

Kornea Onarımında Kullanılan Destek Materyaller

Scaffolds for the Regeneration of Cornea: Review

Seren KAYIRAN,^a
Sibel BOZDAĞ,^a
Dr. Hasan Basri ÇAKMAK,^b
Dr. Emir Baki DENKBAŞ,^c
Dr. Nurşen ÜNLÜ^a

^aFarmasötik Teknoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,

^b1. Göz Hastalıkları Kliniği,
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
^cKimya Bölümü, Biyokimya AD,
Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 17.06.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 23.09.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Nurşen ÜNLÜ
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji AD, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
nunlu@hacettepe.edu.tr

ÖZET Görme keskinliğini ciddi bir şekilde azaltması ve bazen eşlik eden komplikasyonlar ile gözün kaybına yol açabilmesinden dolayı kornea hastalıkları, göz hastalıkları arasında özel bir öneme sahiptir. Korneada görülen bu hastalıklar sonucunda korneada erozyon, ülser, ödem ve vaskülarizasyon gibi hasarlar meydana gelmektedir. Kornea esas olarak damarsız bir doku olduğundan sistemik olarak uygulanan ilaçlar korneaya ulaşamazlar ve bu nedenle de korneal hastalıkların tedavisinde topikal uygulama tercih edilir. Çözeltiler, süspansiyonlar ve merhemler gibi konvansiyonel göz preparatları göze topikal olarak uygulanınca, göz kırpması ve göz yaşı salımı gibi gözün savunma mekanizmaları nedeniyle uygulanan ilaçtan %1-5 civarında yararlanım sağlanır. Bu nedenle istenilen etkin madde konsantrasyonunu sağlayabilmek için sık ilaç uygulaması gerekmektedir. Bu durum, hasta uyuncunun olumsuz etkilenmesinin yanında, etkin maddenin yan etkilerinin de ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca hastalıklar sonucunda korneada meydana gelen hasarlar oldukça ciddidir ve kornea rejenerasyonunun sağlanabilmesi için ilaç tedavisinin yanı sıra hasarlı bölgeye hücre aktarımı da gerekmektedir. Göze uygulanan formülasyonun oküler biyoyararlanımının artırılmasını sağlayan yaklaşımlardan biri ilacın destek matris (yapı iskelesi=scaffold)ler içine hapsedilerek etki bölgesinde kontrollü bir şekilde salınmasını sağlamaktır. Bu şekilde ilacın biyoyararlanımının artırılması ve sık uygulamanın neden olduğu istenmeyen yan etkilerin ortadan kaldırılarak hasta uyuncunun artırılması öngörülmektedir. Bu sistemler sayesinde hasarlı bölgede etkin madde salımıyla birlikte hücre aktarımı da yapıldığından kornea rejenerasyonu sağlanabilmektedir. Böylece doku iskeleleri yerleştirildikleri bölgede hem doku onarımını sağlayarak, hem de etkin madde için taşıyıcı sistem oluşturarak hasarlı bölgede tedaviyi gerçekleştirmektedir. Bu derlemede korneal yapı iskelelerinin üretimi, kullanım alanları ve hazırlanmalarında kullanılan polimerler değerlendirilecektir. Buna ilaveten, yapı iskelesi hazırlamada kullanılan kollajen, çapraz bağlı kollajen, kollajen- glikozaminoglikan, kollajen-kitosan-sodyum hiyaluronat, sodyum aljinat ve kitosan polimerleri ile yapılan araştırmalar ile ilgili literatür örnekleri sunulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Topikal uygulama, yapay göz, doku iskeleleri

ABSTRACT Corneal disorders have a significant importance among eye diseases, as it might cause visual impairment and eventually to blindness. As a result of corneal diseases, some damages such as erosion, ulcer, edema and vascularisation may occur on the surface of cornea. Since cornea is avascular membrane, the drugs applied systemically can not reach to it and, therefore topical drug application is preferred in the treatment of corneal diseases. Conventional ophthalmic preparations such as solutions, suspensions, ointments have poor bioavailability because of rapid precorneal clearance, induced lacrimation, and normal tear turnover. Therefore, daily frequent instillation of the solution is necessary to achieve a therapeutic effect. The frequent use of solutions may cause side effects and patient in compliance. Furthermore, since the damages result from corneal diseases are severe, it is necessary to carry out cell transfer in addition to drug therapy. One of the approaches to increase ocular bioavailability of drug formulations is preparation of drug loaded scaffolds in order to provide controlled and local drug delivery. Therefore, frequent drug application to the eye and patient in compliance can be avoided by this system. Finally, drug loaded scaffolds can achieve the cell transfer and drug delivery to the corneal area in order to treat damaged tissue. In this review, the preparation and application of corneal scaffolds and polymers used for the production of these systems will be evaluated. Furthermore, research studies on corneal scaffolds prepared with collagen, cross-linked collagen, collagen-glycozaminoglican, collagen-chitosan-sodium hyaluronate, sodium alginate or chitosan polymer will be presented.

Key Words: Topical administration, artificial eye, tissue scaffolds

KORNEANIN ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Göz küresinin dışarıya bakan ön kısmını saydam özellikte ve damarsız olan kornea oluşturur. Kornea, göze uygulanan ilaçların oküler yararlanımı açısından en önemli emilim bölgesidir.¹⁻⁹ Genel olarak beş tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar dıştan içe doğru epitel, “Bowman” membranı, stroma, “Descemet” membranı ve endotel olarak isimlendirilir.² Korneanın şematik gösterimi Şekil 1’de verilmiştir.³

Kornea esas olarak damarsız olduğundan sistemik uygulanan ilaçlar korneaya ulaşamazlar ve bu nedenle de korneal hastalıkların tedavisinde topikal uygulama tercih edilir.¹⁰

Konjunktiva membranı ise göz akınının dış ve göz kapaklarının iç yüzeyini kaplayan bol damarlı bir epitel membranıdır. Konjunktiva, korneanın aksine kan damarları açısından zengin bir membrandır. İlacın gözün iç dokularına ulaşması ve etkisini göstermesi için esas olarak korneadan emilmesi gerekmektedir. Göze uygulanan ilacın bir kısmı konjunktiva tarafından da emilir. Ancak konjunktivadan emilen ilaç, çok sayıda kan damarları nedeniyle büyük oranda sistemik dolaşıma geçmektedir. Korneal olmayan bu emilim yolu göze uygulanan bazı ilaçların sistemik yan etkisinin görülmesine yol açabilir.¹⁰

KORNEA HASARLARI

Kornea hastalıkları görme keskinliğini ciddi bir şekilde düşüren durumlara neden olabilmeleri ve bazen eşlik eden komplikasyonların gözün kaybına yol açabilmesinden dolayı göz hastalıkları arasında özel bir öneme sahiptir.⁸ Korneada bu tip hastalıklar sonucunda erozyon, korneal ülser, kornea ödemi ve vaskülarizasyon gibi hasarlar meydana gelebilir. Korneanın yüzeyel katlarındaki kayıplar ekfoliasyon, “Bowman” membranına kadar olan tam kat kayıplar ise erozyon olarak adlandırılır.¹ Kornea ülseri, “Bowman” membranı ve daha derin katları tutan kayıplardır. Kornea ödemi, endotel hücre kaybı ve hücreler arasında sıvı toplanmasıyla kornea saydamlığının kaybolmasıdır.⁸ Vaskülarizasyon ise, trahom, kimyasal yanık, uzun süren

ülser, interstisyel keratit vb. durumlarda damarsız korneanın damarlanmasıdır.¹

KORNEA HASARLARINDA GİRİŞİMSSEL TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

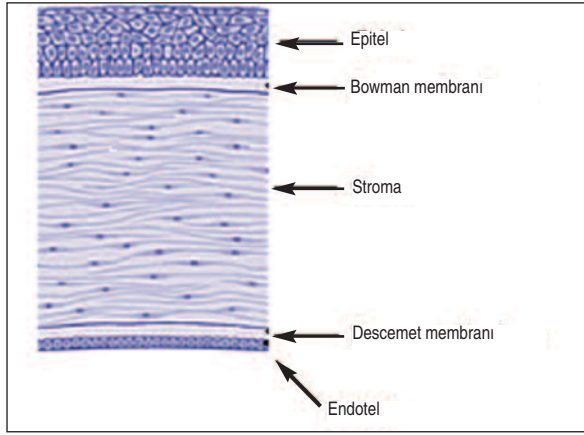
KERATOPLASTİ

Kornea transplantasyonu veya kornea greftleme olarak adlandırılan keratoplasti, kişinin anormal dokusunun sağlıklı donör kornea dokusu ile değiştirilmesi işlemidir.¹¹

Kornea nakli, genetik olarak geçiş gösteren bazı kornea hastalıklarında, göz ameliyatı sonrasında korneanın şeffaf kalmasını sağlayan hücrelerin hasar görmesi sonucunda, enfeksiyon nedeni ile korneada yara dokusu ve yeni damarlanma oluşması halinde (herpes keratiti sonrası), korneanın doğal kubbe şeklinin bozularak konikleşmesi durumunda (keratokonus), kazalar nedeniyle kornea bulanıklaşmasında veya bütünlüğünün ağır derecede bozulmasında ve kornea nakli ameliyatı sonrası görülen redlerde yapılabilir. Bazı durumlarda görme bozukluğunun yanı sıra şiddetli ağrı da olabilir. Kornea nakli ile görmenin düzeltilmesi, ağrının azaltılması ya da göz bütünlüğünün korunması sağlanabilir.¹¹

Günümüzde keratoplasti en sık ve başarılı olarak yapılan homolog organ naklidir. Keratokonus gibi kornea patolojisi olan kişilerde kornea nakli yüksek başarı oranına sahiptir. Ancak ameliyat sonrasında keratoplasti hastalarının hepsinde aynı başarı beklenemez. Yüksek risk grubu olarak kabul edilen hasta grubunda başarı oranı daha düşüktür.¹² Keratoplasti için yüksek risk grubu; alkali yanığı, kornea vaskülarizasyonu, “herpes simpleks keratiti”, göz yaşı yetersizliği, oküler yüzey hastalıkları, azalmış kornea yüzey hassasiyeti, daha önce geçirilmiş başarısız keratoplasti ve glokom öyküsü olan hastalardır.^{13,14}

Günümüzde gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere pek çok ülke ciddi bir donör eksikliği ile karşı karşıya bulunmaktadır.¹⁵ Bu nedenle göz bankası sistemini geliştirmek için pek çok ülkede çeşitli stratejiler uygulanmaktadır. Ancak bu durum göz kaynaklarında yalnızca çok küçük bir artışa neden olmuştur. Kornea körlüğü vakalarının gittikçe art-



ŞEKİL 1: Korneanın tabakaları.³

tığı gelişmiş ülkelerde sağlıklı donör doku oranı da oldukça düşüktür. Bütün bu durumlardan dolayı bu hastalar için zarar görmüş korneanın yapay bir materyal ile değiştirilmesi uygun bir alternatiftir.¹⁶

YAPAY KORNEALAR

Yapay kornea oluşturmak için yapılan ilk girişim 1951 yılında Harold Ridley tarafından gerçekleştirilmiştir. Ridley, intraoküler lense polimetilmetakrilat implantasyonu yapmıştır. 1951 yılından bu zamana kadar pek çok araştırmacı keratoprotez veya "kpro's" olarak bilinen kornea protezleri geliştirmek için çok sayıda sentetik polimer kullanmışlardır. Son yıllarda araştırmalar sentetik polimerlerin kullanıldığı, biyogeçimliliği arttırmaya yönelik modifikasyonlar yapılmış protezler üzerine yapılmaktadır.¹⁷ Sürekli elde edilebilmeleri, hastalığın diğer dokulara geçiş riskini azaltmaları ve ameliyat sonrası şekil değişikliklerini önlemeleri sentetik polimerleri çok çekici hale getirmektedir.¹⁸ Son zamanlarda hücre bazlı, doku mühendisliğince yapılmış kornea eşdeğerleri doğal dokuyu taklit etmesi, doğal olarak konakçının vücuduyla birleşmesi, uyum sağlaması gibi özellikleri nedeniyle hasta tedavisinde büyük rol oynamaktadır. Genel olarak günümüzde yapay kornealar keratoprotezler ve korneal "scaffold"lar olarak ikiye ayrılmaktadır.¹⁷

Keratoprotezler

Keratoprotezler sentetik polimerlerin kullanıldığı, biyogeçimliliği arttırmaya yönelik modifikasyonlar yapılmış protezlerdir.¹⁸ Genel olarak üç değişik tip-

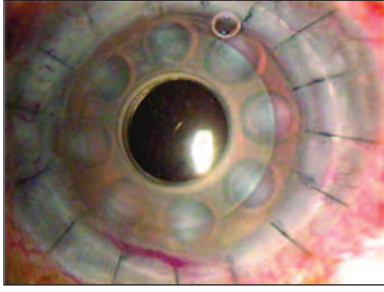
te tasarlanabilirler. Tip 1 keratoprotezler en yaygın uygulanan protezlerdir. Stroma içine intralamellar olarak yerleştirilmiş bir tabaka ile tutulan veya transplante edildiği doku ya da göz kapağı derisi ile çevrilmiş şeffaf bir gövdeden oluşur. Bu keratoprotezlerde optik kısmı oluşturmak için çoğunlukla polimetil metakrilat (PMMA) kullanılır. PMMA, tamamen şeffaf ve inert olup, standart intraoküler lenslerde de kullanılan bir polimerdir. Tip 2 keratoprotezler son zamanlarda geliştirilmiş yeni sistemlerdir. Porları sayesinde doku büyümesine izin veren gözenekli bir yapı ile çevrili şeffaf bir tabakadan oluşurlar.¹¹ Bu protezler genel olarak politetrafloroetilen, poliüretan veya modifiye hidrojelardan oluşurlar.¹⁹⁻²² Tip 3 keratoprotezler daha az yaygın sistemler olup, birbirleriyle gövdeden birleşmiş iki tabakadan oluşan protezlerdir.²³⁻²⁷ Bu yapı hasta korneasına yerleştirildiğinde korneal doku sandviç şeklinde iki tabaka arasına girer.¹¹

Günümüzdeki tasarımların pek çoğu gözenekli tabaka içinde korneal stromanın fibroblast büyümesi yoluyla materyale sabitlenmesine odaklanmıştır. Bu teknik genellikle başarılı olsa da inflamasyon oluşumu gibi bazı komplikasyonlar bildirilmiştir.²⁸

Amerikan laç ve gıda kurumu (FDA) tarafından onay almış keratoprotezler

Keratoprotezler üzerinde pek çok çalışma olmasına rağmen henüz iki tip keratoprotez FDA tarafından onay almıştır.²⁹ Bunlardan birincisi "Dohlman-Doane" keratoprotezleridir (Resim 1). Bu keratoprotezler çift tabakalı veya tasma-düğme şekilli olup, genellikle pek çok doku veya yüzey tarafından çevrelenmiş, kornea içine yerleştirilmiş PMMA optik merkez kısımdan oluşmaktadır. "Dohlman-Doane" keratoprotezlerinin iki tipi vardır. Birinci tip protezler PMMA'dan yapılmış olup en sıklıkla kullanılan keratoprotezlerdir ve bir ön plaka, orta kısım, arka plaka ve korneal greftin beslenmesini ve hidrasyonunu sağlayan 8 boşluktan oluşmuşlardır.^{30,31} İki plakanın kendiliğinden gevşemesini engellemek ve yapıyı sağlamlaştırmak amacıyla son zamanlarda proteze titanyum kilitli halka eklenmiştir.

İkinci tip Dohlman-Doane protezleri oküler yüzey hastalıklarının son döneminde olan hastala-

RESİM 1: "Dohlman- Doane" keratoprotezleri.^{32,33}

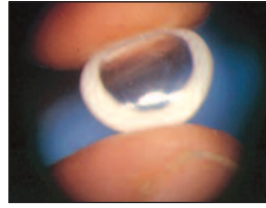
ra uygulanmaktadır. Bu keratoprotezler deriden penetre olabilmesi için 2 mm uzunluğunda bir ön çıkıntı şeklinde tasarlanmıştır. Protezin diğer kısımları tip 1 protezler ile benzerdir. Bu tip keratoprotezler daha karmaşık bir cerrahi işlem ve işlem sonrası sık kontrol gerektirir.³⁴

FDA tarafından onaylanan diğer keratoprotez olan "AlphaCor", hidrofilik bir polimer olan poli (2-hidroksietil metakrilattan (pHEMA) yapılmış keratoprotezlerdir (Resim 2).³⁵ Ayrıca protezin konakçı korneasına biyointegrasyonuna izin veren gözenekli sünger bir tabaka ile çevrili optik merkez kısmı bulunmaktadır. Bu protezler korneal stromal lameller cebe iki aşamalı bir işlemle implante edilirler.^{35,36}

Keratoprotezlerde kullanılan polimerler

Keratoprotezlerin geliştirilmesinde çok çeşitli sentetik polimerler denenmiştir. En başarılı sonuçlar hidrojellerle, özellikle de pHEMA ile elde edilmiştir.¹⁶ Hidrofilik yapıları nedeniyle hidrojeller mükemmel biyomedikal malzemelerdir. Tam şeffaflıkları, ışık yayıcı özellikleri ve küçük molekül ağırlıklı besinlere karşı geçirgenlikleri özellikle oftalmolojik kullanım için pHEMA'ları çekici hale getirmektedir. Bu protezler uzun süreli implantasyonlarda kalsifikasyon sorunu oluşabilmektedir.³⁸ Sentez koşullarının iyileştirilmesi ve mekanik özelliklerinin geliştirilmesine rağmen, polimerlerin zayıf mekanik özellikleri hala önemli bir problem oluşturmaktadır.^{17,39}

Legeais ve ark., gözenekli yarı saydam PTFE tabakası ve silikon kauçuk ile kaplanmış, polivinilpirolidon (PVP) merkez optik kısımdan oluşan bir keratoprotez modeli geliştirmişlerdir.^{40,41} Araştır-

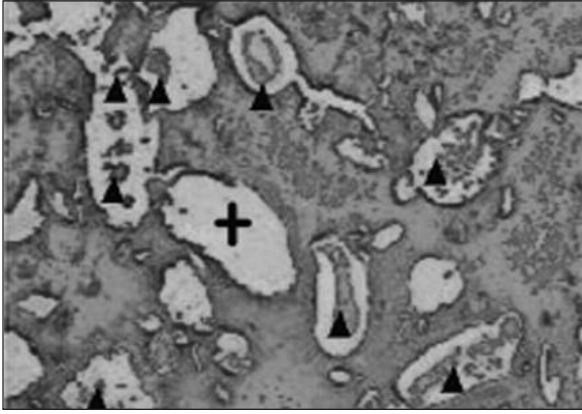
RESİM 2: AlphaCor keratoprotezleri.^{32,37}

macılar polidimetilsiloksan/politetrafloroetilen (PDMS/PTFE) arayüzeyinin orijinal PMMA'a göre üstünlükleri bulunmasına rağmen, epitelizasyon eksikliğine bağlı problemlerin ortaya çıkabileceğini bildirmiştir.

Fenglan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, gözenekli nanohidroksiapatit/poli vinil alkol (n-HA/PVA) hidrojel tabakası ve transparan PVA hidrojeli merkez kısım olarak kullanılarak yapay kornea modeli oluşturulmuş ve tavşan gözüne yerleştirildikten sonra in vivo olarak değerlendirilmiştir.⁴² Sonuçlar histolojik olarak değerlendirildikten sonra geliştirilen yapay kornea klinik kullanım için potansiyel bir model olarak değerlendirilmiştir (Resim 3).

Polibütülen/polipropilen ağ ve polietilen tereftalat da gözenekli tabaka oluşturmak için bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır.⁴³

Oftalmik uyumluluğu, mükemmel mekanik özellikleri ve yüksek oksijen geçirgenliği nedeniyle PDMS keratoprotez geliştirilmesinde pek çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır.⁴⁴⁻⁴⁶ Ancak, PDMS'nin zayıf besin ve su geçirgenliği, aşırı derecede hidrofobik yapısı nedeniyle başarılı bir protez için çeşitli modifikasyonların yapılması gerekmektedir. Lee ve ark., PDMS'nin yüzeyini düzeltmek



RESİM 3: Yapay kornea taşıyan gözün operasyondan 6 ay sonraki histolojik görüntüsü (büyütme: x100). Porlarda (+) kolajen (▲) görülmektedir.⁴²

ve ıslanabilirliğini arttırmak için bu polimerin yüzeyinde pHEMA'nın plazma polimerizasyonunu kullanmışlardır.⁴⁶ Plazma polimerizasyonu ile hazırlanmış filmlerin uzun süreli stabilite incelemesinde, plazmanın aktivasyon olasılığı nedeniyle kullanımları kısıtlı olmuştur.

Poliüretanlar ve orijinal perfloroeterler de potansiyel keratoprotez materyalleri olarak araştırılmıştır.^{47,48} Yapılan çalışmalarda porozitelerinin iyi olduğu, glukoz, insülin ve insan serum albüminine karşı yüksek geçirgenlik gösterdikleri bildirilmiştir.

Keratoprotez geliştirmek için kullanılan bir diğer polimer polivinil alkol (PVA)'dür.^{49,50} Düşük sıcaklıkta kristalize olabilen PVA şeffaftır ve keratoprotezler için uygun mekanik özelliklere sahiptir.⁵¹ Saf PVA düşük hücre afinitesi göstermesine rağmen tip 1 kollajenin PVA'ün yüzeyine immobilize edilmesi sonucunda bu özelliği geliştirilmiştir. Günümüzdeki çalışmalar PVA-kollajen kombinasyonunun doğal kornea ile benzer fizyolojik ve morfolojik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.⁵²

Keratoprotezlerin dezavantajları

Keratoprotezler çok büyük avantajlara sahip olsa da implantasyon sonrası ortaya çıkan komplikasyonlar, keratoprotezlerin başarısızlığına yol açmaktadır. Keratoprotezlerle ilgili en önemli problem yapay korneanın ön yüzünde epitelizeasyonun gerçekleşmemesidir. Devamlı bir epitel ta-

bakasının olmaması bakteriyel enfeksiyonlara, göz yaşı filminin yayılımında bozukluklara ve epitelin büyüme geriliğine neden olur.⁵³ Protezlerin uzun zamanlı stabilitesini sağlamak için epitelizeasyonu desteklemeye yönelik çalışmalar devam etmektedir.¹⁷ Ayrıca keratoprotezlerin tamamen kompleks kornea yapısına sahip olmaları ve canlı elementleri içermemeleri bu yapıların dezavantajlarını oluşturmaktadır.⁵⁴

Korneal Yapı İskeleleri

Doku mühendisliğinde son yıllarda meydana gelen ilerlemeler hastalıklı ya da hasarlı dokuların iyileştirilmesinde ümit vaatmektedir. Hastalıklı veya hasarlı dokuların iyileştirilmesinde 3 ana strateji söz konusudur. Bu stratejiler, yeni izole edilmiş veya kültür ortamında geliştirilmiş hücrelerin nakli, hücrelerden yapısal iskeleleriyle laboratuvar koşullarında oluşturulmuş dokuların nakli ve dokunun bulunduğu yerde kendi kendini yenilemesinin sağlanmasıdır. Hücre nakli için, hastadan ya da vericiden alınan hücrelerle, küçük hücre kümeleri kullanılır. Bunlar hasarlı dokuya doğrudan aşılanabilir gibi, bozunur bir yapı iskelesiyle laboratuvar ortamında birleştirildikten sonra da nakledilebilir. Doku naklinde, biyobozunur bir yapı iskelesiyle birlikte hastadan veya vericiden alınan hücreler kullanılarak laboratuvar koşullarında üç boyutlu tam bir doku elde edilir. Meydana getirilen doku kültürü olgun faza eriştiğinde hastanın vücuduna nakledilir. Yerinde yenileme tekniğinde ise, yapı iskelesi hasarlı dokuya doğrudan nakledilir ve vücut hücrelerini uyarak, yerel doku tamirine yardımcı olur. Hücre nakli için kullanılan kaynaklar, hastadan alınan "otolog" hücreler, hastayla immünolojik olarak benzerlik göstermeyen bir insan vericiden alınan "allogenik" hücreler ve farklı bir türden alınan "ksenogenik" hücreler olabilir. Bu işlemlerde kendi kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olan embriyonik kök hücreler kullanılabilir gibi, olgunlaşmanın farklı safhalarında bulunan hücrelerden oluşan karışımlar da kullanılabilir. Bazı yaklaşımlarda hücre karışımları kullanılmakla birlikte, çoğunlukla kök hücrelerin ayrılması ve zenginleştirilmesi yolu tercih edilir.^{17,55}

Korneal yapı iskelelerinin üretimi ve kullanım alanları

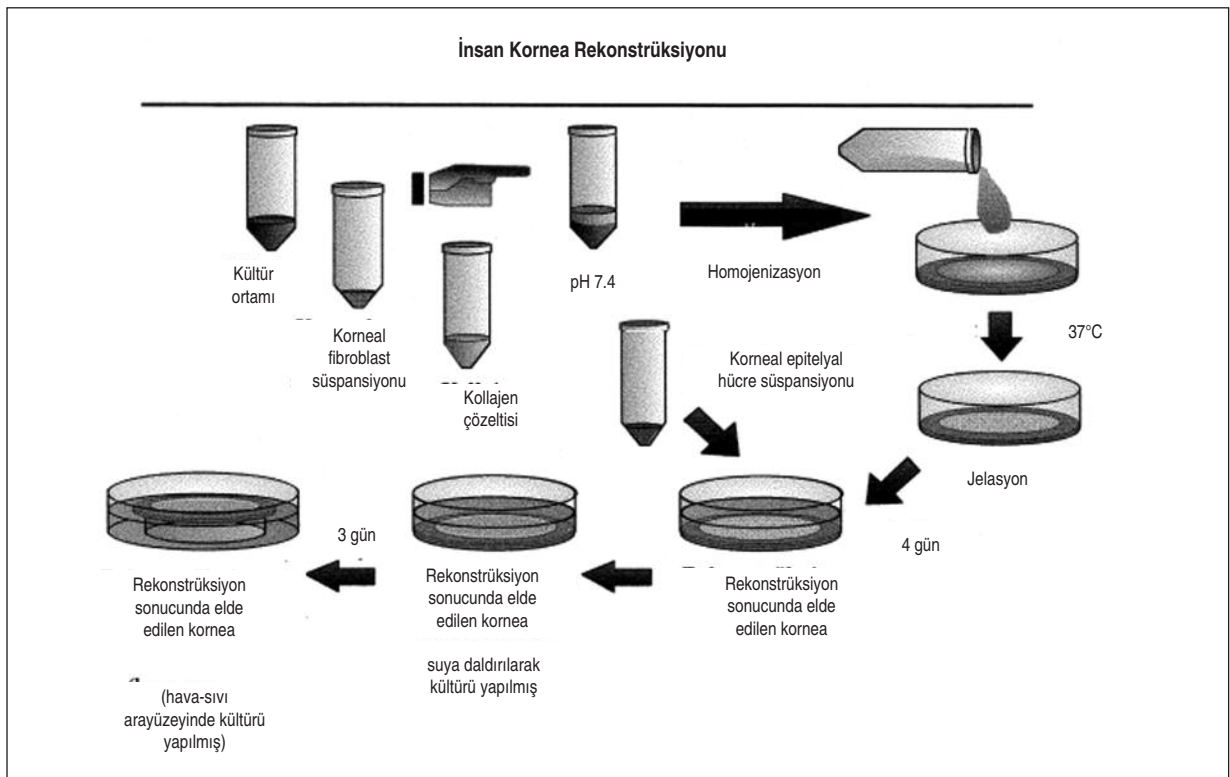
Korneal yapıların geliştirilmesinde ilk aşama insan kornea hücrelerinin in vitro olarak izolasyonu ve her bir hücre tipinin kültürünün yapılmasıdır. İkinci aşama stromanın üretilmesini kapsar ve son aşamada ise epitelin yapılandırılması yer alır. Kültür ortamı, korneal fibroblast süspansiyonu ve kolajen çözeltisi pH 7.4 tamponunda homojenize edildikten sonra besiyerlerine aktarılır ve 37°C'de jelleşmeye bırakılır. Jelleşmeden 4 gün sonra rekonstrükte edilmiş stroma elde edilir ve buna korneal epitelyal hücre süspansiyonunun ilave edilmesiyle rekonstrükte kornea elde edilmiş olur. Şekil 2'de kornea yapılarının geliştirilmesi şematik olarak gösterilmektedir.⁵⁵

Doku mühendisliğince üretilen yapı iskeleleri tek başlarına implant olarak veya hücre ekimi sağlanarak hücre yapı iskelesi kompozitleri olarak kullanılabilirler. Üç boyutlu doku taklitçisi olarak potansiyel klinik kullanımlarının yanı sıra doku mühendisliğince üretilen kornealar; canlı dokunun kompleks fizyolojisinin in vitro çalışmasını ince-

lenmesi ve farmakotoksisite çalışmaları açısından hayvan modellerine alternatif oluşturmak amacıyla kullanılabilirler.⁵⁶⁻⁵⁸

Doku mühendisliğinde ilaç taşıyıcı sistemlerin önemi de her geçen gün artmaktadır. Bu sistemler sayesinde ilacın yarılanma ömrü artırılabilmekte ve ilaç hedeflenmesi sağlanmaktadır. Doku rejenerasyonunda önemli olan büyüme faktörlerinin bu sistemler kullanılarak hasarlı dokuya hedeflendirilmesi ve dokuların in vivo yaşam sürelerinin artırılması üzerinde çalışmalar devam etmektedir.⁵⁹ Ayrıca DNA ve peptid taşıyıcı sistemler olarak da doku iskelelerinin kullanımı üzerine çalışmalar bulunmaktadır.^{60,61} Bu sayede hasarlı bölgede doku iskeleleriyle hücre aktarımı sonucu dokunun rejenerasyonu sağlanırken, bu sistemlere yüklenen ilaçla da hasarlı bölgede tedavi gerçekleştirilebilmektedir.⁶²

Doku mühendisliğindeki son gelişmeler kök hücre teknolojisi ve nano boyuttaki yapı iskeleleridir. Bu teknolojiyle insan kornealarının tamiri ve kornea benzeri dokuların yapımı gerçekleştirilmekte-



ŞEKİL 2: İnsan korneasının rekonstrüksiyonu (in vitro şartlarda yapılandırılması).⁵⁵

dir. İnsan kornea-limbal epitel tabakalarının fibrin üzerinde kültürü ile elde edilen greftler uzun süreli klinik etkinlik göstererek, hasar görmüş kornea yüzeyinin rejenerasyonunu sağlayabilmektedir.^{63,64} Ayrıca hasar görmüş göz dokusu, epitel hücrelerin amniyotik membranlar üzerinde kültürlerinin yapılmasıyla ve sıcaklığa hassas hücre kültür yüzeyleriyle onarılabilir.⁶⁵⁻⁶⁷ Stromal hücrelerle ön yüklem yapılmış veya asellüler destek olarak kullanılan yapı iskeleleri, özellikle hayvan modellerinde umut vaat edici sonuçlar vermektedir.⁶⁸⁻⁷⁰ Tamamen fonksiyonel kornea dokuları henüz tam anlamıyla gerçekleştirilmemiş olsa da, kollajen bazlı yapı iskeleleri kullanılarak in vitro olarak üç ana korneal tabakanın rekonstrüksiyonu (in vitro şartlarda yapılandırılması) yapılabilmektedir.^{56,57,71} Griffith ve ark. "Bowman" ve "Descemet" membranlarının kendi in vitro sistemlerinde spontan olarak oluşabildiğini bildirmektedirler.⁵⁷

Korneal yapı iskelelerinde kullanılan polimerler

Kornea doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin aşağıdaki özelliklere sahip olması istenir. Kornea için nonimmünojenik ve nontoksik olmalı, cerrahi olarak uygulanabilir olmalı ve dokuda inflamasyona neden olmamalıdır. Ayrıca kornea hücreleri kolaylıkla üzerine yapışabilmeli ve biyoparçalanma oranları devamlı bir doku rekonstrüksiyonu sağlayabilmelidir.⁷²

Kollajen, korneal ekstrasellüler matriksin esas proteindir ve kuru ağırlığının %70'ini oluşturur. Bu nedenle kollajen, korneal eş değer olarak potansiyel doku mühendisliği yapı iskeleleri oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Biyomalzemelerin sentezinde kollajenin kullanılmasının nedenleri, pek çok doku için toksik olmaması, uygun yapısal, fiziksel, kimyasal ve immünolojik özellikler taşımasıdır. Ayrıca kollajen büyük miktarlarda saf olarak elde edilebilmekte ve değişik formlarda kullanılabilir.⁷³

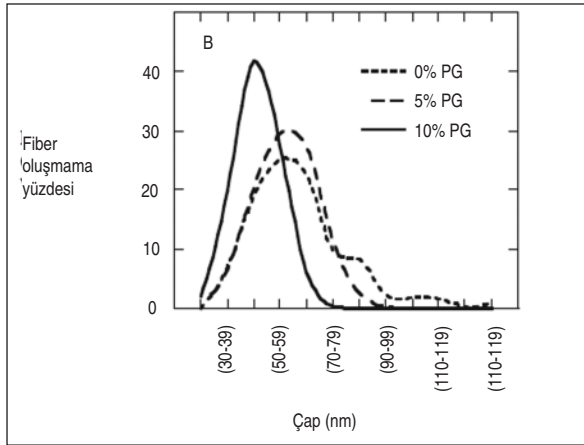
Germain ve ark., çalışmalarında, tam kalınlığa sahip kornea rekonstrüksiyonu yapabilmek amacıyla insan kornea hücreleriyle birlikte kollajen jeller kullanmışlardır.⁵⁵ Liu ve ark., çapraz bağlı kollajen jellerini tavşan ve domuz gözüne yerleştirdikten sonra etraftaki hücrelerden migrasyonu-

nu başarıyla sağlayabilen, epitel ve stromanın bir kısmından oluşan ön korneanın rekonstrüksiyonunu gerçekleştirmişlerdir.⁷⁰ Diğer stromal yapılar, kollajen jel, keratositlerden veya hücre hatlarından oluşan kollajen köpük bazlı olabilmektedir.^{56-58,74,75} Jeller genellikle yarı şeffaf ve kırılma olup yeni sentezlenen ekstrasellüler matriks oranı kısıtlıdır.⁷⁶ Köpükler ise yüksek oranda gözenekli bir yapıya sahip olup büyük miktarlarda ekstrasellüler matriks sentezine izin verir. Ancak kollajen fiberlerinin oryantasyonu bu yapılarda gerçekleşmez. Stromal hücreler yerleştirilmiş üç boyutlu fibröz poliglukolik asit yapı iskeleleriyle de başarılı sonuçlar elde edilmiş ve bu yapı stroma fonksiyonunu yerine getirmesi amacıyla tavşan gözüne uygulanmıştır.⁶⁷ Stromal yapıların mekanik özellikleri, korneanın görme fonksiyonunu sağlayabilmesi, göz kırpmaya ve intraoküler basınca karşı dayanıklı olabilmesi açısından çok önemlidir.^{77,78} Birçok çalışmada korneal implantların mekanik dayanıklılığının zamanla azaldığı gösterilmiştir.^{79,80}

Torbet ve ark.; tip 1 kollajen fibrillerinin oluşturduğu çoklu dikey tabakalardan meydana gelmiş korneal stroma benzeri yapı iskeleleri oluşturmak için manyetik yönlendirme kullanmışlardır.⁸¹ Manyetik yönlendirme sayesinde daha dayanıklı kollajen jel yapısı elde etmişlerdir. Bu yapıları oluştururken %5 ve %10 oranında proteoglikanları da kullanmışlar ve bu sayede fibril çapını küçülterek ve fibrillerin yan yana birleşmesini önleyerek kollajen fibrillerinin oluşturduğu jel yapının şeffaflığını arttırmışlardır. Buna göre elde edilen sonuçlar Şekil 3'te görülmektedir.

Borene ve ark., tip 1 sığır dermal kollajenini kullanarak insan korneal fibroblastlarını içeren üç boyutlu kollajen sünger matriks modeli geliştirmişler ve bu modeli 21 gün süre ile inkübasyona bırakmışlardır.⁷⁹ Bu süre içerisinde, yapının mekanik özelliklerini ve hücre davranışlarını incelemişlerdir. Aynı araştırmacılar daha önce yaptıkları bir çalışmada ise, kollajen veya proteoglikan matrikste stromal fibroblastların migrasyonunun ve kollajen matriks içindeki yerleşiminin uygun olduğunu göstermişlerdir.⁸²

Saf kollajen, normal olarak zayıf çapraz bağlı kollajen olarak bulunmaktadır. Bu yüzden doku



ŞEKİL 3: Proteoglikan konsantrasyonunun fonksiyonu olarak fibril çapı dağılımı. Ortalama fibril çapları %0 PG konsantrasyonunda 62 ± 17.9 nm, %5 PG konsantrasyonunda 57 ± 11.6 nm, %10 PG konsantrasyonunda 46 ± 7.4 nm'dir.⁸¹

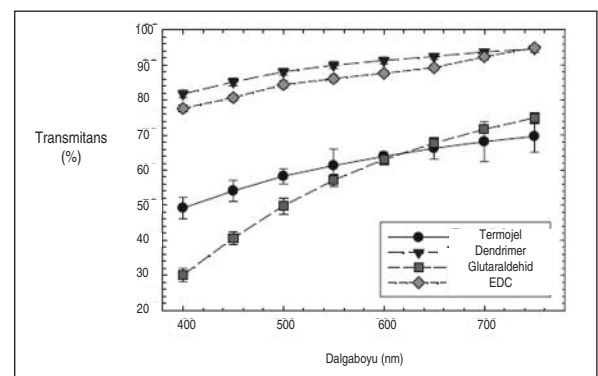
mühendisliği uygulamalarında yapının mekanik dayanıklılığını sağlamak için, uygun biyoyumlu moleküller kullanarak kollajen molekülleri arasında çapraz bağlama yapmak gerekir. Glutaraldehyd, kollajenin çapraz bağlanmasında sıklıkla kullanılır; ancak sitotoksik özelliğinin bulunması araştırmacıları daha farklı çapraz bağlama mekanizmalarına yöneltmiştir.⁸³⁻⁸⁶ Bu amaçla dehidrotermal işlem, ultraviole radyasyonu ve diizosiyanatlar, açıl azid ve 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) karbodiimid (EDC) gibi yeni kimyasal çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılmıştır.⁸⁷⁻⁹⁰ Glutaraldehyd, açıl azid ve heksametilen diizosiyanat da dahil olmak üzere pek çok çapraz bağlayıcı, kollajen molekülleri arasında kimyasal köprü oluşturarak çapraz bağlamayı gerçekleştirir. Ancak, EDC ile kollajen molekülleri doğrudan bağlanmaktadır.⁹¹

Duan ve ark., dilüe kollajen çözeltileri hazırlayarak çapraz bağlayıcı ajanlar olarak dendrimerleri kullanmışlar ve EDC ile çapraz bağlanan kollajen moleküllerine göre çapraz bağlanma oranının arttığını tespit etmişlerdir.⁹¹ Çalışmalarında glutaraldehydi de kontrol materyali olarak kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda dendrimer, EDC ve glutaraldehyd kullanılarak çapraz bağlanmış kollajenin şeffaflık özelliklerini, glukoz permeasyonunu ve mekanik dayanıklılığını değerlendirmişlerdir. Kollajen örneklerinin transmittans özelliği spektrofotometrik olarak değerlendirilmiş ve, EDC ile dendri-

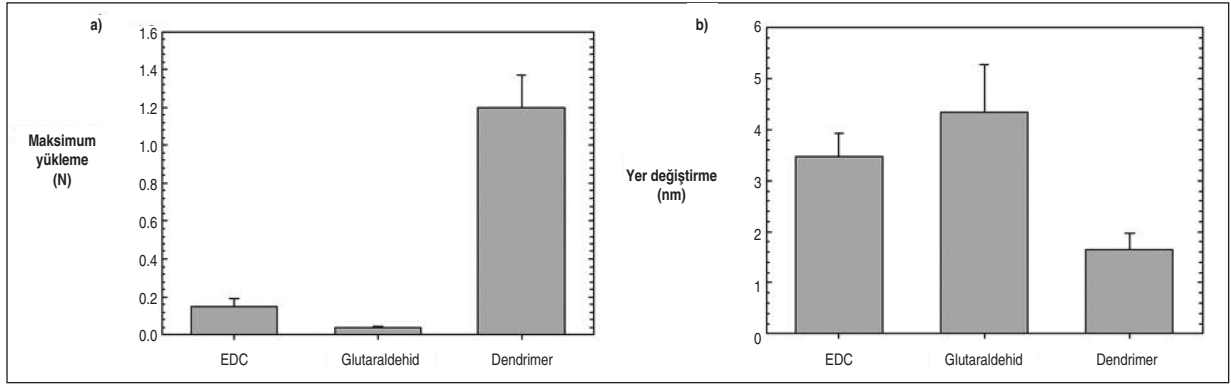
mer çapraz bağlı kollajen örneklerinin yüksek oranda şeffaf olduğu, diğer örneklerin ise opak veya yarı şeffaf olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4).

Araştırmacılar ayrıca doğal kornea yapısının yüksek besin geçirgenliğine sahip olduğunu dolayısıyla kornea yapı iskelelerinin glukoz geçirgenliğinin yüksek olması gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmada doğal kornea stromasının glukoz geçirgenliğinin yaklaşık olarak 0.7×10^{-6} cm²/s olduğu belirtilmiş ve %3 dendrimer ile çapraz bağlı kollajenin benzer veya daha yüksek ($0.8-1.1 \times 10^{-6}$) glukoz geçirgenliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna ilaveten araştırmacılar bu çalışmada kollajen örneklerinin mekanik dayanıklılıklarını da değerlendirmiş ve dendrimer ile çapraz bağlı kollajen örneklerinin en yüksek mekanik dayanıklılığı gösterdiğini, bu örneklerin esnekliğinin diğer örnekler göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır (Şekil 5).⁹¹

Uchino ve ark., PVA'ün yüzeyine tip 1 kollajeni immobilize etmişler ve bu materyali yapay kornea doku iskelesi olarak tasarlamışlardır.⁹² Araştırmacılar, PVA'üne kollajen immobilizasyonu sonucu PVA'ün hücre adezyon yeteneğinin arttığını ancak; in vivo olarak stabil bir epitelizasyon sağlanmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yaptıkları bir başka çalışmada, epitelizasyonu geliştirmek için amniyotik membran immobilize edilmiş PVA-kollajen hidrojel materyalini kullanmışlardır.⁹³ Amniyotik membranın PVA-kollajen yüzeyine bağlanmasında çapraz bağlayıcı olarak sitrik asidin bir türevini kullanmışlardır. Yaptıkları in vivo çalışmada PVA-AM yapısının PVA-COL



ŞEKİL 4: Kollajen örneklerinin dalga boyunun fonksiyonu olarak transmittans değerlerinin dağılımı.⁹¹



ŞEKİL 5: a) Değişik kolajen örneklerinin maksimum yükleme değerlerine göre dağılımı, b) Değişik kolajen örneklerinin maksimum yüklemeye yer değiştirme değerlerine göre dağılımı.⁹¹

yapısına göre epitelizasyonu daha çok geliştirdiği sonucuna varmışlardır.

Doillon ve ark., kollajen-glikozaminoglikan korneal yapı iskeleleri üzerinde çalışmışlardır.⁹⁴ Tip 1 kollajen ve kondroitin sülfat karışımı glutaraldehid ile çapraz bağlanmış, korneal epitel ve endotel hücrelerini ekleyerek ve eklemeyen korneal keratosit hücreleri yapı iskelelerine ilave edilmiştir. Elde edilen yapılar askorbik asit varlığında ve yokluğunda değerlendirilmiştir. Sonuçta elde edilen matriks şeffaf, dayanıklı, hücre büyümesini ve fonksiyonunu destekleyen ve kollajenazlarla parçalanmaya dayanıklı bir yapı olduğu tespit edilmiştir. Glutaraldehidin %0.02 konsantrasyonda maksimum hücre büyümesi ve çapraz bağlama sağladığı bildirilmiştir. Araştırmacılar ortama askorbik asit eklenmesinin matriks fonksiyonu üzerinde önemli bir etkisi olmadığını tespit etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada, stromal keratositlerin askorbik asit ile işlenmesinin korneanın esas bileşeni olan kollajenin sentezinde artışa neden olduğu gösterilmiştir.^{95,96}

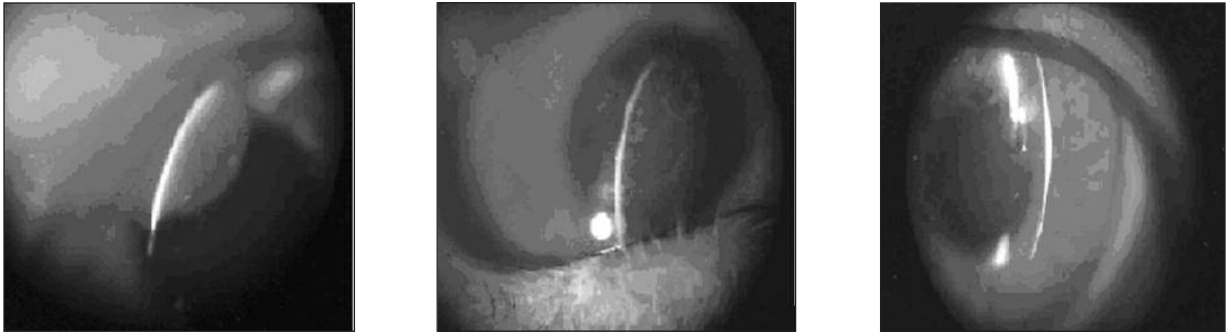
Kollajen, kitosan ve hiyaluronik asit, korneal ekstrasellüler matriks ile benzer yapısal özellikler gösteren doğal biyopolimerlerdir. Tip 1 kollajen, korneal doku mühendisliği uygulamalarında en fazla tercih edilen biyopolimerdir. Kitosan, düşük toksisite, mükemmel oküler tolerans, biyoadezyon ve permeabilite gibi pek çok önemli özelliğe sahiptir. Hiyaluronik asit ise, yüksek hidrasyon kapasitesine sahiptir ve migrasyon ve

proliferasyon gibi pek çok hücre fonksiyonunda rol oynar.⁹⁷

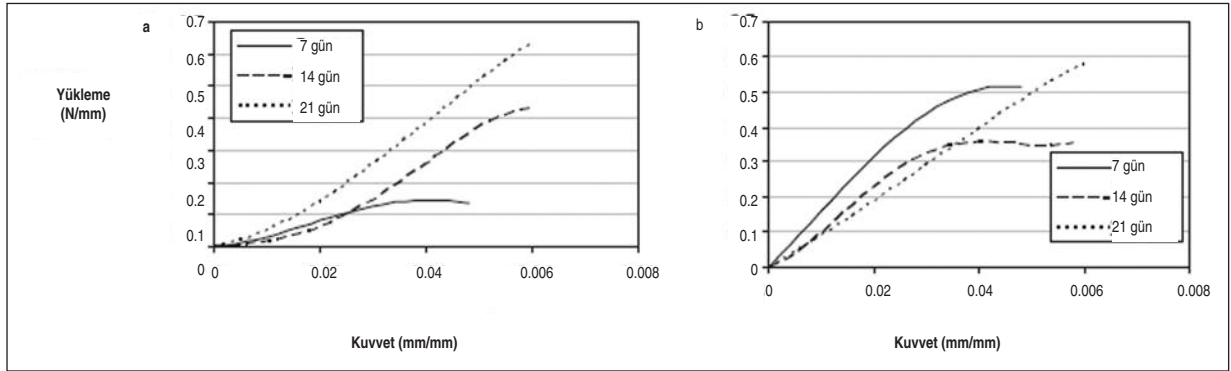
Chen ve ark., değişik oranlarda kollajen-kitosan-sodyum hiyaluronat kompleksleri hazırlamışlar ve bu kompleksleri tavşan gözüne implante ettikten sonra biyomateryallerin konakçı dokusuyla biyoyumluluğunu incelemişlerdir.⁹⁸ Bunun için implantasyon işleminden 5 ay sonra tavşan kornealarının "slit lamp" fotoğrafları çekilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Buna göre; %10 kitosan + %0.5 sodyum hiyaluronat korneada opaklaşma gösterirken (A), %30 kollajen + %10 kitosan + %0.5 sodyum hiyaluronat korneada yarı şeffaf bir görüntü (B) ve %20 kollajen + %10 kitosan + %0.5 sodyum hiyaluronat kompleksinin de şeffaf bir görüntü oluşturduğu bildirilmiştir (C) (Resim 4).

Zorlutuna ve ark.; keratositleri ve epitelyal hücreleri taşıyan yapı iskelelerini kullanarak oluşturdukları Poli(L-laktid-co-D,L-laktid)-poli(hidroksibütirik asit-ko-3-hidroksivalerik asit (P(L,DL-LA)-PHBV) film bazlı stromal tabakanın mekanik dayanıklılığını üç hafta boyunca in vitro olarak değerlendirmişlerdir.⁵⁴ Buna göre keratosit taşıyan yapı iskelelerinin mekanik dayanıklılığının epitelyal hücrelere göre daha fazla olduğunu bildirmişler ve bu durumu epitelyal hücrelerin keratositlere göre daha değişken oranlarda hücre büyümesine ve ekstrasellüler matriks deposiyonuna izin vermesiyle açıklamışlardır (Şekil 6).

Zorlutuna ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada da, biyoparçalanabilir ve biyoçeçimli P(L/DL)



RESİM 4: İmplantasyondan 5 ay sonraki kornea "slit-lamp" görüntüleri.⁹⁸



ŞEKİL 6: İnkübasyonun değişik dönemleri üzerinde hücre büyümesinin net etkisi: a) Keratosit taşıyan yapı iskeleleri, b) Epitelyal hücreleri taşıyan yapı iskeleleri.⁵⁴

LA-PHBV poliester taşıyıcıları, kornea tedavisinde kullanılmak üzere hücre bazlı filmlerde test edilmiştir.⁹⁹ D407 ve 3T3 hücreleri, korneanın epitel ve stroma tabakalarını oluşturmak amacıyla film taşıyıcılar üzerine ekilmiş ve 14 gün boyunca kültürleri yapılmıştır. Polimerlerin yüzeyi fibronektin ile kaplanarak yapının hücre adezyon yeteneği artırılmıştır. Çalışmanın sonucunda gözenekli yapıya sahip P(L/DL)LA-PHBV köpük karışımının kalın yapısı nedeniyle 3T3 fibroblastlarının homojen olarak yerleşmediği tespit edilmiş ancak yine de bu polimer karışımının ve mikropattern filmlerin korneanın stroma ve epitel tabakalarının rekonstrüksiyonunda potansiyel materyaller olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir.

Denkbaşı ve ark., epitel hücre tabakalarını içeren korneal yüzey oluşturmak amacıyla polimerik membranlar hazırlamışlardır.¹⁰⁰ Polimerik membranları hazırlamak amacıyla sodyum aljinat ve kitosanı kullanmışlardır. Tek başına sodyum aljinat kullanıldığında hazırlanan membranlar mekanik

olarak zayıf bulunmuş, sadece kitosan kullanıldığında ise çok sert yapılar elde edilmiş ve biyoparçalanabilirlik açısından birtakım zorluklarla karşılaşmıştır. Sodyum aljinat ve kitosanın birlikte kullanıldığı polimerik membranlarda mekanik dayanıklılık açısından karşılaşılan problemler ortadan kaldırılmıştır. Hücre büyümesi iki hafta sonunda hücre popülasyonlarının sayılmasıyla tespit edilmiş ve bu süre sonunda hücrelerin polimerik membran üzerine genişçe yayıldığı bildirilmiştir. Sonuçta sodyum aljinat ve kitosandan oluşan polimerik membranlar kornea onarımında hücre kültürü için potansiyel sistemler olarak değerlendirilmiştir.

SONUÇ

Kornea hasarları tedavi edilmediği takdirde kornea körlüğüne kadar varan sonuçlara yol açabildiğinden bu hasarlar ciddi olarak değerlendirilmelidir. Günümüzde gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere pek çok ülke ciddi bir donör eksikliği ile karşı kar-

şıya bulunmaktadır. Bu nedenle göz bankası sistemini geliştirmek için pek çok ülkede çeşitli stratejiler uygulanmaktadır. Ancak bu durum göz kaynaklarında yalnızca çok küçük bir artışa neden olmuştur. Ayrıca, kornea körlüğü vakalarının git-tikçe arttığı gelişmiş ülkelerde sağlıklı donör doku oranı da oldukça düşüktür. Verilen rakamlar dahilinde her yıl 300.000 hasta kornea transplantasyonu için beklemekte, donör yetersizliği nedeniyle ancak sadece 3000 hastada transplantasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Doku mühendisliğinde son yıllarda meydana gelen ilerlemeler hastalıklı ya da hasarlı dokuların iyileştirilmesinde ümit vaat-

mektedir. Yeni izole edilmiş veya kültür ortamında geliştirilmiş hücrelerin, hücrelerden ve laboratuvar koşullarında yapısal iskeletleriyle oluşturulmuş dokuların ve dokunun bulunduğu yerde kendi kendini yenilemesinin sağlanması ile hasarlı bölgede kornea rejenerasyonu sağlanabilmektedir. Doku mühendisliğindeki son gelişmeler doku da mevcut hasarın iyileştirilmesinde taşıyıcı yapı yardımıyla hücre aktarımının yanı sıra etkin madde yükleme gerekliliğini de gündeme getirmiştir. Böylelikle hasarlı bölgede hücre aktarımı ile doku onarımı sağlanırken, yüklenen etkin madde ile de tedavi sağlanabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Şimşek Ş. Göz Hastalıkları Cep Kitabı. Ankara: Özgür Matbacılık; 2007. p.69-77.
2. Mitra AK. Ophthalmic Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker Inc; 1993. p.29-55.
3. Wilson SA, Last A. Management of corneal abrasions. Am Fam Physicians 2004;70(1): 123-30.
4. Ünlü N, Selek H, İrkeç M, Şumnu M, Hincal A. Kuru Göz Hastalığı ve Yapay Gözyaşı Formülasyonları. Ankara: Grup Tanıtım; 2006. p.7-11.
5. Selek H, Ünlü N, Orhan M, İrkeç M. Evaluation of retinoic acid ophthalmic emulsion in dry eye. Eur J Ophthalmol 2000;10(2):121-7.
6. Bengisu Ü. Kornea: Göz Hastalıkları. Ankara: Palme Yayın Dağıtım; 1998. p.69-90.
7. Duke-Elder S, Wybar KC. The eye. Regional anatomy. The cornea, System of Ophthalmology. The anatomy of the visual system. London: H. Kimpton; 1961. p.92-131.
8. Miller SJH. Parsons Göz Hastalıkları. In: Özçetin H, editör. Teşhis ve Tedavi. Ankara: Atlas Tıp Kitapçılık; 1989. p.145-67.
9. Fırat T. Göz ve Hastalıkları. Ankara: Emel Mat.; 1980. p.63-7.
10. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989;30(4): 684-9.
11. Krachmer HJ, Mannis JM, Holland JE. Cornea. Surgery of the Cornea and Conjunctiva. Volume 2. China: Elsevier Inc.; 2005. p.1719-27.
12. Panda A, Vanathi M, Kumor A, Dash Y, Priya S. Corneal graft rejection. Surv Ophthalmol 2007;52(4):375-96.
13. Mader TH, Stulting RD. The high risk penetrating keratoplasty. Ophthalmol Clin North Am 1991;4:411-26.
14. Stulting RD, Waring GO 3rd, Brideges WZ, Cavanagh HD. Effect of donor epithelium on corneal transplant survival. Ophthalmology 1988;95(6):803-12.
15. 1999 Eye Banking Statistical Report. Washington: Eye Bank Association of America.
16. Hicks CR, Fitton JH, Chirila TV, Crawford GJ, Constable IJ. Keratoprosthesis: advancing toward a true artificial cornea. Surv Ophthalmol 1997;42(2):175-89.
17. Griffith M, Hakim M, Shimmura S, Watsky MA, Li F, Carlson D, et al. Artificial human corneas: scaffold for transplantation and host regeneration. Cornea 2002;21(7 Suppl):54-61.
18. Thompson KP, Hana K, Waring GO 3rd, Gipson I, Liu Y, Gailitis RP, et al. Current status of synthetic epikeratoplasty. Refractive Corneal Surg 1991;7(3):240-8.
19. Legeais JM, Renard G, Parel JM, Savoldelli M, Pouliquen Y. Keratoprosthesis with bioclonizable microporous fluorocarbon haptic: two-year study on 24 patients. Arch Ophthalmol 1995;113(6):757-63.
20. Caldwell DR. The soft keratoprosthesis. Trans Am Ophthalmol Soc 1997;95:751-802.
21. Leibowitz HM, Trinkaus-Randall V, Tsuk AG. Progress in the development of a synthetic cornea. Prog Ret Eye Res 1994;13: 605-21.
22. Chirila TV, Hicks CR, Dalton PD. Artificial cornea. Prog Polym Sci 1998;23:447-73.
23. Dorzee MJ. Kératoprothèse an acrylique. Bul Soc Belge Ophthalmol 1955;108:592-3.
24. Cardona H, Devoe AG. Prosthokeratoplasty. Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 1977;83(2):271-80.
25. Dohlman CH, Schneider HA, Doane MG. Prosthokeratoplasty. Am J Ophthalmol 1974;77(5): 694-70.
26. Kocaturk T, Dohlman CH. [Keratoprosthesis surgery.] Türkiye Klinikleri J Ophthalmol 2007; 16(1):47-55.
27. Sweeney DF, Xie RZ, O'Leary DJ, Vannas A, Odell R, Schindhelm K, et al. Nutritional requirements of the corneal epithelium and anterior stroma: clinical findings. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39(2):284-91.
28. Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Biological response to a synthetic cornea. J Control Release 1998;53(1-3):205-14.
29. Khan B, Dudenhofer EJ, Dohlman CH. Keratoprosthesis: an update. Curr Opin Ophthalmol 2001;12(4):282-7.
30. Dohlman CH, Dudenhofer EJ, Khan BF, Morenault S. Protection of the ocular surface after keratoprosthesis surgery: the role of soft contact lenses. CLAO J 2002;28(2):72-4.
31. Dudenhofer EJ, Nouri M, Gipson IK, Baratz KH, Tisdale AS, Dryja TP, et al. Histopathology of explanted collar button keratoprostheses: a clinicopathologic correlation. Cornea 2003;22(3):424-8.
32. İlhan-Sarac O, Akpek EK. Current concepts and techniques in keratoprosthesis. Curr Opin Ophthalmol 2005;16(4):246-50.
33. Belin MW. When Cornea Transplants Fail. What Next? Ophthalmology Management 2003;1-5.
34. Dohlman CH, Terada H. Keratoprosthesis in pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. Adv Exp Med Biol 1998;438:1021-5.

35. Hicks CR, Crawford GJ, Lou X, Tan DT, Snibson GR, Sutton G, et al. Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea, AlphaCor: device preliminary outcomes and complications. *Eye* 2003;17(3):385-92.
36. Crawford GJ, Hicks CR, Lou X, Vijayasekaran S, Tan D, Mulholland B, et al. The Chirila keratoprostheses: phase I human clinical trial. *Ophthalmology* 2002;109(5):883-9.
37. Martel JN, Graff JM, Goins KM, Sutphin JE. The evolution of surgical approaches to AlphaCor keratoprosthesis insertion and associated complications. *Eye Rounds* 2007;1-7.
38. Vijayasekaran S, Chirila TV, Robertson TA, Lou X, Fitton JH, Hicks CR, et al. Calcification of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea: a 3 month study. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11(6):599-615.
39. Lou X, Vijayasekaran S, Chirila TV, Maley MA, Hicks CR, Constable IJ. Synthesis physical characterization and biologic performance of sequential homointerpenetrating polymer network sponges based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mater Res* 1999;47(3):404-11.
40. Legeais JM, Drubaix I, Briat B, Pouliquen Y. 2nd generation bio-integrated keratoprosthesis. Implantation in animals. *J Fr Ophthalmol* 1997;20(3):42-8.
41. Legeais JM, Renard G. A second generation of artificial cornea (Biokroll). *Biomaterials* 1998;19(6):1517-22.
42. Fenglan X, Yubao L, Xiaoming Y, Hongbing L, Li Z. Preparation and in vivo investigation of artificial cornea made of nano-hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol) hydrogel composite. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(4):635-40.
43. Wu XY, Tsuk A, Leibowitz HM, Trinkaus-Randall V. In vivo comparison of three different porous materials intended for use in a keratoprosthesis. *Br J Ophthalmol* 1998;82(5):569-76.
44. Lloyd AW, Faragher RGA, Denyer SP. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* 2001;22(8):769-85.
45. Langefeld S, Kompa S, Redbrake C, Brenman K, Kirchoff B, Schrage NF. Aachen keratoprosthesis as temporary implant for combined vitreoretinal surgery and keratoplasty: report on 10 clinical applications. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238(9):722-6.
46. Lee SD, Hsueh GH, Kao CY, Chang PCT. Artificial cornea, surface modification of silicon rubber membrane by graft polymerization of pHEMA via glow discharge. *Biomaterials* 1996;17(6):587-95.
47. Bruin P, Meeuwse EAJ, van Andel MV, Worst JG, Pennings AJ. Autoclavable highly cross-linked polyurethane Networks in ophthalmology. *Biomaterials* 1993;14(14):1089-97.
48. Evans MD, Xie RZ, Fabbri M, Maidgan MC, Chacouk H, Beumer GJ, et al. Epithelialization of a synthetic polymer in the feline cornea: a preliminary study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(7):1674-80.
49. Kobayashi H, Ikada Y, Moritera T, Ogura Y, Honda Y. Collagen-immobilized hydrogel as a material for lamellar keratoplasty. *J Appl Biomater* 1991;2(4):261-7.
50. Trinkaus-Randall V, Wu XY, Tablante R, Tsuk A. Implantation of a synthetic cornea: design, development and biological response. *Artif Organs* 1997;21(11):1185-91.
51. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Honda Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;5(5):397-406.
52. Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, et al. Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76(11):56-63.
53. Latkany R, Tsuk A, Sheu MS, Loh IH, Trinkaus-Randall V. Plasma surface modification of artificial corneas for optimal endothelialization. *J Biomed Mater Res* 1997;36(1):29-37.
54. Zorlutuna P, Builles N, Damour O, Elsheikh A, Hasirci V. Influence of keratocytes and retinal pigment epithelial cells on the mechanical properties of polyester-based tissue engineering micropatterned films. *Biomaterials* 2007;28(24):3489-96.
55. Germain L, Carrier P, Auger AF, Salesse C, Guérin LS. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* 2000;19(5):497-527.
56. Germain L, Auger FA, Grandbois E, Guignard R, Giasson M, Boisjoly H, et al. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 1999;67(3):140-7.
57. Elçin YM. Tissue engineering. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 2008;1(2):36-43.
58. Builles N, Bechetoille N, Justin V, Andre V, Barbaro V, Iorio ED, et al. Development of a hemicornea from human primary cell cultures for pharmacotoxicology testing. *Cell Biol Toxicol* 2007;23(4):279-92.
59. Tabata II. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharm Sci Technol Today* 2000;3(3):80-9.
60. Nof M, Shea LD. Drug-releasing scaffolds fabricated from drug loaded microspheres. *J Biomed Mater Res* 2002;59(2):349-56.
61. Jaklenec A, Wan E, Murray ME, Mathiowitz E. Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29(2):185-92.
62. Denkbaş EB, Seyyal M, Pişkin E. 5-fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. *J Microencapsul* 1999;16(6):741-9.
63. Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349(9057):990-3.
64. Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72(9):1478-85.
65. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19(4):421-6.
66. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343(2):86-93.
67. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 2004;77(3):379-85.
68. Hu X, Lui W, Cui L, Wang M, Cao Y. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. *Tissue Eng* 2005;11(11-12):1710-7.
69. Li F, Carlsson D, Lohmann C, Suuronen E, Vaschetto S, Kobuch K, et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(26):15346-51.
70. Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, Fagerholm P, Lagali N, Watsky MA, et al. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(5):1869-75.
71. Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(7):2316-24.
72. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
73. Ho HO, Lin CW, Sheu MT. Diffusion characteristics of collagen film. *J Control Release* 2001;77(1-2):97-105.
74. Reichl S, Dohring S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human cornea construct HCC-an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60(2):305-8.
75. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004;88(4):560-5.

76. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue like structure by contraction of collagen lattice by human fibroblast of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(3):1274-8.
77. Ren H, Wilson G. The effect of a shear force on the cell sheeding rate of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol Scand* 1997;75(4):383-7.
78. Orsengo GJ, Pye DC. Determination of the true intraocular pressure and modulus of elasticity of the human cornea in vitro. *B Math Biol* 1999;61(3):551-72.
79. Borene ML, Barocas VH, Hubel A. Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent. *Ann Biomed Eng* 2004;32(2):274-83.
80. Crabb RA, Chau EP, Evans MC, Barocas VH, Hubel A. Biomechanical and microstructural characteristics of a collagen film-based corneal stroma equivalent. *Tissue Eng* 2006;12(6):1565-75.
81. Torbet J, Malbouyres M, Builles N, Justin V, Roulet M, Damour O, et al. Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. *Biomaterials* 2007;28(29):4268-76.
82. Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng* 2000;6(4):307-19.
83. Jameela SR, Jayakrishnan A. Glutaraldehyde as a fixture in bioprotheses and drug delivery matrixes. *Biomaterials* 1996;17(5):471-84.
84. Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* 1997;18(2):95-105.
85. Moore MA, Chen WM, Philips RE, Bohachevsky IK, McLroy BK. Shrinkage temperature versus protein extraction as a measure of stabilization of photooxidized tissue. *J Biomed Mater Res* 1996;32(2):209-14.
86. Moore MA, Bohachevsky IK, Cheung DT, Boyan BD, Chen WM, Blickers RR, et al. Stabilization of pericardial tissue by dye-mediated photooxidation. *J Biomed Mater Res* 1994;28(5):611-8.
87. Boyce ST, Christianson DJ, Hansborough JF. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J Biomed Mater Res* 1988;22(10):939-57.
88. Weadock KS, Miller EJ, Keuffel EI, Dunn MG. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J Biomed Mater Res* 1996;32(2):221-6.
89. Rault I, Frei V, Herbage D. Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges. *J Mater Sci Mater Med* 1996;7:215-21.
90. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials* 1996;17(8):765-73.
91. Duan X, Sheardown H. Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: Mechanical properties and corneal cell interactions. *Biomaterials* 2006;27(26):4608-17.
92. Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, et al. Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76(1):56-63.
93. Uchino Y, Shimmura S, Miyashita H, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, et al. Amniotic membrane immobilized poly(vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81(1):201-6.
94. Doillon CJ, Watsky MA, Hakim M, Wang J, Munger R, Laycock N, et al. A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: Physical and physiological properties. *Int J Artif Organs* 2003;26(8):764-73.
95. Grinnell F, Fukamizu H, Pawelek P, Nakagawa S. Collagen processing, cross-linking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp Cell Res* 1989;181(12):483-91.
96. Geesin J, Hendricks L, Gordon JS, Berg RA. Modulation of collagen synthesis by growth factors: the role of ascorbic-stimulated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1991;289(1):6-11.
97. Bendetti L, Cortivo R, Berti T, Berti A, Pea F, Mazzo M, et al. Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyafl) implanted in rats. *Biomaterials* 1993;14(15):1154-60.
98. Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al. Study on biocompatibility complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs* 2005;29(2):104-13.
99. Zorlutuna P, Tezcaner A, Kiyat I, Aydınlı A, Hasırcı V. Cornea engineering on polyester carriers. *J Biomed Mater Res* 2006;79(1):104-113.
100. Öztürk E, Ergün MA, Öztürk Z, Nurözler AB, Keçeci K, Özdemir N, et al. Chitosan-coated alginate membranes for cultivation of limbal epithelial cells to use in the restoration of damaged corneal surfaces. *Int J Artif Organs* 2006;29(2):228-38.