikle bir simetri esasından faydalanılır ve çerçevenin iki kenarı ile kesilen tüm hücreler bütün olarak sayılırken, çerçevenin diğer iki kenarı ile kesilen hücreler sayılmaz. Hücrelerin büyüklüğü çerçevenin alanının hücre sayısına bölünmesiyle, hücre yoğunluğu ise mm^2 'deki hücre sayısı ile tespit edilir (Tomey Endothelium Specular Microscope, EM-2000).⁴⁹

3.2.2 Hücre boyutunun değişken çerçeve analizi: Bu yöntem çerçeve sınırı boyunca uzanan çok küçük hücrelerin sayımından kaynaklanan problemleri ortadan kaldırır. Böylece sabit çerçeve analizine göre ortalama hücre boyutunun çok daha doğru saptanmasını sağlar. Değişken çerçeve analizinde kişi ilk olarak bir alanı dolduran birbirine komşu hücre gruplarının çevrelerini, daha sonra her hücreyi fare ile tıklayarak işaretler. Bilgisayar hücre yoğunluğunu, işaretlenmiş hücre sayısını çerçeve alanına bölerek bulur.

3.2.3 Merkez Yöntemi (Center Metod): Kullanıcı her bir hücrenin merkezini işaretler. Daha sonra cihaz hücre boyutu ve alanını hesaplar (Konan Eye Bank Kerato Analyzer, Model EKA-98, Japonya).

4.Kornea Kalınlığını Değerlendirme Yöntemleri

Korneal pakimetri bugün için 'hatırlanmış' bir teknik olarak addedilebilir. Santral Kornea Kalınlığı (SKK) ölçümü ilk kez Blix tarafından 1880 yılında yaşayan insanlarda

yapılmıştır. Daha önceki çalışmalar postmortem anatomik çalışmalar olup SKK 1 mm olarak bulunmuştur. Blix 10 gözde direk optik ölçüm yapmış ve SKK değerini genç erkeklerde 0.5 mm olarak belirlemiştir. Bin dokuz yüz elli birde Maurice ve Giardini pratik, klinikte kullanılabilen bir pakimetre geliştirdi. Bu pakimetre optik prensiplere dayalı ölçüm yapıyordu. Korneanın ön ve arka yüzeyinden yansıyan speküler görüntülerin Haag-Streit slit-lamp 900 mikroskopunda görüntülenmesi esasına dayalıydı. Kırk dört kişide yaptıkları ölçümlerde SKK 507 μm olarak bulmuşlardır.⁵⁰ Olsen ve Ehlers 1984'de benzer speküler yöntemi kullanarak yaptıkları ölçümlerde SKK $517 \pm 0.0031 \mu\text{m}$ olarak belirledi.⁵¹ Bin dokuz yüz elli ikide Jaeger son 10 yıldır yaygın bir şekilde kullanılacak olan optik pakimetreyi geliştirdi.⁵² Haag-Streit slit-lamp 900 mikroskopuna monte bir sistemle, saydam yapılarda, optik bölümde ışığın yayılımı prensibine dayalı olarak ön ve arka sınırlar belirlenir; sırasıyla korneal epitel ve endotelden yansıyan iki görüntüden optik kısmın kalınlığı tahmini olarak tespit edilir. Hansen bu aletle 1971'de yaptığı çalışmada ortalama SKK değerini $520 \pm 0.021 \mu\text{m}$ olarak tespit etti.⁵³ Bin dokuz yüz yetmiş beşte Green ve ark. korneada ışığın hızı ile ilişkili, dokulardan geri yansıyan ışık hızları arasındaki farkı tespit ederek korneal kalınlık ölçümünün mümkün olabileceğini gösterdi.^{54,55} Bu bir optik interferometri olup, saydam dokuların kalınlığı ölçülebilmektedir. Günümüzde ise optikal koherans tomografi bu prensibe göre ölçüm yapmaktadır. Ultrasonik pakimetrede, optik interferometriye benzer, ışık yerine ultrason dalgaları kullanılmaktadır. Doku içinde ses dalgalarının yayılım hızındaki değişikliğe bağlı akustik yüzeylerden oluşan, ekolar tespit edilmektedir. Bin dokuz yüz seksenlerden sonra bilgisayarlı korneal topografik sistemler geliştirilmiştir. Günümüzde lazer interferometri, konfokal mikroskopi, nonkontakt speküler mikroskopi ve ultrason biomikroskopi gibi yeni ve daha karmaşık aletler kullanıma girmiştir.

Günümüzde SKK ölçümünde kullanılan aletler iki prensibe göre ölçüm yapmaktadır:

1- Optik yöntem (Slit-Lamp Pakimetri, Non-kontakt Speküler Mikroskopi, Tarayıcı Korneal Topografi (Orbscan II), Pentacam (OCULUS Inc., Almanya), Konfokal Mikroskopi, Optik Koherans Tomografi)

2- Ultrasonik yöntem (Ultrasonik Pakimetre ve Ultrason Biyomikroskobu)

Pratik olarak en sık kullanılan, altın standart yöntem ultrasonik pakimetredir.⁵⁶⁻⁵⁸ Korneaya temas etmesi ve topikal anestezi gerektirmesi dezavantajlarıdır. Tekrarlayan ölçümler sırasında gözyaşı film tabakasının değişikliği, korneal epitel tabakasının baskıya uğraması ve hücre sayısındaki değişiklikler klinik olarak pek anlamlı olmasa da ölçüm değerlerinde yaklaşık 5 µm civarında hataya neden olabilir.

Ultrasonik pakimetre ile SKK ölçüm tekniğinde temel prensipler şunlardır: Hasta oturur pozisyondayken lokal anestezi damla damlatılır. Hasta karşıya baktırılır ve korneal ışık refleksi belirlenir ve ışık reflesinin 1.5 mm temporaline yani kornea santraline ultrason probu (1,5 mm'lik bir alan) dik olarak temas ettirilerek 3 kez ölçüm yapılır ve ortalaması alınır. Korneanın santralinden periferine doğru gidildikçe kornea kalınlığı artmaktadır. Bu nedenle gerçek kornea santralini belirlemek önemlidir. Yanlış lokalizasyon yanlış ölçüme yol açacaktır.^{54,55} Kornea santrali, vizüel aksın 1.5 mm temporal olarak kabul edilir. Vizüel aks, korneanın santrali, pupilla ve lensin ortasından geçerek makulayı birleştiren çizgidir. Pratik olarak, kornea ışık reflesinin 1.5 mm temporalidir. Korneanın en ince bölgesi ise korneal ışık reflesinin 1.5 mm alt temporalidir.⁵⁹ Edmund'a göre kornea santrali %69 oranında vizüel aks ile çakışır; %26 vizüel aksın temporal, %5'i nazaldir. Kornea kalınlığı ölçüm değerleri şöyledir: Santral 550 µm, temporal 590 µm, nazal 610 µm, inferior 630 µm, superior 640 µm.⁶⁰

5.Kornea Dokusunun Saklanması

İdeal kornea saklama yöntemi endotelyal ve epitelyal canlılığı sürdürmeli, endotelyal canlılığın değerlendirilmesine müsaade etmeli, saklama süresince korneanın saydamlık ve inceliğini korumalı, sınırsız bir saklama zamanı sunmalı, sterilite sağlamalı, taşımaya müsaade etmeli, teknik olarak basit olmalı, lameller veya penetran keratoplasti için uygun doku sağlamalı ve fiyatı ucuz olmalıdır.

Donör kornea üç şekilde saklanmaktadır. Bunlar; nemli kamarada saklama, hipotermik korneal saklama ve organ kültürüdür.

5.1.Nemli kamarada saklama:

İlk olarak Filatov tanımlamıştır.⁶¹ Enükle edilmiş göz, gazlı bezle birlikte bir kamaraya yerleştirilir ve genellikle salin veya antibiyotik solüsyonuyla nemlendirilir; 4 °C'de bekletilir. Dezavantajı, saklama süresinin 24 saatle sınırlı olmasıdır.

5.2. Hipotermik korneal saklama:

M-K medyum, McCarey ve Kaufman tarafından geliştirilmiş olup, TC 199 ve dekstran içerir. dört °C'de saklanmaktadır.⁶² Güvenilir saklama süresi 2-3 güne kadar uzamıştır. Sonraki yıllarda HEPES tamponu ile stabilitesi arttırılmış, gentamisin yanına penisilin ve streptomisin ilavesiyle antibakteriyal spektrumu genişletilmiştir.^{63,64} Temel M-K medyum içine kondroitin sülfat ilavesiyle K- Sol elde edilmiştir. Saklama süresi 7-10 güne uzamıştır.⁶⁵ Ancak kondroitin sülfat içeren bu solüsyonun problemi korneanın küçük molekül ağırlıklı parçaları içine alması ve ozmotik etki sonucunda ödemlenmesiydi. Bu solüsyona dekstran ilave edilmesiyle geliştirilen Deksol bu sorunun üstesinden gelmiştir. Optisol en son geliştirilen ticari saklama ortamıdır ve Deksol'e göre endotelial hücre morfolojisi ve kornea kalınlığını daha iyi korumaktadır.⁶⁶ Kornea 7- 10 gün süresince 2-6 °C'de saklanabilir. Üreticiler Optisol'ün oda ısısında (21 °C) 48 saat süresince korneal koruma özelliğini koruduğunu bildirmiştir.⁶⁶ Optisol, antimikrobiyal olarak streptomisin ve gentamisin içerir.³¹

5.3.Organ kültürü:

Saklama ısısı 31-37 °C'dir. Kornea 35 güne kadar saklanabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

HAYVAN DENEYİ

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi ve Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nın katkılarıyla, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'nun 18/2017 protokol numaralı izni ile Temmuz 2017-Aralık 2017 gerçekleştirildi. Çalışmaya, 2-2.5 kg'lık 14 adet Yeni Zelanda albino tavşanı dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tavşanlar 2 gruba ayrıldı. Tavşanlar çalışma süresince standart oda ısısında (20 ± 2 oC) ve 12'şer saatlik aydınlık / karanlık ortamında tutulup, standart pelet tavşan yemi ile beslendi, yem ve suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı ve iki grup oluşturuldu. Tavşanların sağ gözlerine intrakameral Aprokam® (Sefuroksim) enjeksiyonu yapıldı. Sol gözler kontrol grubu olarak alındı.

Grup I (n:7): İntrakameral 1mg/0.1 ml SF ile sulandırılmış Aprokam® enjekte edilen grup

Grup II (n:7): İntrakameral 1mg/0.1 ml BSS ile sulandırılmış Aprokam® enjekte edilen grup

Grup III (n=14): İntrakameral enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu

Hayvan laboratuvarı ameliyathanesinde, cerrahi aletlerin sterilizasyonu sağlandıktan sonra, tavşanlar 1 ml intramüsküler ketamin hidroklorid (35 mg/kg)(Ketalar®, Pfizer, USA) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg)(Rompun®, Bayer, Germany) karışımı ile uyutuldu. %0,5'lik proparakain hidroklorür (Alcaine®, Alcon Laboratuvarları Ticaret A.Ş., Beykoz, İstanbul) damla ile topikal anestezi sağlandıktan sonra NIDEK US-4000 Okuler Ultrasonografi cihazı yardımıyla intrakameral enjeksiyon uygulaması öncesi her iki göze ultrasonografik kornea kalınlığı(pakimetri) ölçümü yapıldı.%0.5'lik tropikamid (Tropamid®, Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., Maslak, İstanbul) ve %2.5'lik fenilefrin hidroklorür (Mydfirin®, Alcon Laboratuvarları Ticaret A.Ş., Beykoz, İstanbul), damla ile pupiller dilatasyon sağlandıktan sonra, %0,5'lik proparakain hidroklorür (Alcaine®, Alcon Laboratuvarları Ticaret A.Ş., Beykoz, İstanbul) damla ile topikal anesteziyi ve %5'lik povidon iodin uygulanmasını takiben 27-gauge iğne ile

intrakameral Aprokam® enjeksiyonu yapıldı. Postoperatif dönemde ofloksasin %0.3 (Exocin®, Allergan) antibiyotik damla uygulaması alt konjunktival forniks içine günde 3 kez olacak şekilde 7 gün boyunca uygulandı ve tavşanlar 1 hafta süre ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda bakım altında izlendi. Bu dönem boyunca 1. gün, 3. Gün ve 1. haftada ön segment yapıları ışık kaynağı ile kontrol edildi. 1.haftanın sonunda ultrasonik pakimetri her iki gözde tekrarlandı.her iki göz korneası steril cerrahi şartlarda alınarak kornea saklama solüsyonuna(Optisol) alındı. Ardından tavşanlar sakrifiye edildi.

Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, %10'luk formaldehit ile tespit edilen göz doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60 °C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı (Tablo-1).

Tablo-1: Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Tespit	%10 formalin	24-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dakika
	% 80 etil alkol	20 dakika
	% 95 etil alkol	20 dakika
	Aseton (4 değişim)	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dakika
	Ksilol	30 dakika
Emdirme %60°C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60 °C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksin (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo-2).

Tablo-2: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
	Hematoksilen	10 dakika
	Akarsu	10 dakika
Şeffaflaştırma	Eosin	2 dakika
Kapama	Akarsu	5 dakika
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Entellan	

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

İzole edilen kornealar %2,5 gluteraldehit ile 30 dakika fikse edildi. %7'lik sükröz solüsyonunda 15 dakika inkübe edildikten sonra yıkama yapmadan %2'lik OsO₄ 30 dakika bekletildi. Kornealar 5 dakika distile suda yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serileri (%70 , %85 , %95 , %100) içerisinde her bir basamak 5 dakika olacak şekilde dehidrasyonu sağlandı. Örnekler şeffaflandırma aşaması için hekzametildisilazan (HMDS) solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 30 dakika kurutulduktan sonra cyritical point dryer (Quorum K850) ile örnekler tamamen kurutuldu. Daha sonra özel bir kaplama cihazında (Quorum Q150R S) yaklaşık 5nm kalınlığında altın ile kaplandı. Örnekler , Zeiss Sigma 500 elektron mikroskobunda incelendi.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Diseksiyon ile alınan dokular 1 mm³ parçalar haline getirilerek %2,5 fosfat tamponlu gluteraldehit içerisinde fikse edildi. Dokular Sorenson's Fosfat Buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15 dakika yıkandı. Örnekler postfiksasyon aşaması için 1:1 oranında Sorenson Fosfat Buffer : Osmium Tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 90 dakika bekletildi. Daha sonra fosfat tamponuyla 3 değişim 15 dakika yıkama işlemi yapıldı. Örnekler %50 asetonunda 2 değişim 15 dakika dehidre edildikten sonra kontrastlama işlemi için %70 aseton + %0,5 uranil asetat ve %1 fosfotungustik asit karışımında 1 gece +4 te tutuldu. Ertesi gün dehidratasyon işlemi için %80, %90, %96 ve %100 asetonlarda 3 değişim 15'er dakika tutuldu. Propilen oksit ile iki değişim 15 dakika tutulan dokular infiltrasyon işlemi kurumayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Araldite CY212 Resin ve DDSA (dodecenyl succinic anhydride) (1:1) oranında karıştırılarak her şişeye 2 mL konuldu. Dokular yeni araldit karışımında 1 gece +4 te bekletildi. Ertesi gün Araldite CY212 Resin ve DDSA 1:1 oranında hazırlanan bu yeni karışıma (gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak) BDMA (Benzyl Dimethylamine) ilave edilerek gömme materyali hazırlandı. Bu karışım içine gömülen dokular 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra yarı ince kesitleri alınarak (Leica Ultratom R) toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi. Belirlenen alanlardan ince kesitler formvar kaplı gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapılacak ve elektron mikroskobunda(Zeiss Sigma 500) değerlendirildi.

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizde tanımlayıcı olarak ölçülen değerler her iki grup içinde parametrik dağılım gösterenler ortalama sapma ile nonparametrik dağılım gösterenler ortanca(min-max) değerler ile ifade edildi. Analitik olarak iki bağımsız grubun karşılaştırılması parametrik dağılımı olanlar t-test nonparametrik dağılımı olanlar Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. P<0.05 istatistiki anlamlılık sınır değeri olarak alındı.SPSS 23.0 paket programı ile analiz edildi.

BULGULAR

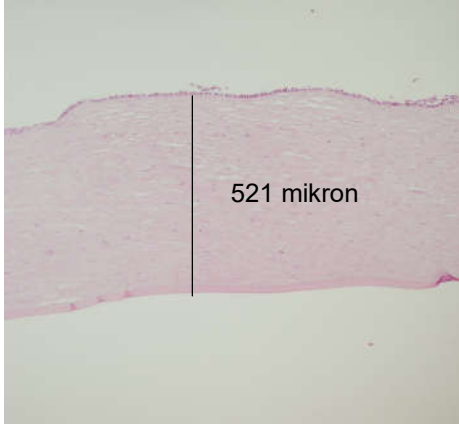
Tavşanların Takip ve İzlemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda bakım altında izlenen tavşanların hiç birinde, izlem süresince çalışmadan çıkarılmayı gerektirecek sistemik patoloji gelişmedi. Bir haftalık çalışma süresince ölen tavşan olmadı. Takip süresi boyunca tavşanların hiçbirinde; korneal ödem, ön kamerada fibrin reaksiyon, hipopiyon, lens kesafeti, vitreus içi hemoraji, retina dekolmanı ve endoftalmi gelişmedi.

Histopatolojik İnceleme

Histolojik preparatlar hazırlanırken makroskopik bakıda anormal bulguya rastlanmadı.

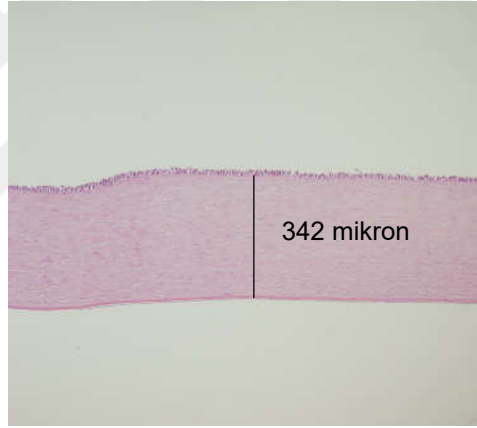
Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan mikroskopik incelemede Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) uygulanan grupta korneal stromanın Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) ve kontrol grubuna göre daha ödematöz ve kalın olduğu saptandı.(Resim-3)



Grup I H&E Boyama Görüntüsü



Grup II H&E Boyama Görüntüsü

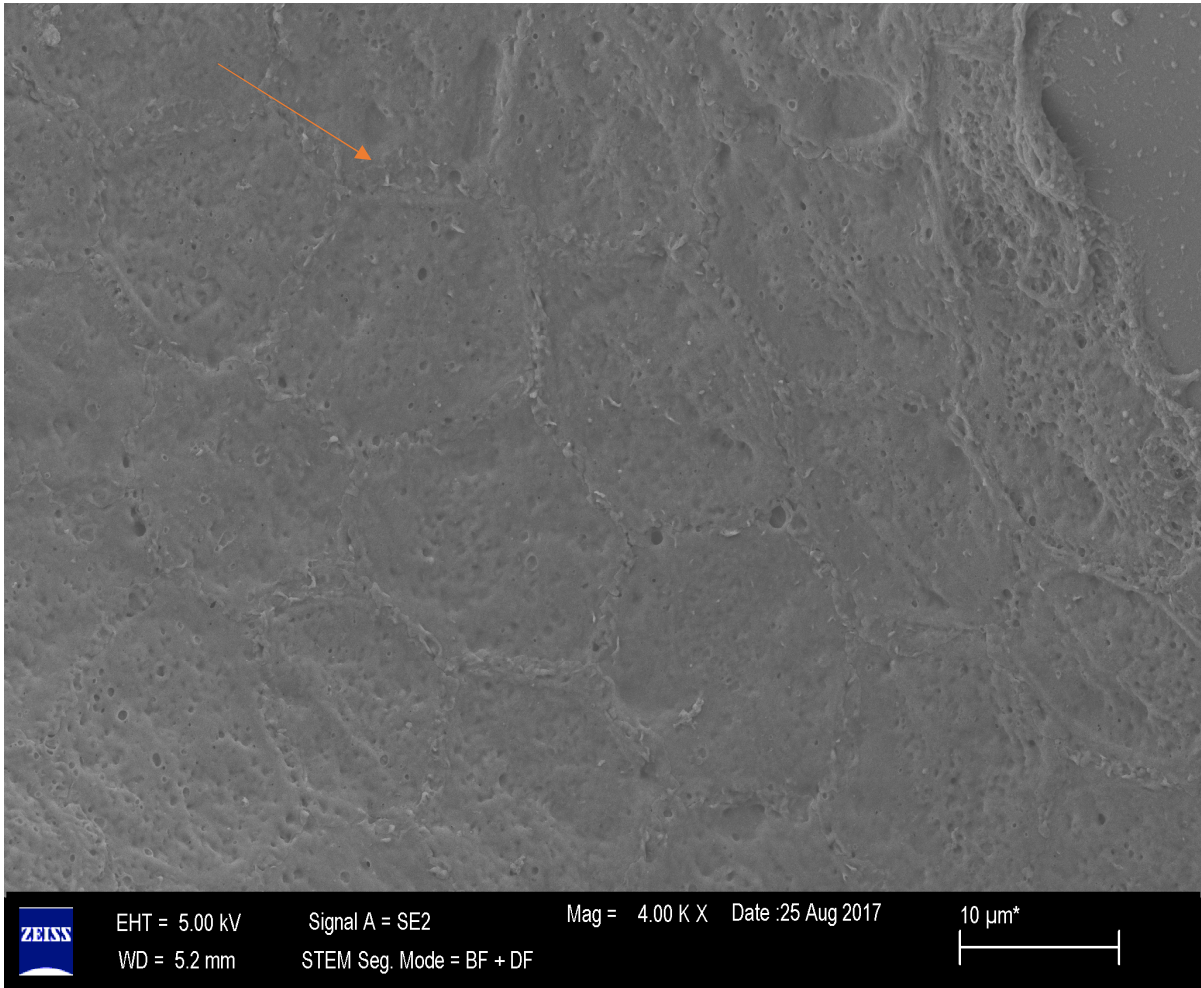


Grup III H&E Boyama Görüntüsü

Resim-3: Grupların H&E Boyamada Stromal Kalınlık Görüntüsü

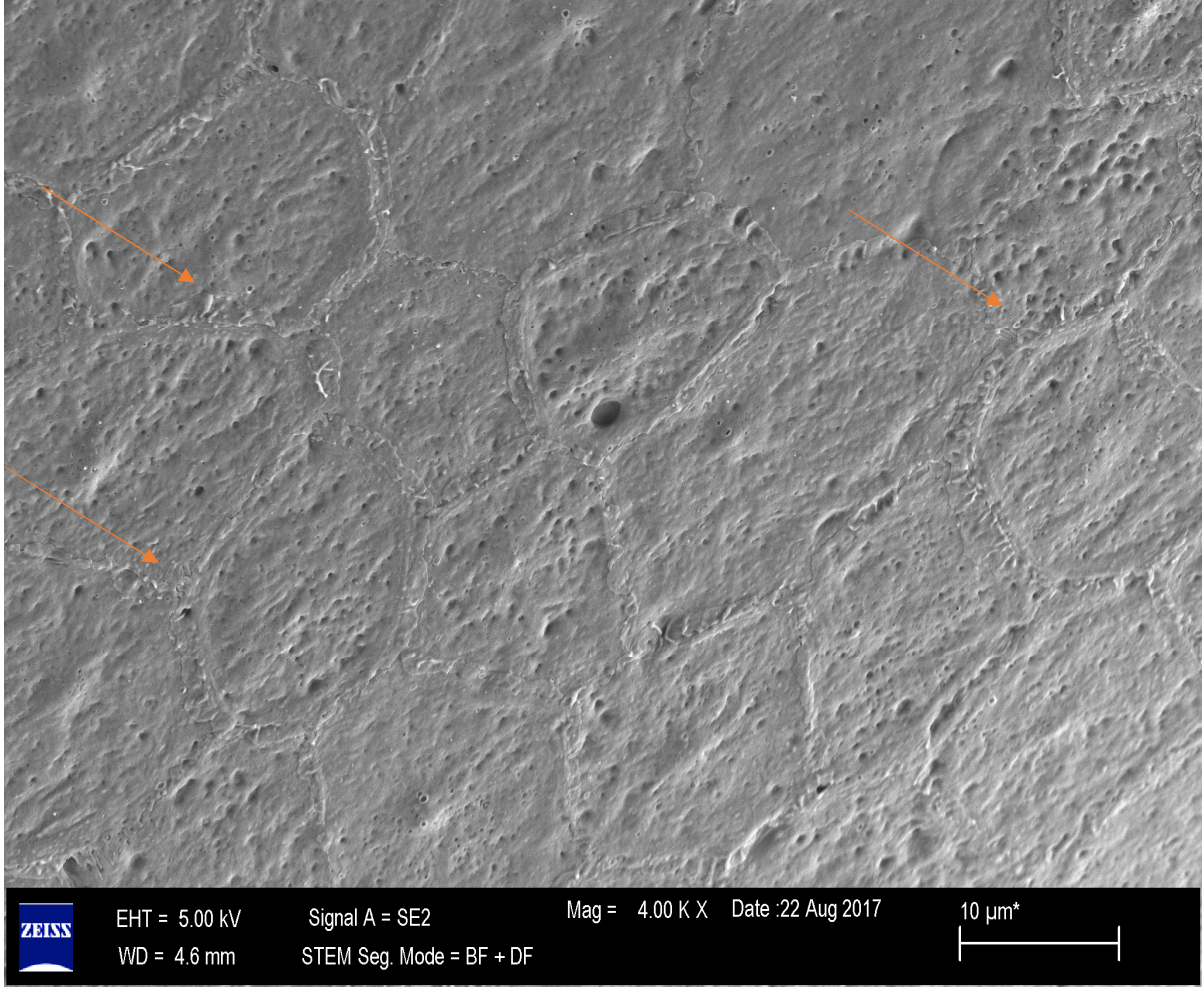
Taramalı Elektron Mikroskopi Görüntüleri(SEM)

Grupların taramalı elektron mikroskopi görüntülemelerinde Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) ve Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) kornea endotelinin hekzagonal yapılarının korunduğu görünmekle beraber endotel mikrovilluslarında her iki grupta da kayıp olduğu; kontrol grubunda endotel mikrovilluslarının salim olduğu görüldü. Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) de yer yer hücreler arasında ayrışma olduğu saptandı. (Resim-7). Tavşanlardan her gruba ait SEM görüntüleri Resim-4, Resim-5 Resim-6 ve Resim-7de fotoğraflandı.



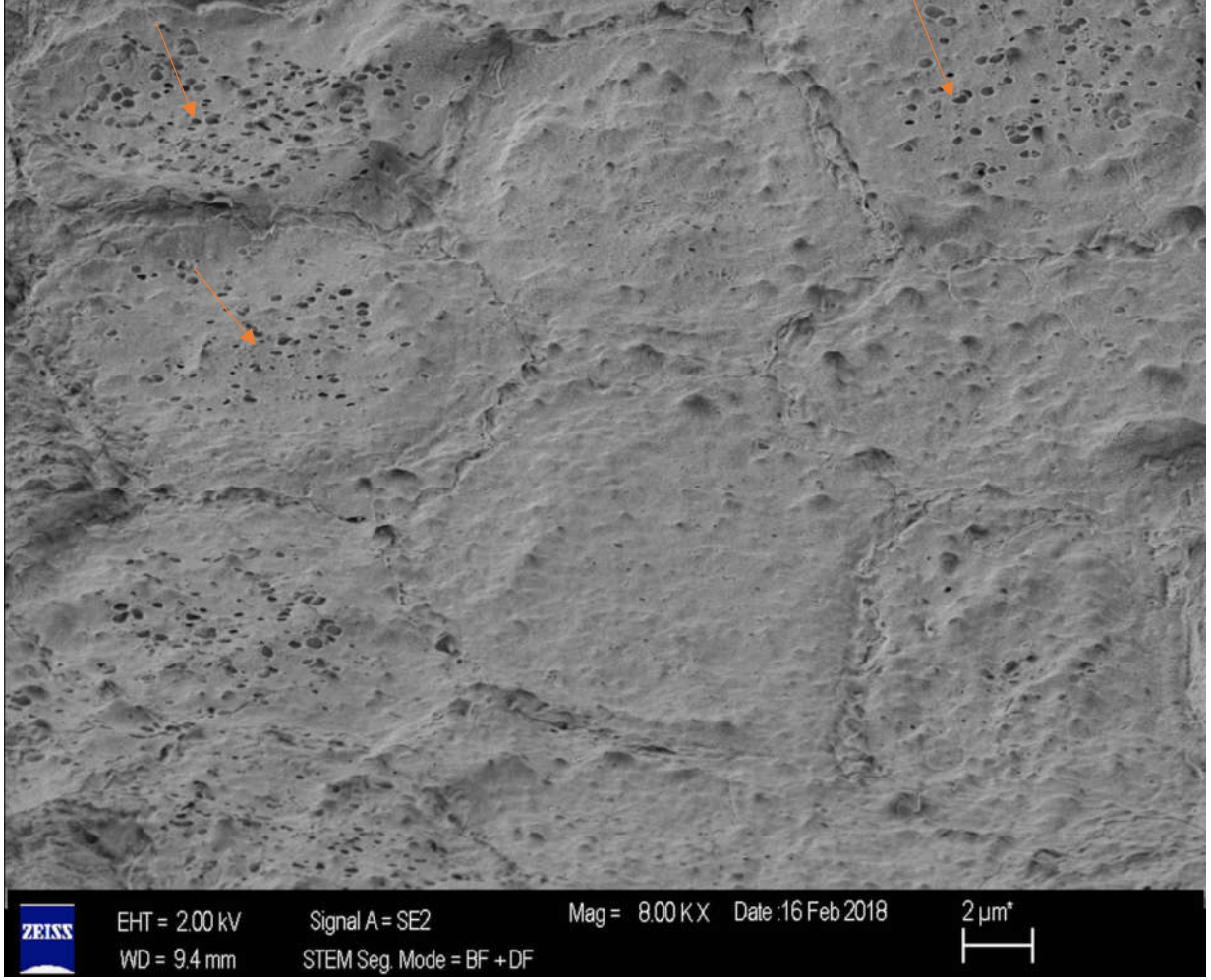
Resim-4 : Grup III (kontrol) SEM Görüntüsü

➡ Düzgün hekzagonal yapılı endotel hücre mikrovillusları salim görünmekte



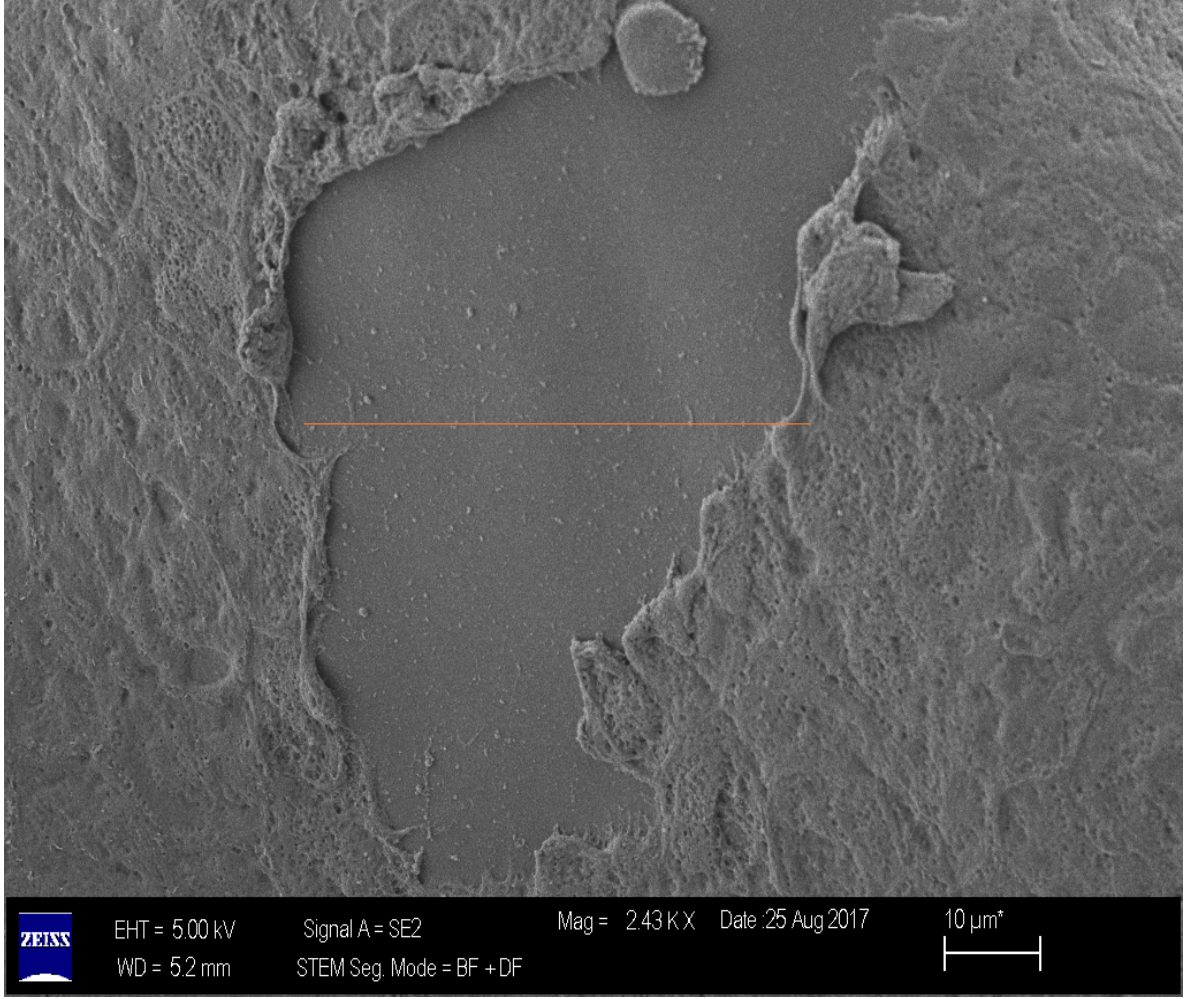
Resim-5 : Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) SEM Görüntüsü

→ Düzgün hekzagonal yapılı endotel hücre mikrovillusları



Resim-6 : Grup I (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) SEM Görüntüsü

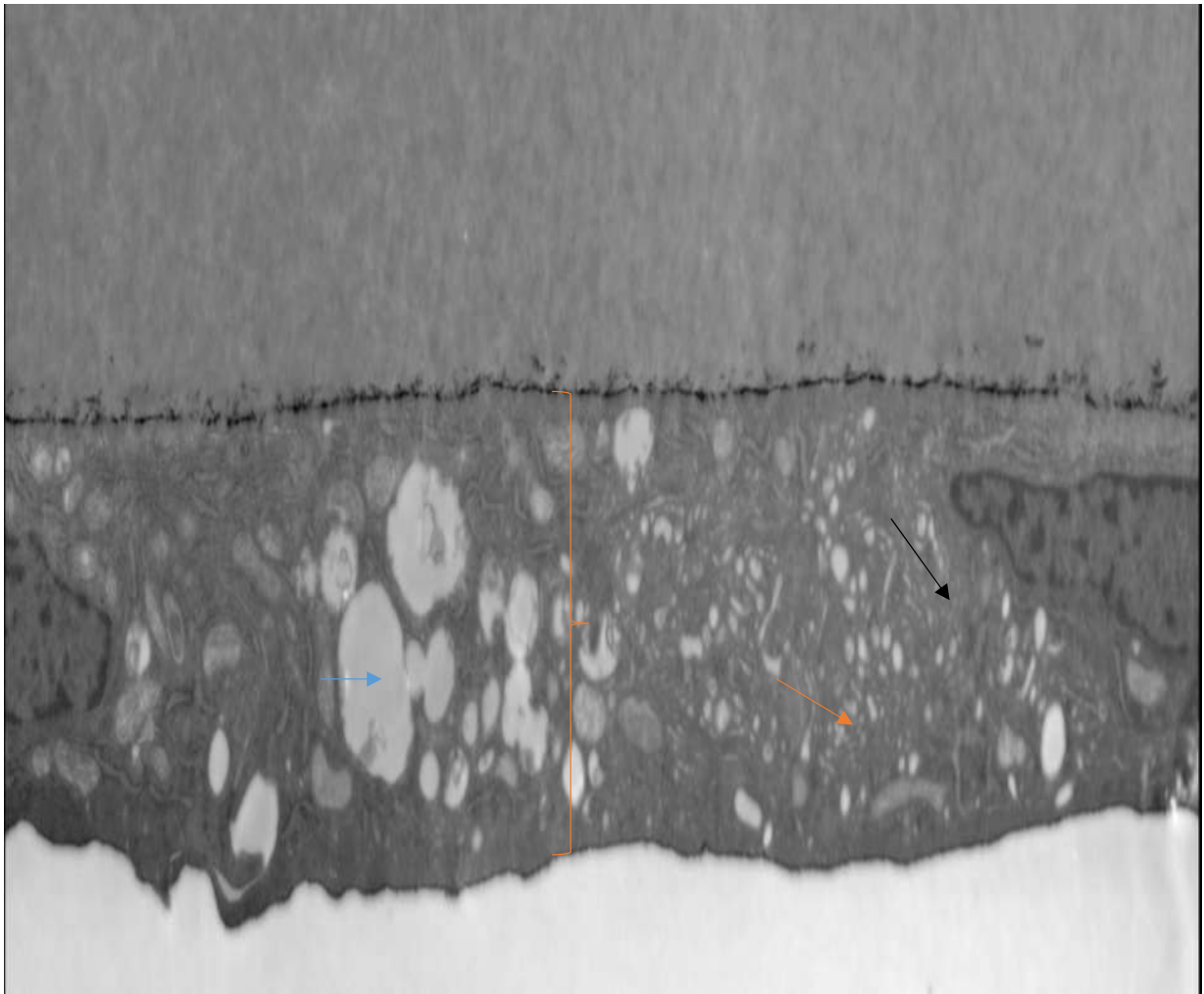
→ intrasitoplazmik vakuoller ve endotel mikrovilluslarında kayıp



Resim-7 : Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) Endotel Hücreleri Arasında Ayrılma Görüntüsü

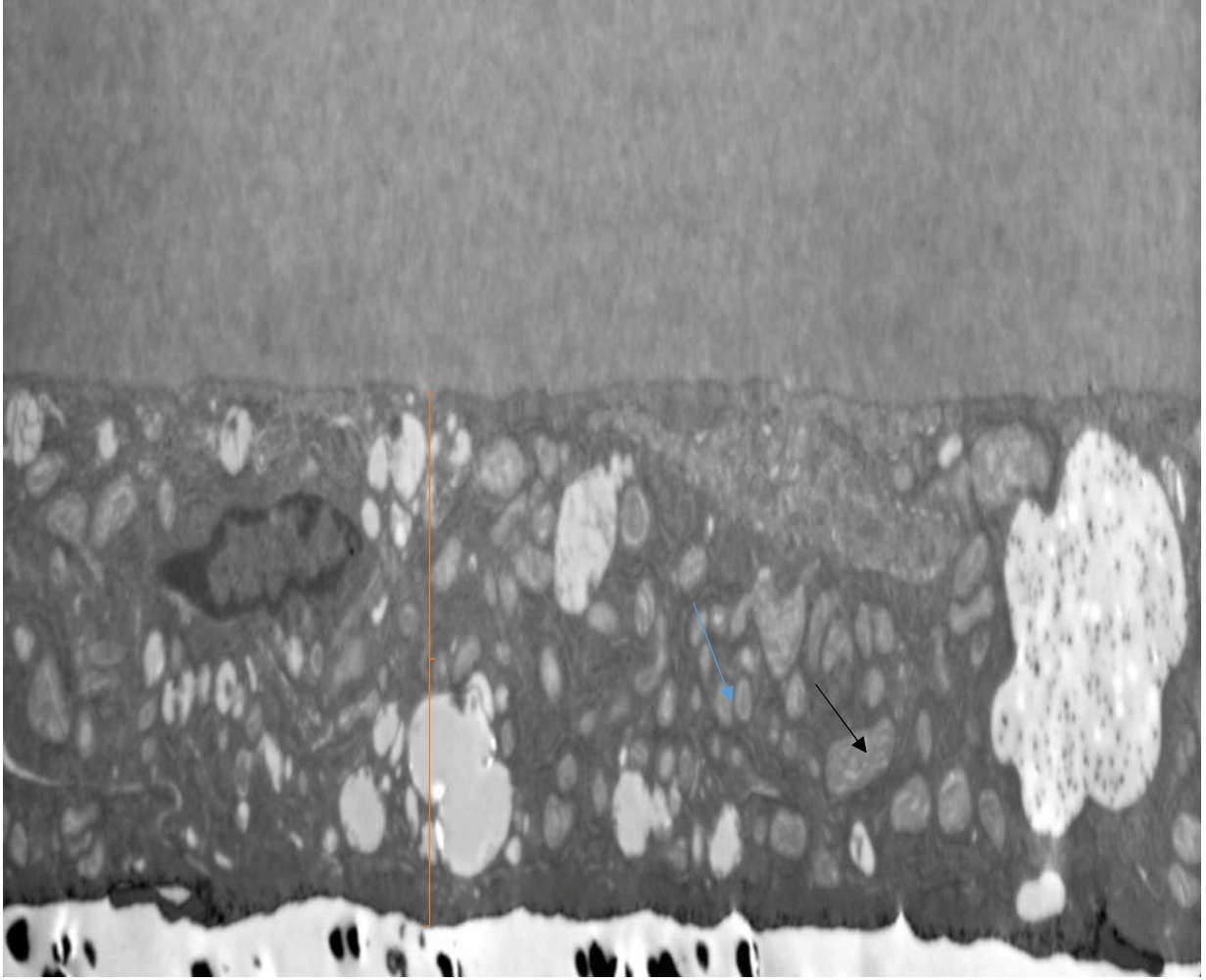
Transmisyon Elektron Mikroskobi (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobik(TEM) incelemelerde kontrol grubuna göre Grup I ve Grup II' de mitokondrilerde şişme ,endoplazmik retikulumlarda kabalaşma, intrasitoplazmik belirgin vakuol oluşumları ve endotel hücre boyutlarında artış izlendi.Grup I ve Grup II arasında belirgin bir bir farklılık saptanmadı.Tavşanlardan her gruba ait TEM görüntüleri Resim-8, Resim-9 ve Resim-10de fotoğraflandı.



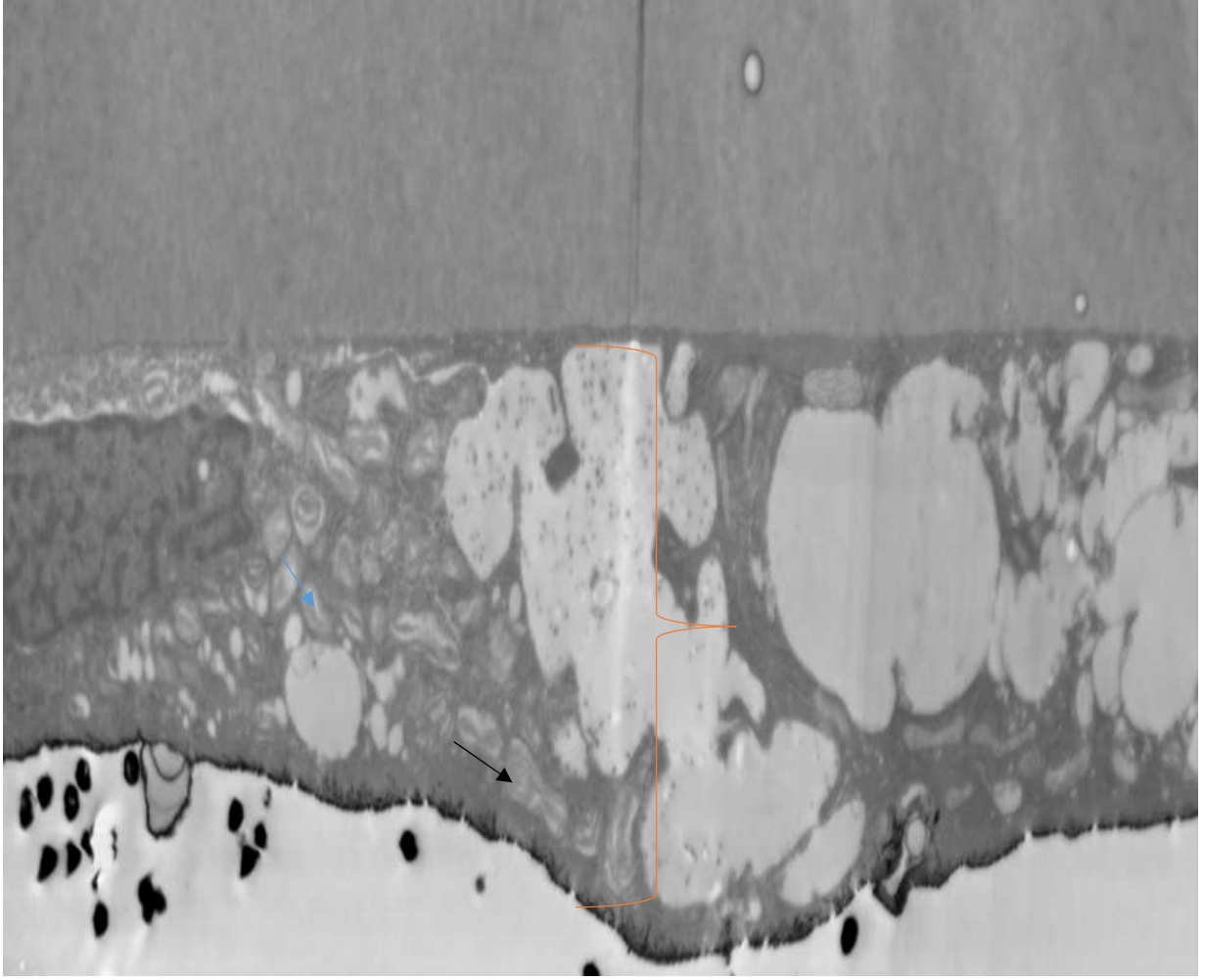
Resim-8 : Grup III (Kontrol) TEM Görüntüsü

- İntrasitoplazmik vakuol
- Endoplazmik retikulum
- Mitokondriler



Resim-9 : Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) TEM Görüntüsü

- Endoplazmik retikulumlarda kabalaşma
- Mitokondrilerde şişme
- Endotel hücre boyutunda artış



Resim-10 : Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®)

- ▲ Endoplazmik retikulumlarda kabalaşma
- ▲ Mitokondrilerde şişme
- } Endotel hücre boyutunda artış

Speküler Mikroskobi

1.haftanın sonunda alınan tavşan korneaları Konan Kerato Analyzer EKA-10 speküler mikroskop ile değerlendirildi.

Tüm gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde endotel sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı.($p=0.049$)

Grup III (Kontrol) ile Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) karşılaştırıldığında Grup I de endotel sayılarının daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.($p=0.022$)

Grup III (Kontrol) ile Grup II ((BSS ile sulandırılmış Aprokam®) karşılaştırıldığında endotel sayıları arasında istatistiksel fark saptanmadı.($p=0.948$)

Grup I ve Grup II kendi arasında değerlendirildiğinde Grup I de endotel sayılarının daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.($p=0.040$)

Grupların korneal endotel sayılarının karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo-3 de gösterildi.

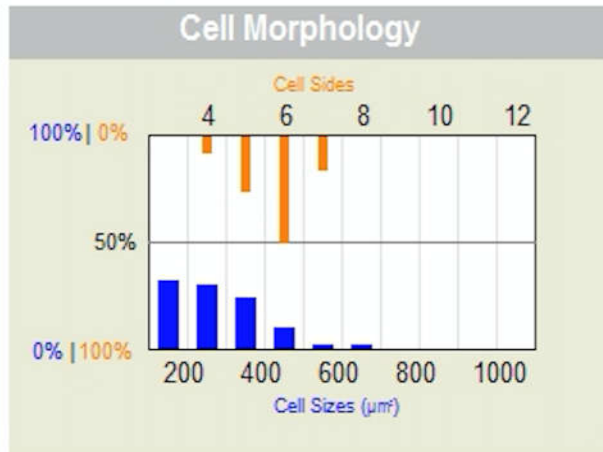
Grupların korneal endotel sayıları ile ilgili minimum ve maksimum değerleri ile ortalama endotel sayıları değerleri Tablo-4 de gösterildi.

Her bir gruba ait speküler mikroskopi görüntüleri Resim-11 Resim-12 ve Resim-13 de fotoğraflandı.

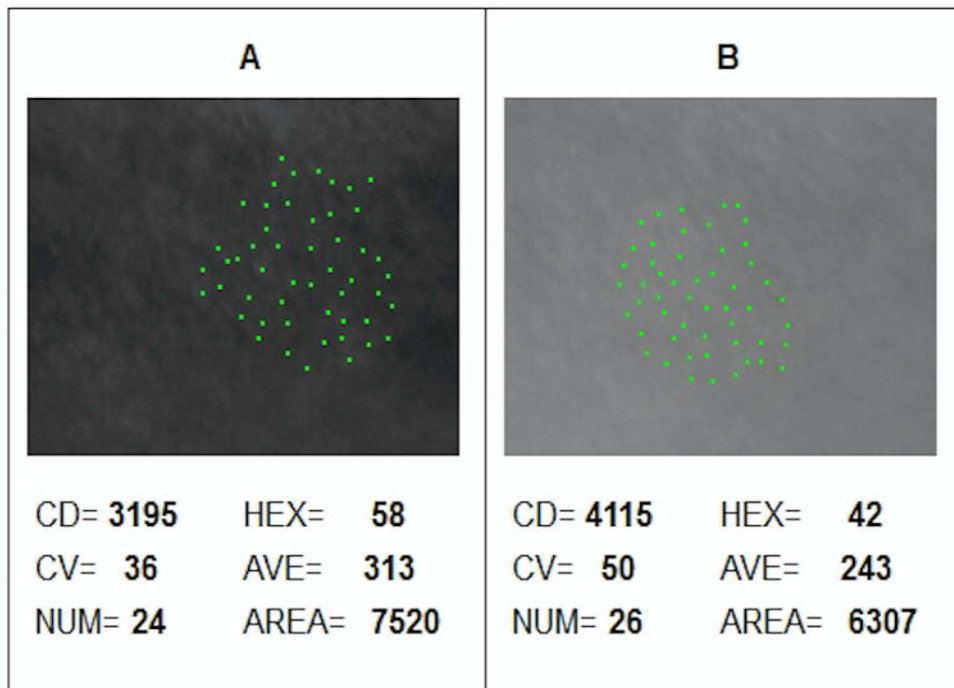
Tablo-3: Grupların Kornea Endotel Sayıları p Değerleri

Kornea Endotel Sayıları	P
Grup I-II-III	0.049
Grup I-III	0.022
Grup I-II	0.040





Multi-Sample TM Averages	
A, B	
CD = 3610	HEX = 50
SD = 121	AVE = 277
CV = 44	
Total AREA =	13827 μm^2
Total NUM =	50



Resim-11 : Grup III (Kontrol) Speküler Mikroskopi Görüntüsü

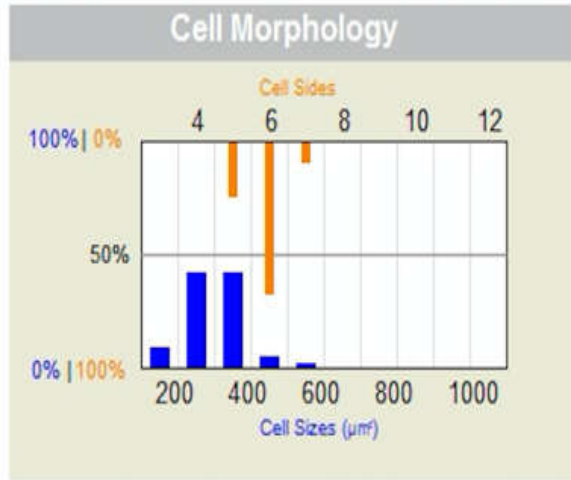
CD=Cell Density

SD=Standart Deviation

CV=Cell Variation

HEX=Hexagonal Cell Shape

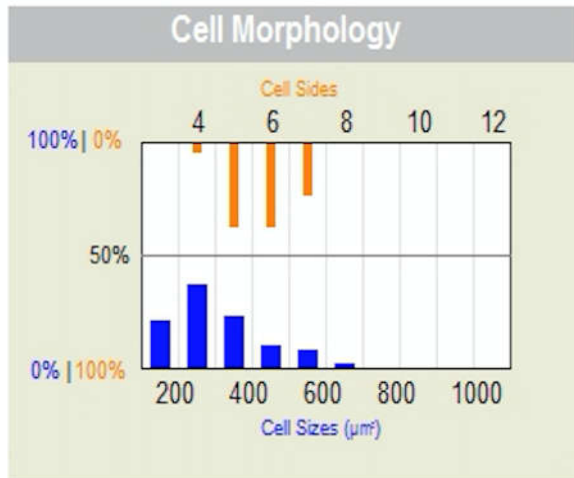
AVE=Average Cell Densities



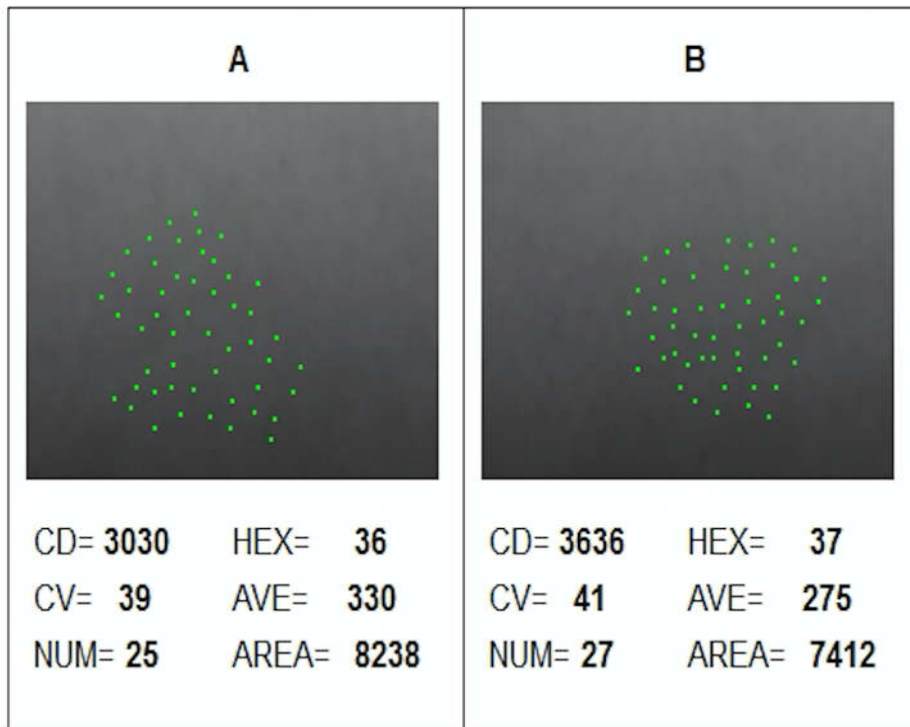
Multi-Sample™ Averages		
A, B		
CD = 3425	HEX =	67
SD = 80	AVE =	292
CV = 27		
Total AREA =	16057	μm^2
Total NUM =	55	

A	B
CD= 3509	CD= 3333
HEX= 60	HEX= 74
CV= 28	CV= 27
AVE= 285	AVE= 300
NUM= 28	NUM= 27
AREA= 7969	AREA= 8088

Resim-12 : Grup II (BSS ile sulandırılmış Aprokam®) Speküler Mikroskopi Görüntüsü



Multi-Sample TM Averages	
A, B	
CD = 3322	HEX = 36
SD = 123	AVE = 301
CV = 41	
Total AREA =	15650 μm^2
Total NUM =	52



Resim-13: Grup I (SF ile sulandırılmış Aprokam®) Speküler Mikroskopi Görüntüsü

Tablo-4: Grupların Kornea Endotel Sayıları Analizi

Kornea Endotel Sayıları	Ortalama	Standart deviasyon(SD)	Minimum	Maksimum
Grup I	1835,85	852,92	1063,00	3584,00
Grup II	2545,50	573,44	1572,00	3650,00
Grup III	2564,89	681,56	2101,00	3334,00

Ultrasonik Pakimetri Sonuçları

Her bir tavşan gözü korneasının enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası 1. haftada NIDEK US-4000 Okuler Ultrasonografi (USG) cihazı yardımıyla pakimetrik değerleri ölçüldü. Yapılan istatistiki değerlendirmede enjeksiyon öncesi pakimetri değerlerinin parametrik dağılmadığı görüldü. ($p=0.127$) Enjeksiyon öncesi ortalama pakimetri değeri Grup I'de 404,42 μm , Grup II'de 470,85 μm olarak hesaplandı. Enjeksiyon sonrası alınan pakimetri ölçümlerinde ise ortalama kalınlıklar Grup I de 417,57 μm Grup II'de ise 488,57 μm olarak hesaplandı. Her iki grupta enjeksiyon öncesi ve sonrası alınan pakimetri değerlerinde artış saptanmıştır ve bu artışın istatistiksel anlamlı olduğu hesaplanmıştır. ($p=0.038$) Grupların pakimetri değerleri analizi Tablo-5 de gösterildi.

Tablo-5: Grupların Pakimetri Değerleri Analizi

Pakimetri(μm)	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart deviasyon(SD)
Grup I	404,42	345,00	519,00	61,65
Grup II	462,00	429,00	518,00	27,41
Grup III	441,50	374,00	510,00	42,86

TARTIŞMA

Endoftalmi katarakt cerrahisi sonrası potansiyel yıkıcı etkileri olan bir komplikasyondur. Değişik vaka serilerinde %0.04-0.2 oranında görülür.^{1,3,67,68} Geçmişten bugüne bakteriyel endoftalmi gelişimini engellemek amacıyla preoperatif olarak topikal ve subkonjonktival antibiyotik uygulama ve povidon-iodine damlatma gibi pek çok kemoprofilaksi yöntemi uygulanmıştır. Giderek artan kanıtlar intrakameral antibiyotik uygulanmasının postoperatif endoftalmi gelişimini daha etkili bir şekilde engellediğini desteklemektedir.⁶⁸

Sefuroksim intraoküler cerrahide endoftalmi profilaksisi için uygulanmaktadır.⁶⁹⁻⁷⁶ Literatürde değişik vaka serileriyle güvenilirlikleri desteklenen moksifloksasin, sefalosporinler ve vankomisin gibi 3 farklı antibiyotik postoperatif endoftalmi gelişimini engellemek amacıyla off-label intrakameral olarak uygulanmaktadır.⁷⁶⁻⁸¹

Sefuroksim doz bağımlı olarak bakterisidal aktivite gösteren ikinci kuşak sefalosporin grubu bir antibiyotiktir. Diğer beta-laktam grubu antibiyotikler gibi hücre duvarı sentezini inhibe eder. Sefuroksimin bakterisidal aktivitesi konsantrasyon bağımlıdır ve minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIK) 4-5 katı dozunda bu etki ortaya çıkar. Etki spektrumu metisilin rezistan *Staphylococcus aureus* (MRSA) dışında birçok gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmaları kapsar.

Sefuroksim sodyum etken maddesini içeren ve ülkemiz piyasasında yaygın olarak bulunabilen Aksef (Nobel), Cefaks (Deva), Cefurol (İE Ulagay), Enfexia (Bilim), Multisef (Mustafa Nevzat), Zinnat (GSK) ticari müstahsallar serum fizyolojik (SF), ringer laktat ve BSS gibi değişik solüsyonlar yardımıyla sulandırılarak 1 mg/0.1cc dozunda olacak şekilde katarakt cerrahisi sonrası ön kameraya uygulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada yukarıda ticari isimleri sırasıyla belirtilen 6 ilacın ortalama asidite ve osmolarite değerleri SF, BSS ve ringer laktat ile sulandırılma yapıldıktan sonra ölçüldüğünde, ortalama asidite değerlerinde farklılık saptanmazken; ortalama osmolarite değerlerinde farklılık saptanmıştır¹⁹. Ön kameraya verilecek preparasyonların asiditeleri arasında anlamlı fark bulunmazken, osmolariteleri hazırlanmalarında kullanılan solüsyonlara göre belirgin farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu durumun ön kameraya

antibiyotik uygulanan katarakt cerrahileri sonrasında, erken dönemde görülen ön segment reaksiyonlarının farklılığını açıklayabileceği düşünülmüştür.

Ancak bu preparatlar sistemik kullanım için hazırlanmış preparatlar olup ön kamaraya uygulanması endikasyon dahilinde değildir. Özellikle katarakt cerrahisinin son aşamasında ön kamaraya uygulanmak üzere piyasaya sefuroksim sodyum preparatı(Aprokam®, Thea Pharma) sürülmüştür.Bu preparatın prospektusunda %0.9'luk sodyum klorür (serum fizyolojik, SF) ile 1 mg / 0.1 cc dozunda olacak şekilde hazırlanıp uygulanması önerilmektedir.Yapılan bir çalışmada Aprokam® prospektüs bilgisinde yazdığı şekilde %0.9'luk sodyum klorür, BSS ve ringer laktat ile 1 mg / 0.1 cc dozunda olacak şekilde steril şartlarda sulandırılıp ön kamera sıvısının asidite ve osmolarite değerleri ile karşılaştırılmıştır. İlacın SF, BSS ve ringer laktat solüsyonları ile sulandırılması sonucu ortalama asiditesi sırasıyla 6.90, 6.93 ve 6.11 olarak ölçülmüştür. İlacın ortalama osmolarite değerleri incelendiğinde SF ile hazırlandığında 321.0 mOsm/kg, BSS solüsyonu ile hazırlandığında 347.0 mOsm/kg ve ringer laktat solüsyonu ile hazırlandığında 294.6 mOsm/kg olarak ölçülmüştür. Aköz humörün 7.2 civarında belirtilen pH değeri ve 330 – 345 mOsm/kg aralığında belirtilen osmolarite değerleri dikkate alındığında, ticari preparatın prospektüsünde yazıldığının aksine SF yerine BSS ile hazırlanmasının daha fizyolojik olacağı düşünülmüştür.²⁰

Literatürde de ne sefuroksimin ne de diğer intrakameral olarak kullanılan diğer antibiyotiklerin serum fizyolojik ile sulandırılabilceğini dair bir kanıt rastlanamamıştır.⁷⁶ Antibiyotiklerin hazırlanmasında kullanılan solüsyonların çoğunu BSS solüsyonu oluşturmaktadır.^{77-80,82-88}

Sefuroksimin kornea endotel hücreleri üzerine apoptotik etkisi ile ilgili araştırdığımız kadarıyla literatür çalışmasına rastlamadık. Fakat apoptozis ile ilgili yapılan göz çalışmalarında; L-karnitin ile insan korneal epitel hücrelerinde apoptozisle ilgili olarak yapılan çalışmada, L- karnitin hiperosmotik stres altındaki insan kornea hücrelerinin hacmini düzenleyici ve hiperosmotik strese bağlı apoptozisi azaltabileceği belirtilmiştir⁸⁹.Daha önce belirtildiği gibi sefuroksimin farklı sulandırma solüsyonlarıyla sulandırıldıktan sonra osmolaritelerinin ölçüldüğü bir çalışmada; SF ile hazırlanmış

sefuroksimin daha hipoozmolar olduğu saptanmıştır.Bu sebeple L-karnitin gibi antioksidan ajanların hiperosmotik stres altındaki kornea hücrelerinde etkili olduğu düşünöldöğünde; SF ile sulandırılma yapılmış hipoosmalar stres altındaki korneada oluşabilecek apopitotik süreci durduramayabileceğini düşünörmektedir.

Göz içi cerrahilerinin korkutan sonucu olan endoftalmili hastalara intravitreal enjeksiyon ve bazen de vitrektomi gerekebilmektedir. Endoftalmi gözün görme kaybına neden olabilmektedir. Bundan dolayı cerrahlar endoftalmi sebeplerini tespit etmede ve önlemede farklı çalışmalar ve uygulamalar yapmışlardır.

Oküler cerrahi sonrası enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalar, genellikle kapak veya konjonktiva florasından kaynaklandığı bilinmektedir. Aynı zamanda havadan bulaşma, bozulmuş göz içi solösyonlar, intraoküler lensler, ameliyat cihaz veya setlerinin kullanımından ya da personelden kaynaklanabilmektedir.⁹⁰ Endoftalmiyi önlemede asepsi ve antisepsi kurallarına uymanın yanısıra povidon iyot kullanmanın ve çağdaş cerrahi tekniklerinin uygulanması önemlidir.^{90,91} Bunlara ilaveten antibiyotiklerin de cerrahinin her evresinde uygulanması ile olumlu sonuçlar elde edilmesi bu konudaki çalışmaları arttırmıştır.

Operasyon öncesinde % 5' lik povidon iyodin kullanılması, göz yüzeyindeki bakteri sayısını azaltarak endoftalmi riskini ciddi olarak azaltan ispatlanmış bir yöntemdir.⁹¹

BSS irrigasyon solusyonuna antibiyotik eklenmesi bir diğeri kullanılan yöntemdir. 0.1 ml (4 mg) gentamisin 500 ml BSS şişesine ilave edilerek 8µg/ml konsantrasyon sağlanılarak cerrahide kullanılabilmektedir. Fakat deneysel çalışmalar irrigasyon solösyonlarının içine konularak verilen antibiyotiklerin farmakodinamik ve farmakokinetik verilerine bakıldığında, çoğunun yeterli etkinlik gösteremeyecek seviyelerde olduğu, bakterisidal etki göstermek için göz içinde yeterli süre kalamadıklarını ve hızla elimine olduklarını göstermektedir.^{13,84,92,93} Bu sebeple cerrahi sonunda antibiyotiğın intarakameral olarak uygulanması yaygın göröş ve kullanım alanı oluşturmuştur.

Ön kameraya cerrahi sonunda antibiyotik verilmesinde sefuroksim ve moksifloksasin uygun dozda verildiklerinde vankomisine göre etkili ve güvenli olduğu

gösterilmiştir.^{94,95} Artan kanıtlar nedeniyle postoperatif sefuroksim kullanımı yaygınlaşmaktadır^{12,68} ve bu durum toksisiteden korunma ve yeterli etkinlik oluşturabilme açısından sefuroksimin uygun dozda ve uygun sulandırma solüsyonunda kullanılmasının önemini arttırmaktadır. Bizim çalışmamız sefuroksimin SF ile sulandırılmasından çok BSS ile sulandırılmasının; korneal endotel fonksiyon kaybının önlenmesi, apopitozise kadar gidebilen hücresel şişme ve ödemin önüne geçilmesi, korneal endotel sayısının ve sağlığının korunması açısından daha doğru bir seçenek olacağını düşündürmektedir.

Demirel ve ark.⁹⁶ yaptıkları çalışmada intrakameral sefuroksim uygulanması sonrası tavşan kornealarında elektron mikroskopi düzeyinde histolojik değişikliklere rastlamamıştır. Daha önce Montan ve arkadaşlarının yapmış oldukları benzer çalışmada ilacın güvenilirliği; speküler mikroskopi ile endotel sayısı ölçümü, laser flare fotometre ile aköz protein konsantrasyonu ölçümü (kan aköz bariyerini değerlendirmek amacı ile), görme düzeyi ve klinik olarak kistoid maküler ödem değerlendirilmesi şeklinde değerlendirilmiş ve sonuçta ilacın uygulanmadığı kontrol grubu ile ilaç uygulanan grup arasında fark saptanmamıştır.⁹⁷

Bizim çalışmamızda speküler mikroskopide korneal endotel sayımında SF ile sulandırma yapılan grup endotel sayıları ile kontrol ve BSS grubu ile sulandırma yapılan grupların endotel sayılarına göre istatistiksel anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Bu sebeple kullanılan ilacın benzer olması ancak sulandırma solüsyonlarının farklı olması endotel hücre kaybına giden sürecin ön kamera sıvısı biyokimyasına uyumsuz olduğu düşünülen SF ile sulandırma yapılmış olmasına bağlanmıştır.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Benzer şekilde TEM ve SEM görüntülemelerinde kontrol grubuna göre ilaç uygulanmış her iki grupta da mitokondrilerde şişme, endoplazmik retikulumlarda kabalaşma, intrasitoplazmik belirgin vakuol oluşumları ve endotel hücre boyutlarında artış meydana gelmiştir. İlaça bağlı olduğu düşünülen ve endotel hücre fonksiyonunu sekteye uğratıp apapitozis ve nekrozis oluşmasına sebep olabilecek durumların ortaya çıkmasının önlenmesi veya en aza indirgenmesi açısından ön kameraya uygulanacak olan ilacın sulandırılmasında kullanılacak olan solüsyonların ön kamera sıvısına daha

fizyolojik ve endotel hücrelerine karşı koruyucu olduğu düşünölen BSS gibi solusyonların kullanılmasının daha uygun ve sağılıklı olacağı düşünölmüştür.⁹³

Yoeuek ve ark.⁷⁰ yaptıkları çalışmada, költür ortamında insan kornea endoteli üzerinde sefuroksim ve vankomisin sitotoksik ve apoptotik özelliklerini karşılaştırmışlardır. Doza bağımlı bir toksisite gösterilmiş, güvenlik aralıklarının dar olduğu ve daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının geri dönüşümsüz hücre ölümüne neden olabileceğı bildirilmiştir.

Tavşan gözlerinde yapılan bir çalışmada kornea endotel hücrelerinin toksik ajanlara karşı çok duyarlı olduğu gösterilmiştir. İntrakameral kullanılan sefuroksimin hazırlanırken doz ayarlamasının uygun yapılmasının önemi belirtilmiştir.⁹⁷

İntrakameral uygulama için spesifik olarak geliştirilen sefuroksim preparatı Aprokam® ise; doza bağımlı toksisite oluşumunu engellmenin yanında, prospektusunda belirtildiğı gibi SF ile sulandırılmasının yerine BSS ile sulandırılmasının oluşabilecek osmolorite nedenli toksik etkinin ortaya çıkmasının önlenmesi açısından daha doğru bir tercih olacağı düşünölmüştür.

Çalışmamızda BSS'in kornea endotel hücreleri üzerinde apoptozise karşı koruyucu rolünün olabileceğı yönünde sonuçlar elde ettik. İntraoküler cerrahilerde BSS kullanımı endotel hücrelerinde apoptozisi azaltıcı etkisinden dolayı mutlaka kullanılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.⁹³

Sefuroksimin korneal endotel üzerinde minimal düzeyde de olsa toksisite geliştirdiğı düşünöldüğünde^{70,101} kornea endoteli üzerinde koruyucu rol üstlendiğı düşünölen ve diğör intrakameral uygulanan antibiyotiklerin sulandırılmasında da tercih edilen BSS solüsyonun kullanılmasının daha sağılıklı bir yaklaşım olacağını düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

1. Çalışmada intrakameral ilaç uygulanan tavşan gözlerinde, SF ile sulandırılma yapılan grupta kontrol ve BSS ile sulandırılma yapılan gruba göre korneal stromal kalınlaşma ve ödem saptandı.
2. İntrakameral ilaç uygulanmış her iki grupta kontrol grubuna göre elektron mikroskopik görüntülemelerden SEM görüntülemeye; kornea endotelinin hekzagonal yapılarının korunduğu görünmekle beraber; endotel mikrovilluslarında her iki grupta da kayıp olduğu, kontrol grubunda endotel mikrovilluslarının salim olduğu görüldü. SF ile sulandırılma yapılan grupta endotel hücreleri arasında yer yer ayrışmalar olduğu görüldü.
3. İntrakameral ilaç uygulanmış her iki grupta, kontrol grubuna göre elektron mikroskopik görüntülemelerden TEM görüntülemeye; mitokondrilerde şişme ,endoplazmik retikulumlarda kabalaşma, intrasitoplazmik belirgin vakuol oluşumları ve endotel hücre boyutlarında artış izlendi. İlaç uygulanmış her iki grup arasında belirgin farklı değişiklik saptanmadı.
4. İntrakameral ilaç uygulanmış her iki grupta enjeksiyon öncesi ve sonrası yapılan ultrasonik korneal pakimetri değerlerinde istatistiksel anlamlı artış saptandı.
5. Speküler mikroskopide endotel hücreleri değerlendirilmesinde kontrol grubuyla beraber değerlendirildiğinde her iki grupta endotel hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı.

6. BSS ile sulandırılma yapılmış grup endotel sayıları ile kontrol grubu arasında speküler mikroskopide endotel hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.
7. SF ile sulandırılma yapılan grupta kontrol grubuna göre speküler mikroskopide endotel hücre sayılarında istatistiksel anlamlı azalma saptandı.
8. İlaç uygulanan her iki grup kendi aralarında değerlendirildiğinde speküler mikroskopide ölçülen endotel hücre sayılarının SF uygulanan grupta istatistiksel anlamlı daha düşük saptandı.
9. Tavşanlar üzerinde yapılan çalışmamız postoperatif endoftalmi profilaksisinde kullanılan antibiyotiklerden sefuroksimin sulandırılmasında serum fizyolojisinin uygun bir solusyon olmadığını düşündürmüştür. İntrakameral uygulanacak antibiyotiklerin veya diğer ilaçların sulandırılmasında literatürce güvenilirliği kanıtlanmış balance salt solution gibi diğer solusyonların tercih edilmesinin kornea endotel hücre viabilitesi ve dolaylı olarak kornea dokusunun saydamlığının korunması açısından daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Miller, J. J. *et al.* Acute-onset endophthalmitis after cataract surgery (2000-2004): incidence, clinical settings, and visual acuity outcomes after treatment. *Am. J. Ophthalmol.* **139**, 983–7 (2005).
2. Packer, M. *et al.* Prevention, diagnosis, and management of acute postoperative bacterial endophthalmitis. *J. Cat. Refract. Surg.* **37**, 1699–1714 (2011).
3. Inoue, T. *et al.* Incidence of endophthalmitis and the perioperative practices of cataract surgery in Japan: Japanese Prospective Multicenter Study for Postoperative Endophthalmitis after Cataract Surgery. *Jpn. J. Ophthalmol.* **62**, 24–30 (2018).
4. Ou, J. I. & Ta, C. N. Endophthalmitis prophylaxis. *Ophthalmol. Clin. North Am.* **19**, 449–56 (2006).
5. Kelkar, A., Kelkar, J., Amuaku, W., Kelkar, U. & Shaikh, A. How to prevent endophthalmitis in cataract surgeries? *Indian J. Ophthalmol.* **56**, 403–7
6. Lam, P. T. H., Hui, M., Young, A. L., Chan, C. Y. & Lam, D. S. C. Preoperative Antisepsis With Povidone-Iodine 5% in Cataract Surgery. *Asia-Pacific J. Ophthalmol.* **1**, 77–83 (2012).
7. Goldberg, R. A. How to prevent endophthalmitis after intravitreal injections. *Int. J. Retin. Vit.* **1**, 12 (2015).
8. Ye, J. [Problems deserving attention in preventing infection in cataract surgery]. *Zhonghua. Yan Ke Za Zhi.* **53**, 805–809 (2017).
9. Montan, P. G., Wejde, G., Koranyi, G. & Rylander, M. Prophylactic intracameral cefuroxime. Efficacy in preventing endophthalmitis after cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **28**, 977–81 (2002).

10. Tan, C. S. H., Wong, H. K. & Yang, F. P. Epidemiology of postoperative endophthalmitis in an Asian population: 11-year incidence and effect of intracameral antibiotic agents. *J. Cataract Refract. Surg.* **38**, 425–30 (2012).
11. Shorstein, N. H., Winthrop, K. L. & Herrinton, L. J. Decreased postoperative endophthalmitis rate after institution of intracameral antibiotics in a Northern California eye department. *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 8–14 (2013).
12. Endophthalmitis Study Group, European Society of Cataract & Refractive Surgeons. Prophylaxis of postoperative endophthalmitis following cataract surgery: results of the ESCRS multicenter study and identification of risk factors. *J. Cataract Refract. Surg.* **33**, 978–88 (2007).
13. Hui, M. *et al.* In vitro compatibility study of cephalosporin with intraocular irrigating solutions and intracameral medications. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **39**, 164–70 (2011).
14. Yoeuruk, E. *et al.* Comparison of in vitro safety profiles of vancomycin and cefuroxime on human corneal endothelial cells for intracameral use. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 2139–45 (2008).
15. Arbisser, L. B. Safety of intracameral moxifloxacin for prophylaxis of endophthalmitis after cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 1114–20 (2008).
16. Lane, S. S., Osher, R. H., Masket, S. & Belani, S. Evaluation of the safety of prophylactic intracameral moxifloxacin in cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 1451–9 (2008).
17. Espiritu, C. R. G., Caparas, V. L. & Bolinao, J. G. Safety of prophylactic intracameral moxifloxacin 0.5% ophthalmic solution in cataract surgery patients. *J. Cataract Refract. Surg.* **33**, 63–8 (2007).
18. García-Sáenz, M. C., Arias-Puente, A., Rodríguez-Caravaca, G. & Bañuelos, J. B.

- Effectiveness of intracameral cefuroxime in preventing endophthalmitis after cataract surgery Ten-year comparative study. *J. Cataract Refract. Surg.* **36**, 203–7 (2010).
19. Ozturk, T. Ön Kameraya Uygulanmak Üzere Hazırlanan Parenteral Sefuroksim Sodyum Solüsyonlarının Farmasötik Özellikleri Türk Oftalmoloji Derneği. (2015).
 20. Ön Kameraya Uygulanan Sefuroksim Sodyum Preparatının Çeşitli Sulandırma Solüsyonlarına Bağlı Farmasötik Özellik Değişimleri Turk J Ophthalmol 2015 Taylan ÖZTÜRK.
 21. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11, Kornea, 2009;13-9.
 22. Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T. & Lowe, J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* **120**, 1778–85 (2013).
 23. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11, Kornea, 2009;13-9.
 24. Hoffer, K. J. & Kraff, M. C. Normal endothelial cell count range. *Ophthalmology* **87**, 861–6 (1980).
 25. Dua, H. S. & Said, D. G. Clinical evidence of the pre-Descemets layer (Dua's layer) in corneal pathology. *Eye* **30**, 1144–1145 (2016).
 26. Kocluk, Y., Burcu, A. & Sukgen, E. Demonstration of cornea Dua's layer at a deep anterior lamellar keratoplasty surgery. *Oman J. Ophthalmol.* **9**, 179 (2016).
 27. Tuft, S. J. & Coster, D. J. The corneal endothelium. *Eye* **4**, 389–424 (1990).
 28. Honda, H., Ogita, Y., Higuchi, S. & Kani, K. Cell movements in a living mammalian tissue: long-term observation of individual cells in wounded corneal endothelia of cats. *J. Morphol.* **174**, 25–39 (1982).

29. Pepose JS, Ubels JL. Cornea and Sclera. In: Adler's Physiology of the Eye. Tenth Edition.
30. Bourne, W. M., Nelson, L. R. & Hodge, D. O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 779–82 (1997).
31. Kaufman, H. E., Beuerman, R. W., Steinemann, T. L., Thompson, H. W. & Varnell, E. D. Optisol corneal storage medium. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **109**, 864–8 (1991).
32. Watsky, M. A. & Rae, J. L. Ion channel involvement in the temperature-sensitive response of the rabbit corneal endothelial cell resting membrane potential. *J. Membr. Biol.* **135**, 61–71 (1993).
33. Yap, C., Wong, A. M., Naor, J. & Rootman, D. S. Corneal temperature reversal after storage in Chen medium compared with Optisol GS. *Cornea* **20**, 501–4 (2001).
34. Li, X. Z., Ma, D., Livermore, D. M. & Nikaido, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1742–52 (1994).
35. Guerra, R., Casu, L., Giola, L., Rizzu, D. & Cappuccinelli, P. Penetration of parenteral cefuroxime into the human aqueous humor. *Arzneimittelforschung.* **31**, 861–3 (1981).
36. Ghia, M., Lotti, R., Traverso, C., Mattioli, F. & Martelli, A. Penetration of oral cefuroxime axetil into the human aqueous humor. *Ophthalmologica.* **211**, 229–31 (1997).
37. Koul, S., Philipson, A., Philipson, B. T., Kock, E. & Nylén, P. Intraocular levels of cefuroxime in uninflamed rabbit eyes. *Acta Ophthalmol.* **68**, 455–65 (1990).

38. Kelkar, A., Kelkar, J., Amuaku, W., Kelkar, U. & Shaikh, A. How to prevent endophthalmitis in cataract surgeries? *Indian J. Ophthalmol.* **56**, 403–7
39. Edelhauser, H. F., Hanneken, A. M., Pederson, H. J. & Van Horn, D. L. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **99**, 1281–7 (1981).
40. Gonnering, R., Edelhauser, H. F., Van Horn, D. L. & Durant, W. The pH tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **18**, 373–90 (1979).
41. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–62 (1995).
42. Ameisen, J. C. The origin of programmed cell death. *Science* **272**, 1278–9 (1996).
43. Koester. Comparison of optical sectioning methods. The scanning slit confocal microscope. In: Pawley J. editor: The handbook of biological confocal microscopy. Madison, IMR Pres. 1989.
44. Pekel, G., Özbakış, F., Bahar, A., Pekel, E. & Çetin, E. N. Correlations of Corneal Optical Densitometry, Endothelial Hexagonality Percentage, and Epithelium Thickness. *Curr. Eye Res.* **43**, 170–174 (2018).
45. Chebli, S., Rabilloud, M., Burillon, C. & Kocaba, V. Corneal Endothelial Tolerance After Iris-Fixated Phakic Intraocular Lens Implantation. *Cornea* 1 (2018). doi:10.1097/ICO.0000000000001527
46. Polat, N., Cumurcu, B., Cumurcu, T. & Tuncer, İ. Corneal endothelial changes in long-term cannabinoid users. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **37**, 19–23 (2018).
47. Golabchi, K. *et al.* The effects of smoking on corneal endothelial cells: a cross-sectional study on a population from Isfahan, Iran. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **37**, 9–14 (2018).

48. Laing R. Specular Microscopy. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. Cornea: Fundamentals of Cornea and External disease. St Louis: Mosby; 1998.
49. Blix M. Oftalmometrisk studier. Uppsala Lak- areförenings Förhandlingar 1879;15:349-420.
50. MAURICE, D. M. & GIARDINI, A. A. A simple optical apparatus for measuring the corneal thickness, and the average thickness of the human cornea. Br. J. Ophthalmol. 35, 169-77 (1951).
51. Olsen, T. & Ehlers, N. The thickness of the human cornea as determined by a specular method. *Acta Ophthalmol.* **62**, 859–71 (1984).
52. Hansen FK. A clinical study of the normal human central corneal thickness. *Acta Ophthalmol* 1971;49:82- 89. No Title.
53. Green DG, Frueh BR, Shapiro JM. Corneal thickness measured by interferometry. *J Opt Soc Am* 1975;65:119-123.
54. Kremer FB, Walton P, Gensheimer G. Determination of corneal thickness using ultrasonic pachymetry. *Ann Ophthalmol* 1985;17:506-507.
55. Sarışın E, Kevser Ma, Eren H, Kaya V. Ultrasonik Pakimetre İle Kornea Kalınlıklarının Ölçümü. *T Oft Gaz* 1992;22:441.
56. Çevik, S. G. *et al.* Comparison of central corneal thickness estimated by an ultrasonic pachymeter and non-contact specular microscopy. *Arq. Bras. Oftalmol.* **79**, 312–314 (2016).
57. Scotto, R. *et al.* Comparison of Central Corneal Thickness Measurements Using Ultrasonic Pachymetry, Anterior Segment OCT and Noncontact Specular Microscopy. *J. Glaucoma* **26**, 860–865 (2017).

58. Erdur, S. K., Demirci, G., Dikkaya, F., Kocabora, M. S. & Ozsutcu, M. Comparison of Central Corneal Thickness with Ultrasound Pachymetry, Noncontact Specular Microscopy and Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Semin. Ophthalmol.* 1–6 (2018). doi:10.1080/08820538.2018.1448091
59. Edmund C. Determination of the corneal thickness profile by optical pachymetry. *Acta Ophthalmol.* 1987;65:147.
60. Payne JW. Donor selection. In: Brightbill FS. editor. Corneal surgery, theory, technique and tissue. St Louis: Mosby-Year Book; 1986.
61. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest ophthalmol* 1974; 13:165- 173.
62. Waltman SR, Palmberg PF. Human penetrating keratoplasty using modified M-K medium. *Ophthalmic Surg* 1978; 9:48-50.
63. Kaufman HE, Varnell ED, Kaufmann S, Beuerman RW, B. B. K.-S. corneal preservation. *A. J. O.* 1985; 100-299-304. No Title.
64. Keates RH, Rabin B. Extending corneal storage with 2.5 percent chondroitin sulfate (K- Sol). *Ophthalmic Surg* 1988; 19:817-820.
65. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL. Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 1992; 114:345-356.
66. Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED. Optisol corneal storage medium. *Arch Ophthalmol* 1991; 109:864-868.
67. Packer, M. *et al.* Prevention, diagnosis, and management of acute postoperative bacterial endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* **37**, 1699–1714 (2011).

68. ESCRS Endophthalmitis Study Group. Prophylaxis of postoperative endophthalmitis following cataract surgery: results of the ESCRS multicenter study and identification of risk factors. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:978–988.
69. Hui, M. *et al.* In vitro compatibility study of cephalosporin with intraocular irrigating solutions and intracameral medications. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **39**, 164–70 (2011).
70. Yoneruek, E. *et al.* Comparison of in vitro safety profiles of vancomycin and cefuroxime on human corneal endothelial cells for intracameral use. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 2139–45 (2008).
71. Arbisser, L. B. Safety of intracameral moxifloxacin for prophylaxis of endophthalmitis after cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 1114–20 (2008).
72. Lane, S. S., Osher, R. H., Masket, S. & Belani, S. Evaluation of the safety of prophylactic intracameral moxifloxacin in cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 1451–9 (2008).
73. Espiritu, C. R. G., Caparas, V. L. & Bolinao, J. G. Safety of prophylactic intracameral moxifloxacin 0.5% ophthalmic solution in cataract surgery patients. *J. Cataract Refract. Surg.* **33**, 63–8 (2007).
74. García-Sáenz, M. C., Arias-Puente, A., Rodríguez-Caravaca, G. & Bañuelos, J. B. Effectiveness of intracameral cefuroxime in preventing endophthalmitis after cataract surgery Ten-year comparative study. *J. Cataract Refract. Surg.* **36**, 203–7 (2010).
75. Montan, P. G., Wejde, G., Koranyi, G. & Rylander, M. Prophylactic intracameral cefuroxime. Efficacy in preventing endophthalmitis after cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **28**, 977–81 (2002).

76. Braga-Mele, R. *et al.* Intracameral antibiotics: Safety, efficacy, and preparation. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 2134–2142 (2014).
77. Libre, P. E. & Mathews, S. Endophthalmitis prophylaxis by intracameral antibiotics: In vitro model comparing vancomycin, cefuroxime, and moxifloxacin. *J. Cataract Refract. Surg.* **43**, 833–838 (2017).
78. Haripriya, A., Chang, D. F. & Ravindran, R. D. Endophthalmitis Reduction with Intracameral Moxifloxacin Prophylaxis. *Ophthalmology* **124**, 768–775 (2017).
79. Gower, E. W. *et al.* Perioperative antibiotics for prevention of acute endophthalmitis after cataract surgery. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2**, CD006364 (2017).
80. Haripriya, A. & Chang, D. F. Intracameral antibiotics during cataract surgery. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **29**, 33–39 (2018).
81. Alasil, T., Wong, J. J. Y., Adelman, R. A., Tom, D. & Coady, P. A. Hemorrhagic Occlusive Retinal Vasculitis After Intracameral Vancomycin Use In Cataract Surgery After Intravenous Exposure. *Retin. Cases Brief Rep.* **1** (2018).
Doi:10.1097/Icb.0000000000000725
82. Khandekar, N. *et al.* Decrease in hyperosmotic stress-induced corneal epithelial cell apoptosis by L-carnitine. *Mol. Vis.* **19**, 1945–56 (2013).
83. Haripriya, A. Antibiotic prophylaxis in cataract surgery – An evidence-based approach. *Indian J. Ophthalmol.* **65**, 1390 (2017).
84. Beigi, B. *et al.* The effect of intracameral, per-operative antibiotics on microbial contamination of anterior chamber aspirates during phacoemulsification. *Eye* **12**, 390–394 (1998).

85. Gore, D. M., Angunawela, R. I. & Little, B. C. United Kingdom survey of antibiotic prophylaxis practice after publication of the ESCRS Endophthalmitis Study. *J. Cataract Refract. Surg.* **35**, 770–773 (2009).
86. Gualino, V. *et al.* Injections intracaméculaire de céfuroxime dans la prophylaxie des endophtalmies après chirurgie de cataracte : organisation et résultats. *J. Fr. Ophthalmol.* **33**, 551–555 (2010).
87. Nguyen, E. T. & Shorstein, N. H. Preparation of intracameral antibiotics for injection. *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 1778–1779 (2013).
88. Barry, P. Adoption of intracameral antibiotic prophylaxis of endophthalmitis following cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **40**, 138–142 (2014).
89. Jack J. Kanski. Acute Bacterial Endophthalmitis. Clinical Ophthalmology Sixth Ed. 2007;12: 354-9.
90. Grzybowski, A., Kanclerz, P. & Myers, W. G. The use of povidone–iodine in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **29**, 19–32 (2018).
91. Lam, P. T. H. *et al.* Apt L. Isenberg Sj. Yoshimori R *et al.* Chemical preparation of the eye in ophthalmic surgery: part III. Effect of povidone- iodine on the conjonktiva 1984; 102:728-9. *Am. J. Ophthalmol.* **139**, 983–7 (2005).
92. Gritz, D. C., Cevallos, A. V, Smolin, G. & Whitcher, J. P. Antibiotic supplementation of intraocular irrigating solutions. An in vitro model of antibacterial action. *Ophthalmology* **103**, 1204-8-9 (1996).
93. Uthaisang-Tanechpongthamb, W., Limtrakarn, W. & Reepolmaha, S. The effect of temperature of eye irrigation solution to reduce corneal endothelial cell loss during phacoemulsification: an in vitro model study. *J. Med. Assoc. Thai.* **95 Suppl 1**, S83-9 (2012).

94. Yu-Wai-Man, P., Morgan, S. J., Hildreth, A. J., Steel, D. H. & Allen, D. Efficacy of intracameral and subconjunctival cefuroxime in preventing endophthalmitis after cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 447–51 (2008).
95. Endophthalmitis Study Group, European Society of Cataract & Refractive Surgeons. Prophylaxis of postoperative endophthalmitis following cataract surgery: results of the ESCRS multicenter study and identification of risk factors. *J. Cataract Refract. Surg.* **33**, 978–88 (2007).
96. Demirel S, Atilla H, Köse Sargın A, Can B. İntrakamaral Sefazol ve Sefuroksim Uygulamasının Tavşan Korneaları Üzerine Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi. *MN Oftalmoloji Mart 2010; 17 (1): 67-70.*
97. Montan, P. G., Wejde, G., Setterquist, H., Rylander, M. & Zetterström, C. Prophylactic intracameral cefuroxime. Evaluation of safety and kinetics in cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* **28**, 982–7 (2002).
98. Özlem, T. Y. *et al.* Are cefuroxime and vancomycin really safe on the corneal endothelial cells? *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **248**, 415–420 (2010).
99. Choi, J. A. & Chung, S. K. Safety of Intracameral Injection of Gatifloxacin, Levofloxacin on Corneal Endothelial Structure and Viability. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **25**, 425–432 (2009).
100. Kim, S.-Y., Park, Y.-H. & Lee, Y.-C. Comparison of the effect of intracameral moxifloxacin, levofloxacin and cefazolin on rabbit corneal endothelial cells. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **36**, 367–370 (2008).
101. Bowen, R. C. *et al.* Comparative analysis of the safety and efficacy of intracameral cefuroxime, moxifloxacin and vancomycin at the end of cataract surgery: a meta-analysis. *Br. J. Ophthalmol.* [bjophthalmol-2017-311051](https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-311051) (2018).
doi:10.1136/bjophthalmol-2017-311051

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 09/08/2017
Toplantı Tarihi : 18 Nisan 2017

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Sayın, Prof.Dr.Ayşe Tülin BERK
DEÜ Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

18/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Tavşanlarda intarakameral Aprokam®(ön kameraya spesifik sefuroksim) in farklı sulandırma solüsyonlarıyla sulandırıldıktan sonra intarakameral uygulamasının kornea üzerindeki lokal etkilerinin değerlendirilmesi" isimli; Ferhan Yılmaz, Osman Yılmaz ve Pembe Keskinoglu'nun araştırmacı olduğu, 14 Adet Yeni Zelanda Albino Tavşan talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Araştırmacı)

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Güngör OKTAY
Üye

Prof.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Nergiz DÜRMÜŞ
Üye

Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Z. Kınan
Zehra KINAM
Üye

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman (Araştırmacı)

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ
Üye (Topl.Katılmadı)

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.