

# Holmium Laser Termokeratoplasti Sonrası Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değişiklikler

Hamdi ER\*, D.D.KOCH\*\*

## ÖZET

Holmium laser termokeratoplasti hipermetropi, astigmatizm ve olasılıkla miyopinin düzeltilmesinde ümit verici bir prosedürdür. Holmium: YAG laser termokeratoplasti (Ho: YAG LTK)'nin başarı spektrumu işlemin neden olduğu kornea ultrastrüktürel değişiklikler ve yara iyileşme cevabına bağlıdır.

Bundan önceki histopatolojik çalışmalarda LTK değişik miktarlarda epitel hasarı, stroma yapısında değişiklikler ve yüksek enerji seviyelerinde endotel hasarı görüldü.

Bu çalışma ise akut dönemde insan ve tavşan, uzun dönemde tavşanlarda histopatolojik değişiklikler ve tavşanlarda LTK sonrası oluşan yara iyileşme cevabını değerlendirmek için yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Holmium laser termokeratoplasti, Stromal retraksiyon, Hipermetrop\* refraktif cerrahi

T Klin Oftalmoloji 1995, 4:296-300

## SUMMARY

### **HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES FOLLOWING HOLMIUM LASER THERMAL KERATOPLASTY**

**Ho:** YAG laser thermal keratoplasty is a promising procedure for correction of hyperopia, astigmatism, and possibly myopia. The spectrum of successful Ho: YAG LTK procedure is depend on the corneal ultrastructural changes and wound healing response.

In previous histopathological studies, varied amounts of epithelial injury, altered stromal architecture and at high energy levels endothelial injury have been seen.

This study was undertaken to assess the acute (human and rabbit) and long-term (rabbit) histopathological changes as well as the wound healing response (rabbit) occurring following Ho: YAG LTK.

Key Words; Holmium laser thermal keratoplasty, Stromal shrinkage, Hyperopic refractive surgery

T Klin J Ophthalmol 1995, 4:298-300

## Giriş

Son zamanlarda kornea topografisinin gelişimi ve kornea özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına LTK'de daha güvenli ve efektif bir prosedür olma yolunda gelişim kaydetti.

Geliş Tarihi: 14.03.1995

\* Yard.Doç.Dr. İnönü Üniv. Tıp Fakültesi Göz Hast. ABD, MALATYA

\*\* Assoc.Prof.Baylor College of Medicine.

Yazışma Adresi: Hamdi ER

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Göz Hastalıkları ABD, MALATYA

LTK tedavisi kornea tarafından absorbe edilen infra-red ışığın istenilen ısı düzeyine çevrilmesi esasına dayanmaktadır. Meydana gelen ısı hidrotermal olarak tedavi alanının çevresinde aminoasitler arasındaki ekstrasellüler matriksin üçlü heliks yapılarındaki moleküller arası çapraz bağlantıları ve hidrojen bağlarını kırarak stroma kollajen yapısında bir çekilmeye neden olmaktadır.

Bu çekilme miktarını başlıca 3 parametre belli etmektedir. Bunlar kollajen yapısının stabilitesi, keratosit cevabı ve kollajen retraksiyon ısısı (1,2). LTK ile ilk çalışmalar 1889'da Lans tarafından başlatıldı.

Lans koter kullanılarak astigmatizm'i düşürmeye çalıştı ve bunları doku rezeksiyonları ile karşılaştırdığını-

## HOLMIUM LASER TERMOKERATOPLASTİ SONRASI HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

da çalışmasının daha efektif fakat daha az stabil olduğu sonucuna ulaştı. Modern anlamda ilk kullanım ise 1964'de Stringer ve Perr tarafından başlatıldı. 1970'lerde ise keratokonus ve hidrops tedavisinde kullanıldı (4,6). Fakat tüm bu çalışmalarda refraktif sonuçlardaki dengesizlik, korneal skar, vaskülarizasyon, aseptik stromal nekroz, büllöz keratopati, üveit gibi komplikasyonlar sebebi ile ABD'de uygulamadan kaldırıldı (3,5).

1980'li yıllarda önce Rus oftalmolog Fyodorov daha sonra da ABD'de Rovvsey'in çalışmaları başladı. Fyodorov 600 dereceye dek ısıtılmış nikel termal probu başarı ile kullandığını rapor etti. Fyodorov başlangıç tedavi sonuçlarını hayli yüksek düzeltmeler olarak verirken, daha sonra orta derecede gerilemeler olduğunu belirtti (7). Rovvsey ise radiofrekans sistemini kullandı. Fakat ABD'deki bu çalışmalar benzer sebepler nedeni ile yine uygulamadan kaldırıldı (9-11).

Yine aynı yıllarda özellikle Japonya'da keratokonus vakalarında LTK çalışmaları sık olarak keratoplastiye alternatif olarak uygulandı. Ayrıca başta Fyodorov olmak üzere değişik cerrahlarca Co2 ve Erbium laser ile LTK uygulamaları yapıldı (8).

Bu alandaki son çalışmalara ise Seiler, Durrie, Thomson ve Koch öncülük etmektedir (12,13).

### Materyel ve Metod

Bu çalışmada Sunrise'ın biomikroskopik laser sistemi kullanıldı (Sunrise Teknolojileri, Fremont, CA). Sistem kompakt, solid yapıda olup kullanılan parametreler şöyle idi. Dalga boyu 2.12 mikron, spot büyüklüğü 600 mikron, pulse süresi 250 mikrosaniye, pulse tekrarlama hızı 5 Hz, tedavi süresi 2 saniye, toplam pulse sayısı 10/per shot, enerji densiteleri ise 7.1 ile 11.3 arasında değişiyordu.

Çalışmada 3 insan gözü ve 5 Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanıldı, insan gözleri Fuchs' distrofi nedeni ile keratoplasti planlanan gözlerdi. Herbir kor-

neaya değişik enerji seviyelerinde 2 spot'dan 4'er laser uygulandı. Takiben post-op 1.günde kornealar çıkarılıp ışık ve elektron mikroskopilerde incelendi.

Sıçan kornealarına ise yine değişik enerji seviyelerinde herbiri 6 spotdan 2 laser tedavisi uygulandı. Tavşanların diğer gözleri kontrol grubu olarak saklanırken 1 sıçan derhal öldürüldü. Kalan 4 sıçan 15 dakika, 1 gün, 1 hafta, 1 ay, 2 ay, 3 ay takip periodlarında ışık ve elektron mikroskopilerinde incelendi. İmmünohistokimyasal çalışmalarda ise Beta 4 integrin, Tip 7, Tip 4 ve Tip 6 kollajenler prokollajen, keratan sülfat düzeyleri incelendi.

### Sonuç

İnsan kornealarının ışık ve elektron mikroskopi ile inceleme sonuçlarına baktığımızda korneal şişme, hücre yapısında kayıp, bütün enerji seviyelerinde inflamatuvar hücreler, yüksek enerji seviyelerinde ciddi epitel hasarı görmekteyiz (Tablo 1). Bazal membran ve bowman katı kendi lineer ve ince filamentöz yapısını özellikle yüksek enerji seviyelerinde yitirmekte olmadı, stroma keratosit kaybı ve ekstrasellüler matriksde belirgin yapı değişiklikleri diğer izlenen bulgular idi. Endotel katına gelince düşük enerji seviyelerinde değişiklik gözlenmez iken yüksek enerji seviyelerinde hasar gözlendi.

Tedavi edilen alanın yakın dokusundaki değişiklikler ise 11.3 J/cm<sup>2</sup> enerji seviyesinde sadece yüzeysel epitel değişiklikleri ve bowman seviyesine kadar olan bazı yapı değişiklikleri ile sınırlı idi.

Tavşan gözlerinde epitel hasarı 1 aydan itibaren hiperplastik görünüme dönerken aynı zamanda bowman değişiklikleri de normale döndüğü görüldü. Stromada ise 1 aydan itibaren aktive keratositlerin ortaya çıktığı izlendi (Tablo 2).

Bu çalışmanın histopatolojik sonuçlarına göre kornea yara iyileşmesi tama yakın gerçekleşmekte, yüksek enerji seviyeleri ve yoğun laser tedavileri dışında

**Tablo 1.** insan kornealarındaki ışık ve elektron mikroskopi sonuçları

Enerji J/cm <sup>2</sup>	Epitel	Bazal Membran	Bowman Tabakası	Stroma	Keratosit	Endotel
7.9	Yapı kaybı İnflamasyon şişme ve hasar	Lineer Yapı bozulması	Ön normal Stromaya geçiş anormal	Artmış boyanma Fibrillerde yapı değişiklikleri	Hücre ölümü (özellikle önde)	Normal
8.8	Hasar	Anormal	ince yapı kaybı	Artmış boyanma Görülebilir lameller Parçalanmış materyeller	Hücre ölümü (Önde belirgin)	Hasar Apoptosis
9.7	Hasar	Anormal	İnce filamentöz yapı kaybı	Artmış boyanma Fibrileryapı kaybı	Artmış hücre ölümü	Hasar Apoptosis
11.3 ve 12	Ciddi hasar	Anormal	Artmış ince filamentöz yapı kaybı, elektron dense partikül	Artmış parçalı materyal, disorganize yapı	Artmış hücre ölümü	Kayıp

Tablo 2. Tavşan kornealarında ışık elektron mikroskop! sonuçları

Enerji J/cm <sup>2</sup>	Kornea yapıları	Derhal	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay
7.5	Epitel	Hasar	Hasar	Hiperplazi	Hiperplazi	Hiperplazi
	Bazal M	Hasar	Hasar	Normal	Normal	Normal
	Stroma	Boyanma distorsiyon	Boyanma distorsiyon	Yapı değişikliği- (önde)	Yapı değişikliği (önde)	Yapı değişikliği (önde)
	Keratosi	Hasar	Hücre ölümü	Aktive	Aktive	Aktive
	Endotel	Kayıp	Kısmi kayıp	Kısmi kayıp	Membran	Membran
9.0	Epitel	Hasar	Hasar	Hiperplazi	Hiperplazi	Hiperplazi
	Bazal M	Hasar	Hasar	Normal	Normal	Hiperplazi
	Stroma	Boyanma distorsiyon	Boyanma distorsiyon	Disorganizasyon	Disorganize lameller	Disorganize lameller (önde)
	Keratosi	Hasar	Hücre ölümü	Aktive	Aktive	Aktive
	Endotel	Kayıp	Kısmi kayıp inflamasyon, genişlemiş hücre	Membran	Membran	Membran

Tablo 3. Tavşan kornealarında immunohistokimyasal sonuçlar

Komponent	Fonksiyon yeri	Derhal	1.gün	1.hafta	1.ay	2.ay	3.ay
Beta 4 Integrin	Hemidesmosomlar	0	0	1	N	N	N
Tip 7 kollajen	Çapraz fibriller	0	1	1	t	N	N
Tip 4 kollajen	Bazal membran	0	1	N	N	N	N
Tip 4 kollajen	Stroma	0	t	î	t	î	t
Prokollajen	Kollajen sentezi	0	o	î	î	î	
Keratan sülfat	Glikozaminoglikanlar	i	VY	VY	i	N	N
Tip 6 kollajen	Stroma	0	0	J	1	N	N

## Tanımlamalar:

- 0 : Yok  
 î : Normal üzeri  
 1 : Normalden az  
 N : Normal  
 VY : Veri yok

endotel hasarı görülmemekte, tedavi alanı dışında ise kornea yapı ve morfolojisinde kayda değer hasara rastlanmamaktadır. Yüksek enerji seviyelerinde toplam enerji kaybı 16 spot paterninde de %1.7 olarak tespit edilmiştir.

Tavşan gözlerinde yapılan immunohistokimyasal çalışmada ise akut epitel hasarı ve bazal membranda bozukluk (Tip 4 kollajen), hemidesmosomlar (Beta 4 integrin) ve ankorin fibriller (Tip 7 kollajen), keratan sülfat ve Tip 6 kollajen seviyeleri 3.aydan itibaren normale döndüler (Tablo 3). Aktive olmuş keratositler gösteren prokollajen seviyeleri 3.haftadan itibaren arttı ve 3.ay sonunda bütün proteinlerin seviyeleri normale dönerken prokollajen seviyeleri bu sürede normalden daha yukarıda seyretti. Bu sonuçlara göre yara iyileşmesinin 1.haftadan itibaren başladığını ve yaklaşık 3 aya kadar uzandığını görmekteyiz.

## Tartışma

Şu anda ABD'de faz II çalışmaları devam eden LTK düşük ve orta dereceli hipermetropi, astigmatizm tedavisinde güvenli ve iyi tolere edilen bir prosedürdür. Ayrıca yeni laser sistemleri de kullanım açısından kolaylık ve konfor getirmektedir. LTK'nin bir diğer avantajı da tekrarlanabilir olmasıdır (14,15). Miyopi ve keratokonus tedavisi üzerindeki çalışmalar ise geniş olarak devam etmekte olup muhtemelen yakın gelecekte gündeme gelecektir (16).

LTK'de açık bir gerçek kollajen fibrillerin hidrotermal retraksiyonu kornea kurvaturu üzerinde tedavinin hemen ertesinde belirgin yassılaşmaya böylece de görme keskinliğinde dramatik bir düzelmeye sebep olmaktadır. Tüm vakalarda laser sonrası korneadaki yassılaşma 40 dioptri'nin altına inmekte, takiben de korneadaki şişmeye bağlı olarak önce dikleşme sonra da

## HOLMIUM LASER TERMOKERATOPLASTİ SONRASI HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

dehidratasyona bağlı olarak ilk değerlere kadar inmesi de tekrar bir yassılaşıma olmaktadır.

Arentsen ve ark.'lan elektron mikroskopi çalışmasında bazal membran kaybı ile birlikte kornea epitelinde ciddi dejenerasyon rapor ettiler (18).

Gasset ve Kaufman'da tavşanlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada ciddi epitel hasarı, 1/3 ön stromada keratosit membran hasarı ve stoplasma dejenerasyonu ile kollajen fibril dizimlerinde bozuluk tespit ederken bazal membran, 1/2 arka stroma ve endotelde hasar izlenmemişlerdir. Postoperatif 6 saat sonra ise endotelde özellikle endoplasmik retikulumda kısa süre yoğun reaksiyon izlenmiştir. Epitel hasarı 1 hafta sonra normale dönmeye başlamış ve 2.haftadan itibaren de epitel, keratosit, descemet's membran, endotel tamamen normal görünüme ulaşmışlardır. Laser sonrası hasar sırası ile önce epitel sonra stroma ve endotel şeklinde olurken rejenerasyon periodu ise epitel, endotel ve stroma şeklinde olmaktadır. Bu period 3 ile 4 günde başlamaktadır (17).

Aynı çalışmanın immunohistokimyasal sonuçlarına göre de enzim seviyelerinde laser sonrası derhal çarpıcı bir azalma tespit edilmiş ve 2.haftadan itibaren tedrici olarak normale döndükleri izlenmiştir.

Hamilton Moreira ve ark.'larının kadavra gözleminde ve tavşanlardaki histopatolojik çalışmalarında laser tedavisinin hemen sonrasında epitelde termal hasarı gösteren artmış eozinofili, nukleus şekil değişiklikleri, stromada lameller patern kaybı ve artmış hematoksilen alımı gözlenmiştir. 15 J/crn enerji densitesi üzerinde keratosit nukleuslarının piknotik hale gelmesi, stroma yapısında değişiklikler, 20 J/cm<sup>2</sup> üzerinde endotel hasarı, 25 J/cm<sup>2</sup> üzerinde de ön kamarada reaksiyon tespit edilmiştir (19).

Endotelde özellikle 10 J/cm<sup>2</sup> üzerinde fokal şişme alanları, 20 J/cm<sup>2</sup> üzerinde hücre ödemi ve nekrozu meydana gelmiş ve endotel hasarı toplam endotel yüzey alanının yaklaşık %0.04'ünü tuttuğu endotel hücre kayıp oranının ise %1,2'sini oluşturduğu rapor edilmiştir.

Normalde kollajen retraksiyonu 60-65 derecede oluşmaktadır. Bundan yüksek ısı düzeylerinde ek bir retraksiyon oluşmamakta. aksine termal yaralanma ve nekroz ile sonlanmaktadır (20,21).

ideal durum ısının stroma için maksimum, epitel ve endotel için minimal olanıdır. Böylece amaç olan kollajen retraksiyonu gerçekleştirecek epitel ve endotel hasarı ve komplikasyonları minimal kalacaktır (22).

Bu arada tavşan kornea kalınlığının insan korneasının %65'i kadar olduğu düşünülürse endotel hücre kaybının tavşan kornealarına göre görülmeye şansı in-sanda daha az olacaktır.

Yeni modern teknikler ile refraktif cerrahide tekrar gündeme gelen LTK klinik olarak retraksiyon sonuç-

larının tahminindeki güçlükler ve gerileme (23) dışında daha önceki uygulamalarında görülen komeal skar vaskülarizasyon, aseptik nekroz, büllöz keratopati gibi komplikasyonların yeni tekniklerde elimine edilmesi ile güvenli bir metod olma yolundadır. Ancak refraksiyon ve gerileme ile ilgili problemler eski yöntemlere göre az görülmekle beraber sonuçta kaçınılmaz görülmektedir.

### Kaynaklar

1. Koch DD. Ho:YAG laser thermal keratoplasty: in vitro experiments. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34/4 (suppl):1246.
2. Koch DD. Laser photothermal keratoplasty: nonhuman primate results. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33/4(suppl):768.
3. Aquavella JV, Smith RS, Shaw EL. Alterations in corneal morphology following thermokeratoplasty. Arch Ophthalmol 1976; 94:2082-5.
4. Keates RH, Dingle J. Thermokeratoplasty for keratoconus. Ophthalmic Surgery 1975;6:89-92.
5. Aquavella JV, Buxton JN, Shaw EL. Thermokeratoplasty in the treatment of persistent corneal hydrops. Arch Ophthalmol 1977; 95:81-4.
6. Gasset AR, Kaufman HE. Thermokeratoplasty in the treatment of keratokonius. Am J Ophthalmol 1975; 79:226-32.
7. Neumann AC, Fyodorov S, Sanders DR. Radial thermokeratoplasty for the correction of hyperopia. Refract and Corneal Surg 1990; 6:404-12.
8. Horn G. New refractive method for laser thermal keratoplasty with the CO:MgF2 laser. J Cataract Refract Surg 1990; 16:611-6.
9. Rowsey JJ, Doss JD. Preliminary report of los alamos keratoplasty techniques. Ophthalmology 1981; 88:755-60.
10. Rowsey JJ, Gaylor JR, Dahlstrom R, Doss JD. Los alamos keratoplasty techniques. Contact and Intraocular Lens Med Jr 1980; 6:1-12.
11. Rowsey JJ. Electrosurgical keratoplasty: update and retraction. Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28:224.
12. Seller T, Matallana M, Bende T. Laser Thermokeratoplasty by means of a pulsed Ho:YAG laser for hyperopic correction. Refract and Corneal Surg 1990; 6:335-8.
13. Thompson V, Seller T, Durrie DS, Cavanaugh TB. Ho:YAG laser thermokeratoplasty for hyperopia and astigmatism: An overview. Refract and Corneal Surg (suppl) 1993; 9:134-7.
14. Neumann AC. Thermokeratoplasty for hyperopia. Ophthalmology Clinics of North America 1992; 5:753-72.
15. Neumann AC, Sanders D, Raanan M, Deiuca M. Hyperopic thermokeratoplasty: Clinical evaluation. J Cataract Refract Surg 1991; 17:830-7.

16. Horn G. Laser thermokeratoplasty shows promise. *Ophthalmology Times* 1989; 39-41.
17. Gasset AR, Shaw EL, Kaufman HE, Itoi M, Sakimoto T. Thermokeratoplasty *Tr Am Acad Ophth* 1973; 77:441-54.
18. Arentsen JJ, Rodriques MM, Laibson PR. Histopathologic changes after thermokeratoplasty for keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:32-8.
19. Moreira H, Campos M, Sawusch MR, McDonnell JM, Sand B, McDonnell PJ. Holmium laser thermokeratoplasty. *Ophthalmology* 1993; 5:752-60.
20. Berry MJ. Temperature distributions in laser-irradiated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32/4(suppl):994.
21. Shaw EL, Gasset A. Thermokeratoplasty temperature profile. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1974; 13:181-6.
22. Shaw E. Collagen shrinkage procedures for keratoconus and corneal astigmatism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 127-37 (originals).
23. Feldmann ST, Ellis W, Chayet A, Brown SI. Regression of effect following radial thermokeratoplasty in humans. *Refract and Corneal Surg* 1989; 5:288-91.