



T.C.

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

**DENEYSEL SIÇAN KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU
MODELİNDE DOVİTİNİB VE BEVACİZUMABIN
NEOVASKÜLARİZASYON AZALTICI ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. BERNA ŞAHAN

Tez Danışmanı:

PROF. DR. B. ILGAZ YALVAÇ

İstanbul, 2016

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, sürdürülmesi ve tamamlanması sürecinde bana her türlü desteği veren tez danışmanı hocalarım Prof. Dr. B. Ilgaz Yalvaç ve Prof. Dr. Ferda Çiftçi başta olmak üzere uzmanlık eğitimim boyunca iyi bir göz hekimi olarak yetişmem için emek veren, engin bilgi ve tecrübelerini esirgmeden benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Sinan Tatlıpınar'a, Prof. Dr. Şule Ziylan'a, Prof. Dr. R. Beril Küçümen'e, Yrd. Doç. Dr. Muhsin Altunsoy'a, Yrd. Doç. Dr. Vildan Öztürk'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bayram Yılmaz'a, Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Aylin Yaba Uçar'a ve doktora öğrencileri Siğnem Eyüboğlu ve Ecem Yıldırım'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve her türlü fedakarlığı zevkle yapan annem başta olmak üzere tüm aileme ve en büyük desteğim sevgili eşim Dr. Murat Şahan'a yürekten teşekkür ederim.

Dr. Berna Şahan

İstanbul, 2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	2
İÇİNDEKİLER	3
KISALTMALAR	5
TABLO DİZİNİ	6
ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ	7
1. GİRİŞ ve AMAÇ	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. KORNEA	11
2.1.1. KORNEA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	11
2.1.1.1. Korneanın Yapısı ve Tabakaları	11
2.1.1.1.1. Kornea Epiteli	11
2.1.1.1.2. Bowman Tabakası	12
2.1.1.1.3. Kornea Stroması	12
2.1.1.1.4. Descemet Membranı	12
2.1.1.1.5. Kornea Endoteli	12
2.1.1.2. Kornea Vaskülarizasyonu	13
2.1.2. KORNEA EMBRİYOLOJİSİ	13
2.2. KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU	14
2.2.1. Kornea Neovaskülarizasyonu (KNV) Epidemiyolojisi ve Etyolojisi	14
2.2.2. Kornea Neovaskülarizasyonu Mekanizması	15
2.2.3. Kornea Neovaskülarizasyonu Yerleşimi	16
2.2.4. Kornea Neovaskülarizasyonu Nedenleri	17
2.3. ANJİYOGENEZ	18
2.3.1. ANJİYOGENİK FAKTÖRLER	18
2.3.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	18
2.3.1.1.1. VEGF Tipleri	19
2.3.1.1.2. VEGF Reseptörleri (VEGFR)	20
2.3.1.1.3. VEGF Salgılanması	21
2.3.1.1.4. VEGF Fonksiyonları	22
2.3.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	22
2.3.1.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	23
2.4. KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU TEDAVİSİ	23
2.4.1. MEDİKAL TEDAVİ	23

2.4.2.	LAZER TEDAVİSİ	24
2.4.3.	CERRAHİ TEDAVİ	25
2.4.4.	ANTİ-VEGF STRATEJİLER	25
3.	GEREÇ-YÖNTEM	27
3.1.	DENEY HAYVANLARI	27
3.2.	KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU MODELİNİN VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	27
3.3.	KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	30
3.3.1.	Ön Segment Muayenesi ve Neovaskülarizasyon Alanı Yüzdesinin Hesaplanması	30
3.3.2.	Doku Takibi ve Kesitlerin Boyanması	30
3.4.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	31
4.	BULGULAR	32
4.1.	KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	32
4.2.	HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	40
5.	TARTIŞMA	48
	ÖZET	56
	ABSTRACT	57
	KAYNAKLAR	58

KISALTMALAR

KNV.....: Kornea neovaskularizasyonu

VEGF.....: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR.....: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

FGFR.....: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü

PDGFR.....: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü

FGF.....: Fibroblast büyüme faktörü

TGF-alfa.....: Transforme edici büyüme faktörü alfa

TNF-alfa.....: Tümör nekroz faktörü alfa

IL.....: İnterlökin

VPF.....: Vasküler permeabilite faktörü

HIF-1.....: Hipoksiyle indüklenen faktör -1

bFGF.....: Temel fibroblast büyüme faktörü

AgNO₃.....: Gümüş nitrat

FDA.....: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

YÜDHEK.....: Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu

YÜDETAM...: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi

DMSO.....: Dimetilsülfoksit

ERK.....: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Korneadaki damarların yerleşim yerine göre değişen özellikleri anlatılmaktadır.
(sayfa 16)

Tablo 2: Deney gruplarına uygulanan işlemler, tedaviler ve uygulama süreleri özetlenmiştir.
(sayfa 29)

Tablo 3: Tüm gruptaki kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri ve istatistiksel değerler gösterilmiştir. (sayfa 33)



ŞEKİL ve RESİM DİZİNİ

Sekil 1: Kornea neovaskularizasyonuna neden olabilen hastalıklar anlatılmaktadır. Abdelfettah ve arkadaşlarının⁴⁸ çalışmasından modifiye edilmiştir. (sayfa 17)

Sekil 2: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerinin yapısı anlatılmaktadır. (sayfa 20)

Sekil 3: Hemanjiyogenez ve lenfanjiyogenezde makrofajların ve vasküler endotelial büyüme faktörünün rolü anlatılmaktadır. Cursifien ve arkadaşlarının⁷³ çalışmasından modifiye edilmiştir. (sayfa 21)

Sekil 4: Deney sürecince uygulanan işlemler şematize edilmiştir. (sayfa 30)

Sekil 5: Sadece koterizasyon yapılan (Grup 1), DMSO uygulanan (Grup 2), bevacizumab (5 mg/ml) uygulanan (Grup 3), dovitinib uygulanan (Grup 4) ve bevacizumab (5 mg/ml) + dovitinib (5 mg/ml) uygulanan gözlerde 14. günde çekilen fotoğraflardaki kornea neovaskularizasyonu yüzdeleri (%). (sayfa 33)

Resim 1: Korneada neovaskularizasyonu modeli oluşturulması esnasında kornea santraline gümüş nitrat çubuğu uygulaması görünümü (sayfa 28)

Resim 2: Kornea neovaskularizasyonu modeli oluşturulması esnasında gümüş nitrat çubuğu korneada 10 sn bekletildikten hemen sonraki görünüm (sayfa 28)

Resim 3: Hiçbir işlem uygulanmamış sol gözden 14. günde çekilen fotoğrafta damarsız kornea görünümü (sayfa 34)

Resim 4: Kontrol grubunda (hiçbir kimyasal madde uygulanmayan grup) bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu (sayfa 35)

Resim 5: DMSO grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu (sayfa 36)

Resim 6: Bevacizumab grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu (sayfa 37)

Resim 7: Dovitinib grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu (sayfa 38)

Resim 8: Bevacizumab + dovitinib grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu (sayfa 39)

Resim 9: Herhangi bir işlem yapılmadan alınan gözün (küçük resim) ve gözün korneasının tabakaları görülmektedir. **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X. (sayfa 40)

Resim 10: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün beklenen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X. (sayfa 41)

Resim 11: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca DMSO verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X. (sayfa 42)

Resim 12: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca Bevacizumab (5 mg/ml) verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X. (sayfa 43)

Resim 13: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca Dovitinib (5 mg/ml) verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X. (sayfa 44)

Resim 14: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca Bevacizumab (5 mg/ml) ve dovitinib (5 mg/ml) birlikte verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X. (sayfa 45)

Resim 15: Tüm grupların kornea tabakalarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. **A,** Hiçbir işlem yapılmayan Kontrol grubu; **B,** Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün beklenen 1. Grup (GR 1); **C,** DMSO verilen 2. Grup (GR 2); **D,** Bevacizumab (5 mg/ml) verilen 3. Grup (GR 3); **E,** Dovitinib (5 mg/ml) verilen 4. Grup (GR 4); **F,** Bevacizumab (5 mg/ml) ve dovitinib (5 mg/ml) birlikte verilen 5. grup (GR 5). Büyütme 40X. (sayfa 46)

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kornea neovaskularizasyonu (KNV) ilk olarak 1787 yılında tanımlanmıştır.¹ Kontakt lens kullanımı, kapak inflamasyonu, geçirilmiş cerrahi, ön segment neovaskularizasyonu, travma, trikiyazis ve herpes simpleks infeksiyonu gibi bir çok nedenin kornea neovaskularizasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Korneada ortaya çıkan kronik inflamasyon, persistan epitelyal hasar, stromal skar ve neovaskularizasyon görme keskinliğinde azalmaya ve yaşam standartlarında düşmeye neden olmaktadır.² İleri düzeyde neovaskularizasyonu olan hastalara keratoplasti uygulanması gerekmektedir. Neovaskularizasyon gelişmiş kornealara uygulanan keratoplastinin prognozu kötüdür.

Neovaskularizasyonu azaltmak için öncelikle neovaskularizasyon mekanizmaları araştırılmış ve neovaskularizasyonlu kornealarda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) ve reseptörlerinin normal kornealardan daha yüksek konsantrasyonda mevcut olduğunu görülmüştür.³ Bevacizumab (Altuzan) VEGF molekülüne karşı sentezlenmiş uzun etkili bir antikordur ve metastik kolorektal kanserde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (Food and Drug Admisnistration (FDA)) onayı almıştır. Deneysel kornea neovaskularizasyon modelinde yapılan çalışmalarda bevacizumab tedavisi ile neovaskularizasyonda ve oküler doku VEGF düzeylerinde ciddi bir azalma olduğu gösterilmiştir.⁴⁻⁸

Dovitinib, çok hedefli tirozin kinaz inhibitörüdür ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörlerinin Reseptörlerinin (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)) yanı sıra anjiyogenezde rol oynayan fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörlerini (Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)) de inhibe etmektedir.^{9,10} Son yıllarda yapılan çalışmalarda deneysel kornea neovaskularizasyon modellerinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinin, neovaskularizasyonu anlamlı bir şekilde azalttığı ve bazılarının bu etkilerinin bevacizumaba göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.¹¹⁻¹³ Bu çalışmalarda kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri VEGFR ve PDGFR'yi inhibe etmektedirler. Dovitinib ise bunlara ek olarak anjiyogenezde rol oynayan diğer bir büyüme faktörü olan FGFR'yi de inhibe etmektedir. Bu etkisi dolayısıyla anjiyogenezi etkili bir biçimde inhibe edeceği düşünülebilir.

Yapılan literatür taramasında dovitinib maddesinin kornea neovaskularizasyonu üzerindeki neovaskularizasyon azaltıcı etkisini bevacizumab ile karşılaştırmalı olarak araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmamızda, kornea neovaskularizasyonunda dovitinib ve bevacizumab kullanımının farklı sonuçları olabileceğini hipotez ettik. Bu nedenle her iki ilacın kornea neovaskularizasyonundaki etkisini karşılaştırmalı olarak ortaya koymayı hedefledik.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.KORNEA

2.1.1.KORNEA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

2.1.1.1.Korneanın Yapısı ve Tabakaları

Kornea ortalama 12.6 mm horizontal ve 11.7 mm vertikal çapta saydam ve damar içermeyen bir dokudur. Korneanın kırıcılık gücü 43,25 Diyoptridir ve bu kırma gücünün çoğu gözyaşı-hava yüzeyinden kaynaklanır. Kornea kalınlığı korneanın hidrasyonu ile yakından ilişkilidir. Sağlıklı bir korneanın kalınlığı midperiferde ortalama 560 ± 80 mikron iken; santralde 500-520 mikrona kadar düşer.¹⁴

Korneanın sensöryel sinirleri, uzun siliyer sinirlerden kaynaklanır ve subepitelyal tabakada sinir pleksusunu oluşturur.¹⁵ Kornea, aköz hümörden glukoz ve gözyaşından oksijen almaktadır. Aynı zamanda limbal bölgedeki dolaşımdan da oksijen almaktadır.

Kornea önden arkaya doğru 5 katmandan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla kornea epiteli, Bowman tabakası, kornea stroması, Descemet membranı ve kornea endotelidir.

2.1.1.1.1.Kornea Epiteli

Kornea epiteli dış çevreye karşı bariyer görevi görmektedir ve non-keratinize çok katlı yassı epitel yapısındadır.^{16,17} Hücreler, aralarında hiç boşluk olmayacak şekilde dizilmişlerdir ve zonula okludensler adı verilen bağlantılar sıkı bir şekilde birbirlerine tutunarak su geçirgenliğine karşı bariyer görevi görmektedir. Bu bağlantılar, gözyaşı sıvısının stromaya penetrasyonunu engeller.¹⁸

Epitel hücreleri yapı yönünden 3 gruba ayrılır. Yüzeysel hücreler, değişik şekil ve büyüklükte poligonal hücrelerden oluşmaktadır. Yüzeysel tabakanın 2-3 sıra altında kanat hücreler yer almaktadır.^{19,20} Epitelin en derin tabakasında ise bazal tabaka bulunmaktadır ve silindirik hücreler (bazal hücreler) bu tabakada yer almaktadır.²¹

Epitel hücreleri sürekli yenilenmektedir ve limbusta epitelin yenilenmesine yardımcı olan hücreler yer almaktadır. Bunlar Vogt palizadları adı verilen katlantılar içinde yüzeysel olarak yerleşmiş kök hücrelerdir.

2.1.1.1.2.Bowman Tabakası

Rastgele yayılmış kollajen liflerden oluşan 8-14 mikron kalınlığında aselüler bir tabakadır.²¹ Arka sınırında stroma bulunmaktadır. Descemet membranından farklı olarak bu tabaka yenilenemez ve hasarlandığında skar dokusu oluşur.¹⁸

2.1.1.1.3.Kornea Stroması

Saydam bir kornea için epitel hücrelerinin birbirine sıkıca bağlanması gereklidir. Bunun yanı sıra, stroma hücrelerinin ve makromoleküllerin düzgün bir şekilde dizilmiş olması bu saydamlığı sağlar.

Kornea kalınlığının %90'ını stroma oluşturmaktadır.²¹ Stroma keratosit, ara madde ve kollajen lamellerden oluşmaktadır. Keratositler yassı fibroblastlardır ve kollajen lamelleri arasında bulunurlar. Kollajen fibriller, korneanın ön 1/3'lük kısmında oblik ve arka 2/3'lük kısmında ise paralel olarak dizilmiştir. Ara madde mukoprotein ve glikoproteinden oluşur ve boşlukları doldururlar.

Endotel, besinlerin stromaya geçişini sağlar ve artık maddeleri stromadan uzaklaştırır. Gözyaşı tabakası, stromanın uygun hidrasyonu için bariyer görevi yapmaktadır.

2.1.1.1.4.Descemet Membranı

Endotelden köken alan, arka stroma ile endotel arasında yer alan bir membrandır. Kornea endotelinin bazal membranıdır. Yaşam boyunca kalınlığı artar. Doğumda 3-4 mikron iken, yetişkinde kalınlığı 10-12 mikrona ulaşır.¹⁸ Uterin hayatta gelişmeye başlayan “ön çizgili zon” ve yaşam boyu oluşan “arka çizgisiz zon” olmak üzere iki zondan oluşmaktadır. Kornea periferindeki Descemet membranı çıkıntılarına Hassal-Henle cisimcikleri denilmektedir.¹⁸

2.1.1.1.5. Kornea Endoteli

Hekzagonal şekilli parmaklı uzantılara sahip hücrelerin, tek sıra mozaik paternde dizilmesi ile oluşur. Genç endotel hücreleri büyük nükleus ve belirgin mitokondriye sahiptirler. Bu organeller, stromanın geçirgenliğinin korunmasında önemlidir. Hücreler arasındaki sıkı bağlantılar (tight junction) ve aralıklı bağlantılar (gap junction) bariyer fonksiyonunda rol oynamaktadır.¹⁸ Endotelde aktif Na-K ATPaz pompa mekanizması vardır.

Bu pompa sayesinde düşük ozmotik basınca sahip stromadan, hiperozmotik aköz hümöre doğru sıvı akışı mevcuttur.²²

Speküler mikroskopu ile sağlıklı bir korneada ölçüm yapıldığında, her milimetrekarede ortalama 2.500 hücre bulunmaktadır.²³ Endotel hücrelerinde sayısı yaş ile beraber giderek azalır. Özellikle travma ve cerrahiye bağlı olarak gelişen hücre kaybı ile komşu hücreler oluşan boşlukları kapatmak için genişler ve bu bölgelere göç ederler.^{20,24}

2.1.1.2.Kornea vaskülarizasyonu

Kornea, avasküler bir dokudur ve lenfatik drenajı da yoktur. Kornea, oftalmik arterin dalları olan siliyer arterlerin oluşturduğu, limbal bölgede yer alan perikorneal vasküler pleksustan beslenir. KNV, bu bölgede yer alan kapiller ve venüllerden kaynaklanır.

Perikorneal vasküler pleksus, opak sklera ve konjonktiva ile damarsız transparan kornea arasında geçiş zonudur.²⁵ Limbusun 1-5 mm arkasında yer alan damar ağından köken almaktadır.²⁶ Arteriyoller limbustan başlar, Vogt palisadlarını çaprazlar ve damarlar için doğal bir bariyer olan Bowman tabakasının altında ilerler.²⁷ Limbal bölgedeki kan akımını düzenlemek için afferent arteriyollerin posterior kısımlarında valv olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra perisit ve endotel hücreleri kontrakte olabilmektedir. Bu şekilde kanı akımı düzenlenebilmektedir.^{28,29}

2.1.2.KORNEA EMBRİYOLOJİSİ

Nöroektoderm, yüzey ektodermi ve mezenkim göz küresinin oluşumunda görev alan 3 tabakadır. Endoderm göz küresi oluşumuna katkıda bulunmaz.³⁰

Korneanın oluşumu gestasyonel 5-6. haftalarda başlamaktadır.²¹ Gestasyonel 5. haftada yüzey ektodermi lens vezikülünden ayrılır ve primitif kornea epitelini oluşturur.²¹ Gestasyonel 7. haftada perioküler mezenşim hücrelerinin göçü esnasında kornea stromasında farklılaşma başlar. Bu esnada lensin varlığı önemlidir. Lensin sadece kornea gelişiminden değil kornea varlığını sağlamasından da sorumlu olduğu iddia edilmiştir. Gestasyonel 8. haftada kornea endoteli çift sıralı kübik ve yassı hücrelerden oluşur. Descemet membranı bu evrede oluşmaya başlar. Kornea epitelini çok katlı skuamöz gelişim göstermektedir ve bazal membran bulunmaktadır. Ayrıca bu haftada alt ve üst göz kapakları birbirine ulaşır ve 6. aya

kadar göz kapakları kapalılığını devam ettirir. Gestasyonel 4. ayda kornea epitelı kbık Şekilli bazal tabaka ve yassı yüzeyel tabaka olmak üzere iki farklı hücre tabakasından oluşur. Yine bu dönemde Descemet membranı endotel hücreleri tarafından oluŐturulur.²¹ Gestasyonel 6. aya ulaŐıldıĐında epitel 3-4 tabakalıdır ve Bowman tabakası iyice olgunlaŐmıŐtır. Descemet tabakası geliŐimine devam etmektedir. Endotel hücreleri iyice geliŐmiŐtir ve aralarında sıkı bağlantılar bulunmaktadır.³⁰ Gestasyonel 7. ayda epitelde bazal hücreler, kanatsız hücreler ve yassı hücreler izlenmektedir. Gestasyonel 9. ayda kornea epitelı olgunlaŐma sürecini tamamlamıŐtır.

Doğumda kornea 10 mm çapta ve ortalama 55,67 Diyoptri keratometrik güce sahiptir. DoĐum sonrası ilk hafta içinde kalınlığı 581 ±47 mikrondur.³⁰

2.2.KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU

2.2.1.Kornea Neovaskülarizasyonu (KNV) Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

Kornea saydam bir dokudur ve normal koŐullarda damar içermez. Patolojik durumlarda neovaskülarizasyon görülebilmektedir. KNV'nin gerçek insidans ve prevalansı bilinmemekle birlikte ABD'de yapılan bir çalışmada, Massachusetts Gz ve Kulak Hastanesi'ne baŐvuran hastalar içerisinde prevalansı %4,14 olarak bildirilmiştir.³¹ Bu hastalarda kornea neovasklarizasyonuna neden olan etyolojik nedenler arasında kontakt lens kullanımı, kapak inflamasyonu, geçirilmiş cerrahi, iskemi ön segment neovaskülarizasyonu, travma, trikiyazis ve herpes simpleks infeksiyonu yer almaktadır.

Kornea enfeksiyonları kornea neovaskülarizasyonunun en önemli nedenlerindedir. Amerika'da toplumdaki ülseratif keratit oranı 11/100.000 olarak bildirilmiştir.³² Trahom, nlenebilir körlük nedenleri arasındadır ve dünya çapında 84 milyon hastada bulunmaktadır. Esas olarak Afrika ve Asya'da olmak üzere 55 ülkede endemiktir.³³

Kontakt lens kullanımı ile ilişkili KNV, kontakt lens kullanıcıları arasında %11-23 olarak bildirilmiştir.³⁴ KNV, özellikle yumuŐak hidrojel lenslerin uzun süreli kullanımı ile ilişkilidir.

Keratoplasti öncesi alıcı yatağı avasküler olan hastaların %50'sinde keratoplasti sonrası kornea anjiyogenezi görülmüştür.³⁴ Yine kornea transplantasyonu hastalarında yapılan histopatolojik incelemelerde hastaların % 20'sinde neovaskülarizasyon tespit edilmiştir.

Travma KNV'nin diğer bir nedenidir. Kimyasal yanıklar oküler travmaların %7,7 - 18'ini oluşturmaktadır.³⁵ Özellikle alkali yanıklar dokuya penetre olarak ciddi hasarlar bırakmaktadır. KNV, bu hastalarda oldukça ciddi boyutlardadır.

Kornea neovaskülarizasyonun gerçek insidans ve prevalansı için popülasyon tabanlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.2.2.Kornea Neovaskülarizasyonu Mekanizması

Korneanın çok özel bir anatomisi vardır. Sürekli dehidrate kalabilmesi, kollajen lamellerinin sıkı olmasını ve lameller boyunca keratositler arası bağın sıkı olmasını sağlamaktadır. Stromal ödem varlığında bu sıkı kollajen lameller düzen bozulur; kornea saydamlığını yitirir ve inflamatuvar sitokinler artar. Bunun sonucunda lameller arasında yeni damarlar oluşabilir.^{36,37} Korneada ödem, vaskülarizasyon olmadan da olabilir fakat yeni damar oluşumu genellikle ödem ile ilişkilidir.

Korneada neovaskülarizasyon önleyici mekanizmalar bulunmaktadır.³⁸ Kornea epitel ve stroma hücrelerinin, damar oluşumunu engelleyici etkileri vardır. Kornea epitel bazal membranında bulunan endostatin, trombospondin, doku inhibitör metalloproteinaz-3 gibi sitokinler neovaskülarizasyon engelleyici etkiler göstermektedir.^{39,40} Bunlara ek olarak kornea epitelinde adı verilen solubl vasküler endotelial büyüme faktörü A reseptörü bulunmaktadır. VEGF için bir tuzak reseptörüdür ve membrana bağlı VEGF-A reseptörü 1 ve 2'nin heterodimerizasyonunu inaktive eder.⁴¹⁻⁴³ Ayrıca limbal epitel hücreleri de bariyer görevi görmektedir. Limbusta normal korneal epitele dönüşen kök hücreler bulunmaktadır. Limbus-kornea sınırda bir hasar oluştuğunda oluşan defekt, kornea epiteli ve komşu limbal epitel tarafından kapatılmaktadır. Limbal kök hücre yıkımı meydana geldiğinde ise oluşan hasarlar konjonktiva epitel ile onarılmaktadır. Konjonktiva epiteli, kornea epitelinin aksine vaskülarizedir. Yara iyileşmesi bu vaskülarize epitel ile sağlandığında saydam olması gereken kornea tabakasının optik kalitesi bozulur, görme keskinliğini düşürür ve korneanın bariyer fonksiyonu bozulur.

2.2.3.Kornea Neovaskülarizasyonu Yerleşimi

Korneada oluşan yeni damarlar genellikle stromada yer alır. Bazı hastalıklar ise birçok kornea tabakasını da tutabilir. Yapılan bir çalışmada en çok ön ve orta 1/3 kornea tabakasının tutulduğu gösterilmiştir.⁴⁴

KNV'nin 3 klinik formu bulunmaktadır.⁴⁵⁻⁴⁸

Derin KNV: KNV, Descemet membranının üzerinde uzanır. Herpetik ve sifilitik stromal keratitlerde oluşan KNV örnek verilebilir.

Stromal KNV: Neovaskülarizasyon stromada yer alır. Stromal keratitlerin çoğunda veya alkali hasara bağlı oluşan neovaskülarizasyon bu tiptedir.

Vasküler pannus: Oküler yüzey hastalıklarında, kornea periferindeki yüzeyel bağ dokusunun proliferasyonudur.

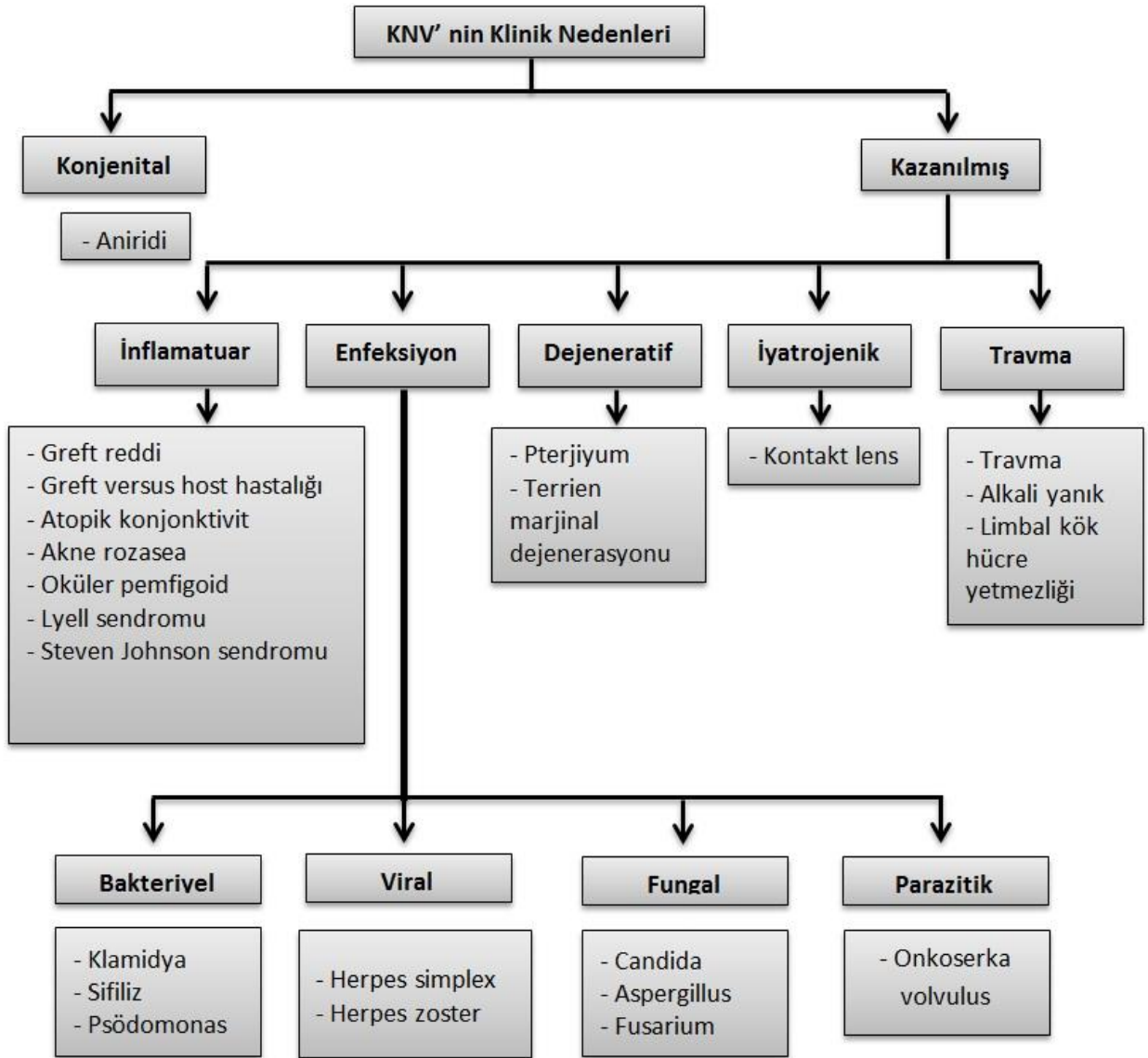
Damarlar, korneada neovaskülarizasyonun yerleşim yerine göre farklı özellikler göstermektedir (Tablo 1).⁴⁹

Yüzeyel vaskülarizasyon	Derin vaskülarizasyon
<ul style="list-style-type: none">• Konjonktival damarlardan kaynaklanır	<ul style="list-style-type: none">• Anterior siliyer damarlardan kaynaklanır
<ul style="list-style-type: none">• Limbusu çaprazlar	<ul style="list-style-type: none">• Limbusta kaybolur
<ul style="list-style-type: none">• Yüzeyel stromal tabakada ilerler	<ul style="list-style-type: none">• Derin stromal tabakada ilerler
<ul style="list-style-type: none">• Parlak kırmızı renktedir	<ul style="list-style-type: none">• Koyu kırmızı renktedir
<ul style="list-style-type: none">• Dallara ayrılır	<ul style="list-style-type: none">• Paralel ve radyal uzanım gösterir
<ul style="list-style-type: none">• Epiteli yukarı kaldırabilir	<ul style="list-style-type: none">• Epiteli yukarı kaldırmaz

Tablo 1: Korneadaki damarların yerleşim yerine göre değişen özellikleri anlatılmaktadır.

2.2.4.Kornea Neovaskülarizasyonu Nedenleri

Kornea neovaskülarizasyonu, konjenital hastalıklardan daha ziyade kazanılmış hastalıklarda görülmektedir. Kornea neovaskülarizasyonun çok sayıda nedeni vardır; bunlar korneanın inflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif, iyatrojenik hastalıkları ve travma olarak gruplandırılabilir (Şekil 1).⁴⁹



Şekil 1: Kornea neovaskülarizasyonuna neden olabilen hastalıklar anlatılmaktadır. Abdelfettah ve arkadaşlarının⁴⁹ çalışmasından modifiye edilmiştir.

2.3.ANJİYOGENEZ

İnsanlarda damar oluşumunda **vaskülojen** ve **anjyogen** adı verilen iki mekanizma rol oynamaktadır. **Vaskülojen**, damarların embriyonik dönemde endotel hücre öncülerinden köken alarak oluşmasıdır. Bu gelişimde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ana rol oynamaktadır ve önemi fare çalışmalarında gösterilmiştir. Çalışmalarda VEGF allellerinden birisi eksik olan fareler, kardiyovasküler sistemde oluşan gelişim defekti nedeniyle intrauterin dönemde ölmüştür.⁵⁰ **Anjiogen** ise daha önce oluşmuş damarlardan yeni damarların gelişimidir. Yara iyileşmesi, kıl büyümesi, üreme gibi fizyolojik durumlarda anjiogenezis etkilidir.⁵¹ İskemi, inflamasyon, tümörlerin progresyonu, metastazı ve invazyonu gibi patolojik durumlarda da anjiogenezis önemli rol oynamaktadır.

Vücutta proanjyogenik ve antianjiogenik faktörler arasında denge vardır. Bu dengenin proanjyogenik faktörler lehine bozulması sonucu anjiyogenez gerçekleşmektedir. İlk olarak faktörlerin etkisi ile matriks metalloproteinaz enzimi aktive olur ve bazal membran parçalanır. Daha sonra endotel hücreleri aktive olur ve adezyon, migrasyon, proliferasyon ile tüp oluşumu gerçekleşir.⁵² Bazal membranın oluşması ve perisitlerin eklenmesi ile anjiyogenezis tamamlanır. Son yıllarda üzerinde en çok durulan proanjyogenik faktör VEGF'tir. Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor (FGF)) ise diğer önemli anjiyogenik sitokindir.⁵³⁻⁵⁵

2.3.1.ANJİYOGENİK FAKTÖRLER

Bugüne kadar anjiyogenezde rol oynadığı bilinen ve halen etkileri araştırılan bir çok madde bulunmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenezde görev aldığı bilinen en önemli sitokindir. FGF ve PDGF ise anjiyogenezde rol oynayan diğer önemli sitokinler arasında yer almaktadır.

2.3.1.1.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörleri, heparin bağlayıcı anjiyogenik büyüme faktörleridir ve glukoprotein yapıdadırlar. İlk olarak Senger ve arkadaşları 1983 yılında tümör vasküler permeabilite faktörü (Vascular Permeability Factor, VPF)) olarak tanımlamışlardır.⁵⁶ Daha sonra Ferrara ve Henzel, 1989 yılında endotel hücrelerde mitojen etki yaptığını tespit ettikleri bir sitokine VEGF adını vermişlerdir.⁵⁷ Daha sonra yapılan çalışmalarda bu iki sitokinin de aynı olduğu tespit edilmiştir ve VEGF adı kullanılmaya devam edilmiştir.⁵⁸

Büyük bir VEGF ailesi vardır. Bu ailenin üyeleri VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ile VEGF-D, VEGF-E'dir. Ayrıca PIGF ve PDGF de VEGF-A ile homoloji göstermektedir.

Plasental büyüme faktörü (PIGF, PGF): İlk olarak insan plasentasında keşfedildiği için bu ismi almıştır. VEGF-A ile benzer şekilde reseptörlere bağlanmaktadır.^{59,60}

2.3.1.1.1. VEGF Tipleri

VEGF-A: Anjiyogenezde de en etkili olan VEGF-A'dır. 34-42 kilodalton (kDa) ağırlığındadır.^{59,60} İnsanlarda 6p21. kromozomda kodlanmaktadır.⁶¹ Hipoksi ile aktive olup etkisini vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1) ve VEGFR-2'ye bağlanarak göstermektedir.

VEGF-A'nın VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189, VEGF206 olmak üzere 9 izoformu vardır. İzoformlar sahip oldukları aminoasit sayılarına göre adlandırılmaktadır.⁶² VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 reseptör bağlayıcı ve heparin bağlayıcı bölge içerirler. Diğer izoformlar difüzyona uğrayabilirler, reseptör bağlayıcı bölge içerirler ve heparine bağlanmazlar.⁵⁸ Anjiyogenezde en önemli rolü VEGF165 oynamaktadır. VEGF165b, endojen inhibitör özellik gösteren tek izoformdur ve etkisini VEGFR2 aracılığıyla gösterir.⁶³ VEGF110 ise endotel hücre büyümesinde etkilidir ve damar geçirgenliğini artırır. Mitojenik aktivitesi VEGF165'den daha azdır.

VEGF-B: İnsanlarda en fazla kalp, iskelet kası ve pankreasta bulunmaktadır. VEGF-B167 izoformu 21 kDa; VEGF-B186 izoformu ise 32 kDa ağırlığındadır. İnsanda 11. kromozomda kodlanır. VEGFR-1'ye bağlanarak etki göstermekte; hücre dışı matriks degradasyonu, hücre adezyonu ve göçünde rol oynamaktadır.⁶⁴

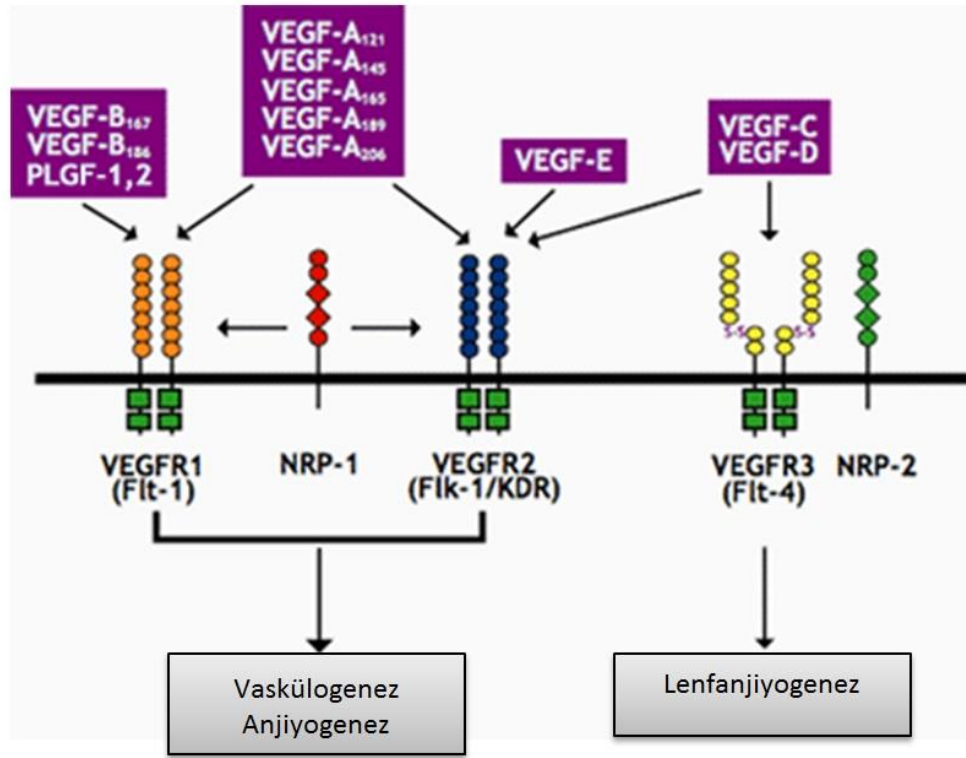
VEGF -C: Erişkinde yoğun olarak kalp, ince barsak, plasenta ve over dokusunda bulunur. İnsanda 4. kromozomda kodlanır. Lenfanjiyogenezde ve yara iyileşmesinde etkilidir.⁶⁵ Etkisini VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanarak gösterir.

VEGF-D: İnsanda X kromozomunda kodlanır. Erişkinde akciğer, kalp, iskelet kası, kolon ve ince bağırsakta sentezlenir. Lenfanjiyogenezde görev almaktadır ve etkisini VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanarak gösterir

VEGF-E (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü C, PDGF-C): İnsanda 4. kromozomda kodlanır. VEGF-A ile homoloji gösteren viral bir homologtur.^{64,66}

2.3.1.1.2. VEGF Reseptörleri (VEGFR)

VEGF'lerin hücre yüzeyinde bağlandığı tirozin kinaz reseptörleridir (TKR).^{67,68} Üç tip VEGFR vardır; bunlar VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3'tür. Ekstraselüler kısmında 7 immünglobulin benzeri yapı vardır ve sitokinler bu bölgeye bağlanırlar. Ayrıca Nörofilin-1 ve nörofilin-2 adı verilen transmembran koreseptörleri bulunmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerinin yapısı anlatılmaktadır.

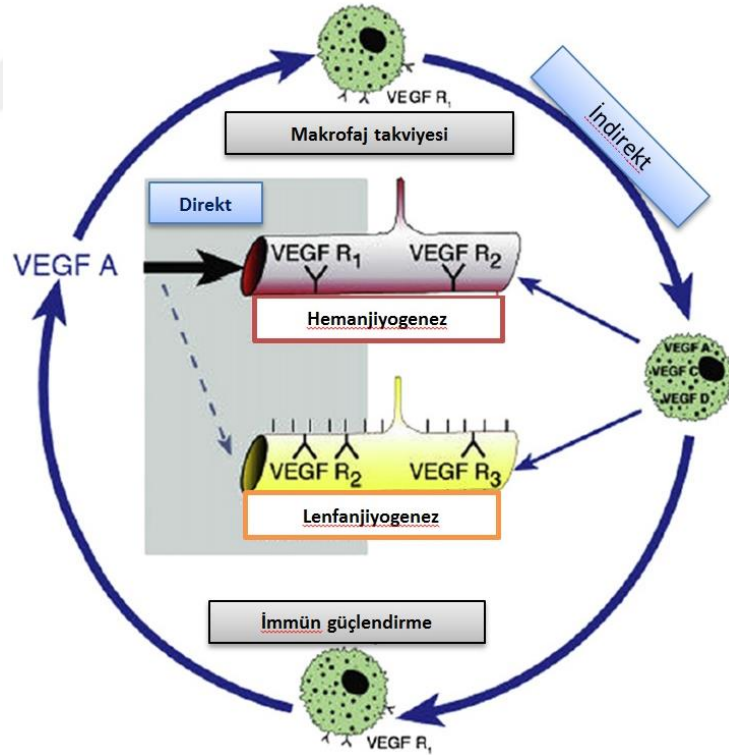
VEGFR-1: VEGFR olarak ilk tanımlanan TKR'dir.⁶⁹ VEGF-A, VEGF-B ve PIGF bu reseptöre yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Vasküler endotel hücrelerinde, perisitlerde, damar düz kas hücrelerinde, osteoblastlarda, makrofajlarda, monositlerde, plasental trofoblastlarda, renal mezengial hücrelerde ve hematopoetik kök hücrelerde sentezlendiği gösterilmiştir.⁶⁴ VEGFR-1 ekspresyonu, hipoksi ortamında hipoksiyle indüklenen faktör -1 (HIF-1) aracılı mekanizma ile aktif olur.⁷⁰

VEGFR-2: VEGF-A'ya yüksek afinite gösterir. VEGF'nin mitojenik, anjiyogenik ve permeabilite artışı etkilerinden sorumlu olan reseptördür. VEGF-E, VEGF-C ve VEGF-D de bağlanabilir. Endotel hücresi, osteoblast, nöron, megakaryosit ve hematopoetik kök hücreler tarafından sentezlenir.^{70,71}

VEGFR-3: VEGF-C ve VEGF-D'ye yüksek afinite gösterir. Lenfanjiyogeneizde görev almaktadır.⁵⁸

2.3.1.1.3. VEGF Salgılanması

VEGF salınımı inflamasyon nötrofiller, makrofajlar, T ve B lenfositler tarafından kontrol edilmektedir. Özellikle makrofajlar tümör nekroz faktörü- α (Tumor Necrosis Factor - α , TNF- α), VEGF gibi neovaskülarizasyonu artıran sitokinler salgılanmaktadır.^{72,73} Makrofajlar VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D üretimini artırır^{74,75} ve VEGFR aracılığıyla korneada hemanjiyogenezi ve lenfanjiyogenezi uyarırlar (Şekil 3).⁷⁶



Şekil 3: Hemanjiyogenez ve lenfanjiyogenezde makrofajların ve vasküler endotelial büyüme faktörünün rolü anlatılmaktadır. Cursifien ve arkadaşlarının⁷⁴ çalışmasından modifiye edilmiştir.

Makrofajların yanı sıra korneadaki fibroblastlar ve kornea epitel hücreleri de VEGF-A için önemli kaynaklardır. Kornea yaralanmasından sonra bu hücreler yüksek miktarda VEGF-A salgırlarlar.^{74,77,78}

Hipoksi ya da iskemi, anjiogenezis oluşmasına neden olan faktörleridir.⁷⁹ HIF-1, VEGF-A gen ekspresyonununun sağlar.^{80,81} Büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü α ve β (Transforming Growth Factor (TGF- α ve β), keratinosit büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, FGF, PDGF), hipofiz hormonları (tiroid stimüle edici hormon, adrenokortikotropik hormon), nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler (İnterlökin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8), serbest oksidaller ve onkojenik mutasyonlar da VEGF ekspresyonunu düzenler.^{62,79,82}

2.3.1.1.4.VEGF Fonksiyonları

VEGF-A'nın birçok fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar;

1. Vaskülojeniz, anjiogenez ve lenfanjiyogenezini düzenler.^{58,65} VEGF; endotel hücreler için in vivo ve in vitro yaşamsal faktördür.
2. Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir. Ayrıca monositler için kemotaktiktir.⁶⁴
3. Endotel hücrelerinde apoptozu engelleyerek hücrelerin devamlılığını sağlar.⁸³
4. Damar geçirgenliğinde artışa ve retinal lökostaza neden olur.⁸⁴
5. Nöron koruyucu etkileri vardır.⁸⁵ VEGF'nin inaktive edildiği farelerde, nörodejeneratif hastalık gelişmesi, hipoksi ile indüklenen VEGF'nin nöron koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir.⁸⁶ Retina gangliyon hücrelerinde aksotomi yapılan farelerde, VEGF'nin retina gangliyon hücre ölümünü yavaşlattığı saptanmıştır.⁸⁷
6. Pro-inflamatuvar etkilidir. VEGF lökositlere bağlanabilir.

2.3.1.2.Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF'nin anjiyogenezdeki etkisi 1980'lerde keşfedilmiştir. Yirmi iki FGF ailesi üyesinin özellikle de FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5,FGF-8'in anjiyogenezde rol oynadığı bilinmektedir.^{88,89}

Temel fibroblast büyüme faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)), 23 yapısal ilişkili heparin bağlayıcı peptidlerden oluşur. Hücre farklılaşmasında, anjiyogenezde, mitogenezde ve yara iyileşmesinde rol oynar. Etkisini tirozin kinaz reseptör özelliği gösteren FGFR'ler ile göstermektedir. Dört adet FGFR bulunmaktadır; bunlar FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4 reseptörleridir.⁹⁰

FGF bağlanma seviyesine bağlı olarak yeni damarların maturasyonun seviyesi değişmektedir. Hasarlanan kornea stroma hücreleri ve inflamatuvar hücreler, direkt olarak FGF salgılamaktadırlar. Salgılanan FGF endotel hücreleri etkileyerek anjiyogenezi stimüle etmektedir.⁹¹ Birçok hayvan çalışmasında bu etki gösterilmiştir. Chung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu etkinin yanı sıra VEGF ve FGF arasındaki ilişki de ortaya koyulmuştur. Tüm farelere bFGF verilmiş ve fareler anti-VEGFR-2 veya anti-VEGFR-3 ile tedavi edilmiştir. Anti-VEGFR-2 ile tedavi edilenlerde anjiyogenezde azalma gözlenirken, anti-VEGFR-3 ile tedavi edilenlerde ağırlıklı olarak anjiyogenik cevap görülmüştür. Bu model ile bFGF ile VEGF salınımı arasında bir bağ olduğunu gösterilmiştir.^{92,93}

2.3.1.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ailesinde PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C ve PDGF-D olmak üzere 4 adet ligand bulunmaktadır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR) PDGFR- α ve PDGFR- β 'dir.

PDGF miyofibroblast, makrofaj ve tümör hücrelerinde rol oynamaktadır. Mitojendir, makrofaj ve miyofibroblastlar için kemoatraktandır. Ortamda VEGF varlığında PDGF, PDGFR'leri aktive eder. PDGF'nin etkisi azaltıldığında damarlanmanın da azaldığı görülmüştür. Ayrıca bir başka çalışmada oküler neovaskularizasyonun VEGF-A ve PDGF-B birlikte inhibe edildiği grupta, VEGF-A ve PDGF-B'nin ayrı ayrı inhibe edildikleri gruplara göre çok daha fazla azaldığı görülmüştür.⁹⁴

2.4. KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU TEDAVİSİ

2.4.1. MEDİKAL TEDAVİ

Steroidler

Steroidler, kornea neovaskularizasyon tedavisinde en yaygın kullanılan ajandır. Topikal steroidlerin antianjiyogenik etkisi ilk olarak 1950 yılında gösterilmiştir.⁹⁵

Steroidlerin antiinflamatuvar etkileri vaskularizasyonu azaltır; vasküler endotel hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu, sitokin sentezini ve kemotaksisi inhibe ederler.⁹⁶⁻¹⁰¹

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar

Prostaglandinler, korneada yara iyileşmesi ve anjiyogenezde rol oynarlar. Hayvan modellerinde sentezleri, Fosfolipaz –A2 veya COX inhibitörleri ile baskılandığında korneada damarlanmanın azaldığı tespit edilmiştir.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Korneada COX-1 ve COX-2 iki tip COX enzimi bulunmaktadır. COX-2 enziminin VEGF ligand ve reseptörlerinin ekspresyonunu düzenlediği¹⁰⁶ insanda ve deneysel olarak kanserlerde önemli bir pro-anjiyojenik protein olduğu gösterilmiştir.^{107,108}

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar özelliklerine göre COX-1 ve COX-2'yi inhibe etmektedirler. Selektif COX-2 inhibitörleri, kornea bazal prostoglandin E2 sentezini %20 azaltabilmektedir, yaralanmadan sonra bu oran %80'lere ulaşabilmektedir.¹⁰⁹ Selektif COX-2 inhibitörlerinin, indometazin gibi selektif olmayan COX-1 ve COX-2 inhibitörlerine benzer şekilde neovaskularizasyonu kısmi olarak azaltabildikleri gösterilmiştir.¹¹⁰

Bunların yanı sıra IL-1 antagonistleri, trombosit aktive edici faktör antagonistleri¹¹¹, TNF- α inhibitörleri¹¹², siklosporin^{101,113-115}, metotreksat^{116,117}, talidomid^{118,119}, oktreetid¹²⁰, angiostatin¹²¹ gibi birçok molekülün kornea neovaskularizasyonunu inhibe edici etkisi araştırılmaktadır.

2.4.2.LAZER TEDAVİSİ

Korneal damarları tıkamak amacıyla argon lazer ve fotodinamik tedavi gibi farklı teknikler kullanarak yapılan çalışmalar mevcuttur. Lazer fotokoagülasyonda kornea damarlarına etki edebilen 577 nm sarı ışık uygulanmaktadır. Bu teknik hayvan çalışmalarında nispeten güvenli görülmektedir.^{122,123} Medikal tedaviye dirençli olgularda korneal neovaskularizasyonun rekürensini önlemek için keratoplasti öncesi ve korneal neovaskularizasyonu tedavi etmek için keratoplasti sonrasında denenmiştir. Penetran keratoplasti sonrasında neovaskularizasyon miktarında biraz azalma görülmesine rağmen, keratoplasti öncesinde yüksek riskli hastalardaki etkinliği net değildir. Ayrıca yaygın kornea neovaskularizasyonu olgularında çok kullanışlı bir yöntem olarak görünmemektedir.

Fotodinamik tedavide fotosensitize edici bir ajan sistemik dolaşıma verilir. Bu fotosensitize edici ajan yeni damarlarda birikir ve daha sonrasında bir lazer ışıyla seçici olarak bu damarlar oklude edilir. Bu yöntem koroidal neovaskülarizasyonda klinik olarak kullanılmaktadır ve kornea neovaskülarizasyonundaki etkisi hayvan modellerinde denenmektedir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda ümit verici sonuçlar elde edilmiş ve tedavi edilmiş korneaların histopatolojik incelemelerinde tromboze olmuş ve endoteli ileri derecede hasarlı korneal damarlar görülmüştür. Ancak etkinliğin iyi belirlenmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.^{124,125}

2.4.3.CERRAHİ TEDAVİ

Oküler yüzeyi konjonktival, limbal greft ve amniyotik membran transplantasyonu ile düzelterek korneadaki anjiyogenik uyarıyı azaltmayı amaçlayan çalışmalar mevcuttur. Oküler yüzey hastalıklarında oto ve allogreft limbal konjonktival transplantasyonun korneal neovaskülarizasyonu azalttığı gösterilmiştir.¹²⁶ Amniyotik membran transplantasyonun da antianjiyogenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.¹²⁷ Amniyotik membranın bu etkisini yapısında bulunan antianjiyogenik moleküller ve öncü maddeler (trombospondin-1 ve kollajen 18 vb.) aracılığı ile gerçekleştirdiği düşünülmüştür.^{128,129}

2.4.3.ANTİ-VEGF STRATEJİLER

Günümüzde VEGF üzerinde etkili birçok ajan bulunmakta ve yeni ajanlar geliştirilmektedir. Kornea neovaskülarizasyonunda en çok kullanılan VEGF üzerinde etkili ajan ise bevacizumabtır.

Bevacizumab

Bevacizumab VEGF-A'ya karşı geliştirilmiş bir rekombinan humanize monoklonal antikordur. VEGF için iki bağlantı yeri olan, tam uzunlukta bir antikordur ve VEGF'nin biyolojik olarak aktif tüm izoformlarını bloke eder. Metastatik kolon kanserinde sistemik kullanımı için FDA onayı vardır. Günümüzde neovasküler tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu, diyabetik makula ödemi, neovasküler glokom, kornea neovaskülarizasyonu, santral retinal ven oklüzyonu, prematüre retinopatisi ve benzeri neovasküler hastalıklarda topikal veya intravitreal enjeksiyon yöntemiyle kullanılmaktadır.¹³⁰⁻¹³² Sıçanlarda ve tavşanlarda kornea neovaskülarizasyon modelinde yapılan deneysel çalışmalarda

bevacizumab tedavisi sonrası neovaskularizasyonda ve oküler doku VEGF düzeylerinde ciddi bir azalma olduğunu göstermiştir.⁴⁻⁸

Dovitinib

Dovitinib yeni geliştirilen (faz 4 aşamasında) çok hedefli-tirozin kinaz inhibitörüdür ve VEGFR 1, VEGFR-2, VEGFR-3, VEGFR-4, FGFR-1, FGFR-3, PDGFR tirozin kinazlarını inhibe etmektedir.^{9,10} Literatüre bakıldığında tirozin kinaz inhibitörlerinin kornea neovaskularizasyonunu azaltıcı etkisi üzerine birçok çalışma mevcuttur. Literatürde iki ayrı çalışmada deneysel kornea neovaskularizasyonu modelinde tirozin kinaz inhibitörü olan sunitinib ve bevacizumab etkilerini karşılaştırılmış ve bu çalışmalarda sunitinibin kornea neovaskularizasyonu azaltıcı etkisinin bevacizumaba göre daha fazla olduğu anlamlı bir biçimde gösterilmiştir.¹¹⁻¹³ Yine başka bir tirozin kinaz inhibitörü olan regorafenibin kornea neovaskularizasyonu üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada regorafenibin anlamlı etki gösterdiği tespit edilmiştir.¹³ Yukarıda bahsedilen çalışmalarda kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri VEGFR ve PDGFR'yi inhibe etmektedirler. Dovitinib ise bunlara ek olarak anjiyogeneze rol oynayan diğer bir büyüme faktörü olan FGFR'yi de inhibe etmektedir. Bu etkisi dolayısıyla anjiyogenezi etkili bir biçimde inhibe edeceği düşünülebilir.

Bu çalışmada, kornea neovaskularizasyonunda dovitinibin bevacizumabtan daha farklı bir şekilde kornea neovaskularizasyonunu azaltacağını hipotez ettik. Bu etkiyi araştırmak amacıyla her iki ilacın kornea neovaskularizasyonundaki etkisini karşılaştırmalı olarak ortaya koymayı hedefledik.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun (YÜDHEK) onayı ile Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) gerçekleştirilmiştir. Deney süreci, hayvanların bakımları ve barınma koşulları YÜDHEK tarafından denetlendi.

3.1.DENEY HAYVANLARI

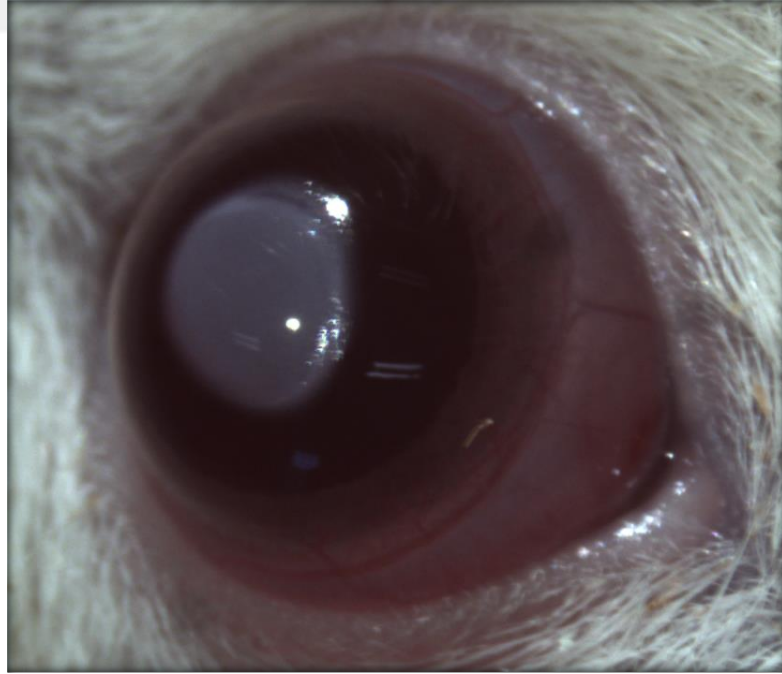
Ağırlıkları 180-250 gram arasında değişen 39 adet erişkin dişi Sprague-Dawley sıçanlar denek olarak kullanıldı. Tüm deney boyunca sıçanların bulunduğu odanın sıcaklığı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi aynı seviyede tutuldu. Tüm sıçanların beslenme ve su ihtiyaçları ad-libitum şartlarda sağlandı ve sıçanlar plastik kafeslerde barındırıldı. Günlük biyolojik ritimleriyle ilgili aydınlık karanlık sürecin devamlılığı amacıyla 12 saatlik aydınlık ve 12 saat karanlık ışık siklusu oluşturuldu.

3.2.KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU MODELİNİN VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Bütün deneklere ketamin hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) ile genel anestezi uygulandı. Lokal anestezi için proparakain hidroklorid (Alcaine® oftalmik solüsyon, Alcon Laboratories, inc, TX, USA) kornea üzerine damlatıldı. Kornea neovaskülarizasyonu oluşturmak amacıyla gümüş nitrat (AgNO_3) çubuğu, sağ göz kornea santralinde, ortalama 2-2,5 mm çapında bir alanda, 10 sn bekletildi ve korneanın kimyasal koterizasyonu sağlandı (Resim 1 ve 2). Ardından 10 ml dengeli tuz solüsyonu (BSS® - Balanced Salt Solution, Alcon Laboratories, inc, TX, USA) ile kornea ve forniksler yıkandı.



Resim 1: Korneada neovaskularizasyonu modeli oluşturulması esnasında kornea santraline gümüş nitrat çubuğu uygulaması görünümü



Resim 2: Kornea neovaskularizasyonu modeli oluşturulması esnasında gümüş nitrat çubuğu korneada 10 sn bekletildikten hemen sonraki görünüm

Koterizasyon sonrası sıçanlar randomize olarak 5 gruba ayrıldı. Birinci gruba gümüş nitrat ile koterizasyon sonrası hiçbir kimyasal madde uygulanmadı ve 14 gün beklenildi. İkinci gruba kornea koterizasyonu yapıldıktan sonra 25 mikrolitre Dimetilsülfoksit (DMSO, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, ABD) damlatıldı. DMSO polar çözücü bir maddedir. Çalışmamızda toz halindeki dovitinib maddesini damla formuna dönüştürmek için kullanılmış ve gruplar arası farka neden olmaması için tüm gruplarda çözücü olarak tercih edilmiştir. Üçüncü gruba kornea koterizasyonu yapıldıktan sonra DMSO içerisinde çözdüğümüz 5 mg/ml bevacizumab (Altuzan; Roche, Genentech Inc., San Francisco, ABD) solüsyonu oftalmik damla formuna getirilerek uygulandı. Dördüncü gruba kornea koterizasyonu yapıldıktan sonra DMSO içerisinde çözdüğümüz 5 mg/ml dovitinib (TKI-258, CHIR-258, Selleckchem.com) solüsyonu oftalmik damla formuna getirilerek uygulandı. Beşinci gruba gruplara gerektiği dozlarda oftalmik damla formunda hazırlandı. Bevacizumab (5 mg/ml) ve dovitinib (5 mg/ml) DMSO'da çözülerek oftalmik damla formunda uygulandı. Tüm uygulamalar deneklerin sağ gözüne yapıldı, hiçbir uygulama yapılmayan sol gözler ise kontrol olarak kullanıldı. İlaç tedavileri ilk olarak kimyasal koterizasyon işleminden 12 saat sonra uygulanmaya başlandı. Daha sonra günde 2 defa olmak üzere, 14 gün boyunca kimyasal maddeler damlatıldı. Tüm gruplar Tablo 2'de verilmiştir.

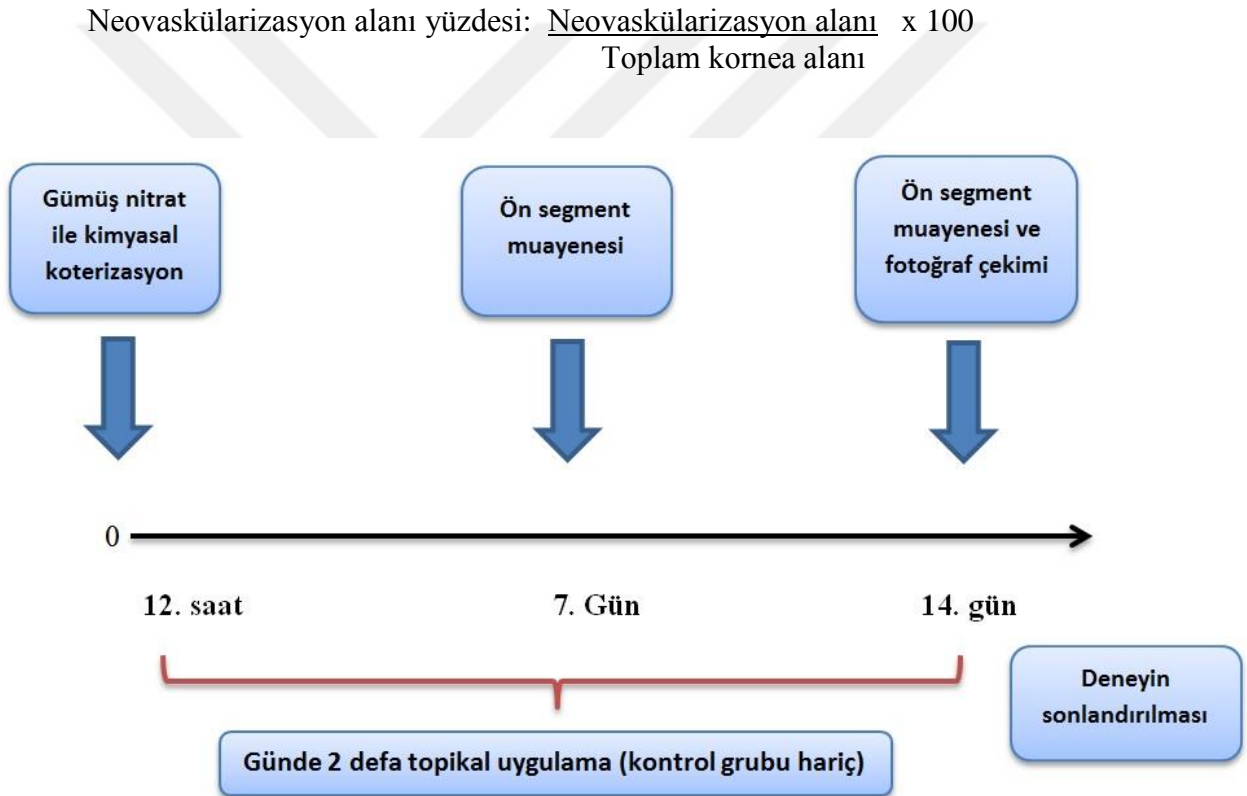
Gruplar	n	Yapılan işlem	İlaç uygulama süresi (gün)	Tedavi
1. Grup	7	AgNO ₃ ile Koterizasyon	14	-
2. Grup	8	AgNO ₃ ile Koterizasyon	14	Dimetilsülfoksit (DMSO)
3. Grup	8	AgNO ₃ ile Koterizasyon	14	Bevacizumab (5mg/ml)
4. Grup	8	AgNO ₃ ile Koterizasyon	14	Dovitinib (5 mg/ml)
5. Grup	8	AgNO ₃ ile Koterizasyon	14	Bevacizumab (5 mg/ml) + Dovitinib (5 mg/ml)

Tablo 2: Deney gruplarına uygulanan işlemler, tedaviler ve uygulama süreleri özetlenmiştir.

3.3.KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.3.1. Ön Segment Muayenesi ve Neovaskülarizasyon Alanı Yüzdesinin Hesaplanması

El biyomikroskopi cihazı ile 7. ve 14. günlerde tüm deneklerin ön segmentleri muayeneleri, ketamin hidroklorid ve ksilazin hidroklorid ile genel anestezi altında yapıldı. Neovaskülarizasyon alanları ve oluşabilecek yan etkiler değerlendirildi. Ön segment fotoğrafları 14. günde World Precision Instruments marka mikroskop ile çekildi. Image J dijital bilgisayar görüntü analizi programı kullanılarak fotoğraftaki neovaskülarizasyon alanı piksel yöntemiyle hesaplandı ve tüm kornea alanına bölünmesiyle neovaskülarizasyon alanının yüzdesi (%) tespit edildi.



Sekil 4: Deney sürecince uygulanan işlemler şematize edilmiştir.

3.3.2. Doku Takibi ve Kesitlerin Boyanması

Tüm denekler 14. günde dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Göz enükleasyonu sonrası alınan dokular morfolojik değerlendirme yapmak üzere %10'luk formalinde oda

ısısında 8 saat fikse edildi. Fiksasyonun ardından dokular sırasıyla %70, 80, 90 ve 100'lük alkol serilerinden geçirildi. Ardından dokular ksilol içerisinde bekletilerek şeffaflaştırma yapıldı. Şeffaflaştırmanın ardından dokular 56 °C' deki etüvde bulunan sıvı haldeki parafin içerisinde 3 saat inkübe edildi. Son olarak da temiz parafin içerisine gömülerek parafin blok haline getirildi.

Parafin bloklardan mikrotomda 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, parafini uzaklaştırmak amacıyla ksilolde bekletildi. Daha sonra %70, 80, 90 ve 100'lük alkol serilerinden geçirildi ve çeşme suyunda yıkama yapıldı. Hematoksilen ile boyanan kesitler çeşme suyunda iyice yıkandıktan sonra, eozin ile boyandı. Ardından %100, 90, 80 ve 70'lik alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde bekletildi. Kapatma solüsyonu ve lamel ile kapatılan kesitlerden Zeiss mikroskopta fotoğraflar alınarak tüm gruplarda neovaskülarizasyon alanları incelendi.

3.4.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, minimum, maksimum) yanı sıra nicel verilerin karşılaştırılmasında ve normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4.BULGULAR

4.1.KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm deneklerin gözlerinde başarılı bir şekilde kornea neovaskülarizasyonu modeli oluşturuldu ve tüm denekler çalışmaya dahil edildi. On dördüncü günde biyomikroskopik muayeneleri yapıldı ve ön segment fotoğrafları değerlendirildi. Deneklerin hiçbirinde kullanılan kimyasal maddelere karşı gelişmiş toksik yan etki tespit edilmedi. Tüm denekler için kornea neovaskülarizasyonu yüzdesi hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Tüm deneklerin kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Kornea neovaskülarizasyonu yüzdesi en az grup 3'te tespit edilmiştir ve bunu sırasıyla grup 5, grup 4, grup 2 ve grup 1 takip etmiştir. (Şekil 5). Grup 3, grup 4 ve grup 5'teki kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri, sadece koterizasyon yapılan grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p_{1,2,3}=0.004$) (Tablo 3). Yine grup 3, grup 4 ve grup 5'teki kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri, DMSO uygulanmış olan grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p_{1,3}=0.004$; $p_2=0.016$) (Tablo 3).

Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.003$). Gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında grup 4'ün kornea neovaskülarizasyonu yüzdesi, Grup 3 ve Grup 5'e göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p_1=0.004$; $p_2=0.006$). Grup 3 ile Grup 5'in arasında ise kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.228$).

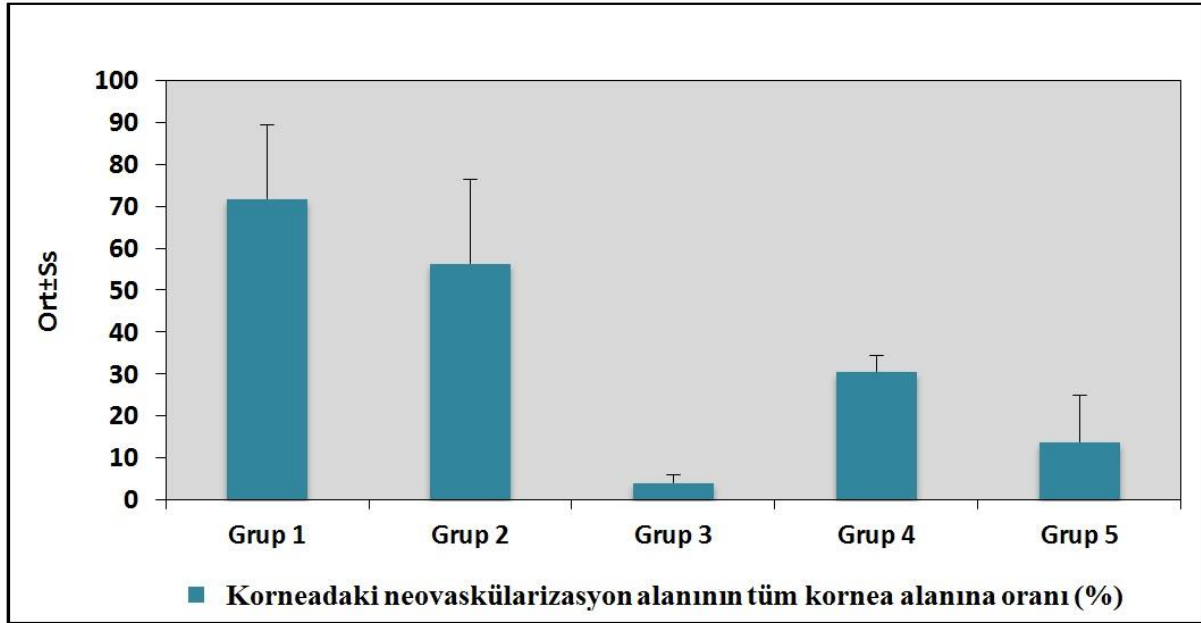
Kornea Neovaskülarizasyonu Yüzdeleri (%)

Gruplar	n	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma	p_1	p_2
Grup 1 Kontrol	7	51.1	91.2	71.80	17.58	-	-
Grup 2 DMSO	8	32.3	77.7	56.47	19.95	-	-
Grup 3 Bevacizumab	8	2.4	7.1	4.05	1.93	0.004	0.004
Grup 4 Dovitinib	8	25.8	35.6	30.67	3.68	0.004	0.016
Grup 5 Bevacizumab + Dovitinib	8	1.2	27.8	13.70	11.08	0.004	0.004

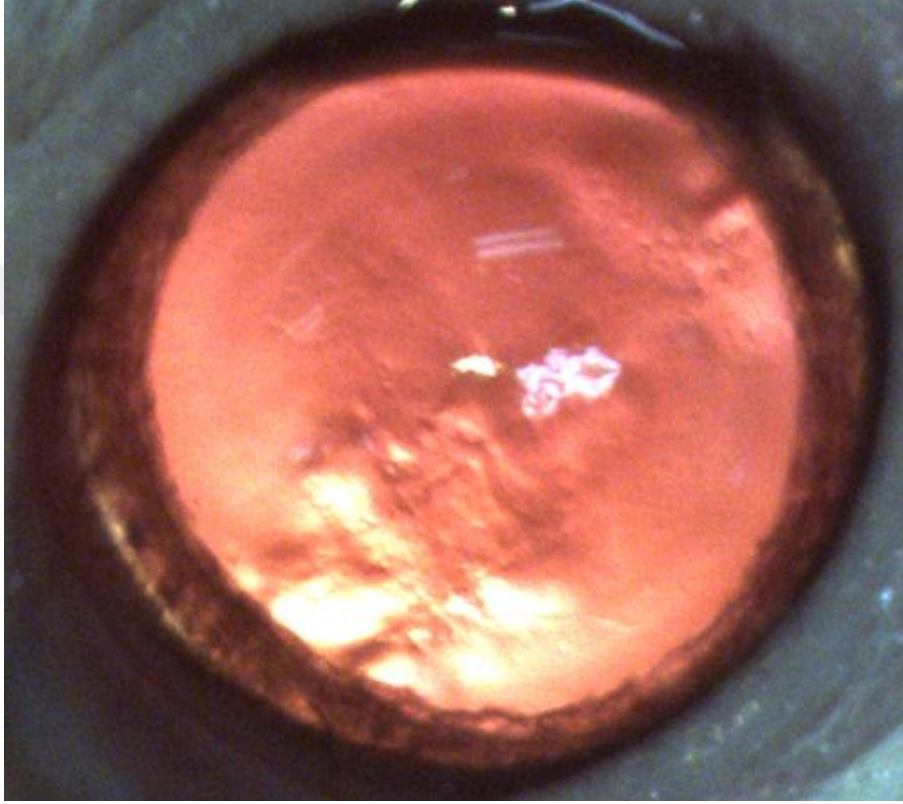
p_1 : Grup 3,4 ve 5 ile Grup 1 arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir.

p_2 : Grup 3,4 ve 5 ile Grup 2 arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir.

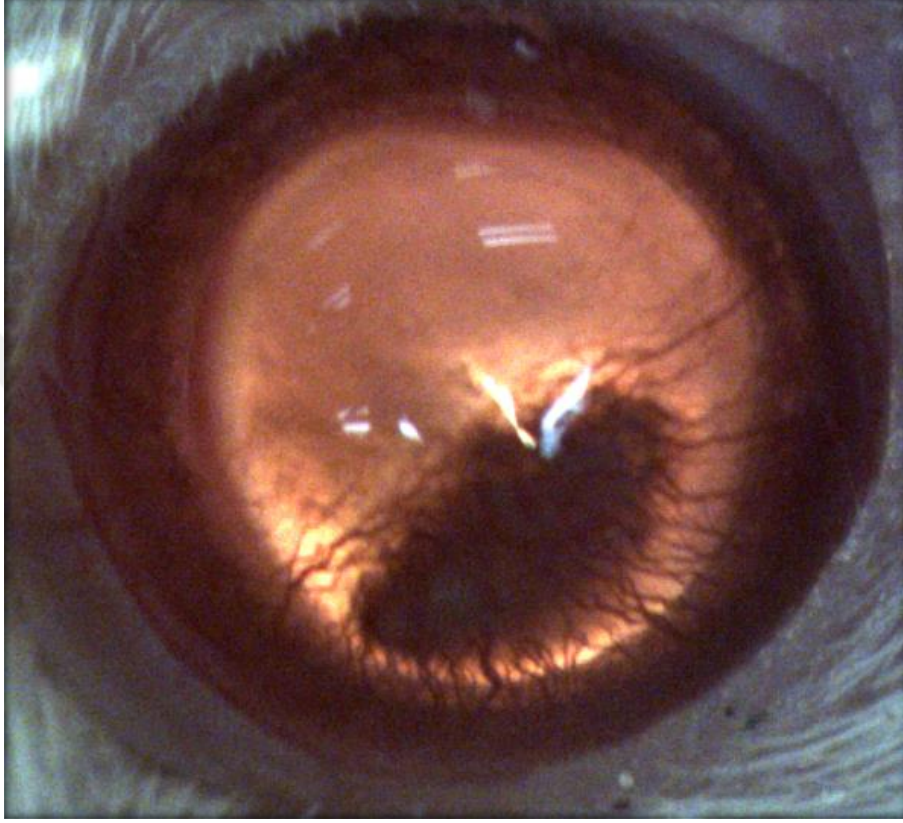
Tablo 3: Tüm gruptaki kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri ve istatistiksel değerler gösterilmiştir.



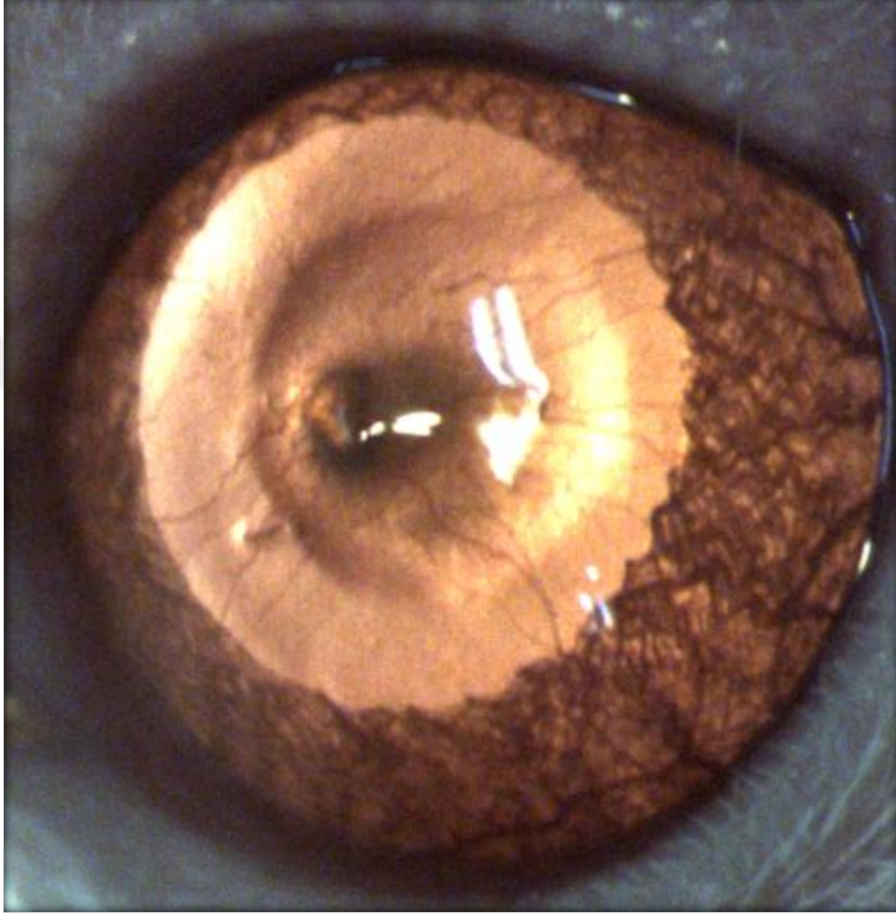
Sekil 5: Sadece koterizasyon yapılan (Grup 1), DMSO uygulanan (Grup 2), bevacizumab (5 mg/ml) uygulanan (Grup 3), dovitinib uygulanan (Grup 4) ve bevacizumab (5 mg/ml) + dovitinib (5 mg/ml) uygulanan gözlerde 14. günde çekilen fotoğraflardaki kornea neovaskülarizasyonu yüzdeleri (%).



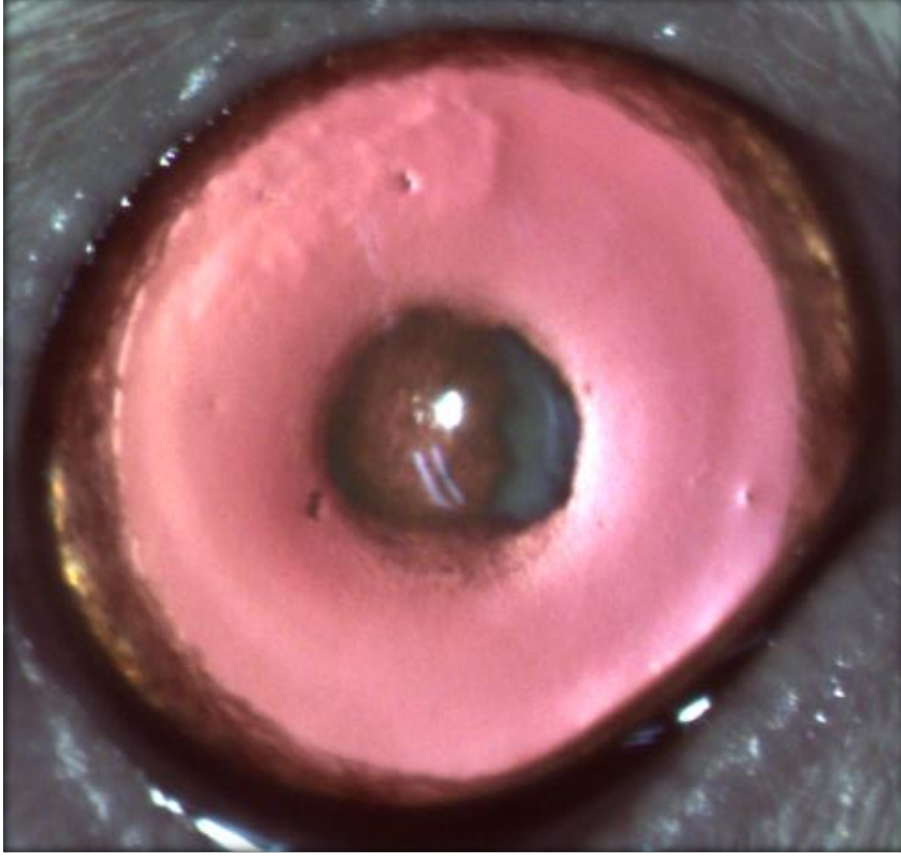
Resim 3: Hiçbir işlem uygulanmamış sol gözden 14. günde çekilen fotoğrafta damarsız kornea görünümü



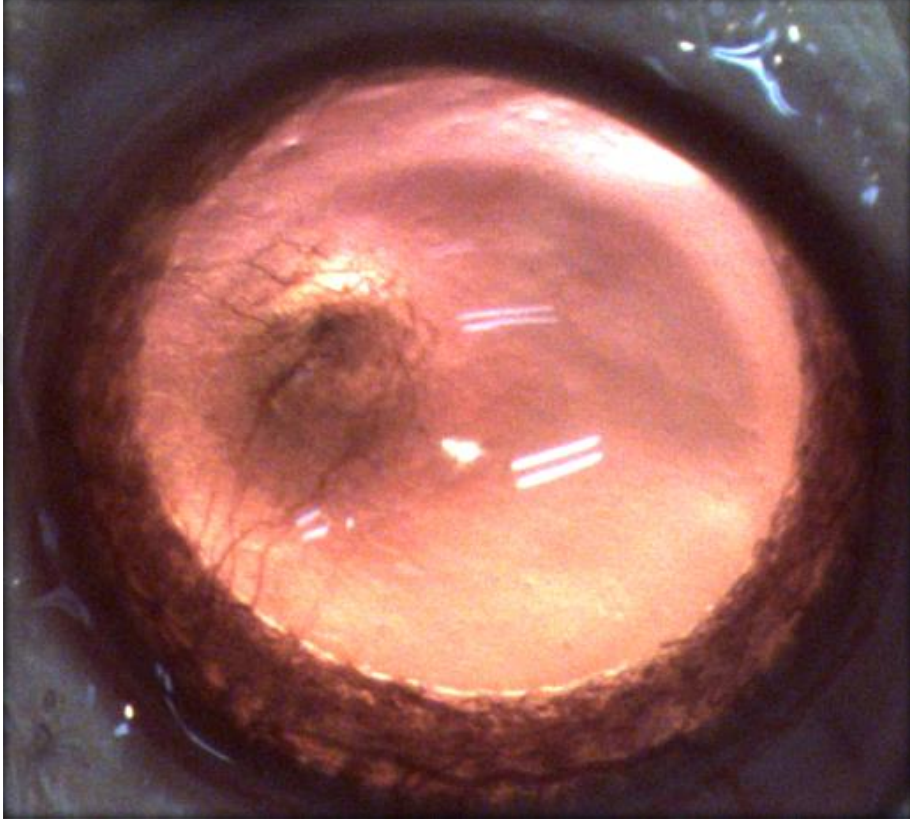
Resim 4: Kontrol grubunda (sadece kimyasal koterizasyon yapılan grup) bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu



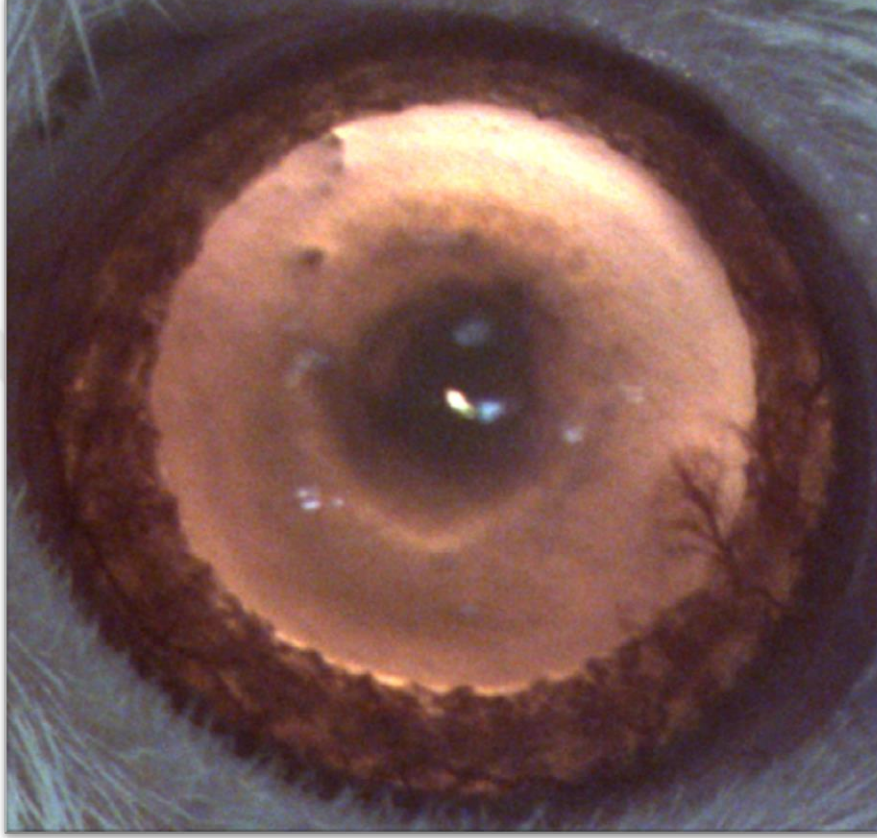
Resim 5: DMSO grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskülarizasyonu



Resim 6: Bevacizumab grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskülarizasyonu



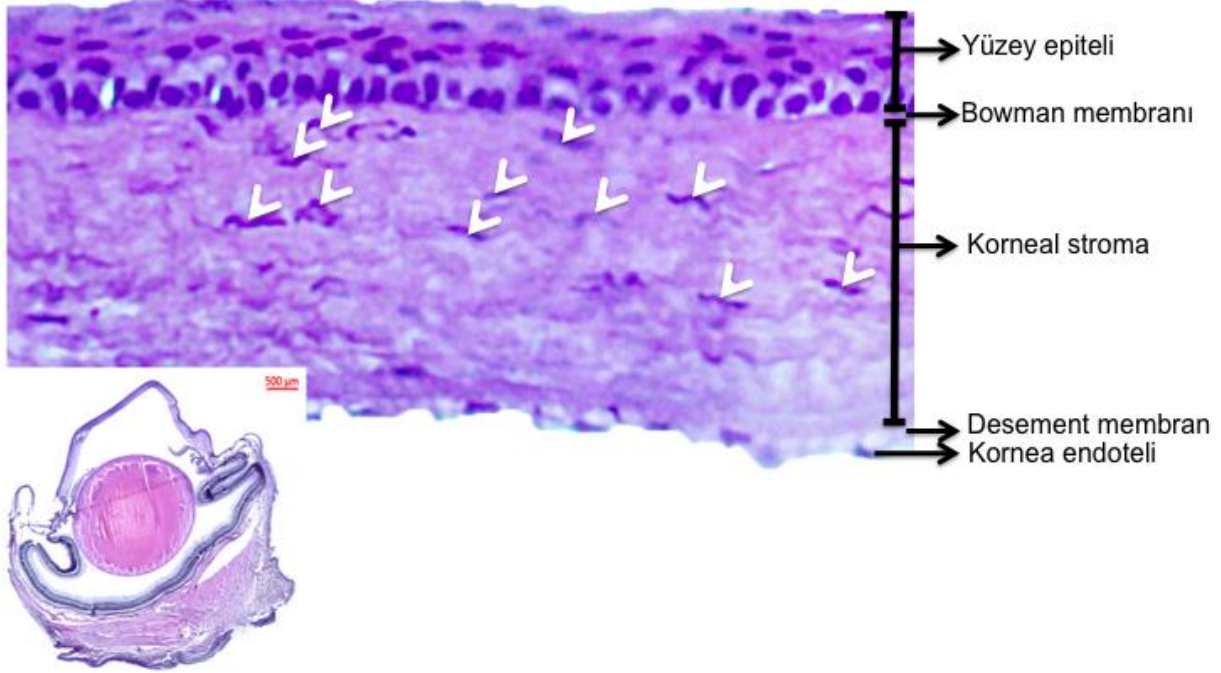
Resim 7: Dovitinib grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskülarizasyonu



Resim 8: Bevacizumab + dovitinib grubunda bulunan bir sıçanın sağ gözünden 14. günde çekilen fotoğrafta görülen kornea neovaskularizasyonu

4.2.HİSTOLOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

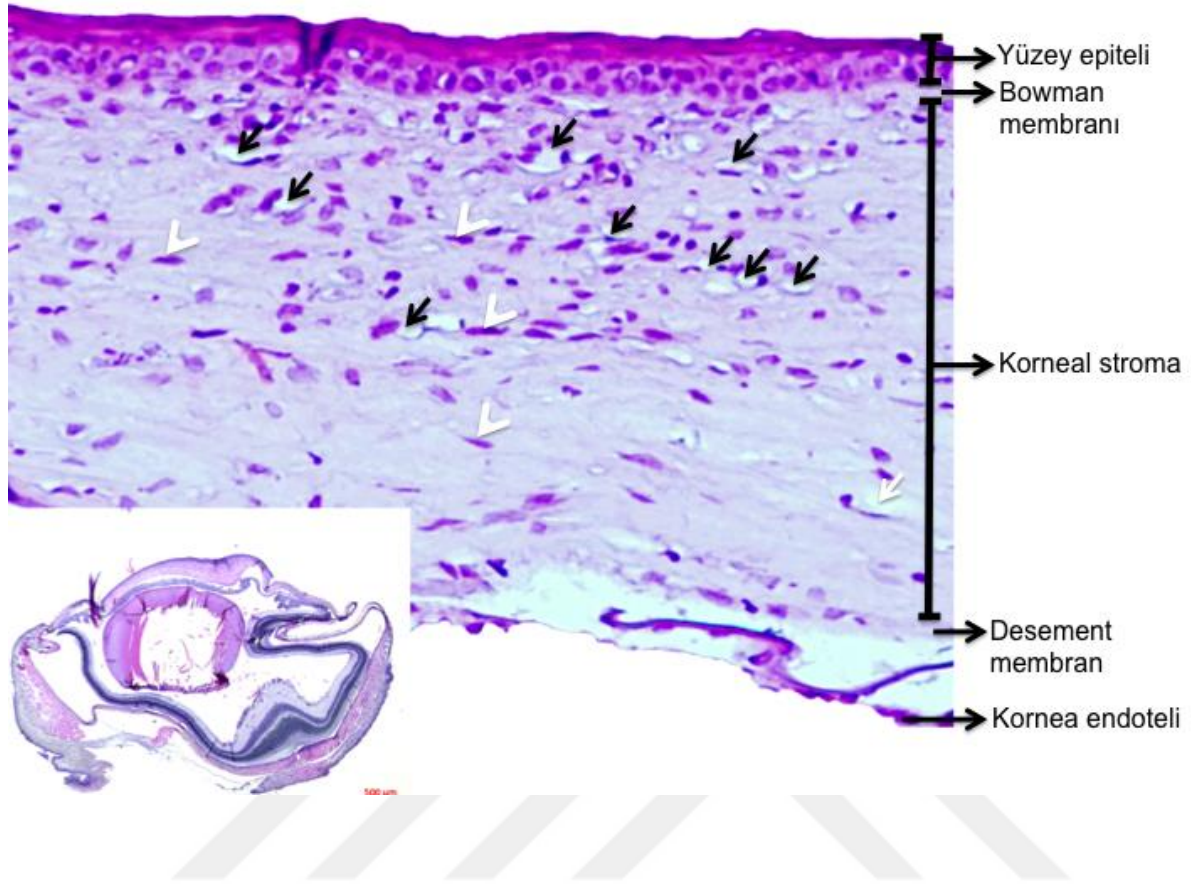
Bütün deneklerin işlem yapılan sağ korneaları histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Buna ek olarak hiçbir işlem yapılmayan sol korneaları da kontrol olarak kullanılmıştır.



Resim 9: Herhangi bir işlem yapılmadan alınan gözün (küçük resim) ve gözün korneasının tabakaları görülmektedir. **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X.

Hiçbir işlem yapılmayan sıçan gözünden alınan kesitte, korneanın 5 histolojik tabakası izlenmektedir. Yüze bakan tabaka yüzey epiteli tabakası olup 5-6 sıra epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Yüzey epiteli tipik olarak çok katlı yassı epitelidir. Epitelin altında korneaya dayanıklık sağlayan ve açık bir bant şeklinde izlenen Bowman membranı (ön sınırlayıcı membran) bulunmaktadır. Korneal stroma korneanın en geniş tabakası olarak izlenmektedir. Kalın kollajen lifler birbirine paralel olarak düzenlenmiştir ve kollajen liflerin arasında yerleşen uzamış şekilli ve koyu mor renkteki çekirdekleri ile ayırt ettiğimiz fibroblast hücreleri görülmektedir (beyaz ok başları). Fibroblast hücreleri korneal stroma tabakasına homojen bir şekilde dağılmıştır. Korneal stromanın en önemli özelliği damar içermemesidir. Descemet membran diğer bir deyişle arka sınırlayıcı membran, ince kollajen liflerden oluşan homojen bir yapı olarak görülmektedir ve stroma ile altındaki endotel hücreleri arasında bir sınır oluşturduğu izlenmektedir (Resim 9).

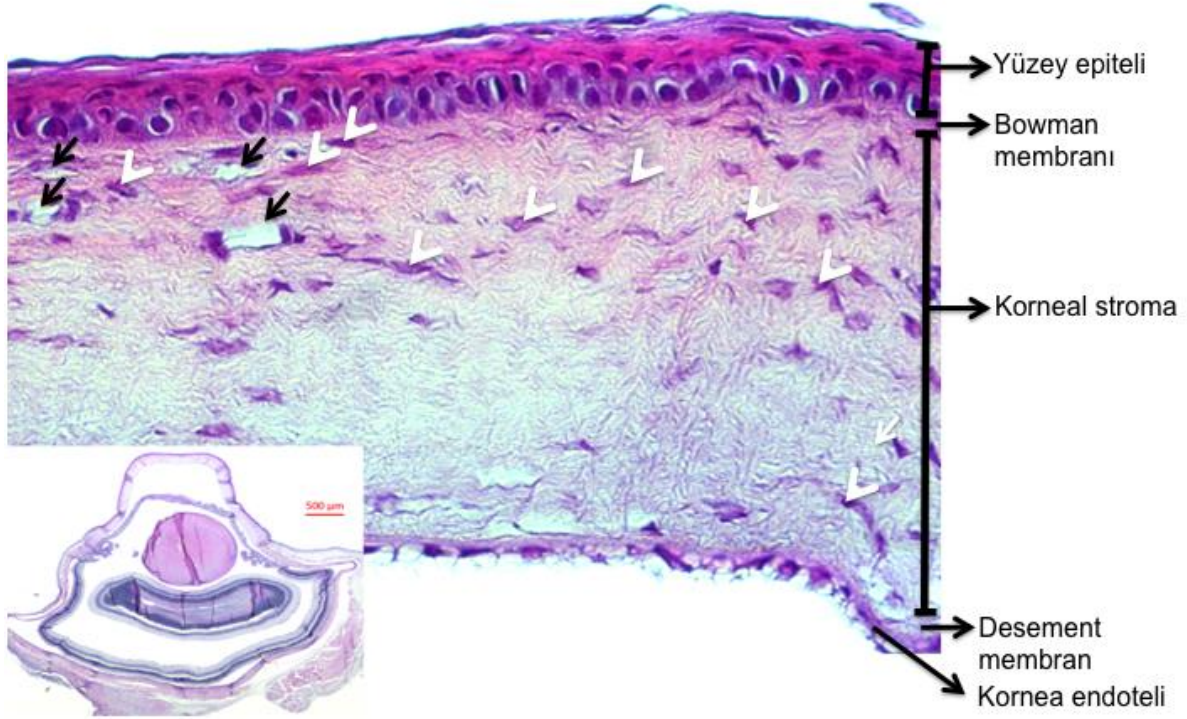
Grup 1: Gümüş Nitrat ile Kimyasal Koterizasyon Yapılan Grup



Resim 10: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün beklenen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X.

Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün beklenen 1. grupta yüzey epitelinde keratinizasyon olduğu izlendi. Bowman membranında herhangi bir değişiklik gözlenmezken, korneal stromada fibroblastların sayıca arttığı (beyaz ok başları) ve stromal alan boyunca heterojen bir dağılım sergiledikleri gözlemlendi. Yassı çekirdeklerin yanı sıra oval çekirdeğe sahip hücreler de belirlendi. Yine kornea stromasında yoğun bir damarlanma (siyah oklar) olduğu izlendi. Descemet membran ve kornea endotelinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık belirlenmedi (Resim 10).

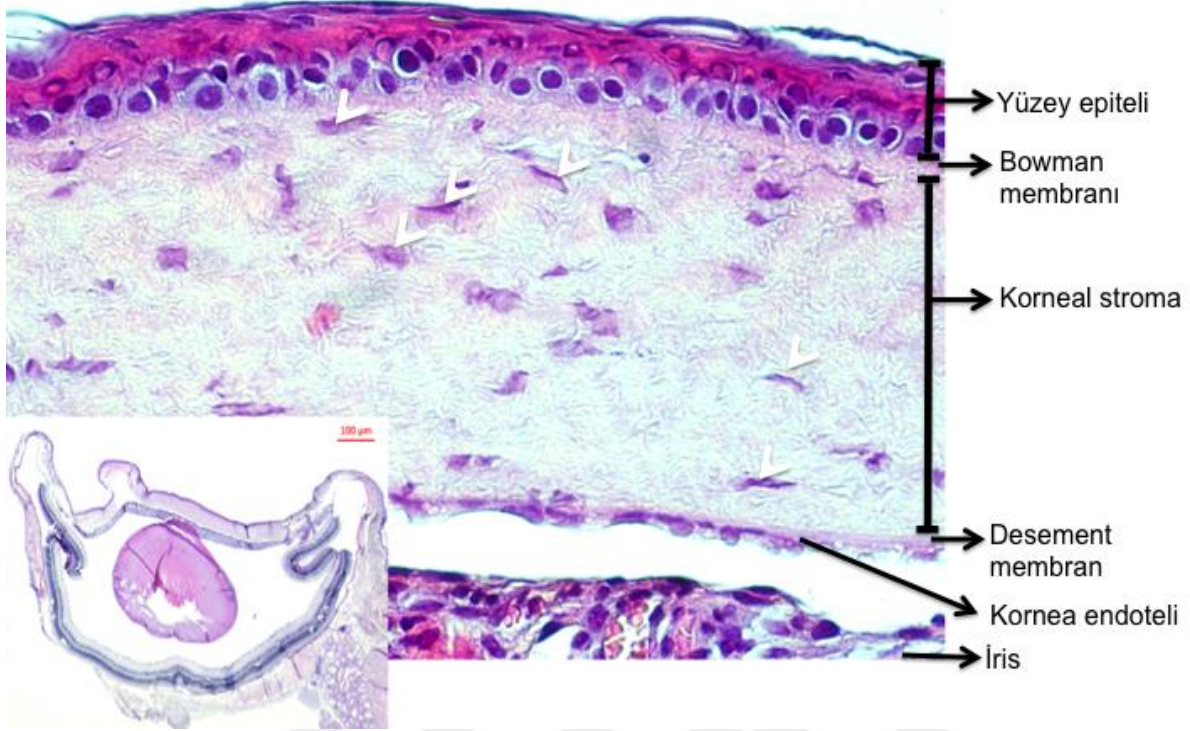
Grup 2: Dimetilsülfoksit (DMSO) Verilen Grup



Resim 11: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca DMSO verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X.

Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca DMSO verilen 2. grupta korneanın yüzey epitelinde keratinizasyon belirlendi. Epitelin altında yer alan Bowman membranında herhangi bir değişiklik izlenmezken, korneal stromada damarlanma (siyah oklar) olduğu gözlemlendi. Stromal alanda izlenen fibroblast hücrelerinin (beyaz okbaşları) yoğunluğunda azalma gözlenirken bu hücrelerin genel olarak Bowman membranı altındaki alanda yoğunlaşarak heterojen bir görünüm oluşturdukları belirlendi. 2. grupta Descemet membran ve kornea endotelinin, kontrol grubu ile aynı özelliklere sahip olduğu izlendi (Resim 11).

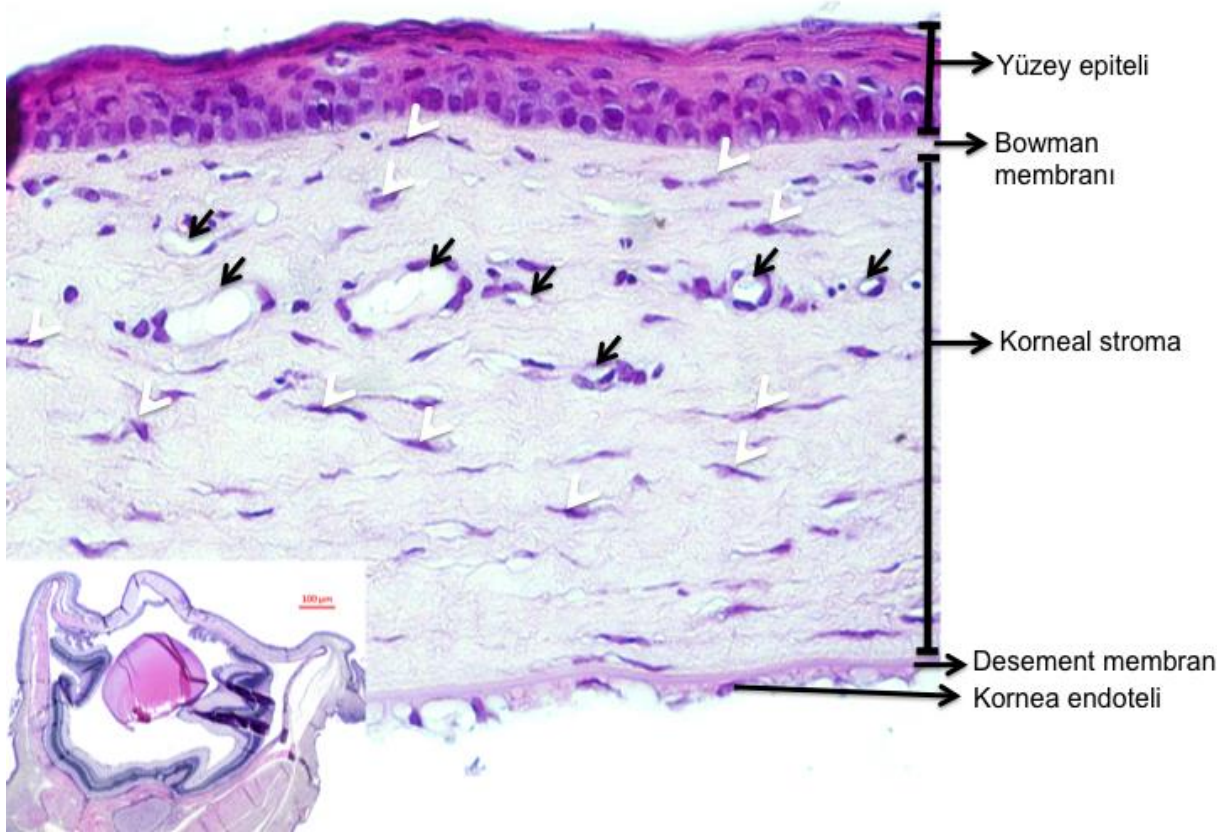
Grup 3: Bevacizumab (5mg/ml) Verilen Grup



Resim 12: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca bevacizumab (5 mg/ml) verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X.

Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca bevacizumab (5mg/ml) verilen 3. grupta yüzey epitelinde keratinizasyon belirlendi. Epitelin altında yer alan ve korneaya dayanıklılık sağlayan Bowman membranı hücresiz, kalın ve açık renkli homojen bir bant şeklinde izlendi. Korneal stromada fibroblastların stromal alan boyunca homojen bir şekilde dağılım gösterdiği (beyaz ok başları) gözlemlendi. 14 gün boyunca 5mg/ml bevacizumab verilen grupta korneal stromada hemen hemen hiç damar belirlenmedi. Kollajen liflerden oluşan Descemet membran pembe homojen bir hat şeklinde izlenirken, gerek Descemet membranın gerekse kornea endoteli tabakasının kontrol grubu ile aynı özelliklere sahip olduğu gözlemlendi (Resim 12).

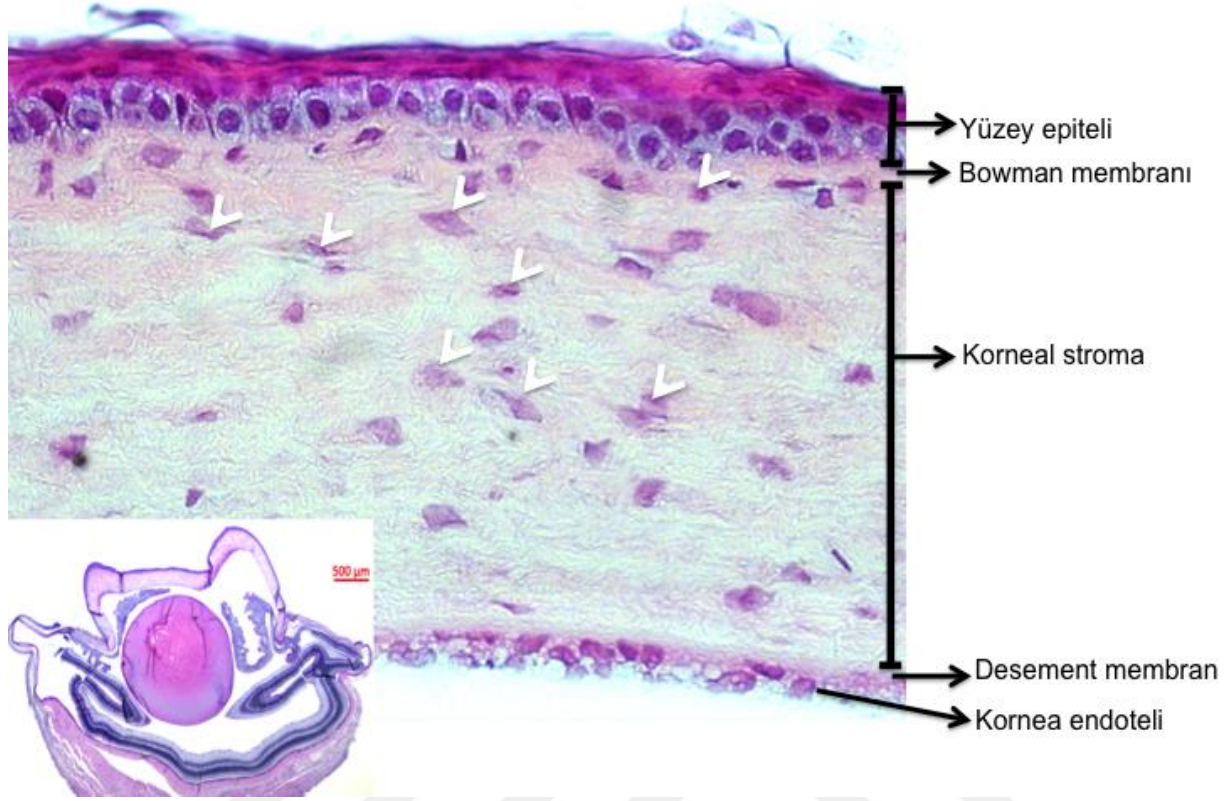
Grup 4: Dovitinib (5 mg/ml) Verilen Grup



Resim 13: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca dovitinib (5 mg/ml) verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X.

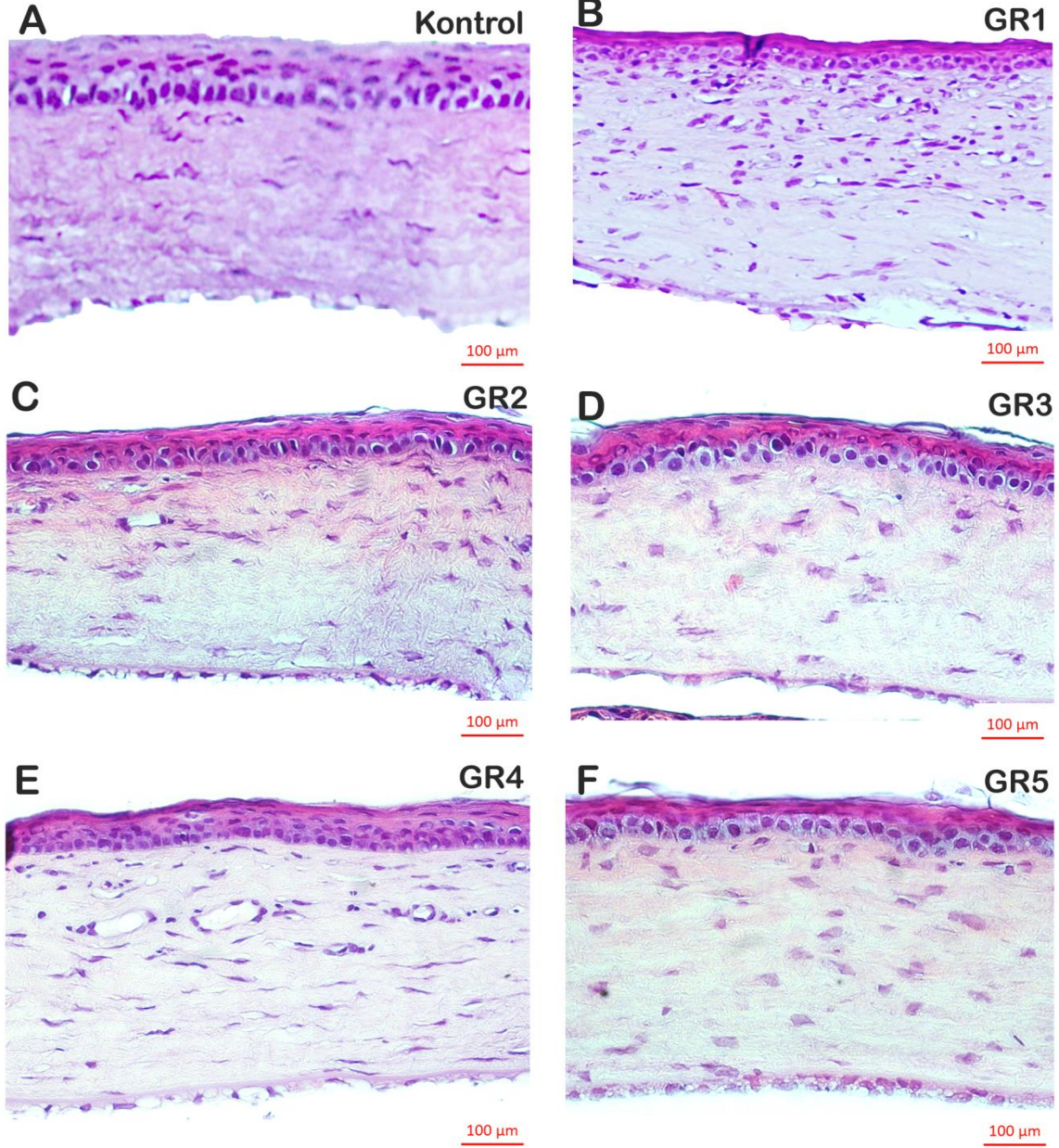
Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca dovitinib (5 mg/ml) verilen 4. grupta yüzey epitelinde keratinizasyon belirlendi. Epitelin altındaki Bowman membranı hücresiz, homojen ve açık bir bant şeklinde izlenirken, korneal stromada damarlanmaların olduğu gözlemlendi. Stromal alanda bulunan fibroblastların heterojen bir dağılım gösterdikleri ve yuvarlak çekirdekli hücrelerin de stromal alanda yer yer bulunduğu belirlendi. Descemet membran pembe homojen bir hat şeklinde izlenirken, Descemet membran ve endotel hücre tabakasının kontrol grubu ile aynı özelliklere sahip olduğu gözlemlendi (Resim 13).

Grup 5: Bevacizumab (5mg/ml) ve Dovitinib (5 mg/ml) Birlikte Verilen Grup



Resim 14: Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca bevacizumab (5 mg/ml) ve dovitinib (5 mg/ml) birlikte verilen grupta total göz (küçük resim) ve korneanın tabakaları izlenmektedir. **Siyah ok:** Damar, **Beyaz ok başı:** Fibroblast. Büyütme 40X.

Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca bevacizumab (5mg/ml) ve dovitinib (5mg/ml) birlikte verilen 5. grupta, yüzey epitelinde keratinizasyon izlendi. Epitelin altında bulunan Bowman membranı kollajen liflerden dolayı pembe bir hat şeklinde izlenirken korneal stromada damarlanmanın yok denecek kadar az olduğu belirlendi. Korneal stromal alandaki fibroblastların genel olarak homojen bir dağılım gösterdiği (beyaz ok başları) ancak çekirdeklerinin yassıdan ovale doğru değişim gösterdiği gözlemlendi. İnce kollajen liflerden oluşan Descemet membran homojen pembe bir hat şeklinde izlenirken, altındaki endotel tabakasının da kontrol grubu ile aynı özelliklere sahip olduğu belirlendi (Resim 14).



Resim 15: Tüm grupların kornea tabakalarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. **A**, Hiçbir işlem yapılmayan Kontrol grubu; **B**, Gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün beklenen 1. Grup (GR 1); **C**, DMSO verilen 2. Grup (GR 2); **D**, Bevacizumab (5 mg/ml) verilen 3. Grup (GR 3); **E**, Dovitinib (5 mg/ml) verilen 4. Grup (GR 4); **F**, Bevacizumab (5mg/ml) ve dovitinib (5 mg/ml) birlikte verilen 5. Grup (GR 5). Büyütme 40X.

Tez çalışmamızın histolojik kısmının tamamlanması ve elde edilen fotoğraflar sonucunda, gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon yapıldıktan sonra 14 gün boyunca 5 mg/ml bevacizumab verilen grupta damarlanmanın yok denilecek kadar az olduğu, korneal stromal alanda homojen dağılmış fibroblastların ve yoğun kollajen liflerin olduğu gözlemlendi. Bu özellikleri ile bevacizumab ile tedavi edilen grup, kontrol grubuna en yakın morfolojiyi gösteren grup olmuştur.



5.TARTIŞMA

Kornea neovaskularizasyonu kimyasal yanık, iskemi, enfeksiyon, travma ve inflamasyona bağlı gelişebilen ve görmeyi ileri derecede azaltabilen bir durumdur. Bazı kornea neovaskularizasyonu hastalarına keratoplasti gerekebilmektedir ve bu hastaların cerrahi sonrası prognozu, neovaskularizasyon nedeniyle daha kötüdür.

Kornea neovaskularizasyonu için mevcut tedaviler topikal kortikosteroid ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, lazer, fotodinamik tedavi, konjonktival ve limbal transplantasyondur.^{45,133,134} Bu tedavilerin hepsi sınırlı klinik etkinliğe sahiptir. Günümüzde korneal neovaskularizasyonun tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlar kortikosteroidlerdir. Kortikosteroidlerin korneal neovaskularizasyondaki etki mekanizmaları tam bilinmemekle birlikte membran fosfolipidlerinden araşidonik asit salınımını baskılayarak, prostaglandin ve lökotrien gibi enflamatuvar mediatörlerin oluşumunu azalttıkları ve bu yolla kapiller geçirgenliği ve lökosit göçünü engelleyerek anjiyogenezi inhibe ettikleri düşünülmektedir.¹³⁵ Bununla birlikte günümüzde kortikosteroidler, istenmeyen yan etkilere, özellikle göz içi basınç artışına, ve arka subkapsüler katarakta yol açabilmektedirler.^{45,133}

Neovaskularizasyonu azaltacak başka tedaviler üzerinde bugüne kadar birçok araştırma yapılmış ve farklı kimyasal maddelerin etkileri değerlendirilmiştir. Anti-VEGF ajanlar neovasküler yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, diyabetik retinopati ve neovasküler glokom gibi oküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.¹³⁶ Bevacizumab, VEGF-A'ya karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur ve etkisini VEGF-A'nın tüm izoformlarını bloke ederek göstermektedir. Literatürde bevacizumabın kornea neovaskularizasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Hosseini ve arkadaşları¹³⁷ tavşanlarda NaOH çubukları ile oluşturulan kornea neovaskularizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumabın etkinliğini değerlendirmek için iki grup oluşturmuş; birinci gruba alkali yanığı takiben hemen 2.5 mg tek doz subkonjonktival bevacizumab, ikinci gruba ise 2.5 mg tek doz subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu uygulamıştır. Üç haftalık deney süresinin sonunda muayene ve fotoğraf analizi yöntemleriyle kornealar değerlendirilmiştir. Bevacizumab grubunda kontrol grubuna göre kornea neovaskularizasyonunda %32 azalma saptanmış ve toplam neovaskularizasyon oranı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bevacizumab grubunda düşük bulunmuştur.

Bevacizumabın kornea neovaskularizasyonunu azaltmada anlamlı bir etkisi olduğu gösterilmiştir.

Ülkemizden Dursun ve arkadaşları¹³⁸ 24 adet sıçanda kimyasal yanık modeliyle kornealarında neovaskularizasyon oluşturmuşlardır. Dört gruba ayırdıkları sıçanlara sırayla suni gözyaşı damlası (sodyum karboksimetilselüloz), topikal florometalon asetat (%0.1), subkonjonktival bevacizumab (2.5 mg, 0.1 ml) ve topikal bevacizumab (5 mg/ml) uygulanmıştır. Damlalar günde 2 defa 21 gün boyunca yapılmış, subkonjonktival enjeksiyon ise bir doz uygulanmıştır. Kornea neovaskularizasyonun toplam kornea alanına oranı, bevacizumab uygulanan 3. ve 4. gruplarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Yine 3. ve 4. gruplardaki kornea neovaskularizasyonu alanı florometalon asetat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha az tespit edilmiştir. Bevacizumabın topikal uygulandığı grupta neovaskularizasyon alanı oranı, subkonjonktival uygulandığı gruba göre daha düşük bulunmuş fakat aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bevacizumabın kornea neovaskularizasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı ve bu etkisinin florometalon grubu steroidlere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bevacizumabın topikal veya subkonjonktival uygulanması arasında fark saptanmamıştır.

Yoeruek ve arkadaşları¹³⁹ NaOH ile alkali yanığına bağlı geliştirdikleri kornea neovaskularizasyonu modelinde bevacizumab tedavi gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu bulmuşlardır. Korneal opasite açısından gruplar değerlendirildiğinde erken tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düşüş saptamışlardır. Bevacizumabın kornea üzerinde herhangi bir toksik etkisi görülmemiştir. Bu sonuçlara göre bevacizumabın kornea neovaskularizasyonu üzerinde azaltıcı etkisi olduğu ve erken tedavi ile sonuçların daha iyi olacağı düşünülmüştür.

Topikal ve subkonjonktival bevacizumabın etkinliğini araştırmak için ülkemizden Ahmed ve arkadaşlarının¹⁴⁰ yaptığı bir çalışmada birinci gruba günde üç kez bevacizumab 12.5 mg/ml damla, ikinci gruba subkonjonktival 5 mg bevacizumab iki gün arayla, üçüncü gruba subkonjonktival 10 mg bevacizumab iki gün arayla ve dördüncü gruba ise subkonjonktival 0.2 ml salin enjeksiyonu olarak uygulanmıştır. Neovaskularizasyona ek olarak gözyaşı ve aköz hümeördeki VEGF seviyeleri değerlendirilmiştir. Bir hafta sonunda topikal bevacizumab tedavi gruplarında kornea neovaskularizasyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük olduğu bulunmuştur. Subkonjonktival enjeksiyondan iki gün

sonra kornea neovaskularizasyonu bevacizumab gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı daha az tespit edilmiştir. Aköz hümeör VEGF seviyeleri 7. gün ile 14. gün arasında kontrol grubunda %66 oranında artış göstermiş iken; 1. tedavi grubunda %50, 2. tedavi grubunda %70 ve 3. tedavi grubunda %76 oranında azalma tespit edilmiştir. Gözyaşındaki VEGF seviyeleri ölçüldüğünde 7. gün ile 14. gün arasında, kontrol grubunda %35 artış; sırasıyla grup 1’de %57, grup 2’de %35 ve grup 3’te %68 azalma tespit edilmiştir. Fakat aradaki fark sadece grup 1 ve grup 3 için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Subkonjonktival 5 mg/ml bevacizumab enjeksiyonun kornea neovaskularizasyonunu azaltmada etkin bir tedavi olduğu düşünülmüştür.

Bevacizumabın kornea neovaskularizasyonu üzerinde anlamlı bir azaltıcı etkisi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Bizim çalışmamızda bevacizumab ise 5 mg/ml dozunda 14 gün boyunca günde 2 defa topikal olarak uygulanmış ve tedaviye kornea neovaskularizasyonu modeli oluşturulduktan 12 saat sonra yani erken dönemde başlanmıştır. On dört gün sonunda deney sonlandırılmış ve an az kornea neovaskularizasyonu 5 mg/ml bevacizumab tedavisi uygulanan grupta tespit edilmiştir. İkinci en az kornea neovaskularizasyonu ise 5 mg/ml bevacizumab ve 5 mg/ml dovitinibin birlikte uygulandığı grup olmuştur. Fakat bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0.228$).

Bevacizumabın yanısıra benzer şekilde anti-VEGF etki gösteren başka maddelerin etkisi de deneysel modeller üzerinde araştırılmıştır. Hürmeriç ve arkadaşları¹⁴¹ 21 kobayda oluşturdukları deneysel kornea neovaskularizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanip sodyumun etkinliğini değerlendirmişlerdir. Birinci gruba subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu, ikinci gruba subkonjonktival 1 mg bevacizumab, üçüncü gruba subkonjonktival 0.15 mg pegaptanib sodyum enjeksiyonu yapılmıştır ve 10 gün sonra deney sonlandırılmıştır. Kornea neovaskularizasyonun yüzey alanı, kontrol grubunda %74, bevacizumab grubunda %60, pegaptanib grubunda %83 olarak tespit edilmiştir. Histolojik değerlendirmede kornea vaskularizasyonu derecesi kontrol grubunda 13.1, bevacizumab grubunda 8.9, pegaptanib grubunda 12.7 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak kornea neovaskularizasyonunun azaltılmasında bevacizumab, pegaptanibe göre daha etkili bulunmuştur.

Ranibizumab, bevacizumab oluşturmak için kullanılan aynı antikorun Fab kısmıdır ve VEGF-A'ya daha yüksek bir afinite ile bağlanır. Neovasküler yaşa bağlı maküla dejenerasyonu tedavisinde her ikisinin benzer etkinlik gösterdiğini bildiren çalışmalar yapılmıştır.^{137,142} Dursun ve arkadaşları¹⁴³ çalışmalarında NaOH çubukları ile kornealarını koterize ettikleri 15 sıçanı 3 gruba ayırmışlar ve sırasıyla subkonjonktival salın, 2.5 mg bevacizumab ve 1 mg ranibizumab uygulamışlardır. Üç hafta sonra biyomikroskopik bulguları ve kornea fotoğraflarını değerlendirdiklerinde bevacizumab ve ranibizumabın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak neovaskülerizasyonu azalttıklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca bevacizumab grubunda kornea neovaskülerizasyon alanı, en uzun damar boyu ve korneal opaste skoru ranibizumab grubuna göre daha düşük bulunmuş fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bevacizumab gibi ranibizumabın da kornea neovaskülerizasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiş fakat iki ilaç arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Kanser tedavisinde kullanılan anjiyogenez inhibitörlerinin kornea neovaskülerizasyonu üzerinde de etkili olacağı düşünülmüştür ve bu etki ilk olarak 1971 yılında bir hayvan çalışması incelenmiştir.¹³³ Bevacizumab, metastatik kolon kanserinde kullanılan ve bu endikasyonla 2004 yılında FDA onayı almış bir ilaçtır. Benzer şekilde kanser tedavisinde kullanılan diğer anjiyogenez inhibitörlerinin de kornea neovaskülerizasyonu üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Tirozin kinaz inhibitörleri, tirozin kinaz reseptörleri üzerinden etki gösteren ve bağlandıkları reseptörün işlevine göre anjiyogenezini inhibe edebilen moleküllerdir.

Sorafenib hepatoselüler kanser ve ileri renal hücreli kanser tedavisinde kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Etkisini neovaskülerizasyonda rol oynayan VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR üzerinden göstermektedir.^{15,144} Seo ve arkadaşlarının¹⁴⁴ sıçanlarda yaptıkları deneysel çalışmada, kornea santraline gümüş nitrat çubukları kimyasal koterizasyon uygulayarak kornea neovaskülerizasyonu modeli oluşturulmuştur. Daha sonra sıçanları kontrol, düşük doz sistemik sorafenib (30 mg/kg/gün), yüksek doz sistemik sorafenib (60 mg/kg/gün) olmak üzere 3 gruba ayırmışlardır. Kornea neovaskülerizasyonu, kornea görüntü analizi, fosforile ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)) ve VEGFR-2 mRNA ekspresyonu ölçülerek değerlendirilmiştir. Görüntü analizinde kornea neovaskülerizasyonundaki azalma, kontrol grubuna göre düşük doz sorafenib grubunda %44

ve yüksek doz sorafenib grubunda %66 bulunmuştur. Sorafenib tedavisi uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre fosforile ERK ekspresyonu artmışken ve VEGFR-2 mRNA ekspresyonu daha az bulunmuştur. Bu çalışmada çok hedefli tirozin kinaz inhibitörü olan ve VEGFR-2, VEGFR-3 ve PDGFR'yi inhibe eden sorafenib oral uygulama ile kullanılmıştır. Sorafenibin kornea neovaskülarizasyonunu anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Sunitinib, VEGFR-2 ve PDGFR- β 'yi inhibe eden bir tirozin kinaz inhibitörüdür, neovaskülarizasyon üzerindeki etkisi birçok deneysel çalışmada araştırılmıştır. Perez-Santonja ve arkadaşları¹¹ deneysel kornea neovaskülarizasyonu modelinde tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında topikal bevacizumab (5 mg/ml) ve sunitinibin (0.5 mg/ml) etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada korneaya 5 adet sütür konularak neovaskülarizasyon oluşturulmuş ve 14 gün boyunca günde 3 defa tedavi amaçlı topikal uygulama yapılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında korneada neovaskülarizasyonlu alan bevacizumab tarafından %29 ve sunitinib tarafından %82 inhibe edilmiştir. Korneada neovaskülarizasyonlu bölge yüzdesi sunitinib uygulanan grupta bevacizumab grubuna göre daha azdır. Bu çalışmada topikal uygulama ile sunitinibin neovaskülarizasyon inhibisyonunda bevacizumaba göre 3 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Ko ve arkadaşları¹² tavşanlarda korneaya sütür atılması yöntemiyle oluşturdukları kornea neovaskülarizasyonu modelinde, subkonjonktival ve topikal bevacizumab ve sunitinibin etkilerini araştırmışlardır. Subkonjonktival enjeksiyon gruplarında; birinci gruba 0.1 ml salin, ikinci gruba 2.5 mg/0,1 ml bevacizumab ve üçüncü gruba 0.25 mg/0.1 ml sunitinib enjeksiyonunu 1 hafta ara ile toplamda 2 defa uygulamışlardır. Topikal tedavi gruplarında; dördüncü gruba salin, beşinci gruba 5 mg/ml bevacizumab ve altıncı gruba 0.5 mg/ml sunitinib damlayı 2 hafta boyunca günde 2 defa uygulamışlardır. Korneada neovaskülarizasyonlu alan yüzdesi sunitinib uygulanan gözlerde bevacizumab ve kontrol grubuna göre hem subkonjonktival hem de topikal uygulama için anlamlı şekilde daha az bulunmuştur. Ayrıca sunitinib tedavisinde topikal uygulamanın subkonjonktival uygulamaya göre daha etkin olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda tüm tedavi gruplarına 14 gün boyunca günde 2 defa topikal uygulama yapılmıştır ve topikal uygulama ile tüm tedavi gruplarında (bevacizumab, dovitinib ve bevacizumab + dovitinib gruplarında) kornea neovaskülarizasyonu etkin bir şekilde azaltılmıştır ($p_{1,2,3}=0.004$).

Tirozin kinaz inhibitörleri ailesinden olan regorafenib, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 ve PDGFR- β 'yi inhibe etmektedir. Ülkemizden Önder ve arkadaşları¹³ sıçanlarda NaOH kullanarak oluşturdukları kornea neovaskülarizasyonu modelinde topikal regorafenib (1 mg/ml), bevacizumab (5 mg/ml) ve deksametazon fosfatın (%0.1) etkilerini karşılaştırmışlardır. En az kornea neovaskülarizasyonlu alan deksametazon grubunda olmasına rağmen bevacizumab ve regorafenib gruplarına göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aktif caspase-3 hücre sayısı regorafenib grubunda ve deksametazon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha az bulunmuştur. Bu çalışmada regorafenibin kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde parsiyel etkin bir tedavi olduğu sonucuna varılmıştır.

Pazopanib VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR ve FGFR'yi inhibe eden bir tirozin kinaz inhibitördür. Amparo ve arkadaşları¹⁴⁵ prospektif çalışmalarında, stabil KNV'si olan 20 hastaya topikal pazopanib tedavisi uygulamışlardır. Üç hafta boyunca %0.5 topikal pazopanib damlatılmış olan hastalar, 12 hafta takip edilmişlerdir. Üçüncü haftada başlangıca göre neovasküler alanda ve vasküler uzunlukta istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit etmişlerdir. On ikinci haftada neovasküler alanda, invazyon alanında ve vasküler uzunlukta yine anlamlı azalma bulmuşlardır. Bu çalışmada topikal pazopanibin kornea neovaskülarizasyonunu anlamlı bir biçimde azalttığı ve tedavi boyunca hastalarda herhangi bir yan etki görülmediği bildirilmiştir.

Anti-VEGF ajanların stabil olmuş eski neovaskülarizasyondan daha çok aktif, yeni oluşmuş neovaskülarizasyonda etkin olduğu bir çok çalışmada bahsedilmiştir.^{45,146,147} Korneada yeni oluşan damarlardaki endotel hücreleri zaman içerisinde perisitlerle ve düz kas hücreleriyle kaplanırlar.^{72,148-150} Cursiefen ve arkadaşları⁷² 2 hafta içerisinde endotel hücrelerini peristlerle %80 oranında kaplanmış olduğunu bildirmişlerdir. Yakın zamanda yayınlanan tavşanlarda yapılmış bir çalışmada kornea neovaskülarizasyonunun engellenmesinde erken ya da geç uygulanan subkonjonktival enjeksiyonun etkisi incelenmiş ve altta yatan mekanizmalar tartışılmıştır.¹⁵¹ Çalışmada tavşanlarda kornea neovaskülarizasyonu modeli oluşturulmuştur. Erken tedavi grubuna hemen, geç tedavi grubuna ise 1 ay sonra haftalık 5 mg bevacizumab subkonjonktival enjeksiyon uygulanmıştır. İmmün boyama yöntemiyle bevacizumabın intrakorneal difüzyonu ve neovaskülarizasyon çevresindeki perisitler ve düz kas hücreleri incelenmiştir. Bununla birlikte anti-makrofaj antikoru, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 ve vasküler endotel hücrelerindeki apoptozis de

değerlendirilmiştir. İntrakorneal bevacizumab difüzyonu incelendiğinde gruplar arasında farklı olmadığı görülmüştür. Bevacizumabın erken tedavi grubunda makrofaj infiltrasyonunu ve VEGF-1 ve VEGF-2 ekspresyonunu engellediği, geç tedavi grubunda ise engellemediği gözlenmiştir. Kornea neovaskülarizasyonun erken tedavi grubunda geç tedaviye göre önemli oranda daha az olduğu tespit edilmiştir. Korneada neovaskülarizasyonu azaltmak anti-VEGF tedavinin erken dönemde başlanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda da tüm tedavi edici ajanlar (bevacizumab, dovitinib, bevacizumab+dovitinib) erken dönemde (kornea neovaskülarizasyonu modeli oluşturduktan 12 saat sonra) topikal olarak uygulanmaya başlanmıştır. Tedavi sonrası bevacizumab, dovitinib ve bevacizumab + dovitinib gruplarındaki kornea neovaskülarizasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p_{1,2,3}=0,004$).

Kornea neovaskülarizasyonunda VEGF'in yanı sıra PDGF ve FGF'nin de rol oynadığını bilinmektedir. Bevacizumab sadece VEGF-A'yı inhibe ederken; dovitinib VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, VEGFR-4, FGFR-1, FGFR-3, PDGFR tirozin kinazlarını inhibe eden çok hedefli tirozin kinaz inhibitörüdür.^{9,10} Çalışmamız, neovaskülarizasyon mekanizmasında daha çok molekül inhibe edilerek kornea neovaskülarizasyonun daha başarılı bir şekilde azaltılabileceği düşünülerek tasarlanmıştır. Deney sonunda yapılan incelemelerde dovitinibin etkin bir şekilde kornea neovaskülarizasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Kornea neovaskülarizasyonu kontrol grubunda %71.80±17.58 bulunmuşken dovitinib grubunda %30,67±3,68 bulunmuştur ($p=0,004$). Deneklerde herhangi toksik bir etkinin görülmemesi dovitinibin bu amaçla kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte bevacizumab bu amaçla klinikte kullanılan bir ilaçtır ve hem literatürde hem de çalışmamızda kornea neovaskülarizasyonunu etkin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki kornea neovaskülarizasyonu %71.80±17.58 bulunmuşken bevacizumab grubunda %4.05±1.93, bevacizumab + dovitinib grubunda %13.70±11.08 bulunmuştur ($p_{1,2}=0.004$). Bevacizumab ve bevacizumab + dovitinib gruplarında kornea neovaskülarizasyonu yüzdesi, dovitinib grubuna göre anlamlı bir şekilde daha az tespit edilmiştir ($p_1=0.004$ ve $p_2=0.006$). Bevacizumab ile bevacizumab + dovitinib grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.228$). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde kornea neovaskülarizasyonunu en etkin şekilde bevacizumabın inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Literatürde de çalışmamızla uyumlu olarak bevacizumabın 5 mg/ml dozda topikal uygulama ile başarılı bir şekilde kornea neovaskülarizasyonunu azalttığı bildirilmiştir.^{11-13,138} Fakat dovitinib kornea neovaskülarizasyonunu azaltmak amacıyla ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmış ve tedavi dozu olarak 5 mg/ml tercih edilmiştir. Çalışmamızda dovitinibin etkin bir şekilde kornea neovaskülarizasyonunu azalttığı gösterilmiştir ($p=0,004$). Bununla birlikte dovitinib farklı dozlarda farklı etki gösterebilir ve kornea neovaskülarizasyonunu azaltmada bevacizumabtan istatistiksel olarak daha az etkili bulunmasının sebebi doz yetersizliği olabilir. Bunun için dovitinibin farklı dozlardaki etkilerinin araştırılacağı deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda takip süresi 2 hafta idi ve benzer şekilde literatürdeki çalışmalarda da takip süresi kısa olduğundan sonuçlar kısa dönem için geçerlidir. Ayrıca korneaya uygulanan kimyasal maddelerin oftalmik ve sistemik yan etki profilleri hem kısa dönem hem de uzun dönem için ayrıntılı bir şekilde araştırılmalıdır. Kornea neovaskülarizasyonun önlenmesinde oftalmik ve sistemik etki ve yan etkilerin anlaşılabilmesi için daha uzun takip süreli deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Amac: Kornea neovaskularizasyonu tedavisinde bevacizumab ve dovitinibin neovaskularizasyon azaltıcı etkilerinin karşılaştırılması

Gereç ve Yöntem: Ağırlığı 180-250 gram arasında değişen 39 adet erişkin dişi Sprague-Dawley sıçanlar denek olarak kullanıldı. Tüm sıçanların sağ gözlerine gümüş nitrat ile kimyasal koterizasyon uygulanarak kornea neovaskularizasyonu modeli oluşturuldu. Kimyasal koterizasyon sonrası tüm sıçanlar randomize olarak 5 gruba ayrıldı. Grup 1'e hiçbir kimyasal madde uygulanmadı. Grup 2'ye dimetilsülfoksit, Grup 3'e 5 mg/ml bevacizumab, Grup 4'e 5 mg/ml dovitinib, Grup 5'e mg/ml bevacizumab+ 5 mg/ml dovitinib günde 2 defa 14 gün boyunca topikal olarak uygulandı. On dördüncü günde, biyomikroskopik muayeneleri yapıldı ve ön segment fotoğrafları çekildi. Bilgisayar görüntü analizi programı ile ön segment fotoğraflarındaki neovaskularizasyonlu kornea alanı, kornea total alanının yüzdesel değeri olarak hesaplandı. Histopatolojik incelemeler için kornea kesitleri hematoksilin eozin ile boyandı.

Bulgular: Kornea neovaskularizasyonu yüzdesi tüm tedavi gruplarında (Grup 3, Grup 4 ve Grup 5) kontrol grubuna (Grup 1) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az bulundu ($p<0,01$). Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in kornea neovaskularizasyonu yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.003$). Grup 4'ün kornea neovaskularizasyonu yüzdesi, Grup 3 ve Grup 5'e göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p_1=0.004$; $p_2=0.006$). Grup 3 ile Grup 5'in arasında ise kornea neovaskularizasyonu yüzdeleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.228$). Sonuçlar histopatolojik bulgular ile uyumlu bulundu.

Sonuç: Dovitinib yeni geliştirilen (faz 4) çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Topikal dovitinibin (5 mg/ml) kornea neovaskularizasyonunu etkin bir şekilde inhibe ettiği fakat bu etkisinin topikal bevacizumaba (5 mg/ml) göre daha az etkili olduğu sonucuna varıldı.

ABSTRACT

Objective: To compare the inhibitory effects of dovitinib and bevacizumab for treatment of corneal neovascularization.

Material and Methods: Thirty nine adult female Sprague -Dawley rats weighing 180-250 g were used. Corneal neovascularization was induced by silver nitrate in the right eyes of each rat. After chemical burn, the animals were randomized into five groups. Group 1 did not receive any chemical substance. Group 2 received dimethyl sulfoxide, Group 3 received bevacizumab 5 mg/ml, Group 4 received dovitinib 5 mg/ml, Group 5 received bevacizumab 5 mg/ml + dovitinib 5 mg/ml topically administered twice in a day for 14 days. On the 14th day, slit-lamp examination was performed and anterior segment photographs were taken. The corneal neovascular area was measured on photographs as the percentage of the cornea's total area using computer-imaging analysis. Corneal sections were stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination.

Results: A statistically significant decrease in the percentage of corneal neovascularization was found in all treatment groups (Group 3, Group 4 and Group 5) to comparing with control group (Group 1) ($p < 0.01$). A statistically significant difference in the percentage of corneal neovascularization was found among Group 3, Group 4 and Group 5 ($p = 0.003$). Percentage of corneal neovascularization of Group 4 was significantly higher than Group 3 and Group 5 ($p_1 = 0.004$; $p_2 = 0.006$). There was no statistically significant difference in percentage of corneal neovascularization between Group 3 and Group 5 ($p = 0.228$).

Conclusion: Dovitinib is a newly developed (phase 4) multi targeted tyrosine kinase inhibitor. Topical administration of dovitinib effectively inhibited corneal neovascularization but this effect of dovitinib was found more less than topical bevacizumab.

KAYNAKLAR

1. Folkman J. History of angiogenesis. In: Figg W, Folkman J, eds. *Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine*. Springer; 2008:1-14.
2. Du Y, Chen J, Funderburgh JL, Zhu X, Li L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis*. 2003;9:635-643.
3. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo (Brooklyn)*. 1994;8:961-965.
4. Benayoun Y, Adenis J-P, Casse G, Forte R, Robert P-Y. Effects of subconjunctival bevacizumab on corneal neovascularization: results of a prospective study. *Cornea*. 2012;31:937-944.
5. DeStafeno J, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol*. 2007;128:834-836.
6. 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;34:85-91.
7. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal Model. *Am J Ophthalmol*. 2008;145.
8. Petsoglou C, Balaggan KS, Dart JKG, et al. Subconjunctival bevacizumab induces regression of corneal neovascularisation: a pilot randomised placebo-controlled double-masked trial. *Br J Ophthalmol*. 2013;97:28-32.
9. Dey JH, Bianchi F, Voshol J, Bonenfant D, Oakeley EJ, Hynes NE. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. *Cancer Res*. 2010;70:4151-4162.
10. Sivanand S, Pena-Llopis S, Zhao H, et al. A Validated Tumorgraft Model Reveals Activity of Dovitinib Against Renal Cell Carcinoma. *Sci Transl Med*. 2012;4:137ra75-137ra75.
11. Pérez-Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledó-Riquelme M, Javaloy J, Alió JL. Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (Anti-VEGF) and sunitinib (Anti-VEGF and Anti-PDGF) in an animal model. *Am J Ophthalmol*. 2010;150(4).
12. Ko BY, Kim YS, Baek SG, et al. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival and Topical Bevacizumab and Sunitinib in a Rabbit Model. *Cornea*. 2013;32:689-695.
13. Onder HI, Erdurmus M, Bucak YY, Simavli H, Oktay M, Kukner AS. Inhibitory effects of regorafenib, a multiple tyrosine kinase inhibitor, on corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol*. 2014;7:220-225.
14. Binder P, Lambert R, Moore M. Anatomical considerations for contact lens fitting in

- Contact Lenses. In: Kastl P, ed. Kendall: Hunt Publishing Company; 1995:1-118.
15. Wilhelmus K, Huang A, Hwwang D, Parrish C, Sutpuin J, Whitsett J. External Disease and Cornea Basic Science Course. *Am Acad Ophthalmol*. 2000;8(11-13-54).
 16. Maloney RK, Bogan SJ, Waring GO. Determination of corneal image-forming properties from corneal topography. *Am J Ophthalmol*. 1993;115:31-41.
 17. Ozdamar A, Aras C, Sener B. Epithelial deposits after hyperopic LASIK. *J Cataract Refract Surg*. 2000;26:632.
 18. Akyol F. Kornea anatomisi. In: *Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları - Kornea*. ; 2009:13-20.
 19. Waltman S, Hart W. The cornea. In: Moses RA, Hart WM, eds. *Adler's Physiology of the Eye*. 8th edition. St. Luis: The C.V. Mosby Company; 1987:36-45.
 20. Sugar J. Cornea and external disease. In: Yanoff M, Duker J, Augsburger J et al, eds. *Ophthalmology*. 2nd edition. St. Luis: Mosby; 2004:413-501.
 21. Akova Y, Yaycıoğlu R. Kornea hastalıklarına giriş, kornea iltihapları, diğer keratitler. In: Aydın P, Akova Y, eds. *Temel Göz Hastalıkları*. 3. baskı.; 2015:235-236.
 22. Pepose, JS. Ubels J. Cornea and Sclera. In: *Adler's Physiology of the Eye*. 10th edition. St. Louis: Mosby; 2003:59-92.
 23. Kanski J, Bowling B. Cornea. In: Kanski J, Bowling B, eds. *Kanski Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*. 7th edition. Philedephia: Elseiver; 2011:250.
 24. Kaufman H. The corneal endothelium in intraocular surgery. *J R Soc Med*. 1980;73:165-171.
 25. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:50-57.
 26. Meyer PA. The circulation of the human limbus. *Eye*. 1989;3:121-127.
 27. Bock F, Maruyama K, Regenfuss B, et al. Novel anti(lymph)angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2013;34:89-124.
 28. Aharinejad S, MacDonald I, Schmidt E, Böck P, Hagen D, Groom A. Scanning and transmission electron microscopy and high resolution intravital video-microscopy of capillaries in the mouse exocrine pancreas, with special emphasis on endothelial cells. *Anat Rec*. 1993;237:163-167.
 29. Ragan DMS, Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC. Spontaneous cyclic contractions of the capillary wall in vivo, impeding red cell flow: A quantitative analysis. Evidence for endothelial contractility. *Microvasc Res*. 1988;36:13-30.
 30. Eğrilmez S. Kornea embriyolojisi. In: *Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları - Kornea*; 2009:21-25.
 31. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, et al. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea*. 1995;14:604-609.

32. Erie JC, Nevitt MP, Hodge DO, Ballard DJ. Incidence of ulcerative keratitis in a defined population from 1950 through 1988. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1993;111:1665-1671.
33. WHO. Trachoma. [Http://www.who.int/blindness/causes/trachoma/en/](http://www.who.int/blindness/causes/trachoma/en/). Published 2009.
34. Cursiefen C, Kruse F. New aspects of angiogenesis in the cornea. *Essentials Ophthalmol*. 2006;83-89.
35. Broocker G, Aaron M, Kim J. Injury to the eye. In: Feliciano, DV. Mattox, KL. Moore E, ed. *Trauma*. 6th edition. McGraw Hill Professional; 2007:419-435.
36. Cogan D. Vascularization of the Cornea. Its Experimental Induction by Small Lesions and a New Theory of Its Pathogenesis. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1948;46:457-471.
37. Langham M. Observations on the growth of blood vessels into the cornea; application of a new experimental technique. *Br J Ophthalmol*. 1953;37:210-222.
38. Levene R, Shapiro A, Baum J. Experimental corneal vascularization. *Arch Ophthalmol*. 1963;70:242-249.
39. Lin HC, Chang JH, Jain S, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2517-2524.
40. Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. In: *Matrix Biology*. Vol 22.; 2003:63-71.
41. Ambati BK, Patterson E, Jani P, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br J Ophthalmol*. 2007;91:505-508.
42. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006;443:993-997.
43. Chen H, Ikeda U, Shimpo M, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble FLT-1 gene. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:498-502.
44. Cursiefen C, Maruyama K, Jackson DG, Streilein JW, Kruse FE. Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation. *Cornea*. 2006;25:443-447.
45. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: An epidemiologic review. *Surv Ophthalmol*. 1998;43:245-269.
46. Tshionyi M, Shay E, Lunde E, et al. Hemangiogenesis and lymphangiogenesis in corneal pathology. *Cornea*. 2012;31:74-80.
47. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001;12:242-249.
48. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review. *Surv Ophthalmol*. 2012;57:415-429.

49. Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA, et al. Clinical correlates of common corneal neovascular diseases: a literature review. *Int J Ophthalmol*. 2015;8:182-193.
50. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439-442.
51. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995;333:1757-1763.
52. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*. 2002;21:33-49.
53. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol*. 2000;11:617-624.
54. Klagsbrun M, A. D'Amore P, D'Amore P a. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1996;7:259-270.
55. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer*. 2005;41:1109-1116.
56. 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.
57. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;161:851-858.
58. Kaiser PK. Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases. *Am J Ophthalmol*. 2006;142(4).
59. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel D V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309.
60. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246(1309-1312).
61. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93:1493-1495.
62. Shams N, Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am*. 2006;19:335-344.
63. Konopatskaya O, Churchill A, Harper S, Bates D, Gardiner T. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis*. 2006;12:626-632.
64. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-794.
65. Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1542-1547.

66. Witmer A. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:1-29.
67. Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265:19461-19466.
68. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest.* 1992;89:244-253.
69. 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 (80-).* 1992;255:989-991.
70. Cross M, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 2003;28:488-494.
71. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-676.
72. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Küchle M, Schlötzer-Schrehardt U. Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. *Br J Ophthalmol.* 2003;87:101-106.
73. Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest.* 2005;115:2363-2372.
74. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 2004;113:1040-1050.
75. Fukumoto A, Maruyama K, Walsh T, et al. Intracellular thiol redox status regulates lymphangiogenesis and dictates corneal limbal graft survival. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2450-2458.
76. Mimura T, Amano S, Usui T, Kaji Y, Oshika T, Ishii Y. Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis. *Exp Eye Res.* 2001;72:71-78.
77. Nakao S, Hata Y, Miura M, et al. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced corneal neovascularization: role of nuclear factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol.* 2007;171:1058-1065.
78. Sivak JM, Ostriker AC, Woolfenden A, et al. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem.* 2011;286:44965-44975.
79. Tong JP, Yao YF. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions. *Clin Biochem.* 2006;39:267-276.
80. Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: Role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res.* 2006;83:473-483.
81. Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in

- ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:182-189.
82. Lin R, Rosenfeld P. Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin.* 2007;47:117-137.
 83. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25:581-611.
 84. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol.* 2000;156:1733-1739.
 85. Jin KL, Mao XO, Greenberg D a. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:10242-10247.
 86. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.* 2001;28:131-138.
 87. Kilic U, Kilic E, Järve A, et al. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci.* 2006;26:12439-12446.
 88. Maciag T, Mehlman T, Friesel R. Heparin Binds Endothelial Cell Growth Factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science (80-).* 1984;225:932-934.
 89. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:159-178.
 90. Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, et al. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* 1998;17:5896-5904.
 91. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, et al. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ.* 1996;7:147-160.
 92. Auguste P, Gürsel D, Lemièrè S, et al. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* 2001;61:1717-1726.
 93. Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299:1073-1085.
 94. Jo N, Mailhos C, Ju M, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol.* 2006;168:2036-2053.

95. Jones I, Meyer K. Inhibition of vascularization of the rabbit cornea by local application of cortisone. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1950;74:102-104.
96. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:1954-1962.
97. Williams J. Squalamine, a new angiostatic steroid. In: Teicher B, ed. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy.* Totowa: N. J. Humana Press; 1999:153-174.
98. Boneham G, Collin H. Steroid inhibition of limbal blood and lymphatic vascular cell growth. *Curr Eye Res.* 1995;14:1-10.
99. McNatt L, Weimer L, Yanni J, Clark A. Angiostatic activity of steroids in the chick embryo CAM and rabbit cornea models of neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1999;15:413-423.
100. Suzuki T, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S. Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on cytokine production by human corneal epithelial cells. *Curr Eye Res.* 2000;20:127-130.
101. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S. Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:154-158.
102. Harvey PT, Cherry PM. Indomethacin v. dexamethasone in the suppression of corneal neovascularization. *Can J Ophthalmol.* 1983;18:293-295.
103. Haynes W, Hirakata A, Proia A. Inhibition of corneal neovascularization in the rat by SK&F 86002, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism. *Exp Eye Res.* 1992;55:189-191.
104. Haynes W, Proia A, Klintworth G. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:1588-1593.
105. Frucht J, Zauberman H. Topical indomethacin effect on neovascularisation of the cornea and on prostaglandin E2 levels. *Br J Ophthalmol.* 1984;68:656-659.
106. Liu XH, Kirschenbaum a, Yao S, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17:687-694.
107. Fosslien E. Review: Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 2001;31:325-348.
108. Dempke W, Rie C, Grothey a, Schmolz HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001;127:411-417.
109. Yamada M, Kawai M, Kawai Y, Mashima Y. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Curr Eye Res.* 1999;19:300-304.
110. Edelman J, Castro M, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the

- growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:1112-1123.
111. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med.* 1998;4:376-383.
 112. Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe P. A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis.* 2002;5:35-44.
 113. Jia WD, Xu GL, Sun HC, Wang L, Xu RN, Xue Q. Effect of octreotide on angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma in vivo. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003;2:404-409.
 114. Abbas A, Khan B, Feroze AH, Hyman GF. Thalidomide prevents donor corneal graft neovascularization in an alkali burn model of corneal angiogenesis. *J Pak Med Assoc.* 2002;52:476-482.
 115. Cohen R, Gebhardt B, Bazan N. A platelet-activating factor antagonist reduces corneal allograft inflammation and neovascularization. *Curr Eye Res.* 1994;13:139-144.
 116. Dana R. Comparison of topical interleukin-1 vs tumor necrosis factor-alpha blockade with corticosteroid therapy on murine corneal inflammation, neovascularization, and transplant survival (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2007;105:330-343.
 117. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, Becker MD, Völcker HE. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998;236:461-466.
 118. Matsumura K, Hirashima M, Ogawa M, et al. Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3. *Blood.* 2003;101:1367-1374.
 119. Burton JB, Priceman SJ, Sung JL, et al. Suppression of prostate cancer nodal and systemic metastasis by blockade of the lymphangiogenic axis. *Cancer Res.* 2008;68:7828-7837.
 120. Cheng H-C, Yeh S-I, Tsao Y-P, Kuo P-C. Subconjunctival injection of recombinant AAV-angiostatin ameliorates alkali burn induced corneal angiogenesis. *Mol Vis.* 2007;13:2344-2352.
 121. Whitehurst B, Flister M, Bagaitkar J, et al. Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model. *Int J Cancer.* 2007;121:2181-2191.
 122. Nirankari VS, Dandona L, Rodrigues MM. Laser photocoagulation of experimental corneal stromal vascularization. Efficacy and histopathology. *Ophthalmology.* 1993;100:111-118.
 123. VS. N. Laser photocoagulation for corneal stromal vascularization. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1992;90:595-669.

124. Primbs GB, Casey R, Wamser K, Snyder WJ, Crean DH. Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1998;29:832-838.
125. Gohto Y, Obana A, Kanai M, Nagata S, Nakajima S, Miki T. Treatment parameters for selective occlusion of experimental corneal neovascularization by photodynamic therapy using a water soluble photosensitizer, ATX-S10(Na). *Exp Eye Res*. 2001;72:13-22.
126. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S, et al. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1995;102:1020-1025.
127. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:431-441.
128. Kim J, Tseng S. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol*. 1995;9:32-46.
129. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19:348-352.
130. Wakabayashi T, Oshima Y, Sakaguchi H, et al. Intravitreal Bevacizumab to Treat Iris Neovascularization and Neovascular Glaucoma Secondary to Ischemic Retinal Diseases in 41 Consecutive Cases. *Ophthalmology*. 2008;115:1571-1580.
131. Hsu J, Kaiser RS, Sivalingam A, et al. Intravitreal bevacizumab (avastin) in central retinal vein occlusion. *Retina*. 2007;27:1013-1019.
132. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, et al. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in the Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology*. 2006;113(10).
133. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-1186.
134. Cursiefen C, Chen L, Dana MR, Streilein JWJ. Corneal Lymphangiogenesis: Evidence, Mechanisms, and implication for corneal transplant immunology. *Cornea*. 2003;22:273-281.
135. Wu P-C, Liu C-C, Chen C, et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003;241:63-69.
136. Tolentino M. Systemic and Ocular Safety of Intravitreal Anti-VEGF Therapies for Ocular Neovascular Disease. *Surv Ophthalmol*. 2011;56:95-113.
137. 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 Exp Ophthalmol*. 2007;35:745-748.
138. Dursun A, Arıcı M, Topalkara A, et al. Alkali Yanığına Bağlı Gelişen Korneal Anjiogenez Modelinde Topikal, Subkonjonktival Bevacizumab ve Florometolon Asetatın Topikal Uygulanması. *Turk J Ophthalmol*. 2010;40:318-322.
139. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, et al. Safety, penetration and efficacy of

- topically applied bevacizumab: Evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol.* 2008;86:322-328.
140. Ahmed A, Berati H, Nalan A, Aylin S. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. *Clin Exp Ophthalmol.* 2009;37:730-736.
 141. Hürmeriç V, Erdurman F, Mumcuoğlu T, et al. Deneysel kornea neovaskularizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanib sodyum enjeksiyonunun etkinliğinin karşılaştırılması. *Turk J Ophthalmol.* 2009;39:348-353.
 142. Pieramici DJ, Rabena MD. Anti-VEGF therapy: comparison of current and future agents. *Eye (Lond).* 2008;22:1330-1336.
 143. Dursun A, Arici M, Dursun F, et al. Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int J Ophthalmol.* 2012;5:448-451.
 144. Seo JW, Chung S-H, Choi J-S, Joo C-K. Inhibition of corneal neovascularization in rats by systemic administration of sorafenib. *Cornea.* 2012;31:907-912.
 145. Amparo F, Sadrai Z, Jin Y, et al. Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:537-544.
 146. Papathanassiou M, Theodoropoulou S, Analitis a, Tzonou a, Theodossiadis PG. Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization: a meta-analysis. *Cornea.* 2013;32:435-444.
 147. Cursiefen C, Küchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea.* 1998;17:611-613.
 148. 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.
 149. Motiejunaite R, Kazlauskas A. Pericytes and ocular diseases. *Exp Eye Res.* 2008;86:171-177.
 150. Lin C, Hu F, Kuo K, et al. The different effects of early and late bevacizumab (Avastin) injection on inhibiting corneal neovascularization and conjunctivalization in rabbit limbal insufficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:6277-6285.
 151. Chen W, Chen Y, Chu H, et al. Mechanisms controlling the effects of bevacizumab (avastin) on the inhibition of early but not late formed corneal neovascularization. *PLoS One.* 2014;9:e94205.