

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

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU
OLUŞTURULAN SIÇAN MODELİNDE TOPİKAL VE
SUBKONJONKTİVAL UYGULANAN BEVASİZUMAB VE
SESAMOL'UN NEOVASKÜLARİZASYONA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HÜSEYİN KAYA**

**DANIŞMAN
YRD.DOÇ.DR. GÖKHAN PEKEL**

DENİZLİ - 2014

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

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU
OLUŞTURULAN SIÇAN MODELİNDE TOPİKAL VE
SUBKONJONKTİVAL UYGULANAN BEVASİZUMAB VE
SESAMOL'UN NEOVASKÜLARİZASYONA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HÜSEYİN KAYA**

**DANIŞMAN
YRD.DOÇ.DR. GÖKHAN PEKEL**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 11/04/2014 tarih ve 2014TPF010 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2014

Yrd.Doç. Dr. GÖKHAN PEKEL danışmanlığında Dr. HÜSEYİN KAYA tarafından yapılan "DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU OLUŞTURULAN SIÇAN MODELİNDE TOPIKAL VE SUBKONJONKTİVAL UYGULANAN BEVASİZUMAB VE SESAMOL'UN NEOVASKÜLARİZASYONA ETKİSİ " başlıklı tez çalışması 05/01/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından GÖZ HASTALIKLARI Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: PROF.DR.AVİNİ MURAT AVUNDUK

ÜYE : PROF.DR.VOLKAN YAYLALI

ÜYE : YRD.DOÇ.DR.HARUN ÇAKMAK

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. Gün../Ay../Yıl..

Prof. Dr.HASAN HERKEN

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim baŐta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Avni Murat Avunduk olmak üzere tüm değerli hocalarıma teŐekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalışmalarımnda katkılarını esirgemeyen baŐta tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Gökhan PEKEL olmak üzere, Prof. Dr. Volkan Yaylalı ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Simavlı hocalarıma ayrıca teŐekkürlerimi sunarım.

İhtisasım boyunca beraber çok Őey paylaŐtıđımız, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarımlın her birine teŐekkürlerimi sunarım.

Bu uzun serüvende beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve hep desteğini hissettiğim annem, babam, eşim Derya' ya ve oğlum Mustafa Kayra'ya teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kornea Anatomisi	3
2.1.1.Epitel ve Bazal Membran	3
2.1.2.Bowman Zarı	5
2.1.3. Stroma Tabakası	5
2.1.4. Descement Membranı	6
2.1.5. Endotel Tabakası	6
2.2. Kornea Yara İyileşmesi	6
2.2.1.Epitel Yara İyileşmesi	6
2.2.2.Bazal Membran Yara İyileşmesi	7
2.2.3.Stromal Yara İyileşmesi	8
2.2.4.Endotel Yara İyileşmesi	9
2.3.Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	9
2.3.1.Beslenme ve Yaş	9
2.3.2.Göz Yaşı Tabakası	10
2.3.3.Enfeksiyon	10
2.3.4.Yara Apozisyonu	10
2.3.5.Enflamasyon	10
2.3.6.Duyusal İnervasyon ve İntraoküler Basınç	11
2.3.7.Vaskülarizasyon	11
2.3.8.İlaçlar	11
2.3.9.Fibronektin	12
2.4.Korneal Yara İyileşmesinde Enflamatuvar Sitokinlerin Rolü	12
2.5.Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Büyüme Faktörleri	12
2.6.Korneanın Alkali Yanıkları	14
2.7.Korneanın Avasküler Durumu ve Vaskülarizasyon	14
2.7.1.Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyaran Faktörler	16
2.7.1.1.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	16

2.7.1.2.Tümör Nekrosis Faktör	17
2.7.1.3.Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör	18
2.7.1.4.Fibroblast Growth Faktör	18
2.7.1.5.IL-8	18
2.7.2.Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler	18
2.7.3.Kornea Neovaskülarizasyon Fazları	19
2.7.4.Epidemiyoloji	20
2.7.5.Risk Faktörleri	20
2.8.Bevasizumab	22
2.9.Sesamol	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1.Anestezi Tekniği	28
3.2.Kornea Yanık Alanlarının Değerlendirilmesi	28
3.3.Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi	28
3.4.Histopatolojik İnceleme	29
3.5.İstatistiksel Analiz	33
4.BULGULAR	33
4.1.Kornea Yanık Derecelerinin Karşılaştırılması	34
4.2.Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması	35
4.3.Histopatolojik İnceleme	39
5.TARTIŞMA	44
6.SONUÇLAR	58
7.KAYNAKÇA	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ang:	Anjiopoetin
COX :	Sikloksijenaz
ECM:	Ekstraseluler Matriks
EGF:	Endotel Büyüme Faktörü
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
Fn:	Fibronektin
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
IGF:	İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü
IL:	İnterlokın
KGF:	Keratosit Büyüme Faktörü
kDa:	kilodalton
MMP:	Matriks Metallo Proteinaz
NF-κB:	Nükleer faktör kapa B
PMNL:	Polimorfonükleer Lökosit
PDGF:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEDF:	Pigment Epiteli Derived Faktör
TGF :	Transforme edici büyüme faktörü
TNF :	Tümör nekrozis faktör
Tsp:	Trombospondin
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
YBMD:	Yaşa bağı makula dejenerasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa No:
Şekil 2.1. Kornea epiteli kesiti	4
Şekil 2.2. Sesamolün kimyasal formülü	23
Şekil 3.1. A) 3 mm çapında kesilmiş whatman kağıtları B) whatman filtre kağıdı	26
Şekil 3.2. NaOH ile kimyasal koterizasyondan hemen sonraki görünüm	26
Şekil 3.3. Kimyasal koterizasyondan hemen sonra subkonjonktival enjeksiyonun yapılışı	27
Şekil 3.4. Kimyasal koterizasyondan hemen sonra damla uygulaması	28
Şekil 3.5. Mahoney ve Waterbury'nin tanımladığı yanık alanının ve Korneal neovaskülarizasyonun derecelendirilmesi	29
Şekil 3.6. Bu örnekte neovaskülarizasyonun derin stromaya kadar uzandığı, yoğun ve yaygın damarlanma olduğu görüldü. Vaskülarizasyon derecesi, fibroblast aktivitesi ve inflamasyon yoğunluğu değerlerinin hepsi ++++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir (Işık mikroskobu(IM), HE, x100).	31
Şekil 3.7. Vaskülarizasyon derecesi ++++, fibroblast aktivitesi ++++ ve inflamasyon yoğunluğu ++++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(IM, HE, x100).	31

- Şekil 3.8.** Bu örnekte arkası kesik oklar fibroblastları göstermekte olup fibroblast aktivitesi ++++ olarak değerlendirilmiştir (IM,HE, x 200). 32
- Şekil 3.9.** Vaskülarizasyon derecesi +++, fibroblast aktivitesi +++ ve inflamasyon yoğunluğu +++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(IM, HE, x100). 32
- Şekil 3.10.** Vaskülarizasyon derecesi ++, fibroblast aktivitesi ++ ve inflamasyon yoğunluğu ++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(IM, HE, x100). 33
- Şekil 3.11.** Yukarıdaki örnekte vaskülarizasyon derecesi +, fibroblast aktivitesi + ve inflamasyon yoğunluğu + olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli göstermektedir (IM, HE, x100). 33
- Şekil 4.1.** Gruplardaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon alanlarının dağılımının grafikte gösterimi. 36
- Şekil 4.2.** Tüm grupların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi. 38
- Şekil 4.3.** Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre inflamasyon yoğunluğunun dağılımı 41
- Şekil 4.4.** Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre fibroblast aktivitesinin dağılımı. 42
- Şekil 4.5.** Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre damarlanma yoğunluğunun dağılımı. 44

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler	16
Tablo 2.2. Kornea neovaskülarizasyonuna neden olan hastalıklar	21
Tablo 4.1. Gruplardaki sıçanların kornea yanık alanları dereceleri.....	34
Tablo 4.2. Gruplardaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri	35
Tablo 4.3. Tüm gruplardaki sıçanların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdelerinin ortalama ve ortanca değerleri.....	37
Tablo 4.4. Grupların histopatolojik inceleme sonuçları.	39

ÖZET

Deneyisel kornea neovaskülarizasyonu oluşturulan sıçan modelinde topikal ve subkonjonktival uygulanan bevasizumab ve sesamol'un neovaskülarizasyona etkisi

Dr.Hüseyin KAYA

Korneal neovaskülarizasyon görmeyi tehdit eden önemli bir sağlık problemidir. Çalışmamızda deneyisel korneal neovaskülarizasyon oluşturulan sıçan modelinde topikal ve subkonjonktival uygulanan bevasizumab ve sesamolün neovaskülarizasyona etkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda 56 adet Wistar-Albino cinsi dişi sıçanın sağ gözleri kimyasal uygulamayla koterize edildi. Çalışmayı tamamlayabilen 55 tanesi ile sonuçlar elde edildi. Denekler kontrol, subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival sesamol, subkonjonktival bevasizumab+sesamol, topikal bevasizumab, topikal sesamol, topikal bevasizumab+sesamol, topikal tween 80 olmak üzere 8 gruba ayrıldı. Alkali yanık oluşturulduktan hemen sonra subkonjonktival gruplara 0,05 ml (1,25 mg) bevasizumab ya da sesamol enjeksiyonu yapıldı. Topikal gruplara 10 mg/ml dozunda hazırlanan bevasizumab ya da sesamol damla günde iki kez damlatıldı. Topikal tween 80 grubuna %0,8 konsantrasyonda tween 80 günde iki kez damlatıldı. Kontrol grubu tedavisiz bırakıldı. Deneyin 8. gününde gözler enükle edilmeden önce dijital fotoğraflar çekildi. Histopatolojik örnekler alındı.

Çalışmamızda kornealarda oluşan yanık alanları açısından grupların elde ettiği dereceler benzer bulundu. Fotoğraflar üzerinde neovaskülarizasyon alanları incelenip tüm gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p<0,001$). Subkonjonktival uygulama ile topikal uygulama karşılaştırıldığında, subkonjonktival bevasizumab tedavisinin topikal bevasizumab tedavisinden farklı olmadığı bulundu ($p=0,109$). Topikal sesamol grubunun topikal bevasizumab grubundan daha üstün olduğu görüldü ($p=0,040$). Topikal sesamol grubunun subkonjonktival sesamol grubundan üstün olduğu görüldü ($p=0,003$). Subkonjonktival additif tedavi ile topikal additif tedavi arasında fark olmadığı görüldü ($p=0,110$). Topikal additif tedavinin topikal bevasizumab tedavisinden üstün olduğu görüldü ($p=0,018$). Korneal neovaskülarizasyon dereceleri kontrol grubunun

dereceleri ile karşılaştırıldığında topikal sesamol, subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab+sesamol ile topikal bevasizumab+sesamol gruplarında fark istatistiksel açıdan anlamlı düzeye ulaşıyordu ($p<0.05$).

Çalışmadan elde ettiğimiz veriler korneal neovaskularizasyon tedavisinde bevasizumabın yanısıra sesamol ya da sesamol ile bevasizumab kombinasyonun kullanılmasının yeni bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: korneal neovaskularizasyon, VEGF, sesamol, bevasizumab

ABSTRACT

The effects of topical and subconjunctivally injected bevacizumab and sesamol in experimental rat model

Dr.Hüseyin KAYA

Neovascularization in the transparent cornea is a sight-threatening and important health problem. In this study our aim was to compare the effect of subconjunctivally and topically administered bevacizumab and sesamol on experimental induced corneal neovascularization in rats.

In this study 56 right eyes of 56 Wistar-Albino rats were chemically cauterized. Results were obtained with 55 rats which had completed the study. The subjects were divided into 8 groups: control, subconjunctival bevasizumab, subconjunctival sesamol, subconjunctival bevasizumab+sesamol, topical bevasizumab, topical sesamol, topical bevasizumab+sesamol, topical tween 80. 0,05 ml (1,25 mg) bevacizumab or sesamol was injected in subconjunctival groups. Topical groups were instilled with 10 mg/ml drops twice daily. Control group was left untreated. Digital photographs were obtained before the eyes enucleated. Corneal sections were analyzed histopathologically.

In this study all groups were similar in terms of burned areas on the conea. When photos of neovascularization areas examined, all treatment groups had statistically significant difference compared with the control group ($p < 0,001$). There was no significant difference between subconjunctival bevacizumab and topical bevasizumab groups ($p = 0,109$). Topical sesamol group was found to be more effective when compared with the topical bevasizumab group ($p = 0,040$). Topical sesamol was found to be more effective when compared with the subconjunctival sesamol ($p = 0,003$). There was no statistically significant difference between subconjunctival additive and topical additive treatment ($p = 0,110$). Topical sesamol+bevacizumab was found to be more effective when compared with topical bevacizumab ($p = 0,018$). When the corneal neovascularization scores of groups were

compared with the control group; the scores of topical sesamol, subconjunctival bevacizumab, subconjunctival bevacizumab+sesamol, topical bevacizumab+sesamol groups were statistically significant ($p<0.05$).

The data we obtained from this study indicate that the use of sesamol monotherapy or combined with bevacizumab may be a novel therapeutic method for corneal neovascularization.

Key Words: corneal neovascularization, VEGF, sesamol, bevacizumab

1.GİRİŞ:

Kornea, göz küresinin ön kısmında yer alan şeffaf, avasküler, kubbe şeklinde bir dokudur. Kornea gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur ve göz içi yapıları dış etkilere karşı koruyan elastik yapıda bir bariyer görevi görür. Korneanın saydamlığı kırıcılık için çok önemlidir. Saydamlık stromadaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine, korneanın damarsız yapısına ve kısmi dehidratasyona bağlıdır(1). Kornea neovaskularizasyonu görme kaybına neden olan yeni damarların oluşumudur. Görme kaybı sızıntı, enflamasyon ve skarlaşmaya yol açarak korneanın şeffaflığının azalmasına bağlıdır.

Gözün kimyasal yaralanmaları epitel yüzeyinde, korneada ve ön segmentte ciddi hasar oluşturabilmektedir (2). Kimyasal yanıklar kornea stromasının ciddi yaralanma sebeplerinden birisidir. Kimyasal yanıklar persistan ülserasyona, opasifikasyona, skar oluşumuna ve neovaskularizasyona neden olarak kalıcı görme kaybıyla sonuçlanabilir. Korneada alkali yanıklara bağlı komplikasyonların patogenezinde rol oynayan durumlar, artan hücre popülasyonunun ana bileşenleri mezenkimal hücreler (aktive keratositler ya da myofibroblastlar), makrofajlar ve neovaskularizasyon gibi faktörlerdir (3-4).

Anjiyogenezis varolan damarlardan yeni damarsal yapıların gelişmesi olarak tanımlanmıştır. Normalde korneada fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi anjiyogenik faktörler ile anjiostatin, endostatin, veya pigment epitelyum derive faktör gibi anti-anjiyogenik moleküller arasında bir denge vardır. Korneal neovaskularizasyon, anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki bu hassas dengenin bozularak anjiyogenik tarafa kaymasıyla ortaya çıkar (5). Enfeksiyöz, inflamatuvar, dejeneratif ya da travmatik hastalıklar korneal neovaskularizasyon oluşturabilir (6). Korneal neovaskularizasyon skar oluşumu, lipid depolanması, korneal graft reddi gibi durumlara neden olabilmektedir. Bu durumlar ciddi görme kaybına neden olabilmektedir (7). Vasküler büyüme genelde inflamatuvar hücreler, miyofibroblastlar ve arka segmentte glial ya da aktif pigment epitel hücrelerini de içeren yara iyileşmesi cevabının bir parçasıdır. Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) proteolitik aktivite, endotel hücre çoğalması

ve kapiller t p oluŐunu gibi anjiogenezin birçok basamağında görev alır (2,8,9).

Kornea neovaskülarizasyonunun engellenebilmesi için Argon ve Neodymium: Nd:(YAG) lazer fotokoagülasyonu(10,11), fotodinamik tedavi (12), kortikosteroidler, siklosporin-A, somatostatin, somatostatin analogu oktreotid, anti-tümör nekrosis factor- , anti-intersellular adezyon molekülü, heparan sulfat, rapamisin, anjiostatin, talidomid, suramin, genistein, metotreksat(13-14) gibi doğal ve sentetik birçok madde denenmiŐtir. Ancak bütün bu çalışmalara ve kullanılan ajanlara rağmen kornea neovaskülarizasyonunun önlenmesi halen önemli ve aŐılması güç bir sorun olarak karŐımızda durmaktadır.

Güncel çalışmalarda korneal neovaskülarizasyonun tedavisi için yeni ajanlar, farklı kullanım yolları, etkin doz ve doz aralıkları araŐtırılmaktadır. Son yıllarda yapılan çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar bevasizumabın topikal ve subkonjonktival kullanımının korneal neovaskülarizasyon gelişimini engellediği, diğer anti-VEGF ajanlarla karşılaştırıldığında bevasizumabın korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda daha etkili olduğu gösterilmiştir (15-16).

Sesamol, susam yağından üretilen organik bir bileşiktir. Sesamol suda eser miktarda  z n r ve birçok yağ ile  z nebilir. Sesamol yağların bozunmasını engellediği gösterilmiş kuvvetli bir antioksidandır ve bu nedenle vücudu serbest radikallerden koruyabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (17). Ayrıca sesamol oksidatif stres, inflamatuvar sitokin salınımı ve kaspaz-3 düzeyleri gibi mediatörleri de düzenleyebilen kuvvetli bir antiinflamatuardır (18).

Bu çalışmada, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda bevasizumab, sesamol ve her ikisinin additif kullanılmasının etkinliğini araŐtırmayı ve bu maddelerin subkonjonktival veya topikal yolla uygulanmasının etkinliğini karŐılaŐtırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİ

2.1.Kornea Anatomisi

Kornea göz küresinin ön tarafında, limbusta opak sklera ve yarı saydam konjonktiva ile bütünleşen ortalama dikey çapı 10,5 mm, yatay çapı 11.5 mm olan avasküler ve saydam bölümdür. Kornea ön yüzeyinin ortalama eğrilik yarıçapı 7,8 mm, arka eğrilik yarıçapı 6,8 mm kadardır. Kornea ön yüzeyi konveks ve asferik yapıdadır. Kendine özgü saat camı benzeri eğimi, +43 diyoptri kırma gücü ile ışığın kırılmasını sağlayan ana dokudur (19,20). Kornea ciltten 300-400 kat daha yoğun olan sinir ağıyla vücudun duyuşal innervasyonu en yoğun olan dokularından biridir. Kornea duyuşal innervasyonunu trigeminal sinirin oftalmik dalından kaynaklanan silyer sinirden alır. Limbus çevresinde sinir halkası oluşturan uzun silyer sinir periferik stromaya derinden ve radyal olarak girerek, bowman tabakasını deldikten sonra pleksus oluşturur ve kornea epitelinin kanat hücreleri seviyesinde sonlanır. Yüzeyel ektodermden köken alan kornea santralde ortalama 500 µm kalınlığa sahiptir. Kornea ön yüzü gözyaşı filmiyle arka yüzü humor aköz ile ıslanmaktadır. Korneanın beslenmesinde glukozun kaynağı aköz humor, oksijenin kaynağı ağırlıklı olarak gözyaşı film tabakasıdır (21).

Kornea anatomik olarak 5 ayrı tabakadan oluşmaktadır:

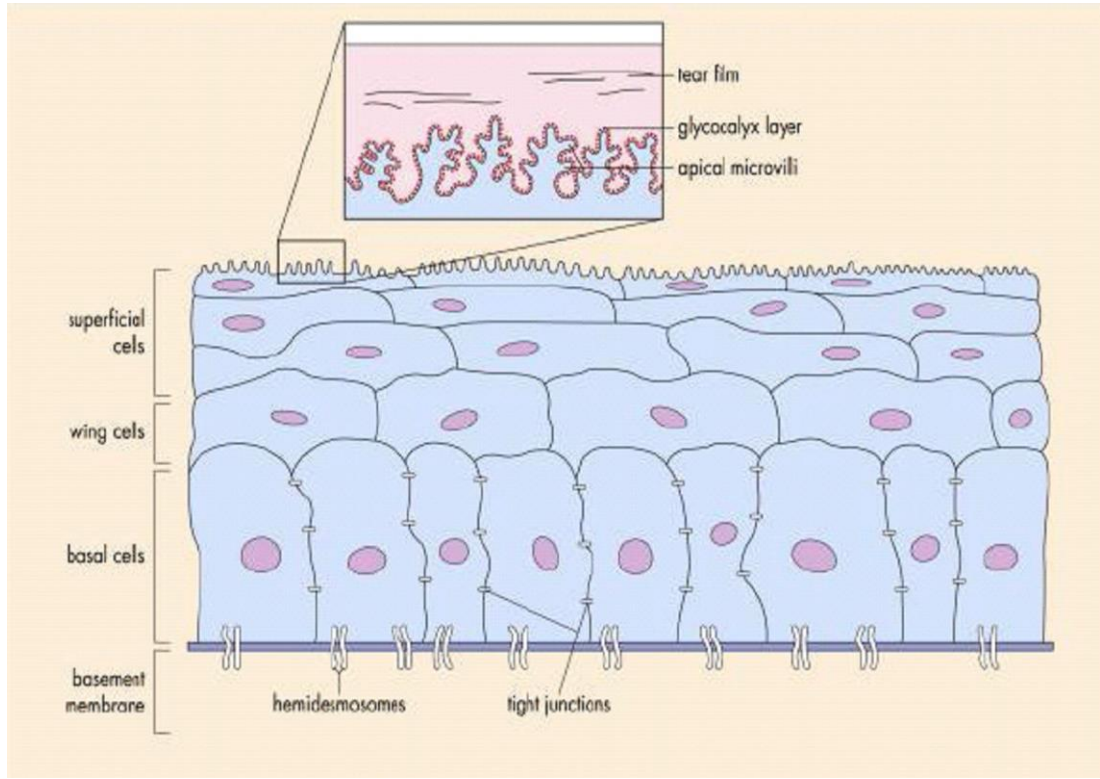
- 1.Epitel ve bazal membran,
- 2.Bowman zarı,
- 3.Stroma,
- 4.Descemet membranı,
- 5.Endotel

2.1.1.Epitel ve Bazal membran

Kornea epiteli bazal hücre tabakası, kanatsız hücreler, yüzeyel hücreler olmak üzere üç tabakaya ayrılır. Santralde 5-6 kat, periferde 8-10 kat hücre vardır. Bazalde bulunan tek katlı silindirik hücre tabakası altındaki bazal membrana hemidesmozomlarla sıkı bir şekilde tutunmuştur. Gerçek bir membran yapısında olan bazal membran tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve fibrin içerir. Lamina lucida denen gevşek ön ve Lamina densa olarak adlandırılan daha sıkı arka iki kısımdan oluşmuştur. Bazal membranın rejenerasyon yeteneğı yoktur. Bazal

membran epitel için yapısal destek görevi görür ve epitel hücrelerini stromadan ayırır. Yokluğunda epitel hücreleri stromaya invaze olur (22).

Normalde korneanın yüzeyel epitel hücreleri devamlı dökülmekte ve dökülen bu hücrelerin yerine bazal epitel hücrelerinden mitozisle çoğalan hücreler gelmektedir. Göç aynı zamanda periferden kornea merkezine doğru olmaktadır. Mitoz gösteren bazal hücreler yüzeye doğru ilerlerken yavaş yavaş farklılaşır, çekirdekleri küçülür, organellerini yitirir ve nihayet dejenere olup kornea yüzeyinden dökülürler. Bu süreç her 7 günde tüm epitelin yenilenmesiyle sonuçlanır (22).



Şekil 2. 1. Kornea epiteli kesiti
(Yanoff & Duker. Ophthalmology. 3. baskı, Elsevier, 2008.)

Bazal hücreler epitel bazal membranına hemidesmozomlarla bağlanmış, tek katlı küboidal hücrelerdir. Bu hücreler çoğalarak öne doğru ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar. Kanat hücreleri ince kanatsız uzantılara sahiptir ve iki-üç kat halinde uzanırlar. Yüzey hücreleri iki tabaka halinde dizilmiş durumda uzun ve ince bir yapı gösterirler. Gözyaşıyla temas halinde olan yüzey hücreleri mikrovilluslar ve

mikroplıklar ile genişlemiş durumdadırlar. Yüzeyel hücreler olağanüstü rejenerasyon kabiliyetine sahip bulunduğundan epitelde nedbeleşme oluşmaz (23).

2.1.2.Bowman Zarı

Bowman zarı hücre içermeyen bir tabakadır ve hasar gördüğünde rejenerasyon olmaz. Bowman zarı Tip I ve V kollajen ve bunların arasını dolduran TipVI kollajen filamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Bowman tabakasının kalınlığı yaşam boyu sabit kalır (22,23).

2.1.3.Stroma Tabakası

Kornea kalınlığının yaklaşık % 90'ını stroma tabakası oluşturur. Korneanın fiziksel gücü, şeklinin stabilitesi, saydamlığı ve birçok anatomik ve biyokimyasal özelliği stromanın özelliklerine bağlıdır (24). Korneanın optik ve mekanik özellikleri doğrudan stromal makromoleküler içerik ve bunların dokuda düzenlenmesinin sonuçlarıdır. Stroma yaklaşık %76 oranında su içermektedir. Kuru ağırlığının %80'i kollajen fibrillerden, %15'i matriksten, %5'i hücresel elementlerden oluşmaktadır (25).

Kollajen lifler büyük oranda Tip I ve az miktarda Tip III, IV, V kollajenden oluşur. Kollajen lifler stromanın ön 1/3 lük kısmında oblik ,arka 2/3 lük kısmında ise lameller şekilde dizilim gösterirler. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde %60 oranda keratan-sülfat ve %40 oranda kondroitin-sülfattan oluşmuştur. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını sağlar. Korneanın fonksiyonel bütünlüğü, kalınlığı, şeffaflığı stromal elemanların yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasına bağlıdır (25). Ekstrasellüler matriks (ECM) yıkımı temel olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) ile olur. Endotelin disfonksiyonu nedeniyle stromaya su geçmesi durumunda glikozaminoglikanların su çekip şişmesi ile kornea kalınlığı artar ve kollajen fibrillerinin dizilimi düzensiz hal alarak stromal opaklaşma ortaya çıkar. (25). Embriyonik olarak nöral krestten köken alan stroma hücreleri keratositlerdir. Keratositler kollajen lameller arasında yerleşmişlerdir. Normal koşullarda yavaş ama sürekli bir sentetik aktivite ile ECM'nin idamesini

sağlayan bu hücreler, akut ödem veya yaralanma sonrasında fibroblast haline gelebilirler. Stromada ayrıca az sayıda polimorfonükleer lökositler (PMNL), plazma hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır.(26,27,28)

2.1.4.Descemet membranı

Descemet membranı kornea endotelinin bazal membranıdır ve gerçek membran yapısındadır. Proteolitik enzimlere karşı direnci oldukça yüksek bir yapıdır. Ağır keratitlerde bile sağlam kalabilir (27). İntrauterin gelişen anterior çizgili zon ve yaşam boyu endotel tarafından desteklenen posterior çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Çizgisiz zon başlıca bazal membran bileşenleri olan tip IV kollajen, laminin, fibronektinden oluşmuştur ve periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Descemet membranı stromaya gevşek olarak tutunur ve göz içi basıncının yardımıyla stromaya yapışık kalmaktadır. Travma nedeniyle bu membran stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve zedelenme durumunda endotel tarafından salgılanarak onarılmaktadır (25).

2.1.5.Endotel tabakası

Endotel tabakası tek sıra hegzagonal hücrelerden oluşmaktadır. Korneanın herhangi bir şişmeye maruz kalmaksızın mevcut yapısını sürdürebilmesinde ve dolayısıyla korneal şeffaflığın korunmasında önemli bir rol oynarlar. Endotel hücrelerinin mitotik aktiviteleri doğum sonrasında durur. Bu aşamadan sonra ölen endotel hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur. Fonksiyonlarını yitirmeleri durumunda, stromal hidrasyon artarak, ödem, kalınlık artışı ve opasifikasyon gelişmektedir (26). Endotel hücre sayısı yaşla birlikte azalır. Doğumda 5000 hücre/mm² iken erişkinde bu sayı 2500-3500 hücre/mm² civarında olup, 800 hücre/mm² altına indiğinde korneal fonksiyonlar bozulmaya başlar (27,28).

2.2.Kornea Yara İyileşmesi

2.2.1.Epitel Yara İyileşmesi

Kornea epitelini düzeyindeki yaralanmalar, kornea epitelinde genellikle tam kat defekt yaratırlar. Epitel yara iyileşmesinde birçok hücreyel yapının ve sinyel molekülünün karşılıklı etkileşimi söz konusudur. Epitel hücreleri IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , interferon- γ , transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), kompleman 5-a , lökotrien B4 gibi birçok eriyebilen sitokin veya prostaglandin sentezleyip salgılayabilirler (29). Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi kornea epitel yapısının devamında önemli rol oynar. Hasarlanan epitel hücreleri veya üzeri açılan bazal membrandan, komşu sağlıklı hücrelere dolaşım yoluyla veya gözyaşı filmi aracılığıyla sinyaller yayılır. Daha sonra komşu hücrelerin yapısında ve hücreler arası bileşelerde değişimin başladığı bir latent dönem yaşanır. Yaralanmanın ardından hücre göçünün başlamasına kadar geçen süre lag fazı olarak adlandırılır (30). Lag fazı tamamlandığında, oküler yüzey epitelini yeniden meydana getirmek için yaraya komşu hücreler göçe başlar. Hücrelerin göçü intrastoplazmik aktin-miyozin kontraksiyonu ile oluşan ameboid hareketlerle gerçekleşir. Hücreler bir başka hücre ile temas edene kadar göçlerine devam eder. Defekt tek hücre katıyla örtüldükten sonra mitozla normal epitel kalınlığı sağlanır. Epitel iyileşmesi sırasında bazal hücrelerle limbal kök hücreler arasında bir denge bulunmaktadır.

Bu görüş Thoft'un "X,Y,Z" hipotezi ile ortaya konmuştur.

X; bazal epitel hücre çoğalmasını,

Y; limbal hücre çoğalmasını ve santrale göçünü,

Z; yüzeyden epitel hücre kaybını yansıtmak üzere denge konumunda $X+Y=Z$ olmalıdır (31).

Epitel tabakası normal kalınlığına ulaştıktan sonra farklılaşmanın gelişmiş safhaları, mikrovillusların, mikropalikaların, glikokalikslerin gelişimi başlar. Bu sırada hücreler arası ve hücreler ile bazal membran arası bağlantı kompleksleri oluşturulur.

2.2.2.Bazal Membran Yara İyileşmesi

Korneada bazal membran, bazal epitel hücreleri tarafından salgılanır. Kornea epitel hücreleri tarafından salınan tip IV kollajen ve laminin temel içeriğidir. Bazal membran epitel morfolojisi, farklılaşması ve devamında çok dinamik bir role sahip olduğundan kornea epitelinin iyileşmesinde önemli yer tutar. Epitelyal hücre göçü zemin olarak bazal membranı kullanır. Ancak epitel debridmanı sonrası yeni bazal membran gelişimi bir haftadan uzun zaman aldığından geçici matriks olarak fibronektin hücre göçüne zemin oluşturur. Yani normal durumda mutlak gerekliliği olan tip IV kollajen bu nedenle akut yaralanma durumlarında yerini fibronektine bırakır (32). Keratektomi sonrası fibronektin ile geçici matriks oluşurken lezyona komşu alanda göçe hazırlanan epitel hücrelerin hemidesmozom ve bağlayıcı fibrilleri çözülür. Bazal membranın gelişimini ve epitelizasyonun tamamlanmasını takiben hemidesmozom ve bağlayıcı fibriller görülmeye başlar (1,32,33). Yeni hemidesmozomlar bazal membranda daha önce var olan çapa fibrillerinin karşısına gelecek şekilde sentezlenir ve adezyon kompleksleri kısa sürede bütünlüklerine kavuşur. Eğer yaralanma bazal membranı da içeriyorsa, epitelin önce bazal membran sentezlemesi gerekir ki bu durumda adezyon komplekslerinin sentezinin tamamlanması yaklaşık bir yıl sürer (27).

2.2.3. Stromal yara iyileşmesi

Stromal iyileşme yeni kollajen sentezi, bunların birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından oluşur. Zedelenmeden 1.5 saat sonra stromal yarada PMNL'ler görülür. Polimorfonükleer lökositler 12 saatte pik yapar, 72 saat sonra giderek azalır. Hasar gören epitel tabakasının altındaki keratositlerde apoptozis gözlenir(27). Hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla iyileşme kaskadı başlamaktadır. Keratositlerde kollajen sentezi zedelenmeden 1.5 saat sonra başlar ve 8. günde sonlanır. Yara direnci stroma iyileşmesi ile yakından ilişkilidir. Ancak insanlarda 2-3 yılda bile % 50 direnç düzeyine erişilememektedir (27). Epitel yaralanmalarında, yaralanmanın altındaki keratositler dejenere olur ve hücresiz kalan stromaya bir süre sonra çevreden gelen yeni keratositler yerleşir. Stromal yaralanmalarda keratositler bağlantılarını kaybeder, büyür ve çoğalır. Ortaya çıkan bu hücreler fibroblastların yapısal ve

fonksiyonel özelliklerini taşır. Stromal iyileşme sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedir (27). Kontraktıl özellikte olan bu hücreler kollajenleri, glikozaminoglikanları ve diğer matriks proteinlerini üretmektedir. Normal stroma tip I kollajenden oluşurken korneal skar dokusu ise büyük oranda tip III kollajenden oluşur. Skar dokusunun yeniden düzenlenmesi sonrasında tip III kollajen, stromanın normal yapısında olan tip I kollajen ile yer değiştirir. İlk hafta içerisinde stromada hiyaluronik asit üretimi görülür ve zamanla yerini kondrotin sülfat ve keratan sülfata bırakır. Ayrıca keratositlerden keratinosit growth faktör (KGF), hepatosit growth faktör (HGF) gibi büyüme faktörleri de salgılanmaktadır (34). Hasar sonrası ikinci haftada kontraktıl faz başlamaktadır. Miyofibroblastlarda kas hücrelerindeki benzer şekilde aktin ve miyozin kontraktıl ünitleri oluşur. Yara iyileşmesi ve korneanın gerilme gücünün yeniden oluşması erken dönemlerde duraklayabileceği gibi yıllar sonra bile devam edebildiği çalışmalarda gösterilmiştir (35).

2.2.4.Endotel yara iyileşmesi

İnsan endotel hücrelerinde doğumdan sonra neredeyse hiç mitoz görülmediği için endotel hücreleri yavaşça kaybolursa, komşu hücrelerin genişlemesiyle boşluklar kapanır (27). Endotelin santralinde oluşan bir hasar sonrası periferik ve santral hücre yoğunluğu ile hegzagonal hücre yüzdesi düşer, buna karşın hücre boyutlarındaki çeşitlilik yani polimegatizm artar (36,37). Defekt bir kez kapatıldıktan sonra, normal hegzagonal yapının oluşturulması için hücreler yeniden düzenlenir. Bu düzenlenme sırasında hücreler birbirinden kopmaz. Birkaç hafta sonra zedelenme alanını kaplayan endotel yeni desmet membranını salgılayarak ortalama iki-üç ay içinde homojen, hegzagonal bir yapı oluşturur. Kronik inflamasyon veya fiziksel travma durumunda yeniden düzenlenme gecikir ve hücre kaybı devam eder (27).

2.3.Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

2.3.1.Beslenme ve Yaş

Protein, vitamin A ve vitamin C gibi yara iyileşmesi için önemli faktörlerin alımı yara iyileşmesi için önemlidir. Şiddetli vitamin A eksikliğinde korneal

ülserasyon siktir (38). Yaşlılarda yara iyileşmesi aylar alabilmekteyken genç popülasyonda iyileşme daha hızlıdır (38).

2.3.2.Gözyaşı tabakası

Gözyaşının nicel özellikleri epitelin sağlıklı olması ve bütünlüğü için çok önemli bir faktördür. Göz açıkta kaldığında orta aköz tabaka buharlaşma ve nazolakrimal drenaj sebebiyle incelir ve yüzeyel lipid tabaka müsün tabakaya ulaşır. Gözkapağı hareketiyle aköz komponent yenilenmezse müsün tabakanın lipidle kontaminasyonu lokalize hidrofobik epitelyal alanlar yaratır (39). Aköz tabaka yetersizliği durumunda yüzeyel kuruluk, punktat epitelyal boyanma, mukus plak, iyileşmeyen epitel defektleri gözlenir. Lipid tabaka eksikliğinde oküler yüzey keratinizasyonu, yüzey mikroplika kaybı, epitel defekti, korneal ülserasyon, keratomalazi gibi durumlar gözlenir. Gözkapakları gözyaşının devamlı ve yeterli miktarda dağılımını sağladığı için nörojenik fonksiyon bozukluğu, kapak skatrizasyonu veya malpozisyonu gibi durumlar sonucunda hidrofobik epitelyal yüzeyler oluşur (39).

2.3.3.Enfeksiyon

Mikroorganizmalar inflamatuvar yanıtı artırarak aşırı kollajen yıkımı ve hücre ölümüyle veya salgıladıkları enzimlerle glikozaminoglikan ve/veya kollajen yıkımını artırarak yara iyileşmesini geciktirir veya engellerler (38).

2.3.4.Yara Apozisyonu

Kötü apozisyon yara iyileşmesini geciktirerek ön veya arka yara dudağında basamaklanmaya yol açabilir. Bu durum enfeksiyon, inkarserasyon veya yabancı doku adezyonu olasılığını artırır, retrokorneal membran ile sonuçlanabilen epitelyal ve stromal gelişim bozukluklarına yol açabilir (38).

2.3.5.Enflamasyon

Farklı travma tipleri farklı inflamatuvar yanıtlar oluşturur. Örneğin, yabancı cismin yerinde kaldığı laserasyonlar dev hücre reaksiyonu ve aşırı skar dokusu ile sonuçlanır. Topikal steroidle baskılanan erken inflamatuvar yanıt, belirgin bir şekilde iyileşmeyi geriletir. Yaralanma sonrası korneaya inflamatuvar hücre akımı dokuyu onarıma hazırlamakla birlikte iyileşmeyi bozabilecek etkiye de sahiptir. Dokudan serbestleşen lökotrienler, C5a, C3a gibi lokal faktörler PMNL aktivitesini artırır. Fazla sayıda PMNL birikimi epitel migrasyonunu inhibe ederek persistan epitel defektine ya da daha da ilerleyerek ülser oluşumuna yol açabilir(40).

2.3.6.Duyusal İnervasyon ve intraoküler basınç

Normal epitel iyileşmesinde sinirsel uyarımın da önemli bir faktör olduğu ve duyuşal innervasyon yokluğunda hücre göçü ve adhezyonu büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (41). Aynı çalışmada intraoküler basıncın yüksekliği stromal yara iyileşmesinde skar dokusunun kontraksiyonunu önlediği gösterilmiştir.

2.3.7.Vaskülarizasyon

Korneal vaskülarizasyon gelişiminde çok sayıda faktör rol oynamaktadır. Akut enflamasyonu ve vaskülarizasyonu deneysel olarak oluşturabilme yeteneğinde olan prostaglandin E1, limbusa yakın travmalar, korneal nekroz, zayıf yara apozisyonu, yaraya iris adezyonu gibi faktörler vaskülarizasyon gelişiminde önemli rol oynamaktadır (42).

2.3.8.İlaçlar

Korneal vaskülarizasyona bazı ilaçların etki ettiği bilinmektedir. Steroidler korneanın epitel, stroma ve endotel tabakalarındaki yara iyileşmesi sürecini inhibe ederler. Deneysel olarak oluşturulan lineer perforan insizyonda gerginliğe karşı yara direncinin medroksiprogesteron ile % 20, prednizolon ile % 11 oranında azaldığı gösterilmiştir (43). Artmış doza bağımlı olarak kloramfenikol, basitrasin (10.000 u/ml), genta-sulfat (10 mg /ml) ve neomisin (8 mg/ml) gibi antibiyotiklerin

epitelizasyonu belirgin biçimde inhibe ettiği gösterilmiştir (44). Benzalkonyum Cl (% 0.01) koruyucular içerisinde en toksik olanıdır. Koruyucu olarak bu kimyasal maddeyi içeren topikal ilaçların kullanımında rejenere epitel üzerinde adheransta zayıflama ve oluşan epitel tabakanın yerinden ayrılması gibi etkiler gözlenmiştir (45).

2.3.9.Fibronektin (Fn)

Fibronektin (Fn) multifonksiyonel bir ekstraselüler matriks proteindir. Fibronektinin hücre adhezyonu ve migrasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Fn yaralanmadan 8-36 saat sonra yüzeysel epitel defektlerinde gözyaşından veya limbal vasküler yapılardan köken almaktadır. Stromal yaralarda ise Fn, keratositlerce üretilir (46). Korneal fibronektin iyileşen epitel yara yüzeyinde gözlenir ve epitelizasyon tamamlanınca ortadan kaybolur (47). Organ kültüründe tavşan korneası üzerinde epitel migrasyonunun araştırıldığı Nishida ve ark.nın bir çalışmasında epitel hücrelerinin gösterdiği migrasyon aktivitesinin ortama eklenen Fn ile belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (48).

2.4.Korneal Yara İyileşmesinde Enflamatuvar Sitokinlerin Rolü

Sitokinlerin kornea yara iyileşmesinde önemli etkileri vardır. Kornea epiteline olan travma sonrasında epiteldeki çeşitli sitokinlerin seviyesi artar. Bunların en önemlileri İL-1, İL-6 ve TNF- α 'dır (49). İnterlökin-6 integrinleri düzenleyerek kornea epitelinde göçü uyarır (50). İnterlökin-1, EGF ile sinerjik biçimde in vitro epitel yara kapanmasını artırır (51). İnterlökin-1 ve TNF- α kollajenin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar. Bunlar kornea fibroblastlarında İL-8, monosit kemotaktik protein gibi bir takım kemokinlerin üretimini artırır ve sadece epitel yaralanmasında üretilir (52). Ancak bu sitokinlerin etkileri her zaman yararlı değildir. İL-1, İL-6 ve İL-8 kornea stromasında erimeyi uyarabilir (53).

2.5.Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Büyüme Faktörleri

Göz, Epidermal growth faktör (EGF), Platelet-derived growth faktör (PDGF), İnsulin-like growth faktör (IGF), Transforming growth faktör (TGF) - α ve - β , Fibroblast growth faktör (FGF) gibi birçok büyüme faktörü için hedef doku konumundadır (54). Bu faktörler hücre çoğalmasını, göçünü ve hayatının devamını uyaran, bazı durumlarda ise bunları engelleyen peptid yapısında moleküllerdir. Bu faktörler en sık parakrin mekanizmalarla hareketlerini gerçekleştirerek karşılıklarına gelen hücre yüzey reseptörlerine(tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir) bağlanarak deoksi ribonükleik asit (DNA) sentezinin sentez fazını uyarır ve hücre çoğalması gerçekleşir (55).

Transforming growth faktör- α , gözyaşında bulunur ve en olası kaynağı lakrimal bezlerdir. Endotel hasarında aköz hümörde TGF- α konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir (54). TGF- β dimerik, inaktif biçimde salgılanır ve ECM'ye bağlanır, ekstraselüler veya membrana bağlı enzimlerle aktif hale getirilir (56). Transforming growth faktör- β 'nın genel olarak epitel, endotel hücreleri, lökositlerin büyümesini engellediği ve fibroblast üretimini uyardığı kabul edilmektedir (57). EGF fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive ederek epitel hücrelerinin çoğalmasını sağlayan bir diğer büyüme faktörüdür (58).

Fibroblast growth faktör(FGF) asidik ve bazik olarak sınıflandırılabilir. Asidik FGF, Bowman zarı ve Descement membranlarında, endotel hücrelerinde, daha az oranda ise epitelde tespit edilmiştir. Asidik ve bazik FGF epitel, endotel ve stroma hücrelerinde mitojeniktir (56). Hepatosit growth faktör hücre göçünü uyarır, stroma fibroblastlarına etkisi minimaldir (59). Hepatosit growth faktörün kornea epitel katının bütünlüğünün sürdürülmesinde ve endotel hücrelerinin bütünlüklerinin devamında rol oynadığı düşünülmektedir. (60). Keratinosit growth faktör, FGF ailesinden, keratinositler ve epitel hücreleri için mitojenik etkiye sahip tek zincirli bir polipeptiddir.(61). KGF'nin stromada üretilip, epitel hücrelerinde parakrin bir mekanizma ile etkili olduğu düşünülmektedir (62).

2.6.Korneanın Alkali Yanıkları

Alkali yaralanmalar ph değişimi, ülser oluşumu, proteoliz, kollojen sentezinde defekt oluşumu gibi durumlara sebep olarak korneaya ciddi şekilde zarar vermektedir. Korneanın alkali yanıkları genellikle yüzeyde kabarıklık oluşturan, tekrarlayıcı epitel hasarı yaratan, stromal hücre ölümüyle, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve endotel hasarıyla sonuçlanan dirençli keratitle sonuçlanır. Korneal ve konjonktiva epiteli kimyasal yanık sonrası öylesine zarar görebilir ki limbal kök hücre kaybı meydana gelebilir. Bu durum korneada neovaskülarizasyon ve opasifikasyon oluşumuna neden olabilir. Bu olaylar sonucunda göz içi basıncında akut bir yükselme olabilir. Goblet hücre kaybı ve konjonktival inflamasyon oküler yüzey kuruluğuna sebep olabilmektedir. Ayrıca semblefaron oluşumuyla skatrizan entropiyon ya da ektropiyon oluşumu olabilmektedir (63).

Alkali yaralanmalar asit maddelere göre daha çok hasar vericidir. Bu durum fosfolipidlerden meydana gelen hücre membranlarının alkali ph da çözünmelerinden kaynaklanır. Alkali maddeler temas ettiği tüm hücre membranlarını eritirler. Yüzeydeki hücreler hasar gördükten sonra alkali madde daha derinlerdeki dokulara geçer (64). Alkali maddelerin göze difüzyonu ilerleyicidir ve korneadan başka trabeküler aę, iris, siliyer cisim, lens, retina ve optik diske zarar verebilirler(65).

Kimyasal yaralanmaların gecikmiş epitelizasyon, yüzeyel ve derin neovaskülarizasyonla birlikteliği iyi bilinmektedir (66). Alkali hasardan sonra keratositlerin anormal kollajenolitik aktiviteleri ve nötrofiller kornea dokusunu yıkmakta, geniş korneal ülserasyonlara neden olmaktadır. Ülserasyonlar ancak korneanın yeniden epitelizasyonu ya da yoğun neovaskülarizasyonla sonlanmaktadır (67). Alkali yanıklarda inflamasyona konjonktivalizasyon ve yeni damar yapıları eşlik etmektedir. Yüzeyel korneanın neovaskülarizasyonunda VEGF'nin rol oynadığı gösterilmiştir (68).

2.7.Korneanın Avaskular Durumu ve Vaskülarizasyonu

Korneanın besleyici damarları olan siliyer arterler oftalmik arterden köken olarak limbus bölgesinde perikorneal pleksusta sonlanır. Kornea

neovaskularizasyonu perikorneal pleksusta yer alan kapiller ve venüllerden kaynaklanmaktadır (69). Kornea neovaskularizasyonu genel olarak üç çeşit klinik ile gözlenir: genellikle herpetik interstisyel keratitte görülen descemet membranı üzerinde derin stromal neovaskularizasyon, genellikle stromal keratitlerden kaynaklanan stromal neovaskularizasyon ve oküler yüzey hastalıklarından kaynaklanan periferik yüzeysel korneada bağ dokusu proliferasyonu olarak tanımlanan vasküler pannus (6). Yeni damar oluşumunda (neovaskularizasyon) üç mekanizma mevcuttur. Bunlardan ilki vaskülogenezisdir. Yeni damar oluşumu embriyogenez döneminde kemik iliği kaynaklı anjioblastlardan çoğunlukla da embriyogenez aşamasında görülmektedir (70). Bir başka mekanizma progenitor vasküler endotelial hücrelerin toplanması ile yeni damar gelişimidir. Endotelin yenilenmesinde görev yapan progenitor vasküler endotelial hücreler periferik matür endotel hücrelerinin öncülleridirler (71). Anjiogenez ise mevcut damarlardan yeni damar gelişimidir (72,73).

Vaskülogenez gelişimin sonunda durur ve endotel hücre proliferasyonu yetişkinlerde sonlanmış durumdadır (74). Anjiogenez yetişkinlerde yara iyileşmesi, ovulasyon ve plasental maturasyon gibi fizyolojik fonksiyonlardan sorumludur. Normal biyolojik fonksiyonlar dışında inflamasyon, retinopatiler, iskemi, yada tümör gelişimi gibi bazı patolojik durumlarda da anjiogenez görülür (75).

Neovaskularizasyonun oftalmolojide bu kadar önemli olmasının sebebi gözün optik bir organ olması dolayısıyla saydam ortamlara gereksinim göstermesi, ve göz içi dokuların kritik organizasyonundan ileri gelmektedir (76). Kornea neovaskularizasyonu birçok kornea katmanını tutabilirse de yapılan bazı çalışmalarda vaskularizasyonun stromanın ön ve orta üçte birini tuttuğu gösterilmiştir (77).

Korneada anjiogenik faktörler ile antianjiogenik faktörler arasında önemli bir denge bulunmaktadır (78). Bu dengede anjiogenik faktörler ağırlık gösterdiği zaman anjiogenez oluşmaktadır. Bazı çalışmalarda neovaskularizasyon için sadece anjiogenik faktörlerin yükselmesi değil aynı zamanda anti anjiogenik faktörlerin

azalması da gerektiği gösterilmiştir (5). Tablo 2.1.'de anjiogenik faktörler ile antianjiogenik faktörler gösterilmektedir.

Tablo 2.1. **Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler (79).**

Anjiyogenezi önleyen faktörler	Anjiyogenik faktörler
Trombospondin-1 ve 2 İnsan makrofaj metalloelastazı Vazostatin Angiyopoietin-2 Prolaktin derivesi Anjiyostatin İnterferon- α ve β Endostatin VEGF inhibitörü Trombosit faktör-4 fragmanı Platelet faktör-4 fragmanı Antitrombin-3 fragmanı İnterferon ile indüklenebilen protein-10 İnterlökin-12 Restin	VEGF Plasental büyüme faktörü Fibroblast büyüme faktörü Transforming büyüme faktörü - α TGF- β IL-6 ve IL-8 TNF- α Anjiyopoetin-1 Hepatosit büyüme faktörü Epidermal büyüme faktörü Trombosit kaynaklı büyüme faktörü Granülosit koloni uyaran faktör Anjiyogenin Doku faktörü

2.7.1Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyaran Faktörler

2.7.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGF damar yapılarının yoğun olarak görüldüğü tümörlerde tanımlanmış 46 kilodalton (kDa) ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir (80). Bugüne kadar çeşitli VEGF izoformları tanımlanmıştır (VEGF121, VEGF121b, VEGF145, VEGF165, VEGF165b, VEGF189 ve VEGF206). VEGF165 dokuların çoğunda bulunan, en sık rastlanan moleküler türüdür (81,82).

VEGF 165 büyük oranda heparine bağlanarak salınmaktadır ve anjiogenezde ana rol oynayan formdur (83). VEGF anjiyogenezin proliferasyon, migrasyon, proteolitik aktivite ve kapiller tüp oluşumu gibi birçok basamağını ilerleten, hem patolojik hem de normal anjiyogenezde rol alan potent bir anjiyogenik stimülatördür (84,85). VEGF vasküler geçirgenliği histaminden 5000 kat daha fazla artırma etkinliğine sahip olduğu için vasküler permeabilite faktörü olarak da

bilinmektedir (80,84). VEGF üretimi lokal ve sistemik birçok faktör tarafından düzenlenir bunlar; protein kinaz C agonistleri, polipeptit büyüme faktörleri, siklik AMP (cAMP), steroid hormonlar, sitokinler, oksijen, serbest radikaller, glikoz, kobalt ve demirdir (86,87). VEGF üretimini artıran faktörler; FGF, PDGF, tümör nekrosis faktör, TGF, KGF, IL-1 ve IL-6 dır. IL-10 ve IL-13 ise VEGF salınımını inhibe eder(88).

VEGF biyoaktivitesini, esas olarak endotel hücrelerinden eksprese edilen, iki reseptör üzerinden gösterir. Bu reseptörler vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-1 ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2 dir (89,90). VEGF'nin bu reseptörlere bağlanması vasküler geçirgenliği ve endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu sağlayan sinyal transdüksiyon kaskadını başlatır (91). Ekzojen VEGF düşük inflamatuvar cevap ile ya da hiç inflamatuvar cevap olmadan deney hayvanlarında korneadaki anjiyogenezi güçlü bir şekilde uyarmaktadır (92). Kontakt lens kullananlarda, kornea travması ve transplantasyonu sonrası veya inflamatuvar durumlar sonucu oluşan patolojik korneal neovaskülarizasyonda bu faktörün rolü açık değildir. Son yıllarda VEGF'nin tavşan kornealarının saklandığı kültürde üretildiği ve iki haftalık atmosferik hipoksi sonrasında fare korneasında in vivo olarak artmış olduğu gösterilmiştir (93). Normal avasküler korneadan kaynaklanan epitel hücreleri VEGF üretmekte ancak vasküler kornea veya konjonktivadaki epitel hücrelerinin ürettiğinden daha düşük seviyede kalmaktadır.(94).

2.7.1.2. Tümör Nekrosis Faktör- α

TNF- α T hücreleri, aktive Natürel Killer (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri tarafından salgılanır. TNF- α ; IL-1, IL-6, kemokinleri ve TNF'nin kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. TNF- α IL-6 ile sinerjik etki göstermektedir. TNF- α ; adezyon molekülleri ekspresyonunun up-regülasyonu, nötrofil aktivasyonu, kemokin sekresyonunun indüksiyonu ve NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu gibi birçok proinflamatuvar ve immün modulator fonksiyonların önemli bir medyatörüdür (95). TNF- α iyileşmekte olan kornea epiteli

ve inflamatuvar hücrelerde tesbit edilmiştir. TNF- α ayrıca MIF salınımını regüle ederken VEGF, FGF ve TGF üretimini arttırarak neovaskülarizasyonu arttırır (96).

2.7.1.3. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör

MIF oküler inflamasyonun patofizyolojisinde önemli role sahiptir. MIF, neovaskülarize korneadan bol miktarda eksprese edilir. İnflamatuvar korneal neovaskülarizasyonda anjiogenik rolü gösterilmiştir (97). MIF, proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, COX-2, PLA2 ve MMP seviyelerini artırır (98).

2.7.1.4. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda yeni damarların maturasyon derecelerine göre farklı yoğunlukta vasküler bazal membrana bağlanmaktadır (99).

2.7.1.5.IL-8:

IL-8 anjiogenik ve lokosit kemotaksis aktivasyonuna sahip çok fonksiyonlu bir sitokindir. IL-8 kornea inflamasyonu, anjiogenez ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. IL-8 direkt olarak vasküler endotel hücrelerin kemotaksis ve proliferasyonunu gerçekleştirirerek neovaskularizasyonu tetikler (100).

2.7.2.Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler

Kornea neovaskülarizasyonunu engelleyen bir çok faktör vardır. Bunlardan bir kısmına örnek vermek gerekirse, pigment epiteli derived faktörünü (PEDF) bloke eden antikolar kornea stromasına yerleştirildiğinde vaskülarizasyonun uyarıldığı tespit edilmiştir (101). Yine anjiostatin plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olan güçlü bir antianjiogenik faktördür (102). Anjiostatin ve benzeri fragmanların implantasyonu korneada FGF ve anjiogenezin uyardığı

neovaskularizasyonu engellediği gösterilmiştir (103). Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklediği anjiogenezin olduğu gözlenmiştir (104). Ayrıca endostatin, implante edildiği kornealarda bFGF'nin uyardığı neovaskularizasyonu engellemektedir (105).

2.7.3.Kornea Neovaskularizasyon Fazları

Erken prevasküler fazı: Enflamasyon sonucunda oluşan hasar ile birlikte damarlarda dilatasyon, geçirgenlik artışı ve ödem meydana gelir. 2–3 saat sonra PMNL'ler damar dışına çıkarak, kornea stromasına göç ederler. PMNL infiltrasyonu 24–48 saat sonra pik yaparak kemotaksisi başlatıp bazı sitokinlerin salınımına neden olur. Lökositlerden salınan proteolitik enzimler damarların bazal membranını parçalar. Normalde sıkı bir dizilim gösteren kollajen fibriller damar geçirgenliğinde artış ve ödem ile birbirlerinden ayrılırlar. Ödem oluşumu sonucunda ekstravasküler dokuya geçen fibrinojen pıhtılaşarak vaskularizasyonda önemli rol oynar (106,107).

Vasküler Tomurcuklanma Fazı: Bazal membran devamlılığının bozulması sonucunda endotel hücreleri psödopodları ile hasarlı bölgeden göç eder. Bu göçten sonra endotel hücrelerinde yeni damar tomurcuğu oluşumu ve mitoz gözlenir. Çinko bağlayan proteolitik bir enzim grubu olan MMP'lar ECM bileşenlerini bozarak, göç eden endotel hücreleri için gerekli olan yolu açar (108). Endotel hücre göçü vaskularizasyondaki en önemli basamaktır çünkü göç olayı tek başına neovaskularizasyon için yeterli olmaktadır. Hücresel proliferasyon olmasa bile endotel hücrelerinin yayılımı, göçü ve yeniden dağılımı ile yeni damar oluşumu gerçekleşebilmektedir. Bu fazda vasküler lümen oluşmamıştır (109).

Vasküler Matürasyon Fazı: Ortamda yeterli sayıya erişen endotel hücreleri zamanla lümen oluşturacak şekilde yan yana gelir ve primitif damar halini alır. Bu olay esnasında anjiogenik uyarı ile endotel hücrelerinden ECM proteinleri ortaya çıkar ve bu proteinler perivasküler boşluğa ulaşarak, hücre proliferasyonunu gerçekleştirir. Daha sonra yeni oluşan damarların bazal membranları devamlı bir oluşum halini alır ve perisitlerin endotel hücrelerini çevrelemesi ile ana damar

oluşumu gözlenir. Postkapiller venüllerden oluşan primitif damarlar zamanla birbirleriyle etkileşime geçer ve bu etkileşim sonucunda kan akımı başlar (107).

2.7.4.Epidemiyoloji

Kornea ve gözün diğer bölümlerinin neovasküler ve enfeksiyöz hastalıkları toplumda görülen önemli problemlerdendir. Türkiye’de kornea neovaskularizasyonun sıklığı hakkında yapılmış bir çalışma yoktur. Amerika’da bir sene içinde 1,4 milyon hasta kornea neovaskularizasyonu geçirmektedir. Toplumun %4’ünde kornea neovaskularizasyonu bulunmakta ve kornea nakli sırasında elde edilen kornea örneklerinin %20’si histopatolojik olarak vaskularizasyon göstermektedir (106).

2.7.5.Risk Faktörleri

Kornea neovaskularizasyonu yapabilen birçok dejeneratif, travmatik, enflamatuar ve enfeksiyöz durumlar vardır (Tablo-2). Neovaskularizasyon kornea skarı, ödemi, yağ depozitesi ve enflamasyonu gibi major oküler komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu durum sadece görme düzeyini azaltmakla kalmamakta aynı zamanda penetran keratoplastinin sonuçlarını da etkilemektedir. Örneğin kornea nakli sonrasında histopatolojik kesitlerde alıcı kornealarda görülen vaskularizasyonun %30’u greft reddi ile sonuçlanmaktadır (110).

Korneanın ve konjonktivanın immunolojik ve enfeksiyöz hastalıkları nedeniyle kornea neovaskularizasyonuna neden olan anjiogenik moleküller üretilmektedir. Enfeksiyöz hastalıklar arasında özellikle Herpes simpleks ve Herpes zoster keratitleri öne çıkmaktadır. Sadece hastanın reaksiyonuna bağlı olmayıp interstisyel, nekrotizan veya tekrarlayan keratit sonrasında da gelişebilen bir komplikasyondur (111). Atopik keratokonjonktivit gibi enflamatuar hastalıklar nedeniyle uzun süre takip edilen hastaların %60’ında kornea neovaskularizasyonun geliştiği görülmektedir (112). Korneal neovaskularizasyon genellikle enflamatuar hastalıklardan kaynaklansa da, pterjium ve Terrien marjinal dejenerasyonu gibi

dejeneratif hastalıklar ve aniridi gibi konjenital hastalıklar neovaskularizasyon oluşturabilmektedir (113,114). Enflamasyon bu durumlarda kornea neovaskularizasyon patogenezindeki olası sorumludur. Bütün enfeksiyöz keratitler kornea neovaskularizasyonuna neden olabilir ancak acanthamoeba keratiti şiddetli ve uzun süreli formunda bile neovaskularizasyona neden olmamaktadır (115). Bu durum korneadaki anjiogenez ve anti anjiogenez dengesinin ne kadar hassas ve kompleks olduğunu göstermektedir. Normal durumda kornea avaskuleritesinin sağlanması için düşük düzey anjiogenik faktörler ve yüksek düzey anti anjiogenik faktörler gerekmektedir. Kornea neovaskularizasyon patogenezinde bu hassas dengenin bir şekilde bozulması söz konusudur.

Tablo 2.2. **Kornea neovaskularizasyonuna neden olan hastalıklar**

Enflamatuvar hastalıklar (95,106,110,112)	Okular pemfigoid Atopik keratokonjonktivit Stevens-johnson sendromu Graft versus host hastalığı Rozasea Greft rejeksiyonu Lyell's sendromu	
Dejeneratif-konjenital bozukluklar (113,114)	Pterjium Terrien marjinal dejenerasyon Aniridi	
Enfeksiyöz keratitler (73,111,115)	Viral	Herpes simpleks Herpes zoster
	Bakteriyel	Psodomonas Klamidyatrakomatis Sifiliz
	Fungal	Kandida Fusarium Asperjillus
	Parazitik	Onkoserkiazis
Travmatik-iatrojenik bozukluklar ve diğerleri	Kontakt lens Alkali yanığı Ülser İatrojenik Kök hücre yetmezliği	

--	--

2.8.Bevasizumab:

Bevasizumab 214 aminoasitten oluşan ,molekül ağırlığı 149 Kda olan, insan VEGF'sine spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Bevasizumab, hümanize mürin antikorunun komplementer-determinant bölgeleri VEGF'ye bağlanan, insan antikoru temel bölgelerini içermektedir. Bevasizumab, gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Chinese Hamsterinin over memeli hücresi ekspresyon sisteminde rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almış ilk antianjiogenik ilaçtır. Bevasizumab, 5-florourasil/folinik asit veya 5-florourasil/folinik asit/irinotekan ile kombine olarak metastatik kolon ve metastatik rektum kanserinin birinci basamak tedavisinde kullanılır (116,117).

Bevasizumabın henüz oküler hastalıkların tedavisinde kullanım ruhsatı bulunmamaktadır. Fakat VEGF'ün anjiojenezdeki merkezi rolü, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu(YBMD), anjioid streak, yüksek miyopiye sekonder gelişen koroidal neovasküler membran, retinal ven oklüzyonu, diabetik retinopati, korneal neovaskülarizasyon, neovasküler glokom ve prematür retinopati gibi göz hastalıklarında olası bir tedavi seçeneği olarak göz önünde bulundurulmuş bir ajan haline getirmiştir (118).

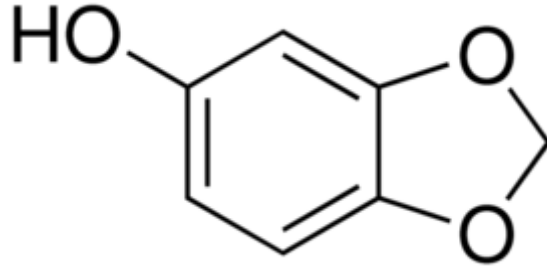
Bevasizumabın neovasküler YBMD hastalarında intravenöz kullanımı 2004 yılında başlatılan SANA (Systemic Avastin for Neovascular AMD) çalışmasıyla gündeme gelmiştir.Bu çalışmanın sonuçlarına göre 24 hafta sonunda bevasizumabın sistemik kullanımı hem görme keskinliği, hem de anjiografi ve OCT bulgularına göre etkili gibi gözükmektedir (119). Çoğunluğu retrospektif olan klinik çalışmalarda intravitreal bevasizumab enjeksiyon tedavisinin hem önceki tedavilere rağmen progresyon gösteren, hem de yeni tanı almış KNV'lerde etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca vitrektomi öncesi intraoküler bevasizumab enjeksiyonun proliferatif diabetik retinopati (PDR) hastalarda fibrovasküler proliferasyonu

azalttığı ve intraoperatif hemoraji riskini azaltarak cerrahiyi kolaylaştırdığı gösterilmiştir (120). Santral retinal ven oklüzyonu veya retinal ven dal oküzyonuna sekonder makuler ödemli hastalarda intravitreal bevasizumab enjeksiyonunun görme keskinliğini iyileştirdiği, makuler ödemi azalttığı ve toksisite işareti görülmediği belirtilmiştir (121). Bevasizumab, premature retinopatisi ve neovaküler glokomda yeni damar oluşumunda VEGF'ye olan etkisi nedeniyle önemli bir tedavi seçeneği haline gelmiştir. Yapılan bir çalışmada premature retinopatisinde intravitreal bevasizumab enjeksiyonunun neovaskularizasyonu geriletmediği saptanmıştır (122). Neovasküler glokom için yapılan çalışmalarda intravitreal bevasizumab enjeksiyonunun göz içi basıncını düşürmede ve neovaskularizasyonu geriletmede etkin olduğu gösterilmiştir (123,124).

Korneal neovaskularizasyonla mücadelede bevasizumab kullanımı ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda subkonjonktival veya topikal bevasizumab uygulamalarının korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (125-131). Göz hastalıklarında kullanım ruhsatı olmamakla birlikte, bevasizumab birçok klinikte korneal neovaskularizasyon tedavisinde ve diğer oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.9.Sesamol (3,4-Methylenedioxyphenol):

Susam yağının sağlığa faydalı etkileri bin yıldır bilinen ve araştırılan bir durumdur. Susam yağı sesamolin, sesamin ve sesamol içermektedir (132). Susam tohumlarının kavrulmasıyla sesamolin miktarı azalırken sesamol miktarı artar (133). Sesamol (3,4-methylenedioxyphenol), susam yağından üretilen organik bir bileşiktir. Sesamol suda eser miktarda çözünür ve birçok yağ ile çözünebilir. Sesamol yağların bozunmasını engellediği gösterilmiş kuvvetli bir fenolik antioksidandır. Sesamolün bu özelliği nedeniyle vücudu serbest radikallerden koruyabileceği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (17).



Şekil 2.2. Sesamolün kimyasal formülü

Güncel çalışmalarda sesamolün metabolik düzenleyici, kemoprotektif, antimutajenik, antihepatotoksik, antiplatelet ve antiaging özellikleri gösterilmiştir (132,134-136). Bir başka çalışmada sesamolün kanserli hücrelerde ve kardiyovasküler hücrelerde büyümenin durmasını ve apoptozu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (137). Sesamol hem plazminojen aktivatörünü etkileyerek vasküler fibrinolitik kapasiteyi hem de endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımını artırmaktadır. (138,139). Ayrıca sesamol oksidatif stres, inflamatuvar sitokin salınımı ve kaspaz-3 düzeyleri gibi mediatörleri de düzenleyebilen kuvvetli bir antiinflamatuvardır (18).

Sesamolün farelerde yapılan bir çalışmada nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlara bağlı gastrik ülserlerde koruyucu etkinliği gösterilmiştir (140). Başka bir çalışmada sesamolün farelerde yara iyileşmesini kolaylaştırdığı (141), strese bağlı gastrik ülserde IL-1 β , IL-6, TNF- α üretimini ve NF- κ B aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (142).

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları ve Patoloji Anabilim Dalının katkıları ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları yaklaşık 250-300 gram olan 56 adet Wistar-Albino cinsi dişi sıçan çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından ruhsatlandırılmış Pamukkale Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde ayrı gruplar halinde, ayrı kafesler içerisinde, optimum nem ve sıcaklıkta, uygun şartlarda ve standart koşullar altında tutuldu. Pamukkale

Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu'nun PAUHDEK-2013/042 karar numaralı izni ile çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmada 56 sıçan randomize olarak 8 gruba ayrıldı. 7 sıçandan oluşan her grup ayrı ayrı kafeslerde uygun şartlarda, standart koşullarda tutuldu. Çalışmayı tamamlayamayan kontrol grubundaki 1 adet sıçan çalışma dışında bırakıldı.

Gruplar:

- 1.grup (topikal sesamol grubu)
- 2.grup (subkonjonktival sesamol grubu)
- 3.grup (topikal bevasizumab grubu)
- 4.grup (subkonjonktival bevasizumab grubu)
- 5.grup (topikal sesamol + bevasizumab grubu)
- 6.grup (subkonjonktival bevasizumab + sesamol grubu)
- 7.grup(topikal tween 80 grubu)
- 8.grup(kontrol grubu)

Bevasizumab ile sesamol additif etkisini araştırmak için bu iki ilaç subkonjonktival bevasizumab+sesamol ile topikal bevasizumab+sesamol grubunda birlikte uygulanmıştır.

Tüm sıçanların her iki gözü de muayene edildi. Her iki gözü de sağlam ve sağlıklı olan sıçanların sağ gözlerinde gerekli anestezi ve analjezi uygulandıktan sonra sağ göz kornea santraline 2 M NaOH emdirilmiş 3 mm çapında daire şeklinde kesilmiş Whatman filtre kağıdı ile kimyasal yanık oluşturuldu (Şekil 3.1.A,B). Kimyasal yanıklar 2 M NaOH emdirilmiş 3 mm çaplı whatman filtre kâğıdının kornea santralinde 10 sn boyunca bekletilmesiyle oluşturuldu. Bu işlemde hemen sonra geride kalabilecek kimyasal partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması için kornea

ve forniksler 10 ml % 0.9 sodyum klorür izotonik ile yıkanarak temizlendi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. A)3 mm çapında kesilmiş whatman kağıtları B) whatman filtre kağıdı



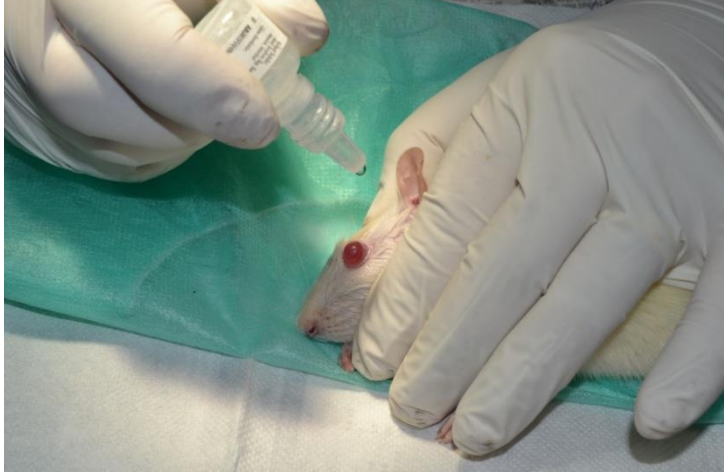
Şekil 3.2.NaOH ile kimyasal koterizasyondan hemen sonraki görünüm

Kimyasal yanık oluşumu deneyin birinci gününde yapıldı. Sağ gözleri yakılan sıçanlar randomize bir şekilde 8 gruba ayrıldı. Yanık oluşturulduktan hemen sonra hayvanlara subkonjonktival enjeksiyon yapıldı yada damlalar damlatılmaya başlandı. Kontrol grubu tedavisiz bırakıldı. Tween 80 grubuna %0,8 lik tween 80 ile hazırlanan damla sabah akşam yapıldı. Subkonjonktival enjeksiyonlar Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobu altında limbusun 2 mm gerisinden superior bulber konjonktiva altına 30 gauge ucu olan enjektör ile yapıldı. Subkonjonktival bevasizumab grubundaki sıçanlara 0,05 ml (1,25 mg) bevasizumab ALTUZAN® Flakon 400 mg/16 ml konsantre infüzyon çözeltisi (F. Hoffmann-La Roche Ltd.,

Basel, İsviçre lisansı ile Genentech Inc., Güney SanFransisko, ABD) enjekte edildi. Subkonjonktival sesamol grubundaki sıçanlara %0,8 tween 80 ile çözülerek hazırlanan 1,25 mg sesamol (3,4-Methylenedioxyphenol,Sigma-Aldrich Co.) enjekte edildi. Subkonjonktival bevasizumab + sesamol grubundaki sıçanlara 0,05 ml(1,25 mg) bevasizumab ve 0,05ml (1,25 mg) sesamol konjonktivanın farklı yerlerinden uygulandı (Şekil 3.3.). Subkonjonktival uygulamalar deneyin birinci gününde bir defaya mahsus uygulandı. Topikal yolla tedavi edilen gruptakilere kornealarında kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra hazırlanan damlalar 1 hafta boyunca günde iki kez damlatıldı(Şekil 3.4.). Topikal bevasizumab grubundaki sıçanlara %0.9 sodyum klorür izotonik ile seyreltilerek 10 mg/ml dozunda hazırlanan bevasizumab damla damlatıldı. Topikal sesamol grubundaki sıçanlara % 0,8 tween 80 ile çözülerek 10 mg/ml dozunda hazırlanan sesamol damla damlatıldı. Topikal tween 80 grubuna % 0,8 lik topikal tween 80 damla damlatıldı. Topikal bevasizumab+sesamol grubuna hazırlanan damlalar 10'ar dakika ara ile damlatıldı. Hazırlanan damlalar buzdolabında +4 derecede saklandı.



Şekil 3.3. Kimyasal koterizasyondan hemen sonra subkonjonktival enjeksiyonun yapılışı



Şekil 3.4. Kimyasal koterizasyondan hemen sonra damla uygulaması

Deney süresi tamamlanan sıçanların kornea muayeneleri ve korneaların fotoğraflamaları yapıldı. Daha sonra yüksek doz ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorür verilerek dekapite edildi ve enükleasyon uygulandı.

3.1. Anestezi Tekniği:





Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 50 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0.5'lik proparakain hidroklorid (Alcain, Alcon, Fort Worth, Texas, ABD) damla damlatıldı.

3.2. Kornea Yanık Alanlarının Değerlendirilmesi

Sıçanların korneaları muayene edilerek 8. günde kornea kimyasal yanık alanları Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde belirlendi (143). Yanık dereceleri oluşan yanığın kabarıklığına göre 0 (kornea yüzeyinde kabarma yok), +1 (kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık), +2 (kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık), +3 (kornea yüzeyinde büyük kabarıklık) şeklinde derecelendirildi.

3.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi

Deneyin 8. gününde tüm sıçan korneaları Topcon DC-3 dijital kamera monteli biyomikroskop ile muayene edilerek korneal neovaskülarizasyon dereceleri Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde belirlendi (166). Oluşan neovaskülarizasyonun kornea yanık alanına uzaklığına göre: 0 (kornea yüzeyinde neovaskülarizasyon yok), +1.5 (1/4 uzaklıkta), +2 (1/3 uzaklıkta), +3 (1/2 uzaklıkta), +4 (2/3 uzaklıkta), +4.5 (3/4 uzaklıkta), +6 (yanık alanına ulaşmış) şeklinde derecelendirildi (Şekil 3.5.).

	Kimyasal yanık Derecesi	Neovaskülarizasyon Derecesi
	Derece 0 kornea yüzeyinde kabarma yok	Derece 0 kornea yüzeyinde neovaskülarizasyon yok
	Derece 1 kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık	Derece 3 1/2 uzaklıkta
	Derece 2 kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık	Derece 1.5 1/4 uzaklıkta
	Derece 3 kornea yüzeyinde büyük kabarıklık	Derece 4.5 3/4 uzaklıkta

Şekil 3.5. Mahoney ve Waterbury'nin tanımladığı yanık alanının ve korneal neovaskülarizasyonun derecelendirilmesi (143).

Topcon DC-3 dijital kamera ile sıçan kornealarının fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar PHOTOSCAPE (MOOII tech.) ve GIMP 2.8.14 görüntü işleme programlarıyla işenerek korneal neovaskülarizasyon alanları belirlendi. Fotoğraflar üzerinde neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi İMAGEJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) programı kullanılarak hesaplandı.

3.4.Histopatolojik inceleme

Sakrifikasyon sonrası enükleasyon uygulanan sıçanlardan elde edilen gözler ayrı gruplar halinde %10'luk formaldehitle dolu kaplara kondu. Fiksasyon sonrasında limbustan limbusa uzanan ve kornea santralinden geçen kesiler yapılarak örnekler alındı. Dokular yıkandı ve sırasıyla alkol, ksilen, parafin aşamalarından geçirildi. Daha sonra parafin bloklara gömüldü. 4 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler hematoksilin- Eosin (HE) ile boyandı. Kesitler çalışma gruplarını bilmeyen bir patolog(M.A.) tarafından incelendi. Örnekler neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından değerlendirildi.

Örneklere +1 den +4'e kadar değerler verilerek bir değerlendirme sistemi oluşturuldu. Neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu ve fibroblast aktivitesi bulunmayan örneklere – (negatif) değeri verildi.

Fibroblast Aktivitesi:

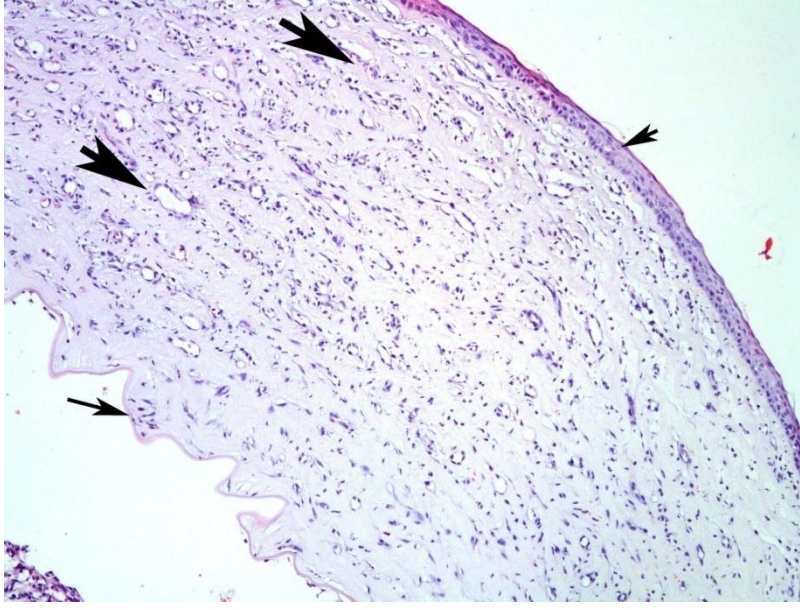
- + : Minimal ya da negatife yakın fibroblast aktivitesi
- ++ :Fokal fibroblast aktivitesi
- + ++ : ++ ile + + ++ arasında kalan aktivite durumları
- + + ++ : Yoğun ve yaygın fibroblast aktivitesi

Vaskülarizasyon Yoğunluğu:

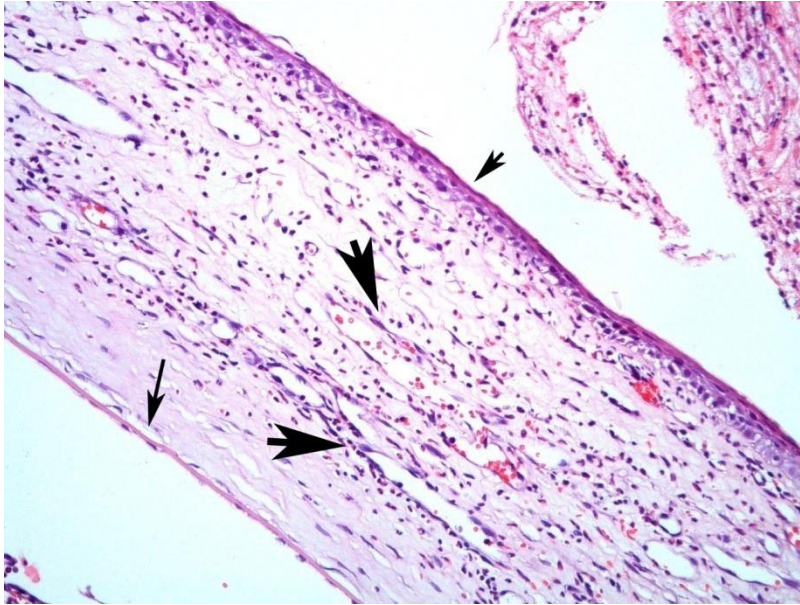
- + : Minimal ya da negatife yakın damarlanma olması
- ++ : Subepitelyal, ön stromal alanda sınırlı veya fokal damarlanma olması
- + ++ : ++ ile + + ++ arasında kalan durumlar
- + + ++ : Yoğun ve yaygın damarlanma olması

İnflamasyon Yoğunluğu:

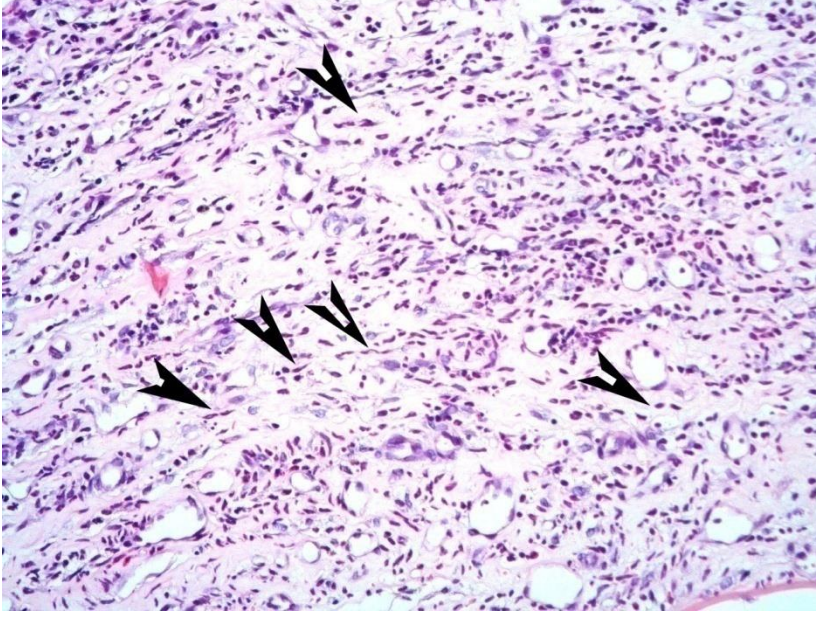
- + : Minimal ya da negatife yakın inflamasyon
- ++ : Fokal, az sayıda mikst tip inflamatuvar hücre tipleri. Lenfosit, nötrofil lökosit, eozinofil lökosit gibi
- + ++ : ++ ile + + ++ arasında kalan durumlar
- + + ++ : Diffüz, yoğun mikst tip inflamatuvar hücre



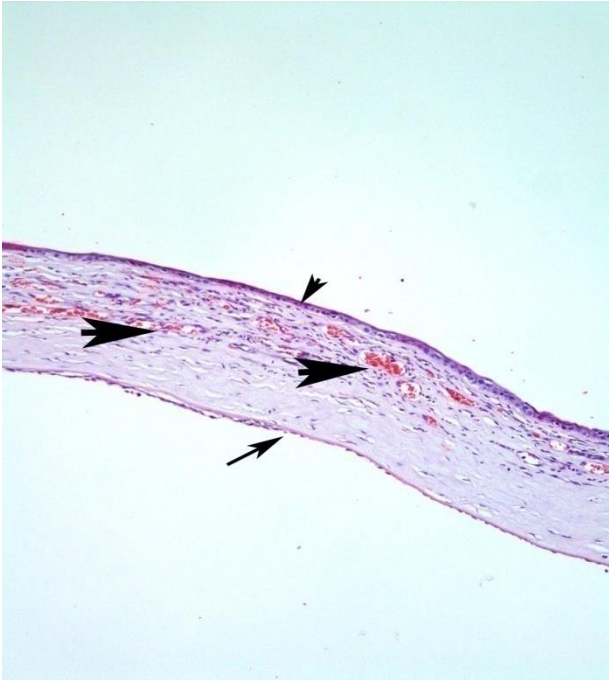
Şekil 3.6. Bu örnekte neovaskülarizasyonun derin stromaya kadar uzandığı, yoğun ve yaygın damarlanma olduğu görüldü. Vaskülarizasyon derecesi, fibroblast aktivitesi ve inflamasyon yoğunluğu değerlerinin hepsi ++++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(Işık mikroskobu(IM), HE, x100).



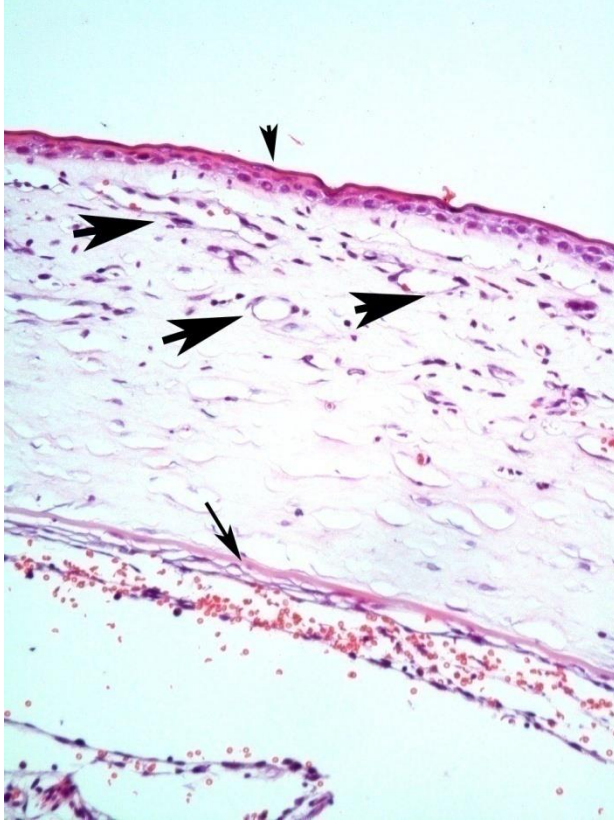
Şekil 3.7. Vaskülarizasyon derecesi ++++, fibroblast aktivitesi ++++ ve inflamasyon yoğunluğu ++++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(IM, HE, x100).



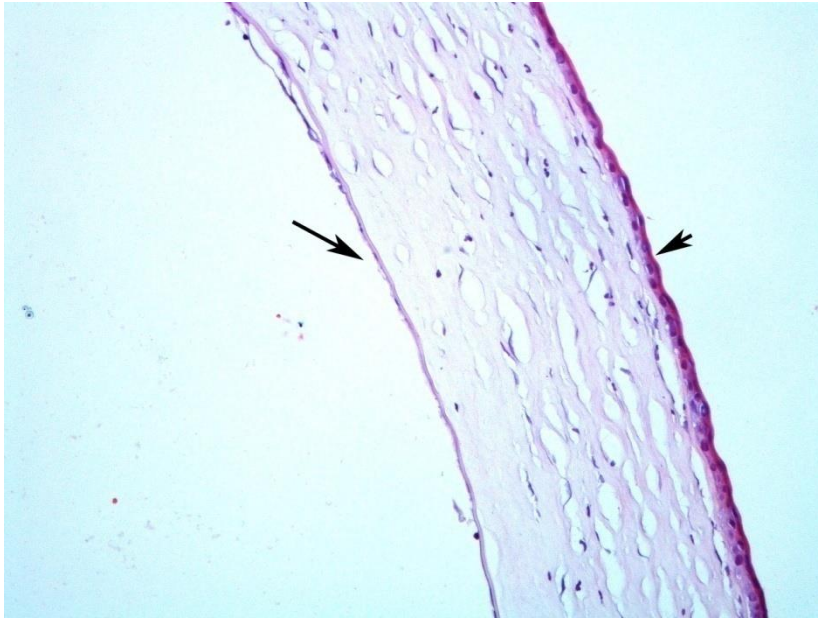
Şekil 3.8. Bu örnekte arkası kesik oklar fibroblastları göstermekte olup fibroblast aktivitesi ++++ olarak değerlendirilmiştir (IM,HE, x 200).



Şekil 3.9. Vaskülarizasyon derecesi +++, fibroblast aktivitesi +++ ve inflamasyon yoğunluğu +++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descemet membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(IM, HE, x100).



Şekil 3.10. Vaskülarizasyon derecesi ++, fibroblast aktivitesi ++ ve inflamasyon yoğunluğu ++ olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli, büyük kalın oklar ise damar yapılarını göstermektedir(IM, HE, x100).



Şekil 3.11. Yukarıdaki örnekte vaskülarizasyon derecesi +, fibroblast aktivitesi + ve inflamasyon yoğunluğu + olarak değerlendirildi. İnce uzun ok descement membranı, ince kısa ok epiteli göstermektedir (IM, HE, x100).

3.5. İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler ortalama +/- standart sapma, ortanca(minimum-maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı(yüzde) olarak ifade edildi. Çalışmanın istatistiksel analizi çalışmaya uygun olan Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 21 (SPSS, Windows versiyon 21) paket programı ile yapıldı. Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi analiz edilirken gruplar arası çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve gruplar arası ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Belirli bir derece sınıflandırılması kullanılarak yapılan diğer değerlendirilmelerde ise grupları birbirleri ile karşılaştırmak için Chi-Square Testi kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1.Kornea Yanık Derecelerinin Karşılaştırılması

Kornealarda oluşan yanık dereceleri tüm gruplarda Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildi (143). Elde edilen veriler tüm gruplar için aşağıdaki gibidir (Tablo 4.1.).

Gruplar/sıçan no	1	2	3	4	5	6	7
Topikal sesamol	2	1	2	1	2	2	2
Subkonjonktival Sesamol	2	3	3	2	3	2	2
Topikal Bevasizumab	2	2	2	1	2	2	2
Subkonjonktival Bevasizumab	1	2	3	2	2	2	2
Topikal sesamol+bevasizumab	2	2	2	2	2	1	3
Subkonjonktival Sesamol+bevasizumab	3	2	2	1	2	2	1
Topikal tween 80	3	2	2	2	2	3	2
Kontrol	3	3	2	3	2	2	

Tablo.4.1.Gruplardaki sıçanların kornea yanık alanları dereceleri.

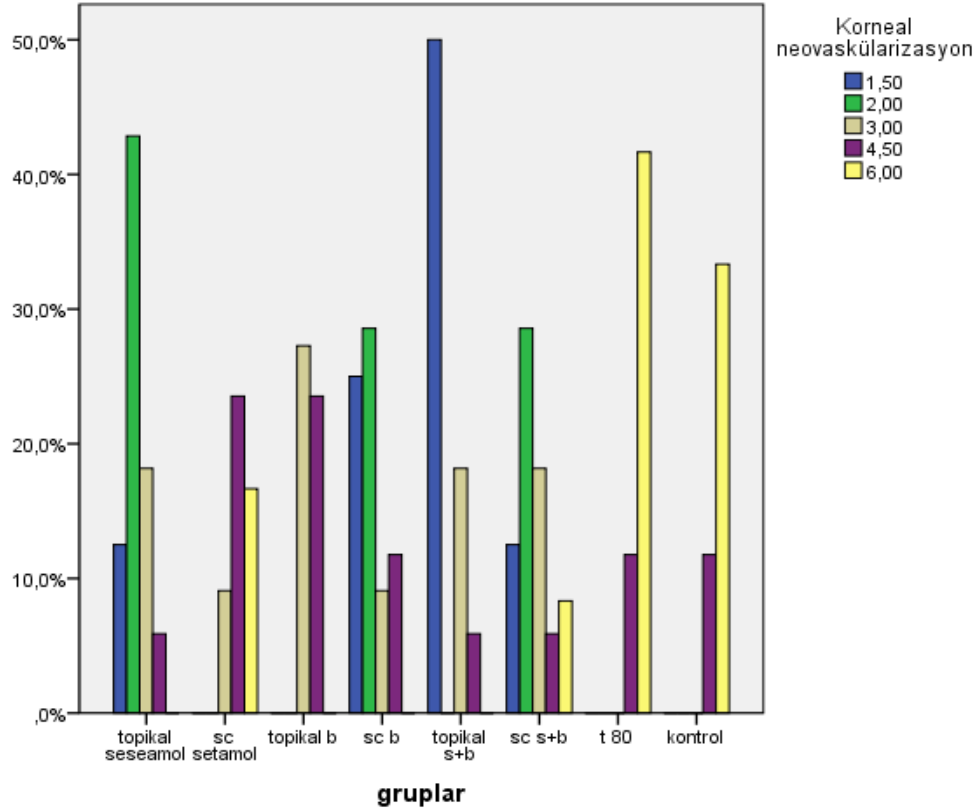
Kornea yanık alanları dereceleri tüm sıçan gözlerinde +1 ve üzerinde bulundu. Gruplar kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).Kornealarda oluşan yanık alanları açısından grupların elde ettiği dereceler benzer düzeydeydi ($p>0,05$).

4.2. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması

Tüm gruptaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildi (143) (Tablo 4.2.) (Şekil 4.1.).

Tablo 4.2. Gruplardaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri

Grup/sıçan	1	2	3	4	5	6	7
Topikal sesamol	3	1,5	2	2	2	3	4,5
Subkonjonktival Sesamol	3	4,5	6	4,5	6	4,5	4,5
Topikal Bevasizumab	4,5	4,5	4,5	3	4,5	3	3
Subkonjonktival Bevasizumab	1,5	3	4,5	2	4,5	1,5	2
Topikal sesamol+bevasizumab	1,5	3	4,5	1,5	1,5	1,5	3
Subkonjonktival Sesamol+bevasizumab	6	3	4,5	1,5	2	3	2
Topikal tween 80	6	6	6	6	4,5	6	4,5
Kontrol	6	6	4,5	6	6	4,5	



Şekil 4.1. Gruplardaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon alanlarının dağılımının grafikte gösterimi.

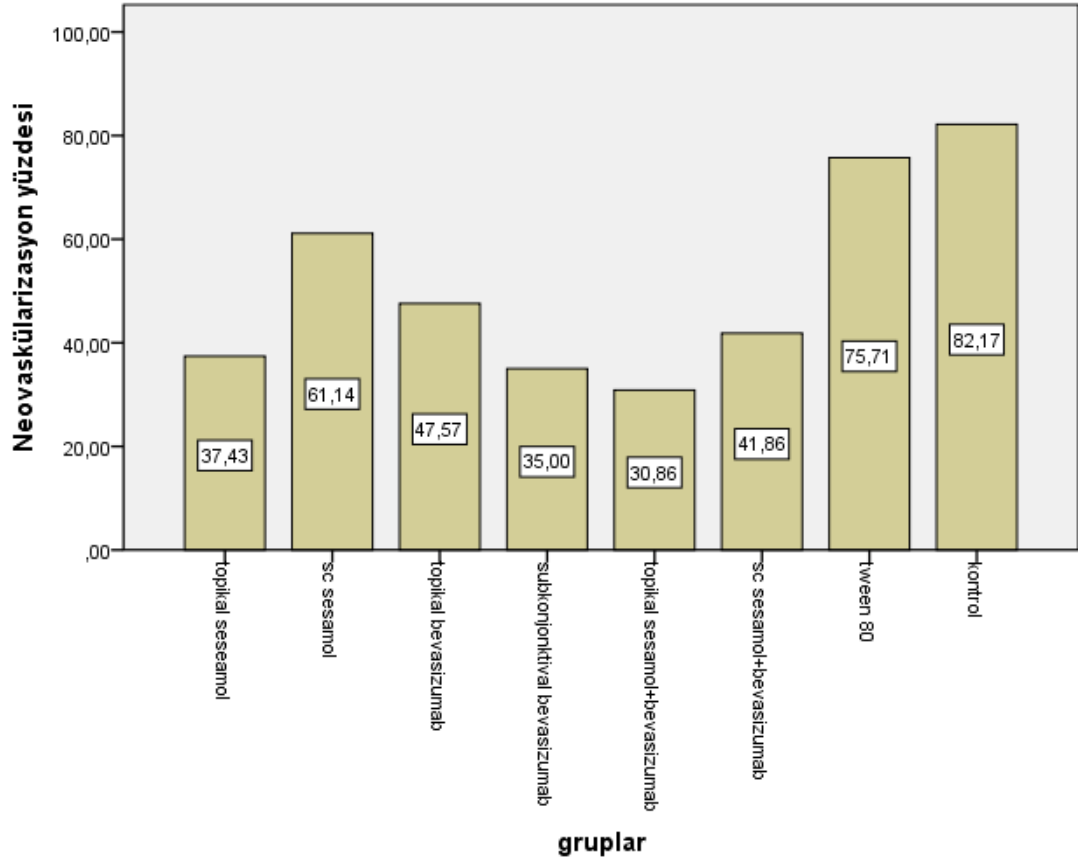
Tedavi gruplarındaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri kontrol grubu dereceleri ile karşılaştırıldı. Subkonjonktival sesamol ve tween 80 grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında arada istatistiksel açıdan fark olmadığı ($p=0,226$, $p=0,253$), diğer tedavi gruplarında ise anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Topikal sesamol ve subkonjonktival sesamol grupları karşılaştırıldığında topikal uygulamanın daha düşük değerler elde ettiği görüldü. İstatistiksel açıdan aradaki fark anlamlıydı ($p=0,025$). Subkonjonktival bevasizumab ve topikal bevasizumab grubu arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı görüldü ($p=0,276$). Topikal additif tedavi ile subkonjonktival additif tedavi kıyaslandığında arada istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p=0,512$). Topikal sesamol ile topikal bevasizumab grubu kıyaslandığında sesamol grubunun bevasizumab grubuna üstün olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,027$). Topikal additif tedavinin topikal bevasizumab grubuna göre daha düşük değerler elde ettiği ve bunun

istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p=0,025$). Subkonjonktival additif tedavi ile topikal bevasizumab grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,280$).

Gruplardaki sıçanların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 4.3.) (Şekil 4.2.).

Gruplar	Ortalama \pm Std. Sapma	Ortanca (Min-maks)
Topikal sesamol	37,43 \pm 18,85	33 (27 - 51)
Subkonjonktival sesamol	61,14 \pm 16,23	62 (50 - 70)
Topikal bevasizumab	47,57 \pm 17,61	52 (38 - 56)
Subkonjonktival bevasizumab	35 \pm 15,78	29 (17 - 53)
Topikal sesamol+bevasizumab	30,86 \pm 14,44	26 (17 - 51)
Subkonjonktival sesamol+bevasizumab	41,86 \pm 11,84	38 (28 - 60)
Tween 80	75,71 \pm 14,86	75 (67 - 81)
Kontrol	82,17 \pm 18,68	83,5 (70 - 92)

Tablo4.3. Tüm gruplardaki sıçanların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdelерinin ortalama ve ortanca değeri.



Şekil 4.2. Tüm grupların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi analiz edildiğinde, istatistiksel açıdan anlamlı fark görüldü ($p < 0.001$). Farklılığın hangi gruplarla ilişkili olduğunu belirlemek için gruplar arası ikili karşılaştırma yapıldı.

Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi açısından tedavi grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tween 80 grubu haricinde istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunduğu görüldü ($p < 0.05$). Gruplar tween 80 grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0,05$) Subkonjonktival uygulama ile topikal uygulama karşılaştırıldığında, subkonjonktival bevasizumab tedavisinin topikal bevasizumab tedavisine göre ortalama neovaskularizasyon alanının daha düşük olduğu fakat iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadığı ($p = 0.109$), topikal additif tedavinin subkonjonktival additif tedaviden üstün olduğu fakat aralarındaki istatistiki farkın

anlamli olmadigi (p=0.109), topikal sesamol grubunun subkonjonktival sesamol grubuna ustun oldugu ve iki grup arasinda istatistiksel acidan anlamlı fark bulunduğu goruldu (p=0.003). Topikal bevasizumab ile topikal sesamol grubu karšılařtırıldıđında topikal sesamol tedavisinin daha başarılı olduğu ve bu farkın istatistiksel acidan anlamlı olduğu goruldu (p=0,040). Bevasizumab grubu ile bevasizumab+sesamol grubu karšılařtırıldıđında ise topikal additif tedavinin topikal bevasizumab tedavisinden daha başarılı olduğu saptandı (p=0.018). Subkonjonktival bevasizumab ile subkonjonktival additif tedavi arasinda istatistiksel acidan anlamlı fark gorulmedi (p=0.371). Topikal sesamol grubu ile topikal bevasizumab+sesamol grubu karšılařtırıldıđında iki tedavi arasinda istatistiksel acidan anlamlı fark gorulmedi (p=0,306). Subkonjonktival sesamol ile subkonjonktival sesamol+bevasizumab grupları arasinda istatistiksel acidan anlamlı fark olduğu goruldu (p=0.007).

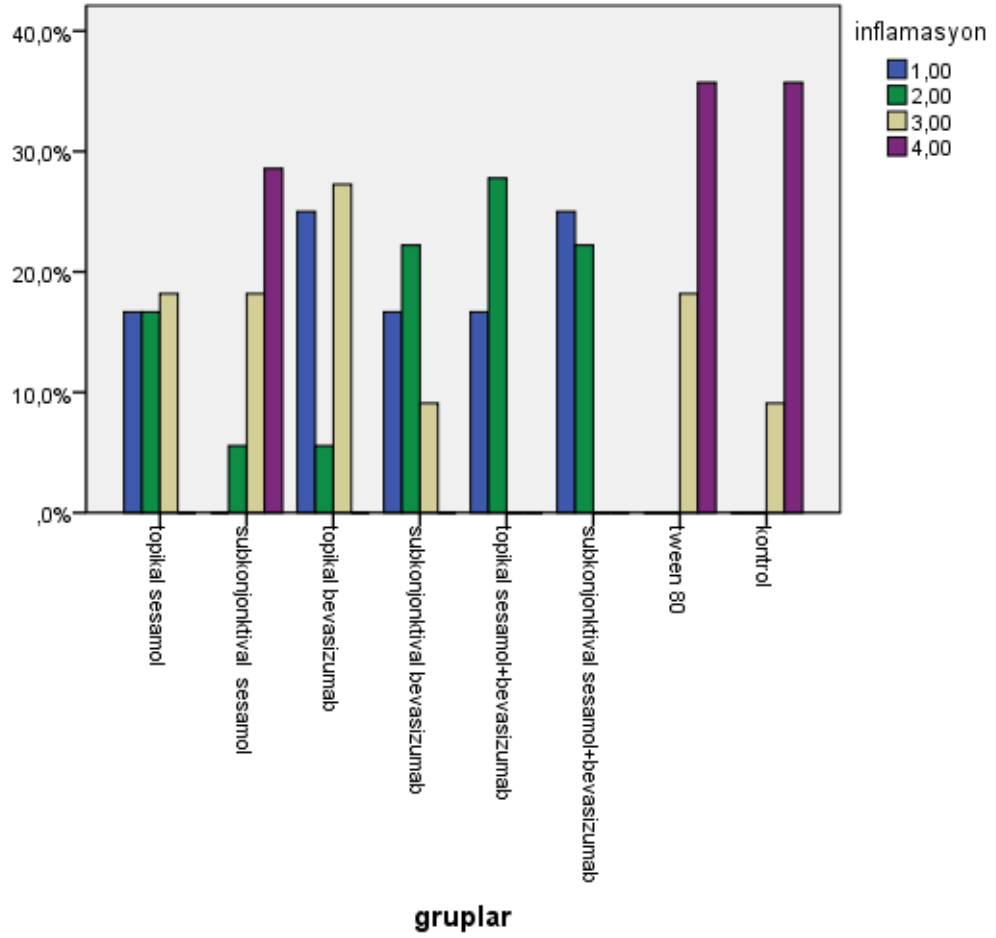
4.3.Histopatolojik İnceleme

Örneklerin fibroblast aktivitesi, inflamasyon yoğunluğu, neovaskularizasyon yoğunluğu aşığından histopatolojik inceleme sonuçları aşığıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Grupların histopatolojik inceleme sonuçları.

Gruplar	Sıçan no:	Fibroblast aktivitesi	İnflamasyon Yoğunluğu	Neovaskularizasyon Yoğunluğu
Grup 1 Topikal sesamol	1	+++	++	++
	2	+	+	+
	3	++	++	++
	4	++	+++	++
	5	+	+	+
	6	++	++	++
	7	+++	+++	+++
Grup 2 Subkonjonktival sesamol	1	++	++	++
	2	+++	++++	+++
	3	++++	+++	++++
	4	+++	++++	+++
	5	+++	++++	+++
	6	+++	+++	++++

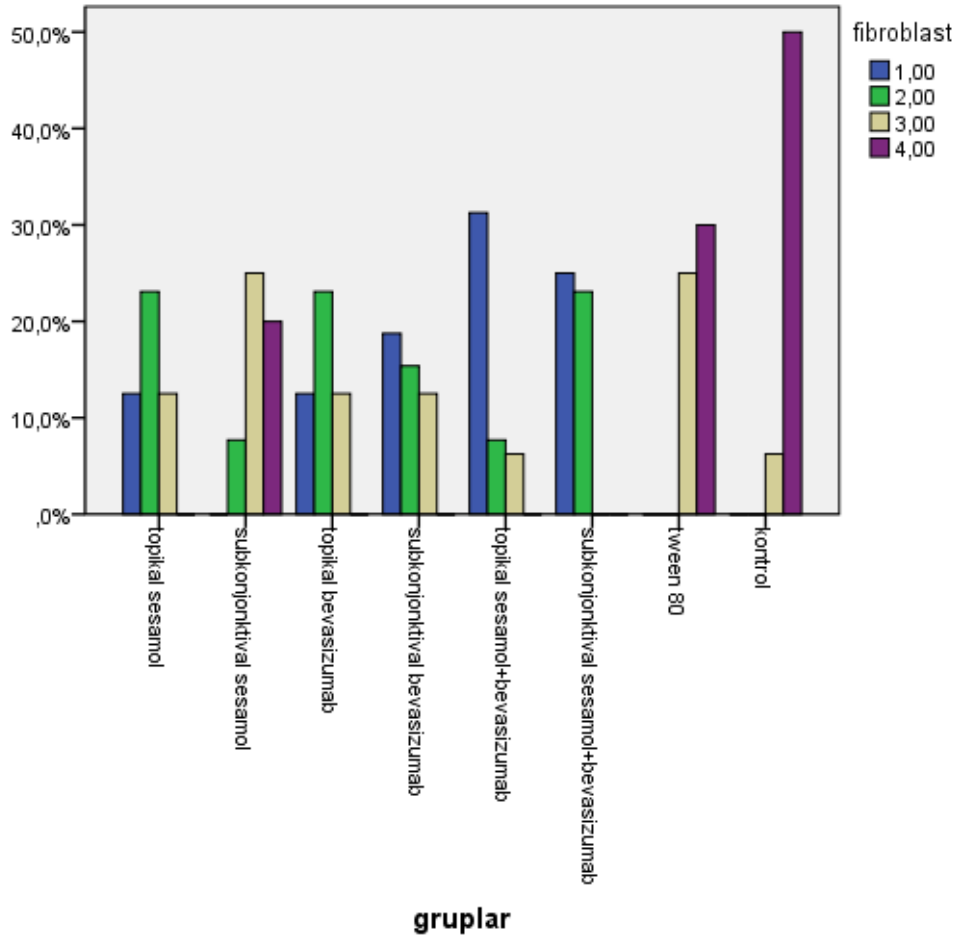
	7	++++	++++	+++
Grup 3 Topikal bevasizumab	1	+	+	++
	2	++	+	+
	3	++	+++	+++
	4	+	+	+
	5	++	+++	+++
	6	+++	++	+++
	7	+++	+++	++
Grup 4 Subkonjonktival bevasizumab	1	+	+	+
	2	+++	++	++
	3	+++	+++	+++
	4	+	++	+
	5	++	++	++
	6	+	++	+
	7	++	+	+
Grup 5 Topikal sesamol + bevasizumab	1	+	+	+
	2	++	++	++
	3	+	++	++
	4	+	++	++
	5	+	+	+
	6	+	++	+
	7	+++	++	+++
Grup 6 Subkonjonktival bevasizumab + sesamol	1	++	++	++
	2	+	+	+
	3	++	++	++
	4	+	+	+
	5	+	++	++
	6	++	++	++
	7	+	+	+
Grup 7 Topikal tween 80	1	++++	++++	++++
	2	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
	4	+++	++++	++++
	5	++++	++++	++++
	6	+++	++++	++++
	7	++++	++++	+++
Grup 8 Kontrol	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++
	4	++++	+++	++++
	5	+++	++++	++++
	6	++++	++++	++++



Şekil 4.3. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre inflamasyon yoğunluğunun dağılımı.

Histopatolojik incelemeler sonucunda tüm gruplar inflamasyon yoğunluğu açısından kontrol grubu ve tween 80 grubu ile karşılaştırıldı. Topikal sesamol, topikal bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab, topikal sesamol+bevasizumab, subkonjonktival sesamol+bevasizumab gruplarında inflamasyon yoğunluğu kontrol grubuna göre daha az bulundu, istatistiksel açıdan fark anlamlıydı ($p < 0.05$). Subkonjonktival sesamol, tween 80 gruplarıyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,226$, $p = 0,253$). Topikal sesamol grubunun subkonjonktival sesamol grubundan daha etkili olduğu görüldü. İki grup arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p = 0,025$). Topikal sesamol+bevasizumab grubunun topikal bevasizumab grubuna göre daha etkili olduğu ve aradaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p = 0,026$). Subkonjonktival bevasizumab ile topikal bevasizumab

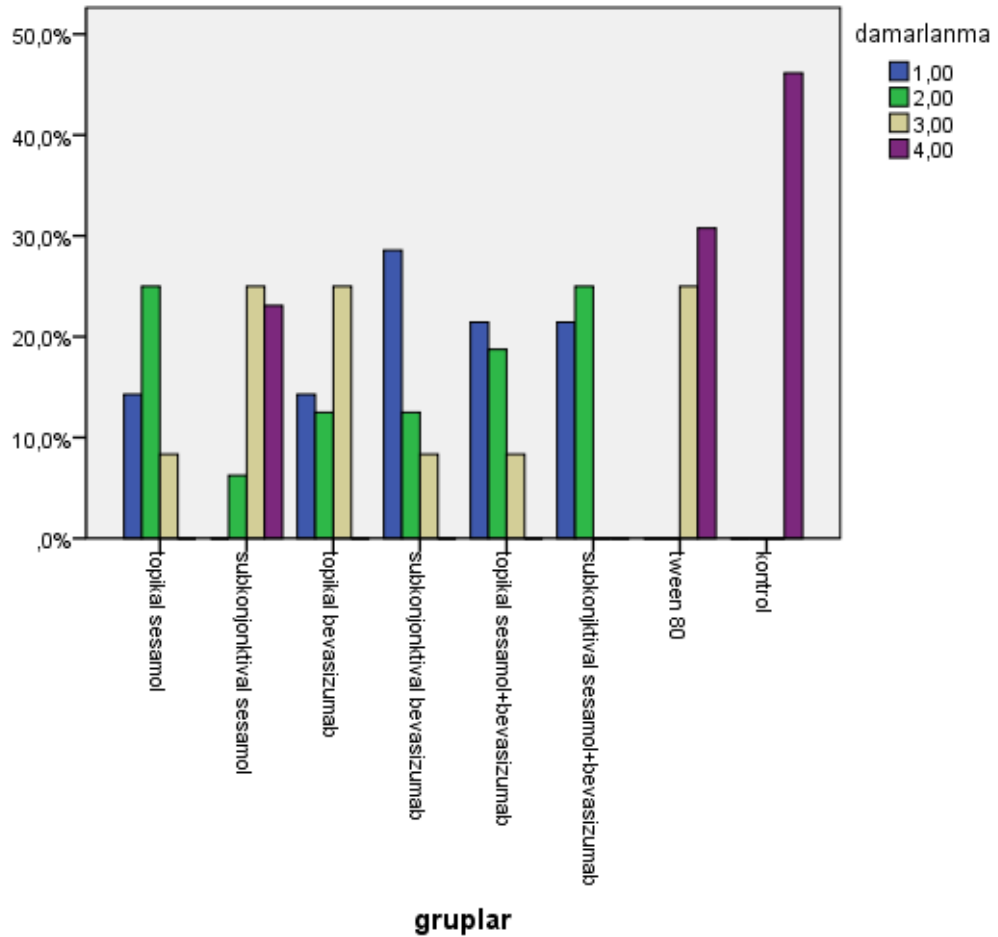
grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,229$). Topikal ve subkonjonktival additif gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,226$). Topikal sesamol grubunun subkonjonktival sesamol grubundan daha etkili olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p=0,025$). Topikal ve subkonjonktival additif gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,780$). Subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab+sesamol, topikal sesamol+bevasizumab, gruplarının subkonjonktival sesamol grubuna göre daha üstün olduğu ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) Kıyaslanan diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.



Şekil 4.4. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre fibroblast aktivitesinin dağılımı.

Tedavi gruplarındaki fibroblast aktivitesi kontrol grubu ve tween 80 grubu ile kıyaslandı. Topikal sesamol, topikal bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab, topikal sesamol+bevasizumab, subkonjonktival sesamol+bevasizumab gruplarında

fibroblast aktivitesi kontrol grubuna göre daha az bulundu, istatistiksel açıdan fark anlamlıydı ($p<0.05$). Subkonjonktival sesamol, tween 80 gruplarıyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,226$). Topikal sesamol grubunun subkonjonktival sesamol grubundan daha etkili olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p=0,025$). Subkonjonktival bevasizumab ile topikal bevasizumab grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=1,000$). Topikal ve subkonjonktival additif gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,226$). Subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab+sesamol, topikal sesamol+bevasizumab, topikal bevasizumab gruplarının subkonjonktival sesamol grubuna göre daha üstün olduğu ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Kıyaslanan diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.



Şekil 4.5. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre damarlanma yoğunluğunun dağılımı.

Tedavi gruplarındaki sıçanların histopatolojik incelemelerde damarlanma yoğunluğu kontrol grubuyla ve tween 80 grubuyla karşılaştırıldı. Topikal sesamol, topikal bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab, topikal sesamol+bevasizumab, subkonjonktival sesamol+bevasizumab gruplarında damarlanma yoğunluğu kontrol grubuna göre daha az bulundu, istatistiksel açıdan fark anlamlıydı ($p<0.05$). Subkonjonktival sesamol, tween 80 gruplarıyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,226$, $p=0,253$). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında topikal sesamol grubunun subkonjonktival sesamol grubundan daha etkili olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p=0,025$). Subkonjonktival bevasizumab ile topikal bevasizumab grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,229$). Topikal ve subkonjonktival additif gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,226$). Subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab+sesamol, topikal sesamol+bevasizumab gruplarının subkonjonktival sesamol grubuna göre daha üstün olduğu ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) Kıyaslanan diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

5.TARTIŞMA

Korneanın neovasküler hastalıkları yarattığı görme kaybıyla beraber insan yaşamını fiziksel, psikolojik ve ekonomik yönlerden etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur(144-145). Kornea neovaskülarizasyonu yeni damarların oluşumuyla beraber sızıntı, enflamasyon ve skarlaşmaya yol açarak korneanın şeffaflığının azalmasına ve görme kaybına neden olur. Yapılan güncel çalışmalar korneanın normal şartlarda avasküler şekilde kalmasını sağlayan mekanizmaları anlamaya ve iyileşme sürecinde korneanın avasküler yapısının korunmasının sağlanmasına odaklanmıştır. Bu çalışmalar korneal anjiogenik dengenin pasif bir durum olmadığını ve çeşitli basamaklara sahip aktif bir durum olduğunu göstermiştir(144-147).

Önemli bir sorun olan korneal neovaskularizasyonu tedavi etmek için klinisyenler çeşitli medikal ya da cerrahi yöntemler uygulamaktadır. Topikal kortikosterooidler proliferen olan korneal damarların baskılanmasında temel tedavidir (13,43). Steroidlere ek olarak non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar, rapamisin, siklosporin A ve metotreksat da klinikte kullanılmaktadır (148,149). Cerrahi tedavileri damarları tıkmayı hedefleyen argon lazer, elektro-koagulasyon, fotodinamik tedaviler oluşturmaktadır. Oküler yüzeyi onaran tedavileri ise konjonktival, limbal ve amniyon zar transplantasyonu oluşturur (6). Ne yazık ki bu yöntemlerin hepsi kısmi bir klinik etkiye sahiptir. Ayrıca özellikle steroid kullanımına bağlı olarak gelişen intraoküler basınç artışı ve arka subkapsüler katarakt oluşumu gibi istenmeyen yan etkileri mevcuttur(150). Tüm bu kısıtlayıcı sebepler ve Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 1.4 milyon insanın korneal neovaskularizasyon nedeniyle görme düzeylerinin etkilendiği düşünüldüğünde korneal neovaskularizasyonun tedavisinde değişik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük bir önem arz etmektedir(106).

VEGF'nin oküler anjiyogenezin bütün formlarında, hem insanlarda hem de hayvan modellerinde korneal neovaskularizasyonda etkili bir faktör olduğu bulunmuştur (151-152). VEGF inhibitörleri korneal neovaskularizasyon tedavisi dışında neovasküler yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, diyabetik retinopati ve neovasküler glokom gibi durumlarda kullanılmaktadır (153). İnsan VEGF'sine spesifik bir şekilde bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden, rekombinant hümanize bir monoklonal antikör olan bevasizumab'ın YBMD, üveit, santral retinal ven oklüzyonu, diyabetik retinopati sonucu oluşan maküler ödem tedavisinde intravitreal olarak kullanımının başarılı sonuçlarının açıklanmasıyla beraber birçok araştırmacı tarafından hayvanlarda ve insanlarda korneal neovaskularizasyonun tedavisi için topikal veya subkonjonktival bevasizumab uygulamasının etkinliği araştırılmıştır (154,155). Bu çalışmaların intravitreal tedavi çalışmalarına göre sayıları daha az olmakla beraber son yıllarda sayıları hızla artmaktadır.

Biz çalışmamızda topikal ve subkonjonktival yolla uygulanan bevasizumab ve sesamolün kimyasal yanıkla indüklenen korneal neovaskularizasyon

inhibisyonundaki etkinliklerini araştırdık ve bunların etkinliklerini kendi aralarında karşılaştırdık. Bu iki ajanın korneal neovaskularizasyon inhibisyonunda etkili olduğunu g6rdük. Neovaskularizasyon y6zdesi açısından topikal sesamol+ bevasizumab grubunun en iyi sonuçlara sahip olduğunu saptadık.

Bevasizumab, korneal neovaskularizasyonda topikal, subkonjonktival ve sistemik olarak değişik konsantrasyon ve s6relerde kullanılmıştır. Bizim alışmamızda kontrol grubuna g6re hem subkonjonktival bevasizumab hem de topikal bevasizumab tedavisi etkili bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar hayvan modellerinde benzer y6ntemler uygulanarak yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçları desteklemektedir (156-158).

Korneal neovaskularizasyonda bevasizumab kullanımı ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan biri olan Hosseini ve ark.'ın çalışmasında tavşanlarda NaOH ile oluşturulan korneal neovaskularizasyon modelinde subkonjonktival bevasizumabın etkinliğini değerlendirmek icin iki grup oluşturulmuş; birinci gruba alkali yanığı takiben hemen 2,5 mg tek doz subkonjonktival bevasizumab, ikinci gruba ise 2,5 mg tek doz subkonjonktival dengeli tuz solusyonu uygulamıştır. 6 haftalık deney s6resinin sonunda tedavi grubunda kontrol grubuna g6re korneal neovaskularizasyonda %32 oranında azalma saptanmış ve meydana gelen en uzun damar boyu kontrol grubuna g6re daha kısa bulunmuştur (156). Yine Manzano ve ark. tarafından sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, kimyasal koterizasyon ile oluşturulan korneal neovaskularizasyonda, g6nde iki kez topikal uygulanan % 4' l6k bevasizumabın etkinliği, g6nde iki kez topikal uygulanan %0,9 NaCl 6zeltisi ile karşılaştırılmış, yedinci g6nde fotoğraflarla değerlendirilen sonuçlara g6re topikal bevasizumab grubunda vaskularize alan %38,2 + 15,5, kontrol grubunda ise %63,5+5,0 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, bevasizumabın korneal neovaskularizasyonu geriletteği, ancak tamamen baskılayamadığı bildirilmiştir (157).

H6rmeri ve ark. kobaylarda oluşturdukları deneysel kornea neovaskularizasyonu modelinde ise subkonjonktival bevasizumab ve pegaptanip

sodyumun etkinliğini araştırmış, çalışma sonunda korneal neovaskularizasyon alanı kontrol grubunda %73,83, bevasizumab grubunda %59,84, pegaptanip grubunda ise %82,69 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonucunda kornea neovaskularizasyonunun azaltılmasında bevasizumab pegaptanib'e gore daha etkili bulunmuştur (158). Başka bir çalışmada Hürmeriç ve ark. kobaylarda gümüş nitrat-potasyum nitrat ile oluşturulan korneal neovaskularizasyon modelinde subkonjonktival bevasizumabın etkinliği araştırılmıştır. Erken ve geç olarak iki tedavi grubu, bir de kontrol grubu olmak üzere üç grup oluşturulmuş. Birinci gruba kimyasal yanık oluşturulmasından hemen sonra ve üç gün sonra subkonjonktival bevasizumab, ikinci gruba kimyasal yanık oluşturulmasından sonraki üçüncü ve beşinci günlerde subkonjonktival bevasizumab yapılmış, kontrol grubuna ise yanık oluşturulmasından sonraki üçüncü ve beşinci günlerde subkonjonktival 0,9 NaCl yapılmış. Yapılan fotoğrafik analizler sonucunda tedavi grupları ve kontrol grupları arasında neovaskularizasyon yüzdesi açısından fark olmadığı, fakat 0 ve +6 arası derecelendirilen Mahoney ve Waterbury (143) tarafından tanımlanan korneal neovaskularizasyon derecesine göre korneal neovaskularizasyon, birinci ve ikinci grupta, kontrol grubuna göre istatikselsel olarak anlamlı düzeyde daha az bulunmuştur. (130).

Bizim alışmamızda dijital fotoğraf analizi ile beraber Mahoney ve Waterbury' nin tarif ettiği korneal neovaskularizasyon derecelendirme yöntemi de kullanılmıştır (143). Bu yöntemle göre yapılan değerlendirmede topikal sesamol tedavisinin subkonjonktival sesamole üstün olduğu görüldü. Yine aynı şekilde topikal sesamol grubunun topikal bevasizumab grubuna üstün olduğu görüldü. Bu yöntem her ne kadar göreceli olarak subjektif olsa da elde edilen sonuçların daha sonra elde edilen dijital fotoğraf incelemesi sonuçlarıyla tutarlı olduğu görüldü.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda(130,158) elde edilen veriler çalışmamızda fotoğraflar üzerinde neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesinin incelenmesiyle elde ettiğimiz sonuçlarla benzerdir. Korneal neovaskularizasyon ile ilgili yapılan çalışmalarda fotoğraflar üzerinde korneal neovaskularizasyonun hesaplanmasında farklı bilgisayar programları kullanılmaktadır. Bu bilgisayar

programları fotoğraflar üzerinde korneal neovaskularizasyonu kantitatif ya da semikantitatif yöntemlerle ölçmektedir. Çalışmamızda kullandığımız İmagej Amerika'da National Institutes of Health (NIH) kurumu tarafından tıbbi araştırmalar için geliştirilen bir bilgisayar programıdır. Bu program neovaskularizasyonun kornea üzerinde ulaştığı sınırların çalışmacı tarafından belirlenmesine ve bu belirlenen alanlardaki piksel sayılarının oranlanmasına imkan vermesi nedeniyle tercih edilmiştir.

Bevasizumabla ilgili klinik çalışmalar değerlendirildiğinde; topikal bevasizumabın insanlarda kullanıldığı ilk çalışmada iki hastaya % 1' lik topikal bevasizumab günde dört defa uygulanarak önemli derecede yüzeysel ve stromal neovaskularizasyon inhibisyonu sağlanmış (159). Bahar ve ark.'ın çalışmasında korneal neovaskularizasyonu olan on hastaya her göze en az iki kez 2,5mg/0,1ml subkonjunktival bevasizumab enjekte edilmiş korneal neovaskularizasyonun yedi hastada kısmen gerilediği, tedavinin iyi tolere edildiği ve sonuçta insan korneal neovaskularizasyonunun %29 oranında azaldığı bildirilmiş (129). Koenig ve ark. çeşitli oküler hastalıklara sekonder gelişen korneal neovaskularizasyon tedavisinde 27 hastanın 30 gözüne 5mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bevasizumab göz damlasını günde beş kez uygulamışlar ve korneal neovaskularizasyon alanının % 61 oranında azaldığını, damar çapının %24 azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada topikal bevasizumab uygulamasının etkili, göreceli olarak güvenli olduğunu ve iyi tolere edildiğini belirtmişlerdir (160). Dastjerdi ve ark. 10 hastanın 10 gözünde yaptıkları çalışmada topikal bevasizumab tedavisiyle ortalama neovasküler alanın % 47,1 ve damar çapının % 54,1 oranlarında azaldığını göstermiş (161).

Chu ve ark. yaptıkları çalışmada korneal neovaskularizasyona sekonder lipid keratopatisi olan 18 hastaya subkonjunktival bevasizumab uygulamış, neovaskularizasyon ve lipid depolanma parametrelerinde iyileşme olduğunu göstermiştir (162). You ve ark.'ın çalışmasında korneal neovaskularizasyonu olan 29 hastada farklı dozlarda (1,25mg/0,05ml 2,5mg/0,1ml ve 5mg/0,2ml) subkonjunktival

bevasizumab enjeksiyonu uygulanmış. 1,25mg bevasizumab enjekte edilen grupta neovaskularizasyon alanında anlamlı bir değişiklik olmazken, 2.5mg ve 5mg bevasizumab enjekte ettikleri gruplarda neovaskularizasyonda önemli gerileme olduğu ancak tamamen kaybolmadığı gösterilmiş (163). Erdurmuş'un birisi kuru göz nedeniyle oluşan filamentöz keratite diğeri kornea graft reddine bağlı gelişen korneal neovaskularizasyon bulunan iki hastalı çalışmasında hastalara subkonjonktival 2,5 mg (0,01 ml) bevasizumab uygulanmış. Hastalar yarıklı lamba ve kornea fotoğraflarıyla takip edilip, birinci hafta sonuçları yayınlanmış. Korneal neovaskularizasyonun ilk vakada anlamlı şekilde azaldığı, ikinci vakada küçük damarlarda gerileme olduğu fakat büyük ana damarda değişiklik olmadığı, sonuç olarak subkonjonktival bevasizumabın tedaviye eklenebileceği bildirilmiş (126).

Topikal bevasizumab tedavisinin uygulama ve pozolojisi konusunda farklı çalışmalarda farklı görüşler mevcuttur. Çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 12.5 mg/ml ve 25 mg/ml gibi farklı konsantrasyonlarda topikal bevasizumab tedavisi uygulanmıştır (16,159,164). Kimyasal yanıkla korneal neovaskularizasyon oluşturulan sıçanlarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml) ve günde iki kez uygulanan topikal bevasizumab tedavilerini karşılaştırmıştır. Sonuç olarak 4 mg/ml konsantrasyonunun yeterli olduğunu diğer konsantrasyonların etkisiz kaldığını bildirmiştir (165). DeStafeno iki hastaya 6 ay boyunca günde 4 kez uyguladıkları 10 mg/ml konsantrasyonundaki topikal bevasizumab tedavisinin korneal neovaskularizasyonu geriletmede başarılı olduğunu ve herhangi oküler bir yan etkiye rastlanmadığını bildirmiştir (159). Çalışmamızda da 10 mg/ml dozunda hazırlanıp, yedi gün boyunca günde iki kez damlatılan topikal bevasizumab tedavisi kontrol grubuna göre etkili bulunmuştur.

Subkonjonktival bevasizumab uygulamasının topikal bevasizumab uygulamasına göre üstün olup olmadığı kesinlik kazanmış bir durum değildir. Korneal greft modeli yaratılan bir hayvan çalışmasında subkonjonktival ve topikal uygulanan bevasizumabın yüksek riskli kornea nakli sonrasında greft survey oranını

artırdığı, subkonjonktival uygulamanın kontrol grubuna ve topikal uygulamaya göre daha üstün olduğu gösterilmiş. Greft reddini engellemede ise sadece subkonjonktival bevasizumabın etkili olduğu bildirilmiş. Bu çalışmanın sonucunda topikal bevasizumabın kornea epitelinden yeterli derecede geçememesi nedeniyle etkinliğinin düşük olduğu tartışılmıştır. (166). Diğer taraftan topikal bevasizumabın klinik etkinliğini gösteren bir çok çalışma mevcuttur (116,161,164). Bu çalışmaların farklılık göstermesinin sebeplerinden biri bevasizumabın topikal dozunun daha yüksek verilmesi gerekliliği olabilir(167). Diğer bir sebep de neovaskularizasyon oluşturulan gözlerle greft korneanın genetik farklılık göstermesi olabilir. Rocher ve ark. yine bir korneal greft modelinde topikal ve subkonjonktival uygulamanın tedavi edici etkisi olduğunu ve iki grubun korneal greft rejeksiyonuna etkinliklerinin aynı olduğunu bildirmiş (168).

Bizim çalışmamızda hem topikal bevasizumab hem de subkonjonktival bevasizumab uygulaması kontrol grubuna göre etkili bulunmasına ve subkonjonktival bevasizumabın neovaskularizasyon alanı yüzdesi ve histolojik inceleme parametreleri daha iyi olmasına rağmen iki tedavi yöntemi arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı.

Anjiyogenezde monosit, fibroblast gibi kollajen matriksin yıkımı sonrası ortaya çıkabilen birçok hücresel ajan rol oynamaktadır (169). Şener'in çalışmasında neovaskularizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından subkonjonktival bevasizumab tedavisi kontrol grubuna göre daha başarılı bulunmuştur (170). % 100 alkolle kimyasal yanık oluşturulan bir diğer çalışmada sıçan kornealarına uygulanan subkonjonktival bevasizumabın inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve sitokinleri azalttığını bildirmiştir (171). Çalışmamızda histopatolojik örneklerde neovaskularizasyon yoğunluğunun yanısıra neovaskularizasyon patogenezinde rol oynayan fibroblast, PMNL, monosit, lenfosit, eozonofil ve nötrofil gibi hücresel elemanlar da incelendi.

Çalışmamızda subkonjonktival bevasizumab ve topikal bevasizumab gruplarında incelenen fibroblast aktivitesi, inflamasyon, neovaskularizasyon gibi

histolojik parametrelerde anlamlı bir fark gösterilememiş, birbirlerine karşı her hangi bir üstünlük gözlenmemiştir. Bu bulgular dijital fotoğraflar üzerinde yapılan analiz sonuçlarının kıyaslanmasıyla benzerlik göstermektedir.

Reaktif oksijen molekülleri süperoksit radikallerini(O₂), hidrojen peroksiti (H₂O₂) ve hidroksil radikallerini (OH) içerir. Reaktif oksijen molekülleri hücre hemostazında önemli rol oynar. Yüksek konsantrasyonları hücre ölümü, yaşlanma gibi durumlarda gözlenir. Bu moleküller bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B yi aktifleyerek inflamatuvar sitokinleri, VEGF, MCP-1, interlökinler ve TNF aktifleyebilirler(172, 173). Aktiflenen bu ajanlar neovaskülarizasyona ve inflamasyonun artmasına sebep olurlar.

İnflamasyon mikrobik enfeksiyon, kimyasal hasar, travma gibi sebeplerden dolayı ortaya çıkabilen fizyolojik bir olaydır. Anjiojeneze benzer şekilde inflamasyon hücre kemotaksisi, migrasyonu ve proliferasyonunu düzenleyen proinflamatuvar ve anti inflamatuvar moleküller ile kontrollü bir şekilde ilerlemektedir (174). İnflamasyon ve anjiojeniz arasında sıkı bir ilişki vardır. Anjiojeniz, inflamasyon bölgesindeki hücreler için gerekli olan oksijen ve besin desteğini sağlayarak inflamasyonu sürdürür. İnflamasyonun ilk basamaklarında üretilen NO damar dilatasyonu ve geçirgenliğini artırarak immün hücrelerin damar dışına geçişini sağlar. İmmün hücrelerce üretilen mediatörler, fibroblastları ve damar endotel hücrelerini hedef alarak anjiojenik faktörleri salgılatır. Aynı zamanda inflamatuvar hücrelerin kendileri de VEGF, Ang, bFGF, HGF, PDGF, TGF- β , TNF- α gibi anjiojenik faktörler salgılar(174). Bu durum göz önüne alınarak literatürde korneal neovaskülarizasyon için çeşitli antioksidan ve antiinflamatuvar özellikte ajanlar kullanılmıştır.

Kubota ve ark. çalışmalarında NaOH ile kimyasal yanık oluşturulan sıçan kornealarında reaktif oksijen moleküllerinin arttığını, dihydroethidium (DHE) fluorescence ile göstermiş (175). NF- κ B aktivasyonu, VEGF ve monosit kemoatraktan protein-1(MCP-1) düzeylerinin arttığı gösterilmiş. Yine aynı çalışmada kimyasal yanık oluşturulmadan üç gün önce antioksidan bir molekül olan N-acetyl-

L-cysteine(NAC) 200 mg/kg dozunda, spesifik bir NF- κ B inhibitörü olan dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) 5 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak yapılmış ve her iki tedavinin kontrol grubuna göre neovaskularizasyonu azalttığı görülmüş(p<0,05). Aynı çalışmada kimyasal yanıktan hemen sonra antioksidan özelliği bilinen Hidrojen(H₂) solüsyonu 30 dakika boyunca uygulanmış ve takip sonrasında neovaskularizasyonu anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiş (175).

Lee ve ark. çalışmasında tavşanlarda korneaya sütür koyularak oluşturulan korneal neovaskularizasyon modelinde topikal askorbik asit üç farklı gruba 10 mg/mL, 1 mg/mL, ve 0.5 mg/mL şeklinde üç farklı konsantrasyonda uygulanmış, korneal neovaskularizasyon ve serum VEGF ve MMP düzeylerine bakılmış (176). 10 mg/ml ve 1mg/ml konsantrasyonda uygulanan gruplarda korneal neovaskularizasyonun kontrol grubuna göre azaldığı, serum VEGF ve MMP düzeylerinin bütün tedavi gruplarında azaldığı gösterilmiş(176). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada tavşan korneasına sutur koyularak oluşturulan neovaskularizasyon modelinde kuvvetli antioksidan etkisi bilinen ve yeşil çayda yüksek oranda bulunan epigallocatechin gallate (EGCG) 0.01%(grup 1) ve 0.1% (grup 2) konsantrasyonlarında iki ayrı gruba topikal olarak uygulanmış. 0.1 % lik uygulamada neovaskularizasyon alanı ve korneal VEGF messenger RNA ve COX-2 proteini düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuş(177).

Erdurmuş ve ark. kimyasal yanık ile korneal neovaskularizasyon oluşturulan çalışmalarında antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan ve çörek otu içinde bol miktarda bulunan thymoquinone maddesini kullanmışlar (178). Bu çalışmada thymoquinone 'nin daha iyi çözülebilmesi ve korneaya daha iyi penetre olabilmesi için %0,8 tween 80 solüsyonu kullanılmış. Çalışmada thymoquinone 0.1%, thymoquinone 0.4%, triamcinolone asetonid ve kontrol grubu olarak topikal %0,8 tween 80 kullanılmış. Her iki dozda kullanılan thymoquinone' nin korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiği gösterilmiş, tween 80 grubunun ise korneal neovaskularizasyona etkisinin olmadığı gösterilmiştir(178).

Bizim çalışmamızda sesamol için % 0,8 tween 80' i çözücü olarak kullandık ve yukarıda anlatılan çalışmaya(178) benzer şekilde tween 80 solüsyonunun etkisini kontrol etmek amaçlı kontrol grubundan ayrı bir grup daha oluşturduk. Erdurmuş ve ark. gibi biz de %0,8 tween 80 solüsyonunun korneal neovaskülarizasyona etkisinin olmadığını gösterdik.

Literatürde sesamolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini araştıran çalışmalara bakacak olursak; Hsu ve ark. strese bağlı gastrik ülser yaratılan sıçanlarda 0.1, 0.3, 1mg/kg dozlarında oral sesamol ülser oluşumundan otuz dakika önce verilmiş. Sesamol verilen bütün gruplarda kontrol grubuna göre gastrik ülserin ve hemorajinin daha az olduğu bildirilmiş (142). Ayrıca sesamolün mukozada TNF- α , IL-1, IL-6 düzeylerini, NF- κ B aktivitesini azalttığı gösterilmiş. Bu çalışmanın sonucuna göre sesamolün gastrik ülseri azaltmasının sebebi inflamatuvar sitokinleri azaltması ve NF- κ B yolunu inhibe etmesi olduğu düşünülmüş(142).

Adenomatosis poliposis koli geninde defekt olan sıçanlarla yapılan bir çalışmada tedavi grubundaki sıçanlara 500 ppm (mg/litre) sesamol 8 hafta boyunca verilmiş.15 haftalık takip sonucunda sesamolün kontrol grubuna göre ince bağırsağın orta kesiminde polip sayısını % 66,1 oranında azalttığı gösterilmiş (179). Ayrıca polip parçalarındaki örneklerde sesamolün kontrol grubuna göre siklooksijenaz 2 (COX-2), sistosolik prostoglandin E2 sentaz mRNA düzeyini azalttığı gösterilmiş. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre sesamolün antikarsinojenik etkilere sahip olduğu, ve COX-2 inhibisyonu yapmasının kanser kemoprevensiyonunda kullanışlı bir ajan olabileceği gösterilmiş (179).

Chang CC ve ark insan plateletleri üzerinde yaptıkları çalışmada sesamolün cAMP-PKA sinyal yolunu aktifleyip trombositlerdeki NF- κ B yolunu inhibe ederek hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu ve trombosit agregasyonunu inhibe ettiğini göstermişler (180). Bu çalışmada trombositlerin sadece hemostazda değil inflamasyonda ve metastazda aktif rol oynadığı belirtilmiş. Bu nedenle trombosit

aktivitesinin NF- κ B yoluyla engellenmesinin kanser ve çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde çok önemli bir etkiye sahip olabileceği vurgulanmış (180).

Literatürde korneal neovaskülarizasyon, sesamol anahtar kelimelerini kullanarak tarayabildiğimiz kaynaklarda korneal neovaskülarizasyonda sesamolün etkisine dair bir çalışmaya rastlayamadık. Korneal neovaskülarizasyon için sesamolün topikal yada subkonjonktival olarak kullanımına da rastlayamadık.

Bizim çalışmamızda kuvvetli bir antioksidan ve antiinflamatuvar olan sesamol (17,18) topikal ve subkonjonktival olarak uygulanmış ve kontrol grubuna göre iki grubun da neovaskülarizasyonu azaltmada etkili olduğu görülmüş, topikal uygulamanın subkonjonktival uygulamaya göre daha üstün olduğu görülmüştür. Histolojik incelemede, inflamasyon, fibroblast aktivitesi, vaskülarizasyon açısından iki grup kıyaslandığında topikal sesamolün üç parametrede de subkonjonktival yolla uygulamadan daha üstün olduğu görülmüştür. Hatta subkonjonktival uygulamanın kontrol grubuna göre histolojik parametreler açısından farklılığı gösterilememiştir. Bu durum topikal ve subkonjonktival uygulamanın daha önceden yapılmış bir doz çalışmasının olmaması sebebiyle subkonjonktival uygulamanın uygun dozlarda verilememiş olmasından ya da sesamolün subkonjonktival uygulamayla uygun şekilde dokulara etki edememesinden kaynaklanabilir.

Korneal Neovaskülarizasyonda sadece VEGF değil daha başka bir çok büyüme faktörü rol oynamaktadır(174). Bu nedenle bu faktörleri hedef alan ajanlarla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan biri Sener E nin VEGF ve EGF inhibitörlerini kıyasladığı çalışmadır (170). Bu çalışmada 30 adet sıçan kornealarında kimyasal yanık oluşturulduktan sonra 5 gruba ayrılmış. Gruplar bevasizumab, ranibizumab, trastuzumab, regaptanib ve kontrol grubu olarak belirlenmiş. Diğer üç etken VEGF ye etkiliyken trastuzumab epidermal büyüme faktörü reseptör 2 yi hedefleyen ve meme kanseri tedavisinde kullanılan monoklonal bir antikordur (174). Bu çalışmada tedavi gruplarına kimyasal yanık oluşumundan hemen sonra ilaçlar subkonjonktival yolla yapılmış. Çalışma sıçanların sekiz gün takibinin sonunda dijital korneal fotoğrafları çekilerek sonlandırılmış. Bu çalışmaya göre diğer VEGF

inhibitörlerinin yanında trastuzumabın da korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiği ve tedavide kullanılabileceği belirtilmiş (170). Diğer taraftan bir başka çalışmada 0,1 M NaOH ile kimyasal yanık oluşturulan sıçan kornealarına günde bir kez hem topikal hem de intraperitoneal yolla bir immunsupresif olan rapamisin(181) uygulanmış. Sıçanlar 4 hafta boyunca takip edilmiş.Bu çalışma sonucunda korneal neovaskularizasyonun kontrol grubuna göre daha az olduğu ve korneal IL-6, TGF-b düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük bulunduğu bulunmuş. Bu çalışma sonucunda korneal neovaskularizasyonun TGF-b yolu inhibe edilerek azaldığı gösterilmiş(181).

Korneal neovaskularizasyonda anti VEGF ajanların yanında başka ajanların additif kullanılmasına dair çalışmalar mevcuttur. Tunik ve ark.ın çalışmasında subkonjonktival bevasizumab, cetuximab ve bevasizumab + cetuximab tedavilerinin korneal neovaskularizasyon üzerine etkilerini araştırılmış. Cetuximab kimerik EGFR Ig G1 monoklonal antikordur. Cetuximab EGFR reseptörlerini inhibe ederek angiogenezi önler(182). Bu çalışmada 28 sıçanın sağ gözlerinde gümüş nitrat ile kimyasal yanık oluşturulmuş. Hayvanlar dört gruba ayrılmış. Birinci gruba subkonjonktival 0,15 ml serum fizyolojik, ikinci gruba 1,25 mg bevasizumab , üçüncü gruba 5 mg cetuximab , dördüncü gruba ise 1,25 mg bevasizumab+cetuximab verilmiş. Sıçanların sol gözleri kontrol grubu olarak ayrılmış.Tedavi gruplarındaki bütün gözlere 1.,4.,7. günlerde subkonjonktival yolla ilaçlar uygulanmış. Çalışmanın 8. Gününde neovaskularizasyon alanları değerlendirilmiş. Bu değerlendirme Mahoney ve Waterbury nin tarif ettiği neovaskularizasyon derecelendirme yöntemiyle yapılmış (143) . Bevasizumab grubunun kontrol grubuna göre neovaskularizasyonu % 50,8, cetuximab grubunun % 54,3 ve bevasizumab+cetuximab grubunun % 15,8 oranında inhibe ettiği görülmüş. Histolojik incelemelere göre ve bu bulgulara göre subkonjonktival cetuximabın korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiği ama subkonjonktival cetuximab + bevasizumab ın korneal neovaskularizasyona etkisi olmadığı gösterilmiş. Bu durumun fizyolojik antagonizma nedeniyle olmuş olabileceği belirtilmiş(183).

Özdemir Ö. nün çalışmasında sıçanlarda gümüş nitrat ve potasyum nitrat ile kaplanmış çubuklarla korneada kimyasal yanık oluşturulmuş (143). Bu çalışmada subkonjonktival ve topikal bevasizumab uygulamasının yanında TNF- α inhibitörü olan etanercept de tek başına ve bevasizumab ile kombine şekilde topikal ve subkonjonktival olarak uygulanmış. Deneyin birinci gününde ayrı gruplara subkonjonktival bevasizumab 0,05 ml (1,25 mg) dozunda ve etanercept 0,05 ml (1,25 mg) dozunda uygulanmış. Bir başka gruba etanercept (1,25mg) + bevasizumab(1,25 mg) subkonjonktival yolla konjonktivanın farklı yerlerinden uygulanmış. Topikal bevasizumab ve topikal etanercept ve topikal etanercept+ bevasizumab gruplarına ise damlalar 10mg/ml dozlarında günde iki defa hergün uygulanmış. Yedi gün süren tedavi sonrasında korneal neovaskülarizasyonun tüm kornea alanına oranı dijital fotoğraflar üzerinden bir bilgisayar programı ile hesaplanmış. Kontrol grubunun oranı ortalama % 82.42 bulunurken topikal ve subkonjonktival uygulanan etanerceptin korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği ve bu oranların ortalamasının % 62.16 ve % 54.83 olduğu bulunmuş. Subkonjonktival ve topikal bevasizumab gruplarında ise korneal neovaskülarizasyon oranları % 63.00 ve % 43.50 olarak bulunmuş. Topikal ve subkonjonktival bevasizumab+ etanercept gruplarının ortalama korneal neovaskülarizasyon oranının % 19.57 ve 38.16 olduğu bulunmuş. Topikal bevasizumab ile kombine edilen etanercept grubunun korneal neovaskülarizasyonu inhibe etmede en iyi grup olduğu ve elde edilen bu verilere göre etanerceptin tek başına ve bevasizumab ile kombine kullanımının yeni bir tedavi şekli olabileceği vurgulanmış(184).

Bizim çalışmamızda da korneal neovaskülarizasyonun sadece VEGF inhibisyonuyla değil, inflamasyon ve oksidatif stresden kanaklanan diğer neovaskülarizasyon faktörlerinin de inhibisyonuna yönelik olarak anti VEGF etkili bir ajan ile birlikte antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi olan bir ajan olan sesamol birlikte kullanılmıştır.

Çalışmamızda kombine subkonjonktival uygulamada korneal neovaskülarizasyon oranı ortalaması % 41,86 iken subkonjonktival bevasizumab grubunda %35 olarak bulunmuş ve arada istatistiksel açıdan bir fark görülmemiştir.

Topikal bevasizumab grubunda neovaskularizasyon oranı ortalaması % 47,57 olarak bulunmuş iken kombine topikal uygulamada neovaskularizasyon oranı %30,86 olarak bulunmuş ve aradaki farkın anlamlı olduğu ve sesamol+bevasizumab grubunun sadece topikal bevasizumaba üstün olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar Tunik ve arkadaşlarının kombine kullanımın etkisizliğini gösterdikleri çalışmasıyla uyumlu değildir (183). Bunun sebebi çalışmada da belirtildiği üzere kombine kullanılan ajanların birbirleriyle kimyasal antagonizmaya girmiş olması olabilir. Diğer taraftan Özdemir Ö'nün çalışmasında kullanılan kombine tedavi oldukça etkin olarak bulunmuştur (184). Bu yönüyle bu çalışmadaki sonuçlar bizim çalışmamızdan çıkan sonuçlarla uyumludur. Bizim çalışmamızdaki kombine tedavinin etkin olmasının sebebi iki ayrı neovaskularizasyon mekanizmasının inhibe olmasıyla ve kombine edilen bevasizumab ve sesamolün kimyasal olarak birbirlerini negatif yönde etkilememesiyle ilgili olabilir.

Çalışmamızın kısıtlılıklarına bakılacak olursa; çalışma 1 haftalık bir periyodu kapsamaktadır ve daha uzun takip süreli yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Literatürde sesamolün korneal vaskularizasyonda topikal ya da subkonjonktival uygulaması için herhangi bir doz çalışması yoktur. Bu çalışmada topikal ve subkonjonktival uygulama yapılmış, oral ve intraperitoneal yolla uygulama yapılmamıştır. Ayrıca IL- 1, IL -6 ,TNF- α gibi enflamasyon göstergeleri bu çalışmada çalışılmamıştır.

Halen aktif olarak büyüyen ya da yerleşmiş korneal neovaskularizasyonda henüz ideal anti-anjiyogenik tedavi bulunamamıştır ve araştırmalar devam etmektedir. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler korneal neovaskularizasyon tedavisinde bevasizumabın yanısıra sesamol ya da sesamol ile bevasizumab kombinasyonun kullanılmasının yeni bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çeşitli inflamatuvar, enfeksiyöz, travmatik ve korneal graft reddi ile ilişkili korneal neovaskülarizasyon durumlarının tedavisinde geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda anti-VEGF ajanlar ya da kombine tedaviler kullanılabilir.

Anti-VEGF ajanlar ile antioksidan ve antiinflamatuvar etkili ajanların kombinasyonu dirençli korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etkili bir alternatif olabilir. Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde anti-anjiyogenik özellik gösteren tek bir molekül yerine farklı etki mekanizması gösteren iki ayrı molekülün kullanılması daha iyi sonuçlar verebilir.

Çalışmamızda topikal sesamol ve topikal sesamol+ bevasizumab tedavisi topikal bevasizumab tedavisinden daha iyi sonuçlar vermiştir. Tedavide anti-VEGF ajanların yanına additif olarak eklenen sesamol korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda topikal olarak uygulanan sesamol subkonjonktival olarak uygulanan sesamolden daha etkili bulunmuştur.

Günümüzde anti-VEGF ajanlar endikasyon dışı olarak insanlarda korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bizim bulgularımız da subkonjonktival ve topikal bevasizumab tedavisinin korneal neovaskülarizasyon gelişimini azaltmada etkin bir tedavi olduğunu desteklemektedir. Subkonjonktival ve topikal bevasizumab tedavisini karşılaştırdığımızda ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür.

Antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan sesamol hem topikal hem subkonjonktival yolla korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılmaya aday bir ajandır. Kornea dokusunda sesamol ile yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Korneal neovaskularizasyon tedavisinde sesamolün sistemik, subkonjonktival ve topikal yol gibi veriliş yolları ve farklı dozlarda verilmesi üzerine yapılacak çalışmalar sesamolün etkisini daha çok aydınlatacaktır.

KAYNAKLAR:

1. Nishida T. Basic Science: Cornea, Sclera, and Ocular Adnexa Anatomy, Biochemistry, Physiology, and Biomechanics. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management. China: Elsevier Mosby, 2005: 3-26
2. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. Survey of Ophthalmology 1997; 41: 275-313
3. Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, et al. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review. Ophthalmology 2000; 107: 1829–1835
4. Ishizaki M, Zhu G, Haseba T, et al. Expression of collagen I, smooth muscle aactin, and vimentin during the healing of alkali-burned and lacerated corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34: 3320–3328
5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995; 1: 27-31
6. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. Current Opinion in Ophthalmology 2001; 12: 242–249
7. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, et al. Corneal neovascularization: pathogenesis and inhibition. Cornea 1987; 6: 250–7
8. Yin-Shan Ng, KrillekeD, David T. Shima. VEGF function in vascular pathogenesis. Experimental Cell Research. 2006; 312; 527 – 537
9. Quoc T. Ho, Calvin J. Kuo Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007; 39 ; 1349–1357
10. A Sharma, A Samal, S Narang, A Gutpa, J Ram, A Gupta. Frequency doubled Nd :YAG (532 nm) laser photocoagulation in corneal vascularisation : efficacy and time sequenced changes. Indian J Ophthalmol. 2001;49: 235-240
11. Kyung Jik Lim, Won Ryang Wee, Jin Hak Lee. Treatment of Corneal Neovascularization with Argon Laser. Korean J. Ophthalmol. 1993; 7: 25-27.

12. Yoon KC, You IC, Kang IS, ImSK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol.* 2007; 144: 390-395
13. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 1954-1962
14. Becker MD, Kruse FE, Azzam L, Nobiling R, Reichling J, Völcker HE. In vivo significance of ICAM-1 dependent leukocyte adhesion in early corneal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 612-618.
15. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2545–2552
16. Uy HS, Chan PS, Ang RE. Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with Stevens–Johnson syndrome. *Cornea* 2008; 27: 70–73
17. Joo Yeon Kim, Dong Seong Choi and Mun Yhung Jung "Antiphot-oxidative Activity of Sesamol in Methylene Blue- and Chlorophyll-Sensitized Photo-oxidation of Oil" *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(11): 3460 -3465
18. Chopra K, Tiwari V, Arora V, Kuhad A. 'Sesamol suppresses neuro-inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy.' *J.Pain* 2010;11(10):950-7.
19. Günalp İ. Göz Hastalıkları Temel Gözbilim (1.baskı). Ankara: Antup A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları, 2003: 45
20. Bengisu Ü. Göz Hastalıkları (3.baskı). İstanbul:Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., 1990: 63-84
21. Galloway NR, Amoaku WMK, Galloway PH, Browning AC. *Common Eye Diseases and their Management* (3rd edition). London: Springer-Verlag London Ltd, 1999: 8
22. Özçetin H. Klinik Göz Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri 2003; 4: 62-63.
23. Kanski J.J. *Clinical Ophthalmology* (fifth edition). Oxford: Butterworth Heinemann, 2003: 96
24. Akyol F. Kornea Anatomisi. Türk Oftalmoloji Derneği. Kornea. İstanbul: Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11, 2009: 14
25. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Regard G. Corneal collogens. *Pathol Biol* 2001; 49. 353-363.

26. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4: 671-677.
27. Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. *Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları* 2005; 2: 7-25.
28. Michael K. Smolek and Stephen D. Klyce. Cornea. *Duane's Foundations of Clinical ophthalmology*. 2006 Edition Volume 1 Chapter 8
29. Iwata M, Yagihashi A, Roat MI, Zeevi A, Iwaki Y, Thoft RA. Human leukocyte antigen-class II-positive human corneal epithelial cells activate allogeneic T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 12: 3991-4000
30. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol*. 2003; 51: 5-15
31. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol*. 1994; 78: 401-408
32. Cameron JG. Corneal Reaction to Injury. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005: 115-131
33. Tuli SS, Goldstein M, Schultz GS. Modulation of Corneal Wound Healing. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005: 133-150
34. Lu PC, Ye H, Maede M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40: 20-27.
35. Jester JV, Petrol WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retina Eye Res* 1999;18: 311-356.
36. Honda H, Higuchi OS, Kani K, Ogita Y. Cell movements in a living mammalian tissue: Long-term observation of individual cells in wounded endothelia of cats. *J Morphol* 1982; 25: 174
37. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26:443
38. Dua HS, Forrester JV. Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987; 104: 481-489.
39. İrkeç MK. Gözyaşı tabakasının yapısı, biyokimyası, immünolojisi ve kontakt lensler. *Oftalmoloji* 1994;1:18-20.

40. Philipp W, Göttinger W. Leukocyte adhesion molecules in diseased corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2449-2459.
41. Kaufman HE, Barron AB, McDonald MB, Waltman SR. Corneal trauma. *The Cornea* 1991;22: 599-642.
42. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacol Ther* 1994; 63:265-280.
43. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose, Miller D, Kublin C, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 640-643.
44. Petroustos G, Guimaraes R, Giraud J, Poliques Y. Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1775-1778.
45. Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF. Wound healing. *Principles and practice of ophthalmology* 1980; 381-386.
46. Frangieh G, Hayashi K, Teekhasaene C, Wolf G, Colvin RB, Gibson HK, Kenyon KR. Fibronectin and corneal epithelial wound healing in the vitamin-A deficient rat. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 567-571.
47. Watanabe K, Frangieh G, Reddy CV, Kenyon KR. Effect of fibronectin on corneal epithelial wound healing in the vitamin A-deficient rat. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2159-2162.
48. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 1983; 97: 1653-1657.
49. Wilson SE, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong JW, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 625-637.
50. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992; 153: 1-5.
51. Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC. Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res* 1993; 57: 293-300.
52. Tran MT, Tellaetxe-Isusi M, Elnor V, Strieter RM, Lausch RN, Oakes JE. Proinflammatory cytokines induce RANTES and MCP-1 synthesis in human corneal keratocytes but not corneal epithelial cells. Beta-chemokine synthesis in corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 987-96.

53. Sotozono C. Second injury in the corneal. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 2000; 19: 155-159.,
54. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MaCauley S, Van Setten G, Chegini N. Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994; 8: 184-187.
55. Jones, SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor stimulated cells. *Oncogene* 2000; 19: 5558-5567.
56. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994; 59: 63-72.
57. Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, Trinkaus-Randall. TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Mol Pathol* 2002; 55: 164-176.
58. Chung JH, Fagerholm P. Treatment of rabbit corneal alkali wounds with human epidermal growth factor. *Cornea* 1989; 8: 122-128.
59. Li D, Tseng SC. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997; 172: 361-372.
60. Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, Wilson SE. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res* 1997; 64: 501-504.
61. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989; 86: 802-806.
62. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J. Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res* 1994; 59: 385-392.
63. Paterson CA, Pfister RR. Intraocular pressure changes after alkali burns. *Arch Ophthalmol.* 1974;91:211-8
64. Cameron JD. Pathologic Principles of Ophthalmic Disease. In: Tasman W, Jaeger E. A. *Duane's Ophthalmology* (2007 Edition). Lippincott Williams & Wilkins, (CD-ROM edition) 2007.
65. Sehu KW, William R L. *Ophthalmic Pathology: An Illustrated Guide for Clinicians*. Haryana: Blackwell Publishing Ltd, 2005: 61
66. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989; 3: 141-157

67. Cameron JD. Surgical and Nonsurgical Trauma. In: Tasman W, Jaeger EA. Duane's Ophthalmology (2007 Edition). Lippincott Williams & Wilkins, (CDROM edition) 2007.
68. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 117–123.
69. Burger PC, Chandler DB. Experimental corneal neovascularization; biomicroscopic, angiographic and morphologic correlation. *Cornea* 4;35-41,1985
70. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.
71. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:171-178.
72. Cohen MM. Jr. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas and vascular malformations. *Am J Med Genet* 2002;108:265-274
73. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, Goren MB, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea* 1995;14:604- 609.
74. Denekamp J. Vasculature as a target for tumor therapy. In: Hammerson F, Hudlicka O, eds. *Progress in Applied Microcirculation*. Basel: Karger, 1984; 28.
75. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674.
76. Zengin N, Okudan S, Gündüz K. Oküler neovaskularizasyonunda büyüme faktörlerinin rolü. *Oftalmoloji* 1993; 3: 385-389
77. Cursiefen C, Cao J, Chen L et al. Inhibition of lymphangiogenesis and hemangiogenesis after normal risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2666-73.
78. Chan CK, Pham LN, Zhou J, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. Differential expression of pro and anti angiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Lab Invest* 2005;85:721-733.
79. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Intern Rev Immunol* 2002; 21: 33-49
80. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983–985
81. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular

endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cellular Biochem* 1991; 47; 211–218

82. Shin, Y. J., J. S. Choi, et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats. *J Neuroimmunol* 2010; 229 (1-2): 81-90

83. Ishida S, Usui T, Yamashiro T, Kaji Y, Ahmed E. VEGF164 Is Proinflammatory in the Diabetic Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44 :2155–2162

84. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029–1039

85. Aiello LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: 113–119

86. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 1996;271:3877-3883.

87. Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6952-6957.

88. Levy A. P., Levy N. S. Transcriptional regulation of rat endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1995;270;13333-13340

89. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989–991

90. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1579–1586

91. Zhang SX, Ma J. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* 2007; 26: 1–37

92. Kenyon BM, Voest EV, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1625-32

93. Maybodi M, Harvey HD, Williams JM, Pepose JS, Fleming TP. Vascular endothelial growth factor is expressed in cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1139

94. Li CH, McConnell A, Garcia J, Hernandez E, Huang AJ. Expression of vascular endothelial growth factor in rabbit ocular surface epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 863
95. Cogan DG. Corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962;1:253-261.
96. Hayahi T, Matsuoko K, Saitoh M, Takeda S, Kimura M. Influence of α -tumor necrosis factor and β -interleukin-1 on production of angiogenetic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J. Obstet. Gynaecol Res* 2006; 32:15–22.
97. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seiich Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48: 3545-3550.
98. Leilani L. Santos and Eric F. Morand. The role of macrophage migration inhibitory factor in the inflammatory immune response and rheumatoid arthritis. *Wien Med Wochenschr* 2006;156: 11–18.
99. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990, 31: 323-333.
100. Rober M, Steven L. Interleukin-8; a corneal factor that induced neovascularization. *Am J Pathology* 1992;141:1279-1284
101. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285: 245-248.
102. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994, 79: 315-328.
103. Shin SH, Kim JC, Chang SI, Lee H, Chung SI. Recombinant kringle 1-3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 2000; 19: 212-217.
104. Cursiefen C, Masli S, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1117-1124.
105. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2517-2524.

106. Lee P, Wang CC. Ocular neovascularization; an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998;48:245-269.
107. Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81: 439-452.
108. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-686.
109. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9:267-285.
110. Volker HJ. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aus N Z J Ophthalmol* 1987;15;11-18
111. Centifanto YM, Yamaguchi T. Ocular disease pattern induced by Herpes simplex virus is genetically determined by a specific region of Viral DNA. *J Exp Med* 1982;155;475-489
112. Power WJ, Tugal-Tutkun I. Long term follow up of patients with atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1998;105;637-642.
113. Lopez JS, Price FW, Whitcup SM et al. Immunohistochemistry of terrien's and Mooren's corneal degeneration. *Arch Ophthalmol*. 1991;109;988-992.
114. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. III. studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Am J Pathol*. 1976;82;157-170.
115. Kremer I, Cohen EJ, Eagle RC Jr, Udell I, Laibson PR. Histopathologic evaluation of stromal inflammation in acanthamoeba keratitis. *CLAO J* 1994;20;45-48.
116. Kim TI, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008; 27: 349–352
117. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI. The effect of topical Bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology* 2008; 115: 33–38
118. Campochiaro PA.. Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 ;47(2):462-74.
119. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Michels S, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age

related macular degeneration: twenty-four-week results of an 65 uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* . 2006;113(11):2002.e1-12.

120. Friedlander SM, Welch RM. Vanishing disc neovascularization following intravitreal bevacizumab (avastin) injection. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(9):1365

121. Beyon SH, Kwon YA, Oh HS, Kim M, Kwon OW. Short-term results of intravitreal bevacizumab for macular edema with retinal vein obstruction and diabetic macular edema. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007 ;23(4):387-94

122. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernandez-Rojas ML, Salazar N, Chan RV. Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina* . 2008 ;28(3 Suppl):S19-25.

123. Ehlers JP, Spirn MJ, Lam A, Sivali, ngam A, Samuel MA, Tasman W. Combination intravitreal bevacizumab/panretinal photocoagulation versus panretinal photocoagulation alone in the treatment of neovascular glaucoma. *Retina* 2008 ;28(5):696-702.

124. Yazdani S, Hendi K, Pakravan M.. Intravitreal bevacizumab (Avastin) injection for neovascular glaucoma. *J Glaucoma*. 2007 ;16(5):437-9.

125. Luiz F.M. , Rubens Belfort Jr. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2007; 79(3): 389-394

126. Erdurmus M , Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007; 245:1577–1579

127. Felix Bock, Yanyan König , Friedrich Kruse, Martin Baier, Claus Cursiefen. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 246:281–284

128. Papathanassiou M, Theodosiadis PG, Vasilios S, Rouvas A, Bourboulis EJ, and Vergados DIA. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal Model. *Am J Ophthalmol*. 2008;145:424 – 431

129. Irit Bahar, Igor Kaiserman, McAllum P, Franzco MB, Rootman D and Slomovic A. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008;27:142–147

130. Hürmeriç V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O and H. Durukan A. Effect of Subconjunctival Bevacizumab (Avastin) on Experimental Corneal Neovascularization in Guinea Pigs. *Cornea* 2008;27:357–362

131. Han YS, Lee JE, Jung JW, Lee JS. Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 ; 247(4):541-8.

132. Jan KC, Ho CT, Hwang LS. Bioavailability and tissue distribution of sesamol in rat. *J Agric Food Chem* 2008;56:7032–7.
133. Fukuda Y, Nagata M, Osawa T, Namiki M. Contribution of lignan analogues to antioxidative activity of refined unroasted sesame seed oil. *J Am Oil Chem Soc* 1986;63:1027–31.
134. Kaur IP, Saini A. Sesamol exhibits antimutagenic activity against oxygen species mediated mutagenicity. *Mutat Res* 2000;470:71–6.
135. Kapadia GJ, Azuine MA, Tokuda H, Takasaki M, Mukainaka T, Konoshima T, et al. Chemopreventive effect of resveratrol, sesamol, sesame oil and sunflower oil in the Epstein–Barr virus early antigen activation assay and the mouse skin twostage carcinogenesis. *Pharmacol Res* 2002;45:499–505.
136. Sharma S, Kaur IP. Development and evaluation of sesamol as an antiaging agent. *Int J Dermatol* 2006;45:200–8.
137. Jacklin A, Ratledge C, Welham K, Bilko D, Newton CJ. The sesame seed oil constituent, sesamol, induces growth arrest and apoptosis of cancer and cardiovascular cells. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:374–80.
138. Chen PR, Lee CC, Chang H, Tsai CE. Sesamol regulates plasminogen activator gene expression in cultured endothelial cells: a potential effect on the fibrinolytic system. *J Nutr Biochem* 2005;16:59–64.
139. Chen PR, Tsai CE, Chang H, Liu TL, Lee CC. Sesamol induces nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Lipids* 2005;40:955–61.
140. D.-Z. Hsu, P.-Y. Chu, Y.-H. Li, and M.-Y. Liu, “Sesamol attenuates diclofenac-induced acute gastric mucosal injury via its cyclooxygenase-independent antioxidative effect in rats. *Shock*. , 2008;30:456–462.
141. Shenoy RR, Sudheendra AT, Nayak PG, Paul P, Kutty NG, Rao CM: Normal and delayed wound healing is improved by sesamol, an active constituent of *Sesamum indicum* (L.) in albino rats. *J Ethnopharmacol*, 2011;133,608–612.
142. Hsu DZ, Chen YW, Chu PY, Periasamy S and Liu MY. ‘Protective Effect of 3,4-Methylenedioxyphenol (Sesamol) on Stress-Related Mucosal Disease in Rats.’ *Biomed Res Int*. 2013;2013:481827. doi: 10.1155/2013/481827.
143. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985; 4:531–535.
144. B. K. Ambati, E. Patterson, P. Jani et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *The British Journal of Ophthalmology*, 2007; 91:505–508.

145. F. Bock, J. Onderka, T. Dietrich, B. Bachmann, B. Pytowski, and C. Cursiefen. Blockade of VEGFR3-signalling specifically inhibits lymphangiogenesis in inflammatory corneal neovascularisation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2008; 246:115–119.
146. C. Cursiefen. Immune privilege and angiogenic privilege of the Cornea. *Chemical Immunology and Allergy*. 2007; 92:50–57.
147. C. Cursiefen and F. Kruse. New aspects of angiogenesis in the Cornea. *Essentials in Ophthalmology*. 2006; 76:83–99.
148. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by Rapamycin. *Exp Mol Med* 2006; 38: 173–179
149. Lavie G, Mandel M, Hazan S et al. Anti angiogenic activities of hypericin in vivo. Potential for ophthalmologic applications. *Angiogenesis* 2005; 8: 35–42
150. Clark AF, Wilson K, de Kater AW, Allingham RR, McCartney MD. Dexamethasone-induced ocular hypertension in perfusion-cultured human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995; 36:478–489.
151. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2514–2522
152. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, et al. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1994; 8: 961–5
153. Tolentino M. Systemic and ocular safety of intravitreal anti-VEGF therapies for ocular neovascular disease. *Surv Ophthalmol*. 2011; 56:95–113.
154. Shree Kurup, Julie Lew, Gordon Byrnes, Steven Yeh, Robert Nussenblatt and Grace Levy-Clarke. Therapeutic efficacy of intravitreal bevacizumab on posterior uveitis complicated by neovascularization. *Acta Ophthalmol*. 2009; 87: 349–352
155. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. A Phase 2 Randomized Clinical Trial of Intravitreal Bevacizumab for Diabetic Macular Edema Diabetic Retinopathy Clinical Research Network *Ophthalmology*. 2007 ; 114(10): 1860–1867.
156. Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, Yazdchi T, Sedaghat A, Noori F. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophtalmol*. 2007; 35:745–8
157. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(6): 804–7

158. Hürmeriç V, Erdurman C F, Mumcuoğlu T, et al. Deneysel kornea neovaskularizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanip sodyum enjeksiyonunun etkinliğinin karşılaştırılması. *Türk J Ophthalmol.* 2009;39:348-53.
159. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125:834–6.
160. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247:1375-82.
161. Dastjerdi MH, Al-Arfaj KM, Nallasamy N, Hamrah P, Jurkunas UV, Pineda R, Langstone DP. Et al. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study. *Arch Ophthalmol.* 2009; 127:381–9.
162. Chu HS, Hu FR, Yang CM, et al. Subconjunctival injection of bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization associated with lipid deposition. *Cornea.* 2011; 30:60–6.
163. You IC, Kang IS, Lee SH, Yoon KC. Therapeutic effect of subconjunctival injection of bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2009;87:653-8.
164. Bock F, König Y, Kruse F, et al. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008; 246:281–4.
165. Habot-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, Moisseiev J, Rosner M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal Neovascularization. *Acta Ophthalmol* 2010; 88:862-7.
166. Dastjerdi MH, Saban DR, Okanobo A, et al. Effects of topical and subconjunctival bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:2411–7.
167. Hashemian MN, Z-Mehrjardi H, Moghimi S, et al. Prevention of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with its topical form in experimental rats. *Ophthalmic Res.* 2011; 46:50–54.
168. Rocher N, Behar-Cohen F, Pournaras JA, et al. Effects of rat anti-VEGF antibody in a rat model of corneal graft rejection by topical and subconjunctival routes. *Mol Vis.* 2011; 17:104–12.
169. Clark ER, Hirschler WJ, Kirby-Smith HT, Rex RO, Smith JH. General observations on the ingrowth of new blood vessels into standardized chambers in the rabbit ear, and the subsequent changes in the newly grown vessels over a period of months. *Anat Rec* 1931; 50: 129-168.

170. Şener E. Deneysel korneal neovaskularizasyon oluşturulan sıçan modelinde subkonjonktival uygulanan EGF ve VEGF inhibitörlerinin neovaskularizasyona etkisi. Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, 2009.
171. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res* 2009; 34(2): 85-91.
172. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239–247.
173. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649–683.
174. Carla Costa, Joaço Incio, Raquel Soares. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*. 2007 :10:149–166
175. Kubota M, Shimmura S, Kubota S, Miyashita H, Kato N, Noda K, Ozawa Y, et al. Hydrogen and N-Acetyl-L-Cysteine Rescue Oxidative Stress-Induced Angiogenesis in a Mouse Corneal Alkali-Burn Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011;52:427-433
176. Lee MY, Chung SK. Treatment of Corneal Neovascularization by Topical Application of Ascorbic Acid in the Rabbit Model. *Cornea* 2012;31:1165–1169.
177. Koh CH, Lee HS, Chung SK. Effect of Topical Epigallocatechin Gallate on Corneal Neovascularization in Rabbits. *Cornea* 2014;33:527–532.
178. Erdurmuş M, Yagci R, Yilmaz B, Hepsen IF, Turkmen C, Aydın B, Karadağ R. Inhibitory Effects of Topical Thymoquinone on Corneal Neovascularization. *Cornea* 2007;26:715–719
179. Shimizu S, Fujii G, Takahashi M, Nakanishi R, Komiya M, Shimura M, Noma N, et al. Sesamol suppresses cyclooxygenase_2 transcriptional activity in colon cancer cells and modifies intestinal polyp development in ApcMin/+ mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2014;54:95–101.
180. Chang CC, Lu WJ, Ong ET, Chiang CW, Lin SC, Huang SY, Sheu JR. A novel role of sesamol in inhibiting NF-kB mediated signaling in platelet activation. *Journal of Biomedical Science*. 2011;18:93:1-10
181. Shin YJ, Hyon JY, Choi WS, Yi K, Chung ES, Chung TY, Wee WR. Chemical Injury-Induced Corneal Opacity and Neovascularization Reduced by Rapamycin via TGF-b1/ERK Pathways Regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:7:4452-58.
182. Blick SK, Scott LJ. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs*. 2007;67(17):2585-607.

183. Tunik S, Nergiz Y, Keklikci U, Akkus M. The subconjunctival use of cetuximab and bevacizumab in inhibition of corneal angiogenesis. 2012;250:1161–1167.

184.Özdemir Ö. Deneysel Korneal Neovaskularizasyon Oluşturulan Sıçan Modelinde Topikal ve Subkonjonktival Uygulanan Bevasizumab ve Etanerceptin Neovaskularizasyona Etkisi. Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, 2010.