

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KORNEAL  
NEOVASKÜLARİZASYONLARDA AFLİBERSEPT, BEVACİZUMAB-  
DOKSİSİKLİN VE SUNİTİNİB-HESPERİTİN KOMBİNASYONLARININ  
ETKİNLİKLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yeliz EKİM

TEZ DANIŞMANI

Yard. Doç. Dr Selçuk KARA

ÇANAKKALE 2016

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KORNEAL  
NEOVASKÜLARİZASYONLARDA AFLİBERSEPT, BEVACİZUMAB-  
DOKSİSİKLİN VE SUNİTİNİB-HESPERİTİN KOMBİNASYONLARININ  
ETKİNLİKLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Yeliz EKİM**

**TEZ DANIŞMANI**

**Yard. Doç. Dr. Selçuk KARA**

**ÇANAKKALE 2016**

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 115S032 numaralı projeden  
desteklenmiştir

T.C.  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı uzmanlık çerçevesinde yürütülmüş olan bu  
çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Arş. Gör Dr. Yeliz EKİM' in Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/06/2016

**TEZ KONU BAŞLIĞI**

**"Deneysel Olarak Oluşturulan Korneal Neovaskülarizasyonlarda Aflibersept,  
Bevacizumab-Doksisisiklin ve Sunitinib-Hesperitin Kombinasyonlarının Etkinlikleri"**

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr Selçuk KARA

**Tez Jürisi Üyeleri:**

**Adı Soyadı**

Doç. Dr. Adil KILIÇ

Doç. Dr. Hasan Ali TUFAN

Yrd.Doç. Dr. Selçuk KARA

**İmzası**

.....  
.....  
.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki  
jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim  
Kurulunun 22.06.2016 tarih ve 12016.26 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.....  
Dekan  
Prof Dr Yavuz DEMİRARAN



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Yeliz EKİM

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danıŐman hocam Yard. Doç. Dr Selçuk KARA, katkı ve yardımlarından dolayı Asist. Dr. Abdullah ALBAKERİ ve Asist. Dr. Mehmet YILMAZ' a, histopatolojik çalışmaları yapan Histoloji ve Embriyoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Turan KARACA ve Asist. Dr. Rukiye KARABACAK ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme ve eŐim İbrahim EKİM' e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

**Dr. Yeliz EKİM**

anakkale, Haziran 2016

## ÖZET

**Amaç:** Topikal aflibersept, sunitinib, bevacizumab-doksisiklin, sunitinib-doksisiklin ve sunitinib-hesperitin kombinasyonlarının korneal neovaskülarizasyon (KNV), apoptozis ve fibrozisi önleyici etkilerinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** 48 ratın korneaları gümüş nitrat ile koterize edilerek KNV başlatıldı. Altı grup oluşturularak suni gözyaşı, aflibersept(20 mg/ml), sunitinib (0.5 mg/ml), sunitinib-hesperitin (0.5mg/ml-0.2 mg/ml), sunitinib-doksisiklin (0.5 mg/ml-20 mg/ml), bevacizumab-doksisiklin (5 mg/ml-20 mg/ml) tedavileri topikal olarak günde 2 kez uygulandı. 0, 3, 7 ve 15. günlerde korneal fotoğrafları çekildi. Korneal fotoğraflardaki vaskülarize alanın tüm korneal alana oranı bilgisayarda yüzde olarak hesaplandı. 15. günde rat gözleri enükle edilip immunohistokimyasal boyamalar yapıldı..

**Bulgular:** KNV oranları 7.günde Sunitinib-Hesperitin (%1.1) ve Sunitinib (%4.8) gruplarında plaseboya (%33.9) göre daha düşüktü ( $p=0,02$ ,  $p=0.029$ ). 15. gündeki KNV oranları Sunitinib-Hesperitin (%20.8) grubunda, Plasebo (%74.6) ve Bevacizumab-Doksisiklin (%80.6) gruplarındaki göre anlamlı olarak düşüktü ( $p=0.04$ ,  $p=0.023$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Tüm gruplarda plaseboya göre daha az CD31, VEGF, TUNEL ve  $\alpha$ -SMA pozitifliği bulundu. Kombinasyon gruplarında monoterapi gruplarına göre daha az VEGF, TUNEL ve  $\alpha$ -SMA pozitifliği saptandı. Sunitinib-Hesperitin ve Bevacizumab-Doksisiklin gruplarında diğer gruplara göre daha az VEGF pozitifliği bulunurken iki grup arasında istatistiksel olarak fark yoktu. TUNEL pozitifliği en az Sunitinib-Hesperitin ve Sunitinib-Doksisiklin gruplarında bulundu;  $\alpha$ -SMA pozitifliği açısından ise Sunitinib-Hesperitin ve Bevacizumab-Doksisiklin gruplarında en düşük oran saptandı.

**Sonuç:** Sunitinib ve Sunitinib-Hesperitin gruplarında diğer gruplara göre

daha az vaskülarizasyon saptandı. Sunitinibin Hesperitin ile birlikte kullanımı monoterapiye göre daha az apoptozis ve fibrozise yol açmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Korneal neovaskülarizasyon, aflibersept, sunitinib, hesperitin, bevacizumab, doksisisiklin



## ABSTRACT

**Aim:** The aim was to research the preventive effects of topical aflibercept, sunitinib, bevacizumab-doxycycline, sunitinib-doxycycline and sunitinib-hesperitin combinations on corneal neovascularization (CNV), apoptosis and fibrosis.

**Material and Method:** The corneas of 48 rats were cauterized with silver nitrate to initiate CNV. Six groups were treated with topical treatments applied 2 times a day: artificial tears, aflibercept (20 mg/ml), sunitinib (0.5 mg/ml), sunitinib-hesperitin (0.5 mg/ml-0.2 mg/ml), sunitinib-doxycycline (0.5 mg/ml-20 mg/ml) and bevacizumab-doxycycline (5 mg/ml-20 mg/ml). Cornea photographs were taken on days 0, 3, 7 and 15. The vascularized area on corneal photographs was calculated as a percentage of the whole area with a computer. On the 15th day rats' eyes were enucleated and immunohistochemical staining performed.

**Results:** On the 7th day the CNV rates in the sunitinib-hesperitin (1.1%) and sunitinib (4.8%) groups were lower compared to placebo (33.9%) ( $p=0.02$ ,  $p=0.029$ ). On the 15th day, the CNV rates in the sunitinib-hesperitin (20.8%) group were significantly lower compared to the placebo (74.6%) and bevacizumab-doxycycline (80.6%) groups ( $p=0.04$ ,  $p=0.023$ ). There was no significant difference with the other groups. All groups had lower CD31, VEGF, TUNEL and  $\alpha$ -SMA positivity compared to placebo. In combination groups, there was lower VEGF, TUNEL and  $\alpha$ -SMA positivity identified compared to monotherapy groups. While the sunitinib-hesperitin and bevacizumab-doxycycline groups had lower VEGF positivity compared to other groups, there was no statistical difference between the two groups. TUNEL positivity was lowest in the sunitinib-hesperitin and sunitinib-doxycycline groups, while the lowest values for  $\alpha$ -SMA positivity were identified in the sunitinib-hesperitin and bevacizumab-doxycycline groups.



**Conclusion:** Less vascularization was observed in the sunitinib and sunitinib-hesperitin groups compared to the other groups. The use of sunitinib with hesperitin caused less apoptosis and fibrosis compared to monotherapy.

**Key words:** Corneal neovascularisation, aflibercept, sunitinib, bevacizumab, doxycycline, hesperitin



# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 Korneal Neovaskularizasyon	5
2.1.1. Giriş	5
2.1.2.Epidemiyoloji	5
2.1.3 Etiyoloji ve Patogenez	6
2.1.4 Korneal Neovaskularizasyon Gelişimi Moleküler Mekanizmaları	10
2.1.5 Pro-anjiyojenik Moleküller	11
2.1.6 Anti-anjiyojenik Moleküller	16
2.1.7 Korneal Neovaskularizasyonlarda Tedavi Seçenekleri	17
3.GEREÇ ve YÖNTEM	26

3.1 Hayvan Modeli	26
3.2 İlaçların Hazırlanması	27
3.3 Biyomikroskopik Değerlendirme	28
3.4 Histopatolojik Değerlendirme	30
3.4.1 İmmünohistokimya Protokolleri	30
3.4.2 İn Situ DNA Uç İşaretleme Metodu- Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Analizi	31
3.5 İstatistiksel Analiz	32
4.BULGULAR	33
4.1 Biyomikroskopik Sonuçlar	33
4.2 Histopatolojik Sonuçlar	37
4.2.1 Korneal vasküler yoğunluk	37
4.2.2 Korneal fibrozis	40
4.2.3 Korneal apopitozis	41
5.TARTIŞMA	43
6.SONUÇ VE ÖNERİ	51
KAYNAKLAR	53

## KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BSS	Balanced Salt Solution
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DRP	Diyabetik Retinopati
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGSF	Hepatosit growth/scatter faktör
IGF	Insuline-like Growth Factor
IL	İnterlökin
kDA	Kilodalton
KNV	Korneal Neovaskularizasyon
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NSAİİ	Non Steroidal Anti İnflamatuvar İlaç
PAİ	Plazminojen aktivatör inhibitörü
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEDF	Pigment Epithelium Derived Factor
PG	Prostoglandin
PIGF	Plasental Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Factor - $\alpha$
YBMD	Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: VEGF reseptörleri	13
Şekil 3.1: Deneklerin el biyomikroskopuna ilişik fotoğraf makinesiyle fotoğraflanması	28
Şekil 3.2: Korneal fotoğrafta vasküler alanın Image J programıyla değerlendirilmesi	29
Şekil 4.1: 7. ve 15. Günlerde tüm grupların KNV alan oranlarının karşılaştırılması	34
Şekil 4.2: Şekil 4.2: Tüm gruplarda 7. gün ve 15. Gün arasında ortalama KNV alan değişimi	34
Şekil 4.3: Tüm grupların 15. gün çekilen korneal fotoğraflarında vaskülarizasyon	36
Şekil 4.4: Kornea dokusunda mm <sup>2</sup> alandaki CD31 pozitif hücre sayısı/mm <sup>2</sup>	37
Şekil 4.5: CD31 boyanma	38
Şekil 4.6: Kornea dokusunda VEGF pozitif hücre sayısı/mm <sup>2</sup>	39
Şekil 4.7: VEGF boyanması	39
Şekil 4.8: Kornea dokusunda α-SMA pozitif hücre sayısı/mm <sup>2</sup>	40
Şekil 4.9 : α-SMA boyanması	41
Şekil 4.10: Kornea dokusunda TUNEL pozitif hücre sayısı/mm <sup>2</sup>	42
Şekil 4.11: TUNEL boyanması	42

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Korneal neovaskularizasyon eşlik eden hastalıklar	8
Tablo 2.2: Pro-anjiyojenik Moleküller	11
Tablo 2.3: Anti-anjiyojenik moleküller	16
Tablo 3.1: Çalışma grupları	27
Tablo 3.2: Korneal yanık evrelemesi	29
Tablo 4.1 : 7. ve 15. gün tüm grupların KNV yüzdeleri	35
Tablo 4.2: 7. ve 15. Günlerde KNV oranlarını gruplara göre gösteren boxplot grafiği	35

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kornea dokusu avasküler ve saydam yapıya sahip mekanik bir bariyer ve aynı zamanda da gözün en önemli refraktif yüzeyidir. Silyer arterin limbus etrafında sonlanan perikorneal pleksus dalları tarafından ve aköz hümörden difüzyon yoluyla beslenir. Gözün optik fonksiyonu için kornea dokusunun saydam olması temel gerekliliktir ve kornea bu amaçla özelleşmiş, immun özerk bir yapıdır. Saydamlığın kaybına neden olan en sık sebeplerden biri ise çeşitli nedenlerle ortaya çıkan korneal neovaskülarizasyondur(1).

Normalde korneal hasarlanma yeni damar oluşumu olmadan gerçekleşirken; kimyasal yanıklar, inflamasyon ve enfeksiyon gibi sebepler limbustaki damarlardan korneal yüzey ve iç katmanlarına doğru yeni damar oluşumunu başlatabilmektedir. Korneada stromal ödem, keratit, lipid depositleri, skar gibi oluşumlara yol açabilen bu yeni korneal vaskülarizasyon dünyada milyonlarca insanın görmesini kaybetmesine sebep olmaktadır. Kornea nakli şansı elde eden hastalarda ise korneal vaskülarizasyon varlığı greft reddi riskini artırmaktadır(2).

Günümüzde korneal yeni damar oluşumlarını engellemek için kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında steroidler, nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar, lazer fotokoagülasyon, fotodinamik tedavi, konjonktival ,limbal veya amniyon zarıyla korneal yüzeyin rekonstrüksiyonu yer almaktadır(3). Kortikosteroidler en sık kullanılan antineovasküler tedavi ajanı olmakla birlikte glokom, katarakt oluşumu, enfeksiyona yatkınlık, korneal ülserasyon ve hatta perforasyonla dahi sonuçlanabilen ciddi yan etki profiline sahiptirler (4).

Oldukça kompleks ve halen araştırılmakta olan korneal yeni damar oluşum mekanizmaları üzerinde pek çok mediyatör görev almaktadır. Bunlar arasında

vasküler endotelial growth faktörler(VEGF), tümör nekrozis faktör(TNF), prostoglandinler(PG) ve interleokinler(IL) yer almaktadır. Bu mediyatörlerden VEGF, hem patolojik hem normal anjiyogenezde çeşitli basamakları kontrol eden kilit roldeki anjiyojenik stimülatör faktördür(5–7). Medikal tedavi için kullanımı incelenen ajanlar VEGF, VEGF reseptörleri ve tirozin kinaz reseptörlerine (flt-1 ve flk-1/KDR) bağlanarak onları etkisiz hale getirmektedir.

Bevacizumab, VEGF-A'nın tüm izoformlarına yüksek afinite ile bağlanan, monoklonal antikordur. Deneysel hayvan modellerinde oluşturulan korneal vaskülarizasyonlarda topikal ve subkonjonktival bevacizumab kullanımının inhibitör etkisi görülmüştür(8). Ancak klinik uygulama sürecinde korneal incelleme ve epitel yara iyileşmesinde gecikmeye neden olması ve ratlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda subepitelyal fibrozis oluşumuna da yol açtığı gösterilmesi bevacizumabın olumsuz özellikleridir(9).

Oküler hastalıklarda kullanılan bir diğer anti VEGF ajan olan ranibizumab, VEGF-A'nın tüm izoformlarını inhibe ederek etki gösteren rekombinant insan monoklonal antikor fragmanıdır(10). Bevacizumab ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda etkinlik açısından birbirine benzer oldukları ve aralarında belirgin fark olmadığı gösterilmiştir(11).

Aflibersept, VEGF A ve B'nin tüm izoformlarını ve growth faktörü(PIGF)'ü inhibe edici özelliği bulunan insan kaynaklı rekombinant füzyon proteindir(12,13). Afliberseptin intravitreal uygulamalarda gösterilen başarılı sonuçlarını KNV hayvan modellerinde yapılan az sayıdaki çalışma yeterince desteklememiştir. Afliberseptin bevacizumaba üstün olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi fark olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur(14,15).

Sunitinib, antitümör ve antianjiyojenik aktiviteye sahip küçük bir moleküldür. Tirozin kinaz reseptör blokajı özelliğine sahip olup VEGFR-1, VEGFR-2 ve



platelet derivatif growth faktör(PDGF)'ü inhibe eder. PDGF vasküler endotel hücrelerden salınıp perisitlerin devamlılığını sağlar ve yokluğunda vasküler yatak desteği bozulduğu için spontan regresyonlar görülür. Sunitinibin bevacizumaba göre anjiyogenez üzerinde 3 kata varan önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir(16). Sunitinibin kornea epitel iyileşmesi üzerine olan etkisi ve uzun süreli olan uygulamalarda yan etkileri ise henüz çalışılmamış olmasına karşın anti VEGF özelliği nedeniyle bevacizumab uygulamasında görülene benzer olumsuzluklar beklenebilir.

Topikal veya subkonjonktival anti VEGF tedavisinin uzun dönemde kornea dokusuna olan incelmeye ve epitel iyileşmesinde gecikme etkilerini azaltmak için yapılan kombine tedavi çalışmalarında doksisisiklin öne çıkmıştır(17). Doksisisiklin, çeşitli enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılan tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Kimyasal yaralanma, korneal ülser gibi korneal erimeye sebebiyet veren klinik durumlarda matriks metalloproteinaz(MMP) inhibisyonu ve antiinflamatuvar etki ile korneal incelmeye ve neovaskülarizasyonlar üzerinde inhibitör etkileri gösterilmiştir(18). Deneysel hayvan çalışmalarında KNV üzerinde inhibitör etkili olduğu gösterilmiştir(19).

Korneal neovaskülarizasyona neden olan bir çok oküler hastalıkta iyileşme süreci skar oluşumu, fibrozis ile sonuçlandığı için uzun dönemde fibroze neden olduğu gösterilen anti VEGF tedavisinin antifibrotik özelliği de olan bir madde ile kombinasyonu korneal saydamlığı korumak için gerekli görülmektedir.

Hesperitin isoflavonoidler ailesinin alt grubu olan flavononlar grubunun bir üyesidir. Flavonoidler yapılarında bulunan OH<sup>-</sup> grupları sayesinde serbest oksijen radikallerine karşı antioksidan etki gösterirler. Hesperitin de yapısında 3 hidroksil grubu bulunan güçlü antioksidan potansiyeli olan bir bileşiktir(20). Flavonoidlerin ayrıca antitrombotik, antialerjik, antiviral, antitümör, antifibrotik,

antianjiyojenik gibi potent etkileri de bulunmaktadır(21–24).

Bu çalışmada rat KNV modelinde topikal aflibersept, sunitinib monoterapileri ile bevacizumab-doksisiklin, sunitinib-doksisiklin ve sunitinib-hesperitin kombine tedavilerinin antineovasküler, antifibrotik ve antiapoptotik etkilerini birlikte değerlendirerek KNV medikal tedavisini daha başarılı kılacak ilaç kombinasyonları araştırılacaktır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Korneal Neovaskülarizasyon**

#### **2.1.1. Giriş**

Normal korneanın saydam ve avasküler bir yapıda olması, optik kalite ve sağlıklı bir görme için önemlidir(25). Korneal yeni damar oluşumları perikorneal limbal pleksusa ait kapiller ve venöz ağdan çeşitli patolojik süreçler sonucu gelişir. Oluşan bu yeni patolojik damar yapıların immatür doğası ve yapısal bütünlüğünün zayıf olması nedeniyle artmış vasküler geçirgenlik sonucu kronik korneal ödeme, lipid eksudasyonuna, inflamasyona ve skar oluşumuna yol açar. Böylece saydam kornea optik kalitesini yitirerek kişinin görmesinin önemli oranda azalmasına yol açmaktadır(26).

#### **2.1.2.Epidemiyoloji**

Neovasküler ve infeksiyöz korneal hastalıklar görme kalitesini düşüren hatta sonunda körlükle sonuçlanabilen büyük bir halk sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır(27). Bu iki önemli sebebin yanında korneal greft rejeksiyonları, kontakt lens ilişkili hipoksi, alkali yanıklar nörotrofik ülserasyonlar, aniridi ve limbal kök hücre defektleri de KNV'a yol açabilen önemli klinik durumlar arasında sayılmaktadır(28)(Tablo 2.1).

Yapılan tahminlere göre Amerika Birleşik Devletleri(ABD)'nde 1.4 milyon korneal neovakülarizasyonlu hasta bulunmaktadır. Korneal transplant sonrası alıcı kornea spesimenleri üzerinde yapılan histopatolojik incelemelerde %40 oranında korneal neovaskülarizasyona ait ipuçlarına rastlanmıştır(29).

Çeşitli inflamatuvar infeksiyöz ve travmatik korneal hastalıkların ortak sonucu KNV'dur. Bu oluşan neovaskülarizasyonlar dokuda skarlaşmayı, lipid depozisyonlarını, stromal hemorajiyi ve korneal ödemi artırarak kişinin görme düzeylerinin düşmesine önemli katkıda bulunmaktadır. Buna ek olarak neovasküler oluşumlar korneanın immunité özelliğini de değiştirerek penetran keratoplasti sonrası başarı şansını da bu hastalarda oldukça düşürmektedir(30). Korneal transplant gereken hastaların çoğunluğunda (%40) KNV izlerine rastlandığı düşünülürse, bu durumun halen çözüm bekleyen önemli bir halk sağlığı sorunu olduğu görülmektedir.

### **2.1.3 Etiyoloji ve Patogenez**

Vaskülogenezis, endoteliyal prekürsör hücreler ve endoteliyal progenitör hücrelerden yeni de novo vasküler yapı oluşmasını tanımlar(31). Anjiyogenezis, büyüme, gelişme ve doku iyileşmesi süreçleri içerisinde var olan damarlardan yeni damar oluşumunu temsil eder ve normal bir süreçtir. Neovaskülarizasyon anormal yerleşimli patolojik süreçteki anjiyogenezisi tanımlarken; KNV'lar ise sıklıkla inflamatuvar, infeksiyöz, travmatik, toksik, dejeneratif veya immunolojik hastalıklar sonucu korneada oluşan yeni damarları temsil eder(11).

Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ)' nün verilerine göre dünya genelinde 285 milyon kişi görme engelli statüsünde ve bunların yaklaşık 39 milyon kadarı yasal körlük kategorisindedir(32). Bunların içinde katarakt önde gelen körlük sebeplerinin başında gelse de gelişmekte olan ülkelerde alınan tüm önlemlere rağmen korneal hastalıklar halen görme kayıplarının en önemli sebebi olmaktadır(33).

KNV oluşumu lokal pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır(34)(Tablo 2.1-2). Bu faktörler arasındaki doğal denge korneal saydamlığı da beraberinde getirmektedir. KNV'lar sıklıkla inflamatuvar ya da

hipoksik bir sürecin sonucunda anjiyojenik sitokinlerin artan salınımına sekonder gelişir(25).

Korneal yara iyileşmesi; bir takım hücrel değişiklikleri, hemen tüm korneal katmanlarından salınabilen çok çeşitli sinyal moleküllerini, lakrimal gland ve inflamatuvar hücrelerin de dahil olduğu oldukça kompleks bir süreçtir(35). Genellikle korneal yara iyileşmesi korneal saydamlığı devam ettiren mükemmel bir süreç olarak işlemektedir. Ancak bazı inflamatuvar, infeksiyöz, dejeneratif ve travmatik süreçlere sekonder KNV'lar oluşarak korneal saydam yapı yitirmektedir(36).

İnflamatuvar süreçler esnasında başrolü oynayan makrofajlardan salınan pro-anjiyojenik faktörlere (en önemlisi VEGF'ler) sekonder endotel hücrelerinin korneaya invazyonu vasküler sürecin başlamasında ana rolü oynamaktadır. Bu sürece matriks metalloproteinazları(MMP) tarafından hücre dışı matriks ve vasküler bazal membran bozulmasının da eklenmesiyle yeni vasküler yapılar filizlenmeye başlamaktadır(37).

İnflamasyona sekonder anjiyogenezis yanında KNV'ların en önemli ikinci mediatörü hipoksidir. Hipoksi varlığında pro-anjiyojenik faktörlerin aktivasyonuna, anti-anjiyojenik faktörlerin de inhibisyonu eşlik ederek bu süreci desteklemektedir(38).

---

**Tablo 2.1:** Korneal neovaskülarizasyon eşlik eden hastalıklar

---

İnflamatuvar hastalıklar

- Pemfigoid
- Atopik konjonktivit
- Rozasea
- Korneal doku reddi
- Stevens- Johnson sendromu
- Graft versus host hastalığı
- Kuru göz

İnfeksiyöz hastalıklar

- Herpes simpleks, herpes zoster
- Psodomonas, klamidya, sifilis
- Kandida, fusarium, aspergillus
- Onkoserkiyazis

Travma

- Kontakt lensler
- Alkali yanık
- Korneal ülserasyon
- İyatrojenik

Dejeneratif

- Terrien marjinal dejenerasyonu
  - Pterijyum
  - Aniridi
  - Limbal kök hücre yetmezliği
- 

Örneğin, pigment epitel derive faktör(PEDF) normoksijenik koşullarda endotelial hücrelerin anjiyojenik faktörlere doğru migrasyonuna engel olarak KNV oluşumunu engelleyen bir ajandır. Ancak hipoksi mevcudiyetinde PEDF seviyeleri düşer. Buna makrofajlardan salınan VEGF artışı da eşlik ettiğinde KNV gelişir. Pek çok kontakt lens kullanıcısında KNV gelişiminin temelinde

hipoksi vardır(39).

Kontakt lensler, son yıllarda artan kullanımları sebebiyle KNV'ların en önemli sebebi haline gelmiştir(29). Kontakt lens kullanıcılarının yaklaşık %20'sinde hipoksiye sekonder vaskülarizasyon olduğu bildirilmektedir(40). Kontakt lensin gaz geçirgenlik oranına bağlı olarak kontakt lens kullanıcılarında oksijen geçişi %8-14 arasında azalmaktadır. Gün içinde uzun kullanım süreleri ve gece kontakt lens takılmasına devam edilmesi hipoksi zeminini daha da arttırmakta ve olaya kontakt lense bağlı minör travmaların da eklenmesiyle neovaskülarizasyon daha güçlü tetiklenmiş olmaktadır(41).

KNV pek çok bakteriyel, parazitik ve viral infeksiyonun potansiyel sonucu olarak da karşımıza çıkabilmektedir. Trahom, dünya genelinde bu infeksiyöz etkenlerin başında gelmektedir. DSÖ' nün verilerine göre dünya çapında 146 milyon trahom vakası bulunmakla birlikte bunların 5.9 milyon kadarı trahom komplikasyonlarına sekonder körlükle karşı karşıya kalmaktadır. Rekürren trahom enfeksiyonları göz kapaklarında skarlaşmaya ve buna sekonder korneal abrazyonlar, ülserasyonlar, KNV'a neden olabilmektedir(42).

KNV'a yol açan diğer en önemli korneal infeksiyon sebebi herpes simplekse bağlı viral keratitlerdir. Bu tip keratitlerin özellikle stromal tutulumlarında VEGF stimülasyonunun arttığı bilinmektedir. Aynı zamanda MMP aktivasyonuna sekonder de bu hastalarda KNV riski artmaktadır(43).

KNV korneal transplantasyon endikasyonları arasında yer alır. Korneanın avasküler yapıda olması immun açıdan ayrıcalıklı bir konumda olmasını sağlamaktadır. Korneal antijenler immun sistem tarafından tanınmadığı için transplant sonrası immun cevap düşük olmasına bağlı olarak greft red reaksiyonu düşüktür(44). Ancak vaskülarize kornealarda vaskülarize alanın büyüklüğüyle de doğru orantılı olarak greft reddi riski de artmaktadır(45). Bu risk

yüzeysel vaskülarizasyonlara göre stromal derin vaskülarizasyonlarda daha da yüksek oranda karşımıza çıkmaktadır(46). 24.944 insan korneal transplantasyon sonuçlarını inceleyen bir metaanaliz incelemesine göre KNV ile greft reddi arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Yine korneanın KNV ile kaplı yüzdesiyle orantılı olarak da bu riskin artmakta olduğu tespit edilmiştir(47).

Dünya genelinde oküler travmadan etkilenen birey sayısı yaklaşık 1.6 milyon civarındadır. Bunların içinde en çok kimyasal korneal yanıklar KNV ile sonuçlanan süreci hazırlamaktadır. Bunun sebebi yanığa sekonder şiddetli doku inflamasyonu olması yanında korneal limbal kök hücre hasarının da gelişebilmesidir(48).

#### **2.1.4 Korneal Neovaskülarizasyon Gelişimi Moleküler Mekanizmaları**

KNV'un pro-anjiyojenik faktörlerle anti-anjiyojenik faktörler arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıktığı bilinmektedir. KNV sebebi sadece pro-anjiyojenik faktörlerin artması değil tek başına anti-anjiyojenik faktörlerin azalmasının da etkili olabileceği bildirilmiştir(49).



## 2.1.5 Pro-anjiyojenik Moleküller

**Tablo 2.2:** Pro-anjiyojenik Moleküller

---

Vasküler endotelial growth faktör (VEGF)
Fibroblast growth faktör (FGF)
Platelet derive growth faktör (PDGF)
Anjiyopoetinler
Anjiyojenin
Matriks Metalloproteinazlar (MMP)
İntegrinler
Sitokinler/Kemokinler (IL-1,IL-8 vb.)
Hepatosit growth/scatter faktör (HGSF)
İnsülin-like growth faktör (IGF)
Renin-Anjiyotensin sistemi
Plasental growth faktör (PGF)
Leptin
Trombin
Tumor nekrozis faktör (TNF- $\alpha$ )

---

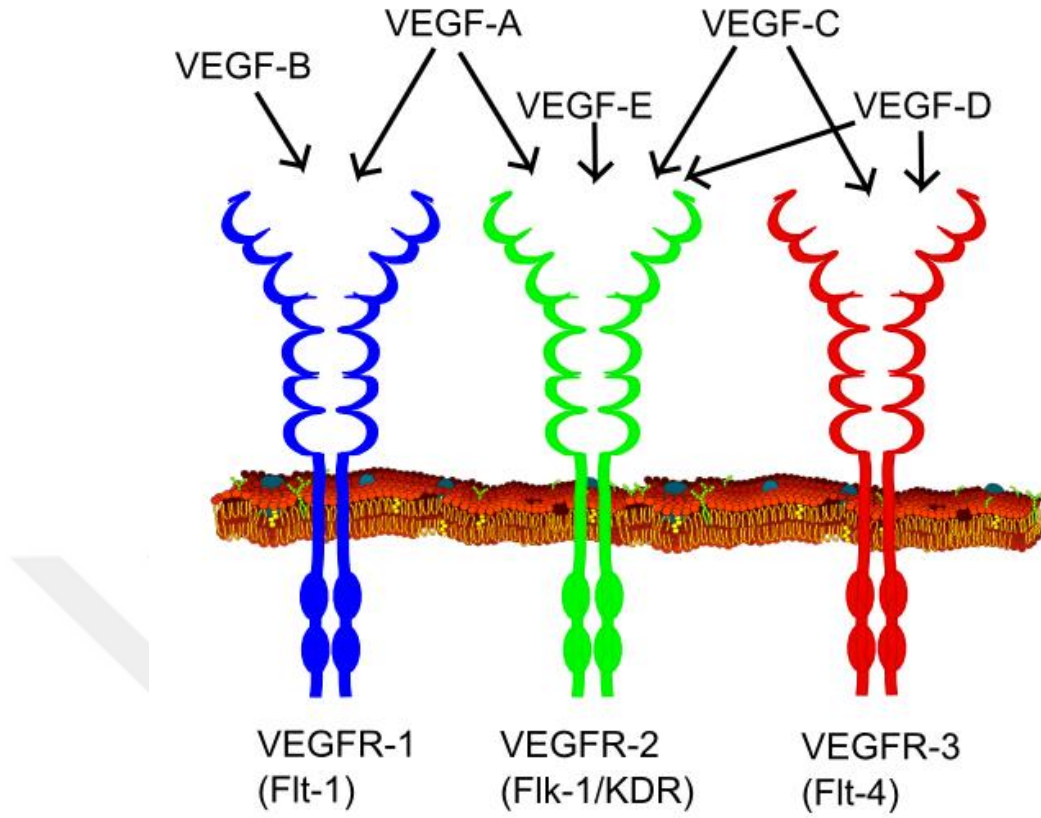
### 2.1.5.1 Vasküler endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor) (VEGF)

Pek çok doku için vaskülarizasyon hayati önem taşıırken; vücuttaki bazı dokuların işlevsel olabilmesi için avaskülaritesini koruması gerekir. Bu dokular arasında başta kornea olmak üzere vitreus, lens, kıkırdak dokusu ve kalp kapakları gelmektedir(50).

Pro-anjiyojenik faktörler arasında en çok üzerine araştırma yapılan faktör VEGF ailesidir(51)(Şekil 2.1). VEGF, 48 kDa'luk homodimerik bir glikoproteindir. Vaskülogenez ve anjiyogenez üzerinde etkili önemli büyüme faktörlerinin bir alt grubudur. En önemli üyesi ve aynı zamanda ilk keşfedilen faktör VEGF-A(VEGF<sub>165</sub>)'dır. Diğer üyeler plasental growth faktör (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D'den oluşur. VEGF-E ve VEGF-F ise virüsler tarafından kodlanan ve bazı yılan venomlarında bulunan VEGF ilişkili proteinleri oluştururlar(52). VEGF-A potent bir anjiyojenik stimülatördür ve hem patolojik hem normal anjiyogenezde pek çok basamağı kontrol etmektedir. Bu etkilerinin yanında vazodilatasyon ve artmış vasküler permeabilite ve kapiller tüp oluşumu da yer almaktadır(53). Vasküler endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağ kalımı üzerinde de etkileri mevcuttur(54). VEGF-B ve C embriyonik anjiyogenez ve lenfanjiyogenez üzerinde etkiliyken; VEGF-D ise akciğer bronşiolindeki lenfatik vasküler sistem oluşumunda görevlidirler. PIGF de vaskülogenez yanında iskemi, inflamasyon, kanser ve doku iyileşmesi gibi durumlarda anjiyogenezden sorumludur(55).

VEGF ailesi öncelikle makrofajlardan, retina pigment epitelinden, astrositlerden ve düz kas hücrelerinden salınmaktadır. Etkilerini yine aktive makrofajlar, monositler ve endotelial hücreler üzerindeki tirozin kinaz reseptörlerine(VEGFR-1 ve VEGFR-2,diğer adıyla Flt-1 ve KDR) bağlanarak göstermektedirler(56).

Yapılan araştırmalarda korneal yara iyileşmesi sürecinde pek çok anjiyojenik faktör rol almakla birlikte, inflame ve vaskülarize kornealarda anti-VEGF ajanların kullanımının hem hayvan çalışmalarında hem de insan korneası neovaskülarizasyonları üzerinde inhibitör etkili olduğu bulunmuştur(57).



Şekil 2.1

VEGF reseptörleri(51)

### 2.1.5.2 Fibroblast Büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor)(FGF)

FGF ailesi 23 tane heparin bağlayan anjiyojenik proteinden oluşmaktadır. Çok çeşitli hücrelerdeki reseptörleri üzerinden tirozin kinaz aktivitesiyle etki göstermektedirler(58). Korneal endotel hücrelerindeki reseptörlerine (FGF-1,-2,-3) bağlanarak VEGF up regülasyonu üzerinden vaskülarizasyonda etki gösterdikleri düşünülmektedir(59). Ayrıca gelişmekte olan ve olgun dokularda hücrel diferansiyasyon, anjiyogenez, mitogenez ve yara iyileşmesi üzerinde de rolleri bulunmaktadır. FGF-1 normal korneal endoteliyal hücreleri üzerinde eksprese olurken, FGF-2'nin korneal hasar sonrası keratosit ve vasküler endoteliyal hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir(60). Ayrıca bowman

epitelinin FGF için rezervuar hücreler olduğunu ve adeta anjiyogenez kontrolünde FGF'nin bu hücrelerde sekestre halde buldukları da gösterilmiştir(61). FGF ailesi proteinlerinin aynı zamanda VEGF ile etkileşimi üzerinden matriks metalloproteinaz reseptörlerinin aktivasyonu da daha fazla anjiyogenetik özelliklerinin olduğu rat çalışmalarında saptanmıştır(62). Bu etkinin tam tersi yönde başka bir çalışmada aynı MMP-2 proteinin salınımının potent anjiyostatik faktörleri aktive edebileceği de savunulmuştur(63). Buradan yola çıkarak MMP'larının korneal vaskülarizasyon üzerinde dual etkili olduklarını söylemek mümkündür.

### **2.1.5.3 Matriks Metalloproteinazlar**

Anjiyogenez esnasında ekstrasellüler matriks ve bazal membran yapım ve yıkım aşamasında etkili çinko bağımlı proteolitik enzim ailesidir(64). İnaktif zimojenler(proenzim) şeklinde salınıp ekstrasellüler matrikste aktive olmaları için proteolitik aktiviteye ihtiyaç duyarlar(65). Yara iyileşmesi, anjiyogenezis, inflamasyon ve tümör metastazı gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde rolleri olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar 20 çeşit MMP proteini tanımlanmıştır. Bunlar doğal fibriler kollajen 1,2 ve 3 tiplerini tanıyan kollajenazlar(MMP-1,-13); denatüre kollajenleri ve bazal membranı parçalayan Jelatinaz A ve B(MMP-2, -9); pek çok kollajen tipini tanıyan ve bazı MMP'ları aktive eden Stromelizinler(MMP-7); ve son zamanlarda yeni keşfedilen hücre yüzey antijenlerine bağlanan membran tipi MMP'lar(MT-MMP/MMP-14) olmak üzere dört başlık altında incelenmektedir(66). Pek çok MMP tipi invaziv kan damarları ve vasküler endotelial hücre kültürlerinde saptanmış ve anjiyogenez aşamasında MMP ekspresyonu VEGF, FGF gibi diğer büyüme faktörleri tarafından etkilerinin düzenlendiği de gösterilmiştir(67). Yapılan son çalışmalar ışığında görülmüştür ki MMP'lar anjiyogenez süreçlerinde hem stimülatör hem de inhibitör etki gösterebilmektedirler(68).

#### **2.1.5.4 Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derivating Factor) (PDGF)**

PDGF ilk olarak trombosit hücrelerin içindeki  $\alpha$ -granüllerde arteriyel düz kas hücrelerinin ve fibroblastların büyümeleri üzerinde etkili faktör olarak keşfedilmiş olmakla birlikte daha sonra pek çok normal ve transforme hücre tarafından da salınabildiği gösterilmiştir(69). Bu hücreler trombositler dışında monositler, megakaryositler, vasküler endotel, düz kas hücreleri de bulunmaktadır. İn vivo PDGF, inflamasyona sekonder bir takım hücrelerden salınıp proliferasyon, kemotaksis, matris üretimi ve doku onarımında görev alır(70). PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, DD olmak üzere beş farklı dimeri bulunmaktadır(71). PDGF- $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki adet hücre yüzeyi reseptörü mevcuttur. İnsan korneasındaki epitelyal hücreler, stromal fibroblastlar ve endotelial hücrelerde daha çok PDGF- $\beta$  reseptörünü taşımaktadırlar(72). Vasküler yapıların matürasyonu sırasında perisitler üzerinden etki göstererek, vasküler yapıları stabilize eder ve VEGF'ün etkisini de sinerjistik mekanizmayla artırarak yeni damar oluşumunda görev alır(73). PDGF'ün korneal neovaskülarizasyonlar üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, PDGF yokluğunda perisit kaybına sekonder korneal vasküler yapıların dansitesinde azalma gözlenmiştir(74).

## 2.1.6 Anti-anjiyojenik Moleküller

**Tablo 2.3:** Anti-anjiyojenik moleküller

---

Pigment epitelyum derive faktör (PEDF)
Endostatin
Anjiyopoetin
Anjiyostatin
Matriks metalloproteinazları
Doku MMP inhibitörleri (TIMP)
Thrombospondin
Prolaktin
Plasental growth faktör
Anti-trombin
Plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI)
Hücre ölüm sinyal proteinleri (Fas/FasL)
Sitokinler (IL-4, IL-13)

---

### 2.1.6.1 Pigment Epitelinden Derive Edilen Faktör (Pigment Epithelium Derivating Factor) (PEDF)

50 kDa ağırlığında olan ve ilk olarak retina pigment epitel hücrelerinden salınımı gösterilen oldukça potent bir anti-anjiyogenetik, immunomodülatör ve nörotrofik etkileri olan serin proteaz inhibitör ailesine ait bir moleküldür(75). Yeni çalışmalar ışığında korneal epitel ve endotelde de gösterilmiş aynı zamanda aköz hümeör ve vitreusta da oldukça yoğun konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir(38). Aktivitesini VEGF, FGF, IL-8/CXCL8 ilişkili vasküler endotelial hücre migrasyonu ve proliferasyonunu inhibe ederek ve aynı zamanda vasküler endotelial hücre apoptozisini Fas/FasL üzerinden indükleyerek gösterir(76,77).

Deneysel olarak oluşturulan kimyasal yanık modelli rat kornealarında topikal olarak PEDF-derive sentetik protein uygulamalarında plasebo gruba göre %31 oranında korneal neovasküler yapılarda azalma olduğu gösterilmiştir(78). Yine diyabetik retinopatili bireylerin vitreuslarında sağlıklı bireylere oranla düzeylerinde azalma saptanmıştır(79).

### **2.1.6.2 Anjiyostatin**

Güçlü bir anti-anjiyojenik faktör olan anjiyostatin 38 kDa ağırlığında plazminojenin fragmantasyonu sonrası oluşur(63). FGF tarafından aktive edilen korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği bilinmektedir(80). Excimer lazer keratektomi sonrası intrakorneal anti-anjiyostatin antikorları enjekte edilen bireylerde korneal neovaskülarizasyon geliştiği gösterilmiştir(81).

### **2.1.6.3 Endostatin**

Endostatin, kollajen 18'in proteolizis sonucu elde edilen anti-anjiyojenik bir moleküldür. Kollajen 18 esas olarak perivasküler pozisyonlarda yerleşim gösteren, bazal membran ve gelişmekte olan postnatal gözlerde de varlığı gösterilmiş nonfibriler kollajendir(82). Endostatin özellikle in vivo koşullarda FGF ve in vitro koşullarda ise VEGF bağımlı endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonunu engelleyerek etki gösterir(83). Aynı zamanda VEGF'ün reseptörüne bağlanmasını engeller(84). Buna ek olarak intrasellüler proteinaz ve kaspaz aktivasyonu üzerinden vasküler endotelial hücre apoptozisini tetikleyerek neovasküler süreçte inhibitör rol üstlenir(85).

### **2.1.7 Korneal Neovaskülarizasyonlarda Tedavi Seçenekleri**

KNV'ların tedavisinde altta yatan sebebin bulunup ona uygun olarak tedavi yöntemi seçilmesi kilit rolü oynar. Çünkü tedavi seçenekleri infeksiyöz

keratitlerde olduğu gibi antimikrobiyal olabileceği gibi, skatrisyel pemfigoidlerde kullanılan sistemik immunsupresan ajanlar da olabilir. Yıllar içerisinde KNV'ların tedavisinde pek çok medikal ve cerrahi yöntem ve anti-anjiyojenik özelliği olan moleküller denenmiştir.

### **2.1.7.1 Medikal Tedavi**

#### **2.1.7.1.1 Anti-inflamatuvar ilaçlar**

Kortikosteroidler aktif olarak proliferen olan korneal neovaskularizasyonları engellemede standart medikal tedaviler arasında baş sırayı almaktadır. Özellikle penetran keratoplasti ile ilişkili neovaskularizasyonlarda sıkça kullanılmıştır(86). Etkilerini inflamasyonla ilişkili neovaskularizasyonları suprese ederek gösterirler ancak daha önceden oluşmuş stabil vasküler yapılar üzerine etkileri yoktur(87).

Steroidlerin anti-inflamatuvar ve anti-anjiyojenik etkileri ilk olarak 1950'li yıllarda fark edilmiştir. Bunlar arasında deksametazon, hidrokortizon, prednizolon ve triamsinolon asetat gibi çeşitli steroidler bulunmakta olup anjiyostatik etkili oldukları gösterilmiştir(88). Steroidlerin inflamasyon üzerindeki inhibitör etkisi inflamatuvar hücrelerden sitokinler ve pro-anjiyojenik mediatörlerin salınışını engellemesiyle gerçekleşir(89). Buna ek olarak bazal membran parçalanması ve edoteliyal hücre migrasyonunun engellenmesinde de rolleri vardır(90). Saud ve arkadaşlarının kimyasal korneal yaralanma sonrası subkonjonktival triamsinolon enjeksiyonuyla KNV oluşumunun anlamlı olarak azaldığını tavşan çalışmalarıyla göstermişlerdir(91). Tüm bu önemli özelliklerine rağmen katarakt oluşumu, intraoküler basınç artışı, korneal incelme ve erime, herpetik keratit aktivasyonu, fungal keratit, bakteriyel enfeksiyonlar gibi istenmeyen yan etkileri kullanımlarını sınırlandırmaktadır(92).



KNV engelleyici diğer bir antiinflamatuvar tedavi seçeneği nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlardır(NSAİİ). Anjiyogenezi stimüle eden prostoglandinlerin yapımını COX enzimini inhibe ederek engellerler. COX enzimleri esas olarak COX-1 ve 2'den oluşmaktadır. COX-1 daha çok normal kornealarda bulunurken, COX-2 kimyasal korneal yanık modellerinde artmış olarak gosterilmiştir(93). COX-2'nin VEGF ve VEGF reseptörleri üzerinde modulatör etkili olduğu bilinmektedir. Nonselektif olarak COX-1 ve COX-2 inhibisyonu yapan indometazin, flurbiprofen, ketorolak, diklofenak ve nepafenak maddelerinin KNV üzerinde inhibitör etkileri hayvan çalışmalarında gosterilmiştir(11,87,94,95). Korneal ülser ve perforasyon gibi istenmeyen yan etkileri özellikle eşlik eden oküler yüzey hastalıklarında kullanımlarını kısıtlar(96).

Diğer antiinflamatuvar etkisinden faydalanılan anti neovasküler ilaçlar siklosporin A, heparin, metotreksat ve talidomidir(97–100).

#### **2.1.7.1.2 Anti-VEGF İlaçlar**

KNV'ların şiddetli komplikasyonları toplumdaki pek çok bireyi etkilemiş olması bu konuda yapılan araştırmaları da son dönemlerde oldukça artırmıştır. Farmakolojik tedavi yöntemleri primer olarak KNV'yi başlatan moleküller üzerinde inhibitör etkiye sahipken, cerrahi tedaviler daha çok önceden oluşmuş damar yapılarının tedavisinde etkili gibi gürünmektedir.

Mevcut farmakolojik ajanların KNV oluşumunun ilk iki hafta gibi erken safhalarında kullanıldıklarında daha etkili oldukları gözlenmiştir. Çünkü bu ilaçlar daha çok KNV'u başlatan moleküler sinyaller üzerinde etkili oldukları için iki haftadan sonra perisitler tarafından tamamen sarılmış ve anti VEGF'lere karşı duyarlılığı azalmış endotelial hücreler üzerinde etkileri hiç gürülmemektedir. Bu aşamada sadece cerrahi yöntemler faydalı olmaktadır.

Ancak mevcut oluşmuş vasküler yapı üzerinde değil de bu vasküler ağdan gelişebilecek yeni filizlenmeler üzerinde de bu bahsedilen anti VEGF ajanların etkili olabileceği yönünde bulgular mevcuttur(73).

Farmakolojik tedavide son yıllarda anti-VEGF ilaçlar kendine geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bu ilaçlar arasında FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylı şu an bir takım onkolojik ve vitreoretinal hastalıklarda kullanım onayı bulunan ancak KNV'larda henüz onay dışı(off-label) kullanımda olan ilaçlar bulunmaktadır(101). Bunlar arasında bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib aflibersept, sunitinib gibi ajanlar yer almaktadır.

Bevacizumab (Avastin; Genentech, CA, USA) VEGF A'nın tüm izoformlarına bağlanan monoklonal bir antikordur. Molekül ağırlığı 149 kDa'dur. İlk kullanımı metastatik kolon kanserli hastalarda intravenöz tedavi şeklinde olmuştur(102). Retinal hastalıklar üzerinde onay dışı intravitreal enjeksiyon şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bevacizumabın kornea üzerine topikal etkilerinin gösterildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Steroid tedavisine yanıt alınamayan KNV'lu hastalar üzerinde bile etkili olduğu gösterilen çalışmalar mevcuttur(103).

Ranibizumab (Lucentis; Genentech), bevacizumabtan çok daha düşük moleküler ağırlıklı(48 kDa) ancak ona benzer olarak VEGF-A'nın tüm izoformlarına yüksek afinite ile bağlanabilen sadece Fab kısmını içeren rekombinant insan monoklonal antikor fragmanıdır(104). Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olan hastalarda intravitreal aylık enjeksiyon olarak kullanılmakta olup, bevacizumaba göre daha küçük molekül olmasının verdiği avantajla subretinal alana daha iyi diffüze olabildiği gösterilmiştir(105). Topikal kullanımda benzer etkinlikte olduğu gösterilmiş olmakla birlikte güvenilirliği ve doz etkinliğinin belirlenmesi amacıyla daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır(106).

Aflibersept (Eylea, Regeneron), yine tüm VEGF izoformlarını bağlayabilen bir füzyon proteindir. Molekül ağırlığı 115 kDa'dur. YBMD'da yeni kullanıma girmiş bir ajandır. VEGF-A'nın tüm izoformları için tuzak reseptör olarak görev yapar ve onları bağlayarak inaktive eder. Bu etkisine ek olarak VEGF-B, PlGF 1- ve 2'yi de bağlayarak antianjiyojenik etkisini kuvvetlendirir. Bugüne kadar çalışılmış VEGF blokajı yapan ajanlar arasında en yüksek afiniteye sahip olanıdır(13). Topikal kullanımda bevacizumaba benzer olarak KNV'larda etkili olabileceği üzerinde çalışmalar devam etmektedir(15).

Sunitinib, tirozin kinaz inhibitör etkisine sahip, anti-tümör ve antianjiyojenik etkili küçük bir reseptör proteindir. Molekül ağırlığı 0.4 kDa'dur. Selektif olarak VEGFR1-3 ve PDGFR'ü, stem cell factor reseptörü(Kit), Flt-3 ve colony stimulating factor 1 reseptörünü inhibe eder(107,108). PDGF, vasküler endotel hücrelerden salınıp perisitlerin stabilitesinin devamını sağlarlar. PDGF yokluğunda perisitler etkilerini kaybederek vasküler yatak bozulur ve spontan regresyon görülür. Sunitinib hem anti VEGF etkili hem de PDGF aktivitesini bloke ettiği için neovaskülarizasyonlar üzerinde daha etkili bir moleküldür. Bugüne kadar böbrek maligniteleri, pankreatik nöroendokrin tümörler ve gastrointestinal stromal tümörlerde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır(109). KNV tedavisinde bevacizumab ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, topikal kullanımda en az 3 kat daha fazla antineovasküler etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(8).

### **2.1.7.1.3 Flavonoidler**

Bioflavonoidler, bir grup bitki kaynaklı antioksidan, antiinflamatuvar, antianjiyojenik, antitümör etkisi bulunan ve aynı zamanda sıvı retansiyonunu azaltma ve kapiller duvar yapısının güçlendirme gibi özelliği bulunan polifenollerdir(110). Meyve ve sebzelerde bulunan, onlara renk ve tat veren maddelerdir. Bugüne kadar yaklaşık 8000 çeşit polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Temelde flavonoidler, yapılarında 15 karbon atomu içeren flavan

nükleusundan oluşan trisiklik bileşiklerdir. İçerdikleri OH<sup>-</sup> grupları sayesinde güçlü antioksidan etki gösteren bu bileşikler moleküler yapılarındaki değişikliklere bağlı olarak flavon, flavanol, flavanon, flavanolol, isoflavon ve antosiyaniden oluşan altı alt gruba ayrılırlar(111). Flavononlar grubunda yer alan Hesperitin 302 dalton ağırlığında, yapısında Naringenin gibi 3 adet OH<sup>-</sup> grubu bulunduran bir bileşiktir. Özellikle limon ve portakalda yoğun olarak bulunan narenciye kaynaklı bir citrus flavonoidi olup, hesperidinin aglikon formudur. Potansiyel bir antioksidan(112), oküler kan akımını arttırıcı etkisiyle retinal iskemiye azalttığı gösterilen(113), vasküler permeabilite üzerinde de azaltıcı etkisi bulunan(114) aynı zamanda nöroproteksiyon(115), antitümör(116) ve antiinflamatuvar özellikleri mevcut olan bir ajandır. Flavonoidlerin yapılarındaki OH<sup>-</sup> bileşenin sayısı arttıkça antioksidan özelliklerinin de kuvvetlendiği bilinmektedir(113). Hesperitin de yapısındaki 3 OH<sup>-</sup> grubu sayesinde güçlü antioksidan etkiye sahip bir bileşiktir.

Oküler hastalık etiyolojilerinde bildiğimiz gibi serbest oksijen radikalleri, oksidatif hasar, hipoksi, azalmış kan akımı, anjiyogenez, artmış kapiller geçirgenlik gibi sebepler yer almaktadır. İskemik retinal hastalık modelinde hesperitin retinal gangliyon hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir(117). Yine benzer bir çalışmada, diyabete sekonder oluşan gliozisin ve vasküler permeabilite artışının hesperitin kullanımıyla engellendiği bulunmuştur(118).

Halihazırda hesperitin KNV üzerinde topikal uygulamasıyla ilgili herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte yine flavanoid ailesinden olan Naringenin'in KNV üzerinde inhibitör antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin olduğu gösterilmiştir(119). Retinal iskemi oluşturulan hayvan modellerinde intraperitoneal uygulanan hesperitin ve naringenin benzer anti apoptotik özellikler gösterdikleri saptanmıştır(120).

### **2.1.7.2.Cerrahi Tedavi**

Yukarıda bahsedilen pek çok medikal tedaviye alternatif olarak ya da onlarla eş zamanlı kullanılabilecek cerrahi tedaviler de mevcuttur.

#### **2.1.7.2.1 Argon Lazer Fotokoagülasyon**

Bu teknik genellikle sınırlı KNV olan hastalarda penetran keratoplasti öncesi uygulanması tercih edilmektedir. Normalde lazer ışığı saydam korneadan direk geçerken vaskülarize korneada damar içindeki hemoglobin tarafından absorbe edilir, buna sekonder damar koagülasyonuna ve oklüzyona sebep olmaktadır(121). Böylece korneal vaskülarizasyon gerilemiş olmakla birlikte, lazerin dokuda yaptığı hasar nedeniyle tetiklenen inflamasyona sekonder proanjiyojenik faktörlerin(özellikle VEGF) salınımının artmasıyla istenmeyen yeni damar oluşumları da izlenebilmektedir(122). Bu tekniğin medikal tedavilerle kombine kullanılması düşünülse de korneal hemoraji, korneal incelme, iris atrofisi ve nekrotizan sklerit gibi önemli yan etkiler de oluşturabileceği akılda tutulmalıdır(123,124).

#### **2.1.7.2.2 Fotodinamik Tedavi**

KNV tedavisinde kullanılan bu yöntemin uygulanabilmesi için fotosensitize edici vertoporfirin, fluoresein gibi ajanlar gereklidir(125,126). Sistemik dolaşıma enjekte edilen ya da oküler yüzeye uygulanan bu ajanlardan sonra özel bir dalga boyundaki lazerin etkisiyle ortaya çıkan reaktif oksijen metabolitlerine bağlı olarak vasküler endotel hücrelerinin hasara uğramasına ikincil tromboz oluşumu esasıyla çalışır(127). Yine fotokoagülasyonda olduğu gibi medikal tedavi ile kombine kullanımı etkisini arttırmaktadır. İlk olarak yaşa bağlı eksudatif maküla dejenerasyonunda etkisi gösterilmiş olmakla birlikte koroidal hemanjiyom, santral seröz koryoretinopati, polipoidal koroidal

vaskülopati gibi koryoretinal hastalıklar üzerinde de kullanım alanı bulmuştur. Deneysel çalışmalarda ve klinik kullanımında özellikle keratoplasti sonrası greft kalitesi açısından umut vaat eden bir yöntem olmakla birlikte yüksek maliyeti kullanımını sınırlandırmaktadır(128).

#### **2.1.7.2.3 Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonu**

Limbal , konjunktival ve amniyotik membran transplantasyonunu içeren bu tedavi seçeneği genellikle diğer yöntemlerle başarısız olduğunda son seçenek olarak kullanılmaktadır. Limbal hücre defekti olan hastalarda limbal kök hücre nakli uygulanması efektif olmasına karşın çift göz hasarı olan hastalarda allogreft nakli ve ona bağlı komplikasyonlar prognozu kötü etkilemektedir(129). Amniyotik membranın inflamasyonu baskılayıcı ve yara iyileşmesini tetikleyici özelliği mevcuttur. Ayrıca anti anjiyojenik özelliğe sahip olduğu da gösterilmiştir ancak KNV tedavisindeki etkisinin kanıtlanması ve kullanımının yaygınlaşabilmesi için daha çok klinik araştırmaya ihtiyaç vardır(130,131).

#### **2.1.7.2.4 İnce İğne Diatermi**

Bu yöntemde koagüle olmasını istediğimiz vasküler yapılara paralel olarak ya da damar lümeni içine yerleştirdiğimiz ince iğneye koagülasyon modundaki diatermi probu tatbik edilmesiyle koterizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir(132). Klinik araştırmalarda bu yöntemin güvenli ve efektif olduğu gösterilmiş olup; geçici korneal beyazlaşma, intrastromal hemoraji gibi komplikasyonları da görülebilen fotokoagülasyona alternatif olabilecek cerrahi bir yöntemdir(133).

### 2.1.7.2.5 Süperfisiyal Keratektomi

Derin yerleşimli olmayan yüzeysel KNV'larda uygulanabilen bu cerrahi teknik bowman tabakasına zarar verilmeden korneal epitel soyulması esasına dayanmaktadır. Topikal Bevacizumab uygulanması planlanan hastalarda tedavi öncesi uygulanmış ve bevacizumabın etkisini tek başına kullanımla karşılaştırıldığında arttırdığı tespit edilmiştir. Tedavi takiplerinde vaskülarizasyonda regresyon görülmesi ve yeni kollateral oluşumu izlenmemesine rağmen sadece yüzeysel tip vaskülarizasyonlarda kullanılabilmesi kullanımını kısıtlayıcı yönleridir(134).



### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde, 2014/09-03 karar numaralı Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayıyla TÜBİTAK proje desteği (proje no: 115S032) ile gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 Hayvan Modeli

Ağırlıkları 250-300 gr olan Wistar Albino erkek rat çalışmaya dahil edilmiştir. 20 mg/kg ketamin hidroklorür(Ketalar, Eczacıbaşı Türkiye) + 4 mg/kg Ksilazin(Alfazyne, EgeVet, Türkiye) ile anesteziye ek olarak % 0.5 proparakain(Alcaine, Alcon, Türkiye) ile topikal anestezi uygulandı. Bütün deneklerin tek gözü çalışma kapsamına alınmış olup, anestezi uygulandıktan sonra gözlerin koterizasyon işleminde Mahoney(95) ve arkadaşlarının tarif ettiği gibi gümüş nitrat tekniği uygulandı. Bu teknikte önce kornea gazlı bezle kurulanıp her ratın sağ kornea santraline 2-3 mm genişliğinde % 75 gümüş nitrat %25 potasyum nitrat ile kaplı çubuk kullanılarak 10 saniye süreyle koterizasyon yapıldı. İşlem sonrası göz 10 ml %0.09 salin ile yıkandı. 2 gün boyunca 2\*1 topikal antibiyotik (netilmisin) tedavisi uygulandı. Koterizasyon işlemi öncesi ratlar rastgele seçilerek 6 gruba ayrıldı. Bütün koterizasyon işlemlerinin aynı araştırmacı tarafından yapılmasına özellikle dikkat edildi. Koterizasyon işlemi esnasında her gruptan birer rata koterizasyon işlemi tamamlandıktan sonra tekrar başa dönme şeklinde bir uygulama yöntemi izlenerek uygulayıcının muhtemel tecrübe farkının tüm gruplara eşit derecede dağıtılmasına özen gösterildi. 3. günden itibaren tedavi için planlanan ajanlar topikal olarak uygulandı. Gruplar aşağıdaki şekildedir:



---

**Tablo 3.1:** Çalışma grupları

---

Grup 1-Plasebo grup: Suni gözyaşı (n=8)

Grup 2–Aflibersept (20 mg/ml) grubu (n=8)

Grup 3-Sunitinib (0,5 mg/ml) grubu (n=8)

Grup 4-Sunitinib (0,5 mg/ml) + Hesperitin (0,2 mg/ml) grubu (n=8)

Grup 5-Sunitinib (0,5 mg/ml) + Doksisisiklin (20 mg/ml) grubu (n=8)

Grup 6-Bevacizumab (5mg/ml) + Doksisisiklin(20 mg/ml) grubu (n=8)

---

### **3.2 İlaçların Hazırlanması**

Bevacizumab (Avastin; Genentech, CA, ABD) (100 mg/ml) flakon %0,9 serum fizyolojik ile sulandırılarak 5mg/ml hazırlandı ve +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

Sunitinib malate (Sigma-Aldrich, Almanya) toz hali %0.9 serum fizyolojik içinde çözülerek 0,5 mg/ml olarak hazırlandı ve +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

Doksisisiklin hidroklorid (Sigma-Aldrich, Almanya) toz formu dimetil sülfoksit(DMSO) solüsyonu içerisinde çözülerek 20 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı ve -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

Hesperitin (Sigma-Aldrich, Almanya) toz formu DMSO içerisinde çözülüp 0,2 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı ve +4<sup>0</sup>C 'de saklandı.

Aflibersept (2 mg/ 0.05ml) (Eylea, Regeneron) flakon %0.9 serum fizyolojik ile dilüe edilip 20 mg/ml olarak hazırlandı ve +4<sup>0</sup>C 'de saklandı.

### 3.3 Biyomikroskopik Değerlendirme

Koterizasyon işleminin hemen sonrasında ve 3, 7, 15. günlerde kornea fotoğrafları el biyomikroskopuna (Reichert, PSL model, ABD) ilişik fotoğraf makinesiyle (Iphone 6) çekildi ve biyomikroskopik muayeneleri yapıldı(Şekil 3.1). İlk iki muayenede ayrıca korneal epitel yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla floresein ile boyandı. Tüm ratların 3. günde gümüş nitrat ile oluşturulan yanık evrelemesi yapılarak evre 2 ve üstü çalışmaya dahil edildi(Tablo 3.2).



Şekil 3.1

Deneklerin el biyomikroskopuna ilişik fotoğraf makinesiyle  
fotoğraflanması

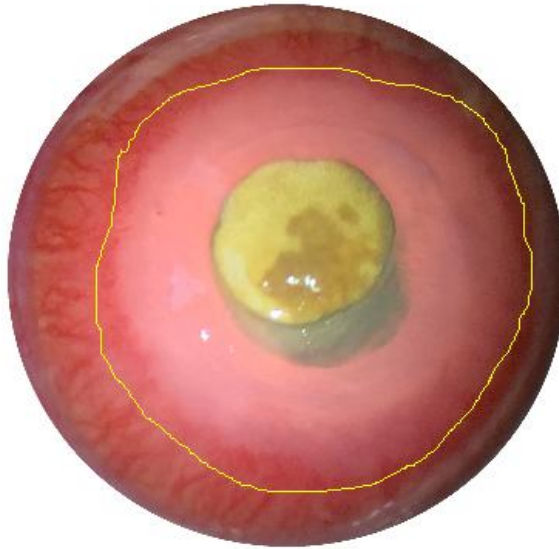
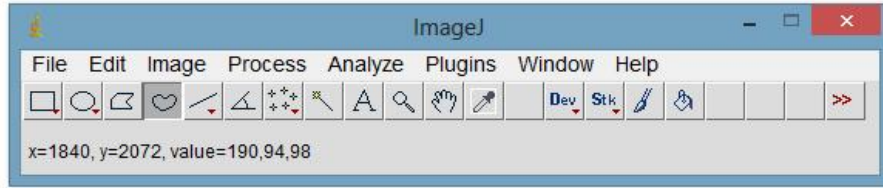
**Tablo 3.2:**Korneal yanık evrelemesi(95)

---

Evre 0: Korneal yüzeyden kabarık bül oluşumu yok
Evre 1: Yüzeyden hafif kabarık, küçük bül oluşumu
Evre 2: Yüzeyden orta derece kabarık, orta büyüklükte bül oluşumu
Evre 3: Büyük bül oluşumu

---

El biyomikroskobuna ilişik fotoğraf makinesiyle çekilmiş 0, 3 ,7, 15'inci günlere ait korneal fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra Image J (Image J 1.46r, Wayne Rasband at the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) programı yardımıyla analiz edildi. Görüntülerde piksel olarak ölçülen vasküler alan sınırları işaretlenerek tüm korneaya oranı hesaplandı ve KNV oranı elde edildi. Ölçümler üç kere tekrarlanıp ortalamaları alınarak KNV değeri olarak kabul edildi(Şekil 3.2).



Şekil 3.2

Korneal fotoğrafta vasküler alanın Image J programıyla değerlendirilmesi

### 3.4 Histopatolojik Değerlendirme

15. günün sonunda tüm deneklere intraperitoneal 50 mg/kg thiopental sodyum(Pentothal Sodium, Abbot, Türkiye) verilmesi ardından ratlar sakrifiye edildi. Her rattan alınan enükleasyon materyaline fikse edici maddenin daha iyi nüfuz edebilmesi için sklera 27 gauge iğne ile limbustan 1 mm mesafeden tek noktadan perfore edildi. Enükleasyon materyalleri ayrı ayrı %10 formaldehid içeren numaralandırılmış kaplara konularak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD laboratuvarına gönderildi. 15. günün sonunda alınan göz örnekleri total olarak %10'luk formaldehit fiksatifinde 48 saat süre ile tespit edildiler. Rutin histolojik takip işlemlerinden sonra örnekler parafinde bloklandılar. Elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler histopatolojik değerlendirmeler için Hematoksilen-Eozin boyaması uygulandı ve örnekler ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirmeleri yapıldı ve fotoğraflanması BX31 Olympus (Japonya) mikroskopunda yapıldı.

#### 3.4.1 İmmünohistokimya Protokolleri

Kornea doku örneklerinde; vascular endothelial growth factor (VEGF), Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) ve cluster of differentiation 31 [(CD31) veya Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)] antikorlarının aktiviteleri immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. 56<sup>0</sup>C'de bir gece bekletilmiş 5µm kalınlığındaki parafin kesitler, deparafinizasyon işleminden sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (10 mM; pH:6.0) kaynatılıp, fosfat tamponu (PBS) ile yıkamanın ardından, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (methanol ile hazırlanmış) içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (Invitrogen, Kaliforniya, ABD) 10

dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikor dilüe etme solüsyonuyla (Invitrogen) hazırlanan tavşan monoklonal VEGF antikoruna (1/200 dilüsyonda, Bioss 0279R), tavşan monoklonal  $\alpha$ -SMA antikoruna (1/100 dilüsyonda, Orbyt 195993) ve tavşan CD31 antikoruna (1/100 dilüsyonda, Bioss 0195R) oda ısısında 90 dakika inkübe edilmişlerdir. Negatif kontroller primer antikor yerine PBS ile muamele edilmiştir. Primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen) 10 dk oda ısısında tutulmuşlar ve son olarak HRP-streptavidin (Invitrogen) ile 10 dk muamele edilmişlerdir. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Thermo HA31567) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksin ile zıt boyama yapılmış ve su bazlı kapatma medyumunu ile kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar BX-31 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

VEGF, CD31, ve  $\alpha$ -SMA immunreaktivite her bir kornea kesitinde 10 farklı alanda 1 mm<sup>2</sup> stromal alandaki immunpozitif hücreler sayılıp ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir. Damar yoğunluğu analizleri de (Argenit Kameram 2.11.5.1, İstanbul) software analiz programı kullanılarak mm<sup>2</sup> alanda sayılarak analiz edilmiştir.

### **3.4.2 İn Situ DNA Uç İşaretleme Metodu- Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Analizi**

Kornea doku örneklerinde apoptozis, TUNEL analizi aracılığı ile 5  $\mu$ m kalınlığındaki parafin kesitler üzerinde ApopTaq Plus Peroksidaz İn Situ Apoptosis Detection Kit (S7101-KIT, Millipore) kullanılarak değerlendirilmiştir. Deparafinize edilmiş doku kesitleri, proteinaz K (Millipore-20  $\mu$ g/ml) ile inkübe edilerek, kesitler endojen peroksidaz inhibisyonu için %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildikten sonra oda ısısında 30 dakika dengeleme tamponunda bekletilmiştir. Digoksinin işaretli dUTP kuyruğunun bağlanması için 37°C'de 1 saat terminal deoksinükleotidil transferaz enzim solüsyonu ile muamele edilip, ardından kesitler oda ısısında 10 dakika durdurma/yıkama tamponunda yıkanmıştır. Oda

ısısında 30 dakika antidiğoksijenin peroksidaz antikor ile inkübe edilen kesitler peroksidaz substrat için 3,3-diaminobenzidine (DAB) kullanılarak işaretlendikten sonra hematoksilen ile zıt boyama yapılmış ve nükleusu koyu kahverengi boyanmış kornea stromal hücreleri TUNEL pozitif olarak değerlendirilmiştir.

TUNEL tekniğı uygulanan her bir kornea kesitinden 10 farklı alanda TUNEL pozitif hücre sayılarak ortalamaları alınarak mm<sup>2</sup> alandaki apoptotik hücre sayısı elde edildi.

### 3.5 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için (SPSS 22.0 SPSS, Inc, Chicago, Illinois,USA) istatistik paket programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart sapma, Medyan, IQR) yanı sıra normal dağılımın incelenmesi için Kolmogorov - Smirnov dağılım testi kullanıldı.

Gruplara göre ölçümlerin bazıları normal dağılım göstermiyordu. Bu yüzden parametrik olmayan yöntemler tercih edildi. Niceliksel verilerin karşılaştırılmasında ikiden fazla grup durumunda, parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalarda ise Wilcoxon işaret testi kullanıldı.

Histolojik incelemede değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak alınmıştır. Tüm deney gruplarına ait immunohistokimyasal ve TUNEL boyama skorları ile damarlanma alan yüzdesi değerleri arasındaki karşılaştırmalar ise Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar %95 güven aralığında  $p < 0.05$  değeri anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

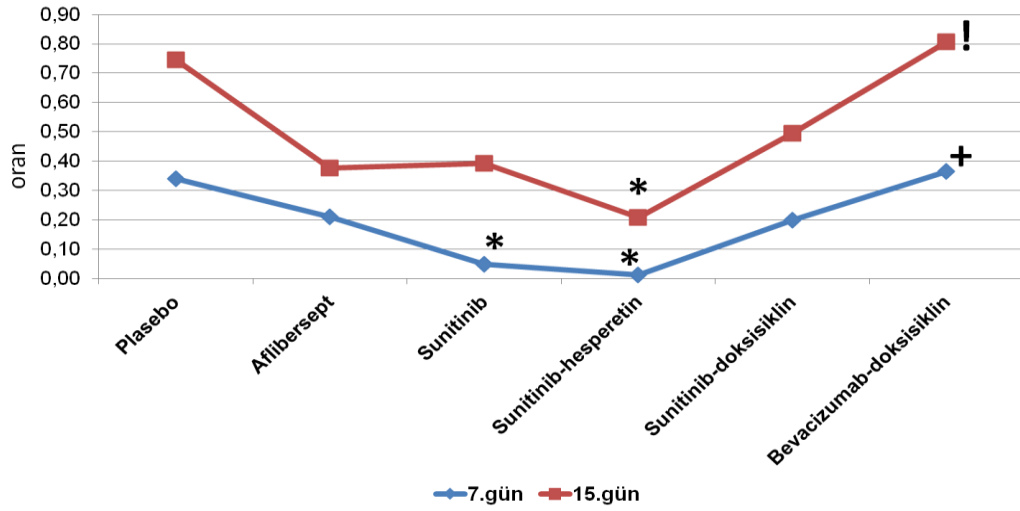
## 4.BULGULAR

### 4.1 Biyomikroskopik Sonuçlar

Bütün ratlarda korneal yanıkların evre 3 ve 4 olduğu izlendi. Grup 5'ten bir rat korneal perforasyon geliştiği için değerlendirme dışı bırakıldı. Tüm gruplarda korneal epitelizasyon ortalama 3 günde tamamlandı.

KNV alan oranlarının ortalamaları 7.gün yapılan değerlendirmede Sunitinib-Hesperitin ve Sunitinib gruplarında plaseboya göre anlamlı olarak düşüktü(Ortalama KNV alanı sırasıyla %1, %4 ve %33;  $p=0,02$ ,  $p=0.029$ ). Sunitinib ve Sunitinib-Hesperitin gruplarında KNV alan ortalamaları Bevacizumab-Doksisiklin grubuna göre anlamlı olarak düşüktü(Ortalama KNV alanı sırasıyla %4, %1 ve %36;  $p=0,007$ ,  $p=0.001$ )(şekil 4.3). Sunitinib–Doksisiklin ve Aflibersept gruplarında gözlenen KNV oranı kontrol grubuna göre daha düşük bulunmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.

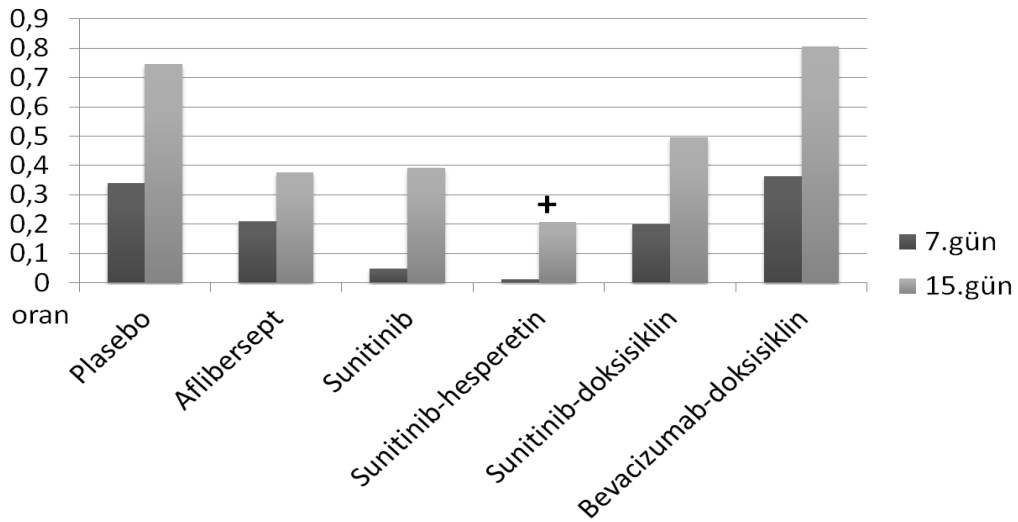
15. güne ait KNV lmleri değerlendirildiğinde Sunitinib-Hesperitin(%20.8) grubundaki olgularda 15. gün ortalama KNV alanı Plasebo(%74.6) ve Bevacizumab-Doksisiklin(%80.6) gruplarındaki oranlara göre anlamlı olarak düşüktü( $p=0.04$ ,  $p=0.023$ ). En az KNV alanı Sunitinib-Hesperitin(%20.8) grubunda saptandı. Diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu(şekil 4.1)(Tablo 4.1-2).



Şekil 4.1: 7. ve 15. Günlerde tüm grupların KNV alan oranlarının karşılaştırılması

\*:Plaseboya göre( $p=0.04$ ) !:Sunitinib-Hesperetine göre( $p=0.023$ ) +:Sunitinib, Sunitinib-Hesperetine göre( $p=0.007$ ) istatistiksel olarak anlamlı

Çalışma gruplarının 7.gün ile 15.gün ortalama KNV alan oranları karşılaştırıldığında sadece Sunitinib-hesperetin grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi( $p=0,109$ ). Diğer tüm gruplarda KNV alanındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı(Grafik 2).



Şekil 4.2: Tüm gruplarda 7. gün ve 15. Gün arasında ortalama KNV alan değişimi

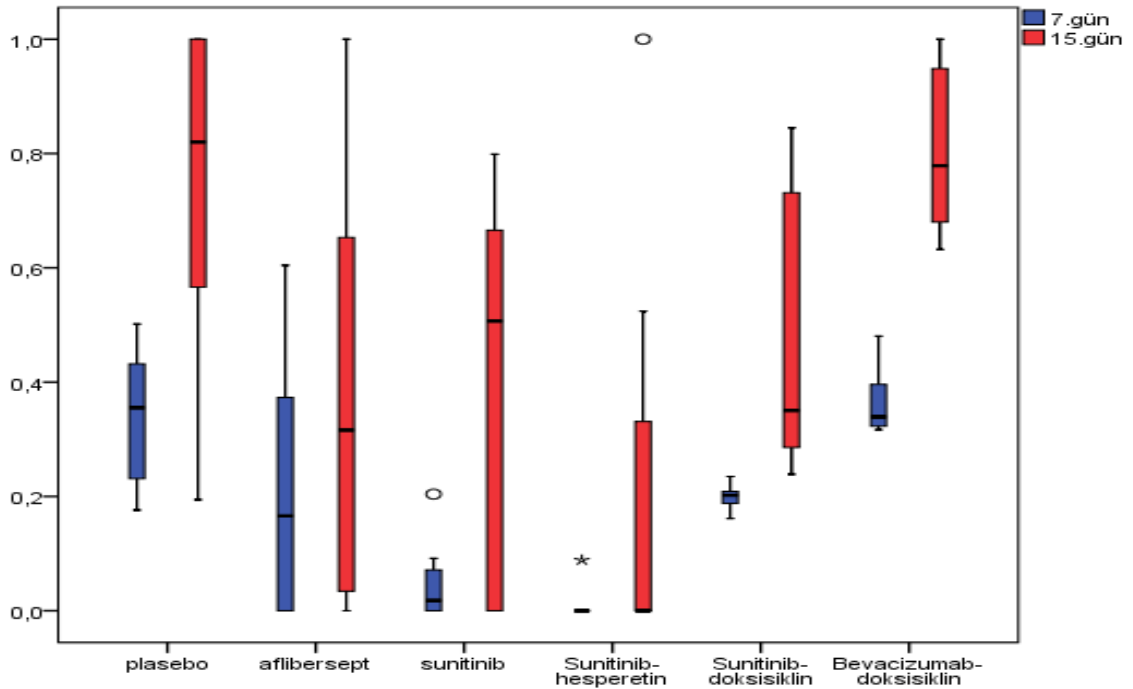
+ : 7. Ve 15 günler arası artış istatistiksel olarak anlamlı değil



	n	KNV alanları (%)			
		7.gün		15.gün	
		Ort	Ss	Ort	Ss
Plasebo	8	33.9	0,121	74.6	0,323
Aflibersept	8	21	0,239	37.6	0,372
Sunitinib	8	4.8 *	0,071	39.3	0,340
Sunitinib-hesperetin	8	1.1 *	0,031	20.8 *	0,368
Sunitinib-doksisisiklin	7	19.9	0,024	49.5	0,060
Bevacizumab-doksisisiklin	8	36.4 +	0,060	80.6 !	0,130

Tablo 4.1 : 7. ve 15. gün tüm grupların KNV yüzdeleri

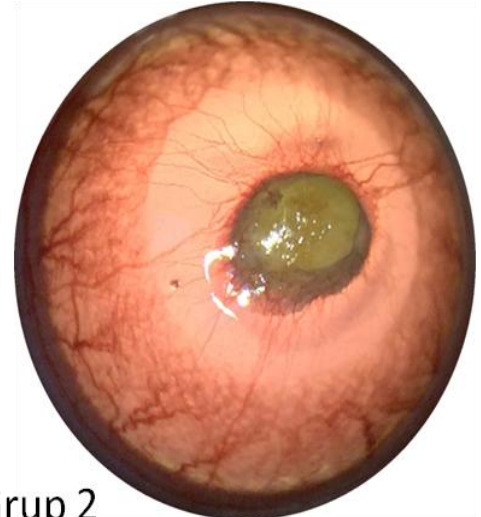
\*:Plaseboya göre(p=0.04) !:Sunitinib-Hesperitine göre(p=0.023) +:Sunitinib, Sunitinib-Hesperitine göre(p=0.07) istatistiksel olarak anlamlı



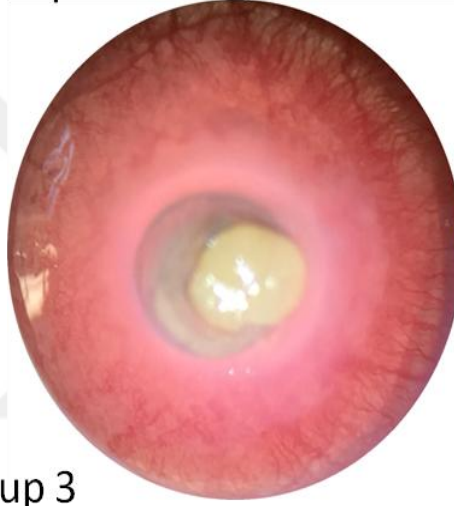
Tablo 4.2 : 7. ve 15. Günlerde KNV oranlarını gruplara göre gösteren boxplot grafiği



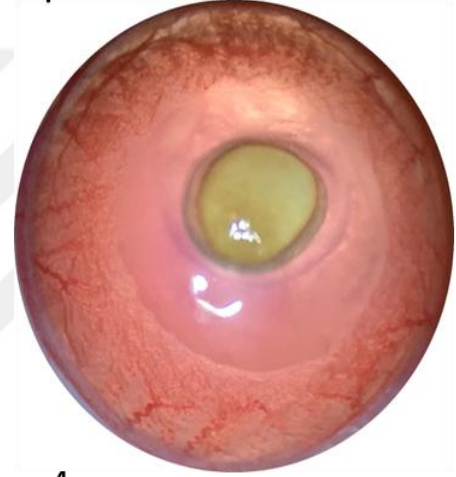
Grup 1



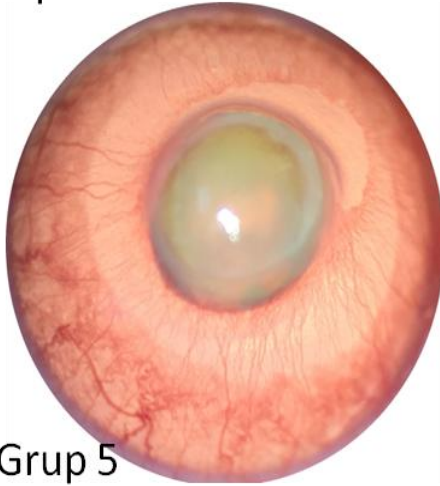
Grup 2



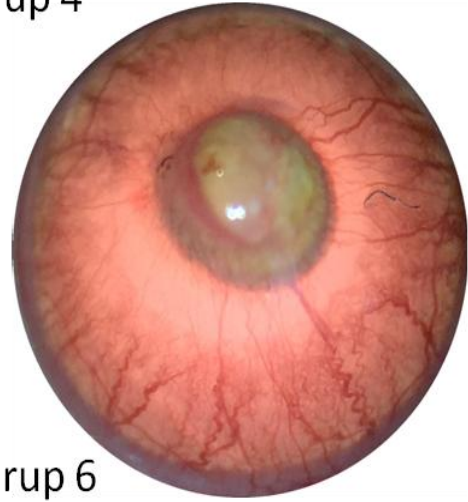
Grup 3



Grup 4



Grup 5



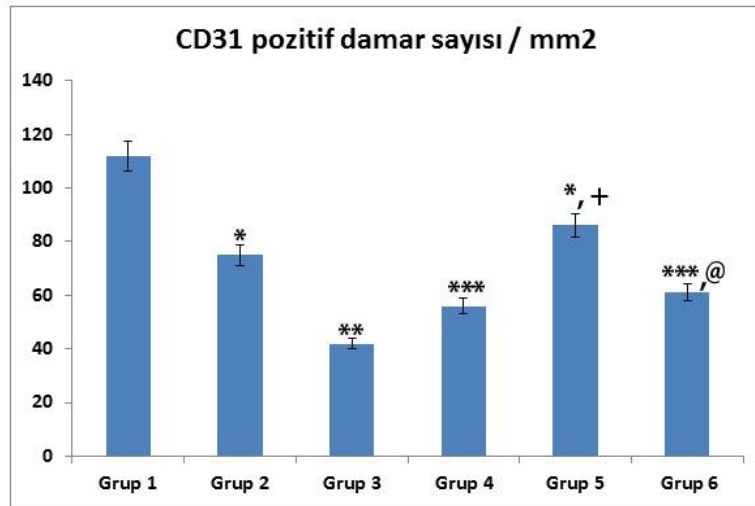
Grup 6

Şekil 4.3: Tüm grupların 15. gün çekilen korneal fotoğraflarında vaskülarizasyon

## 4.2 Histopatolojik Sonuçlar

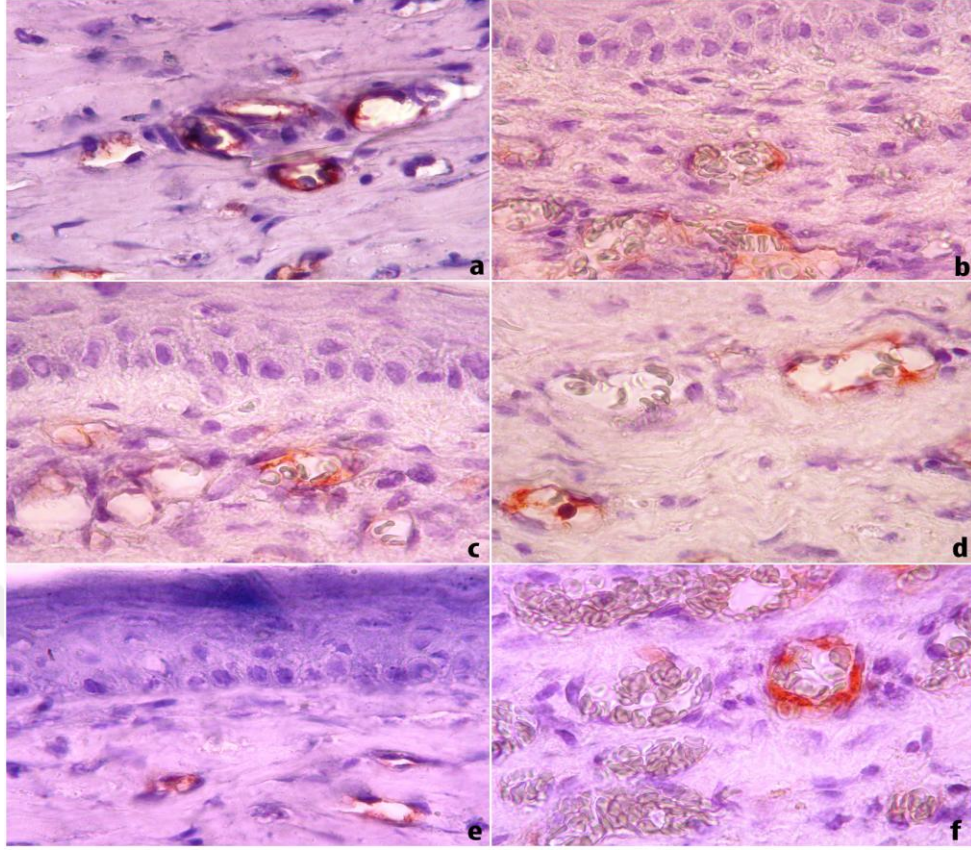
### 4.2.1 Korneal vasküler yoğunluk

Vasküler yoğunluğu değerlendirmeye yarayan endotelial marker anti-CD31 boyanma yüzdeleri incelendiğinde Sunitinib grubunda diğer tüm gruplara göre daha az oranda CD31 pozitifliği izlendi. Tedavi verilen tüm gruplarda plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha az CD31 pozitifliği bulundu. Sunitinib grubunda Aflibersept grubuna göre daha az oranda CD31 ekspresyonu görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur( $p=0.04$ ). Sunitinib-Doksisisiklin grubunda Sunitinib ve Sunitinib-Hesperitin grubuna göre daha yüksek oranda ve istatistiksel olarak anlamlı CD31 pozitifliği bulunmuştur( $p=0.032$ ). Bevacizumab-Doksisisiklin grubunda ise aflibersept, Sunitinib grubuna kıyasla daha yüksek oranda CD31 pozitifliği saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur( $p=0.04$ ,  $p=0.022$ ) (Şekil 4.3-4).



Şekil 4.4: Kornea dokusunda mm2 alandaki CD31 pozitif hücre sayısı/mm2.

\*: Grup 1'e göre( $p=0.021$ ); \*\*: Grup 1 ve 2'ye göre( $p=0.04$ ); \*\*\*: Grup 1, 2 ve 3'e göre( $p=0.022$ ); +: Grup 3 ve 4'e göre( $p=0.032$ ); @: Grup 5'e ( $p=0.015$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı.

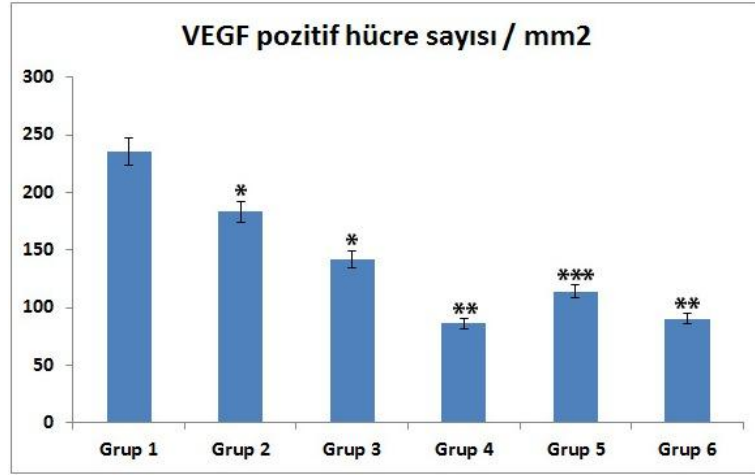


Şekil 4.5: CD31 boyanma (X1000)

a: 1. grup b: 2. grup c: 3. grup d: 4. grup e:5.grup f: 6. Grup

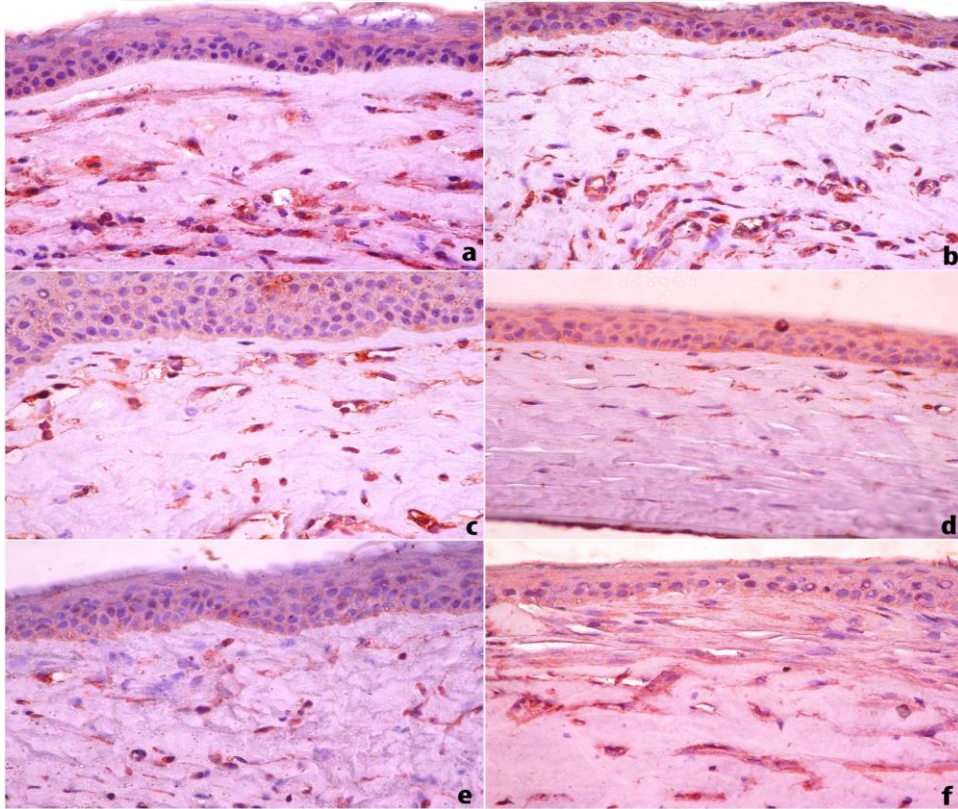
VEGF pozitifliğinin  $\text{mm}^2$ deki yoğunluklarına bakıldığında tedavi verilen gruplarda plaseboya oranla daha az VEGF ekspresyonu olduğu bulundu( $p=0.034$ ). Her üç kombinasyon grubunda da (Sunitinib-Hesperitin, Sunitinib-Doksisiklin ve Bevacizumab-Doksisiklin) plasebo ve anti VEGF monoterapi gruplarına (sunitinib, aflibersept) göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha az VEGF pozitifliği bulundu( $p=0.042$ )(Şekil 4.5-6).





Şekil 4.6: Kornea dokusunda VEGF pozitif hücre sayısı/mm2.

\*: Grup 1 'e göre(p=0.034); \*\*: Grup 1, 2 ve 3'e göre(p=0.025); \*\*\*: Grup 1, 2, 3 ve 4'e göre(p=0.042) istatistiksel olarak anlamlı.

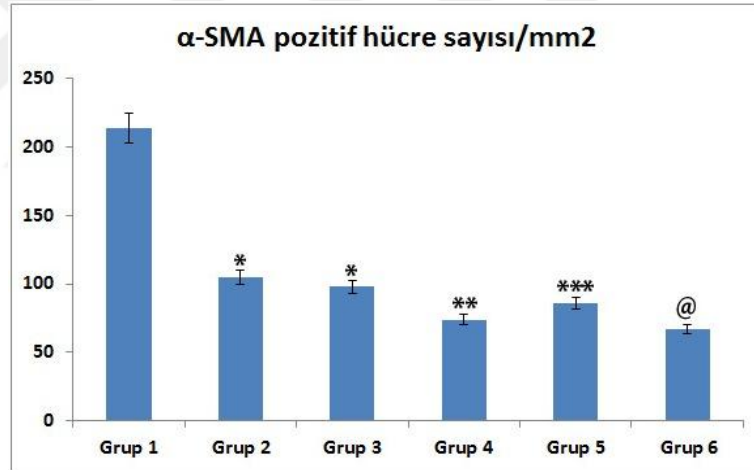


Şekil 4.7: VEGF boyanması (X400)

a: 1. grup b: 2. grup c: 3. grup d: 4. grup e:5.grup f: 6. Grup

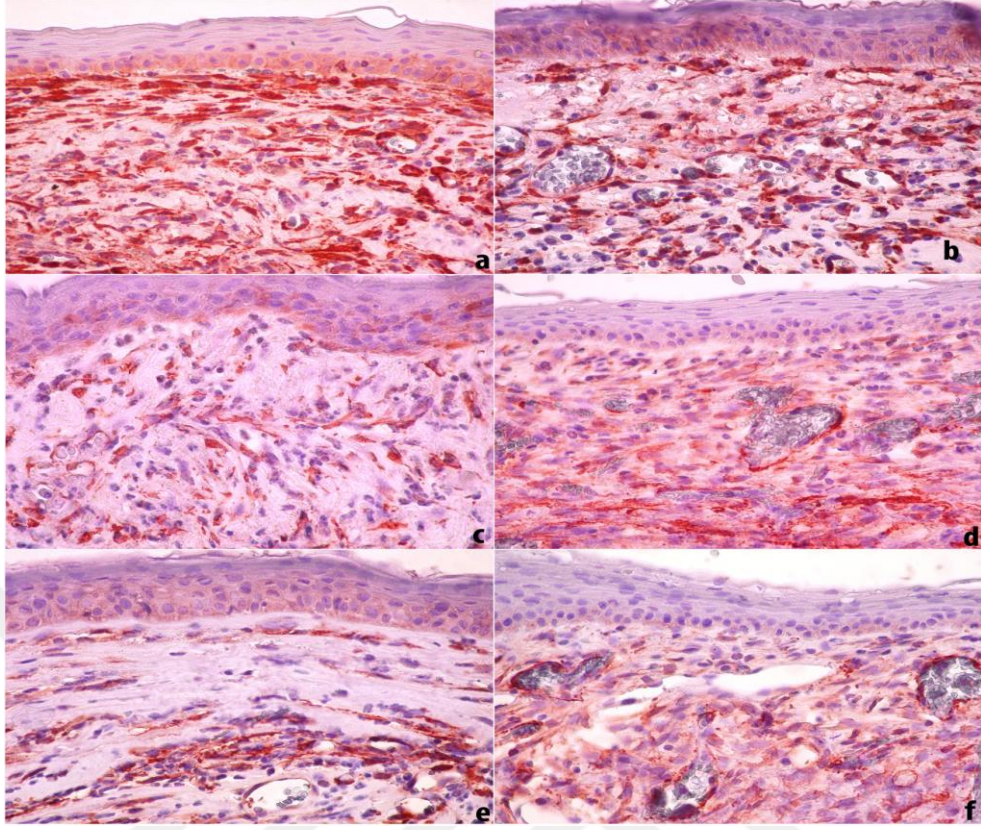
#### 4.2.2 Korneal fibrozis

Fibrozis oluşumu açısından yapılan  $\alpha$ -SMA boyamasında tüm tedavi verilen gruplarda plaseboya oranla daha düşük oranda bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıydı( $p=0.021$ ). Sunitinib-Hesperitin ve Sunitinib-Doksisiklin grubunda Aflibersept ve Sunitinib grubuna göre  $\alpha$ -SMA pozitifliği daha düşük oranda saptandı( $p=0.02$ ,  $p=0.041$ ). Bevacizumab-Doksisiklin grubunda fibrozis pozitifliği Grup 1, 2, 3 ve 5'e göre daha az bulunurken( $p=0.032$ ) Grup 4 ile arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır(Grafik 5,6). Sunitinib-Hesperitin grubunda  $\alpha$ -SMA pozitifliği Sunitinib-Doksisiklin grubuna göre daha düşük oranda saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu( $p=0.041$ )(Şekil 4.7-8).



Şekil 4.8: Kornea dokusunda  $\alpha$ -SMA pozitif hücre sayısı/mm<sup>2</sup>.

\*: Grup 1'e göre( $p=0.021$ ); \*\*: Grup 1,2 ve 3'e göre( $p=0.02$ ); \*\*\*: Grup 1, 2, 3 ve 4'e göre( $p=0.041$ ); @: Grup 1, 2, 3 ve 5'e göre( $p=0.032$ ) istatistiksel olarak anlamlı.



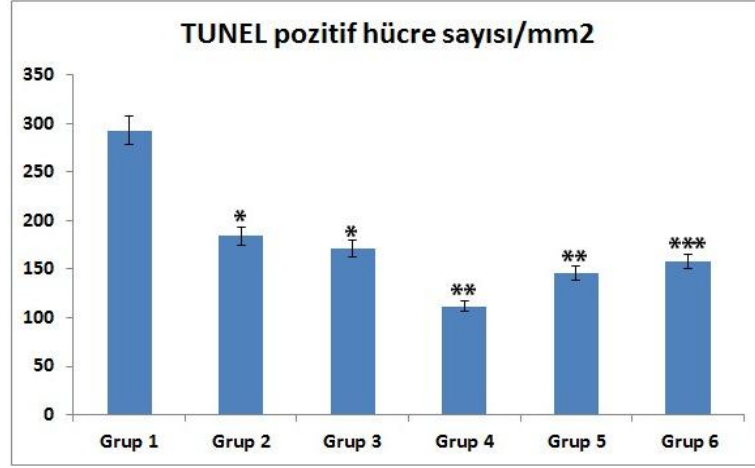
Şekil 4.9 :  $\alpha$ -SMA boyanması (X400)

a: 1. grup b: 2. grup c: 3. grup d: 4. grup e:5.grup f: 6. Grup

#### 4.2.3 Korneal apopitozis

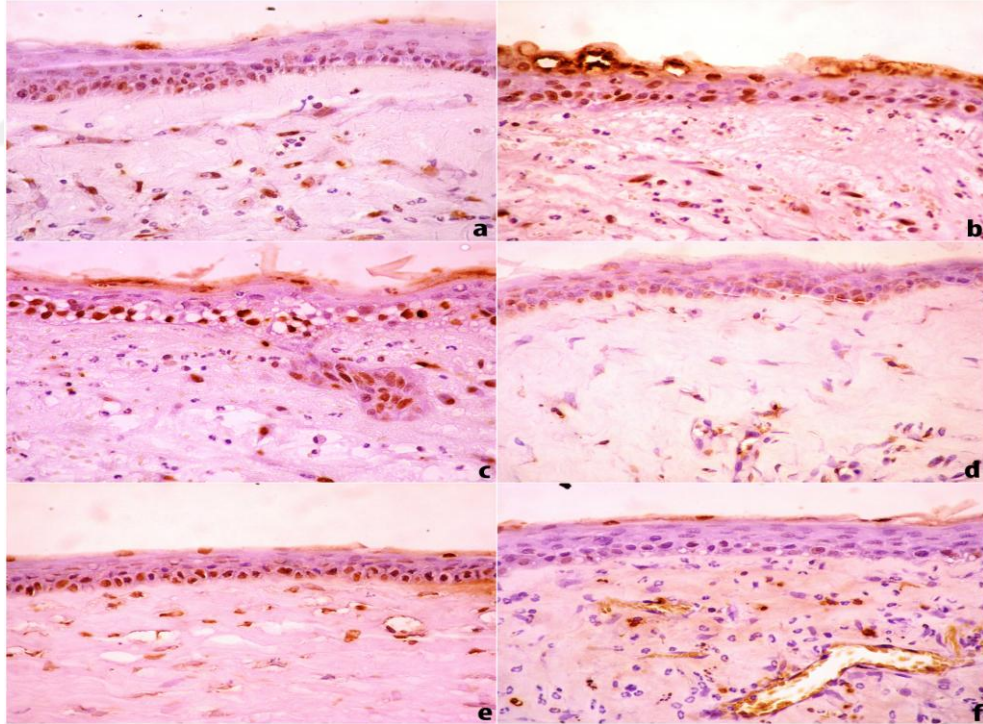
Apopitozis değerlendirilmesi için yapılan TUNEL boyamasında tüm tedavi verilen gruplarda plaseboya oranla daha düşük oran saptandı( $p=0.04$ ). Bevacizumab-Doksisiklin grubunda ilk 3 gruba göre anlamlı olarak daha fazla oranda TUNEL pozitifliği bulunurken( $p=0.03$ ); Sunitinib-Doksisiklin grubu ile arasında belirgin fark görülmedi. Sunitinib-Hesperitin ve Sunitinib-Doksisiklin grupları arasında TUNEL pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmadı(Şekil 4.9-10).





Şekil 4.10: Kornea dokusunda TUNEL pozitif hücre sayısı/mm2

\*: grup 1'e göre( $p=0.04$ ); \*\*: Grup 1, 2 ve 3'e göre( $p=0.025$ ); \*\*\*: Grup 1, 2, 3 ve 4'e göre( $p=0.03$ ) istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.11: TUNEL boyanması

a: 1. grup b: 2. grup c: 3. grup d: 4. grup e:5.grup f: 6. grup



## 5.TARTIŞMA

Bu çalışmada deneysel oluşturulmuş korneal alkali yanık modelinde topikal Aflibersept, Bevacizumab-Doksisiklin, Sunitinib ve Sunitinib kombinasyonları (doksisiklin ve hesperitin ile) antineovasküler etkileri açısından karşılaştırıldı. Literatürde yaptığımız incelemeye göre ilk kez aflibersept, sunitinib ve hesperitin korneal apopitozis ve fibrozis üzerine koruyucu etkileri değerlendirildi ve yine ilk kez topikal Sunitinib-Hesperitin ve Sunitinib-Doksisiklin kombinasyonları kullanıldı. Yakın zamanda topikal Sunitinib monoterapisi ile elde edildiği gösterilen güçlü anti neovasküler etkinin topikal hesperitin kombinasyonu ile başarı oranlarının belirgin düzeyde arttığı gösterildi.

Korneal anjiyogenezde VEGF ailesinin önemli katkısı daha önce yapılan birçok hayvan ve insan deneylerinde gösterilmiştir(26,135–138). VEGF ile VEGF reseptörlerinin aktivasyonu sonucu ekstrasellüler matriks degradasyonu, vasküler endotelial hücre mitozu, migrasyonu ve kapiller tüp formasyonu oluşmasının tetiği çekilmektedir(139). Bu nedenle VEGF antagonistleri neovaskülarizasyonun engellenmesinde etkili bir ilaç grubu olarak kullanılmaktadır. Oküler anjiyogenezin belirgin olduğu diyabetik retinopati, koroidal neovaskülarizasyon, retina ven oklüzyonları, prematüre retinopatisi gibi retinal hastalıkların tedavisinde öncelikle uygulanan veya kombine edilen anti VEGF ilaçlarının kullanım alanları giderek artmaktadır(140). Bu hastalıklardaki elde edilen terapötik başarılar ışığında korneal yüzey hastalıklarında da bu ajanların subkonjonktival ve topikal uygulamalarının etkinlikleri araştırılmaya başlanmıştır.

Bevacizumab, in vitro ve in vivo koşullarda VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanıp onları inhibe eden rekombinan, 149 kDa, insan monoklonal antikorudur. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda bevacizumabın KNV üzerinde inhibe edici etkileri gösterilmiş olsa da KNV'yi tamamen ortadan

kaldırmada bu etki yetersizdir(141–143). Bevacizumabın etkisi daha çok yeni oluşmaya başlayan neovasküler yapılar üzerine olmaktadır. Yani vasküler oluşumu tamamlanmış perisitlerle çevrili vasküler yapılara belirgin etkisi gösterilmemiştir(144). Daha önceki çalışmalarda bevacizumab hem topikal hem de subkonjonktival enjeksiyonlar şeklinde uygulanmıştır. Ancak subkonjonktival kullanımda daha etkili olduğunu savunan yayınlar mevcuttur(145). Bunun sebebini bevacizumab molekülünün büyüklüğüne sekonder korneal epitelden penetrasyonunun yetersiz kalmasına bağlanılmaktadır. Hatta bariyer fonksiyonu bozulmuş defektif korneal epitelden bile geçişinin yetersiz olabileceği yönünde görüşler mevcuttur(30).

Zaki ve ark(136) subkonjonktival bevacizumab(2,5 mg/ml) enjeksiyonunun KNV oranlarını azalttığını bildirmesine rağmen subkonjonktival uygulamanın topikal uygulamaya üstünlüğünün olmadığını bildirmiştir. Kim ve ark(146) subkonjonktival(1.25 mg/ml) ve topikal iki farklı doz(5mg/ml ve 10 mg/ml) bevacizumab uygulamasının etkinliklerini karşılaştırdıkları hayvan çalışmalarında topikal uygulamanın subkonjonktival uygulamaya göre anlamlı üstünlük sağladığını göstermişlerdir. Yine aynı karşılaştırmanın yapıldığı diğer bir çalışma topikal bevacizumabın(12.5 mg/ml) subkonjonktival uygulamaya göre çok daha uzun etkili olduğunu bildirmiştir(147). KNV'nin hakim olduğu hastalar çoğunlukla kronik ve uzun süre tedavi alması gereken hasta grubu olmaktadır. Bu nedenle subkonjonktival uygulamanın bu tip hastalarda hem uygulama zorluğu hem de tekrarlayan uygulamaların subkonjonktival hemorajiye yol açması kullanımını sınırlandırmaktadır.

Oküler hastalıklarda kullanılan bir diğer anti VEGF ajan ranibizumabtır. VEGF A'nın tüm izoformlarını bloke eden 48 kDa ağırlığında monoklonal antikor fragmanıdır. Bevacizumabın ortalama üçte biri büyüklüğünde olduğu için korneal penetrasyonunun daha iyi olabileceği beklenmesine karşın bevacizumab ile karşılaştırılması yapılan kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların bir kısmında bevacizumaba üstünlüğü olduğu gösterilmiş olsa da

geniş serilerle desteklenmemiş olup tam tersi sonuçları olan yayınlar da mevcuttur(11,148). Bununla birlikte oldukça pahalı bir molekül olması şu an için kullanımını sınırlandırmaktadır.

Bevacizumabın uzun süreli subkonjonktival veya topikal kullanımına sekonder korneal incelme ve epitel yara iyileşmesinde gecikme yapması yanında bazı çalışmalarda subepitelyal fibrozis oluşumuna da yol açtığı gösterilmiştir(9,30,149,150). Benzer şekilde bevacizumabın retina hastalıklarındaki kullanımına sekonder retinal hücrelerde fibrozis gelişimi hatta retinal hücrelerde apoptozise neden olduğu gösterilmiştir(151,152). Epitelizasyon gecikmesinin bir sebebi de VEGF'ün aynı zamanda nöral fibrillerin gelişiminde etkili olması ve blokajı durumunda korneal sinirlerin tamirinin gecikmesiyle nörotrofik keratopati oluşumunun kolaylaşmasıdır(153). Bevacizumab ile tedavide karşılaşılan olumsuz yan etkilerin giderilmesi veya azaltılmasına yönelik kombinasyon tedavileri araştırılmaktadır. Bu konuda öne çıkan bir ilaç olan Doksisisiklin, geniş spektrumlu tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Korneal yara iyileşmesinde hızlandırıcı etkisi olduğu da bilinmektedir(154,155). Kimyasal yaralanmalar ya da diğer non infeksiyöz keratitlerde MMP inhibisyonu ile korneal erimeyi inhibe etmektedir(154). Ayrıca doksisisiklinin nitrik oksit ve IL-1 sentezini engelleyerek inflamasyonu baskılamak suretiyle KNV üzerinde önleyici etkisi olabileceği de düşünülmektedir(156,157). Korneal hasar oluştuğunda korneal epitel hücreleri ve diğer lokal hücrelerden nitrik oksit, IL-1, MMP gibi pek çok lokal mediyatör salınımı ile inflamatuvar hücreler hasarlı alana çekilir(158). Böylece 12-24 saat içerisinde hasarlı alanda şiddetli bir inflamatuvar reaksiyon başlatılır. Oluşan inflamasyon korneal hasara katkıda bulunur. Nitrik oksit sentezinin ve IL-1 üretiminin durdurulmasıyla da KNV oluşumunun azaltılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur(159,160). Su ve ark(4) alkali yanık modeli oluşturdukları 15 rat üzerinde doksisisiklin(%0.1) ve bevacizumab(25 mg/ml) ajanlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında kombinasyon tedavisinin monoterapilere anlamlı üstünlük gösterdiğini bildirmişler ve bu etkiyi doksisisiklinin yara iyileşmesi sürecini hızlandırmasına bağlamışlardır. Bizim

çalışmamızda korneal fotoğraf incelemesinde 7. ve 15. gün KNV oranları topikal Bevacizumab-Doksisiklin grubu ile plasebo arasında anlamlı fark yoktu. Ancak kornea kesitlerine ait immunohistokimyasal boyamalar incelendiğinde Bevacizumab-Doksisiklin grubunda CD31 pozitifliği saptanan hücre yoğunluğu plasebo ve Aflibersept grubundan daha az ancak Sunitinib grubundan anlamlı oranda daha fazla bulunmuştur. VEGF ekspresyonu açısından bakıldığında ise her üç kombinasyon(grup 4,5,6) grubunda da VEGF pozitif hücre sayısının plasebo ve monoterapilere göre azaldığı görüldü. En düşük VEGF pozitifliği ise Sunitinib-Hesperitin kombinasyonunda saptandı. Bu durum, sunitinibin anti VEGF etkisinin daha güçlü ve hesperitin de VEGF üzerinde inhibitör etkisi olduğunu savunan çalışmalarla uyumludur.

Aflibersept VEGF A ve B'nin tüm izoformlarını ve PlGF inhibisyonu da yapan monoklonal insan antikor fragmanıdır. Bevacizumaba göre daha küçük bir molekül olması(115 kDa) nedeniyle korneal anti neovasküler etkisinin iyi olması beklenebilir(161). Park ve ark(14) aflibersept (2 mg/0.5 ml ve 2mg/5 ml olacak şekilde iki farklı doz), bevacizumab (2.5 mg/1 ml) ajanlarını karşılaştırdıkları hayvan modelinde aflibersept ve bevacizumab ajanlarının KNV'yi azaltma etkilerinin benzer olduğunu göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada daha yüksek doz topikal aflibersept (25 mg/ml) ve bevacizumab (25 mg/ml) karşılaştırılmış ve bevacizumabın kontrol grubuna üstünlüğü olmadığını afliberseptin ise her iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde KNV azaltıcı etkisi olduğunu bulmuşlardır(15). Bizim çalışmamızda ise 7. ve 15.gün KNV oranları Aflibersept(20 mg/ml) grubunda Bevacizumab-Doksisiklin grubuna kıyasla daha az olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak VEGF ve CD31 pozitifliği Bevacizumab-Doksisiklin kombinasyonunda daha istatistiksel olarak daha az bulunmuştur. Bu sonuçlar doksisiklin kombinasyonunun bevacizumabın KNV üzerindeki etkinliğini arttırdığını savunan çalışmaları desteklemektedir.

Sunitinib, 0.4 kDa'luk küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörüdür. VEGFR-

1, VEGFR-2 inhibisyonu yanında PDGFR- $\beta$ 'yı da inhibe etmektedir. Yeni damar oluşumları kendilerini çevreleyen perisitler sayesinde devam ettirebilirler ve perisit yokluğunda bu hücrelerin stabilite kaybı ile vasküler yatak direnci bozulmakta ve spontan regresyon görülmektedir. Vasküler endotel hücrelerden salınan PDGF perisitlerin devamlılığında sorumludur(108). PDGF yokluğunda perisit kaybına sekonder korneal vasküler yapıların dansitesinde azalma gözlenmiştir(74). Aynı zamanda sunitinibin korneal lenfanjiyogenezi de inhibe ettiği gösterilmiş ve buna sekonder anti inflamatuvar etki potansiyeli olduğu görülmüştür(162). Literatürde sunitinibin KNV üzerindeki etkilerinin araştıran az sayıda yayın bulunmaktadır. Juan ve ark(163)'ünün topikal bevacizumab (5mg/ml) ve sunitinib (0.5 mg/ml) ilaçlarının karşılaştırdıkları hayvan modelinde fotografik ve anjiyografik olarak sunitinibin bevacizumaba oranla 3 kat daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Sunitinibin bu etkisinin VEGF yanında PDGF inhibisyonu ile olabileceğini savunmuşlardır. Ko ve ark(16) yine aynı subkonjonktival ve topikal bevacizumab (2.5mg/0.1ml,5mg/ml) ve sunitinib (0.25 mg/0.1 ml,0.5 mg/ml) uygulamalarının KNV etkisini karşılaştırmışlar ve sunitinib ajanının bevacizumaba oranla çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. İlaç uygulama yolları karşılaştırıldığında ise topikal sunitinibin subkonjonktival uygulamaya göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. Aynı şekilde bizim çalışmamızda da hem CD31 pozitifliğinin hem de korneal fotoğraf değerlendirilmesinde KNV oranlarının daha düşük olduğu saptandı. Tedaviye hesperitin eklendiğinde farkın daha belirgin hale geldiği görüldü. Ayrıca bu kombinasyonla VEGF pozitif hücre yoğunluğu sunitinib monoterapisine göre belirgin derecede azaldı.

Hesperitin isoflavonidler ailesinin alt grubu olan bir flavonondur. Vasküler permeabilite üzerinde etkilerine sekonder diyabetik retinopati ve maküler dejenerasyon gibi hastalıklarda etkileri araştırılmaktadır(164). Daha önce hesperitinin korneal penetrasyonunun oldukça iyi olduğu gösterilmiş ancak KNV üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma literatürde henüz bulunmamaktadır(164). Joussen ve ark(21) genistein (0.5 mg/ml), luteolin (0.5

mg/ml) ve fisetinden (1mg/ml) oluşan izoflavonoid ajanlarının KNV üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve bu üç ajanın kontrol grubuna üstünlüklerini göstermişlerdir. Ana ve ark(119)'nın topikal naringenin KNV üzerine inhibe edici aynı zamanda anti inflamatuvar ve antioksidan etkilerini de göstermişlerdir. Hesperitin, naringenin ile aynı grupta(flavonon) yer aldığından KNV üzerine benzer olumlu etki potansiyeli olduğu düşünölebilir.

Çalışmamızda TUNEL boyama değerlendirmelerine göre tüm kombinasyon gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısı plasebo ve monoterapilerden anlamlı olarak daha az bulundu. En düşük TUNEL pozitif hücre yoğunluğu Sunitinibin hesperitin ve doksisisiklinle olan kombinasyonlarında gözlendi. Daha önceki çalışmalarda iskemi-reperfüzyon göz modelinde intraperitoneal hesperitin ve naringenin uygulamasının retinal apopitozisi azaltan etkisini göstermişlerdir(113,120). Çalışmamızda hesperitin ve doksisisiklinin antiapoptotik etkileri bu çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Korneal vaskölarizasyonu başlatan oküler hastalık veya travmalar genellikle korneal skarlarla birliktelik göstermesine rağmen anti neovasköler tedavi çalışmalarında korneal fibrozis yeterince değerlendirilmemiştir. Elshazyl ve ark.'nın dimetilnitrozamin ile karaciğer fibrozisini tetikledikleri rat modelinde hesperidin uygulamasının dimetilnitrozaminin fibrotik aktivitesini engellediğini göstermişlerdir(24). Saravia ve ark.'nın herpetik stromal keratit hayvan modeli üzerinde yaptıkları araştırmayla bevacizumabın anti neovasköler etkisinin yanında antifibrotik özelliğinin de olduğunu göstermişlerdir(165). Yine benzer antifibrotik etki portal hipertansiyon ile ilgili araştırma modelinde sunitinib uygulamasıyla elde edilmiştir(166). Bunun yanında intravitreal anti VEGF uygulamalarının retinal fibrozisi tetiklediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur(167–169). Çalışmamızda fibrozis için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda tüm gruplarda plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı fibrozis önleyici etkili görölmüş olmakla birlikte kombinasyon tedavilerinin bu konuda çok daha etkili olduğu saptanmıştır. En düşük fibrotik etki Bevacizumab-

Doksisiklin ve Sunitinib-Hesperitin kombinasyon gruplarında elde edilmiştir. Sunitinib-Doksisiklin grubunda Sunitinib-Hesperitine oranla daha yüksek miktarda fibrozis gelişmesi daha önce yapılan çalışmalardaki hesperitinin anti fibrotik etkisini destekler niteliktedir.

Çalışmamızdaki denek sayısı küçük bir grubu temsil ettiğinden kullanılan ilaçların etkilerinin daha net anlaşılabilmesi için geniş serilere ihtiyaç vardır. Tedavi süresi 2 hafta ile sınırlı olduğundan uzun süreli tedavide ortaya çıkabilecek yan etkilerin saptanması mümkün olmamıştır. Tedavide hesperitinin sadece tek konsantrasyonu uygulanmıştır. Afliberseptin doksisiklinle kombinasyonu denenmemiştir.

Bu çalışmamızla tedavi alan tüm gruplarda antiapoptotik ve antifibrotik etki elde edilmiş olmakla birlikte, kombinasyon tedavileriyle bu etkinin daha da arttığını görmekteyiz. Literatürde hesperitin, aflibersept ve sunitinibin kornea üzerinde antiapoptotik ve antifibrotik etkisini değerlendiren ve bu ilaçları kıyaslayan benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmayla antifibrotik etkisi bilinen bir ilacın mevcut antineovasküler ajanla kombine edilmesiyle KNV üzerindeki başarıyı arttırabileceği gösterilerek; keratoplasti, trabekülektomi gibi fibrozis oluşumunun istenmediği ameliyatlarda kullanımıyla postoperatif dönemde operasyon başarısını arttırabilecek tedaviler denenmiştir.

KNV en sık gruplardan biri de kimyasal korneal yanıklardır. Kornea ve limbusun kimyasal madde maruziyetiyle hasarı sonucu yanığın derecesine göre artan oranlarda korneal epitel iyileşmesinden sorumlu limbal hücrelerde kayıp meydana gelmektedir.

Korneal epitelde kimyasal yanık gibi herhangi bir sebeple defekt geliştiğinde tamiri periferik yerleşimli bazal epitel hücreleri ve limbusta yer alan kök hücrelerin migrasyonu ile olmaktadır. Ancak hasarın derecesine göre bu

hücrelerdeki artan kayıplar nedeniyle normal iyileşme süreci bozulup korneada konjonktivalizasyon, neovaskülarizasyon, subepitelial fibrozis, senblefaron ve skarlaşma meydana gelmektedir(169–173). Çalışmamızda kullandığımız hesperitinin anti apopitotik etkisinden faydalanılarak bu tip durumlardaki limbal hücre kayıpları azaltılabilirse korneal iyileşme sürecindeki problemlerin çözümü için önemli bir adım atılmış olacaktır.





## 6.SONUÇ VE ÖNERİ

Bu çalışmayla topikal aflibersept, sunitinib, bevacizumab-doksisiklin, sunitinib-doksisiklin ve sunitinib-hesperitin kombinasyonlarının korneal neovaskülarizasyon ve fibrozisini önleyici etkileri araştırıldı.

Sunitinib monoterapisinin bilinen güçlü anti neovasküler etkisinin topikal hesperitin kombinasyonu ile anlamlı düzeyde arttığı gösterildi.

Tüm gruplarda, Bevacizumab-Doksisiklin ve Sunitinib-hesperetin grupları arasında anlamlı fark olmamasına rağmen, plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı fibrozis önleyici etkili görülmüş ve bu etkinin kombinasyon tedavilerinde belirgin olduğu saptanmıştır.

Sunitinib-Doksisiklin grubunda Sunitinib-Hesperitin grupları arasında apoptozis açısından anlamlı fark yokken; fibrozis oranlarına bakıldığında hesperitinle kombine edilen grupta daha az geliştiği ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Sunitinib-Hesperitin kombinasyon grubunda hem TUNEL hem de  $\alpha$ -SMA (Becacizumab-Doksisiklin grubuyla  $\alpha$ -SMA boyamaları benzer ve aralarında istatistiksel anlamlı fark yok) boyanmasının tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur.

Tedavi alan tüm gruplarda anti apoptotik ve anti fibrotik etki elde edilmiş olup, kombinasyon tedavileriyle bu etki daha da arttırılmıştır. Sunitinib ajanının tek başına kullanıldığında Sunitinib-Hesperetin kombinasyonuna göre çok daha fazla apoptozis ve fibrozis geliştiği gösterilerek kombinasyon tedavilerinin önemi vurgulanmıştır.

İlaçların kısa süre uygulanmış olması nedeniyle uzun dönemdeki yan etkilerini araştırmak ve hesperitinin farklı dozlarıyla denenmesi ve farklı ilaçlarla kombinasyonunun etkinliği konusunda daha fazla bilgi edinmemiz için prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

(1) CHANG, J.-H., GARG, N. K., LUNDE, E., HAN, K.-Y., JAİN, S., AZAR, D. T. (2012) Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review. *Surv. Ophthalmol.* 57, 415–429.

(2) PEYMAN, G. A., KAZİ, A. A., RİAZİ-ESFAHANİ, M., AYDİN, E., KİVİLCİM, M., SANDERS, D. R. (2006) The effect of combinations of flurbiprofen, low molecular weight heparin, and doxycycline on the inhibition of corneal neovascularization. *Cornea* 25, 582–585.

(3) PAPATHANASSİOU, M., THEODOROPOULOU, S., ANALİTİS, A., TZONOU, A, THEODOSSİADİS, P. G. (2013) Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization: a meta-analysis. *Cornea* 32, 435–444.

(4) SU, W., Lİ, Z., Lİ, Y., LİN, M., YAO, L., LİU, Y., HE, Z., WU, C., LİANG, D. (2011) Doxycycline enhances the inhibitory effects of bevacizumab on corneal neovascularization and prevents its side effects. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 9108–9115.

(5) RİAZİ-ESFAHANİ, M., PEYMAN, G. A., AYDİN, E., KAZİ, A. A., KİVİLCİM, M., SANDERS, D. R. (2006) Prevention of corneal neovascularization: evaluation of various commercially available compounds in an experimental rat model. *Cornea* 25, 801–5.

(6) PHİLİPP, W., SPEİCHER, L., HUMPEL, C. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 2514–2522.

(7) FERRARA, N., GERBER, H. P. (2001) The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 106, 148–156.

(8) PÉREZ-SANTONJA, J. J., CAMPOS-MOLLO, E., LLEDÓ-RİQUELME,

M., JAVALOY, J., ALIÓ, J. L. (2010) Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (Anti-VEGF) and sunitinib (Anti-VEGF and Anti-PDGF) in an animal model. *Am. J. Ophthalmol.* 150, 519–528.e1.

(9) KIM, E. C., LEE, W. S., KIM, M. S. (2010) The inhibitory effects of bevacizumab eye drops on NGF expression and corneal wound healing in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4569–4573.

(10) GAUDREAU, J., FEI, D., RUSIT, J., SUBOC, P., SHIU, V. (2005) Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 726–33.

(11) STEVENSON, W., CHENG, S. F., DASTJERDI, M. H., FERRARI, G., DANA, R. (2012) Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs bevacizumab (Avastin). *Ocul. Surf.* 10, 67–83.

(12) CAMPOCHIARO, P. A., CLARK, W. L., BOYER, D. S., HEIER, J. S., BROWN, D. M., VITTI, R., KAZMI, H., BERLINER, A. J., ERICKSON, K., CHU, K. W., SOO, Y., CHENG, Y., HALLER, J. A. (2015) Intravitreal aflibercept for macular edema following branch retinal vein occlusion: The 24-week results of the VIBRANT study. *Ophthalmology* 122, 538–544.

(13) EVOY, K. E., ABEL, S. R. (2013) Aflibercept: newly approved for the treatment of macular edema following central retinal vein occlusion. *Ann. Pharmacother.* 47, 819–27.

(14) PARK, Y.-R., CHUNG, S. K. (2015) Inhibitory Effect of Topical Aflibercept on Corneal Neovascularization in Rabbits. *Cornea.*

(15) SELLA, R., GAL-OR, O., LIVNY, E., DACHBASH, M., NISGAV, Y., WEINBERGER, D., LIVNAT, T., BAHAR, I. (2016) Efficacy of topical aflibercept versus topical bevacizumab for the prevention of corneal neovascularization in a rat model. *Exp. Eye Res.* 146, 224–232.

(16) KO, B. Y., KİM, Y. S., BAEK, S. G., LEE, G. W., KİM, J. M., JEAN, W. S., LEE, N. S., KANG, J. (2013) Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival and Topical Bevacizumab and Sunitinib in a Rabbit Model. *Cornea* 32, 689–695.

(17) AYDİN, E., KIVİLCİM, M., PEYMAN, G. A., ESFAHANİ, M. R., KAZI, A. A., SANDERS, D. R. (2008) Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetonide with low-molecular-weight heparin and doxycycline. *Cornea* 27, 446–53.

(18) SU, W., Lİ, Z., LİN, M., Lİ, Y., HE, Z., WU, C., LIANG, D. (2011) The effect of doxycycline temperature-sensitive hydrogel on inhibiting the corneal neovascularization induced by BFGF in rats. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. = Albr. von Graefes Arch. für Klin. und Exp. Ophthalmol.* 249, 421–7.

(19) LİNG, S., Lİ, W., LIU, L., ZHOU, H., WANG, T., YE, H., LIANG, L., YUAN, J. (2013) Allograft survival enhancement using doxycycline in alkali-burned mouse corneas. *Acta Ophthalmol.* 91, e369–e378.

(20) KESER, S., CELİK, S., TURKOGLU, S. (2013) Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis vinifera* L.) and grape products. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 210–6.

(21) ROUSEFF, R. L., MARTİN, S. F., YOUTSEY, C. O. (1987) Quantitative Survey of Narirutin, Naringin, Hesperidin, and Neohesperidin in Citrus. *J. Agric. Food Chem. J. Agric. Food Chem. J. Agric. Food Chem. Phytochem. Lipids Phytochem. J. Agric. Food Chem. Plant Physiol. Spina, P. Trattato di Agrumic. Swift, L. J. R o c . Flu. State Hortic. SOC. J. Lipid Res* 3556, 1027–1030.

(22) JOUSSEN, A M., ROHRSCHEIDER, K., REICHLING, J., KIRCHHOF, B., KRUSE, F. E. (2000) Treatment of corneal neovascularization

with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp. Eye Res.* 71, 483–7.

(22) CAO, Y., CAO, R., BRÅKENHIJELM, E. (2002) Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J. Nutr. Biochem.*

(23) BREIKAA, R. M., ALGANDABY, M. M., EL-DEMERDASH, E., ABDEL-NAÏM, A. B. (2013) Multimechanistic antifibrotic effect of biochanin a in rats: implications of proinflammatory and profibrogenic mediators. *PLoS One* 8, e69276.

(24) ELSHAZLY, S. M., MAHMOUD, A. A. A. (2014) Antifibrotic activity of hesperidin against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 387, 559–567.

(25) AZAR, D. T. (2006) Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an american ophthalmological society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 104104, 264–302.

(26) GUPTA, D., ILLINGWORTH, C. (2011) Treatments for Corneal Neovascularization: A Review. *Cornea* 00, 1–12.

(27) ELLENBERG, D., AZAR, D. T., HALLAK, J. A., TOBAIGY, F., HAN, K. Y., JAIN, S., ZHOU, Z., CHANG, J.-H. (2010) Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 208–48.

(28) SELLAMI, D., ABID, S., BOUAOUAJA, G., BEN AMOR, S., KAMMOUN, B., MASMOUDI, M., DABBECHÉ, K., BOUMOU, H., BEN ZINA, Z., FEKI, J. (2007) Epidemiology and risk factors for corneal graft rejection. *Transpl. Proc* 39, 2609–2611.

(29) LEE, P., WANG, C. C., ADAMIS, A. P. (1998) Ocular neovascularization: An epidemiologic review. *Surv. Ophthalmol.*

(30) MADDULA, S., DAVIS, D. K., MADDULA, S., BURROW, M. K.,

AMBATÌ, B. K. (2011) Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology* 118, 591–599.

(31) MARAGOUDAKÌS, M. E. (2000) Angiogenesis in health and disease, in *General Pharmacology: Vascular System*, pp 225–226.

(32) PASCOLÌNÌ, D., MARIOTTÌ, S. P. (2012) Global estimates of visual impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 614–618.

(33) WHO | Causes of blindness and visual impairment. [Erişim Tarihi: 2016 Nisan23]; Erişim: <http://www.who.int/blindness/causes/en/>

(34) CHAN, C. K., PHAM, L. N., ZHOU, J., SPEE, C., RYAN, S. J., HİNTON, D. R. (2005) Differential expression of pro- and antiangiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Lab. Invest.* 85, 721–733.

(35) J.H. KRACHMER, M.J. MANNİS, E. J. H. (2005) *Cornea*. Elsevier Mosby, New York.

(36) CHANG, J. H., GABİSON, E. E., KATO, T., AZAR, D. T. (2001) Corneal neovascularization. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 12, 242–249.

(37) SAMOLOV, B., STEEN, B., SEREGARD, S., VAN DER PLOEG, I., MONTAN, P., KVANTA, A. (2005) Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Exp. Eye Res.* 80, 159–166.

(38) DAWSON, D. W., VOLPERT, O. V, GİLLİS, P., CRAWFORD, S. E., XU, H., BENEDİCT, W., BOUCK, N. P. (1999) Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis. *Science* (80-. ). 285, 245–248.

(39) JACKSON, J. R., SEED, M. P., KİRCHER, C. H., WİLLOUGHBY, D. A., WİNKLER, J. D. (1997) The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* 11, 457–65.

(40) ROLFSEN, M. L., FRÍSARD, N. E., STERN, E. M., FOSTER, T. P., BHATTACHARJEE, P. S., MCFERRIN JR, H. E., CLEMENT, C., RODRÍGUEZ, P. C., LUKIŪ, W. J., BERGSMA, D. R., OCHOA, A. C., HILL, J. M. (2013) Corneal neovascularization: a review of the molecular biology and current therapies. *Expert Rev. Ophthalmol.* 8, 167–189.

(41) LIESEGANG, T. J. (2002) Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J.* 28, 12–27.

(42) Report of the global scientific meeting on future approaches to trachoma control. [Erişim tarihi: 2016, Nisan 23]. Erişim: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66169/1/WHO\\_PBL\\_97.60.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66169/1/WHO_PBL_97.60.pdf)

(43) WUEST, T., ZHENG, M., EFSTATHIOU, S., HALFORD, W. P., CARR, D. J. J. (2011) The herpes simplex virus-1 transactivator infected cell protein-4 drives VEGF-A dependent Neovascularization. *PLoS Pathog.* 7, 12–14.

(44) CURSIEFEN, C., CHEN, L., DANA, M. R., STREILEIN, J. W. J. (2003) Corneal Lymphangiogenesis: Evidence, Mechanisms, and implication for corneal transplant immunology. *Cornea* 22, 273–281.

(45) HILL, J. C. (2002) High risk corneal grafting. *Br. J. Ophthalmol.* 86, 945.

(46) Corneal, T. C. (1992) The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch. Ophthalmol.*

(47) BACHMANN, B., TAYLOR, R. S., CURSIEFEN, C. (2010) Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: An evidence-based meta-analysis. *Ophthalmology* 117.



(48) LÌM, P., FUCHSLUGER, T. A, JURKUNAS, U. V. (2009) Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin. Ophthalmol.* 24, 139–48.

(49) QAZÌ, Y., WONG, G., MONSON, B., STRÌNGHAM, J., AMBATÌ, B. K. (2010) Corneal transparency: Genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res. Bull.* 81, 198–210.

(50) BEEBE, D. C. (2008) Maintaining transparency: A review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Semin. Cell Dev. Biol.*

(51) HÄGGSTRÖM, M. (2014) Medical gallery of Mikael Häggström 2014. *Wikiversity J. Med.* 1.

(52) AIELLO, L. P., WONG, J. S. (2000) Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int. Suppl.* 77, S113–S119.

(53) DVORAK, H. F., NAGY, J. A, FENG, D., BROWN, L. F., DVORAK, A M. (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237, 97–132.

(54) LEUNG, D. W., CACHIANES, G., KUANG, W. J., GOEDEL, D. V, FERRARA, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309.

(55) ZHANG, S. X., MA, J. XÌNG. (2007) Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog. Retin. Eye Res.*

(56) KLETTNER, A, ROIDER, J. (2009) Treating age-related macular degeneration - interaction of VEGF-antagonists with their target. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 1127–35.

(57) KRÍZOVÁ, D., VOKROJOVÁ, M., LIÉHNEOVÁ, K., STUDENÝ, P. (2014) Treatment of Corneal Neovascularization Using Anti-VEGF Bevacizumab. *J. Ophthalmol.* 2014, 178132.

(58) QAZÍ, Y., MADDULA, S., AMBATÍ, B. K. (2009) Mediators of ocular angiogenesis. *J. Genet.*

(59) MURAKAMÍ, M., SÍMONS, M. (2008) Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 215–220.

(60) ADAMÍS, A. P., MEKLÍR, B., JOYCE, N. C. (1991) In situ injury-induced release of basic-fibroblast growth factor from corneal epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 139, 961–7.

(61) BÍKFALVÍ, A., KLEIN, S., PÍNTUCCI, G., RÍFKÍN, D. B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.* 18, 26–45.

(62) ONGUCHÍ, T., HAN, K. Y., CHANG, J.-H., AZAR, D. T. (2009) Membrane type-1 matrix metalloproteinase potentiates basic fibroblast growth factor-induced corneal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 174, 1564–71.

(63) O'REÍLLY, M. S., WIEDERSCHAIN, D., STETLER-STEVENSON, W. G., FOLKMAN, J., MOSES, M. A. (1999) Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J. Biol. Chem.* 274, 29568–29571.

(64) VÍSSE, R., NAGASE, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*

(65) BRUMMER, O., BOHMER, G., HOLLWÍTZ, B., FLEMMING, P., PETRY, K. U., KUHNLE, H. (2002) MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol.* 84, 222–227.

(66) NAGASE, H., WOESSNER, J. F. (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494.

(67) RAZA, S. L., CORNELIUS, L. A. (2000) Matrix metalloproteinases: Pro- and anti-angiogenic activities, in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, pp 47–54.

(68) SLANSKY, H. H., FREEMAN, M. I., ITOI, M. (1968) Collagenolytic activity in bovine corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 80, 496–498.

(69) CHAORAN, Z., ZHIRONG, L., GEZHI, X. (2011) Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves the antiangiogenic efficacy for advanced stage mouse corneal neovascularization. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249, 1493–1501.

(70) HOPPENREIJS, V. P. T., PELS, E., VRENSEN, G. F. J. M., FELTEN, P. C., TREFFERS, W. F. (1993) Platelet-derived growth factor: Receptor expression in corneas and effects on corneal cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 637–649.

(71) TALLQUIST, M., KAZLAUSKAS, A. (2004) PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.*

(72) HELLSTRÖM, M., KALÉN, M., LINDAHL, P., ABRAMSSON, A., BETSHOLTZ, C. (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126, 3047–3055.

(73) MENZEL-SEVERING, J. (2012) Emerging techniques to treat corneal neovascularisation. *Eye* 26, 2–12.

(74) DELL, S., PETERS, S., MÜTHER, P., KOCIÖK, N., JOUSSEN, A. M. (2006) The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the

pathogenesis of corneal neovascularization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1928–1937.

(75) ZAMIRI, P., MASLI, S., STREILEIN, J. W., TAYLOR, A. W. (2006) Pigment epithelial growth factor suppresses inflammation by modulating macrophage activation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3912–3918.

(76) NAGATA, S., GOLSTEIN, P. (1995) The Fas death factor. *Science* 267, 1449–1456.

(77) MORI, K., GEHLBACH, P., ANDO, A., MCVEY, D., WEI, L., CAMPOCHIARO, P. A. (2002) Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2428–2434.

(78) MATSUI, T., NISHINO, Y., MAEDA, S., YAMAGISHI, S. ICHI. (2012) PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression. *Microvasc. Res.* 84, 105–108.

(79) SPRANGER, J., OSTERHOFF, M., REIMANN, M., M??HLIG, M., RISTOW, M., FRANCIS, M. K., CRISTOFALO, V., HAMMES, H. P., SMITH, G., BOULTON, M., PFEIFFER, A. F. H. (2001) Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 50, 2641–2645.

(80) AMBATI, B. K., JOUSSEN, A. M., AMBATI, J., MOROMIZATO, Y., GUHA, C., JAVAHERIAN, K., GILLIES, S., O'REILLY, M. S., ADAMIS, A. P. (2002) Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 120, 1063–8.

(81) ELLENBERG, D., AZAR, D. T., HALLAK, J. A., TOBAIGY, F., HAN, K. Y., JAIN, S., ZHOU, Z., CHANG, J. H. (2010) Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog. Retin. Eye Res.*

(82) MORIMOTO, T., AOYAGI, M., TAMAKI, M., YOSHINO, Y., HORI, H., DUAN, L., YANO, T., SHIBATA, M., OHNO, K., HIRAKAWA, K., YAMAGUCHI, N. (2002) Increased levels of tissue endostatin in human malignant gliomas. *Clin. Cancer Res.* 8, 2933–8.

(83) ERIKSSON, K., MAGNUSSON, P., DIXELIUS, J., CLAESSION-WELSH, L., CROSS, M. J. (2003) Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 536, 19–24.

(84) KIM, Y.-M., HWANG, S., KIM, Y.-M., PYUN, B.-J., KIM, T.-Y., LEE, S.-T., GHO, Y. S., KWON, Y.-G. (2002) Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/FIk-1. *J. Biol. Chem.* 277, 27872–9.

(85) DHANABAL, M., RAMCHANDRAN, R., WATERMAN, M. J., LU, H., KNEBELMANN, B., SEGAL, M., SUKHATME, V. P. (1999) Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 11721–6.

(86) CURSIEFEN, C., WENKEL, H., MARTUS, P., LANGENBUCHER, A., NGUYEN, N. X., SEITZ, B., KÜCHLE, M., NAUMANN, G. O. (2001) Impact of short-term versus long-term topical steroids on corneal neovascularization after non-high-risk keratoplasty. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 239, 514–521.

(87) TAKAHASHI, K., SAISHIN, Y., SAISHIN, Y., MORI, K., ANDO, A., YAMAMOTO, S., OSHIMA, Y., NAMBU, H., MELIA, M. B., BINGAMAN, D. P., CAMPOCHIARO, P. A. (2003) Topical nepafenac inhibits ocular neovascularization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 409–415.

(88) JONES, I. S., MEYER, K. (1950) Inhibition of vascularization of the rabbit cornea by local application of cortisone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74, 102–4.

(89) HOS, D., SABAN, D. R., BOCK, F., REGENFUSS, B., ONDERKA, J.,

MASLI, S., CURSIEFEN, C. (2011) Suppression of inflammatory corneal lymphangiogenesis by application of topical corticosteroids. *Arch. Ophthalmol.* 129, 445–52.

(90) INGBER, D. E., MADRÌ, J. A., FOLKMAN, J. (1986) A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: Induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 119, 1768–1775.

(91) SAUD, E. E., MORAES, H. V, MARCULINO, L. G. C., GOMES, J. A. P., ALLODÌ, S., AND MÌGUEL, N. C. O. (2012) Clinical and histopathological outcomes of subconjunctival triamcinolone injection for the treatment of acute ocular alkali burn in rabbits. *Cornea* 31, 181–7.

(92) BECKER, B. (1964) The Side Effects of Corticosteroids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 3, 492–497.

(93) YAMADA, M., KAWAI, M., KAWAI, Y., MASHIMA, Y. (1999) The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Curr. Eye Res.* 19, 300–4.

(94) ROBIN, J. B., REGIS-PACHECO, L. F., KASH, R. L., SCHANZLIN, D. J. (1985) The histopathology of corneal neovascularization. Inhibitor effects. *Arch. Ophthalmol.* 103, 284–287.

(95) MAHONEY, J. M., WATERBURY, L. D. (1985) Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr. Eye Res.* 4, 531–5.

(96) GUIDERA, A. C., LUCHS, J. I., UDELL, I. J. (2001) Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ophthalmology* 108, 936–944.

(97) HEILIGENHAUS, A., STEUHL, K. P. (1999) Treatment of HSV-1 stromal keratitis with topical cyclosporin A: A pilot study. *Graefe's Arch. Clin.*

*Exp. Ophthalmol.* 237, 435–438.

(98) LEPRI, A., BENELLI, U., BERNARDINI, N., BIANCHI, F., LUPETTI, M., DANESI, R., DEL TACCA, M., NARDI, M. (1994) Effect of low molecular weight heparan sulphate on angiogenesis in the rat cornea after chemical cauterization. *J Ocul Pharmacol* 10, 273–280.

(99) JOUSSEN, A. M., KRUSE, F. E., VÖLCKER, H. E., KIRCHHOF, B. (1999) Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 237, 920–927.

(100) KENYON, B. M., BROWNE, F., D'AMATO, R. J. (1997) Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp. Eye Res.* 64, 971–8.

(101) CURSIEFEN, C., COLIN, J., DANA, R., DIAZ-LLOPIS, M., FARAJ, L. A., GARCIA-DELPECH, S., GEERLING, G., PRICE, F. W., REMEIJER, L., ROUSE, B. T., SEITZ, B., UDAONDO, P., MELLER, D., DUA, H. (2012) Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 3–9.

(102) HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J., HEIM, W., BERLIN, J., BARON, A., GRIFFING, S., HOLMGREN, E., FERRARA, N., FYFE, G., ROGERS, B., ROSS, R., KABBINAVAR, F. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2335–42.

(103) DASTJERDI, M. H., AL-ARFAJ, K. M., NALLASAMY, N., HAMRAH, P., JURKUNAS, U. V., PINEDA II, R., PAVAN-LANGSTON, D., DANA, R. (2009) Topical Bevacizumab in the Treatment of Corneal Neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* 127, 381–389.

(104) ROSENFELD, P. J., BROWN, D. M., HEIER, J. S., BOYER, D. S.,

KAISER, P. K., CHUNG, C. Y., KIM, R. Y., MARINA STUDY GROUP. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1419–31.

(105) MARMOR, M. F., NEGÌ, A., MAURICE, D. M. (1985) Kinetics of macromolecules injected into the subretinal space. *Exp. Eye Res.* 40, 687–696.

(106) DURSUN, A., ARICI, M. K., DURSUN, F., OZEC, A. V., TOKER, M. I., ERDOGAN, H., TOPALKARA, A. (2012) Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int. J. Ophthalmol.* 5, 448–51.

(107) MENDEL, D. B., LAIRD, A. D., XIN, X., LOUIE, S. G., CHRISTENSEN, J. G., LI, G., SCHRECK, R. E., ABRAMS, T. J., NGAI, T. J., LEE, L. B., MURRAY, L. J., CARVER, J., CHAN, E., MOSS, K. G., HAZNEDAR, J. O., SUKBUNTHERNG, J., BLAKE, R. A., SUN, L., TANG, C., MILLER, T., SHIRAZIAN, S., MCMAHON, G., CHERRINGTON, J. M. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res.* 9, 327–37.

(108) ROSKOSKI, R. (2007) Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 323–8.

(109) IMBULGODA, A., HENG, D. Y. C., AND KOLLMANNNSBERGER, C. (2014) Sunitinib in the treatment of advanced solid tumors. *Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Progrès dans les Rech. sur le cancer* 201, 165–84.

(110) ADELLI, G. R. (2013) Phytochemicals in ocular health: Therapeutic potential and delivery challenges. *World J. Pharmacol.* 2, 18.



(111) KINOSHITA, T., LEPP, Z., KAWAI, Y., TERAOKA, J., CHUMAN, H. (2006, January 1) An integrated database of flavonoids. *Biofactors*. IOS Press.

(112) CHOI, E. J. (2008) Antioxidative effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in mice. *Life Sci.* 82, 1059–1064.

(113) CHIOU, G. C. Y., XU, X.-R. (2004) Effects of some natural flavonoids on retinal function recovery after ischemic insult in the rat. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 20, 107–113.

(114) PAYSANT, J., SANSILVESTRI-MOREL, P., BOUSKELA, E., VERBEUREN, T. J. (2008) Different flavonoids present in the micronized purified flavonoid fraction (Daflon?? 500 mg) contribute to its anti-hyperpermeability effect in the hamster cheek pouch microcirculation. *Int. Angiol.* 27, 81–85.

(115) CHOI, E. J., AHN, W. S. (2008) Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. *Arch. Pharm. Res.* 31, 1457–1462.

(116) ARANGANATHAN, S., SELVAM, J. P., NALINI, N. (2008) Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on bacterial enzymes and carcinogen-induced aberrant crypt foci in colon cancer rats: a dose-dependent study. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 1385–1392.

(117) SHIMOUCHI, A., YOKOTA, H., ONO, S., MATSUMOTO, C., TAMAI, T., TAKUMI, H., NARAYANAN, S. P., KIMURA, S., KOBAYASHI, H., RUTH, B., NAGAOKA, T., YOSHIDA, A. (2016) HHS Public Access 60, 51–61.

(118) KUMAR, B., GUPTA, S. K., SRINIVASAN, B. P., NAG, T. C., SRIVASTAVA, S., SAXENA, R., JHA, K. A. (2013) Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc. Res.* 87, 65–74.

(119) Naringenin inhibits corneal neovascularization by antiinflammatory and anti-oxidant mechanisms. [Erişim Tarii: 2016, Mayıs 18]. Erişim: [http://www.arvo.org/webs/am2016/sectionpdf/CO/Session\\_338.pdf](http://www.arvo.org/webs/am2016/sectionpdf/CO/Session_338.pdf)

(120) KARA, S., GENCER, B., KARACA, T., TUFAN, H. A., ARİKAN, S., ERSAN, I., KARABOGA, I., HANCI, V. (2014) Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *Sci. World J.* 2014.

(121) REED, J. W., FROMER, C., KLİNTWORTH, G. K. (1975) Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. *Arch Ophthalmol* 93, 1017–1019.

(122) GERTEN, G. (2008) Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularization in corneal transplant surgery. *Cornea* 27, 1195–9.

(123) Pai, V. H., and Handary, S. V. (2009) Necrotizing scleritis following laser therapy for corneal vascularization. *Ann Ophthalmol* 41, 50–51.

(124) NİRANKARI, V. S., BAER, J. C. (1986) Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 93, 1304–9.

(125) YOON, K. C., YOU, I. C., KANG, I. S., IM, S. K., AHN, J. K., PARK, Y. G., AHN, K. Y. (2007) Photodynamic Therapy with Verteporfin for Corneal Neovascularization. *Am. J. Ophthalmol.* 144.

(126) GORDON, Y. J., MANN, R. K., MAH, T. S., GORİN, M. B. (2002) Fluorescein-potentiated argon laser therapy improves symptoms and appearance of corneal neovascularization. *Cornea* 21, 770–773.

(127) MACDONALD, I. I. J., DOUGHERTY, T. J. (2001) Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins* 5, 105–129.

(128) YOU, I.-C., IM, S.-K., LEE, S.-H., YOON, K.-C. (2011) Photodynamic

therapy with verteporfin combined with subconjunctival injection of bevacizumab for corneal neovascularization. *Cornea* 30, 30–3.

(129) SOLOMON, A., ELLIÈS, P., ANDERSON, D. F., TOUHAMI, A., GRUETERICH, M., ESPANA, E. M., TÌ, S. E., GOTO, E., FEUER, W. J., TSENG, S. C. G. (2002) Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 109, 1159–1166.

(130) HAO, Y., MA, D. H., HWANG, D. G., KÌM, W. S., ZHANG, F. (2000) Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19, 348–52.

(131) KÌM, J. C., TSENG, S. C. (1995) The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J. Ophthalmol.* 9, 32–46.

(132) PÌLLAI, C. T., DUA, H. S., HOSSAIN, P. (2000) Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2148–2153.

(133) THATTE, S. (2016) Fine needle diathermy - a choice for managing corneal vascularization. *Nepal J. Ophthalmol.* 3, 23–6.

(134) QÌAN, C. X., BAHAR, I., LEVÌNGER, E., ROOTMAN, D. (2008) Combined use of superficial keratectomy and subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea* 27, 1090–1092.

(135) GAN, L., FAGERHOLM, P., PALMBLAD, J. (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol. Scand.* 82, 557–563.

(136) ZAKÌ, A. A., FARÌD, S. F. (2010) Subconjunctival bevacizumab for

corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 88, 868–871.

(137) ÇAKMAK, H., ERGİN, K., BOZKURT, G., KOCATÜRK, T., EVLİÇOĞLU, G. E. (2015) The effects of topical everolimus and sunitinib on corneal neovascularization. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 9527, 1–7.

(138) BAHAR, I., YEUNG, S. N., SELLA, R., SLOMOVIC, A. (2012) Anterior segment uses of bevacizumab. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 23, 303–16.

(139) CHANG, J. H., GABISON, E. E., KATO, T., AZAR, D. T. (2001) Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 12, 242–249.

(140) TAH, V., ORLANS, H. O., HYER, J., CASSWELL, E., DİN, N., SRİ SHANMUGANATHAN, V., RAMSKOLD, L., PASU, S. (2015) Anti-VEGF therapy and the retina: An update. *J. Ophthalmol.* 2015.

(141) KOENIG, Y., BOCK, F., HORN, F., KRUSE, F., STRAUB, K., CURSIEFEN, C. (2009) Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* = *Albr. von Graefes Arch. für Klin. und Exp. Ophthalmol.* 247, 1375–82.

(142) YOERUEK, E., ZIEMSEN, F., HENKE-FAHLE, S., TATAR, O., TURA, A., GRISANTİ, S., BARTZ-SCHMİDT, K. U., SZURMAN, P. (2008) Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol.* 86, 322–8.

(143) CHEN, W. L., CHEN, Y. M., CHU, H. S., LİN, C. T., CHOW, L. P., CHEN, C. T., HU, F. R. (2014) Mechanisms controlling the effects of bevacizumab (Avastin) on the inhibition of early but not late formed corneal neovascularization. *PLoS One* 9.

(144) YOU, I.-C., KANG, I.-S., LEE, S.-H., YOON, K.-C. (2009)

Therapeutic effect of subconjunctival injection of bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 87, 653–8.

(145) BHATTI, N., QIDWAI, U., HUSSAIN, M., KAZI, A. (2013) Efficacy of sub-conjunctival and topical bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *J. Pak. Med. Assoc.* 63, 1256–1259.

(146) KIM, W.-J., JEONG, H.-O., CHUNG, S.-K. (2010) The effect of bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Korean J. Ophthalmol.* 24, 230–6.

(147) KIM, J., KIM, D., KIM, E.-S., KIM, M. J., TCHAH, H. (2013) Topically administered bevacizumab had longer standing anti-angiogenic effect than subconjunctivally injected bevacizumab in rat corneal neovascularization. *Int. J. Ophthalmol.* 6, 588–91.

(148) KIM, J.-H., SEO, H.-W., HAN, H.-C., LEE, J.-H., CHOI, S.-K., LEE, D. (2013) The effect of bevacizumab versus ranibizumab in the treatment of corneal neovascularization: a preliminary study. *Korean J. Ophthalmol.* 27, 235–42.

(149) XU, L., MREJEN, S., JUNG, J. J., GALLEGRO-PINAZO, R., THOMPSON, D., MARSIGLIA, M., FREUND, K. B. (2014) Geographic Atrophy in Patients Receiving Anti-Vascular Endothelial Growth Factor for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina* 1–11.

(150) CHO, H. J., YOO, S. G., KIM, H. S., KIM, J. H., KIM, C. G., LEE, T. G., KIM, J. W. (2015) Risk factors for geographic atrophy after intravitreal ranibizumab injections for retinal angiomatous proliferation. *Am. J. Ophthalmol.* 159, 285–292.e1.

(151) HUANG, D., ZHAO, C., JU, R., KUMAR, A., TIAN, G., HUANG, L., ZHENG, L., LI, X., LIU, L., WANG, S., REN, X., YE, Z., CHEN, W., XING, L., CHEN, Q., GAO, Z., MI, J., TANG, Z., WANG, B., ZHANG, S., LEE, C., LI, X.

(2016) VEGF-B inhibits hyperglycemia- and Macugen-induced retinal apoptosis. *Sci. Rep.* 6, 26059.

(152) AVCI, B., AVCI, R., INAN, U. U., KADERLI, B. (2009) Comparative evaluation of apoptotic activity in photoreceptor cells after intravitreal injection of bevacizumab and pegaptanib sodium in rabbits. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3438–3446.

(153) YU, C. Q., ZHANG, M., MATIS, K. I., KIM, C., ROSENBLATT, M. I. (2008) Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3870–3878.

(154) RALPH, R. A. (2000) Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea* 19, 274–277.

(155) DURSUN, D., KIM, M. C., SOLOMON, A., PFLUGFELDER, S. C. (2001) Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids. *Am. J. Ophthalmol.* 132, 8–13.

(156) SOLOMON, A., ROSENBLATT, M., LI, D. Q., LIU, Z., MONROY, D., JI, Z., LOKESHWAR, B. L., PFLUGFELDER, S. C. (2000) Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2544–2557.

(157) D'AGOSTINO, P., ARCOLEO, F., BARBERA, C., DI BELLA, G., LA ROSA, M., MISIANO, G., MILANO, S., BRAI, M., CAMMARATA, G., FEO, S., CILLARI, E. (1998) Tetracycline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 346, 283–290.

(158) WILSON, S. E., MOHAN, R. R., MOHAN, R. R., AMBR??SIO, R., HONG, J., LEE, J. (2001) The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog.*

*Retin. Eye Res.*

(159) KON, K., FUJII, S., KOSAKA, H., FUJIWARA, T. (2003) Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester retards vascular sprouting in angiogenesis. *Microvasc. Res.* 65, 2–8.

(160) YAMADA, J., DANA, M. R., SOTOZONO, C., KINOSHITA, S. (2003) Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury. *Exp. Eye Res.* 76, 161–167.

(161) HALL, L. B., ZEBARDAST, N., HUANG, J. J., ADELMAN, R. A. (2014) Aflibercept in the treatment of neovascular age-related macular degeneration in previously treated patients. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 30, 346–52.

(162) DETRY, B., BLACHER, S., ERPIĆUM, C., PAUPERT, J., MAERTENS, L., MAILLARD, C., MUNAUT, C., SOUNNI, N. E., LAMBERT, V., FOÏDART, J. M., RAKIĆ, J. M., CATALDO, D. (2013) Sunitinib inhibits inflammatory corneal lymphangiogenesis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 3082–3093.

(163) PÉREZ-SANTONJA, J. J., CAMPOS-MOLLO, E., LLEDÓ-RÍQUELME, M., FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L., CUENCA-NAVARRO, N. (2013) Vascular morphological and microdensity changes of corneal neovascularization induced by topical bevacizumab and sunitinib in an animal model. *Arch. la Soc. Española Oftalmol. (English Ed.* 88, 473–481.

(164) MAJUMDAR, S., SRIRANGAM, R. (2009) Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid. *Pharm. Res.* 26, 1217–25.

(165) SARAÍA, M., ZAPATA, G., FERRAIÓLO, P., RACCA, L., BERRA, A. (2009) Anti-VEGF monoclonal antibody-induced regression of corneal neovascularization and inflammation in a rabbit model of herpetic stromal

keratitis. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* = *Albr. von Graefes Arch. für Klin. und Exp. Ophthalmol.* 247, 1409–16.

(166) ROSMORDUC, O. (2010) Antiangiogenic therapies in portal hypertension: a breakthrough in hepatology. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, 446–9.

(167) AHN, S. J., PARK, K. H., AND WOO, S. J. (2016) SUBRETINAL FIBROSIS AFTER ANTIVASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR THERAPY IN EYES WITH MYOPIC CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION. *Retina.*

(168) ZHANG, M., CHU, S., ZENG, F., XU, H. (2015) Bevacizumab modulates the process of fibrosis in vitro. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 43, 173–9.

(169) VAN GEEST, R. J., LESNÍK-OBERSTEIN, S. Y., TAN, H. S., MURA, M., GOLDSCHMEDING, R., VAN NOORDEN, C. J. F., KLAASSEN, I., SCHLINGEMANN, R. O. (2012) A shift in the balance of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor by bevacizumab causes the angiofibrotic switch in proliferative diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 587–90.

(170) COTSARELIS, G., CHENG, S. Z., DONG, G., SUN, T. T., LAVKER, R. M. (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57, 201–9.

(171) SEJPAL, K., BAKHTIARI, P., DENG, S. X. (2016) Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* 20, 5–10.

(172) LAVKER, R. M., TSENG, S. C. G., SUN, T.-T. (2004) Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new



angle. *Exp. Eye Res.* 78, 433–446.

(173) DUA HS, AZUARA-BLANCO A.(2000) Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology.* p. 415–25.

