

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

KERATOKONUS HASTALARINDA COMET ASSAY ANALİZİ
İLE DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET CAN HIRAALİ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. SEMRA ACER

DENİZLİ - 2015

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

KERATOKONUS HASTALARINDA COMET ASSAY ANALİZİ
İLE DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET CAN HIRAALİ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. SEMRA ACER

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 21.08.2014 tarih ve
2014TPF037 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2015

Yrd. Doç. Dr. Semra Acer danışmanlığında Dr. Mehmet Can Hıraali tarafından yapılan “keratokonus hastalarında comet assay analizi ile DNA hasarının araştırılması” başlıklı tez çalışması 05/01/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof Dr. Avni Murat Avunduk

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Semra Acer

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Harun Çakmak

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.
05/01/2015

Prof. Dr. Hasan HERKEN

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitim süresince bana her konuda destek veren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Avni Murat Avunduk, Prof. Dr. Volkan Yaylalı, Prof. Dr. Cem Yıldırım, Doç. Dr. Ramazan Yağcı, Doç. Dr. Ebru Nevin Çetin, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Simavlı, Yrd. Doç. Dr. Gökhan Pekel'e ve başta asistan arkadaşlarım olmak üzere tüm Göz Hastalıkları Anabilim Dalı personeline;

Her türlü desteği ve özellikle tezle ilgili yardımı, anlayışı ve sabrı için tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Semra Acer'e ;

Tezimin analizinde her aşamada laboratuvar desteği sağlayıp bana kıymetli zamanını ayıran Fizyoloji Anabilim Dalı'nın, başta Prof. Dr. Vural Küçükatay hocam ve Arş. Gör. Yusuf Ekbiç olmak üzere tüm çalışanlarına;

Her an manevi desteğini hissettiğim, tezden öte can yoldaşım, sevgili eşim Belkıs Hıraali'ye ve tez yazımı sırasında dünyaya gelen ve neşe kaynağımız olan biricik oğlum Ahmet Emir'e;

Uzakta da olsalar hep yanımda olduklarını göstererek, varlıklarıyla sevindiğim kıymetli anneme ve babama;

Çalışmama katılma nezaketi gösteren hasta ve kontrol grubundaki tüm kişilere;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
ÖZET	X
SUMMARY	XII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
KORNEA	3
Embriyoloji	3
Anatomi	3
Fizyoloji	4
Histoloji	5
<i>Epitel</i>	5
<i>Bowman</i>	6
<i>Stroma</i>	6
<i>Descemet Membran</i>	6
<i>Endotel</i>	7
KERATOKONUS	8
Tanım ve Epidemiyoloji	8
Patogenez	8
<i>Genetik</i>	10
Klinik Özellikler ve Bulgular	13

Korneal Görüntüleme	17
Sınıflama	19
<i>Keratometrik Sınıflama</i>	19
<i>Kornea Koni Şekline Göre Sınıflama</i>	19
<i>Amsler- Krumeich Sınıflaması</i>	19
<i>Klinik- Videokeratografik Sınıflama</i>	20
Tanı	21
Ayırıcı Tanı	21
<i>Pellucid Marginal Dejenerasyon</i>	21
<i>Keratoglobus</i>	22
<i>İyatrojenik Ektazi</i>	23
<i>Yalancı Keratokonus</i>	23
Tedavi	23
<i>Refraktif Düzeltme</i>	23
<i>Korneal Kollajen Çapraz Bağlama (Kollajen Crosslinking)..</i>	25
<i>İntrakorneal Halka Segment</i>	25
<i>Keratoplasti</i>	26
DNA HASARI VE COMET ASSAY ANALİZİ	27
DNA Hasarı	27
Comet Assay	28
<i>Tarihçe</i>	28
<i>Klinik Araştırma ve Comet Assay</i>	29
<i>Comet Assay Analizi</i>	29
<i>Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi</i>	29
<i>Comet Analizinde DNA Hasar Seviyesini etkileyen Faktörler ..</i>	30
GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ	32
Hasta	32

Kontrol	32
DIŞLANMA KRİTERLERİ	32
Hasta	32
Kontrol	32
COMET ASSAY PROTOKOLÜ	33
Temel Metodoloji	33
<i>Basamaklar</i>	33
<i>Hücresele Materyal Hazırlanması</i>	33
<i>Mikroskop Lamının Hazırlanması</i>	34
<i>Lizis</i>	34
<i>Alkali Ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması ...</i>	34
<i>Elektroforez</i>	34
<i>Nötralizasyon</i>	35
<i>DNA Boyanması ve Cometlerin Sayılması</i>	35
<i>Comet Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi</i>	35
OxiSelect Comet Assay Kitinde Prensipler	37
Comet Analizi İçin Kullanılan Alet ve Malzemeler	38
Comet Assay IV Programı ile Sonuçların Değerlendirilmesi ...	38
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	41
PENTACAM (OCULUS, WETZLAR, ALMANYA)	42
BULGULAR	45
TARTIŞMA	53
SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

KC	Keratokonus
D	Diyoptri
TKA	Trikarboksilik asit
HMF	Heksoz monofosfat
µm, µl	Mikrometre, mikrolitre
UV	Ultraviyole
LASEK	Lazer epitelyal keratomilözis
GAG	Glikozaminoglikan
Örn	Örnek
OD	Otozomal dominant
GTP/GDP	Guanozin trifosfat/Guanozin difosfat
TGF	Transforming growth faktör
Vb	Ve benzeri
İOL	İntraoküler lens
V	Volt
mA	Miliamper
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
LMPA	Düşük erime noktalı agar
NMPA	Normal erime noktalı agar
Nm	Nanometre

Rpm	Dakikada devir sayısı
PAAG	Primer açık açılı glokom
TOS	Total oksidan durum
TAS	Total antioksidan durum
PVD	Primer vasküler disgenезis
BU	Baş uzunluğu
KU	Kuyruk uzunluğu
BY	Baş yoğunluğu
KY	Kuyruk yoğunluğu
KM	Kuyruk momenti
KMi	Kuyruk migrasyonu
K	Kuyruk
B	Baş
bp	Baz çifti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1	Korneanın histolojik yapısı	7
Şekil 2	Rizutti işareti	14
Şekil 3	Parasantral korneal incelme ve Munson işareti	15
Şekil 4	Fleischer halkası	15
Şekil 5	Vogt stria	16
Şekil 6	Regrese olmuş korneal hidrops	16
Şekil 7	Korneal stromal skar	17
Şekil 8	Hasarlı bir hücrenin şematik comet görüntüsü ve parametreler	36
Şekil 9	Hasar düzeyine göre şematik comet sınıflama görüntüsü	36
Şekil 10	Hasarsız bir hücrenin bilgisayarlı mikroskopik analizde comet görüntüsü	39
Şekil 11	Kuyruk içeren hasarlı hücrenin bilgisayar analizinde comet görüntüsü	40
Şekil 12	Hasarsız bir hücrenin direk mikroskopik görüntüsü ...	40
Şekil 13	Aynı mikroskop alanında birkaç hücrenin comet görüntüsü	41
Şekil 14	Keratokonus hastası topografik görüntüsü (elevasyon haritası)	43
Şekil 15	Keratokonus hastası Belin/Ambrosio analiz haritası topografi görüntüsü	43
Şekil 16	Pentacam (Oculus, Wetzlar, Almanya) cihazının fotoğrafik görüntüsü	44

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1	Hasta ve kontrol grubu yaş bulguları	45
Tablo 2	Hasta ve kontrol grubu cinsiyet bulguları	46
Tablo 3	Hasta ve kontrol grubu sigara bulguları	46
Tablo 4	Hasta ve kontrol grubu meslek dağılımı	47
Tablo 5	Hasta ve kontrol grubu comet sonuçları	48
Tablo 6	Tüm grup sigara ilişkili comet sonuçları	49
Tablo 7	Sigara içmeyen hasta ve kontrol comet sonuçları	50
Tablo 8	Bilateral ve unilateral hastalık ile comet ilişkisi	51
Tablo 9	Tüm grup analizinde comet parametrelerinin korelasyonu	52

ÖZET

Keratokonus Hastalarında Comet Assay Analizi ile DNA Hasarının Araştırılması

Dr. Mehmet Can Hıraali

Keratokonus tüm dünyada genç popülasyonu etkileyen bilateral, progresif bir korneal ektazidir. Patogenezi henüz tam aydınlatılamamıştır. Genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Birçok gen loküsünün hastalıkla ilgisi gösterilse de bilinen klasik bir kalıtım modeli yoktur. Kontakt lens kullanımı, kronik göz ovalama, atopi keratokonusla ilişkilendirilmiş çevresel faktörler arasındadır. Keratoplastinin en sık uygulandığı hastalıklardandır. Tedavi seçenekleri oldukça sınırlı olsa da günümüzde hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı düşünülen korneal crosslinking tedavisi ile yüz güldürücü sonuçlar bildirilmektedir.

Comet assay, DNA hasarını göstermede kullanılan bir jel elektroforez yöntemidir. Duyarlı, hızlı ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle son zamanlarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Literatürde daha önce glokom, katarakt, toksoplazma retiniti gibi farklı oküler hastalıklarda DNA kırıklarının arttığı gösterilmiştir. Keratokonus etyolojisinin aydınlatılması önemli bir iş gücü kaybına neden olan bu hastalıkla ilgili daha fazla bilgi edinmemize ve farklı tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Biz bu çalışmada keratokonus hastalarında comet assay yöntemi ile DNA kırıklarının varlığını araştırdık. Çalışmaya 44 keratokonus hastası ile yaş ve cinsiyet uyumlu 41 sağlıklı birey (kontrol grubu) dahil edildi. DNA analizi için bireylerin periferik kanından elde edilen lenfositler kullanıldı. Her iki grupta baş uzunluğu, kuyruk uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk migrasyonu değerlendirildi. Hasta grubunda kuyruk uzunluğu ve kuyruk migrasyonu sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Ayrıca hastalığın bilateral görüldüğü hasta grubunda, tek taraflı görülen

gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek kuyruk uzunluğu ve kuyruk migrasyonu saptandı.

Keratokonus hastalarında artmış DNA hasarının gösterilmesi, fizyopatolojide kırıklara neden olabilecek çevresel etkenlerin ve/veya bozulmuş DNA tamir mekanizmalarının önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Bu çalışmanın ileride bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Ancak comet parametrelerinin tam olarak yorumlanabilmesi ve artmış DNA kırıklarının patogenezdaki öneminin anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Keratokonus, comet analizi, DNA kırığı

SUMMARY

Evaluation of DNA Breaks in Patients with Keratoconus by Comet

Assay Analysis

Dr. Mehmet Can Hıraali

Keratoconus (KC) is a bilateral, progressive corneal ectasia which mostly affects young patients all around the world. Although both genetic and environmental factors are associated with KC, the pathogenesis is still not clear. Even though several gene locuses are shown relevant to the disease, it does not follow the classical Mendelian inheritance. Contact lens wearing, atopy and chronic eye rubbing are environmental factors which associated with KC. It is the leading cause of penetran keratoplasty. Although the treatment modalities are very limited, there are favorable reports about corneal crosslinking which may decelerate the progression of disease. Comet assay is a sensitive, rapid and easy gel electrophoresis method currently used to demonstrate single and double strand DNA breaks. Previously DNA damage has been shown with comet assay in ocular diseases such as glaucoma, cataract and toxoplasma retinitis. With new studies, we may improve new different treatment modalities for KC, which has a great social and economic impact.

In this study we aimed to evaluate the presence of DNA breaks in patients with KC. 44 KC and 41 age and sex matched controls were included. For DNA analysis, lymphocytic cells were used which separated from peripheric blood cells. Several parameters, including head length, tail length, head intensity, tail intensity, tail moment, tail migration were evaluated for quantitative analysis for DNA damage. The increase in the tail length and tail migration was statistically significant in patients with KC compared with healthy controls group ($p < 0,05$). Also in KC patients with bilateral disease, the increase in the tail length and tail migration was statistically significant compared with patients with unilateral disease ($p < 0,05$).

The increased incidence of DNA breaks in patients with KC may show us the role of environmental factors and/or damaged DNA repair mechanisms in the

pathophysiology of the disease. We deem this study as promising in shedding the light on later studies in the same field. Further studies are needed to have a better understanding of comet parameters and to determine the importance of DNA damage in KC disease.

Keywords: Keratoconus, comet assay, DNA break

GİRİŞ VE AMAÇ

Keratokonus bilateral ve asimetrik korneal distorsiyonla birlikte, korneal incelme, irregüler astigmatizma ve görme azalması ile sonuçlanan bir korneal ektazidir. Genel popülasyonda ortalama 1/2000 oranında görülür.[1] Her iki cinsiyeti etkilemesine rağmen birçok çalışmada erkeklerin kadınlardan daha fazla etkilendiği gösterilmiştir. Etyoloji ve patogenezi henüz tam olarak bilinmemektedir. Çevresel, davranışsal ve multipl genetik komponentler içeren kompleks multifaktöryel bir patofizyolojisi vardır.[2, 3]

Keratokonusun ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir ilişkisi vardır. İyi bilinen çevresel faktörler içerisinde kontakt lens kullanımı, göz ovalama, atopi, ultraviyole gibi oksidatif stres artırıcı etkenler vardır.[1, 4]

Keratokonus hastalarının büyük bir kısmında çevresel faktörlerin tetiklediği genetik bir yatkınlık mevcuttur.[5]

Çoğu vakalar sporadik olsa da otozomal dominant ve otozomal resesif geçiş vardır.[6, 7] Keratokonus hastalarının birinci derece akrabaları normal popülasyona göre çok daha yüksek risk altındadır.[8, 9] Keratokonuslu monozigot ikizlerde hastalık fenotipinin çok benzer bulunmuş olması fenotipte de genetik etkinliğin güçlü olduğunu düşündürmektedir.[10]

Keratokonus tanısında korneal topografi, konfokal mikroskopi, plasido disk analizi ve yarıklı lamba biyomikroskopi büyük oranda yardımcı olsa da hafif semptomları olan genç hastalarda, bulgulardaki çeşitlilik ve yorumlamadaki zorluklar tanıyı güçleştirebilmektedir.[11]

Özellikle bu grup hastalarda spesifik genetik markırların tanımlanması hastalığın tanısı için çok değerli bir bulgu olabilir. Bu da ancak multipl genomik yaklaşımla keratokonusla ilgili lokasyonların ve genlerin tanımlanmasıyla mümkündür.[2]

Kliniğimizde yaptığımız çalışmada, keratokonus tanısı almış hastalarımızdan ve sağlıklı gönüllülerden aldığımız tam kandan lenfosit izole edip comet assay yöntemi ile DNA hasar miktarını ve oranını belirledik. Comet assay analizi, izole edilip -20°C’de saklanan hücrelerin, bazı özel işlemlerden geçirildikten sonra elektroforez yöntemi ile genetik materyallerinin göçü esasına dayanılarak yapılan bir analizdir. Tek hücre jel elektroforezi olarak da isimlendirilir. Elektroforez sonrası hasarlı olan genetik materyal sağlam olan hücre çekirdeğinden yer değiştirmek suretiyle hücrede kuyruk benzeri bir yapı oluşturur. Bu analiz, sağlam ve hasarlı genetik materyallerin birbiriyle ilişkisini matematiksel olarak hesaplayarak hücredeki hasarlı genetik materyal (DNA) oranıyla ilgili bilgi vermektedir.

Çalışmamızda, keratokonus hastalarındaki genetik hasar analizlerini sağlıklı bireylerle kıyaslayarak keratokonus hastalarıyla sağlıklı bireyler arasında DNA hasarı açısından herhangi bir fark olup olmadığını değerlendirdik. Çalışmada, keratokonus hastalığının patofizyolojisinde DNA tamir mekanizmalarının ne kadar öneme sahip olduğunu ve gerçekten DNA hasarı açısından sağlıklı bireylerle keratokonus hastaları arasında anlamlı fark olup olmadığını anlamayı amaçladık. Çalışmamızın, keratokonus hastalarının sağlıklı insanlara göre daha fazla genotoksik etkenlere maruz kalıp kalmadığı konusunda fikir verebileceğini düşündük. Bunun bilinmesi, DNA hasarı oluşturan dış etkenlerden uzak durabilmenin, hastalığın oluşumunu yavaşlatabileceği ya da hastalığın seyrini değiştirebileceği konusunda yol gösterici olabilir. Ayrıca hastalığın etyopatolojisinde DNA hasarının diğer etkenler içerisinde nasıl bir yere sahip olduğunu gösterebilir.

Keratokonus ile ilgili yapılan çok sayıda genetik çalışma ve çok sayıda sorumlu gen mevcuttur. Bunlarla ilgili kanıtlar genelde yetersizdir. Gelecekte yapılacak genetik çalışmalara ışık tutması açısından hücre çekirdeğindeki hasarın boyutunun bilinmesi önemlidir.

GENEL BİLGİLER

KORNEA

Embriyoloji

Kornea oluşumu, lens vezikülünün yüzey ektoderminden ayrılması ile başlar. Gestasyonel 39. günde 2 tabakalı epitel bazal lamina üzerinde uzanmakta ve 2-3 tabakalı endotelden dar asellüler boşluk ile ayrılmaktadır. Periferden gelen mezenşimal hücreler 7. haftada epitel ile endotel arasındaki boşluğa göç eder. Mezenşimal hücreler sonraki gestasyonel süreçte keratinosit olacak hücrelerdir ve 7. haftanın ortasında tam olmayan 4-5 tabaka şeklinde olup hücreler arası birkaç kollajen fibril taşırlar. 3. ayda epitel 2-3 kat hücreden oluşurken stroma arkada daha düzenli olarak 25-30 kat keratositten oluşur. İnce, düz olmayan descemet membranı en arkadaki keratositlerle tek tabakalı endotel arasında uzanır. Bu aşamada descemet membran, stromaya uzanan lamina dens ve endotele komşu lamina lusid olmak üzere 2 zondan oluşmaktadır. Descemet membranı büyüyerek doğumda 3mm ile maksimum kalınlığa ulaşan fetal çizgili zon denen özgün yapıyı oluşturur. Doğum sonrası yaşla birlikte kalınlaşmaya devam eden arka çizgisiz zon ise homojen, fibrinogranüler materyalden oluşur. 4. ayın sonunda ise ön stromanın hücresiz bowman zonu oluşur.

Anatomi

Kornea, gözü koruyucu rolünün yanısıra ortalama 43D kırıcılıkla gözün refraktif gücünün ortalama üçte ikisini oluşturur. Korneanın santral üçte biri neredeyse sferiktir ve normalde ortalama 4mm çapındadır. Merkezde ortalama kalınlık 540µm olup bireyler arasında farklılık gösterir. Korneanın arka yüzeyi ön yüzeyinden daha eğimli olduğundan santral kornea periferik korneaya göre daha incedir. Kornea periferde yassılaştır fakat yassılaşıma simetrik değildir. Yassılaşıma nazalde ve üstte, temporal ve alta göre daha fazladır. Ortalama kornea çapı vertikal olarak 11.5mm, horizontal olarak 12mm'dir.

Kornea, her ikisi de trigeminal sinirin birinci (oftalmik) dalından gelen uzun posterior silier sinirlerden beslenen subepitelyal ve daha derinde yer alan stromal sinir pleksusları tarafından innerve olur. Bu sinir pleksuslarını oluşturan sinirler skleral, episkleral ve konjonktival olmak üzere üç düzeyde korneaya girerler. Periferde uzun posterior silier sinirlerin yaklaşık 70-80 dalı korneaya girer ve limbusun 1-2 mm gerisinde miyelin kılıflarını kaybederler. Kornea bu sinir pleksuslarıyla vücudun en yoğun innervasyona sahip dokusudur. Bu nedenle korneal abrazyonlar ve bazı keratopatiler ağrı, refleks lakrimasyon ve fotofobi ile kendini gösterir.

Fizyoloji

Normal kornea kan damarlarından yoksundur. Beslenme ve metabolik atıkların uzaklaştırılması esas olarak arka yüzeyde humör aköz, ön yüzeyde göz yaşı film tabakası ve kapak damar yapısı tarafından sağlanır. Epitel hücreleri, stromal keratositler ve endotel için birincil metabolik madde glikozdur. Stroma, glikozu humör aközden endotelden geçen taşıyıcı aracılı transport ile alır. Epitel ise glikozu stromadan pasif difüzyonla alır. Preoküler göz yaşı tabakası ve limbal damarlar kornea glikozunun yaklaşık %10'unu sağlar.

Glikoz korneada her üç metabolik yolla metabolize edilir. Bunlar trikarboksilik asit (TKA) siklusu, anaerobik glikoliz ve heksoz monofosfat (HMF) yoludur. Epitel ve endotelde glikozun %35-65'i HMF yoluyla yıkılırken, keratositlerde HMF yolunun önemli bir enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz bulunmadığından stromal keratositler bu yolla çok az glikoz metbolize eder. TKA siklusu endotelde epitele göre daha etkindir. Glikolizin son ürünü olan pirüvik asit ya aerobik şartlarda CO₂ ve H₂O'ya ya da anaerobik ortamda laktik aside çevrilir. Laktik asit sıkı oturmuş düşük oksijen geçirgen kontakt lenslerde olduğu gibi oksijen azlığı durumunda artar. Artmış laktik asit düzeyinin ise artmış çözünen madde osmotik yüküne bağlı olarak ödem veya endotel morfolojisini ve fonksiyonunu değiştiren stromal asidoz gibi zararlı sonuçları vardır.

İnsan korneasında yüksek oranda aldehid dehidrogenaz ve transketolaz vardır. Bu iki protein korneal stromal çözünebilir proteinlerin %40-50'sini oluşturur. Lensin enzim kristalinlerinde olduğu gibi bu enzimler korneanın optik özelliğine katkıda bulunur. Aynı zamanda her iki protein kornea hücrelerini, serbest radikallere ve oksidatif hasara karşı UV-B ışınlarını emerek korur.

Histoloji

Kornea histolojik olarak 5 tabakadan oluşur:

Epitel

Yaklaşık 35µm kalınlığında olup, tüm kornea kalınlığının %10'unu oluşturur. 5-6 tabakadan meydana gelir. 1-2 sıra yüzeysel yassı hücreler, 2-3 sıra geniş kanat hücreleri, en içte kolumnar bazal hücreler içerir. Kolumnar bazal hücreler alttaki bazal laminaya hemidezmozomlarla bağlanmıştır. Yüzeysel epitel hücreleri ise birbirine zonula okludenslerle bağlıdır. Yüzeysel çıkıntıları (mikrovillus ve mikropikata) yüzeysel hücre tabakasının apikal yüzünde bulunur. Bu çıkıntılar glikokaliks denen filamentöz bir maddeyle örtülüdür. Glikokaliks ana yapısını oluşturan müsin glikoproteinlerinin, göz yaşı stabilitesini ve kornea yüzey ıslaklığını sağladığı düşünülmektedir. Plazma membran proteinleri ve kornea epitel hücre lipidleri yoğun olarak glikozillenmiş olup kornea epitel bazal hücrelerinin bazal membrana yapışmasını destekleyerek yara iyileşmesinde rol alırlar. Aynı zamanda korneal enfeksiyonda mikropların tutunma yeri olarak da rol alırlar.[12, 13]

Moleküllerin epitelden geçebilmesi iyonik dağılım durumlarına bağlıdır. Bir organik molekülün epitelden geçebilmesi için yüksüz halde bulunması gerekir. Ancak yüklü molekül daha rahat stromaya girer. Bu nedenle bir organik molekül korneayı geçip ön kamaraya girebilmek için fizyolojik pH ve ısıda (yani stromada) ayrışabilmelidir.[12]

Sağlıklı bir kornea yüzeyi için şart olan epitelyal kök hücreler esasen üst ve alt limbusta yer alır ve muhtemelen Vogt pallisadlarının içerisinde bulunurlar. Bunlar

aynı zamanda konjonktival dokunun kornea üzerine ilerlemesine engel olan bariyer görevi görür.[13]

Bowman

Bu tabaka 12µm kalınlığında rastgele dizilmiş tip 1 ve tip 5 kollajen liflerden oluşmuştur. Bu lifler proteoglikan ve glikoproteinlerden oluşan bir matriks içinde ağ gibi sarılmışlardır. Hücre bulundurmazlar ve hasarlandığında yeniden oluşmazlar. Miyopi düzeltilmesi için uygulanan ekzimer lazer ile, fotorefraktif keratektomi ve LASEK sırasında bowman tabakası uzaklaştırılarak kornea düzleştirilir.[12]

Stroma

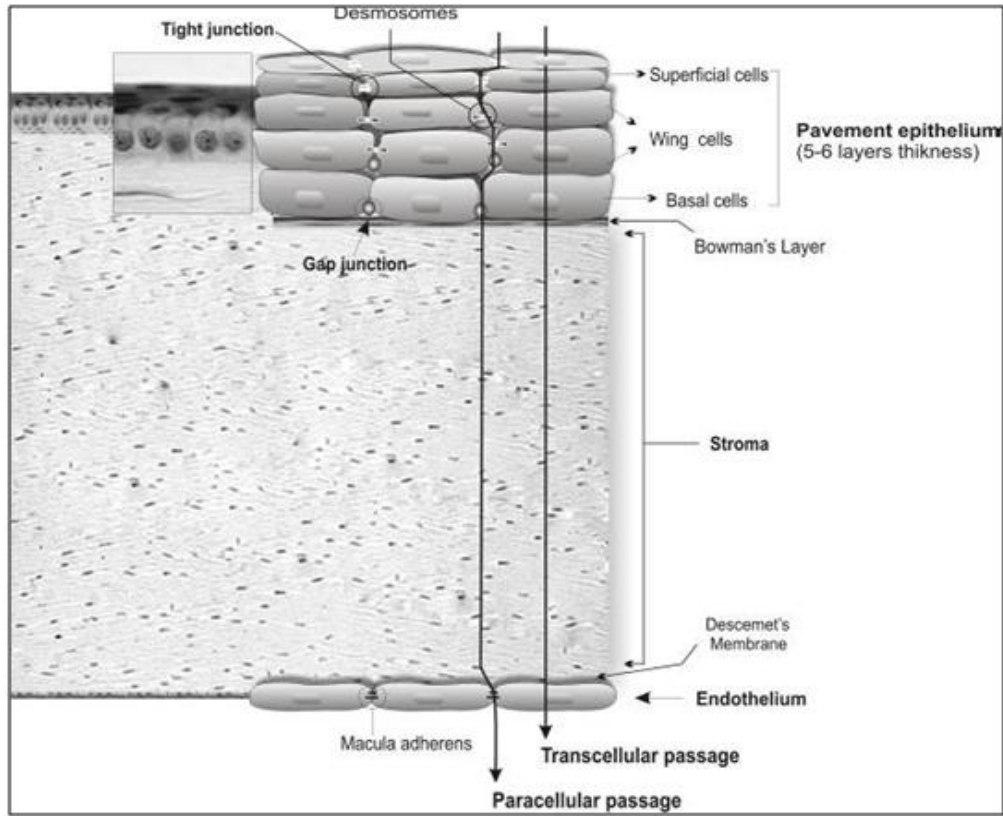
Toplam kornea kalınlığının %90'ını oluşturur. Kollajen üreten keratositlerden, ara maddeden ve kollajen lamellerinden oluşur. Kollajen fibriller ön 1/3'te oblik lameller, arka 2/3'te paralel lameller oluşturur. Kollajenlerin bu lameller yapısı ve düzeni korneanın saydamlığının oluşmasını sağlar. Kollajen fibrillerinin ödem sıvısı ile birbirinden ayrılması korneal bulanıklığa neden olur. Tip 1, 3, 5, 6 kollajen içerir. Ara madde kollajen fibriller arası uzanan proteoglikanlardan oluşur. GAG bileşenleri (kondroitin ve keratan sülfat) oldukça yüküldür ve stromaya şişme özelliği kazandırır. Keratositler hem kollajeni hem proteoglikanları sentezler. Keratositler önde arkaya göre daha yoğundur. Çok sayıda golgi, mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulum içeren oldukça aktif hücrelerdir. Yassı görünüşleri ve koronal dağılımları ışığın yayılımında çok az bozukluğa neden olur. Stromanın hasarlanma sonrası rejenerasyon kabiliyeti yoktur.[12, 13]

Descemet Membran

Kornea endotelinin bazal laminasıdır. Gerçek bazal laminadır. Kalınlığı yaşla artar. Anne karnında oluşan ön bantlı bölge ve endotele komşu uzanıp sonradan oluşan arka bantsız bölgeden oluşur. Bu bölgeler endotelin sentezleme fonksiyonundan sorumludur. Rejenerasyon kapasitesi mevcuttur. Tip 4 kollajenden zengindir. Bu tabakadaki periferik birikimler Hassal-Henle cisimcikleri olarak bilinir ve yaşlılarda sıktır. Santral birikimlere ise kornea guttata denir ve ilerleyen yaşlarda ortaya çıkar.[12, 13]

Endotel

Nöral tomurcuktan köken alan tek sıra poligonal hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin apikal yüzü ön kamaraya bakarken bazal yüzü descemet membranına bitişiktir. Genç endotel hücreleri geniş çekirdeğe ve bol mitokondriye sahiptir. Endotel hücreleri fazla sıvıyı stroma dışına pompalayarak yaşam boyu korneanın saydamlığını sağlarlar. Endotel hücrelerinde mitoz nadirdir ve hücre sayısı yaşla azalır. Endotel hasarında iyileşme, hücre göçü, yeniden düzenlenme ve geriye kalan hücrelerin genişlemesi şeklinde olur. Cerrahi hasar, inflamasyon veya kazanılmış bazı hastalıklar nedeniyle oluşabilecek endotel hücre disfonksiyonu ve kaybı, endotelial yetmezliğe, stromal ödeme ve görme kaybına yol açar.[12, 13]



Şekil 1: Korneanın histolojik yapısı

KERATOKONUS

Tanım ve Epidemiyoloji

Keratokonus bilateral, non inflamatuvar, progresif korneal protrüzyon ve incelmeyle karakterize bir korneal ektazidir. Korneal protrüzyon irregüler astigmatizma ve miyopi ile birlikte görmede azalmaya neden olur. Genel popülasyonda yaklaşık insidansı 1/2.000'dir. Prevelansı 8.8-229/100.000'dir.[3] Çoğu vaka sporadik olsa da az sayıda hastada aile öyküsü vardır. Genel olarak genç yaşlarda ortaya çıkan ve 4. dekada kadar progresyon gösterebilen bir hastalıktır.[14, 15]

Tüm olgularda sadece topografik düzeyde de olsa her iki göz etkilenmiştir. Başlangıçta tek taraflı görme azlığı ile kendini gösterir. Hastalığın asimetrik özelliği nedeniyle diğer gözde görme genelde önemsenmeyecek bir astigmatizmayla birlikte normaldir. Diğer gözde keratokonus gelişimi için en yüksek risk tanı aldıktan sonraki ilk 6 aydır fakat 16 yıl içerisinde diğer gözde keratokonus oluşma ihtimali %50'dir.[13]

Patogenezi

Keratokonusun patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Multifaktöryel bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinde çeşitli çevresel ve genetik faktörler birlikte rol alırlar. Göz ovuşturma, kontakt lens kullanımı, atopi, UV-B maruziyeti gibi etkenler keratokonusun etyolojisi içerisinde yer alır.[15, 16]

Keratokonusun bazı sistemik hastalıklarla ilişkisi bilinmektedir. Bunlar içerisinde Down sendromu, Turner sendromu, Ehler-Danlos sendromu, Marfan sendromu, osteogenezis imperfekta , mitral kapak prolapsusu, mental retardasyon sayılabilir. Bu hastalıklarla keratokonus arasında sebep sonuç ilişkisi kurmak zordur. Bu durum keratokonus etyopatogenezinin ne kadar karmaşık olduğunu göstermektedir. Fakat bu tür genetik hastalığı olan hastalarda yapılan sitogenetik çalışmalar, keratokonus ile ilgili kromozomal translokasyonu anlayabilme açısından büyük öneme sahiptir.[1]

Oküler hastalıklardan ise vernal konjonktivit, mavi sklera, aniridi, ektopia lentis, retinitis pigmentosa, Leber'in konjenital amorozisi ile birlikteliği olabilir.[3, 13]

Keratokonusun histopatogenezinde 3 klasik özellik vardır. Bunlar; korneal stromanın incilmesi, bowman tabakasında kırıklar, epitel bazal membranında demir depolanmasıdır. Ayrıca epitelyal incelme, stromal kollajen fibril yoğunlaşması, derin stromal skarlaşma ise keratokonustaki diğer histopatolojik özelliklerdendir. Descemet membranda etkilenme (çatlak, ayrılma) akut hidrops dışında nadirdir. Keratokonus hastalarında genelde endotelde belirgin etkilenme olmaz. Fakat bazı çalışmalarda endotel hücrelerinde pleomorfizm, polimegatizm, dejenerasyon , hücre membran lizisi gösterilmiştir.[17, 18]

Keratokonusun patogenezinde biyokimyasal mekanizmaların da rolü vardır. Eski çalışmalar keratokonusta korneal kollajen yapısının değişmediği yönündeydi. Son çalışmalar ise proteaz ve diğer katabolik enzimlerdeki artış ve proteaz inhibitörlerinde azalma nedeniyle gerçekleşen yıkım sonucu stromal kayıp geliştiği yönündedir.[1, 19]

Keratokonusta korneal epitelyal abrazyon ve subepitelyal ablasyonun da eşlik ettiği ön stromal keratosit hücrelerindeki kaybın apoptotik hücre ölümü ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Hem kornea epiteli hem kornea endotelinde IL-1 üretimi ve IL-1 reseptör ekspresyonu artmıştır. Bunun sonucunda keratosit ölümü artar, keratosit kemotaksisi azalır.[20]

Göz ovuşturma, atopi, kontakt lens kullanımı gibi mikrotravmalarda da epitelden IL-1 salınımı artmıştır. Dolayısıyla mikrotravmaya bağlı keratokonus oluşumunda IL-1 artışına bağlı apoptotik keratosit ölümünün rolü vardır. [21, 22]

Keratokonusta, korneal stromal fibroblastlarda süperoksit, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen ürünleri yüksek düzeydedir. Artmış hidrojen peroksit düzeyiyle birlikte katalaz aktivitesi normal değerlere göre daha yüksek bulunmuştur.[23]

Keratokonusta, korneada oksidatif hasara sebep olan, lipid peroksidasyonunda artış ve nitrik oksit yolunda bazı anormal ve defektif enzimlerin varlığı gösterilerek kaskad hipotezi öne sürülmüştür. Oksidatif ve sitotoksik ürünlerin birikmesi çeşitli korneal proteinlerde değişikliğe sebep olmaktadır. Bunun sonucunda apoptozis, sinyal yollarında değişiklik, artmış enzim aktivitesi, fibrozis gibi olayları içeren bir kaskad başlamaktadır. Keratokonus hastalarında veya keratokonus oluşumunu önleme açısından sağlıklı insanlarda koruyucu amaçlı oksidatif stresi minimize etmek etkili olabilir. Ultraviyoleye karşı koruyucu güneş gözlüğü veya kontakt lens takmak; mekanik travmayı (ovalamak) azaltmak; suni gözyaşı, non steroid anti-inflamatuvar ilaçlar ve allerji tedavisiyle kornea yüzey konforunu artırmak keratokonusa karşı koruyucu etkiye sahiptir.[24]

Genetik

Keratokonus çoğu zaman sporadik olarak görülse de %6-10 oranında aile hikayesi vardır. Otozomal dominant veya otozomal resesif geçiş gösterebilir. OD kalıtımında farklı fenotiplerin görülmesi geçiş penetransının tam olmadığını göstermektedir.[25] Ayrıca inflamasyon ve apoptozis gibi hücreyel yolakların da keratokonus gelişiminde etkisi vardır.[26] Korneal enzim aktivitesinde anormallikler de keratokonusta kesin olmayan değişikliklerdendir.[27]

Birçok göz hastalığının genetik bir temeli olduğundan, hastalıktan sorumlu genlerin tanımlanması, hastalığı erken tanıma ve tedavi edebilme olanağı tanıması açısından önemlidir. Bu yüzden araştırmalar hastalıklardan sorumlu genleri bulmaya doğru yoğunlaşmıştır. Keratokonus hastalığının da genetik zeminli bir hastalık olduğu düşünüldüğünden sorumlu geni bulmak ve hastalığı erken tespit edebilmek amacıyla çok sayıda genetik araştırma yapılmıştır. Yapılan kompleks genetik araştırmalar sonucu keratokonus hastalığına duyarlılıkta genetik anormalliğin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Keratokonusta son yapılan genetik çalışmalarda farklı popülasyonlarda görülen 17 ayrı gen lokasyonu tanımlanmıştır. Bu da keratokonus genetiğinin ne kadar heterojenik olduğunun göstergesidir.[28]

Keratokonusta genetik çalışmalar yapılırken aday genler genellikle, kornea gelişiminde fonksiyonu olduğu bilinen genler ve daha önce korneal distrofi gibi bazı

korneal hastalıklarla ilişkisi olduğu bilinen genler içerisinde seçilir. Keratokonus olan hastalarla keratokonus olmayan kişilerde, bu seçilen aday genler karşılaştırılarak hastalığa neden olabilecek olası gen mutasyonlarının hastalığa direkt etkisi test edilir.[28]

Vizüel sistem gelişiminde görev alan bir proteini kodlayan VSX1 geninin, kraniofasial ve oküler gelişim sürecinde fonksiyonu vardır. VSX geni embriyolojik gelişim sırasında kon opsin gen ekspresyonunu regüle eden transkripsiyon faktörleriyle ilişkili bir gen ailesinin üyesidir. Retinal bipolar ara nöronların gelişiminde de rol aldığı maymun ve insan korneasından alınan örneklerde görülmüştür. Keratokonus hastalarında bu gende kayıp mutasyonlar olduğu (R166W ve L159M) gösterilmiştir.[29] Fakat hayvan çalışmalarının sonucu bu genin keratokonus gelişimindeki etkisinin çok da fazla olmadığı yönündedir.[30]

Keratokonusta aday genlerden biri DOCK gen ailesinin bir üyesi olan sitokin-9 ile ilişkili DOCK9 genidir. Bu gen, hücre içi sinyal iletiminde rol alan G proteini ile ilişkili CDC42 aktivasyonunda ve GTP/GDP dönüşüm aktivasyonunda görev alır. Keratokonuslu hastalarda 13q32'deki 8 ayrı sorumlu gen bölgesi incelendiğinde DOCK9 ile ilgili bölgede 3 farklı dizinde mutasyon görülmüştür. Diğer iki mutasyon bölgeleri IPO5 (importin 5) ve STK24 (serin/treonin kinaz24) gen lokasyonlarıyla ilişkilidir.[31]

Keratokonusta bir diğer aday gen TGFβ1 genidir. TGFβ1 birçok dominant korneal distrofilardan sorumlu tutulan bir sitokindir. Doku hasarı ve tamirinde ekstrasellüler matriks oluşumunda etkili bir regülatördür. Keratokonuslu hastalarda bu gende saçma mutasyonlar (G535X) tespit edilmiştir.[32] TGFβ1 korneal fibrozis ve skar oluşumunda etkili bir sitokindir. TGFβ yolağındaki markırlarda olan artış ağır keratokonus oluşumuyla ilişkilidir.[33]

Mitokondriyal oksidatif stres; yaşa bağlı fizyolojik korneal değişiklikler, korneal epitelizasyonun gecikmesi, korneal endotel hücrelerinin azalması, descemet membranda zayıflık ve keratit, Fuchs korneal distrofi, keratokonus benzeri korneal disfonksiyonlara neden olan parankimal incelmeye gibi durumlara öncülük etmektedir[34]. Mitokondriyal şişme keratokonuslu kornealarda gösterilmiştir. Son

çalışmalarda sitotoksik yan ürünler, mitokondriyal DNA hasarı, oksidatif stres markırları (düşük pH ve/veya H₂O₂ gibi) keratokonus korneasında yüksek düzeyde bulunmuştur[35]. Ayrıca ayrıştırılarak incelenmiş keratokonuslu kornea fibroblastlarında normal fibroblastlara göre artmış mitokondriyal disfonksiyon ve mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı nedeniyle oksidatif strese karşı artmış bir duyarlılık vardır.[23] Bu durum, keratokonusun gelişimi ve progresyonunda mtDNA'nın etkili olduğunu düşündürmektedir. Mitokondriyal genom içinde mitokondriyal kompleks 1 (ND1-6) geninde 2 yeni çerçeve mutasyonu, VSX1 gen mutasyonu olmayan keratokonuslu hastalarda gösterilmiştir.[36]

20p11.2'deki SOD1 geni, süperoksit radikallerini metabolize ederek oksijen toksisitesine karşı koruyucu etki gösteren büyük bir sitoplazmik antioksidan enzimi kodlar. Genin 5' bağlantı bölgesine yakın intron2'de bulunan 7bp'lik delesyon, keratokonuslu 3 hastada tanımlanmıştır.[37] SOD1 mutasyonu daha önce amyotrofik lateral skleroz hastalarında bulunmuş bir mutasyondur.

Keratokonun patogenezi altta yatan, kollajenin yapısında, fonksiyonunda ve embriyolojik gelişim sürecinde birtakım değişikliklerin de rolü olduğuna dair hipotezler vardır. Bu hipotezler ışığında keratokonus kornealarında kollajen ile ilgili COL4A3 ve COL4A4 genlerinin mutasyon analizinde herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır. Fakat keratokonuslu hastalarda COL4A3 geninde D326Y, COL4A4 geninde ise M1237V ve F1644F allellerinin sık tekrarı görülmüştür.[38]

Keratokonun kornealarında keratosit apoptozisi artmıştır. Bu durum keratokonus gelişiminde apoptotik sürecin de rol oynadığını düşündürmektedir. Apoptozisle ilgili kornea epitelinde ekspre edilen FLG (flaggrin) gen allelinin azalmış fonksiyonu keratokonus hastalarının bazılarında tespit edilmiştir.[39]

Epitelden mezenkimal dönüşümde rol alan ve IL2 bağlanma yerinin negatif düzenleyicisi olarak görev yapan bir transkripsiyon faktörü olan ZEB1 gen mutasyonu da keratokonuslu hastalarda raporlanmıştır.[40]

Ailevi geçişli keratokonusu ve erken başlangıçlı ön polar kataraktı olan hastalarda miR184 geninin başlangıç bölgesinde mutasyon bulunmuş olması

keratokonus ve diğer göz hastalıklarında mikroRNA regülasyonunun önemli olabileceğini düşündürmektedir.[41]

GWAS (genomwide association studies) çalışmasında keratokonusta risk oluşturan sorumlu genler arasında IL1B, CDH11, NUB1, COL27A1, HGF (hepatosit growth faktör) RAB3GAP1 ve LOX genleri de suçlanmıştır. Aynı çalışmada santral kornea kalınlığı ile ilgili FOXO1 ve FNDC3B genlerinin de keratokonusta önemli bir risk faktörü olabileceği söylenmektedir.[42]

5q15 kromozomunda bulunan CAST geni kalpastatin sentezinden sorumludur. Kalpastatin kalpain inhibitörüdür. SNP geni CAST geninde lokalize bir genidir. Hem ailesel hem sporadik keratokonus ile ilişkili bulunmuştur. Diğer olası sorumlu genler arasında TIMP3 ve SPARC geni de vardır. TIMPs (metaloproteinaz doku inhibitörleri) matriks metalloproteinazlarının doğal inhibitörüdür ve ekstrasellüler matriks yenilenmesinin regülasyonunda denge sağlayıcı rol oynar. TIMP3 geninin keratokonus hastalarında farklı bir şekilde ekspre edildiği gösterilmiştir.[2]

Farklı genetik çalışma teknikleriyle yeni sorumlu genlerin tespit edilmesiyle ve bu genlerin hücresel olaylardaki fonksiyonunun daha iyi anlaşılmasıyla, keratokonus patogenezi daha net bilinip daha iyi tedavi şekilleri geliştirilebilir. Bu yüzden keratokonusun patogenezi ve özellikle genetiğini bilmek oldukça önemlidir.

Klinik Özellikler ve Bulgular

Keratokonus sıklıkla 13 ile 20'li yaşların başında görülen bir hastalıktır. Hastalık adölesan yaşlardan 30'lu yaşlara kadar ilerleme gösterme eğilimindedir fakat ilerleme herhangi bir dönemde de görülebilir. Hastalar genelde bulanık veya dağınık görme, refraktif değişkenlikten dolayı sık gözlük camı değiştirme şikayetiyle başvururlar. Ayrıca fotofobi, ilerleyici görme bozukluğu, kamaşma, monoküler diplopi ve oküler irritasyon diğer olası semptomlardandır. Hemen tüm olgular bilateraldir ve bir göz diğerinden daha fazla etkilenmiştir.[3, 43]

Santral ve parasantral korneal incelme, korneada progresif dikleşme ve protrüzyona sebep olmakta ve bu da önce regüler daha sonra irregüler astigmatizma

ile sonuçlanmaktadır. Bazı hastalarda az etkilenen gözde yalnızca yüksek astigmatizma bulunur ve bu da hastalığın ilk belirtisi olabilir.[43, 44]

Retinoskopide kırmızı refle kırılması görülür. Keratokonusun çok erken bulgularındandır.

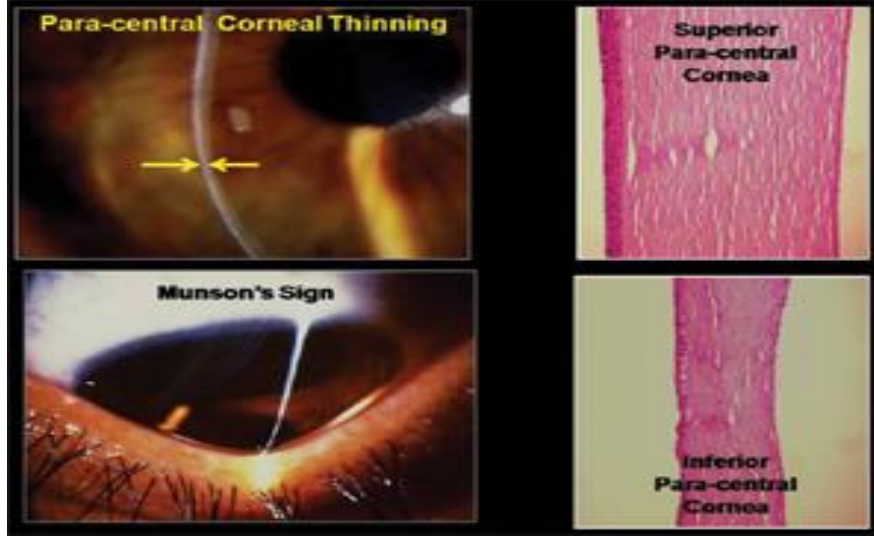
Yağ damlası reflesi keratokonus için anlamlı bulgulardandır.

Rizutti işareti, temporalden yansıtılan ışık altında nazal korneada konik refletin alınmasıdır.



Şekil 2: Rizutti işareti

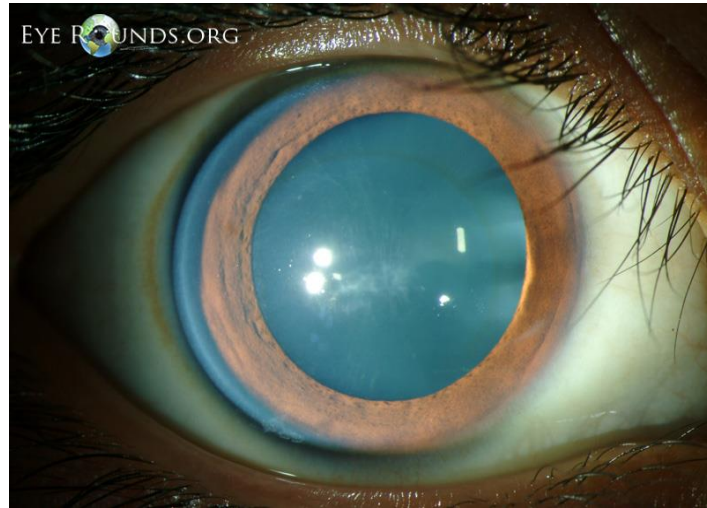
Munson işareti, hasta aşağı doğru bakarken alt göz kapağının kabarık görülmesidir.



Şekil 3: Parasantral korneal incelme ve Munson işareti

Munson işareti ve Rizutti işareti ileri keratokonus bulgularıdır.

Epitelyal demir (homosiderin) depozitleri koninin tabanını çevreleyerek Fleischer halkasını oluşturur. Bu halka kahverengidir. Kobalt mavisi filtrede, oblik ve geniş ışıkta en iyi görülür.



Şekil 4: Fleischer halkası

Arka stromada ince, relüsen ve düzensiz çizgilenmelere Vogt striaları denir. Globa basınç uygulanmasıyla kaybolur.



Şekil 5: Vogt stria

Yarık lamba muayenesi ile açığa çıkan korneal sinirler görülebilir.

Spontan perforasyon nadirdir. Descemet membranda yırtılma her zaman olabilir ve akut hidrops denen korneada ani gelişen ödeme neden olabilir. Allerji ve göz ovuşturma hidrops için risk faktörüdür. Korneal beyazlaşma ile birlikte görme ani düşer. Arka korneadaki çatlak genelde kendiliğinden 6-12 haftada kapanır. Korneal ödem kaybolur fakat stromal skar kalıcı olabilir. Bazı hastaların görmesi, gelişen skarın boyutuna ve lokalizasyonuna göre hidropsun gerilemesiyle artar.[3, 45]



Şekil 6: Regrese olmuş korneal hidrops

Bowman tabakasındaki fokal yırtılmalara sekonder subepitelyal ve ön stromal skarlar olabilir.



Şekil 7: Korneal stromal skar

Keratokonus klinikte bazı hastalıklar ve durumlarla birlikte görülebilir. Bunlar arasında Down sendromu, Turner sendromu, Marfan sendromu, Leber'in doğumsal körlüğü, atopik hastalıklar (vernal konjonktivit, bronşiyal astım, atopik dermatit), bağ dokusu hastalıkları (Ehler-Danlos sendromu, kollajen doku hastalıkları), göz küresine direkt bası (sarkık kapak sendromu, kontakt lens kullanımı, sık göz kaşıma), mitral kapak prolapsusu, osteogenezis imperfekta, mental retardasyon, mavi sklera, aniridi, ektopia lentis, retinitis pigmentosa sayılabilir.[1, 46]

Korneal Görüntüleme

Otorefraktometri ve keratometri ölçümleri ile dik bir kornea, yüksek astigmatizma, deforme olmuş bir kornea tespit edilebilir. Düzensiz miyopik astigmatizma, +48D'den büyük keratometrik değer en belirgin saptanabilecek bulgulardır. Bu yüzden otorefraktometri ve keratometri basit, ucuz bir başlangıç ölçüm olarak keratokonus tanısında yer almaktadır.

Bilgisayarlı videokeratografi, keratokonus tanısında ilk olarak 1980'lerde kullanıma girmiştir. İlk sistemler plasi disk görüntü analizi ile ön korneal eğrilik ölçümlerinden oluşan haritalar içermektedir. Keratokonusta plasi tabanlı topografide düzensiz halkalar, alt kadranda dikleşme, pakimetri haritasında parasantral incelleme görülür.[47]

Daha sonra keratokonus ile normal gözlerin ve diğer hastalıkların ayırılması amacıyla çeşitli indeksler geliştirilmiştir. [örn:KISA (keratometrik değer, inferior dikleşme, superior dikleşme, astigmatizma) indeks].[48]

Refraktif cerrahinin 1990'larda ortaya çıkmasıyla iyatrojenik ektazi ve keratokonus vakaları artmıştır. Bununla beraber subklinik keratokonusun erken tanınması amacıyla yeni tanı testleri geliştirilmiştir. Orbscan (Bausch and Lomb, Rochester, NY, USA), yarı kırık lamba tarama teknolojisi kullanılarak üretilmiş keratometrik haritaya ek olarak geniş alanda pakimetrik ölçümleri, ön ve arka elevasyon ölçümleri içeren bir tarama cihazı olarak geliştirilmiştir.[49]

Scheimpflug prensibi kullanılarak Pentacam (Oculus, Wetzlar, Germany) cihazı geliştirilmiştir. Bu cihaz korneayı üç boyutlu olarak haritalandırma imkanı sunmaktadır. Bu üç boyutlu haritalar ön ve arka korneal yüzey ölçümlerini, pakimetrik ölçümleri, ön kamara açısı ölçümlerini içerir. Pentacam'ın en dikkat çekici özelliği ise Belin/Ambrosio geliştirilmiş ektazi göstergesidir. Bu gösterge küçük elevasyonları daha belirgin bir şekilde göstererek subklinik keratokonusu daha erken tanıma imkanı sunmaktadır.[50]

Korneal topografi ile subklinik keratokonus tespit edilebilir. Konus şekli, büyüklüğü, lokalizasyonu belirlenerek sınıflama yapılabilir. Progresyon takibi yapılabilir. Kontakt lens seçimi için gerekli bilgiler sunar. Crosslinking, keratoplasti, intrakorneal halka tedavisi kararında yol göstericidir.

Son gelişmeler, Ocular Response Analyzer (Reichert Inc, Depew, NY, USA) cihazı aracılığıyla aberasyon profilleri oluşturarak keratokonusta korneal biyomekaniği anlama üzerine odaklanmıştır. Bu yöntemle korneal histeri ve korneal direnç faktör kavramları bulunmuştur. Yapılan çalışmalar kırılabilir korneaların güçlü kornealara oranla ektaziye daha hassas olduğunu göstermiştir. Keratokonuslu

gözlerde, normal gözlere göre çok daha yüksek oranda aberasyon uyarısı (korneal histeri) ve düşük korneal direnç faktörleri saptanmıştır.[51, 52]

Keratokonuslu gözlerde ön ve arka ortalama keratometrik değerlerin ve arka yüzey asferitesinin anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu yüzden keratokonus tanısında ortalama keratometrik değerler yanında arka keratometri ve asferitesi de dikkate alınmalıdır.[53]

Farklı cihazlarla keratokonus ve sağlıklı gözlerde yapılan ölçümler değerlendirildiğinde; keratokonuslu sağlıklı gözlere göre farklı olan en duyarlı parametreler ön kamara derinliği ve korneal histeri değerleri, en az duyarlı parametre korneal volüm olarak bulunmuştur. En spesifik parametre korneal astigmatizma, en az spesifik parametreler ise ön kamara derinliği ve ortalama keratometrik değer olarak bulunmuştur.[54]

Sınıflama

Keratometrik Sınıflama:[55]

Hafif: Ortalama K değeri < 47D

Orta: Ortalama K değeri 47 – 52D

Ağır: Ortalama K değeri >52D

Korneanın Koni Şekline Göre Sınıflama:

Yuvarlak Tip: 5mm'den küçük merkezi veya perifer yerleşimli kon

Oval Tip: 5-6mm boyutunda, oval şekilli kon

Globus (geniş) Tip: 6mm'den büyük kon. Korneanın ¾'ünü kapsar.

Amsler-Krumeich Sınıflaması:

Evre 1:

5 D'den az astigmatizma ve/veya miyopi

Ekzantrik dikleşme

48D'den düşük ortalama K değeri

Evre 2:

5 – 8D arası astigmatizma ve/veya miyopi

48 – 53D arası ortalama K değeri

Korneal skar dokusunun olmaması

En ince kornea kalınlığı 400µm'den fazla

Evre 3:

8 – 10D arası astigmatizma ve/veya miyopi

53D üzeri ortalama K değeri

Korneal skar dokusunun olmaması

En ince kornea kalınlığı 300 - 400µm arası

Evre 4:

Refraksiyon alınamıyor

55D üzeri ortalama K değeri

Santral korneda skar dokusu

En ince kornea kalınlığı 200µm

Klinik - Videokeratografik Sınıflama[56]

1-) Keratokonus; yarık lamba mikroskopide stromal incelmenin yanısıra bir veya daha fazla Vogt stria, Fleischer halkası, Munson işareti, yağ damlası işareti, retinoskopide makaslama refleksi gibi klinik bulguların eşlik etmesidir. Ayrıca topografide radyal aksta kaymayla birlikte olan tipik asimetrik papyon paternin olmasıdır.

2-) Erken keratokonus; yarık lamba mikroskobide keratokonus bulgusu yoktur. Dilate pupilden retinoskopi ile makaslama refleksi görülür. Tipik topografik bulgu (radyal aksta kaymayla birlikte olan asimetrik papyon paterni) eşlik eder.

3-) Keratokonus şüphesi; yarık lamba mikroskopi ve retinoskopi bulgusu yoktur. Sadece tipik topografi bulgusu (radyal aksta kaymayla birlikte olan asimetrik papyon paterni) vardır.

Tanı

Keratokonusun erken tanısı santral ve parasantral kornea konturlarının belirlenmesi ile konur. Hastalığın ilk belirtisi alt korneanın dikleşmesidir. En önemli klinik özelliği ise irregüler astigmatizmadır. Korneanın belirli bir bölgesindeki progresif dikleşme korneanın alt ve üst bölgeleri arasında asimetriye, yüksek sıralı aberasyonlara ve görme kalitesinde azalmaya yol açar. Tanıda keratometrik ölçümler yetersizdir. Hasta yukarı baktırılarak alınan ölçümlerde alt korneal dikleşme saptanabilir. Plasio diskle topografik bilgiler elde edilebilir. Fakat tanıda en değerli yöntem bilgisayarlı korneal topografidir. Kırmızı ve mavi arasında değişen renk haritalarıyla keratokonustaki topografik değişiklikler tespit edilebilir. Korneal skarlar, geçirilmiş refraktif cerrahi, kontakt lens kullanımı keratokonus ile benzer görünümlere sebep olabilir. Posterior korneal aberasyon değerleri, erken dönem ektazi saptanmasında ve bu ektazinin diğer şüpheli durumlardan ayırılmasında önemli bir parametredir. Çünkü keratokonusta kornea arka yüzey aberasyonları ön yüzey aberasyonlarından daha yüksektir. Subklinik keratokonusun tespit edilmesi özellikle refraktif cerrahi öncesi önemlidir. Çünkü bu durumda refraktif cerrahi sonrası ektazi riski yüksektir. Subklinik keratokonusun en erken bulgusu posterior elevasyondur. Kon bölgesinde ölçülen pakimetrik değerlerde, korneal incelmanin saptanması da tanıda önemli yere sahiptir.[57]

Ayırıcı Tanı

Pellucid Marjinal Dejenerasyon

Alt periferik korneada incelmeye ve korneanın incelme bölgesindeki bant üzerinden öne doğru büyüyerek dikleşmesi ile karakterize, korneanın saydam olduğu, nadir, progresif ve idiyopatik bir korneal dejenerasyondur. Bilateral olup ailesel geçiş göstermeyen bir hastalıktır. Etiyolojisi bilinmemektedir. Görme sıklıkla kurala uygun olmayan astigmatizma nedeniyle bazen de akut hidrops atakları ve perforasyon nedeniyle azalır. Bazen keratokonustan ayırdedilmesi mümkün olmayabilir. Keratokonusta dikleşme tam olarak maksimum incelmeye noktasından olurken pellucid marjinal dejenerasyonda alt ya da üst kadranda maksimum incelmeye noktasının üzerindeki bölgeden olur. Damarlanma ve lipid birikimi olmaz fakat arka stromada incelmeye bölgesinde skar gelişimi görülebilir. Genellikle 20-40 yaş arası tanı alırlar ve kadın-erkek tutulumu eşittir.[43, 57]

Genellikle gözlük ve kontakt lens ile tedavi edilebilir ve erken dönemde asıl tedavidir. Fakat kontakt lensin göze uyumu keratokonusa göre daha azdır. Hibrid (gaz geçirgen ve yumuşak lensler) veya skleral lensler alternatif olarak kullanılabilir. Bazen keratoplasti de gerekebilir. Keratoplastide incelmeye noktasının lokalizasyonu nedeniyle, greft geniş ve limbusa yakın olmalıdır. Bu durum cerrahiyi zorlaştırır ve aynı zamanda red olasılığını artırır. Kama şeklinde rezeksiyon ve lameller yapısal greftler alternatif ve yardımcı prosedürlerdir.[57, 58]

Keratoglobus

Tüm korneanın anormal olarak ince olduğu, son derece nadir görülen, konjenital, bilateral korneal ektazidir. Keratokonus ile genetik bağlantısı olduğu düşünülmektedir. Leber'in konjenital amorozisi, mavi sklera, eklemlerde aşırı bükülebilirlik, sensörinöral sağırılık, kırıklar ile birliktelik gösterebilir. Konjenital glokomda kornea ödemi varlığı, megalokorneada ise korneal incelmeye noktasının olmaması ayırıcı tanıda önemlidir.[43, 57]

Korneal ektazi keratokonusun aksine konikten çok globülerdir. Başlangıcı doğuştandır. Korneal incelmeye protrüzyonun tepe noktasında değil yaygındır. Korneal topografide yaygın dikleşme görülse de periferik korneada daha belirgindir. Kornea saydam ve normal çaptadır. Ön kamara çok derinleşmiştir. Skleral incelmeye de bildirilmiştir. Fleischer halkası, stres çizgileri ve ön skarlaşma görülmez. Akut

hidrops atakları keratokonustan daha seyrektr. Kornea minimal bir travmayla bile rüptüre olma eğilimindedir.[13, 43]

Keratoglobusta gözlük tashihi iyi bir görme sağlar ve travmalara karşı koruyucu etkisi vardır. Kontakt lensler ve özellikle skleral lensler faydalı olabilir. Fakat takılıp çıkarılması sırasında travma riskini artırır. Epikeratofaki veya lameller keratoplasti tedavide düşünülebilir. Penetran keratoplasti için prognoz diğer ektazilere göre daha düşüktür.[43, 57]

İyatrogenik Ektazi

Refraktif cerrahi sonrası korneanın progresif olarak öne doğru dikleşmesi ve incilmesi sonucu, miyopi ve/veya astigmatizmada artış olması ve tashihle görme keskinliğinde azalma ile karakterize bir durumdur. Genellikle refraktif cerrahi öncesi varolup tanınamayan keratokonus veya ablasyon sonrası rezidüel stroma kalınlığının 250 mikrondan daha az bırakılması nedeniyle oluşur. Refraktif cerrahi öncesi iyi bir topografik inceleme ve cerrahi sırasında pakimetrik ölçümlerle rezidüel kornea kalınlığının hesaplanmasıyla oluşumu engellenebilir.[57]

Tedavide sert gaz geçirgen kontakt lens görme keskinliğini arttırmada kullanılabilir. Kornea içi halkalar, ultraviyole kollajen çapraz bağlama (UV Cross-linking) ve derin anterior lameller keratoplasti diğer tedavi alternatifleridir.[57]

Yalancı Keratokonus

Sert kontakt lens kullanıp lensi korneaya tam santralize olmamış ve genellikle üste doğru santralize olmuş hastalarda görülebilen bir durumdur. Kontakt lensin korneayla temas ettiği bölgeler daha düz, boşta kalan bölgelerin ise daha dik olarak görülmesiyle, topografik olarak keratokonus izlenimi verebilmektedir. Korneal incelme ve diğer keratokonus bulguları eşlik etmez.[59]

Tedavi

Refraktif Düzeltme

Erken evre keratokonusta genellikle refraktif kusurlar gözlükle yeterince düzeltilerek daha iyi bir görme sağlanabilir. Fakat hastalık ilerledikçe kornea yüzeyi bozularak düzensiz astigmatizma olduğundan gözlük yetersiz kalır ve görme kalitesi düşer. Bu durumda kontakt lensler kullanılabilir. Kullanım konforu ve mali uygunluğu açısından öncelikle yumuşak kontakt lensler tercih edilir. Fakat daha sonraki aşamalarda yumuşak kontakt lens ile de yeterli görme kalitesi sağlanamaz ve keratokonusta en sık kullanılan kontakt lens olan sert gaz geçirgen kontakt lenslere ihtiyaç duyulur. Sert gaz geçirgen kontakt lensler kornea şekil bozukluğunu düzelterek daha yüksek astigmatizmada iyi refraktif düzeltme ve iyi bir görme kalitesi sağlayabilirler. İyi bir gözyaşı geçişi sağlasa da kullanımı zor, konforu azdır. Orta düzey keratokonusta intralimbal sert gaz geçirgen lensler ve miniskleral lensler kullanılabilir. Büyük, desantralize konlar içeren daha ileri keratokonusta, kuru göz hastalarında ve diğer lensleri tolere edemeyen hastalarda skleral lensler kullanılarak refraktif düzeltme sağlanabilir. Piggyback (üstüste lens uygulama) ve hibrid lensler de keratokonusta kullanılacak diğer lens seçeneklerindedir.[3, 60]

Torik veya sferik intraoküler lens yerleştirilmesi, iris destekli veya iris tutturmalı intraoküler lens yerleştirilmesi refraktif düzeltme amacıyla uygulanabilen diğer cerrahi alternatiflerdir.

Katarakt cerrahisi uygulanacak keratokonus hastalarında intraoküler lens (İOL) ölçümü ve doğru astigmatik düzeltme sağlamak güçtür. SRK-II formülü hafif keratokonusta doğru İOL ölçümü için uygun bir formül olarak bulunmuştur. Fakat orta ve ağır keratokonusta tüm formüller uygun ölçüm için yetersiz kalmaktadır. Ayrıca keratometrik ve aksiyel değerler için biyometrik ölçümlerle beraber topografik ölçümler de yapılmalıdır. Keratokonuslu hastalarda torik İOL'ler tercih edilebilir.[3, 61]

Korneal ektazide ekzimer lazer kontraendikedir. Fakat fotorefraktif keratektomi keratokonusta refraktif düzeltme amacıyla kullanılan bir cerrahidir.[62]

Keratokonusta; kollajen crosslinking, fotorefraktif keratektomi ve intrakorneal halka segment tedavileri farklı kombinasyonlar şeklinde birlikte de uygulanabilmektedir.[63]

Korneal Kollajen Çapraz Bağlanma (Kollajen Crosslinking)

Keratokonusun patogenezi daha iyi anlaşılmasıyla keratokonusta, kornea biyolojik yapısının modifiye edilmesi yönünde tedavi şekilleri geliştirilmiştir. Keratokonusun progresyonunu durdurduğu gösterilmiş kollajen çapraz bağlanma tedavisi bu mantıkla geliştirilmiş bir tedavi yöntemidir.[64] Korneanın stabilize olması ve dikleşmenin azaltılması sağlanır. Refraktif kusur üzerine etkisi azdır. Keratometrik değerlerdeki değişikliklerle de direk bir ilişkisi yoktur.[65]

Crosslinking uygulamasının birkaç aşaması vardır. Öncelikle epitelyal debridman yapılır. Sonrasında %0.1'lik riboflavin solüsyonu 30 dakika boyunca kornea üzerine damlatılır. Bu şekilde korneanın fotosensite olması sağlanır. Işığa duyarlı hale gelen korneaya ultraviyole A uygulanarak serbest radikal oluşumu sağlanır. Oluşan serbest radikaller korneal kollajen lifler arasında çapraz bağlar oluşumunu tetikler. Böylece korneanın gücü artırılarak korneanın dikleşmesinin yavaşlaması amaçlanır. Korneal bulanıklık, enfeksiyon, endotel hasarı, persistan korneal ödem, korneal dekompanasyon, lens opasitesi, retinal hasar gibi komplikasyonlar gelişebilir. [66, 67]

İntrakorneal Halka Segment

Korneayı düzleştirerek miyopik düzeltme sağlamak ve daha da önemlisi kontakt lens toleransını arttırmak amacıyla kornea içerisine yerleştirilen halka segmentlerdir. Progresif olmayan keratokonusta, santral korneal skar olmaması ve minimum pakimetrik değer 450 mikron olması durumunda uygulanabilir. Kontrolsüz otoimmün, kollajen, immün sistem hastalık varlığında; hamilelik ve emzirme durumunda kontraendikedir.[3, 57]

Halka segmentler polimetilmetakrilat ve akrilik polimer yapıda olabilir. Halkalar korneal stromaya derin bir şekilde yerleştirilir. Yerleştirilmek üzere açılacak korneal tüneller manuel, vakum emme sistemi ve femtosaniye lazer ile açılabilir. Yerleştirilen halkalar ön kurvatur arkını kısaltarak korneada ortalama 2-3D kadar düzleşme sağlar. Sonuç olarak görme keskinliğinde ve kontakt lens toleransında artış görülür. Düzleştirici etki kullanılan halka segmentin kalınlığına bağlıdır. Bu segmentlerden biri Intacs'tır. Periferal korneanın 2/3 ön kısmına

yerleştirilir. Ferrera ya da Keraring ise diğer kullanılan halka segmentlerden olup korneanın orta-derin kısmına yerleştirilmek üzere tasarlanmıştır. Steril ya da enfeksiyöz keratit, korneal incelme, segmentin yer değiştirmesi, neovaskülarizasyon, fotofobi, kuru göz halka segment yerleştirilmesinin olası komplikasyonlarıdır. Gerek görüldüğünde halkanın tekrar çıkarılabilme avantajı vardır.[57, 68]

Keratoplasti

Keratokonusta keratoplasti bazı durumlarda başvurulması gereken bir tedavidir. Kontakt lense rağmen düşük görme düzeyi, kontakt lens intoleransı, kontakt lens takma sorunu, düzeltilemeyen korneal hidrops gibi durumlar keratoplastiye başvurulabilecek durumlardandır. Geniş çaplı prospektif çok merkezli bir çalışmada 8 yıllık takip süresinde keratokonus hastalarının %12'si keratoplastiye gitmiştir. Keratoplasti için genç yaş, daha yüksek keratometrik değer, düşük görme düzeyi, korneal skar, kontakt lens konforsuzluğu, düşük görme düzeyine bağlı yaşam kalitesinde düşme daha riskli durumlar olarak gösterilmiştir.[3, 69] Düşük komplikasyon oranıyla birlikte görsel ve refraktif sonuçlar açısından penetran keratoplasti başarılı bir yöntemdir.[70]

Mikrokeratom yardımıyla yapılan lameller keratoplasti, keratokonusta başvurulması gereken bir diğer cerrahi prosedürdür. Bu yöntem penetran keratoplastiyle benzer sonuçlar gösterirken endotelyal red olmaması yöntemin önemli bir üstünlüğüdür.[71]

Son yıllarda derin anterior lameller keratoplasti, penetran keratoplastiye önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu prosedürde kornea tam kat olarak transplante edilmez. Descemet membrana kadar epitel ve stroma uzaklaştırılır fakat hastanın kendi endoteli korunur. Donörden descemet membran ile birlikte alınan epitel ve stromal doku penetran keratoplasti gibi alıcı dokuya suture edilir. Derin anterior lameller keratoplasti ekstraoküler bir cerrahidir ve alıcının endoteli tamamen korunmuştur. Greft reddi riski düştüğünden, greft ömrü daha fazladır. Muhtemel komplikasyonları; intraoperatif descemet membran perforasyonu ve bunun sonucunda penetran keratoplastiye dönüş, postoperatif descemet membranda ayrılma, ara bölgede bulanıklık gelişmesi sayılabilir.[72, 73]

DNA HASARI VE COMET ASSAY ANALİZİ

DNA Hasarı

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması oldukça önemlidir. DNA'nın fonksiyonu yapısındaki bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık 10^4 adet kodlanamayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir. DNA üzerinde meydana gelen hasarları onaran spesifik onarım sistemleri vardır. DNA onarım kapasitesini aşan düzeyde hasar oluştuğunda veya DNA onarım sistemleri kalıtsal veya edinsel olarak defektif ise DNA hasarı kısa sürede replikasyonun durmasına, transkripsiyon ve protein sentezinin durmasına, proteolitik aktivitenin uyarılmasına, uzun vadede ise mutasyon ve kromozom anomalilerine neden olur.[74, 75] DNA hasarı düşük düzeyde ise onarılır. Ağır düzeyde ise apoptotik süreç başlayarak hücre ölümü gerçekleşir. Orta düzeyde hasarlar ise çoğunlukla mutasyon ile sonuçlanır.

DNA hasarı kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşabilir. En önemli nedeni baz kaybıdır ve bunun sonucunda kayıp olan bölgelerde hem replikasyon etkilenir hem de kolay zincir kırıkları oluşur.

Fiziksel ve kimyasal ajanlar DNA hasarına sebep olabilirler. Fiziksel etkenlerin başında iyonizan radyasyon gelir. Hem radyasyon enerjisinin direk etkisi ile hem de radyasyonla açığa çıkan enerjiyle oluşan hidroksil radikalleri gibi moleküllerin DNA ile etkileşimi sonucu DNA kırıkları oluşabilmektedir. Başka bir fiziksel etken UV ışınlarıdır. UV ışınları çapraz bağlanmalara, primidin dimerleri oluşumuna ve zincir kırıklarına yol açabilmektedir. Kimyasal ajanlar içerisinde alkilleyici maddeler, nitroz asit, platinum türevleri gibi çapraz bağlayıcılar ve sitokrom P450 sistemi ile metabolize edilen ksenobiyotikler (aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aflatoksinler, fenitoin, warfarin, rifampin vb.) sayılabilir. Bu maddeler de bazıları alkilleyerek, oksitleyerek, çapraz bağlar oluşturarak veya DNA kırıkları yaparak DNA hasarı oluştururlar.

Oksidatif DNA hasarı endojen olarak bazı tepkimeler sonucu oluşan oksijen radikallerince veya iyonizan radyasyon ve çeşitli kimyasallarca ekzojen olarak

oluşabilir. Serbest oksijen radikalleri ve nitrojen radikalleri dış yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron bulundurması nedeniyle DNA ile kolayca etkileşerek oksidatif baz modifikasyonu ve DNA zincir kırıkları oluşturabilirler.

Comet Assay

Tarihçe

Comet assay, hücrelerde DNA hasarını belirlemek için kullanılan, tek hücre jel elektroforezi olarak bilinen, hızlı, oldukça duyarlı, kantitatif bir tekniktir. Spesifik hücrelerde DNA hasarı ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından, lam üzerinde agaroz jel içine gömülü hücrelerin hafif alkali ortamda membranlarının parçalanması sonucu DNA sarmallarının kısmi açılması sağlanarak belirlenmiştir.

Tek hücre jel elektroforezi ilk defa 1984 yılında Ostling ve Johanson isimli iki İsveç’li bilim adamı tarafından geliştirilmiştir. Bu teknikte mikroskop lamı üzerine agaroz jel içine gömülü hücreler yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilerek membranları parçalanır. Nötr pH’ta kısa süreli elektroforez uygulanarak yüksek oranda zincir kırığı içeren DNA’nın sağlam DNA’ya göre daha hızlı anoda hareket etmesi sağlanır. DNA göçünün miktarı, etidyum bromür boyası ve floresans yoğunluğunun mikroskopta ölçülmesiyle belirlenir. Fakat nötr pH’da çift sarmallı DNA hasarı tespit edilip tek sarmallı DNA tespit edilemediğinden bu yöntemin kullanımı kısıtlanmıştır.[76]

1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali (pH>13) ortamda uygulayarak bu sorunu aşmıştır.[77] Günümüzde comet assay, Singh ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu tekniği kullanarak yapılmaktadır. Görüntü analizleriyle, hücre nükleusundan göç eden DNA kırıklarının oluşturduğu kuyruklu yıldız görünümünün incelenmesi ve bu görüntü üzerinde bazı ölçümlerin yapılması esasına dayanır. En sık olarak da alkali comet assay versiyonu kullanılır. Comet assay DNA hasarı ölçümünün yanı sıra hücresel DNA tamir kapasitesi hakkında da bilgi verir. DNA tamiri bozulmuş veya genetik olarak DNA hasarı tetiklenmiş hücreleri görme ve hasar oranını belirleme olanağı sunar.[78, 79] Son yıllarda comet

assay, belirli DNA dizilerine spesifik işaretli problar kullanılarak floresan in situ hibridizasyon tekniği ile birleştirilmiştir. FISH comet olarak adlandırılan bu teknikte dizi veya gen spesifik hasar tespit edilebilmektedir.[80]

Klinik Araştırma ve Comet Assay

Comet assay'in klinik araştırmalarda kullanılması, çeşitli hastalıkların patojenik mekanizmalarının anlaşılmasına önemli katkı sağlamıştır. Bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, kansere duyarlılığın belirlenmesinde, kanser tedavisinin takibinde kullanılabilir. Diyabetes mellitus, katarakt, glokom, bazı kornea hastalıkları, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, polikistik over sendromu ve Alzheimer gibi hastalıklarda artmış DNA hasarı comet assay ile gösterilmiştir. Postmenopozal kadınlarda hormon replasman tedavisinin, tiryakilerde sigaranın DNA üzerine etkileri incelenmiştir. Reprodüktif tedavide erkek infertilitesi mevcut olgularda sperm DNA bütünlüğü yine bu yöntemle test edilmiştir.

Comet Assay Analizi

Hücre içerisinde çevresel faktörlerin etkisiyle ve normal metabolik süreç içerisinde DNA hasarı oluşabilmektedir. Kritik genlerdeki tamir edilemeyen hasarlar hücrenin kendi fonksiyonlarını yürütememesine sebep olmakta ve bu da kanser gibi hastalıkların olasılığında artışa sebep olmaktadır.[81]

Comet assay veya tek hücre jel elektroforez yöntemi hücrede DNA hasar ölçümünde sıkça kullanılan bir tekniktir. Elektroforetik bir alanda hasarlı DNA fragmanları ve DNA kırıklarının sağlam DNA'dan ayrılması esasına dayanır. Mikroskop altındaki klasik görüntüsü kuyruklu yıldız şeklindedir. Bu kuyruklu yıldız görüntüsünde, görüntü analiz programlarıyla yapılan bazı ölçümler sonrası çeşitli ölçüm ve oranlar belirlenir. Oxi-Select Comet Assay, çalışmamızda da kullandığımız hücresel DNA hasarı ölçümünde kullanılan hızlı ve duyarlı bir kitledir.[81]

Ölçüm Sonuçlarını Değerlendirme

Nükleustaki sağlam genetik materyal kuyruklu yıldızın baş kısmını, yer değiştiren hasarlı genetik materyal ise kuyruk kısmını oluşturur. Bu iki bölge arasında değişik ölçümlerle DNA hasarı sayısal olarak ifade edilir. Kuyruk Momenti

ve Kuyruk DNA yüzdesi bu analiz sonuçlarından en sık kullanılanlarıdır. Kuyruk Momenti göç eden genetik materyal ve bunla ilişkili kuyruktaki DNA miktarı göz önünde tutularak indüklenmiş DNA hasarı için uygun bir indeks olarak değerlendirilmektedir.[81]

Comet Analizinde DNA Hasar Seviyesini Etkileyen Faktörler

Sağlıklı ve tedavi almayan kişilerde DNA hasarını etkileyen faktörler yaş, hava kirliliği, sigara, egzersiz, diyet, cinsiyet, güneş ışığı, enfeksiyon, mevsim ve meslek olarak sayılabilir.[82]

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Polikliniği'ne Nisan-Kasım 2014 tarihleri arasında başvuran hastalardan çalışmamızın hasta grubuna, topografik olarak keratokonus kesin tanısı almış 44 hasta ve kontrol grubuna, sağlıklı gönüllü 41 kişi dahil edilmiştir. Çalışmamız, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak yürütülmüştür. Çalışmamızdaki hasta ve gönüllülerin Uluslararası Helsinki Deklarasyonu'na uygun bir şekilde onamı alınmıştır.

Polikliniğimize başvuran hastalardan keratokonus şüphesi olan hastalara, Snellen eşeli kullanılarak görme muayenesi, otorefraktometre ile refraktif ve keratometrik değerlendirme, havalı tonometre ile göz içi basınç ölçümleri yapıldı. Her hastanın isim, yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, meslek, sistemik hastalık öyküsü, göz travma öyküsü, göze ilaç kullanım durumu, geçirilmiş göz cerrahisi öyküsü, kısa anamnez bilgisi, ışık kaynağı ile bakılan ışık refleksleri yazılı kayıt altına alındı.

Çalışmamızda tüm hastalara; klinik, otorefraktif ve keratometrik şüphe sonrası kesin tanı koymak amacıyla Pentacam topografik ölçümü yapıldı. Gözlüğe rağmen az görme, giderek ilerleyen gözlük numarası, bulanık görme gibi keratokonus şüphesi uyandıran, yaş itibarıyla uyumlu olan ve astigmatizması olup keratometrik değerleri yüksek olan hastalarımızdan Pentacam bulgularıyla da desteklediğimiz hastalarımız keratokonus tanısı aldı.

Hasta ve gönüllü grubundan alınan onam sonrası her hasta ve gönüllüden 5cc'lik steril tek kullanımlık enjektörler kullanılarak ortalama 3-4cc, 2 ayrı EDTA içeren hemogram tüpüne ayrıştırılmak üzere kan alındı. Alınan kan örnekleri doğru analiz amacıyla hiç bekletilmeden uygun lenfosit izolasyonu ve sonrasında comet assay analizi yapılmak üzere Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Bölümü Laboratuvarı'na iletildi. Bu bölümdeki yetkili kişilerce analiz yapılmak üzere kan örnekleri işleme alındı.

ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

Hasta

Topografik olarak keratokonus kesin tanısı alma

15-55 arası yaş

Başka göz hastalığı olmaması

Onam alınması

Kontrol

15-55 arası yaş

Topografik olarak keratokonus ve diğer korneal ektazilerin olmaması

≤2 D refraktif kusur dışında herhangi bir göz hastalığı olmaması

Diyabetes mellitus, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, serebrovasküler hastalık, malignite gibi sistemik hastalıkların olmaması

Onam alınması

DIŞLANMA KRİTERLERİ

Hasta

Keratokonus şüphesi ve subklinik keratokonus

Yoğun radyasyon, ultraviyole, kimyasal oksidatif etkenlere maruz kalma riski yüksek meslek grupları (radyoloji teknisyenleri gibi)

Kontrol

Yoğun radyasyon, ultraviyole, kimyasal oksidatif etkenlere maruz kalma riski yüksek meslek grupları (radyoloji teknisyenleri gibi)

Keratokonus, keratokonus şüphesi, erken keratokonus ve subklinik keratokonus

COMET ASSAY PROTOKOLÜ

Temel Metodoloji

Basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipi ve farklı DNA hasar çeşitlerine uygulanabilmesi, radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde comet assay sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülü hücrelere, zarlarının parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemi uygulanır. Lizis işlemi sırasında serbestleşen DNA, ışığa karşı hassas olduğundan bu aşamadan sonra ilave kırık oluşumunu tetiklememek için işlemler karanlık odada veya gece lambası altında yapılır. Alkali ortamda süperkoil yapı gevşeyerek açılır ve kırıkların ortaya çıkması sağlanır. Daha sonra elektroforez yardımıyla kırılmış DNA zincirleri anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Lamın kenar bölümünde yer alan DNA'ların daha yüksek oranda hasarlı olduğu bilindiğinden, comet sayımı lamın orta bölümü dikkate alınarak aynı kişi tarafından yapılır.[83, 84]

Basamaklar

Hücresel Materyal Hazırlanması

Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri (polimorf lökositler, mononükleer hücre fraksiyonları), primer insan fibroblastları, doku örnekleri materyal olarak kullanılabilir ve herbirinin hazırlanması spesifiktir. Tam kan örneklerinde DNA hasar çalışmasında heparinize kan kültür ortamına alınır, düşük erime sıcaklığı olan agaroz ile karıştırılarak kullanılır. Lenfosit ve mononükleer hücrelerde (çalışmamızda lenfosit kullanılmıştır) çalışılırken hücre fraksiyonları histopak ile izole edildikten sonra kullanılır. Fibroblast ve çeşitli doku örneklerinde ise tripsin-EDTA ile muamele edilerek önce proteinler uzaklaştırılır. Bu ön işlemlerle serbestleşen hücreler daha önce agaroz jel ile kaplanmış ve numaralandırılmış lamlar üzerine uygulanır.[83]

Mikroskop Lamının Hazırlanması

Bu işlem sırasında en önemli hedef tüm işlemler tamamlanıncaya kadar jelin bozulmadan kalıp mikroskopik inceleme sırasında temiz ve net bir görüntünün sağlanabilmesidir. Deneyden bir gün önce normal erime sıcaklığındaki agaroz jel mikroskop lamına boydan boya yayılarak ön kaplama yapılır ve bu kaplama bir gece kurumak üzere bekletilir. Ertesi gün düşük erime sıcaklığındaki ikinci bir agaroz jel içinde süspanse edilmiş hücreler ön kaplama yapılmış lam üzerine yayılarak hücreler iki agaroz jel tabakası arasına gömülmüş olur. Agaroz jel yoğunluğu ve hücre konsantrasyonu doğru sonuç için önemlidir. Her gözlem alanında hücre sayısı birkaç taneden fazla olmamalıdır. Yüksek agaroz yoğunluğu da DNA göç hızını etkileyebilir.[85]

Lizis

Agaroz jel dondurulduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde 1 saat bekletilir. Lizis sırasında kan ve doku örneklerinde bulunan eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan demire bağlı serbest radikal aracılı DNA hasarını önlemek için lizis çözeltisine %10 oranında dimetil sülfoksit eklenir. Lizis ile hücre membranı parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılır. DNA az miktarda non-histon proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapıda kalır. Lamalar birkaç kez yıkanarak hücre artıkları, kalan tuz ve deterjanlar uzaklaştırılır.[85]

Alkali Ortamda DNA Superkoil Yapısının Açılması

Hazırlanan materyal çift sarmal DNA'nın açılması için elektroforez öncesi yüksek alkali (pH>13) elektroforez tamponunda ortalama 20 dakika inkübe edilir. Çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar.[85]

Elektroforez

Jel içerisinde oluşan tek zincirli DNA'ya alkali koşullarda elektroforez uygulanarak comet oluşumu sağlanır. Elektrik akımı uygulandığında anoda doğru hareket eden DNA parçaları kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Yöntemin ismi olan comet bu kuyruklu yıldız görünümünden gelmiştir. Hasarsız DNA ise çekirdekten

çıkamamaktadır. Elektroforez işlemi 25V, 300mA akımda ve 25 dakika süreyle uygulanır.[86]

Nötralizasyon

Elektroforez sonrası jel pH'sının nötralizasyonu için lamlar uygun bir tamponla (pH 7,5) 3 kez yıkanır. Nötralizasyon sonrası lamlar boyanarak cometler sayılabilir veya jeller kurutularak daha sonra incelenmek üzere saklanabilir.[85]

DNA Boyanması ve Cometlerin Sayılması

Cometlerin görüntülenmesi için işaretleyici olarak en sık floresan boya etidyum bromür (çalışmamızda bu boya kullanılmıştır) kullanılır. Daha nadir olarak non-floresan boya olan gümüş nitrat kullanılır. Etidyum bromür ile boyama sonrası floresan mikroskobunda anoda göç eden DNA fragmanları kuyruklu yıldız, hasarsız DNA ise spot görünümü verir.[85]

Comet Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi

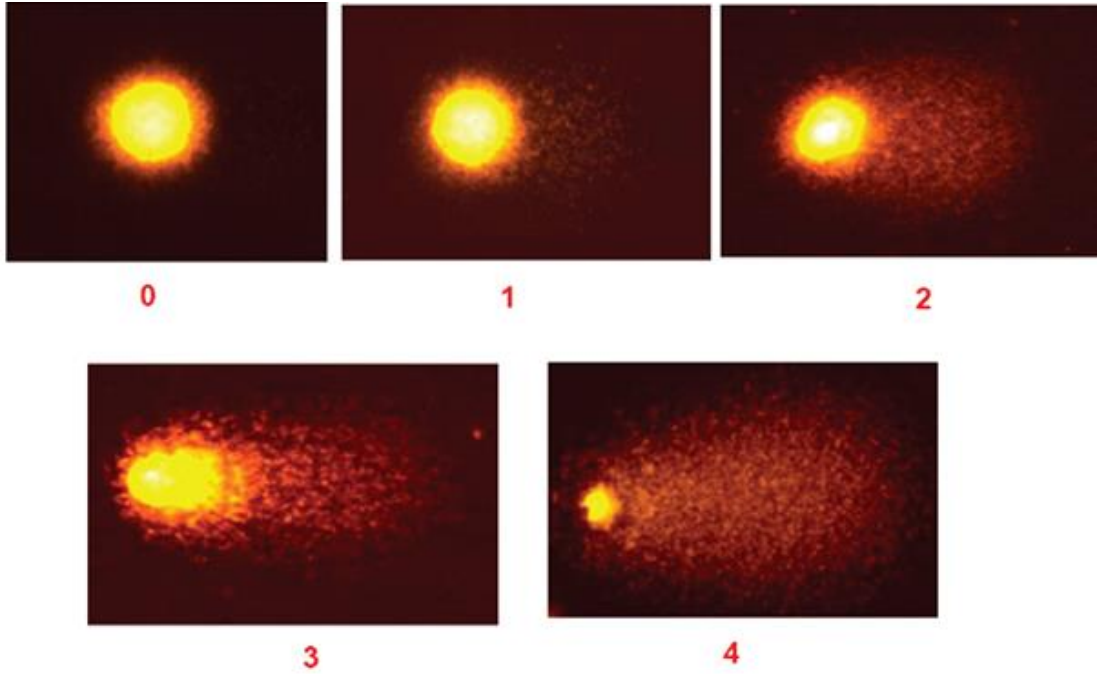
Sayım için görsel analiz veya bilgisayarlı görüntü analizi yapılabilir. Görsel analizde, farklı hasar derecelerini gösteren cometler insan gözü ile kolayca ayırdedilebilir. DNA göç uzunluğuna göre cometler 5 kategoriye ayrılır. Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar (kuyruksuz spot şeklinde görüntü) "0" kategorisi (hasarsız), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. kategoriye (ileri düzeyde hasarlı) girer. 0-4 arasındaki kategoriler ise kolayca ayırdedilebilen 1, 2 ve 3. kategorileri oluşturur. Sayma işlemi için her lamdan rastgele 100 comet seçilir. Bu cometler 0-4 arası kategorize edilerek her kategorideki comet sayısı belirlenir. Daha sonra spesifik formüllerle DNA hasarı belirlenir.[85]

Bilgisayarlı görüntü analizinde; mikroskop üzerine yerleştirilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak comet görüntü analizi yapılır. Analiz için değişik yazılımlar kullanılabilir. Geliştirilmiş programlar comet başını kuyruktan ayırdedebilir, kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi değişik parametreleri belirleyebilir. Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti ise kuyruk uzunluğu

ve göreceli kuyruk yoğunluğunu içeren formüller kullanılarak hesaplanan bir parametredir.[83, 86]



Şekil 8: Hasarlı bir hücrenin şematik comet görüntüsü ve parametreler



Şekil 9: Hasar düzeyine göre şematik comet sınıflama görüntüsü

OxiSelect Comet Assay Kitinde Prensipler

Çalışmamızda kullandığımız OxiSelect Comet Assay kiti ile yapacağımız analiz için hasta ve kontrol gruplarından alınan ve antikoagülan içeren tüplere yerleştirilen kan örnekleri 2 ml bir tüpe alınarak 2 ml soğuk fosfat tamponu (PBS) ile seyreltildi. Seyreltilmiş kan, içinde 5 ml Ficol-1077 olan tüpe aktarılarak 400G'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpteki tabakalardan, lökositlerin olduğu tabaka pastör pipeti ile alınıp başka bir deney tüpüne aktarıldı ve üzeri 10ml'e kadar PBS ile doldurulup 1640 rpm'de 10 dk 25°C de tekrar santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası tüpün altındaki lenfositlerden oluşan tabakaya bir önceki işlem tekrar uygulandı. Bu santrifüj işlemi sonrası tüpün üzerinde kalan sıvı boşaltılarak alttaki kalan kısım ile birlikte, başka bir tüpün içine 1 ml PBS, 200 µl dimetil sülfoksit (DMSO) koyularak 1 gün Mr. Frosty'de -20°C de kaldıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı.

% 0.7 düşük erime noktasına sahip agar (LMPA) 37°C'de mikrodalga fırında eritildi. Donmaması için 20°C su banyosunda bekletildi. Yukarıda hazırlanan hücre süspansiyon preparatından, mikrodalgada eritildikten sonra 10µl alınarak 100µl % 0.7 LMPA ile karıştırıldı. Bu karışımdan 100µl alınarak normal erime noktasına sahip agar (NMPA) kaplı lamalar üzerine konarak donduruldu. Bu preparat lizis çözeltisinde (2.5M NaCl, 100mM%10 DMSO ile Na₂EDTA, 10mM Tris pH 10 ve %1 Triton) 2 saat 4°Cde bekletildi. Daha sonra preparat elektroforez tamponunda (300mM NaOH, 1mM Na₂EDTA ve % 0.2 DMSO, pH>13.5) 4°Cde 20 dakika bekletildi. Alkalın elektroforez 4°Cde 24V ve 300mA'de 40 dakika uygulandı. Elektroforez sonrası preparatlar 0.4M Tris tamponu (pH 7.5) ile üç kez yıkama ile nötralize edildi. 100µl etidyum bromit (10µl / ml) ile boyandı. Preparatların incelenmesinde floresan mikroskobu (BP 515-560 nm eksitasyon filtreli , LP 580 nm bariyer filtreli) kullanıldı ve inceleme karanlık ortamda yapıldı. Elde edilen hücre görüntüleri bilgisayar ortamında "Comet assay IV system (AutoComet)" program yazılımıyla değerlendirildi. İncelemede rastgele seçilmiş 100 (50-100) hücrenin farklı parametreleri kaydedildi. Elde edilen değerlerin kontrol ve hasta grubu arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak incelendi.[81, 87]

Comet Analizi için Kullanılan Alet ve Malzemeler

- Çalkalamalı Su Banyosu NÜVE
- Santrifüj HETTICH
- Mr. Frosty THERMO SCIENTIFIC
- Steril Pipet Ucu AXYGEN
- Steril Cryotüp 2ml ATSC-2 CORNING
- Ependorf Tüpü AXYGEN
- 15 ml'lik Steril Konikal Tüp CORNING
- Lökosep Tüpü GREINER BIO ONE
- Normal erime noktalı agar SIGMA
- Düşük erime noktalı agar BIOSHOP
- Lam SAIL BRAND
- Lamel ISOTHERM
- Otomatik Pipetler AXYPET
- Elektronik Pipet ISOLAB
- Elektroforez Güç Kaynağı BIORAD
- Floresan Mikroskop ve Işık Kaynağı OLYMPUS
- Comet Analiz Tankı CLEAVER
- Buzdolabı BEKO
- Ultra-low Temperature Freezers NUAIRE
- pH Metre HANNA

Comet Assay IV Programı ile Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullandığımız comet assay IV bilgisayar analiz sisteminde şu parametreler değerlendirildi:

Baş uzunluğu (BU, birim μm)

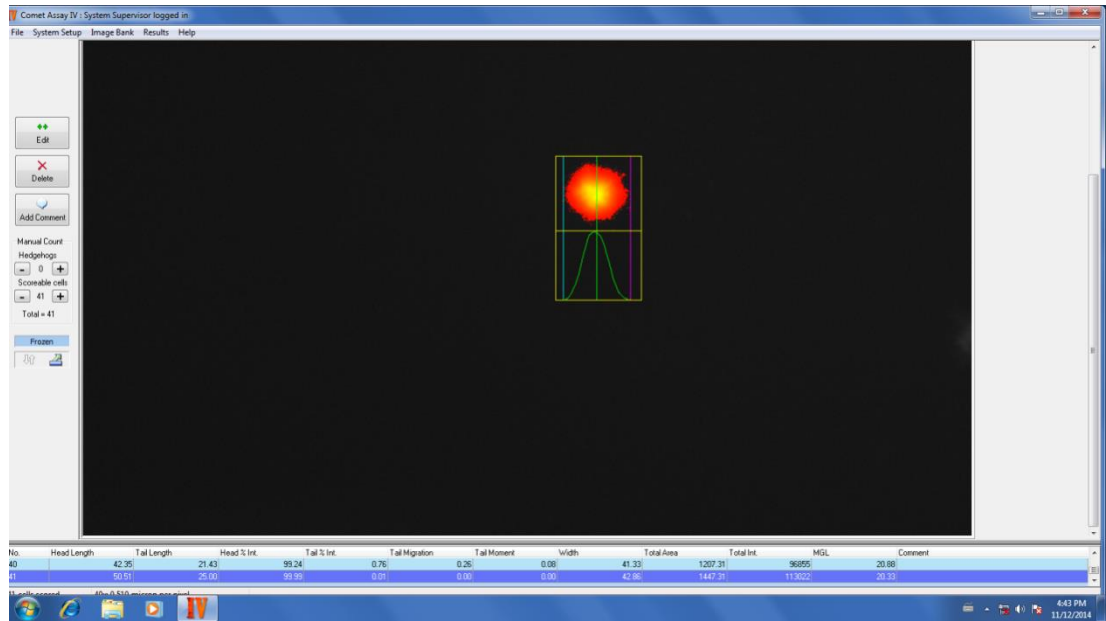
Kuyruk uzunluğu (KU, birim μm)

Baş Yoğunluğu (BY; baş kısmındaki DNA yüzdesi, % B (baş)-DNA olarak ifade edilir.)

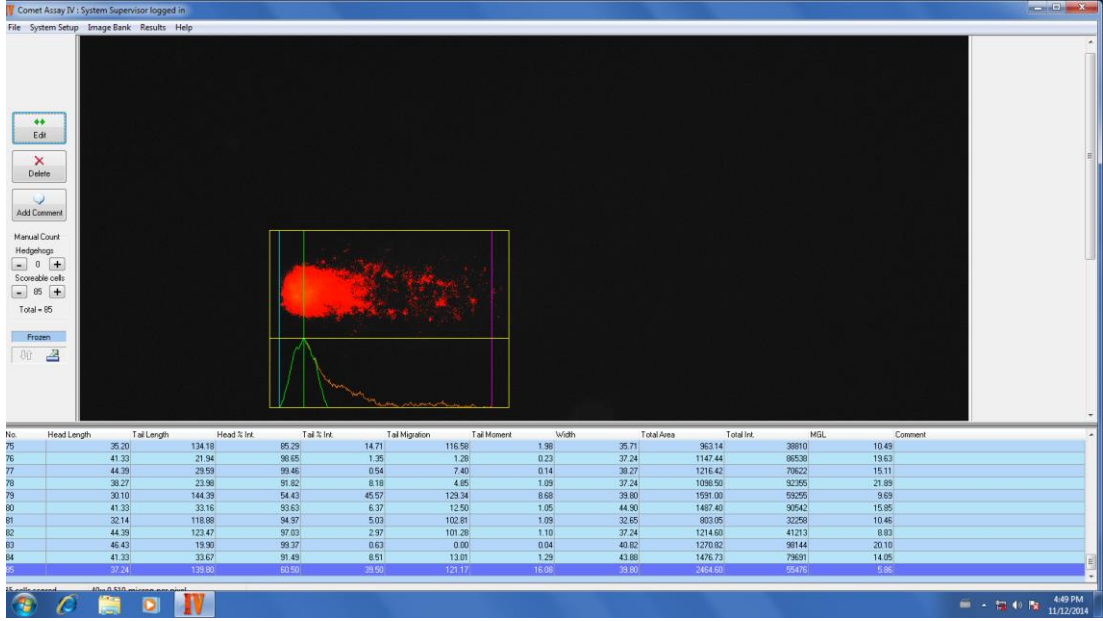
Kuyruk Yoğunluğu (KY; kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi,% K (kuyruk)-DNA olarak ifade edilir.)

Kuyruk Momenti (KM, birim μm , % K-DNA ile KU (kuyruk uzunluğu)'nun çarpımının 100'e bölünmesi ile edilen bir değerdir.)

Kuyruk Migrasyonu (KM_i, baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana DNA göçünün uzunluğudur.)



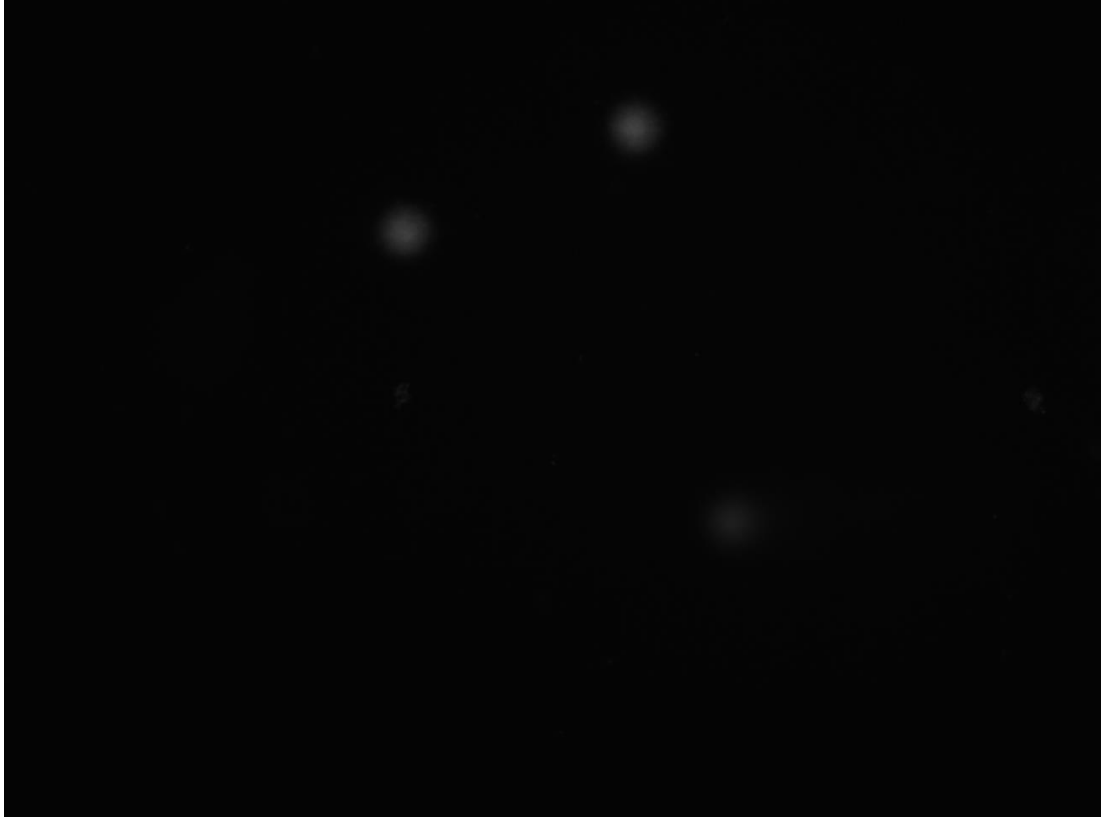
Şekil 10: Hasarsız bir hücrenin bilgisayarlı mikroskopik analizde comet görüntüsü



Şekil 11: Kuyruk içeren hasarlı hücrenin bilgisayar analizinde comet görüntüsü



Şekil 12: Hasarsız bir hücrenin direk mikroskopik görüntüsü



Şekil 13: Aynı mikroskop alanında birkaç hücrenin comet görüntüsü

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21.0 programında yapılmıştır.

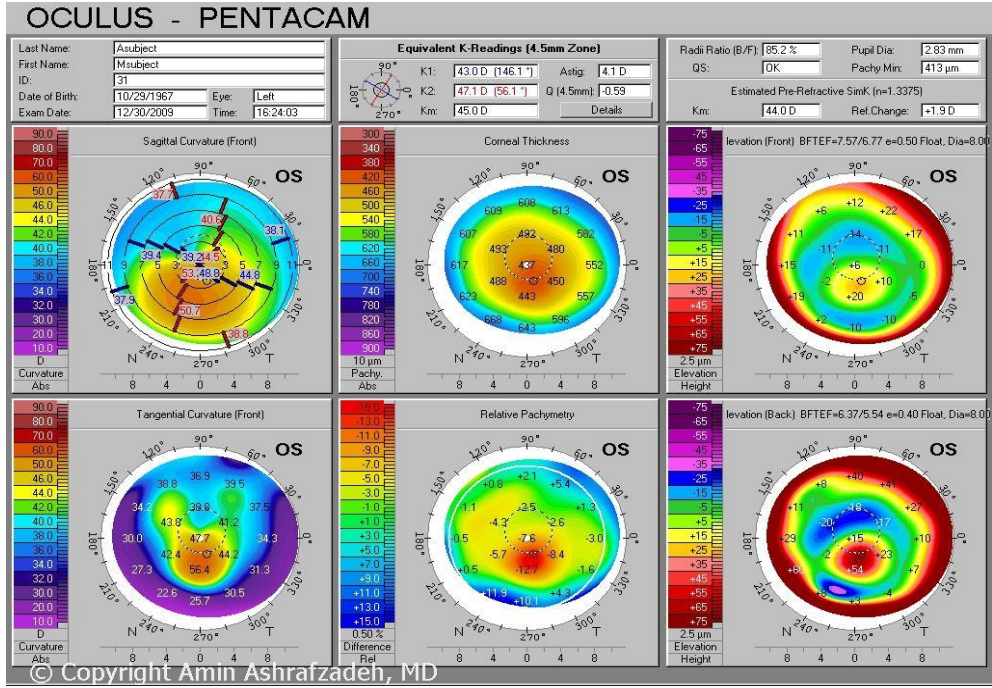
İstatistiksel anlamlılık düzeyi (p değeri) 0,05 olarak kabul edilmiştir.

PENTACAM (OCULUS, WETZLAR, ALMANYA)

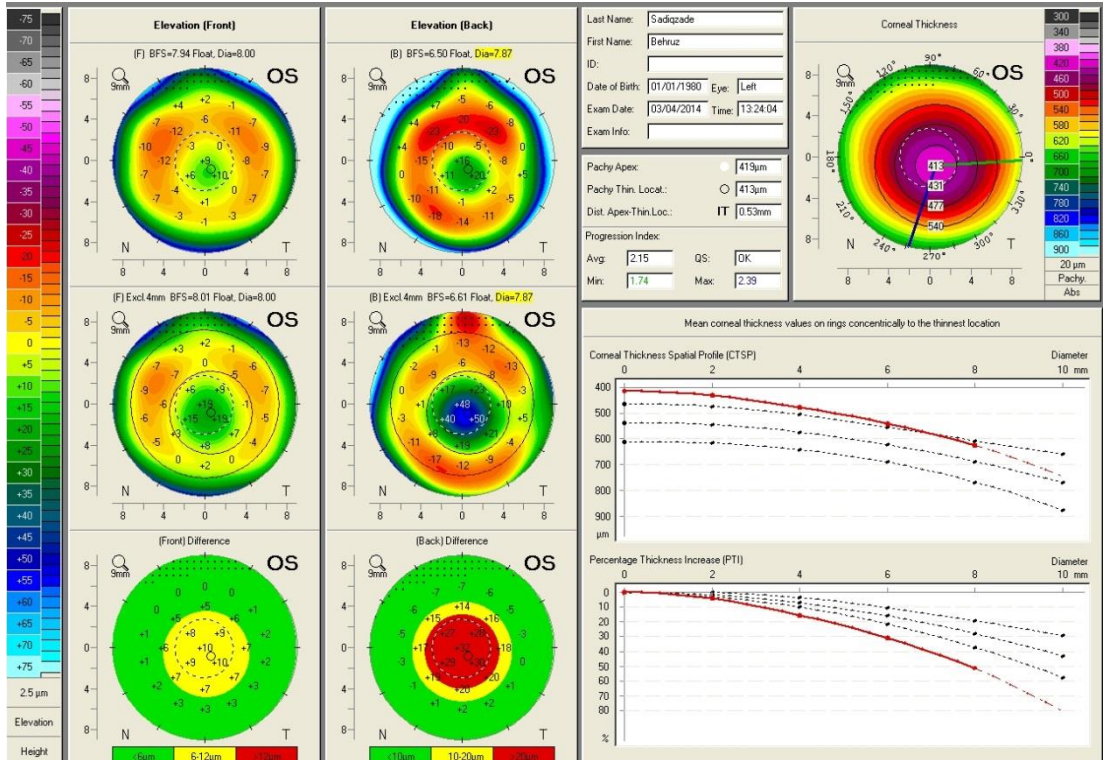
Keratokonus kesin tanısı koymak için, çalışmamıza dahil ettiğimiz tüm hastalarımıza uyguladığımız Pentacam ölçümü, yarık lamba illüminasyon sistemi ve göz etrafında dönen Scheimpflug kameralarından oluşan kombine bir sistemden oluşur. Elle görüntü odaklanır, santralize edilir ve kameralar göz optik aksı etrafında 180° dönerek görüntü alır. Bir nesnenin 3 düzlemde kesişen görüntüsünü yakalayıp tek noktada üç boyutlu görüntü oluşturur. Bu cihaz özel olarak ön segment yapılarını değerlendirmek için düzenlenmiş non-kontakt, optik bir sistemdir. Yarık lamba sistemi 475nm'de sadece mavi ışık yayan bir sistemdir. Yaklaşık 2 saniye içinde 500 görüntü oluşturup bunun içerisinde oluşturulan 25 ön segment görüntüsü alabilmektedir. Tüm korneadan ön ve arka yüzeyden pakimetrik ölçümler alır. İkinci kamera eş zamanlı olarak göz hareketlerini yakalayıp görüntülerde gerekli düzenlemeleri yapar.[54]

Pentacam ile elde edilen görüntüler çeşitli haritalar şeklinde gösterilir. Bu haritalardan yararlanılarak korneanın refraktif güç haritası, ön ve arka korneal yüzey eğim haritaları, tanjansiyel ve sagittal eğim haritaları, ön ve arka elevasyon haritaları, korneal kalınlık haritası, üç boyutlu haritalar, wavefront haritaları incelenebilir.[54]

Çalışmamızdaki keratokonus hastalarında tanı, Pentacam'da 48D üzeri keratometrik değer görülmesi, düzensiz astigmatizma varlığı, asimetrik papyon paterni ve Belin/Ambrosio analizi ile ektazinin tespit edilmesi ile kesinleştirildi.



Şekil 14: Keratokonus hastası topografik görüntüsü (elevasyon haritası)



Şekil 15: Keratokonus hastası Belin/Ambrosio analiz haritası topografi görüntüsü



Şekil 16: Pentacam (Oculus, Wetzlar, Almanya) cihazının fotoğrafik görüntüsü

BULGULAR

Keratokonus hasta grubumuza, topografik olarak keratokonus kesin tanılı 44 hasta dahil edildi. Gönüllü kontrol grubuna keratokonus olmayan 41 kişi dahil edildi. Hasta ve kontrol grubundaki toplam 85 kişinin kanı comet assay ile incelenerek sonuçlar analiz edildi.

Keratokonus hasta grubundaki hastaların yaş ortalaması $31,70 \pm 11,07$ olarak bulundu. Kontrol grubunun yaş ortalaması $30,58 \pm 6,02$ bulundu. Hasta grubunda minimum yaş değeri 18, maksimum yaş değeri 55 idi. Kontrol grubundaki kişilerin minimum yaş değeri 22, maksimum yaş değeri 48 idi. Yaş dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p=0,775$) (Tablo 1)

Tablo 1: Hasta ve kontrol grubu yaş bulguları

Yaş	Ortalama \pm Standart sapma	Median	Minimum-Maksimum
Hasta (n=44)	$31,70 \pm 11,07$	28,5	18 - 55
Kontrol (n=41)	$30,58 \pm 6,02$	30	22 - 48

Kruskal Wallis varyans analizi ve Ki- kare testi. $p=0,775$ ($p>0,05$)

Çalışmaya dahil edilen keratokonus hastalarının % 47,7'si (n=21) erkek, %52,3'ü (n=23) bayan idi. Kontrol grubundaki kişilerin %53,7'si (n=22) erkek, %46,3'ü (n=19) bayan olarak bulundu. Hasta ve kontrol grubu arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p=0,585$) (Tablo 2)

Tablo 2: Hasta ve kontrol grubu cinsiyet bulguları

Cinsiyet	Erkek (%)	Bayan (%)
Hasta	47,7 (n=21)	52,3 (n=23)
Kontrol	53,7 (n=22)	46,3 (n=19)

Chi- Square test kullanılmıştır.p=0,585 (p>0,05)

Hasta grubundaki hastalardan sigara içenlerin oranı %20,5'i (n=9) sigara içmeyenlerin oranı % 79,5 (n=35) idi. Kontrol grubunda sigara içenlerin oranı %26,8 (n=11), içmeyenlerin oranı %73,2 (n=30) olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grupları arasında sigara içimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (p=0,489) (Tablo 3)

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubu sigara bulguları

Sigara	Hasta (%)	Kontrol (%)
İçenler	20,5 (n=9)	26,8 (n=11)
İçmeyenler	79,5 (n=35)	73,2 (n=30)

Kruskal Wallis varyans analizi ve Ki- kare testi. p=0,489 (p>0,05)

Hasta grubunda hastaların % 22,7'si öğrenci (n=10), %13,6'sı öğretmen (n=6), %25'i esnaf (n=11), %31,8'i ev hanımı (n=14), %6,8'i mühendis (n=3) idi. Kontrol grubunun %29,3'si doktor (n=12), %53,7'si memur (n=22), %4,9'u hemşire (n=2), %12,2'si öğrenci (n=5) olarak bulundu. (Tablo4)

Tablo 4: Hasta ve kontrol grubu meslek dağılımı

Meslek	Hasta (% - n)	Kontrol (%-n)
Öğrenci	22,7 - 10	12,2 - 5
Öğretmen	13,6 - 6	-
Esnaf	25 - 11	-
Ev hanımı	31,8 - 14	-
Mühendis	6,8 - 3	-
Doktor	-	29,3 - 12
Memur	-	53,7 - 22
Hemşire	-	4,9 - 2

Hasta grubunda keratokonus hastalarının, kesin keratokonus tanısı almış olması dikkate alındığında, %75'i bilateral (n=33), %25'i tek taraflı (n=11) keratokonus idi. Ayrıca çalışmamızdaki hiçbir hastaya kollajen crosslinking tedavisi uygulanmamıştı.

Hasta ve kontrol grubundaki toplam 85 kişinin comet assay analizinde baş uzunluğu (BU), kuyruk uzunluğu (KU), baş yoğunluğu (BY), kuyruk yoğunluğu (KY), kuyruk momenti (KM), kuyruk migrasyonu (KM_i) parametreleri değerlendirilerek gruplar arası analizler yapıldı.

Hasta grubunda BU $36,86 \pm 5,22$, KU $32,53 \pm 10,22$, BY $82,85 \pm 11,77$, KY $17,14 \pm 11,77$, KM $3,14 \pm 3,62$, KM_i $14,22 \pm 11,21$ olarak hesaplandı.

Kontrol grubunda BU $36,15 \pm 5,83$, KU $28,24 \pm 6,16$, BY $83,42 \pm 12,93$, KY $16,57 \pm 12,93$, KM $2,45 \pm 1,76$, KM_i $10,35 \pm 6,24$ olarak hesaplandı.

BU, BY, KY, KM parametreleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p > 0,05$)

KU ve KM_i açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulunmuştur. ($p < 0,05$) (Tablo 5)

Tablo 5: Hasta ve kontrol grubu comet sonuçları

Comet	Ortalama ± Standart Sapma	Minimum - Maksimum	P değeri
BU Hasta	36,86 ± 5,22	20,86 – 42,15	0,303 (p>0,05)
Kontrol	36,15 ± 5,83	18,71 – 45,96	
KU Hasta	32,53 ± 10,22	19,19 – 85,68	0,006 (p<0,05)
Kontrol	28,24 ± 6,16	18,79 – 51,73	
BY Hasta	82,85 ± 11,77	44,06 – 95,58	0,413 (p>0,05)
Kontrol	83,42 ± 12,93	44,10 – 96,92	
KY Hasta	17,14 ± 11,77	4,42 – 55,94	0,413 (p>0,05)
Kontrol	16,57 ± 12,93	3,08 – 55,90	
KM Hasta	3,14 ± 3,62	0,54 – 24,54	0,242 (p>0,05)
Kontrol	2,45 ± 1,76	0,38 – 6,62	
KMi Hasta	14,22 ± 11,21	2,34 – 75,25	0,038 (p<0,05)
Kontrol	10,35 ± 6,24	1,37 – 33,94	

Mann – Whitney test ve Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır.

Hem hasta hem de kontrol grubunda, sigara içip içmeme durumuyla tüm comet parametreleri arasındaki ilişki analiz edildiğinde, sigara ile 6 farklı comet parametresi arasında her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (p>0.05) Her iki grup beraber değerlendirildiğinde sigara içenler ile içmeyenler arasında comet parametreleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı. (p>0.05) (Tablo 6)

Tablo 6: Tüm grup sigara ilişkili comet sonuçları

Comet – Sigara Tüm Grup	Ortalama ± Standart Sapma	Minimum - Maksimum	P değeri
BU İçen	37,13 ± 7,06	19,64 – 45,96	0,287 (p>0,05)
İçmeyen	35,79 ± 5,40	18,71 – 41,50	
KU İçen	28,67 ± 5,57	21,37 – 38,09	0,717 (p>0,05)
İçmeyen	28,08 ± 6,44	18,79 – 51,73	
BY İçen	82,64 ± 13,44	51,90 – 96,10	0,828 (p>0,05)
İçmeyen	83,71 ± 12,96	44,10 – 96,92	
KY İçen	17,35 ± 13,44	3,90 – 48,10	0,828 (p>0,05)
İçmeyen	16,28 ± 12,96	3,08 – 55,90	
KM İçen	2,66 ± 1,84	0,48 – 5,98	0,783 (p>0,05)
İçmeyen	2,38 ± 1,75	0,38 – 6,62	
KMi İçen	10,26 ± 4,90	2,88 – 16,30	0,805 (p>0,05)
İçmeyen	10,38 ± 6,73	1,37 – 33,94	

Mann – Whitney test ve Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır.

Hasta ve kontrol grubundaki sigara içmeyenler arasındaki comet parametrelerinin istatistik analizinde BU, BY, KY, KM parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05). KU ve KMi parametrelerinde ise hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. (p<0,05) (Tablo 7)

Tablo 7: Sigara içmeyen hasta ve kontrol comet sonuçları

Comet – Sigara İçmeyen	Ortalama ± Standart Sapma	Minimum - Maksimum	P değeri
BU Hasta	36,39 ± 5,60	20,86 – 42,15	0,281 (p>0,05)
Kontrol	35,79 ± 5,40	18,71 – 41,50	
KU Hasta	33,18 ± 11,30	19,19 – 85,68	0,007 (p<0,05)
Kontrol	28,08 ± 6,44	18,79 – 51,73	
BY Hasta	82,35 ± 12,85	44,06 – 95,58	0,415 (p>0,05)
Kontrol	83,71 ± 12,96	44,10 – 96,92	
KY Hasta	17,64 ± 12,85	4,42 – 55,94	0,415 (p>0,05)
Kontrol	16,28 ± 12,96	3,08 – 55,90	
KM Hasta	3,34 ± 4,02	0,54 – 24,54	0,184 (p>0,05)
Kontrol	2,38 ± 1,75	0,38 – 6,62	
KMi Hasta	15,11 ± 12,36	2,34 – 75,25	0,025 (p<0,05)
Kontrol	10,38 ± 6,73	1,37 – 33,94	

Mann – Whitney test ve Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır.

Bilateral keratokonus ile tek taraflı keratokonus hastaları arasında comet parametreleri analiz edildiğinde BU, BY, KY, KM açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken (p>0.05), KU ve KMi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmış olup bilateral grupta her iki parametre tek taraflı gruba göre daha yüksek bulundu. (p<0.05) (Tablo 8)

Tablo 8: Bilateral ve unilateral hastalık ile comet ilişkisi

Comet – Bilateral Unilateral	Ortalama ± Standart Sapma	Minimum - Maksimum	P değeri
BU Unilateral	37,14 ± 4,73	27,09 – 42,15	0,303 (p>0,05)
Bilateral	36,76 ± 5,44	20,86 – 41,63	
KU Unilateral	30,30 ± 4,96	19,19 – 37,61	0,006 (p<0,05)
Bilateral	33,27 ± 11,42	21,80 – 85,68	
BY Unilateral	83,94 ± 10,97	58,90 – 95,58	0,413 (p>0,05)
Bilateral	82,49 ± 12,17	44,06 – 93,85	
KY Unilateral	16,05 ± 10,97	4,42 – 41,10	0,413 (p>0,05)
Bilateral	17,50 ± 12,17	6,15 – 55,94	
KM Unilateral	2,53 ± 1,68	0,54 – 6,31	0,242 (p>0,05)
Bilateral	3,35 ± 4,07	0,79 – 24,54	
KMi Unilateral	11,87 ± 5,48	2,34 – 19,78	0,038 (p<0,05)
Bilateral	15,00 ± 12,53	3,64 – 75,25	

Mann – Whitney test ve Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır.

Comet parametrelerinin kendi içindeki korelasyonu hasta ve kontrol grubundaki tüm kişiler değerlendirilerek incelendiğinde, BU ile BY arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki, BU ile KY, KM ve KMi arasında negatif bir ilişki saptanmıştır. KU ile BY arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilişki, KU ile KY, KM, KMi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. BY ile KY arasında tam bir negatif ilişki (biri artarken aynı oranda diğeri azalır), BY ile KM ve KMi arasında yüksek düzeyde negatif ilişki görüldü. KY ile KM ve KMi arasında yüksek düzeyde (BY ile negatif ilişkisiyle aynı oranda) pozitif ilişki görüldü. Bu korelasyonlar, comet parametreleri arasındaki ilişkilerin tutarlı olduğunu göstermektedir. (Tablo 9)

Tablo 9: Tüm grup analizinde comet parametrelerinin korelasyonu

Tüm Grup (n=85)	BU	KU	BY	KY	KM	KMi
BU	1,0	0,104	0,576**	-0,576**	-0,512**	-0,319**
KU	0,104	1,0	-0,541**	0,541**	0,623**	0,852**
BY	0,576**	-0,541**	1,0	-1,0**	-0,973**	-0,822**
KY	-0,576**	0,541**	-1,0**	1,0	0,973**	0,822**
KM	-0,512**	0,623**	-0,973**	0,973**	1,0	0,874**
KMi	-0,319**	0,852**	-0,822**	0,822**	0,874	1,0

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada keratokonus hastalarında, comet analizi ile tespit edilen parametrelerden kuyruk uzunluğunda ve kuyruk migrasyonunda normal popülasyona göre istatistiksel olarak anlamlı artış izledik. Kuyruk uzunluğu birçok çalışmada DNA hasarının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Normal insan metabolizmasında DNA üzerinde sürekli olarak kırıklar meydana gelebilir. Bu kırıkların miktarı hücrenin yaşına, türüne ve çevresel etmenlere göre değişkenlik gösterebilir. Kırıkların çoğu tamir mekanizmaları tarafından onarılır. Eğer oluşan hasar hücrenin tamir edebilme kapasitesinin üzerindeyse onarılamaz ve farklı hastalıkların gelişmesine zemin hazırlayabilir. Kornea hücreleri ışıkla ilk karşılaşan hücreler olması nedeniyle çevresel hasara oldukça açıktır.

Yapılan çalışmalarda keratokonus hastalarında oksidatif stresin normal popülasyona göre artmış olduğu izlenmiştir. Reaktif oksijen radikallerinin eliminasyonunda görev alan süperoksit dismutaz, aldehit dehidrogenaz, glutatyon –S transferaz enzimlerinin keratokonuslu hastalarda kontrol gruplarına göre daha düşük oranda olduğu bulunmuştur.[24, 88] Oksidatif stres sonrası oluşan endojen veya ekzojen reaktif oksijen ürünleri protein, DNA ve lipidleri etkileyerek çeşitli moleküler hasarlar oluşturmakta ve oluşan hasarın tamir edilememesi mutasyonla sonuçlanmaktadır.

Toprak ve ark. yaptığı çalışmada, sistemik oksidatif stresin keratokonus patogenezindeki etkisini görmek amacıyla keratokonus ve kontrol grubundaki hastaların serumlarında oksidatif stres markırlarını ölçmüşlerdir. Total oksidan durum (TOS) ve total antioksidan durum (TAS) diye adlandırılan serum oksidatif stres markırları, kommersiyel kit kullanılarak ölçülmüş ve her hastanın oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır. TOS ve oksidatif stres indeksi keratokonus grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. TAS değerleri açısından ise iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Böylece keratokonus patogenezinde artmış sistemik oksidatif stresin etkili olabileceği düşünülmüştür.[89]

Karamichoz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan keratokonus hücreleri, insan korneal keratosit hücreleri ve insan fibroblast hücrelerini iki ve üç boyutlu hücre kültürlerinde oksidatif hasar farklılıkları açısından incelemişlerdir. Morfolojik ve metabolik farklılıkları analiz ederek oksidatif hasarla ilgili indikatörleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada, morfolojik olarak, keratokonus hücreleri ve fibroblastlar benzer olarak uzun fibroblastik görünüme sahipken, keratosit hücrelerinin farklı olarak dendritik bir görünüme sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca metabolik açıdan oksidatif stresle ilgili çeşitli moleküller ölçülmüş ve keratokonus hücrelerinde; laktat düzeyi, laktat/malat oranı, laktat/piruvat oranı daha yüksek düzeyde; arginin düzeyi, glutatyon/okside glutatyon oranı daha düşük düzeyde bulunmuştur.[90]

Kalra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, artmış oksidatif hasar sonucu lizozomal membranların zarar görmesi nedeniyle proteolitik enzim aktivitesinde artış olduğu ve bunun, keratokonusta stromal incelmeyi başlatmada etkili olabileceği gösterilmiştir. Yine Atilano ve arkadaşları, yaptığı çalışmada, oksidatif hasara duyarlı mitokondriyal DNA'nın oksidatif stres sonrası hasarlandığını ve bunun sonucunda oksidatif fosforilasyonun bozulmasıyla oksidatif hasarın daha da artarak bu durumun keratokonus gelişimine katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.[35, 91]

Artmış oksidatif stres kırıkların artmasına neden olmanın yanında tamir mekanizmalarını da olumsuz etkileyebilerek hasarın onarılamamasına neden olabilir. Daha önce göz üzerinde yapılan comet analizi çalışmaları mevcuttur. Kataraktlı olgularda lens epitelyum hücrelerinde, PAAG ve Fuch's endotelyal distrofi hastalarında kan hücrelerinde, toksoplazma retiniti oluşturulan fare modelinde retina hücrelerinde hasta ve kontrol grupları kıyaslanmış ve DNA hasarı hasta gruplarında kontrol gruplarına oranla daha yüksek düzeyde bulunmuştur.

Czarny ve ark. yaptığı çalışmada, Fuch's endotelyal distrofi tanılı hastaların periferik kandan izole edilen mononükleer lökositleri, kontrol grubundan alınan örneklerle comet assay yöntemiyle bazal DNA hasarı ve hidrojen peroksit ile indüklenmiş DNA hasarına duyarlılık açısından kıyaslanmıştır. Bazal DNA hasarı yönünden hasta ve kontrol grubu arasında kuyruk uzunluğu açısından anlamlı fark saptanmamış. Ayrıca hasta ve sağlıklı gruptan izole edilen kanlar 10 dakika boyunca

hidrojen peroksite maruz bırakılarak DNA hasarı tetiklenmiş ve sonrasında yapılan comet assay analizinde iki grup arasında anlamlı fark saptanmamış. Hidrojen peroksitle 10 dakika temas sonrası 60 dakika DNA tamiri için gerekli süre olarak beklenerek yapılan analiz sonuçlarında ise hasta grubunda DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Bunun sonucunda hasta grubunda kontrol grubuna göre DNA tamir mekanizmalarının anlamlı derecede bozuk olduğu gösterilmiş.[92]

Zhang ve ark. yaptığı çalışmada, senil katarakt hastalarının lens epitel hücreleri ve periferel kan lenfositlerinde comet assay ile DNA hasarını incelemiştir. Hem lens epitel hücreleri hem de periferel kan lenfositlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek % kuyruk DNA oranı ve kuyruk momenti bulunmuş. Bu sonuçlara göre yaşa bağlı katarakt etyolojisinde oksidatif hasarın etkisinin olabileceği düşünülmüştür.[93]

Mozaffarieh ve ark. primer açık açılı glokom hastalarında daha önce trabeküler ağda ve dolaşımdaki lökositlerde gösterilmiş artmış DNA hasarı çalışmalarından yola çıkarak, comet assay ile ilgili yaptığı çalışmada, primer açık açılı glokom ile kontrol grubunda, dolaşımdaki lökositlerde DNA hasarını incelemiştir. Ayrıca hem hasta hem de kontrol grubundaki hastaları primer vasküler disgenезis (PVD) olan ve olmayan olarak iki alt gruba ayırarak ikisi arasındaki ilişkiyi de DNA hasarı açısından incelemiştir. Primer açık açılı glokom hastalarının lökositlerindeki DNA hasarı (kuyruk momenti), kontrol grubu lökositlerindeki DNA hasarı ile karşılaştırıldığında glokom hastalarında DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş. PVD açısından ise kontrol grubundaki hastalar arasında PVD olan ve olmayanlar arasında DNA hasarı açısından anlamlı fark bulunmamasına rağmen glokom hastaları alt grupları arasında PVD'li alt grupta diğer tüm alt gruplara oranla anlamlı düzeyde daha yüksek oranda DNA kırığı saptanmıştır.[94]

El-Sayed ve ark yaptığı çalışmada fare retina hücrelerinde, toksoplazma gondi enfeksiyonunun indüklediği DNA hasarını comet assay ile incelemiştir. Çalışmada fareler dört gruba ayrılmıştır. 1. grup enfekte olmayan fareler, 2. grup toksoplazma gondi ile enfekte olmuş fareler, 3. grup öncesinde 5 gün subkütan

steroid ile immüsuprese edilmiş ve toksoplazma ile enfekte fareler, 4. grup ise toksoplazma ile enfekte olup antibiyotik tedavisi uygulanmış farelerden oluşturulmuştur. Gruplar arası analizde comet parametrelerinden kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti hasar göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Enfekte gruplarda kontrol grubuna göre retina hücrelerinde kuyruk parametreleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. İmmüsuprese enfekte farelerde diğer enfekte gruba ve kontrol grubuna göre yine anlamlı düzeyde yüksek kuyruk parametreleri bulunmuştur. Antibiyotik tedavisi uygulanmış grupta ise tedavi uygulanmamış enfekte gruba göre DNA hasarında anlamlı bir düşüş saptanmıştır.[95]

Keratokonus ile ilgili çok sayıda gen polimorfizmi ve oksidatif hasar gibi etmenlerin etyolojide yeri olduğuna dair çalışmalar yapılmış olmasına rağmen DNA hasarını herhangi bir yöntemle direkt olarak ortaya koyan bir çalışma bildiğimiz kadarı ile yoktur. Çalışmamız sonucu keratokonus hastalarında izlenen DNA hasarı, sonraki etyolojik çalışmaların hangi konu üzerine daha çok yoğunlaştırılması gerektiği konusunda yol gösterici olması açısından önemlidir. Bu yüzden üzerinde yoğun çalışmalar yapılan olası bir etyolojik nedenin, gerçekten bu hastalığın oluşumunda yerinin olup olmadığının ya da ne kadar öneme sahip olduğunun bilinmesi, sonraki çalışmaların daha doğru yönlendirilmesi ve en önemli etkenin bulunması açısından kritik bir öneme sahiptir.

Keratokonus genellikle izole vaka olarak görülse de hastalığa yatkınlıkta, hastalığın gelişiminde ve progresyonunda genetiğin etkili olduğu gösterilmiştir. Birçok hastalığın tedavisinde umut verici olan genetik çalışmalar ne yazık ki keratokonus üzerinde henüz çok sınırlıdır. Keratokonus ile ilişkilendirilmiş çok farklı gen loküslerinin varlığı da bu konuda yapılabilecek genetik temelli çalışmaları güçleştirmektedir. Keratokonuslu ailelerde yapılan genetik bağlantı çalışmalarında çok sayıda gen bölgesi tanımlanmıştır. VSX, DOCK9, TGFβ1, SOD1, miR184, CAST, TIMP3, SPARC genleri keratokonus patogenezinde etkisi olduğu gösterilen genlerden bazılarıdır. Keratokonusun bazı genetik hastalıklarla birlikteliği de bilinmektedir. Sıkı kontakt lens kullanımı, göz ovalama, atopi ve mekanik travma gibi etkenler keratokonus etyolojisi içerisinde yer almaktadır. Keratokonusun birinci

derece akrabalarda ve monozigot ikizlerde daha yüksek prevalansa sahip olması yine genetik bir zeminin olduğunu göstermektedir. Ayrıca aile hikayesi olan keratokonus hastalarında otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtımla geçiş de gösterilmiştir.[96]

Çalışmamızda daha önceki bazı çalışmalarda olduğu gibi kan lenfositlerini kullanmamızın nedeni tüm hücrelerin DNA yapısının ortak olması, korneadan hücre elde edilmesine göre daha az invaziv bir yöntem olması idi. Comet analizlerinde daha önce detaylı şekilde anlatıldığı gibi farklı parametreler verilmektedir. Bu parametrelerden çalışmamızda iki grup arasında farklılık görülen parametreler kuyruk uzunluğu ve kuyruk migrasyonu idi. Zhang ve ark. yaptığı çalışmada kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu; Mozaffarieh ve ark. yaptığı çalışmada kuyruk momenti; Czarny ve ark. yaptığı çalışmada kuyruk uzunluğu; El-Sayed ve ark. yaptığı çalışmada kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerini kullanmışlardır. Comet parametrelerinin her birinin spesifik anlamları tam olarak bilinmese de çalışmalarda genel anlamda kuyruk parametrelerinin herhangi biri, hasar göstergesi olarak dikkate alınmıştır. Bu konuda yapılacak çalışmalar bu bilgilerin artmasını ve hangi parametrenin ne anlama geldiğinin detaylı olarak bilinmesini sağlayacaktır.

Keratokonus hastalığının patogenezinin aydınlatılması genç popülasyonu etkileyen ve önemli bir iş gücü kaybına neden olan bu hastalıkla ilgili tedavi protokollerinin belirlenmesinde, hastaların takibinde ve hastalara danışmanlık hizmeti verilmesinde önemlidir. DNA hasarının direkt olarak ortaya konması, bunu tetikleyebilecek oksidatif stres, olası bir hücresel tamir mekanizma bozukluğu, apoptozis ile ilgili bozukluklar açısından hastaların takibinde ve yönlendirilmesinde yol gösterici olabilir. Önceki yapılan çalışmalarda yaşa bağlı maküla dejenerasyonu hastalarında antioksidan tedavinin, hastalığın progresyonunu yavaşlatıcı, bir gözde ilerleyici hastalık varken diğer gözü koruyucu ve hastalığın oluşumunu geciktirici etkisi nedeniyle özellikle belirli hasta alt gruplarında tedavi protokolü içerisine alındığı bilinmektedir.[97] Çalışmamızda tespit ettiğimiz keratokonus hastalarında artmış DNA hasarı nedeniyle, keratokonus hastalarında da benzer şekilde antioksidan tedavi seçeneklerinin geliştirilmesiyle, hastalığın progresyonununun yavaşlatılabileceği

veya henüz hastalığın tam ortaya çıkmadığı diğer göz için koruyucu bir etki oluşturabileceği düşünülebilir. Ayrıca keratokonus hastalığının daha genç popülasyonu etkilemesi nedeniyle bu durum sosyolojik açıdan daha önemli bir değere sahiptir. Bu konuda da çalışmamızın yapılması olası birçok çalışmaya ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

Keratokonusta güncel tedavi yaklaşımı olan crosslinking, kollojen lifler arası çapraz bağları arttırarak ve keratosit proliferasyonunu uyararak kornea mekanik direncini arttırmaktadır. Crosslinking tedavisinin DNA kırıkları üzerine olabilecek etkileri tahmin edilemeyeceğinden bu hastaları çalışma dışında bıraktık. Ancak bu tedavinin kırıklar üzerindeki etkilerini tedavi olan ve olmayan gruplarda kontrollü bir çalışma yaparak araştırılabilir.

Çalışmamızda DNA kırıklarına neden olabilecek diğer olası nedenler olan yaş ve sigara içimi açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sigara içenleri her iki gruptan çıkararak iki grubu kıyasladığımızda DNA kırıkları açısından gruplar arasındaki fark yine keratokonus grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek idi. Bu yüzden yaş farkının oluşturabileceği oksidatif stres faktörü, cinsiyet yönünden oluşabilecek olası bir risk farkının DNA hasarına etkileri minimize edilmiştir. Ayrıca çalışmamızdaki hem hasta hem de kontrol grubuna, oksidatif stres yönünden yüksek risk taşıyan meslek grupları dahil edilmeyip ekzojen stres faktörlerinin etkisi en aza indirilmeye çalışılmıştır. Sigara içimi yönünden de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sigara önemli bir stres arttırıcı faktör olabileceği için gruplar arasında bu yönden denklik olması çalışmanın güvenilirliği açısından önemlidir.

Çalışmamızda bilateral keratokonus hastalığı ortaya çıkmış hasta grubunda, henüz tek taraflı hastalığı ortaya çıkmış gruba göre anlamlı düzeyde yüksek KU ve KMi değerleri bulduk. Bu durum hastalığın şiddetiyle ve diğer gözde keratokonus gelişimiyle, DNA hasarının fazlalığı açısından pozitif bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın eksiklikleri arasında; hasta sayısının yetersizliği, tedavi gören hasta sayısının yetersizliği nedeniyle keratokonus mevcut tedavi uygulamaları

sonrası DNA hasarının değişim durumuna bakılamaması, herhangi bir oksidatif stres ajanıyla hasarın indüklenmesi sonrası aynı analizin yapılarak DNA hasarına duyarlılığın ve tamir mekanizmalarının etkinliğinin gösterilememiş olması sayılabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda; daha önce yapılan glokom, katarakt, toksoplazma retiniti ve Fuch's endotelyal distrofi ile ilgili çalışmalara paralel olarak keratokonus hastalarında da comet assay analizi ile artmış DNA hasarı ile uyumlu sonuçlar bulunmuştur. DNA hasarıyla ilgili ileride yapılacak daha geniş hasta grupları ve spesifik analizlerle keratokonus ile ilgili bilinmeyenler daha net anlaşılabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, keratokonus ile sağlıklı kontrol grubu arasında DNA hasarı açısından herhangi bir fark olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Yaptığımız çalışmada keratokonus hastaları ve kontrol grubunda periferik kan lenfositlerinde DNA hasarını comet assay analiziyle inceledik.

Her iki grup arasında yaş, cinsiyet ve sigara içimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Grupların yaş, cinsiyet ve sigara içimi açısından denk olması, çalışmamızın güvenilirliği açısından önemlidir.

Çalışmamıza keratokonus hasta grubunda keratokonus kesin tanısı almış hastaları dahil edip başka bir göz hastalığı ve/veya sistemik hastalığı olan hastaları çalışmamız dışında bıraktık. Kontrol grubunda ise keratokonus hastalığı veya şüphesi olmayan ve başka bir sistemik hastalığı olmayan kişileri dahil ettik. DNA hasarı açısından özellikle risk altındaki kişileri her iki gruba dahil etmedik. Böylelikle başka durumların olası DNA hasar etkisini devre dışı bırakmayı amaçladık.

Daha önce keratokonus etyolojisinde genetiğin etkinliğiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve çok sayıda gen lokasyonu bulunmuştur. Ayrıca oksidatif stresin ve bunun sonucunda meydana gelen hücre içi olayların keratokonus patogenezinde etkili olabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Fakat DNA hasarını matematiksel olarak direkt gösteren çalışmalar yetersizdir. Bunun belirlenmesinin, ileride yapılacak etyolojik çalışmalara ve geliştirilmesi muhtemel tedavi protokollerine ışık tutacağını düşündük.

Çalışmamızda keratokonus hastalarında kontrol grubuna göre, hasar göstergesi olarak bilinen kuyruk uzunluğu ve kuyruk migrasyonu parametreleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Sigara, bilinen bir oksidatif stres artırıcı etken olduğundan sigara içmeyen hastalar arasında da istatistiksel analiz yaptık. Sonuç olarak keratokonus hastalarında KU ve KMi parametrelerinde yine anlamlı bir fark saptadık.

Bilateral hastalığı olan grupla tek taraflı hastalığı olan grubu karşılaştırdığımızda bilateral grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek KU ve KMi bulduk. Hastalığın progresyonunda ve diğer gözde ortaya çıkışında oksidatif DNA hasarının etkisiyle ilgili ileride yapılacak daha geniş ve spesifik çalışmalarla bu durum daha iyi anlaşılabilir.

Comet parametrelerinin kendi içindeki korelasyon analizinde comet baş parametreleri ile kuyruk parametreleri arasında negatif korelasyon, baş parametreleri ve kuyruk parametrelerinin kendi arasında ise pozitif korelasyon tespit edilerek analizin tutarlılığı gösterilmiştir.

Comet assay analizi son zamanlarda popülerlik kazanan basit, ucuz, kolay uygulanabilen ve güvenli bir DNA hasar analizidir. Spesifik bir DNA hasarını değil genel DNA hasarını göstermektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda keratokonus hastalarında sağlıklı kişilere göre artmış DNA hasarı ile uyumlu kuyruk uzunluğu ve kuyruk migrasyonu parametrelerini anlamlı düzeyde yüksek bulduk. Bu da bize keratokonusta artmış DNA hasarı konusunda bilgi vermektedir. Comet assay analizinin daha spesifik parametrelerinin bulunması ve/veya mevcut parametrelerin ne anlama geldiğine dair daha geniş çalışmaların yapılmasıyla, elde ettiğimiz sonuçlar daha değerli bilgiler sunabilir. Ayrıca comet analizinin de geliştirilmesiyle birlikte, ileride yapılacak; keratokonus etyopatogenezinin aydınlatılması, hastalığın progresyonunu durdurucu, oluşumunu engelleyici yeni tedavilerin geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar oksidatif hasar, DNA tamir mekanizmaları, apoptotik süreç üzerine yoğunlaştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Rabinowitz, Y.S., *Keratoconus*. Surv Ophthalmol, 1998. **42**(4): p. 297-319.
2. Abu-Amero, K.K., A.M. Al-Muammar, and A.A. Kondkar, *Genetics of keratoconus: where do we stand?* J Ophthalmol, 2014. **2014**: p. 641708.
3. Vazirani, J. and S. Basu, *Keratoconus: current perspectives*. Clin Ophthalmol, 2013. **7**: p. 2019-30.
4. Burdon, K.P., et al., *Apparent autosomal dominant keratoconus in a large Australian pedigree accounted for by digenic inheritance of two novel loci*. Hum Genet, 2008. **124**(4): p. 379-86.
5. Davidson, A.E., et al., *The pathogenesis of keratoconus*. Eye (Lond), 2014. **28**(2): p. 189-95.
6. Hughes, A.E., et al., *Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(12): p. 5063-6.
7. Bisceglia, L., et al., *Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive Loci*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(3): p. 1081-6.
8. Kennedy, R.H., W.M. Bourne, and J.A. Dyer, *A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus*. Am J Ophthalmol, 1986. **101**(3): p. 267-73.
9. Rabinowitz, Y.S., *The genetics of keratoconus*. Ophthalmol Clin North Am, 2003. **16**(4): p. 607-20, vii.
10. Tuft, S.J., et al., *Keratoconus in 18 pairs of twins*. Acta Ophthalmol, 2012. **90**(6): p. e482-6.
11. Jordan, C.A., et al., *Computerized corneal tomography and associated features in a large New Zealand keratoconic population*. J Cataract Refract Surg, 2011. **37**(8): p. 1493-501.
12. Ophthalmology, A.A.o., *Oftalmolojinin Esas ve İlkeleri*. 2009: Güneş Tıp Kitabevleri.
13. Bowling, J.J.K.B., *Klinik Oftalmoloji Sistemik Yaklaşım*. 2011: Güneş Tıp Kitabevleri. 167,168,210.
14. Stabuc-Silih, M., et al., *Genetics and clinical characteristics of keratoconus*. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat, 2010. **19**(2): p. 3-10.
15. Wojcik, K.A., et al., *Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 19294-308.
16. Edwards, M., C.N. McGhee, and S. Dean, *The genetics of keratoconus*. Clin Experiment Ophthalmol, 2001. **29**(6): p. 345-51.
17. Fernandes, B.F., et al., *Histopathological study of 49 cases of keratoconus*. Pathology, 2008. **40**(6): p. 623-6.
18. Sturbaum, C.W. and R.L. Peiffer, Jr., *Pathology of corneal endothelium in keratoconus*. Ophthalmologica, 1993. **206**(4): p. 192-208.
19. Sawaguchi, S., et al., *Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus*. Arch Ophthalmol, 1989. **107**(10): p. 1507-10.
20. Wilson, S.E., et al., *Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing*. Exp Eye Res, 1996. **62**(4): p. 325-7.
21. Bron, A.J. and Y.S. Rabinowitz, *Corneal dystrophies and keratoconus*. Curr Opin Ophthalmol, 1996. **7**(4): p. 71-82.

22. Bureau, J., et al., *Modification of prostaglandin E2 and collagen synthesis in keratoconus fibroblasts, associated with an increase of interleukin 1 alpha receptor number*. C R Acad Sci III, 1993. **316**(4): p. 425-30.
23. Chwa, M., et al., *Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(5): p. 1902-10.
24. Cristina Kenney, M. and D.J. Brown, *The cascade hypothesis of keratoconus*. Cont Lens Anterior Eye, 2003. **26**(3): p. 139-46.
25. Falls, H.F. and A.W. Allen, *Dominantly inherited keratoconus*. J Genet Hum, 1969. **17**(3): p. 317-24.
26. Lema, I. and J.A. Duran, *Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus*. Ophthalmology, 2005. **112**(4): p. 654-9.
27. Zhou, L., et al., *Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(7): p. 1117-24.
28. Jeyabalan, N., et al., *Genetic and genomic perspective to understand the molecular pathogenesis of keratoconus*. Indian J Ophthalmol, 2013. **61**(8): p. 384-8.
29. Heon, E., et al., *VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1029-36.
30. Verma, A., et al., *Investigation of VSX1 sequence variants in South Indian patients with sporadic cases of keratoconus*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 103.
31. Czugala, M., et al., *Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(4): p. 389-97.
32. Guan, T., et al., *The point mutation and polymorphism in keratoconus candidate gene TGFBI in Chinese population*. Gene, 2012. **503**(1): p. 137-9.
33. Engler, C., et al., *Transforming growth factor-beta signaling pathway activation in Keratoconus*. Am J Ophthalmol, 2011. **151**(5): p. 752-759 e2.
34. Onouchi, H., et al., *Mitochondrial superoxide anion overproduction in Tet-mev-1 transgenic mice accelerates age-dependent corneal cell dysfunctions*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(9): p. 5780-7.
35. Atilano, S.R., et al., *Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(4): p. 1256-63.
36. Pathak, D., et al., *Mitochondrial complex 1 gene analysis in keratoconus*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 1514-25.
37. Udar, N., et al., *SOD1: a candidate gene for keratoconus*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(8): p. 3345-51.
38. Stabuc-Silih, M., et al., *Polymorphisms in COL4A3 and COL4A4 genes associated with keratoconus*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 2848-60.
39. Droitcourt, C., et al., *A prospective study of filaggrin null mutations in keratoconus patients with or without atopic disorders*. Dermatology, 2011. **222**(4): p. 336-41.
40. Lechner, J., et al., *Mutational spectrum of the ZEB1 gene in corneal dystrophies supports a genotype-phenotype correlation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(5): p. 3215-23.
41. Hughes, A.E., et al., *Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(5): p. 628-33.
42. Manolio, T.A., *Genomewide association studies and assessment of the risk of disease*. N Engl J Med, 2010. **363**(2): p. 166-76.
43. Oftalmoloji, A.A., *Yüzey Hastalıkları ve Kornea*. 2012: Güneş Tıp Kitabevleri.

44. McGhee, C.N., *2008 Sir Norman McAlister Gregg Lecture: 150 years of practical observations on the conical cornea--what have we learned?* Clin Experiment Ophthalmol, 2009. **37**(2): p. 160-76.
45. Romero-Jimenez, M., J. Santodomingo-Rubido, and J.S. Wolffsohn, *Keratoconus: a review.* Cont Lens Anterior Eye, 2010. **33**(4): p. 157-66; quiz 205.
46. ÖZÇETİN, P.D.H., *Klinik Göz Hastalıkları.* 2003, Nobel Tıp Kitabevleri. p. 61-102.
47. Klyce, S.D., *Computer-assisted corneal topography. High-resolution graphic presentation and analysis of keratoscopy.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(12): p. 1426-35.
48. Rabinowitz, Y.S. and K. Rasheed, *KISA% index: a quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus.* J Cataract Refract Surg, 1999. **25**(10): p. 1327-35.
49. Sahin, A., N. Yildirim, and H. Basmak, *Two-year interval changes in Orbscan II topography in eyes with keratoconus.* J Cataract Refract Surg, 2008. **34**(8): p. 1295-9.
50. Muftuoglu, O., et al., *Posterior corneal elevation and back difference corneal elevation in diagnosing forme fruste keratoconus in the fellow eyes of unilateral keratoconus patients.* J Cataract Refract Surg, 2013. **39**(9): p. 1348-57.
51. Alio, J.L., et al., *Keratoconus-integrated characterization considering anterior corneal aberrations, internal astigmatism, and corneal biomechanics.* J Cataract Refract Surg, 2011. **37**(3): p. 552-68.
52. Maeda, N., et al., *Wavefront aberrations measured with Hartmann-Shack sensor in patients with keratoconus.* Ophthalmology, 2002. **109**(11): p. 1996-2003.
53. Oruçoğlu, F., *Evaluation of Keratoconus Eyes with Pentacam Topography and Comparison with Normal Eyes.* Türkiye Klinikleri Journal of Ophtalmology, 2012(3).
54. Fontes, B.M., et al., *Ability of corneal biomechanical metrics and anterior segment data in the differentiation of keratoconus and healthy corneas.* Arq Bras Oftalmol, 2010. **73**(4): p. 333-7.
55. Emre, S., S. Doganay, and S. Yologlu, *Evaluation of anterior segment parameters in keratoconic eyes measured with the Pentacam system.* J Cataract Refract Surg, 2007. **33**(10): p. 1708-12.
56. Li, X., H. Yang, and Y.S. Rabinowitz, *Keratoconus: classification scheme based on videokeratography and clinical signs.* J Cataract Refract Surg, 2009. **35**(9): p. 1597-603.
57. Prof Dr.Pinar Aydın O'Dwyer, P.D.Y.A.A., *Temel Göz Hastalıkları*, P.D.Y.A.A. Prof Dr.Pinar Aydın O'Dwyer, Editor. 2010, Güneş Tıp Kitabevleri: Ankara. p. 205-249.
58. Rasheed, K. and Y.S. Rabinowitz, *Surgical treatment of advanced pellucid marginal degeneration.* Ophthalmology, 2000. **107**(10): p. 1836-40.
59. Wilson, S.E. and S.D. Klyce, *Screening for corneal topographic abnormalities before refractive surgery.* Ophthalmology, 1994. **101**(1): p. 147-52.
60. Barnett, M. and M.J. Mannis, *Contact lenses in the management of keratoconus.* Cornea, 2011. **30**(12): p. 1510-6.
61. Thebpatiphat, N., et al., *Cataract surgery in keratoconus.* Eye Contact Lens, 2007. **33**(5): p. 244-6.
62. Bilgihan, K., et al., *Results of photorefractive keratectomy in keratoconus suspects at 4 years.* J Refract Surg, 2000. **16**(4): p. 438-43.
63. Kanellopoulos, A.J., *Comparison of sequential vs same-day simultaneous collagen cross-linking and topography-guided PRK for treatment of keratoconus.* J Refract Surg, 2009. **25**(9): p. S812-8.

64. Wittig-Silva, C., et al., *A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results*. J Refract Surg, 2008. **24**(7): p. S720-5.
65. Raiskup-Wolf, F., et al., *Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results*. J Cataract Refract Surg, 2008. **34**(5): p. 796-801.
66. Sharma, A., et al., *Persistent corneal edema after collagen cross-linking for keratoconus*. Am J Ophthalmol, 2012. **154**(6): p. 922-926 e1.
67. Gokhale, N.S., *Corneal endothelial damage after collagen cross-linking treatment*. Cornea, 2011. **30**(12): p. 1495-8.
68. Pinero, D.P. and J.L. Alio, *Intracorneal ring segments in ectatic corneal disease - a review*. Clin Experiment Ophthalmol, 2010. **38**(2): p. 154-67.
69. Gordon, M.O., et al., *Baseline factors predictive of incident penetrating keratoplasty in keratoconus*. Am J Ophthalmol, 2006. **142**(6): p. 923-30.
70. Javadi, M.A., et al., *Outcomes of penetrating keratoplasty in keratoconus*. Cornea, 2005. **24**(8): p. 941-6.
71. Busin, M., et al., *Outcomes from a modified microkeratome-assisted lamellar keratoplasty for keratoconus*. Arch Ophthalmol, 2012. **130**(6): p. 776-82.
72. Melles, G.R., et al., *A new surgical technique for deep stromal, anterior lamellar keratoplasty*. Br J Ophthalmol, 1999. **83**(3): p. 327-33.
73. Basu, S. and V.S. Sangwan, *Deep anterior lamellar keratoplasty for resolved hydrops*. Cornea, 2011. **30**(9): p. 1067; author reply 1067-8.
74. Lindahl, T., *Repair of intrinsic DNA lesions*. Mutat Res, 1990. **238**(3): p. 305-11.
75. Johnson, R.T., et al., *DNA repair under stress*. J Cell Sci Suppl, 1987. **6**: p. 263-88.
76. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(1): p. 291-8.
77. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.
78. Taylor, R.M., et al., *A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 735-40.
79. Nickson, C.M. and J.L. Parsons, *Monitoring regulation of DNA repair activities of cultured cells in-gel using the comet assay*. Front Genet, 2014. **5**: p. 232.
80. Shaposhnikov, S., E. Frengen, and A.R. Collins, *Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization--a review*. Mutagenesis, 2009. **24**(5): p. 383-9.
81. *OxiSelect Comet Assay Kit (3-Well Slides)*, I. Cell Biolabs, Editor., Cell Biolabs, Inc: San Diego, CA.
82. Moller, P., et al., *The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(10): p. 1005-15.
83. Green, M.H., et al., *Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells*. Methods Enzymol, 1996. **269**: p. 243-66.
84. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. Mol Biotechnol, 2004. **26**(3): p. 249-61.
85. Dinçer, Y., *DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay*. Türkiye Klinikleri, 2010. **30**(4).
86. McKelvey-Martin, V.J., et al., *The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review*. Mutat Res, 1993. **288**(1): p. 47-63.
87. Güner, U. and F.D. Muranlı Gökalp, *Balıklarda Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet Assay)* Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 2013. **3**(9): p. 103-114.

88. Behndig, A., et al., *Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(10): p. 2293-6.
89. Toprak, I., et al., *Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus*. Eye (Lond), 2014. **28**(3): p. 285-9.
90. Karamichos, D., et al., *In vitro model suggests oxidative stress involved in keratoconus disease*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4608.
91. Kalra, J., et al., *Protective effects of lazarooids against oxygen-free radicals induced lysosomal damage*. Mol Cell Biochem, 1994. **136**(2): p. 125-9.
92. Czarny, P., et al., *DNA damage and repair in Fuchs endothelial corneal dystrophy*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(4): p. 2977-83.
93. Zhang, J., et al., *DNA damage in lens epithelial cells and peripheral lymphocytes from age-related cataract patients*. Ophthalmic Res, 2014. **51**(3): p. 124-8.
94. Mozaffarieh, M., et al., *Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1584-8.
95. El-Sayed, N.M. and E.M. Aly, *Toxoplasma gondii infection can induce retinal DNA damage: an experimental study*. Int J Ophthalmol, 2014. **7**(3): p. 431-6.
96. Wojcik, K.A., et al., *Polymorphism of the DNA base excision repair genes in keratoconus*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 19682-99.
97. Aslam, T., et al., *European survey on the opinion and use of micronutrition in age-related macular degeneration: 10 years on from the Age-Related Eye Disease Study*. Clin Ophthalmol, 2014. **8**: p. 2045-53.