

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

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
LAPATİNİB VE TRASTUZUMAB'IN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehmet Kaan KAYA**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Tamer DEMİR**

**ELAZIĞ
2010**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi Standartları'na uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tamer DEMİR

Tez Danışmanı

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Sn. Doç. Dr. Tamer DEMİR, Sn. Doç. Dr. Orhan AYDEMİR, Sn. Yard. Doç. Dr. Burak TURGUT başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalışmama katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Tamer DEMİR'e, Sn. Doç. Dr. Nusret AKPOLAT ve Sn. Prof. Dr. Hakan BULUT'a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım asistan doktor arkadaşlarıma ve kliniğimiz personeline teşekkür ederim.

Ayrıca sıkıntılı zamanlarımda desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Neovaskularizasyon normal büyüme fizyolojisi ve homeostatik mekanizmalar için gerekli olan, ancak saydam korneada görmeyi tehdit eden bir durumdur. Bu çalışmanın amacı deneysel kornea neovaskularizasyonunda Trastuzumab ve Lapatinib'in etkisini karşılaştırmaktır.

Her biri yedi Wistar albino rat içeren beş grup oluşturuldu. Ratların sağ kornea santraline gümüş nitrat ile koterizasyon yapılarak yanık oluşturuldu. Grup I'(kontrol) deki kornealara koterizasyon ve tedavi uygulanmadı. Grup II'(sham) deki ratlara sistemik salin, grup III'(Lapatinib) tekilere 50mg/kg Lapatinib oral lavaj ile verildi. Grup IV'(Trastuzumab) deki ratlara ise 4mg/kg Trastuzumab intraperitoneal verildi. Grup V'(Lapatinib+Trastuzumab) dekilere ise 50mg/kg Lapatinib oral olarak lavaj ile ve 4mg/kg Trastuzumab intraperitoneal olarak beraber verildi. Tüm ratlar yedi gün tedavi edildi. Sekizinci günde korneal fotoğraflar çekilip, yeni damarlar ile kaplı kornea yüzeyinin tüm kornea alanına yüzdesi ölçüldü ve ratlar dekapite edilerek korneaları 4mm'lik panç yardımıyla alındı. Tüm kornealar eşit iki parçaya bölündü ve parçalardan birisinde, Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF) immün boyanması korneanın epitel ve stroma tabakalarında semikantitatif olarak değerlendirildi. Diğer yarısında ise korneal VEGF düzeyleri ELİSA yöntemi ile değerlendirildi.

Neovaskularizasyon alanlarının tüm korneaya yüzdesi, tedavi gruplarında, sham grubundan ($p<0.05$) anlamlı olarak daha düşük saptandı. Grup III ve Grup V benzer oranlara sahipken Grup IV'den daha düşük tespit edildi. Tüm tedavi gruplarında ortalama VEGF immün boyanma yoğunlukları ve VEGF ELİSA düzeyleri sham grubundan daha az olmasına karşın kontrol grubu ile benzer düzeyde tespit edildi. Korneal VEGF ELİSA düzeyleri ve immün boyanma oranları Grup III ve V'de benzer iken Grup IV'den düşük olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, sistemik Lapatinib ve Trastuzumab uygulanması korneal neovaskularizasyonu engellemede etkilidir. Sistemik Lapatinib ve Trastuzumab uygulanması aynı zamanda neovaskularizasyonun önemli ajanlarından olan VEGF düzeylerini de azaltmaktadır. Lapatinib, Trastuzumab'dan daha etkili olmasına rağmen Lapatinib ile Trastuzumab'ın beraber kullanımı tek başına Lapatinib ile benzer etki gücüne sahiptir.

Anahtar kelimeler: Kornea neovaskularizasyonu, Lapatinib, Trastuzumab, VEGF

ABSTRACT

THE EFFECTS OF LAPATINIB AND TRASTUZUMAB IN EXPERIMENTAL CORNEAL NEOVASCULARIZATION

Neovascularization is a part of normal growth physiology and homeostatic mechanisms, but in the transparent cornea it may result in a sight-threatening condition. The aim of this study is to compare the effects of Trastuzumab and Lapatinib in experimental corneal neovascularization.

Five groups which contained seven Wistar albino rats were formed. A silver nitrat pencil was applied on the right cornea of the rats and cauterized for corneal neovascularization. Corneas in group I (control) were not cauterized and not given any treatment. Rats in group II (sham) were received systemic saline and in group III (Lapatinib) were received 50 mg/kg Lapatinib orally by gavage. Rats in group IV (Trastuzumab) were administered 4 mg/kg Trastuzumab intraperitoneally. In group V (Lapatinib+Trastuzumab) rats were also received 50 mg/kg Lapatinib orally by gavage and 4 mg/kg Trastuzumab intraperitoneally together. All the rats were treated for seven days. Corneal photographs were taken on the 8th day and the corneal surface covered with neovascular vessels was measured on the photographs as the percentage of the total area of the cornea. All the animals were sacrificed on the 8th day and corneas were excised by using 4 mm punch. All corneas were divided into two equal parts, one which of was evaluated Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) immunostaining in epithelial and stromal layers of corneas and staining intensity was determined semicantitatively. The other part of the corneas' VEGF leves were assayed via ELISA.

The percentage of neovascularization area to the total corneal surface in all treated groups were smaller than sham group ($p<0.05$). Group III and group V were similar to each other but they were smaller than group IV. The mean VEGF immunostaining intensity and VEGF ELISA leves of corneas in treatment groups were lesser than sham group but similar to conrol group. The corneal VEGF ELISA levels and the corneal mean VEGF immunostaining intensity in group III and V were similar to each other but they were smaller than group IV.

In conclusion, systemic administration of Lapatinib and Trastuzumab is effective in prevention of corneal neovascularization. Systemic administration of Lapatinib and Trastuzumab also decreases the levels of VEGF which is the potential target for neovascularization. Lapatinib is more effective than Trastuzumab but the effect of Lapatinib plus Trastuzumab is similar to Lapatinib alone.

Key words: Corneal neovascularization, Lapatinib, Trastuzumab, VEGF

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	3
1.2.1. Kornea Anatomisi	3
1.2.1.1. Makroskopik Anatomi	3
1.2.1.2. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası	4
1.2.1.3. Mikroskopik Anatomi	4
1.2.1.3.1. Epitel ve bazal membran	5
1.2.1.3.2. Bowman zarı	6
1.2.1.3.3. Stroma tabakası	6
1.2.1.3.4. Descement membranı	7
1.2.1.3.5. Endotel tabakası	7
1.2.1.4. Limbus	8
1.2.2. Kornea Embriyolojisi	8
1.2.3. Kornea Fizyolojisi ve Vasküler Sistem	9
1.2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi	9
1.2.3.2. Epitel Fizyolojisi	9
1.2.3.3. Endotel Fizyolojisi	9
1.2.3.4. Vasküler Sistem	10
1.2.4. Kornea Yara İyileşmesi	10
1.2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi	10
1.2.4.1.1. Lag fazı	10
1.2.4.1.2. Hücre göçü	11
1.2.4.1.3. Hücre çoğalması ve farklılaşması	11

1.2.4.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi	11
1.2.4.3. Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt	12
1.2.4.4. Stroma Yara İyileşmesi	12
1.2.4.5. Endotel Yara İyileşmesi	12
1.2.5. Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	12
1.2.5.1. Yaş	12
1.2.5.2. Beslenme	13
1.2.5.3. Travma	13
1.2.5.4. Yara Apozisyonu	13
1.2.5.5. İnfeksiyon	13
1.2.5.6. Enflamasyon	13
1.2.5.7. Duyusal İnnervasyon	13
1.2.5.8. İntraoküler Basınç	13
1.2.5.9. Gözyaşının Etkisi	13
1.2.5.10. İlaçlar	13
1.2.5.10.1. Antibiyotikler	13
1.2.5.10.2. Kortikosteroidler	13
1.2.5.10.3. Lokal Anestezikler	14
1.2.5.10.4. Asetilkolin	14
1.2.5.10.5. Epinefrin	14
1.2.5.10.6. Antiviral İlaçlar	14
1.2.5.11. Fibronektin (Fn)	14
1.2.5.12. İnterlökin – 6	14
1.2.5.13. Retinoik Asit	14
1.2.6. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Medyatörler	14
1.2.6.1. Büyüme Faktörleri	14
1.2.6.1.1. Epidermal Growth Faktör	15
1.2.6.1.2. Fibroblast Growth Faktör	15
1.2.6.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta	15
1.2.6.1.4. Keratinosit Growth Faktör	16
1.2.6.1.5. Hepatosit Growth Faktör	16
1.2.6.1.6. Platelet Derived Growth Faktör	17

1.2.6.1.7. Diğer Büyüme Faktörleri	17
1.2.7. Kornea yara iyileşmesinde enflamatuvar sitokinlerin rolü	17
1.3. Kornea Neovaskülarizasyonu	17
1.3.1. Epidemioloji	18
1.3.2. Kornea Neovaskülarizasyon Fazları	20
1.3.2.1. Erken Prevasküler Faz	20
1.3.2.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı	20
1.3.2.3. Vasküler Matürasyon Fazı	21
1.3.3. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyarın Faktörler	21
1.3.3.1. Tmor Nekrozis Faktör- α	21
1.3.3.2. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör	22
1.3.3.3. Vasküler Endotelyal Growth Faktör	22
1.3.3.4. Fibroblast Growth Faktör	24
1.3.3.5. İnsülin Like Growth Faktör	24
1.3.3.6. Anjiopoetin	24
1.3.3.7. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	24
1.3.4. Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler	24
1.3.4.1. Anjiostatin	24
1.3.4.2. Endostatin	24
1.3.4.3. Pigment Epiteli Derived Faktör	24
1.3.4.4. Trombospondin-1	25
1.4. Trastuzumab	25
1.5. Lapatinib	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Anestezi Tekniği	28
2.2. Cerrahi Teknik	28
2.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi	29
2.4. Vasküler Endotelyal Growth Faktör ELİSA ile Değerlendirilmesi	29
2.5. Vasküler Endotelyal Growth Faktör İmmünohistokimyasal boyanması	30
2.6. Semikantitatif Değerlendirme (Skorlama)	30
2.7. İstatistiksel Analiz	32

3. BULGULAR	33
3.1. Neovaskularizasyon Alanlarının Karşılaştırılması	33
3.2. Epitel VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması	37
3.3. Stromal VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması	41
3.4. Korneal VEGF ELİSA Düzeyleri	42
4. TARTIŞMA	44
5. KAYNAKLAR	54
6. ÖZGEÇMİŞ	73

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Kornea Neovaskülarizasyonuna Neden Olan Hastalıklar	18
Tablo 2. Anjiogenik Faktörler	19
Tablo 3. Antianjiogenik Faktörler	20
Tablo 4. Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri	33
Tablo 6. Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri	41
Tablo 7. Gruplardaki korneal VEGF ELİSA düzeyleri ve standart sapma değerleri	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Korneanın mikroskopik anatomisi	4
Şekil 2. ErbB1, IGFR, ErbB2, Lapatinib ve Trastuzumab'ın etkileşimi	27
Şekil 3. Epitel ve stromada 1. derece boyanmanın şematize edilmesi	30
Şekil 4. Epitel ve stromada 2. derece boyanmanın şematize edilmesi	31
Şekil 5. Epitel ve stromada 3. derece boyanmanın şematize edilmesi	31
Şekil 6. Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına olan yüzdeleri	33
Şekil 7. Kontrol grubundaki bir rat korneası. Kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok ise iris kenarlarını göstermektedir.	34
Şekil 8. Sham grubunda rat korneasında totale yakın kornea neovaskülarizasyonu.	35
Şekil 9. Lapatinib grubunda olan bir denekteki santral korneal skar ve kısmi kornea neovaskülarizasyon. İnce oklar neovaskülarizasyonları, kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok iris kenarlarını göstermektedir.	35
Şekil 10. Trastuzumab grubunda olan bir denekteki santral korneal skar ve kısmi kornea neovaskülarizasyon. İnce oklar neovaskülarizasyonları, kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok iris kenarlarını göstermektedir.	36
Şekil 11. Lapatinib+Trastuzumab grubunda olan bir denekteki santral korneal skar ve kısmi kornea neovaskülarizasyonu. İnce oklar neovaskülarizasyonları, kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok iris kenarlarını göstermektedir.	36
Şekil 13. Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Boyanma epitelin bazal tabakalarında, stromanın ise tüm katlarında yoğunlaşmıştır. Skorlar; epitel: 1, stroma: 0.	38
Şekil 14. Sham grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Epitel hücrelerinin dizilimlerinin bozulduğu görülmektedir. Stromada kalınlaşma ve düzenli yapıda bozulma mevcuttur. Skorlar; epitel: 3, stroma: 3	39

- Şekil 15.** Trastuzumab grubundaki bir rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Boyanma epitelin bazal tabakalarında yoğunlaşmıştır. Skorlar; epitel: 2, stroma: 1 39
- Şekil 16.** Lapatinib tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü. Epitel ve stromanın düzenli yapısının korunduğu izleniyor. Skorlar; epitel: 1, stroma: 1 40
- Şekil 17.** Lapatinib+Trastuzumab tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü. Epitel ve stromanın düzenli yapısının korunduğu izleniyor. Skorlar; epitel: 1, stroma: 1 40
- Şekil 18.** Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma skorları. 41
- Şekil 19.** Gruplardaki korneal VEGF ELİSA düzeyleri. 43

KISALTMALAR LİSTESİ

Ang	: Anjiopietin
CEPs	: Dolaşan endotelyal progenitör hücreler
D	: Diyoptri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal growth faktör
FGF	: Fibroblast growth faktör beta
GMCSF	: Granülosit makrofaj koloni stimulan faktör
HER	: İnsan epidermal growth faktör reseptör
HGF	: Hepatosit growth faktör
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilen faktör
IGF	: İnsulin-like growth faktör
IL	: İnterlökin
KGF	: Keratonosit growth faktör
MIF	: Makrofaj migration inhibitor faktor
MMP	: Matriks metalloproteinaz
Nd: YAG	: Neodymium: Yttrium Aliminium Garnet
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NO	: Nitrik oksit
PDGF	: Platelet derived growth faktör
PEDF	: Pigment epiteli derive faktör
PG	: Prostaglandin
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
TGF-α	: Transforming growth faktör alfa
TGF-β	: Transforming growth faktör beta
TK	: Tirozin kinaz
TNF-α	: Tümör nekrotizan faktör alfa
Tsp	: Trombospondin
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
VEGF-R	: Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü
μM	: Mikrometre

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Kornea; göz küresinin santral ön kısmında yer alan 5 tabaka, 2 membran ve 3 tip hücreden oluşan şeffaf, elastik ve kubbe şeklinde dokudur. Gözün en önemli refraktif kısmını oluşturan korneanın, göze gelen ışığın iletimi için saydam olması gereklidir. Korneanın saydamlığını, kollajen lamellerinin düzenli dizilimi, kısmi dehidratasyon ve damarsız yapısı sağlamaktadır (1).

Yeni damarlar, anjiyogenez veya vaskülogenez olmak üzere farklı iki yolla oluşur. Yeni damarların de novo olarak erken embriyogenezde vasküler endotelial öncül hücreler tarafından oluşturulması vaskülogenez olarak adlandırılırken, mevcut damarlardan yenilerinin gelişimi anjiyogenez olarak adlandırılır (2). Fizyolojik anjiyogenez doku gelişimi, menstrüel döngü ve yara iyileşmesi gibi olaylarda önemli rol oynar. Gözde anjiyogenez, görmeyi tehdit eden patolojik bir süreç olarak, diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi, eksudatif yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, neovasküler glaukom ve çeşitli kornea hastalıklarında karşımıza çıkabilmektedir (3).

Kimyasal yanık, enfeksiyon, travma, kontakt lens kullanımı, immünolojik ve dejeneratif hastalıklar nedeniyle korneada yeni damarlanma olabilmektedir. Kornea neovaskülarizasyonunda rol oynayan birçok faktör tespit edilmiştir. Korneada anjiyogenik büyüme faktörlerinin salınması; inflamatuvar sitokinlerin ortaya çıkması ve hipoksi ile indüklenir. Bu faktörlerin bir kısmı kornea epitel, stroma ve endoteli tarafından üretilir (4, 5). Gözyaşı ve aköz hümör de anjiyogenik faktörler için kaynak olabilmektedir. Bazı faktörler ise lokal ve sistemik dolaşımdan korneaya gelerek neovaskülarizasyona neden olmaktadır (6).

Vasküler endotelial growth faktör proteolitik aktivite, migrasyon, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi anjiyogenezin birçok basamağında görev alır (7-9). VEGF korneada epitel hücrelerden, keratositlerden, korneal ve vasküler endotel hücrelerinden salınmaktadır. VEGF'in VEGF1 ve VEGF2 olmak üzere iki adet tirozin kinaz reseptörü vardır (7). Kornea neovaskülarizasyonunda VEGF'in önemli rol oynadığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (10-13). Son zamanlarda enflamasyon ve vaskülarize insan ve hayvan kornealarında VEGF'in artmış olduğu da gösterilmiştir (7, 14, 15).

Kornea neovaskularizasyonunun tedavisi için birçok tedavi şekli denenmiştir. Argon ve Nd:YAG lazer kullanılarak yeni oluşan damarlarda oklüzyon ile vaskularizasyonu geriletme hedeflenmiştir (16, 17). Diğer bir lazer uygulaması da pahalı ekipmanlar gerektirdiği için her klinikte uygulanamayan, verteporfin ile fotodinamik tedavidir. Uygulanan diod lazer enerjisi ile sitotoksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Bu radikaller endotel hücrelerinde hasara ve trombus oluşumu ile damar oklüzyonuna neden olmaktadır (18).

Medikal tedavi yöntemlerinin başında kortikosteroidler gelmekte, ancak kortikosteroidlerin etkinliklerinin yetersiz olması ve yan etkilerinin çokluğu kullanımlarını sınırlamaktadır. Uzamış topikal ve sistemik steroid kullanımı mikrobiyal keratitlere, duyarlı bireylerde açık açılı glokoma ve katarakt oluşumuna da neden olabilmektedir (19). Bu yüzden neovaskularizasyonun geriletilmesi için siklosporin-A, somatostatin, somatostatin analogu oktreotid, anti-tümör nekroz faktör- α , anti-interselüler adezyon molekülü, suleparoid (heparan sulfat), talidomid, suramin, genistein, rapamisin, anjiostatin, metotreksat, bevasizumab gibi doğal ve sentetik birçok madde denenmiştir (20-31). Ancak bütün bu çabalara rağmen kornea neovaskularizasyonunun önlenmesi halen önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Trastuzumab; insan epidermal growth faktörü reseptör 2 (HER-2/ErbB2) proteinine karşı geliştirilmiş bir antikordur (32). Trastuzumab meme kanserine karşı kullanılmaktadır. Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyonu, anjiyogenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir (33). EGF anjiyogenik olarak bilinir ve güçlü anjiyogenik moleküller olan VEGF ve IL-8 salınımını uyarmaktadır. Bu etkilerin hepsi EGF reseptör antagonistleri tarafından engellenebilmektedir (34). Trastuzumab'ın kornea neovaskularizasyonunu önlemede etkili olduğu da gösterilmiştir (35).

Lapatinip metastatik meme kanserine karşı tek başına veya trastuzumab ile birlikte kullanılmaktadır. Lapatinib insan epidermal growth faktör reseptör 1 (EGFR/HER1) ve insan epidermal growth faktör reseptör 2 (HER2/ErbB2) tirozin kinazını (TK) inhibe ederek sinyal iletimini önleyen çift etkili selektif inhibitördür (36). EGFR aktivasyonu ile VEGF gibi anjiyogenik moleküllerin salınımını arttarak anjiyogenezin hızlandığı bilinmektedir (37). EGFR inhibitörleri sayesinde

anjyogenezin engellenebileceği gösterilmiştir (38). Trastuzumab'a ilave olarak Lapatinib'in bazı kanser türlerinde daha etkin olduğu gösterilmiştir. HER1 ve HER2 ayrı ayrı inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği daha önceki yayınlarda gösterilmiştir (35). Lapatinib'in kornea neovaskülarizasyonunu engellediğine dair herhangi bir çalışma yoktur.

Çalışmamızın amacı; deneysel kornea yanığı sonucu ortaya çıkan neovaskülarizasyonun önlenmesidir. Bu amaçla anjyogenezde önemli görevleri olduğu bilinen insan epidermal growth faktör reseptör ailesinden HER1 ve HER2 reseptör inhibitörleri kullandık. HER2 reseptör antikoru Trastuzumab ile HER2 ve HER1 reseptör tirozin kinazın dual inhibitörü Lapatinib'i karşılaştırdık. Etkinliğin daha net değerlendirilmesi için denek kornealarını neovaskülarizasyon açısından biomikroskopik olarak değerlendirdik. Denek kornealarındaki VEGF düzeylerini ise hem immünohistokimyasal hem de ELİSA ile karşılaştırdık. Deney sonuçlarımız olumlu olduğu takdirde çalışmamız, önemli görme kaybı sebeplerinden olan korneal yanık ve neovaskülarizasyonunun tedavisinde klasik ve sınırlı etkiye sahip yöntemlere alternatif olabilecek yeni seçenekleri sunacaktır. Bu yeni yöntemlerin etki mekanizması hakkında bilgiler verecektir.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Kornea Anatomisi

1.2.1.1. Makroskopik Anatomi

Kornea saydam ve damarsız yapıda olup periferde kalınlaşarak sklera ile devamlılık gösterir. Sferik yapıda olmakla birlikte, perifer kısmı skleraya gömülü olduğu için öne doğru hafif eliptik özellik gösterir. Kornea, üzerini örten gözyaşı film tabakasıyla birlikte düzgün kırıcı bir ortam oluşturur, gözü enfeksiyon ve yapısal hasara karşı korur. Gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur. Refraktif güç önde +48.8 Dioptri (D), arka yüzde ise -5.8 D olup toplam kırma gücü +43 D'dir. Bu da gözün toplam refraktif gücünün % 70'ini oluşturmaktadır (39). Kornea, vertikal 10.5 (9-11) milimetre, horizontal 11.5 (11-12) milimetre çapında olup, santral 4 milimetrelik alanda hemen hemen sferiktir, ön-arka yüzler birbirine paraleldir ve kalınlığı 0.52 milimetre kadardır. Periferde ise arka yüzeyin eğrilik artışına paralel olarak 1.0 milimetre kalınlığa ulaşır. Kornea kurvatürü yenidoğanlarda ve çocuklarda erişkine oranla daha büyüktür. Doğum sonrası ilk aylarda düzleşme

gerçekleşmektedir. Yaklaşık 6 yaş civarında korneal gelişim tamamlanır. Korneanın ön eğrilik çapı (konveks) 7.8 milimetre, arka eğrilik çapı (konkav) ise 6.2 milimetre kadardır (40).

1.2.1.2. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası

Kornea yüzeyi, üç tabakadan oluşan 7 μm kalınlığında, optik olarak önemli gözyaşı film tabakası ile kaplıdır. Bu tabakalar;

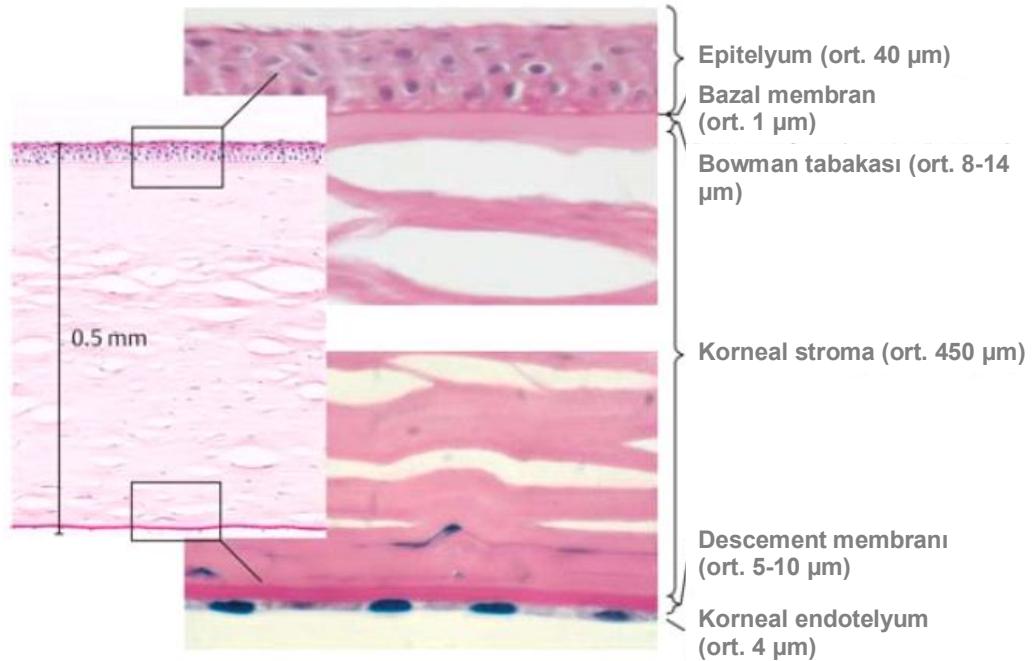
a. Meibomian, Zeis (sebace yapıda) ve Moll (ter bezi yapısında) bezlerince salgılanan hidrofobik ön lipid tabaka.

b. Aksesuar lakrimal bezler (Krause, Wolfring ve Manz bezleri) ve ana lakrimal bez tarafından salgılanan hidrofilik aköz tabaka.

c. Başlıca Goblet hücrelerince ve Manz bezlerince salgılanan müsin tabaka.

1.2.1.3. Mikroskopik Anatomi

Kornea epitel, Bowman zarı, stroma, Descemet membranı ve endotelden oluşan 5 katlı bir yapıya sahiptir, normal şartlarda kan ve lenf damarları içermez (40) (Şekil 1).



Şekil 1. Korneanın mikroskopik anatomisi

(Lang. Ophthalmology. Stuttgart - New York: Thieme, 2000: 118)

1.2.1.3.1. Epitel ve bazal membran

Kornea epiteli, çok katlı non-keratinize yapıda olup yüzey ektoderminden köken almaktadır. Yüzeyi 123 milimetrekare ve kalınlığı ortalama 50-80 mikrometre olup üç tabakadan meydana gelmektedir. Bunlar tek katlı bazal epitelyal, iki-üç katlı kanat ve iki katlı yüzeyel yassı hücre şeklinde sıralanmışlardır (40). Santralde 5-6 kat hücre varken hücre sayısı periferde doğru 8-10 kata kadar artar. Bazalde tek katlı silindirik hücre tabakası altındaki bazal membrana hemidesmozomlarla tutunmuştur. Bazal membran gerçek bir membran yapısındadır ve PAS (+) boyanır. Yapısında tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve fibrin bulunur. Lamina lucida denen gevşek ön ve Lamina densa olarak adlandırılan daha sıkı arka iki zondan oluşmuştur. Rejenerasyon yeteneği olmayan bazal membran epitel için yapısal destek görevi görür ve epitel hücrelerini stromadan ayırır. Yokluğunda epitel hücreleri stromaya invaze olur. Normalde korneanın yüzeyel epitel hücreleri devamlı dökülmekte ve dökülen bu hücrelerin yerine bazal epitel hücrelerinden mitozisle çoğalan hücrelerin gelmektedir. Göç aynı zamanda periferden kornea merkezine doğru olmaktadır. Bazal hücreler basit dizilimli olup oval nükleusludurlar ve mitotik aktiviteleri vardır. Mitoz gösteren bazal hücreler yüzeye doğru ilerlerken yavaş yavaş farklılaşır, çekirdekleri küçülür, organellerini yitirir ve nihayet dejenere olup kornea yüzeyinden dökülürler. Bu süreç her 7 günde tüm epitelin yenilenmesiyle sonuçlanır (40, 41). Yaşla birlikte epitelde herhangi bir değişiklik gözlenmez. Bazal kolumnar epitelden sonra 2-3 kat poligonal hücrelere rastlanır. Yanlara doğru kanatsız uzantıları olan bu hücreler kanat hücreleri olarak da anılır. Yüzeye yaklaştıkça hücreler inceliyor yassılaşıyor uzantılarını kaybeder ve yüzeyel yassı hücrelere dönüşür. Gözyaşıyla temasta olan bu hücrelerin apikal yüzleri, mikrovilli ve mikropalikalar ile girintili çıkıntılı bir yüzey oluşturur. Bu çıkıntılara gözyaşı münin tabakasının glikokaliksleri tutunur. Bunun sonucunda düzgün dengeli bir optik yüzey ve bakteriyel olaylara karşı bir bariyer oluşur. Yüzey epitel hücreleri arasında zonula okludens, yüzey epitel hücreleri ile kanat hücreleri arasında makula okludens, bazal epitel hücreleri ile bazal membran arasında ise hemidesmozom bağlantıları bulunmaktadır. Zonula okludenslerin yüzey hücrelerinin etrafını tamamen çevrelemesi sayesinde kornea yüzeyi suya ve elektrolitlere geçirgenliği çok az olan yarı geçirgen bir membran gibi davranır (41). Epitel tabakasının periferik kısımlarında histiyositler, makrofajlar,

lenfositler, melanositler ve immünojik özelliği olan Langerhans hücreleri bulunabilmektedir. Epitelde bulunan miyelinsiz sinir lifi ağı genelde bazal hücreler arasında yer alır ve kanat hücreleri arasında seyrek olarak bulunur (40).

Epitel adezyon kompleksi bazal hücrelerde başlayıp yüzeysel stromada sonlanan bir yapıdır. Bu kompleksi bazal hücreler, çapa fibrilleri, bazal membran ve yüzeysel stromadaki çapa plakları oluşturur. Hemidesmozomlara komşu hücre zarından başlayan tip VII kollajen yapısındaki çapa fibrilleri, bazal membranı ve Bowman tabakasını geçip stroma içinde yaklaşık 2 mikrometre kadar ilerledikten sonra, Tip VII kollajenin globüler formu ile lamininden oluşmuş çapa plaklarında sonlanırlar. Temel fonksiyonu bazal membranı Bowman zarına bağlamak olan adezyon komplekslerinin korneadaki dağılımı homojen değildir. Göz kapaklarının ayırıcı kuvvetlerine ve dış travmaya daha çok maruz kalan santral korneada adezyon kompleksleri daha sık olarak yerleşmiştir (42).

1.2.1.3.2. Bowman zarı

Hücre içermeyen, elastik ve kollajen fibrillerin yoğunlaşmasıyla oluşan bu tabaka 8-14 mikrometre kalınlığındadır. Kornea stromasının ön bölümü olduğu kabul edilir ve Tip I ve V kollajen ile bunların arasını dolduran Tip VI kollajen filamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Epitele uzanan miyelinsiz sinir lifleri için kanallar içerir. Descement membranının aksine travmatize olduğunda rejenere olmaz ve skar dokusu ile iyileşir. Epitel ile stroma arasında önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Bowman tabakasının yapısı ve kalınlığı yaşam boyu değişmez (40).

1.2.1.3.3. Stroma tabakası

Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur ve yaklaşık 500µm kalınlığa sahiptir. Büyük oranda kollajen fibriller, stromal hücreler ve matriks yapısından oluşur. Stroma yaklaşık %76 oranında su içermektedir. Kuru ağırlığının %80'i kollajen fibrillerden, %15'i matriksten, %5'i hücrenel elementlerden oluşmaktadır (43).

Kollajen lifler büyük oranda Tip I ve az miktarda Tip III, IV, V kollajenden oluşur. Kollajen lifler uniform yapıda olup 300 angström çapındadır ve lameller oluşturmuş halde stromanın her tarafında bulunur. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde %60 oranda keratan-sülfat ve %40 oranda kondroitin-sülfattan oluşmuştur. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını

sağlar. Korneanın fonksiyonel bütünlüğü, kalınlığı, şeffaflığı stromal elemanların yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasına bağlıdır. Ekstrasellüler matriks (ECM) yıkımı temel olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) ile olur. Endotelin disfonksiyonu nedeniyle stromaya su geçmesi durumunda glikozaminoglikanların su çekip şişmesi ile kornea kalınlığı artar ve kollajen fibrillerinin dizilimi düzensiz hale alarak stromal opaklaşma ortaya çıkar. Embriyonik olarak nöral krestten köken alan stroma hücreleri keratositlerdir. Keratositler kollajen lameller arasında yerleşmişlerdir. Sitoplazmalarında mikroorganeller, mikrotübüller, lizozomlar, lipit partikülleri ve değişik inklüzyon cisimcikleri bulunur. Normal koşullarda yavaş ama sürekli bir sentetik aktivite ile ECM'nin idamesini sağlayan bu hücreler, akut ödem veya yaralanma sonrasında fibroblast haline gelebilirler. Stromada ayrıca az sayıda polimorfonükleer lökositler (PMNL), plazma hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Yenidoğan ve çocuklarda stroma erişkinden daha fazla keratosit içerir. Periferik stromada yaşla birlikte kolesterol ve fosfolipid birikimi gerçekleşebilir (arcus senilis) (43).

1.2.1.3.4. Descement membranı

Endotel bazal membranı gerçek membran yapısındadır. Doğumda 3-4 mikrometre kalınlıktadır ve erişkinde 10-12 mikrometre kalınlığa ulaşır. İntrauterin gelişen anterior çizgili zon ve yaşam boyu endotel tarafından desteklenen posterior çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Çizgisiz zon başlıca bazal membran bileşenleri olan tip IV kollajenden oluşmuştur ve periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Descement membranı proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençlidir ve ağır keratitlerde bile sağlam kalabilir. Ancak stromaya gevşek olarak tutunduğu ve göz içi basıncının yardımıyla stromaya yapışık kaldığı gösterilmiştir. Travma nedeniyle bu membran stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve zedelenme durumunda endotel tarafından salgılanarak onarılmaktadır (43).

1.2.1.3.5. Endotel tabakası

Descement membranının arkasında tek sıra halinde dizilmiş 400.000-500.000 hegzagonal hücreden oluşmuştur. Nöroektodermal kökenli, mikrovilli içeren hücrelerden kurulu haldedir, tipik olarak daha genç hücrelerde büyük bir nükleusa ve çok sayıda mitokondriye rastlanır. Bu organeller aktif transportta ve stromanın su kapsamında önemli rol oynarlar. Yan yüzlerde bol miktarda bulunan sıkı bağlantılar

ise hücresel iletimde temel rol oynarlar. Endotel hücre sayısı yaşla birlikte azalır, mitozla nadiren rastlanır. Fonksiyonlarını yitirmeleri durumunda, stromal hidrasyon artarak, ödem, kalınlık artışı ve opasifikasyon gelişmektedir. Doğumda 5000 hücre/mm² iken erişkinde bu sayı 2500 hücre/mm² civarında olup, 800 hücre/mm² altına indiğinde korneal fonksiyonlar bozulmaya başlar. Stres altında veya stabil olmayan kornea endotel hücrelerinde büyüme ve şekil değişikliği olan polimegatzim gözlenmektedir (44).

1.2.1.4. Limbus

Limbus, kornea ile sklera arasındaki geçiş zonudur. Limbustaki yapılar konjonktiva, tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dışı akım aparatı olarak sayılabilir. Anatomik olarak Bowman ve Descement tabakalarının sonlandığı yerlerden geçen düzlem ile arkada Schlemm kanalı ile sınırlanan 1-1.5 milimetrelik alanı kapsar ve korneoskleral bileşke olarak adlandırılır. Limbusta epitel 10-12 katlıdır ve burada melanosit, Langerhans hücreleri, kan damarları bulunur. Bazal epitel hücreleri kök hücrelerinin çok yavaş bölünmesiyle oluşur. Kornea epiteli kök hücrelerinin, limbal epitel hücrelerin bazal tabakasında bulunduğu bildirilmektedir. Kök hücrelerinin aktif metabolizmalarının olduğunu düşünülmektedir. Konjonktivanın aksine goblet hücrelerine rastlanmaz. Limbal kök hücreler önemli miktarda hasarlanırsa kornea epitelinin yerini hızla konjonktiva ve kan damarları alır (45).

1.2.2. Kornea Embriyolojisi

Intrauterin dönemin beşinci haftasında; epitel ve endotel hücreleri nöral krest orjinli olup yüzey ektoderminden gelişirken Descement membranı yassılaştırmış endotel hücrelerinden gelişir. Mezodermden gelişen stroma, intrauterin altıncı haftanın sonunda oluşmaya başlar ve dördüncü ayda epitel altında yoğunlaşarak Bowman tabakasını oluşturur (46).

Kornea ve ön kamara 6. hafta sonunda gelişmeye başlar. 6. haftaya kadar yüzey epiteli ile lens ön yüzü arasındaki boşluk iyi organize olmamış mezenkimal doku ile doludur. 6. hafta sonunda mezoderm içinde dar bir şerit halinde beliren boşluk genişlemeye başlar ve mezodermi, korneal stromayı oluşturacak olan ön tabaka ve iris stromasını oluşturacak olan arka tabaka olmak üzere ikiye ayırır. Aradaki boşluk ise ön kamarayı oluşturur (46).

1.2.3. Kornea Fizyolojisi ve Vasküler Sistem

1.2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi

Gözyaşı korneal fonksiyonlar için yaşamsal önem taşır. Normal salınım 0.9-2.2 µl /dak kadardır. Lipid tabaka; hidrofobik yapısıyla buharlaşmayı önler, lubrikan özellik taşır, gözyaşı menisküsünün kapak dışına taşımını önler. Aköz orta tabakanın %98 'ini su oluşturur, %2'si ise solid kısımdır. İçerdiği Na^+ ve HCO_3^- miktarı serum ile aynı, K^+ ve Cl^- ise daha yüksektir. Salgısal IgA, IgG ve IgE ile beraber içeriğindeki muramidaz etkisi gösteren lizozimler ile lizis etkisi yaratan laktoferrin (Fe^{++} bağlar) sayesinde Fe^{++} bağımlı mikroorganizmalar için bakteriyostatik etki gösterir. Aköz tabaka avasküler korneanın oksijen ve besin gereksiniminden sorumludur. Müsinöz tabaka ise yüzey gerilimini düşürerek aköz tabakanın kornea ve konjonktiva üzerinde üniform yayılımını sağlar (47).

1.2.3.2. Epitel Fizyolojisi

Kornea epitel hücreleri lipid geçirgen özelliktedir. Epitel ve endotel hücreleri gerek mekanik bariyer, gerekse sıvı ve iyon dengesinin sağlanmasıyla, korneanın korunmasında önemli görevlere sahiptirler. Korneada keratosit, endotel ve epitel hücreleri metabolik olarak aktif olup, canlılıklarını devam ettirmek için enerjiye ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Epitel tabakasına oksijen, gözyaşı yoluyla diffüzyonla sağlanırken, göz kapalı durumda iken limbal ve tarsal konjonktiva damarları aracılığı ile sağlanır (48). Aminoasit ve vitamin desteği, aköz hümörden sağlanır. Epitel hücrelerinde, glikoz ve glikojen başlıca enerji kaynağını oluştururlar. Glikoz çoğunlukla aköz hümörden elde edilmekle beraber, % 10 veya daha azı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilir (49).

1.2.3.3. Endotel Fizyolojisi

Endotel hücrelerinin ana enerji kaynağı aközden sağlanan glikoz olup anaerobik ve aerobik yolları kullanırlar. Endotel hücrelerinin en önemli görevi, korneanın şeffaf ve saydam kalmasını sağlamaktır. Bunu yaparken hem aktif bir pompa gibi çalışır, hem de mekanik bir bariyer teşkil ederler. Endotel hücreleri normal pompa fonksiyonu için gerekli oksijeni aköz hümörden sağlarlar. Endotel tabakası metabolik aktivitesini stromadan aköz hümöre su pompalamak üzere gerçekleştirir (49, 50).

Net su akımı için Na^+ , K^+ veya H^+ konsantrasyon gradiyentinin gerçekleşmesi gereklidir. Bu pompalarla gerekli gradient sağlanır. Endotel hücrelerin dış kenarlarına lokalize olan sodyum-potasyum-adenozintrifosfataz pompa sistemi ile su ve elektrolitler dengelenerek, aynı seviyede tutulur. Bu pompa, enerji harcayarak sodyumun hücre dışına çıkmasını sağlar, bunu suyun hücreyi terk etmesi izler. Böylece kornea stromasından ön kamaraya doğru devamlı sıvı geçişi olurken, korneanın şeffaflığı korunur. Korneadan ön kamaraya geçen sıvının geri dönmesi, endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile önlenmektedir. Korneanın şeffaflığının korunması, endotel hücrelerinin etkin fonksiyonlarının yanı sıra, korneada damarsal yapıların bulunmamasına, sinir liflerinin miyelinsiz olmasına ve stroma tabakasındaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine de bağlıdır (50).

1.2.3.4. Vasküler Sistem

Kornea avasküler yapıda olup periferinde, internal karotid arterin ilk dalı olan oftalmik arterden gelen ön siliyer arterlerin oluşturduğu limbal damar arkı bulunmaktadır. Bu damar arkı eksternal karotid arterin fasiyal dallarıyla anastomoz yapar. Böylece kornea periferi internal ve eksternal karotid arter tarafından beslenmektedir (51).

1.2.4. Kornea Yara İyileşmesi

Kornea gözün en önemli refraktif kısmı olduğu için mekanik, kimyasal, enflamatuvar cevap korneanın optik ortamını etkileyecektir. Korneada farklı tabakalarda farklı mekanizmalarla yara iyileşmesi gerçekleşir.

1.2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi

Hücreler arası ve hücre-matriks etkileşimi kornea epitel yapısının devamında önemli rol oynar. Kornea epitel yara iyileşmesi üç faza bölünebilir. Birinci fazda hemidesmozomlar kaybolur ve “fokal temas” denen geçici yapışkanlık kompleksi gerçekleştirilir. Bu faz süresince epitel hücreleri düzleşir ve yara kenarını koruyan bir kalkan halini alır. İkinci fazda proliferasyon ve farklılaşma söz konusudur. Üçüncü fazda hemidesmozomlar oluşturulur ve ECM sentezi ve yeniden yapılanması gerçekleştirilir (52). Bu basamakları lag fazını takip eder.

1.2.4.1.1. Lag fazı

Yaralanmanın ardından hücre göçünün başlamasına kadar geçen süredir. Bu faz büyük ölçüde hücreyel organizasyon ve protein sentezi ile ilişkilidir. Bu

proteinler yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra başlayan hemidesmozomların yeniden sentezine dek, epitelin bazal membrana tutunmasını sağlar (53).

1.2.4.1.2. Hücre göçü

Lag fazı ardından yüzeyin yeniden tesisi için komşu hücreler göçe başlar. Yaralanmadan yaklaşık 5 saat sonra hücreler farklı yönlerden yara merkezine ulaşmak üzere saatte 70 mikrometre hızla göç eder. Defekt tek hücre katıyla örtüldükten sonra mitozla normal epitel kalınlığı sağlanır. Büyük defektlerde onarıma konjonktiva epiteli de katılabilir. Kornea epiteli, abrazyonu 1-4 gün içinde örterken, konjonktiva epiteliyle iyileşme 1-2 hafta veya daha uzun zaman gerektirir (54).

1.2.4.1.3. Hücre çoğalması ve farklılaşması

Hücrelerin göçünden sonra hücre çoğalması gerçekleşir. Santral epitel defekti sırasında, periferik limbal hücreler santrale doğru göç ederek, kornea epitelinin devamlılığını sağlar. Bunlar en yüksek mitoz hızına sahip hücrelerdir. Epitel iyileşmesi sırasında bazal hücrelerle limbal kök hücreler arasında bir denge bulunmaktadır. Kornea epitel debrütmanı hücre çoğalmasını limbal hücrelerde 4.5, korneanın periferik hücrelerinde ise 3.2 kat artırır (55).

1.2.4.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi

Kornea yaralanması sonrası açığa çıkan bazal membrana enflamatuar hücrelerin bağlanması, bazal membranı sindirebilen proteazların salınmasına neden olur. Yaralanma sonra proteaz içeren gözyaşının ve epitel hücrelerinden salınan metalloproteinazlarda bu sürece katkı sağlar (56).

Bazal membran epitel morfolojisi, farklılaşması ve devamında dinamik bir role sahiptir. Fotoablasyondan 24 saat sonra laminin-1 epitel hücrelerince sentez edilir. Laminin-1 adezyon, proliferasyon, farklılaşma gibi birçok hücrel olayları ve hücre göçünü düzenler. Laminin ve benzer etkili desmoglein 1 ve 2 yardımıyla bazal hücrelerle bazal membran arasında geçici adezyonlar oluşur. Bunlar, hemidesmozomların sentezine kadar, epitelin bazal membrana tutunmasını sağlar. Eğer yaralanma bazal membranı da içeriyorsa, önce bazal membranın epitel tarafından sentezlemesi gerekir ki bu durumda yaklaşık bir yıl sürer (54).

1.2.4.3. Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt

Epitel iyileşmesi ile süre açısından farklılık gösterir ve daha uzundur (en az 6 hafta). Stroma, yara iyileşmesi için ideal değildir ve stroma rejenere olmayacağından defektin yerini kollajenöz skar dokusu alabilir veya defekt hiperplastik bir epitlele doldurulabilir (57).

1.2.4.4. Stroma Yara İyileşmesi

Yeni kollajen sentezi, bunların birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından oluşur. Hasar gören epitel tabakasının altındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. İyileşme kaskadı hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla başlamaktadır. Epitel yaralanmasının altındaki keratositler dejenere olur ve çevreden yeni keratositler yerleşir. Stromal iyileşme sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedir. Kontraktil özellikte olan bu hücreler kollajenleri ve diğer matriks proteinlerini üretmektedir. Normal stroma tip I kollajenden oluşurken korneal skar dokusunda ise tip III kollajen bulunur. Skar dokusunun yeniden düzenlenmesi sonrasında tip III kollajen ile tip I kollajen yer değiştirir. Stromal iyileşmenin tam olarak gerçekleşmesi haftalar almaktadır (54).

1.2.4.5. Endotel Yara İyileşmesi

Doğumdan sonra endotel hücrelerinde mitoz görülmez eğer endotel hücre kaybı olursa, komşu hücrelerin genişlemesiyle boşluklar kapanır. Daha büyük ve çok sayıdaki hücreyi ilgilendiren defekte ise 250 mikrometre uzaktaki hücreler bile yara yerini kapatmak üzere ilerler. Yayılma ve göçme sırasında hücreler birbirinden kopmazlar. Tek katlı tabakanın oluşumu tamamlandığında bariyer ve pompa fonksiyonları tekrar devreye girer ve kornea ödemi yavaş yavaş geriler. Defekt kapatıldıktan sonra, normal hegzagonal yapının oluşturulması için hücreler yeniden düzenlenmeye başlar. Birkaç hafta sonra zedelenme alanını kaplayan endotel yeni Descement membranını salgılamaya başlar. Kronik enflamasyon veya fiziksel travma durumunda yeniden düzenlenme gecikir ve hücre kaybı devam eder (42).

1.2.5. Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

1.2.5.1. Yaş

Genç popülasyonda iyileşme daha hızlıdır (58).

1.2.5.2. Beslenme

Malnutrisyon iyileşmeyi belirgin şekilde geriletir. Vitamin A eksikliğinde korneal ülserasyon sıktır (58).

1.2.5.3. Travma

1.2.5.4. Yara Apozisyonu

Kötü apozisyon yara iyileşmesini geciktirir (58).

1.2.5.5. İnfeksiyon

Mikroorganizmalar inflamasyonu artırıp aşırı kollajen yıkımı ve hücre ölümüyle indirekt olarak ve salgıladıkları enzimlerle ile direk olarak yara iyileşmesini geciktirir veya engellerler (58).

1.2.5.6. Enflamasyon

Değişik travma tipleri değişik inflamatuvar yanıt doğurur. Yaralanma sonrası korneaya inflamatuvar hücre akımı dokuyu onarıma hazırlar ancak iyileşmeyi bozabilecek etkiye de sahiptir (59).

1.2.5.7. Duyusal İnnervasyon

Duyusal innervasyon yokluğunda hücre göçü ve adhezyonu çeşitli mekanizmayla büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (60).

1.2.5.8. İntraoküler Basınç

Yükselmesi durumunda stromal yara iyileşmesinde engeller (60).

1.2.5.9. Gözyaşının Etkisi

Gözyaşının niceliği epitelin sağlıklı oluşu ve bütünlüğü için kritik önem taşır. Aköz tabaka eksikliğinde yüzeysel kuruluk, punktat epitelyal boyanma, mukus plak, iyileşmeyen epitel defektleri gözlenir. Lipid tabaka eksikliğinde ise oküler yüzey keratinizasyonu, yüzey mikroploka kaybı, epitel defekti, korneal ülserasyon, keratomalazi gözlenir (47).

1.2.5.10. İlaçlar

1.2.5.10.1. Antibiyotikler

Yüksek doza bağlı olarak basitrasin (10.000 u/ml), genta-sulfat (10 mg /ml) ve neomisin (8 mg/ml) epitelizasyonu belirgin biçimde inhibe ederler (61).

1.2.5.10.2. Kortikosteroidler

Korneal epitel, stroma ve endotel yara iyileşmesini inhibe ederler (62).

1.2.5.10.3. Lokal Anestezikler

Kronik topikal tedavi persistan epitel defektine neden olabilir (63).

1.2.5.10.4. Asetilkolin

Endotel hücre hasarını arttırdığı saptanmıştır (63).

1.2.5.10.5. Epinefrin

1/1000'lik konsantrasyonu irreversible kornea ödemeine neden olduğundan 1/5000'lik konsantrasyonu önerilmektedir (63).

1.2.5.10.6. Antiviral İlaçlar

Epitel iyileşmesini inhibe ederler (63).

1.2.5.11. Fibronektin (Fn)

Yapılan bir çalışmada epitel migrasyonunun ortama eklenen Fn ile belirgin olarak arttığı, etkinin Fn miktarı ile doğru orantılı olduğu, ortama anti-Ig G Fn antikoru eklendiğinde ise anlamlı migrasyon inhibisyonu olduğu gösterilmiştir (64).

1.2.5.12. İnterlökin – 6

Tavşan korneasında epitel hücre migrasyonunu stimule ettiği gösterilmiştir (65).

1.2.5.13. Retinoik Asit

Yapılan çalışmalar all-trans-retinoik asitin cerrahi sonrasında iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi olduğu göstermektedir (66).

1.2.6. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Medyatörler

1.2.6.1. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, hücre çoğalmasını, göçünü ve hayatının devamını uyarıcı veya engelleyen, birçok hücre tarafından salgılanan peptidlerdir. Hareketlerini otokrin, jukstakrin veya en yaygın biçimde parakrin mekanizmalarla gerçekleştirirler. Karşılıklarına gelen hücre yüzey reseptörleri tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri deoksi ribonükleik asit (DNA) sentezinin sentez fazını uyarır ve ardından hücre çoğalması gerçekleşir (67). Göze etki eden çok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır: Epidermal growth faktör (EGF), İnsulin-like growth faktör (IGF), Platelet-derived growth faktör (PDGF), Fibroblast growth faktör (FGF), Transforming growth faktör- α (TGF- α) ve Transforming growth faktör- β (TGF- β) (68).

1.2.6.1.1. Epidermal Growth Faktör

Epidermal growth faktör epitel hücreleri için potent bir mitojen olan, 6 kiloDalton ağırlığında kompakt bir polipeptittir. EGF normal kornea epitel kalınlığının devam ettirilmesinde de önemlidir. EGF fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive eder. Topikal EGF epitel iyileşmesini uyarmakta, özellikle limbal ve periferel kornea epitel rejenerasyonunda maksimum etki göstermektedir (69).

1.2.6.1.2. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör ailesi ortalama 18 kiloDalton (kD) ağırlığında olan, 20 kadar heparin bağlayan, birçok dokuda çoğalma, farklılaşma, göç, ECM depolanması ve anjiyogenez gibi olayları düzenleyen protein grubudur. Parçalanmadan korunmak için düşük afiniteli heparan sülfat proteoglikanlarına tutunurlar ve hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar. Asidik FGF, Bowman zarı ve Descement membranlarında, endotel hücrelerinde, daha az oranda ise epitelde tespit edilmiştir. Lakrimal bez tarafından da salınan bu faktörün, epitel hücrelerinde hem parakrin hem de otokrin etkileri vardır. Asidik ve bazik FGF epitel, endotel ve stroma hücrelerinde mitojeniktir (70). Bazik FGF, kornea fibroblastlarında DNA sentezini, yara gerginliğine direncini ve endotel hücrelerinde mitotik hızı artırır (68).

1.2.6.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta

Fare embriyosunda TGF- α sentezi engellenerek yapılan deneylerde gözkapağı gelişim bozukluğu, mikroftalmi, yüzeysel opasiteler, göz kapağı ve ön segment disgenezisi, korneal enflamasyon ve skar oluşumu, lense ve retina ait defektler gözlenmiştir. Transforming growth faktör- α , EGF gibi gözyaşında bulunur ve olası kaynak yine lakrimal bezlerdir. Ek olarak kornea epitel hücreleri TGF- α , TGF α mRNA'sı ve proteinini içerirler. Bu durum EGF ve TGF- α üreten epitel hücrelerinin otokrin mekanizmayla normal epitel sikluslarını devam ettirdiklerini düşündürmektedir. Endotel hasarında aköz hümörde TGF- α konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir (71, 72).

Transforming growth faktör- β ailesi TGF- β 1, TGF β 2 ve TGF- β 3'den oluşan yaklaşık 25 kiloDalton ağırlığında ve birçok doku tarafından üretilen polipeptidlerdir. TGF- β dimerik, inaktif biçimde salgılanır ve latent growth faktör havuzu oluşturmak üzere ECM'ye bağlanır, ekstraselüler veya membrana bağlı

enzimlerle aktif hale getirilir (70). Transforming growth faktör- β aktivasyonu ECM üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur (71). Transforming growth faktör- β 'nin genel olarak epitel, endotel hücreleri, lökositlerin büyümesini engellediği ve fibroblast üretimini uyardığı kabul edilmektedir (72). Transforming growth faktörün epitelden stromaya salgılanması ve gözyaşında üretimi stromal hücrelerde çoğalma ve göçe neden olur. TGF- β 'nin enflamasyon odağına fibroblast, monosit ve makrofajları çekme özelliği de vardır (73). Tavşanlarda korneal insizyonlarda gerilmeye karşı yara direncini arttırıcı etki gösterir. Bu etkisini insizyon yerinde kemotaksis ile fibroblast sayısını arttırarak gerçekleştirir (68).

1.2.6.1.4. Keratinosit Growth Faktör

Keratinosit growth faktör, FGF ailesinin üyelerinden biri olup, yaklaşık 28 kiloDalton ağırlığında tek zincirli bir polipeptiddir ve keratinositler ile epitel hücreleri için mitojeniktir. Keratinosit growth faktörün EGF, TGF- α , FGF ile aynı sinyal yolağını paylaştığı düşünülmektedir (74).

Keratinosit growth faktör stromada üretilir ve epitel hücrelerinde parakrin bir mekanizma ile etkili olduğu gösterilmiştir (75). Keratinosit growth faktör reseptörü limbal fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde, santral korneaya göre daha fazla bulunmaktadır. Bu durum KGF'nin tercihen kök hücrelerin fonksiyonunu düzenlediğini düşündürmektedir. Keratinosit growth faktörün sürekli olarak düşük miktarda salınmasının sağlıklı korneal epitel bütünlüğünün sağlanmasında rolünün olduğu düşünülmektedir (76).

1.2.6.1.5. Hepatosit Growth Faktör

Hepatosit growth faktör (HGF) yaklaşık 90 kiloDalton ağırlığında bir glikoproteindir. Mezenşimal orjinli hücrelerden salgılanır, travma, enflamatuvar uyarılar ve koagülasyon kaskadındaki proteazlarla aktif hale gelir. Hepatosit growth faktör reseptörü tirozin kinaz özelliği taşır. HGF klasik parakrin etki ile fibroblastlardan üretilerek epitel hücrelerine etki eder (77). HGF üretimi ve reseptörü kornea santralinde daha yoğundur. Hepatosit growth faktör hücre göçünü uyarır, stroma fibroblastlarına etkisi minimaldir (78). Hepatosit growth faktör gözyaşında da bulunur ve kornea epitel katının bütünlüğünün sürdürülmesinde katkısının olduğu düşünülmektedir. Aköz hümörde bulunan HGF'nin endotel hücrelerine bağlanarak,

bu hücrelerin bütünlüklerinin devamında otokrin mekanizma ile rol oynadığı sanılmaktadır (79).

1.2.6.1.6. Platelet Derived Growth Faktör

Platelet derived growth faktör (PDGF) sistein bağlı, 35 kiloDalton ağırlığında, A ve B zincirlerinden oluşmuş dimer yapısındadır. Platelet derived growth faktör'ün reseptörüne bağlanması mitojenik etkileri indükler (63). Platelet derived growth faktör reseptörleri kornea fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde bulunur. Endotel hücrelerinin ve fibroblastların göçü PDGF ile uyarılır. Fibronektin varlığında PDGF epitel hücrelerinin kemotaksisini uyarmaktadır (78). Platelet derived growth faktör aköz hümörde eser miktarda bulunur (80).

1.2.6.1.7. Diğer Büyüme Faktörleri

Sinir büyüme faktörü (SBF), nörotropin-3 ve 4, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör gibi nörotrofik faktörler ile reseptörlerinin korneada bulunduğunu ve bunların epitel hücre çoğalmasını uyardığını göstermektedir (81). Kornea epitel bütünlüğünde kornea sinirlerin önemli rolünün olduğu düşünülmekte ve salınan nörotrofik faktörlerin doku homeostazında rolü bulunmaktadır (82).

1.2.7. Kornea yara iyileşmesinde enflamatuvar sitokinlerin rolü

Kornea epiteline olan travma sonrasında epiteldeki çeşitli sitokinlerin seviyesi artar. Bunların en önemlileri IL-1, IL-6 ve TNF- α 'dır (73). İnterlökin-6 integrinleri düzenleyerek kornea epitelinde göçü uyarır (83). İnterlökin-1, EGF ile sinerjik biçimde in vitro epitel yara kapanmasını arttırır. İnterlökin-1 ve TNF- α kollajenin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar. Ancak bu sitokinlerin etkileri her zaman yararlı değildir. IL-1, IL-6 ve IL-8 kornea stromasında erimeyi uyabilir (84).

1.3. Kornea Neovaskülarizasyonu

Damarlar iki mekanizma ile gelişir: vaskülojeniz ve anjiyogenez. Anjiyogenezde kapillerler önceden varolan damarlardan gelişirken vaskülojenizde kan damarları diferansiye endotel hücrelerinden *de novo* olarak gelişir (80).

Yetişkinlerde sadece anjiyogenez görülür ve yara iyileşmesi, ovulasyon ve plasental maturasyon gibi fizyolojik fonksiyonlardan sorumludur. Endotel hücreleri anormal bölünerek tümör gelişmesi ve anjiyogenez yoluyla bazı oküler hastalıklar gibi patolojik durumlara ortaya çıkar (86).

1.3.1. Epidemioloji

Amerika Birleşik Devleti'nde bir yıl içinde 1.4 milyon hasta kornea neovaskülarizasyonu geliştirmektedir. Yapılan çalışmalarda toplumun %4'ünde kornea neovaskülarizasyonu bulunmakta ve kornea nakli sırasında elde edilen kornea örneklerin %20'si histopatolojik olarak neovaskülarizasyon göstermektedir (87) (Tablo 1). Türkiye'de henüz bu konuda yapılmış bir çalışma yoktur.

Tablo 1. Kornea Neovaskülarizasyonuna Neden Olan Hastalıklar

Enfeksiyöz keratitler

Bakteriyel

Psödomonas
Klamidya trakomatis
Sifiliz

Viral

Herpes simpleks
Herpes zoster

Fungal

Kandida
Fusarium
Asperjillus

Parazitik

Onkoserkiazis

Enflamatuar hastalıklar

Greft rejeksiyonu
Oküler pemfigoid
Atopik keratokonjonktivit
Rozasea Lyell's sendromu
Stevens-Johnson sendromu
Graft versus host hastalığı

Dejeneratif-konjenital bozukluklar

Pterjyum
Aniridi
Terrien'in marjinal dejenerasyonu
Travmatik-iatrojenik bozukluklar ve diğerleri

Korneal ülser

Kontakt lens

Alkali yanığı

Kök hücre yetmezliği

Neovaskularizasyon ortamda var olan damarlardan bir takım faktörlerin aktivasyonu ile yeni damar oluşumudur. Organizmada bu durum anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dengesi sağlanarak sıkı bir şekilde kontrol edilir (Tablo 2 ve Tablo 3). Neovaskularizasyon için sadece anjiogenik faktörlerin yükselmesi değil aynı zamanda anti-anjiogenik faktörlerin azalması da gerekmektedir (88).

Tablo 2. Anjiogenik Faktörler

Tümör nekrozis faktör- α
Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
Vasküler endotelyal growth faktör
Asidik and basik fibroblast growth faktör
Plasenta growth faktör
Platelet-derived epidermal growth faktör
Platelet-activating faktör
Platelet-derived growth faktör
Anjiogenin
Anjiyopoetin-1
Granulosit-makrofaj koloni-stimulan faktör
Granulosit koloni-stimulan faktör
Transforming growth faktör
Epidermal growth faktör
Hepatosit growth faktör
İnsulin-like growth faktör
İnterlökin-1,2,6,8
Prostaglandin E1, E2
Vascular integrin $\alpha\beta$
Matriks metalloproteinazlar
Histamin

Tablo 3. Antianjiogenik Faktörler

İnterferon- α, β, γ
İnterlökin-12
Anjiostatin
Matriks metalloproteinaz inhibitörleri
Platelet faktör 4
Trombospondin
Fibronektin
Endostatin
Retinoik asit

1.3.2. Kornea Neovaskülarizasyon Fazları

1.3.2.1. Erken Prevasküler Faz

Enflamasyona bağlı hasar ile damarlarda dilatasyon, geçirgenlik artışı ve ödem oluşur. Yaklaşık 2-3 saat sonra Polimorfonükleer lökositler (PMNL) damar dışına çıkar ve 24-48 saat sonra PMNL infiltrasyonu pik yapar. PMNL'ler kemotaksisi başlatarak bazı sitokinlerin salınımına neden olur ve salınan proteolitik enzimler ile damarların bazal membranı parçalanır. Damar geçirgenliğinde artış ve ödem normalde sıkı bir dizilim gösteren kollajen fibrillerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Ödemle beraber ekstravasküler dokuya geçen fibrinojen pıhtılaşarak vaskülarizasyonda önemli rol oynar (89, 90).

1.3.2.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı

Bazal membran devamlılığının bozulmasından sonra endotel hücreleri psödopodları ile hasarlı bölgeden göç eder. Takiben endotel hücrelerinde mitoz ve yeni damar tomurcuğu oluşumu gözlenir. Matriks metalloproteinazlar ekstraselüler matriks bileşenlerini bozarak, göç eden endotel hücreleri için gerekli yolu açar (91). Göç olayı tek başına neovaskülarizasyon için yeterli olmakta, hücresel proliferasyon olmasa bile endotel hücrelerinin yayılımı, göçü ve yeniden dağılımı ile yeni damar oluşumu gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle endotel hücre göçünün vaskülarizasyondaki en önemli basamak olduğu söylenebilir (92).

1.3.2.3. Vasküler Matürasyon Fazı

Ortamda çoğalan endotel hücreleri zamanla lümen oluşturacak şekilde yan yana gelir ve primitif damar şeklini alır. Bu sırada endotel hücrelerinden ECM proteinleri ortaya çıkar. Ekstrasellüler matriks proteinleri damar çeperinin düzenli olmasını sağlar. Yeni oluşan damarların bazal membranları devamlı hal alır ve perisitlerin endotel hücrelerini çevrelemesi ile ana damar oluşumu izlenir. Primitif damarlar zamanla birbirleriyle ilişkiye geçer ve kan akımı başlar. Anjiogenik uyarının yetersiz kaldığı durumlarda ise vasküler yapılarda daha fazla uzama gerçekleşmez ve regresyon gözlenebilir (90).

1.3.3. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyarın Faktörler

1.3.3.1. Tümör Nekrozis Faktör- α

T hücreleri, aktive Natürel Killer (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri bu proteini salgırlar. İki çeşit TNF vardır. Bunlar genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (kaşektin de denir) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (lenfotoksin)'dir. TNF- α ; adezyon molekülleri ekspresyonunun up-regülasyonu, nötrofil aktivasyonu, kemokin sekresyonunun indüksiyonu ve NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu gibi birçok proinflamatuvar ve immün modulatör fonksiyonların medyatörüdür (87).

Tümör Nekrozis Faktör' ün başlıca biyolojik etkileri; anjiyogenez, ateş yapıcı etkinlik, hepatositleri etkileyerek akut faz reaktanlarının sentezini uyarmak, nöronların çoğalması ve fonksiyonlarının regülasyonu, T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunun indüksiyonudur. Deneysel hayvanlarına uzun süre verildiğinde kaşektik metabolik değişikliklere neden olur. TNF- α , NO sentezinde rol alarak anjiyogenezin erken dönemlerinde vazodilatasyona yol açar (93).

Alkali kimyasal yanık, korneal stromada ciddi hasar sonucu persistan ülserasyon, opasifikasyon ve neovaskülarizasyon oluşturarak kalıcı görme kaybı nedeni olabilir. Alkali yanık oluşturulan korneada açığa çıkan faktörlerden biri proinflamatuvar pleotropik sitokin olan TNF- α 'dır (94). TNF- α ayrıca VEGF, FGF ve TGF üretimini arttırarak neovaskülarizasyonu arttırır (95).

1.3.3.2. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), makrofajların kapillerlerin dışına migrasyonunu önlediği keşfedilen ilk lenfokindir. T lenfosit ve makrofajlardan salınan ve inflamasyonda anahtar rolü olan potent pro-inflamatuvar sitokindir (96).

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör oküler inflamasyonun patofizyolojisinde önemli role sahiptir. Fare korneasında MIF mRNA'sının hasar veya enfeksiyon sonrası erken dönemde artmış olduğu bulunmuştur (96). MIF, neovaskülarize korneadan bol miktarda eksprese edilir. İnflamatuvar korneal neovaskülarizasyonda anjiojenik rolü vardır (97).

1.3.3.3. Vasküler Endotelyal Growth Faktör

Homodimerik yapıda, 46 kilodalton ağırlığında olan Vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) ilk defa 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından yüksek düzeyde vaskülarize bir tümörde tanımlandı (98). VEGF vaskülotropin olarak da bilinen, çok fonksiyonlu potent bir sitokindir ve esas olarak endotel hücrelerinden salınmaktadır. VEGF endotel hücreleri için spesifik bir mitojen ve anjiojenik faktördür. Anjiojenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulan VEGF'tir (99).

Vasküler endotelyal growth faktör spesifik bir gen tarafından kodlanır ve yapılarındaki aminoasit sayısına göre belirlenmiş altı farklı izoformu vardır: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. İnsanlarda en fazla VEGF₁₆₅ bulunur ve büyük oranda heparine bağlanarak salınmaktadır (3).

Vasküler endotelyal growth faktör biyolojik aktivitesini, VEGF reseptör-1 (VEGFR-1, flt-1), VEGFR-2 (VEGFR-2, flk-1/KDR), VEGFR-3 (flt-4), çözünebilir VEGFR-1 (sVEGF-1) ve çözünebilir VEGFR-2 (sVEGFR-2) reseptörleri ile gerçekleştirir. VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak endotel hücreleri üzerinde tirozin kinaz yapılı, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile lenf damarları üzerinde ise VEGFR-3 ile gerçekleştirir. VEGFR-1 ve VEGFR-2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salınır ve anjiojenez ile damar geçirgenliğinden sorumludur. VEGFR-3'ün lenfanjiyogenezin kontrolü ile sorumlu olduğu sanılmaktadır (100).

Vasküler endotelyal growth faktör'ün birçok yararlı etkilerinin yanında, artmış VEGF ekspresyonu neovaskülarizasyonla karakterize oküler hastalıklar, romatoid artrit, psöriazis ve kontakt dermatit gibi hastalıkların progresyonuna yol

açar. Ayrıca tümör büyümesi, metastazı ve lenfödem gibi patolojik olaylarda da rol aldığı bildirilmiştir. VEGFR'nin aktivasyonu fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz, guanozin trifosfataz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile eder ve DNA transkripsiyonu başlatılır (101). VEGF düzeyi başta Ras ve HER-2 onkojenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, İL-1, İL-6, İL-10, İL-13, FGF, PDGF, TGF- β , İGF-1, TNF- α ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (99, 101, 102). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan, hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF)-1 de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır. Vasküler endotelial growth faktörün salınımında en önemli iki faktör hipoksi ve inflamasyondur (100).

Vasküler endotelial growth faktör endotel hücrelerinde fenestrasyon, ve transselüler gap oluşumuyla permeabiliteyi artırır. Permeabilite artışı kemotaksisin ve inflamasyonun devamında önemlidir. VEGF hücre dışı matris yıkımından sorumlu olan MMP'ler, ürokinaz, doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını uyararak invazyon ve metastazı kolaylaştırır. Anjiyonez sırasında dokular içine ilerleyen kapillerin penetrasyonunu sağlayan kollajenaz ve plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonuna yardımcı olur (103). VEGF'ün etkisi ile endotel hücreleri proliferer olur ve bu büyüme faktörüne doğru göç edip dizilerek yeni damarlar için öncü olan tüp formasyonu oluşmasını sağlar. VEGF endotel hücrelerini apoptozise karşı da korumaktadır. VEGF'ün kemotaktik olaylarda önemli bir rolü vardır (104). İnflamasyonun geç dönemlerinde etkili olan monositler için güçlü kemotaktik özelliği vardır. VEGF'ün endotel hücrelerinde ICAM-1, VCAM-1 ve P-selektin gibi adezyon moleküllerini artırdığı gösterilmiştir. Bu moleküller sayesinde nötrofil, monosit ve doğal öldürücü hücreler damar dışına çıkmak için endotel hücrelerine yapışmaktadır (105). VEGF kornea neovaskülarizasyonunda çok önemli bir medyatördür ve keratositlerde tespit edilmiştir. Deneysel hayvan modellerinde VEGF'in tek başına korneal anjiyonezi güçlü bir biçimde uyardığı bildirilmiştir (106). Ayrıca neovaskülarizasyonlu inflamasyonlu kornealarda yüksek miktarda VEGF tespit edilmiş ve bu faktörün inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu güçlü biçimde azalttığı rapor edilmiştir. Neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda VEGF damar endotel hücrelerinde, infiltratör lökositlerde, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır (10-15). Bu çalışmalar VEGF'in korneadaki

anjiojenezde merkezi bir rol oynadığını kuvvetle belirtmektedir (107). Neovasküler oküler hastalıklarda oluşan yeni damarların sebebinin artmış VEGF olduğu gösterilmiştir (104). Bu hastalıkların tedavisinde anti-VEGF ajanlar kullanılmaktadır.

1.3.3.4. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda vasküler bazal membrana bağlanmaktadır (108).

1.3.3.5. İnsülin Like Growth Faktör

Hayvan modellerinde korneada insülin like growth faktör-1'in anjiogenik etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (109).

1.3.3.6. Anjiopoetin

Bir çalışmada anjiyopoetin (Ang)-1 ve -2'nin sistemik Tie-2 ile inhibisyonu kornea neovaskülarizasyonunda gerilemeye neden olmuştur. Ratlarda Ang-2'nin inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği bildirilmiştir (110).

1.3.3.7. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Kornea neovaskülarizasyonunda MMP-2'nin üretiminin arttığı tespit edilmiştir (111).

1.3.4. Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler

1.3.4.1. Anjiostatin

Anjiostatin 38 kiloDalton ağırlığında, plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olup güçlü bir antianjiogenik faktördür (112). Anjiostatin ve benzeri fragmanların korneada FGF ve anjiogeninin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (113).

1.3.4.2. Endostatin

Endostatin 20 kiloDalton ağırlığında, kollajen XVIII'ün proteolitik parçalanma ürünüdür ve esas olarak damar epitel bazal membranında bulunur. Endostatin, implante edildiği kornealarda bFGF'nin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (123).

1.3.4.3. Pigment Epiteli Derived Faktör

Pigment epiteli derive faktör (PEDF) güçlü bir antianjiogenik ve nörotrofik faktördür. Gözde retina, iris ve korneada bulunmuştur (115). Pigment epiteli derived faktörü bloke eden antikorların vaskülarizasyonu uyarıldığı tespit edilmiştir (116).

1.3.4.4. Trombospondin-1

Trombospondin (Tsp)-1 kornea, sklera, iris ve retinada üretilir (117). Korneada epitel bazal tabakasında üretilmektedir (118). Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklediği anjiyogenezin oluştuğu gözlenmiştir (119).

1.4. Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin®) insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2/ErbB2) proteininin ekstrasellüler bölgesini seçici olarak hedefleyen rekombinant DNA kökenli IgG yapısında bir insan monoklonal antikordur (Şekil 2). Trastuzumab ilk kez 1998'de metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır (120). EGF reseptörü, VEGF reseptörüne benzer şekilde tirozin kinaz reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER2, EGFR'nün 19 altgruplarından biridir (121). HER2 onkoproteini 3 bölümden oluşur: 1) 632 aa'ten oluşan ekstrasellüler alan, burada ligand-bağlayıcı bölge bulunur ve büyüme faktörleri buraya bağlanır. 2) 22 aa'ten oluşan transmembran alanı, 3) 580 aa'ten oluşan intrasellüler alan, bu kısım tirozin kinaz aktivitesi gösterir ve sinyal transduksiyonundan sorumludur. HER2 reseptörü normal hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda kritik rol oynar (122). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyon, artmış tümör hücre motilitesi, anjiyenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir (123).

Epidermal growth faktör ve TGF alfa, EGF reseptörlerine bağlanarak endotel hücreleri için mitojenik etki gösterirler ve anjiyenezi uyarırlar (124). HER2'nin aktivasyonu EGF'ün reseptöre bağlanmasını indükler, fosfatidilinositol 3 kinaz, ve mitojen aktive protein kinaz kaskadını içeren multipl hücresel sinyal yolu aktive olur. HER2'ye karşı geliştirilmiş bir antikör olan trastuzumab HER2'nin internalizasyonu ve dejenerasyonu ile bu sinyal yolunu inhibe eder. Hem yüksek hem de düşük afiniteli EGF reseptörleri özellikle limbal bölgede, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Düşük afiniteli reseptörler stroma keratositlerinde yer almaktadır (125). EGF anjiyjenik faktör olarak bilinir. Güçlü ve etkin anjiyjenik faktörler olan VEGF ve İL-8 gibi faktörlerin ekspresyonunu artırır. EGFR aktivasyonu sıklıkla anjiyenezle ilişkilidir ve ek olarak invazyon ve metastazla da ilişkilidir, bütün bu süreçler EGFR antagonisti tarafından etkilenebilir ve önlenebilir

(126). Trastuzumab'ın korneal neovaskularizasyonun önlenmesinde etkili olduğunu gösteren bir çalışma vardır (35). Kornea neovaskularizasyonunu önlenmesinde çok hedefli terapötik yaklaşımın bir parçası olabilir. Trastuzumab'ın göz hastalıklarında için kullanım ruhsatı yoktur.

1.5. Lapatinib

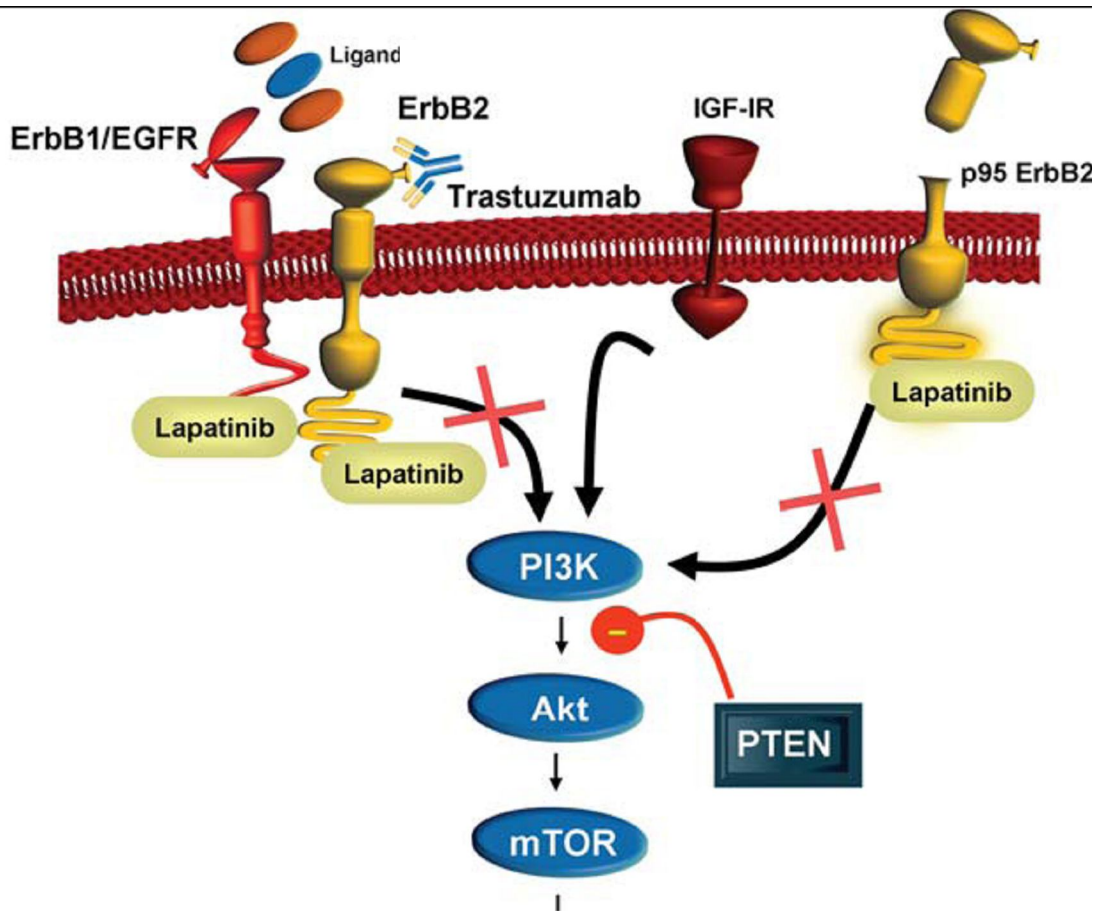
Lapatinib (Tykerb®) insan epidermal growth faktör reseptör 1 (EGFR/HER1) ve insan epidermal growth faktör reseptör 2 (HER2/ErbB2) tirozin kinazını (TK) inhibe ederek sinyal iletimini önleyen çift etkili selektif inhibitördür (36). Lapatinib etkisini intraselüler olarak TK'ın ATP bağlayan kısmına bağlanarak etki göstermektedir. TK'ın fosforilasyon ve aktivasyonuna engel olmaktadır. Bu sayede sinyal iletimi en baştan bloke edilerek, ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz1 (ERK1) ve fosfotidilinozitol-3'kinaz (PI3K) gibi birçok yolağın aktivasyonuna engel olunmaktadır (Şekil 2) (127-130).

İnsan epidermal growth faktör reseptör-1, VEGF reseptörüne benzer şekilde tirozin kinaz reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER1, EGFR'nün 19 alt grubundan birisidir (121). HER1'in uyarılması TK aktivasyonu sonucunda protein kinaz ve fosfotidil inozitol-3-OH kinaz yolunu aktive etmektedir (131). Preklinik çalışmalar sonucunda HER1 aktivasyonunun ve neovaskularizasyona neden olduğu gösterilmiştir (132). EGFR aktivasyonu ile VEGF gibi anjiyogenik moleküllerin salınımını artırarak anjiyogenezin hızlandığı bilinmektedir (37). EGFR inhibitörleri sayesinde anjiyogenezin engellenebileceği gösterilmiştir (38).

İnsan epidermal growth faktör reseptör-2, Lapatinibin etkili olduğu ikinci reseptördür ve anjiyogenezde önemli rolü vardır. HER2'nin aktivasyonu EGF'ün reseptöre bağlanmasını indükler. Fosfatidilinositol 3 kinaz ve mitojen aktive protein kinaz kaskadını içeren multipl hücrel sinyal yolu aktive olur. HER2 reseptörü normal hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunda kritik rol oynar (122). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyon, artmış tümör hücre motilitesi, anjiyogenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir (123).

İnvitro çalışmalarda da Lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptörlerinin ikisini birden inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptör blokörü olarak, tek başına HER1 reseptör blokörlerinden daha etkin olduğu gösterilmiştir (130). Trastuzumab'a ilave olarak Lapatinib'in bazı kanser türlerinde

daha etkin olduğu gösterilmiştir. HER1 ve HER2 ayrı ayrı inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği daha önceki yayınlarda gösterilmiştir (35, 133). Lapatinib sayesinde kornea neovaskülarizasyonunu önlediği bilinen 2 reseptörün birden inhibisyonu ile daha etkili tedavi yöntemleri hedeflenmektedir. Lapatinib kornea neovaskülarizasyonunu önlenmesinde çok hedefli terapötik yaklaşımın diğer bir parçası olabilir. Lapatinib'in göz hastalıklarında için kullanım ruhsatı yoktur.



Migrasyon, proliferasyon, adezyon, anjiyogenez ve apoptozisin önlenmesi.

Şekil 2. ErbB1, IGFR, ErbB2, Lapatinib ve Trastuzumab'ın etkileşimi

(Charles V, Chan A, Gril B. Management of ErbB2-positive Breast Cancer. Jpn J Clin Oncol 2010)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile Göz Hastalıkları ve Patoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları ortalama 250-300 gram olan 35 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu.

Ratlar her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize beş gruba ayrıldı. Ratların beslenmelerini sürdürebilmeleri için sadece sağ kornealarında kimyasal yanık oluşturuldu. Topikal tedaviye yanık işleminden 60 dakika sonra başlandı ve 7 gün devam edildi.

Gruplar:

- 1. grup (Kontrol):** Yanık yapılmayan ve herhangi bir tedavi verilmeyen grup
- 2. grup (Sham):** Yanık yapılan denekler 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.
- 3. grup (Lp):** Yanık yapılan deneklere 50 mg/kg Lapatinib solüsyonu her gün oral olarak lavaj yardımıyla verildi ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı .
- 4. grup (Trs):** Yanık yapılan deneklere 4 mg/kg Trastuzumab intraperitoneal olarak her gün uygulandı ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.
- 5. grup (Lp+Trs):** Yanık yapılan deneklere günlük 50 mg/kg Lapatinib solüsyonu oral olarak lavaj yardımıyla ve 4 mg/kg Trastuzumab intraperitoneal olarak uygulandı. Denekler 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.

2.1. Anestezi Tekniği

Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) ile 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalor, Eczacıbaşı, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0,5'lik proparakain hidroklorid (Alcaine, Alcon, Texas, ABD) damlatıldı.

2.2. Cerrahi Teknik

Korneal yanık ve neovaskülarizasyon oluşturmak için Mahoney ve Waterbury (134) tarafından tarif edilen gümüş nitrat ile koterizasyon tekniği uygulandı. Anestezi ve analjezi uygulanan kontrol grubunun dışındaki deneklerin sağ kornea santraline % 75 gümüş nitrat ve % 25 potasyum nitrat içeren (Nitrate D'argent; Botafarma, Ankara,

Türkiye) kalemle 10 saniye süresince koter yapılarak 2 milimetre genişlikte kimyasal yanık oluşturuldu. Yanık sonrası denek kornea ve forniksleri 5 cc SF ile yıkanarak artık kimyasallar uzaklaştırıldı.

Yanık skorları; oluşan yanığın kabarıklığına göre 0 (kornea yüzeyinde kabarma yok), +1 (kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık), +2 (kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık), +3 (kornea yüzeyinde büyük kabarıklık) şeklinde derecelendirildi. +2 ve üstü yanık skoru oluşan ratlar deneye dahil edildi. Deney süresi tamamlanan ratlara anestezi altında dekapitasyon ve entüleksyon uygulandı. Enükle edilen gözlerden kornealar 4 mm'lik pañç yardımıyla standart büyüklükte çıkartıldı. Eşit iki parçaya bölünerek yarısında ELİSA yöntemiyle diğer yarısında da immünohistokimyasal yöntemle VEGF düzeylerine bakıldı.

2.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi

Rat korneaları X40 büyütmede yarıklı lamba mikroskobuna monte edilmiş Sony dijital kamera (CCD- IRIS model DXC 107 AP) kullanılarak fotoğraflandı. Neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi (neovaskülarizasyon alanı X 100 / toplam kornea alanı) dijital bilgisayar imaj analizi kullanılarak hesaplandı (Topcon Image Net 2000, Itabashiku, Tokyo, Japonya) ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı (135).

2.4. Vasküler Endotelial Growth Faktör ELİSA ile Değerlendirilmesi

ELİSA ile VEGF düzeylerini değerlendirmek için eşit büyüklükte ve miktarda korneal örnekler alındı. Örnekleri alırken eşit büyüklükte olmaları için 4 mm çaplı pañç kullanıldı. Bu örnekler, Rat VEGF doku ve hücre lizatı ELİSA kiti (RayBio®, RayBiotech, Inc. ABD) içinde bulunan solüsyonlar ile lizat haline getirildi. Elde edilen 100 mikrolitrelik örnekler Ependorf tüplerinden alınarak ELİSA platelerine konuldu. İnkübasyon buffer standard dilüsyon buffer eklendi. Kromojen ve streptovidin eklenerek renk reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı ve stop solüsyonuyla durdurulan reaksiyon 450 nanometrede ELİSA cihazında 'endpoint' olarak okundu. VEGF düzeyi pg/kornea biriminde elde edildi (136).

2.5. Vasküler Endotelial Growth Faktör İmmünohistokimyasal boyanması

İmmünohistokimyasal boyama için kornea santralinden geçen, limbustan limbusa uzanan, yanık alanını içeren, beş mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler VEGF kiti (Rat anti-VEGF, Santa Cruz Biothecnology, USA) kullanılarak otomatik immunohistokimyasal boyama cihazı (Ventana, Benchmark XT) yardımıyla boyandı.

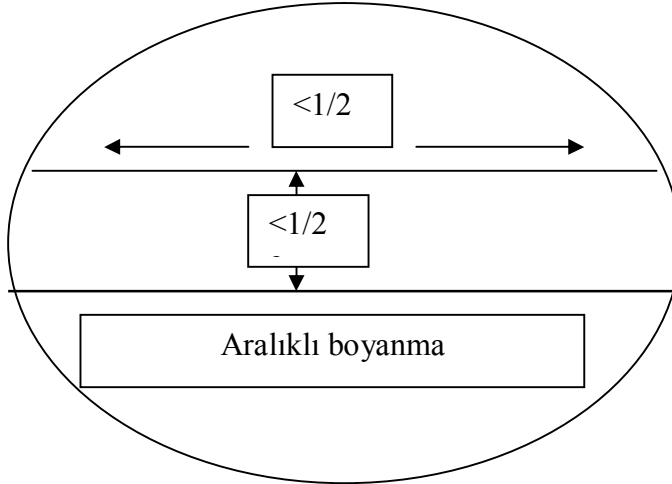
Preparatlar Olympus marka ışık mikroskopu ile randomize olarak incelendi. Aynı mikroskobun fotoğraf ataçmanı ile dokuların 40x büyütmede dijital fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal boyamada VEGF antikoruna ile boyanan kornea epitel, stroma ve endotel hücrelerinin boyanma yaygınlık ve şiddetleri semikantitatif olarak değerlendirildi (7, 137).

2.6. Semikantitatif Değerlendirme (Skorlama)

Her değerlendirme x40 büyütmede ve üç ayrı kesit alanında yapıldı.

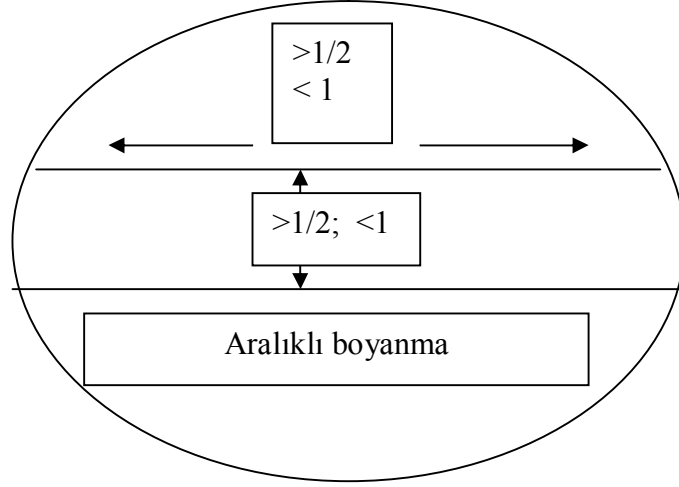
0. derece: Epitel ve stroma tabakalarında hiç boyanma olmaması

1. derece: Epitel ve stromanın hem kalınlığının hem de genişliğinin yarısından azında olan aralıklı boyanma.



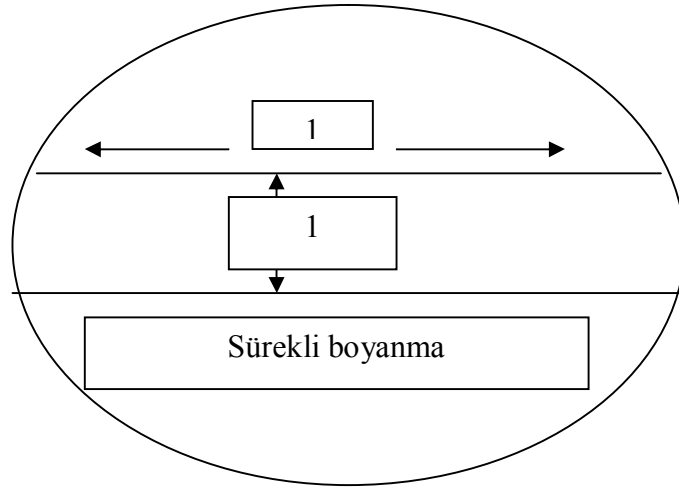
Şekil 3. Epitel ve stromada 1. derece boyanmanın şematize edilmesi

2. derece: Epitel ve stromanın hem kalınlığının hem de genişliğinin yarısından fazlasını tutan ancak, tam kat olmayan aralıklı boyanma.



Şekil 4. Epitel ve stromada 2. derece boyanmanın şematize edilmesi

3. derece: Epitel ve stromanın tüm kalınlığını ve tüm genişliğini kapsayan sürekli boyanma.



Şekil 5. Epitel ve stromada 3. derece boyanmanın şematize edilmesi

Tek sıra hücre tabakasından oluşması nedeniyle semikantitatif değerlendirme yapmanın zorluğu ve sağlıklı kornea endotelinde de VEGF boyanmasının olması nedeniyle endotel tabakası değerlendirmeye alınmamıştır.

2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları alındı. Çalışmanın istatistiksel analizi, Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 13 (SPSS for Windows versiyon 13) paket programı ile yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplararası ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

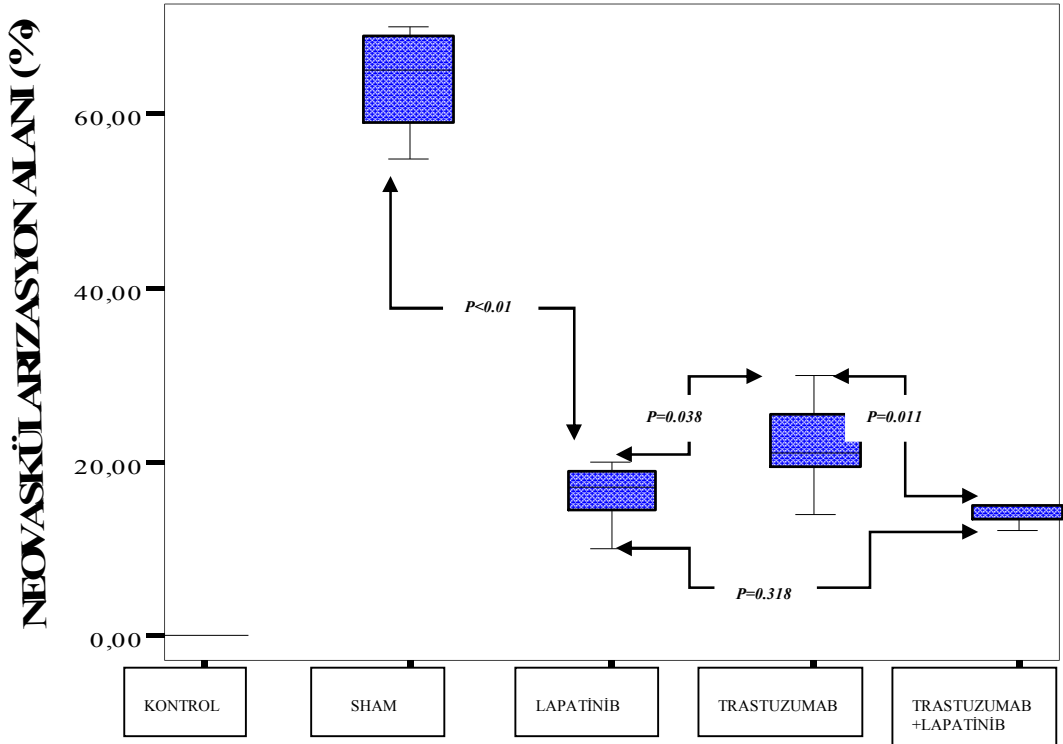
3. BULGULAR

3.1. Neovaskularizasyon Alanlarının Karşılaştırılması

Kontrol hariç tüm gruplarda neovaskularizasyonun ön stromanın üst ve orta kısmında tesbit edildi. Gruplar arasında neovaskularizasyon alanlarının yüzdeleri karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.01$) (Tablo 4, Şekil 6).

Tablo 4. Gruplardaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri

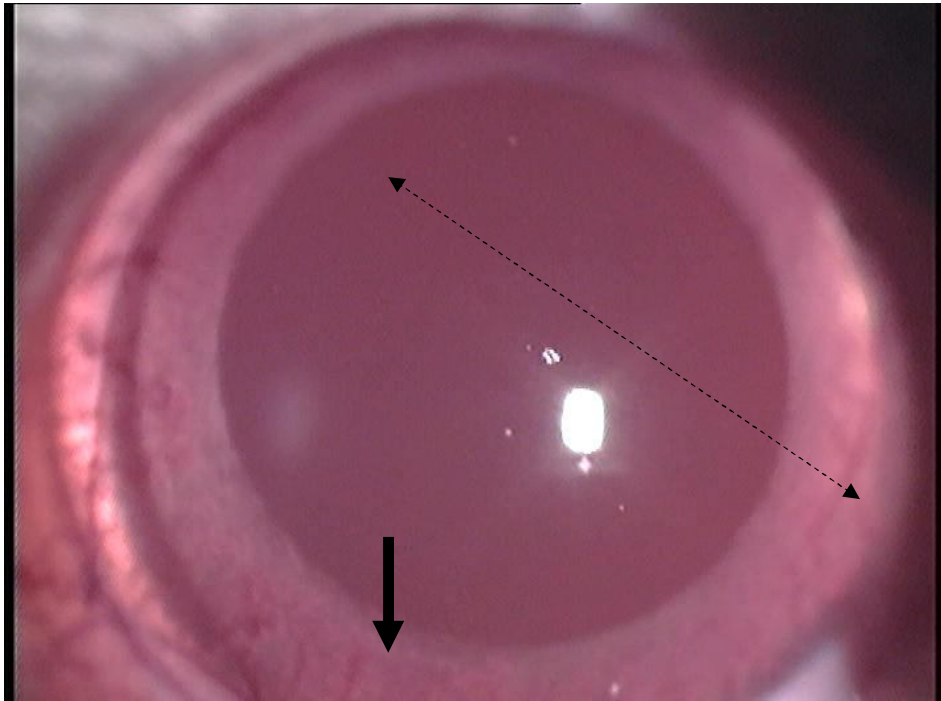
	Grup I Kontrol (N=7)	Grup II Sham (N=7)	Grup III Lpt (N=7)	Grup IV Trst (N=7)	Grup V Lpt+Trst (N=7)
Neovaskularizasyon Alanı (%) (Ort.± SD)	0.00 ± 0.00	63.71 ± 6.07	16.28 ± 3.59	22.85 ± 7.15	14.71 ± 2.21



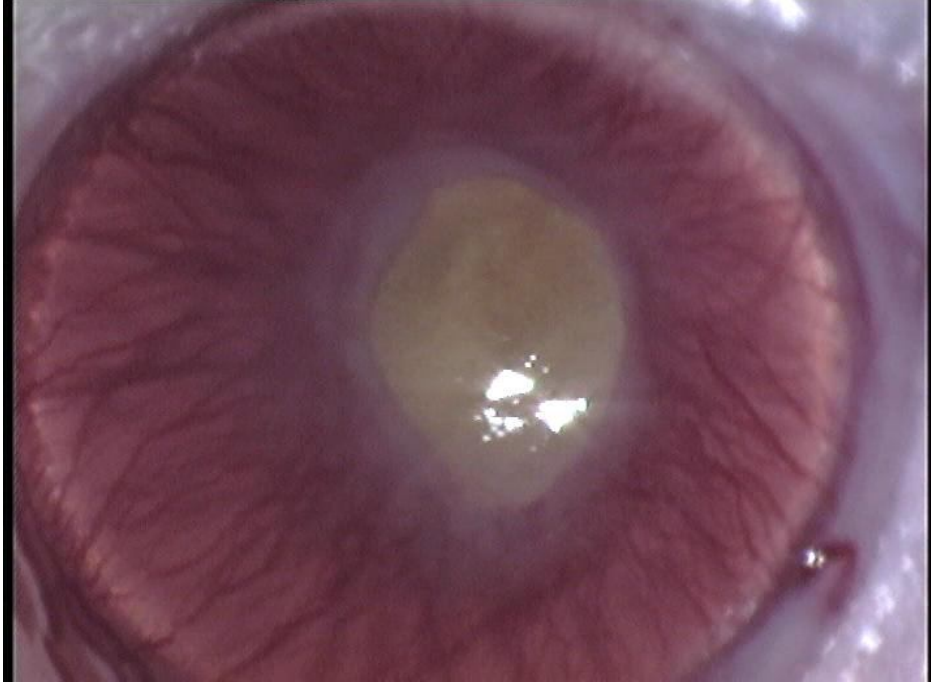
Şekil 6. Gruplardaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına olan yüzdeleri

Kontrol grubundaki neovaskularizasyon alanının, sham ve tedavi gruplarına göre anlamlı düşük olduğu görülürken ($p<0.01$), tedavi gruplarının tümünde sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu tesbit edildi ($p<0.01$). Tedavi gruplarından olan grup III ile grup V arasında anlamlı farkın olmadığı tespit edildi ($p=0.31$). Grup III ve grup V'in tek başına grup IV'e göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p=0.03$, $p=0.01$) (Tablo 4, Şekil 6).

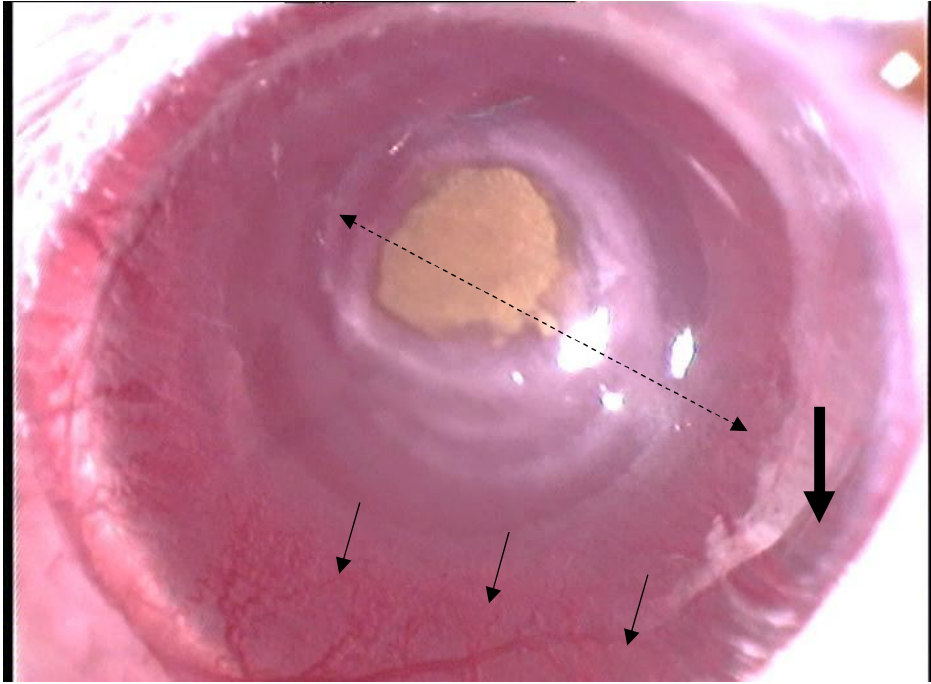
Gruplardaki kornea neovaskularizasyonları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 7, 8, 9, 10, 11).



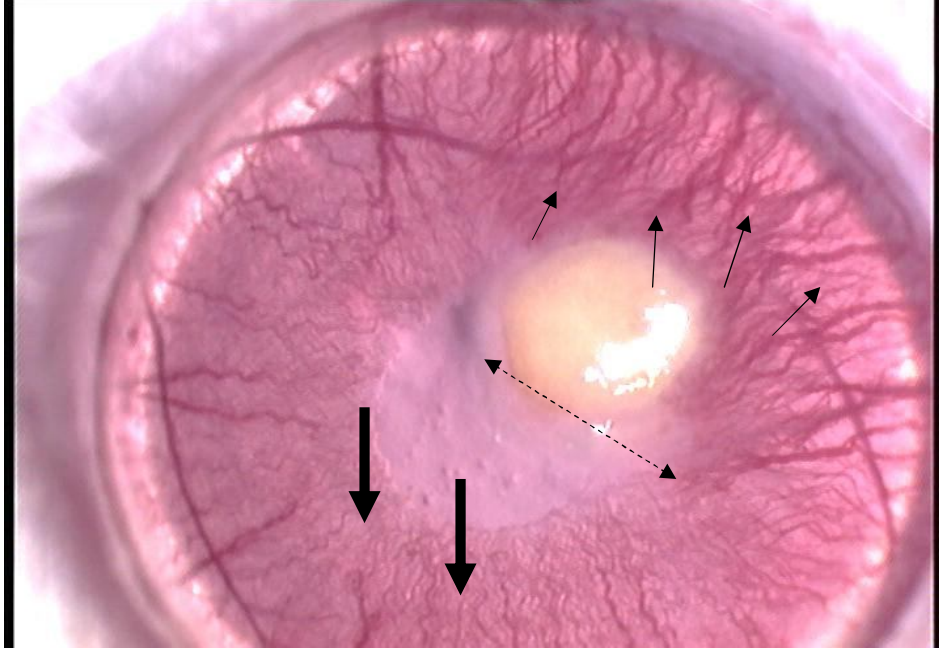
Şekil 7. Kontrol grubundaki bir rat korneası. Kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok ise iris kenarlarını göstermektedir.



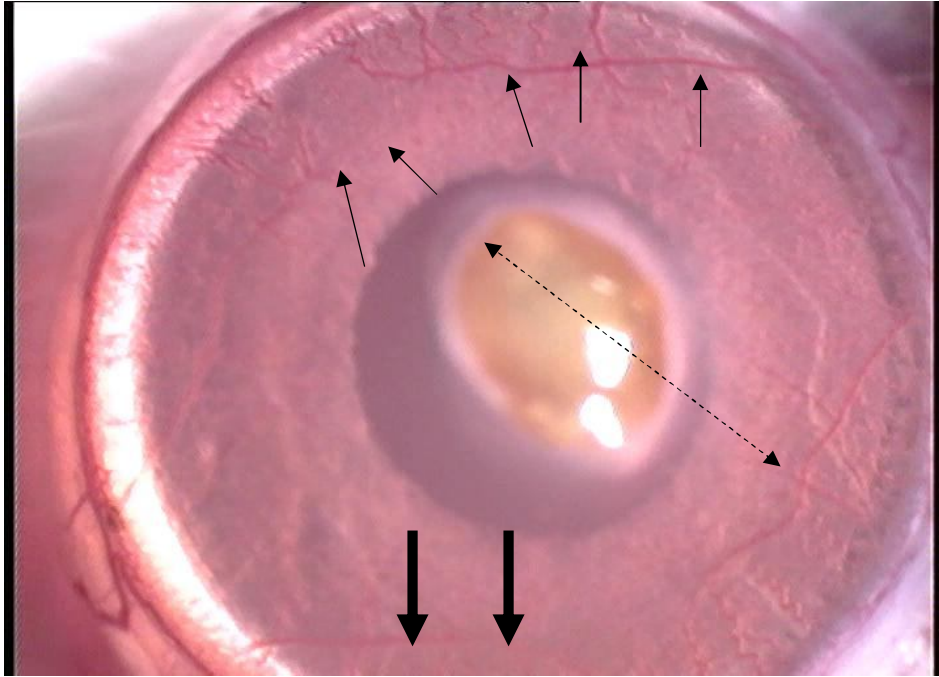
Şekil 8. Sham grubunda rat korneasında totale yakın kornea neovaskülarizasyonu.



Şekil 9. Lapatinib grubunda olan bir denekteki santral korneal skar ve kısmi kornea neovaskülarizasyon. İnce oklar neovaskülarizasyonları, kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok iris kenarlarını göstermektedir.



Şekil 10. Trastuzumab grubunda olan bir denekteki santral korneal skar ve kısmi kornea neovaskülarizasyon. İnce oklar neovaskülarizasyonları, kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok iris kenarlarını göstermektedir.



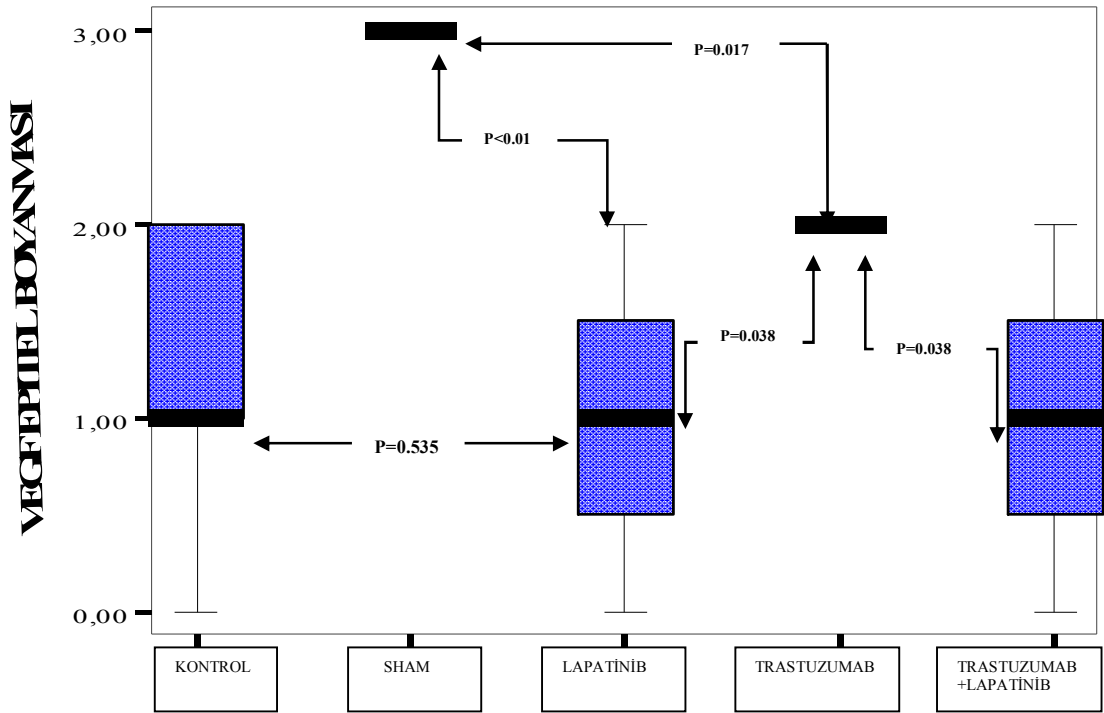
Şekil 11. Lapatinib+Trastuzumab grubunda olan bir denekteki santral korneal skar ve kısmi kornea neovaskülarizasyonu. İnce oklar neovaskülarizasyonları, kalın oklar albino ratın iris damarlarını ve çift taraflı çizgili ok iris kenarlarını göstermektedir.

3.2. Epitel VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması

Vasküler endotelyal growth faktör immünohistokimyasal boyanması epitel katında özellikle hücrelerin sitoplazmasında yoğun olarak tespit edildi (Tablo 5, Şekil 12).

Tablo 5. Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.

	Grup I Kontrol (N=7)	Grup II Sham (N=7)	Grup III Lpt (N=7)	Grup IV Trst (N=7)	Grup V Lpt+Trst (N=7)
Epitelium VEGF Boyanma Skoru (Ort.± SD)	1.285 ± 0.75	2.857 ± 0.37	1.000 ± 0.81	2.000 ± 0.57	1.000 ± 0.81

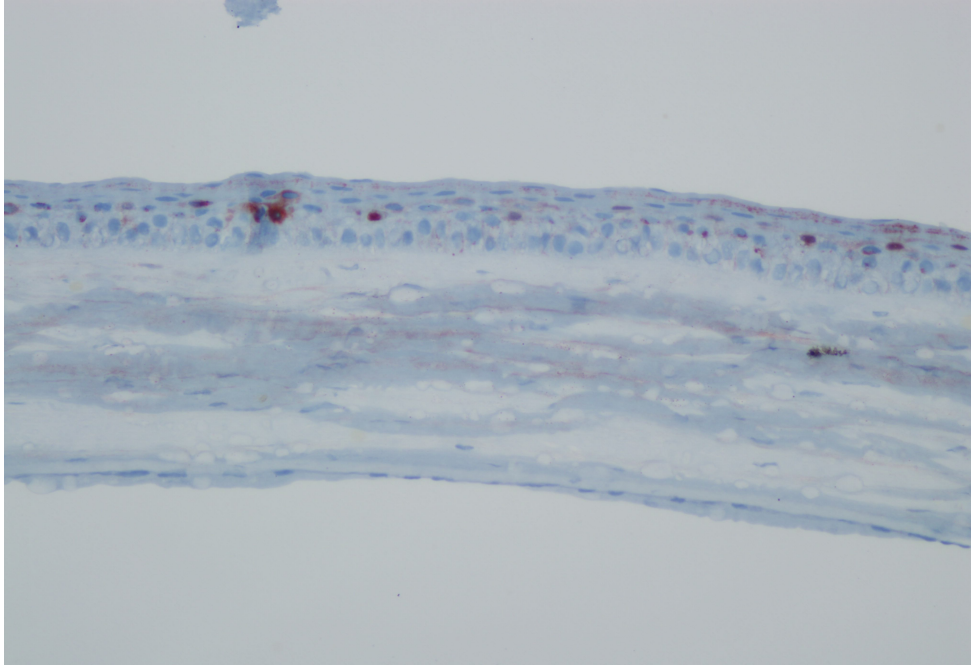


Şekil 12. Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanma skorları.

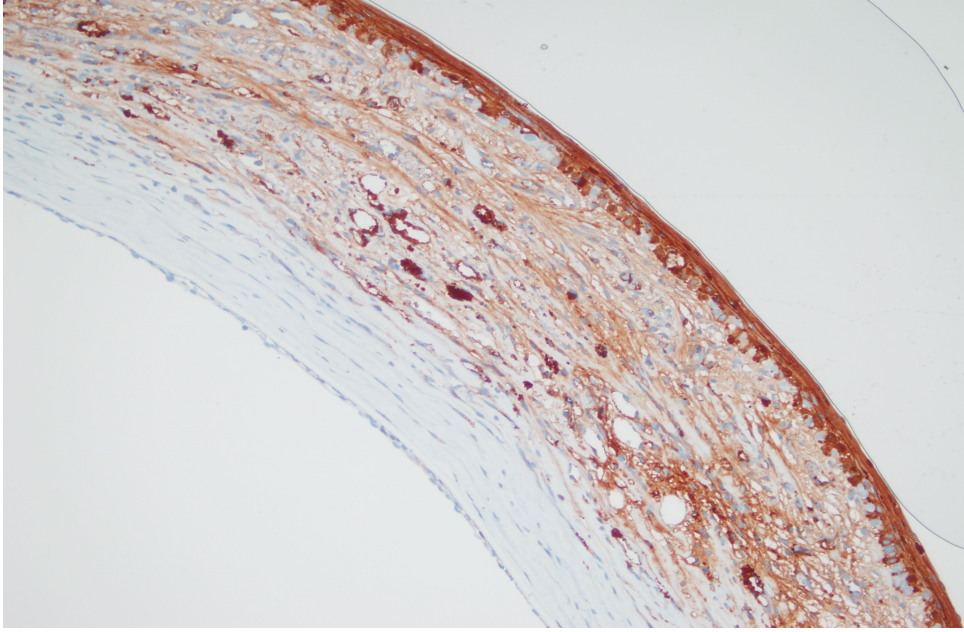
Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların epitel VEGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü (p=0.01). Grup III'teki epitel VEGF boyanma düzeyi,

Grup II'den anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p<0.01$), grup I ile farklılık saptanmadı ($p=0.53$). Grup IV'te sham grubundan anlamlı ölçüde düşük epitel VEGF boyanma düzeyi tespit edilirken ($p=0.01$), grup I ile farklılık saptanmadı ($p=0.12$). Yine grup IV'deki epitel VEGF boyanma düzeyi, grup III ve V'in boyanma düzeyinden anlamlı ölçüde yüksek tesbit edildi ($p=0.03$ ve $p=0.02$). Grup V'te grup II'den anlamlı ölçüde daha düşük epitel VEGF boyanma düzeyi olduğu görüldü ($p=0.02$). Grup I, grup V ve grup III arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0.53$, $p=0.63$ ve $p=0.98$).

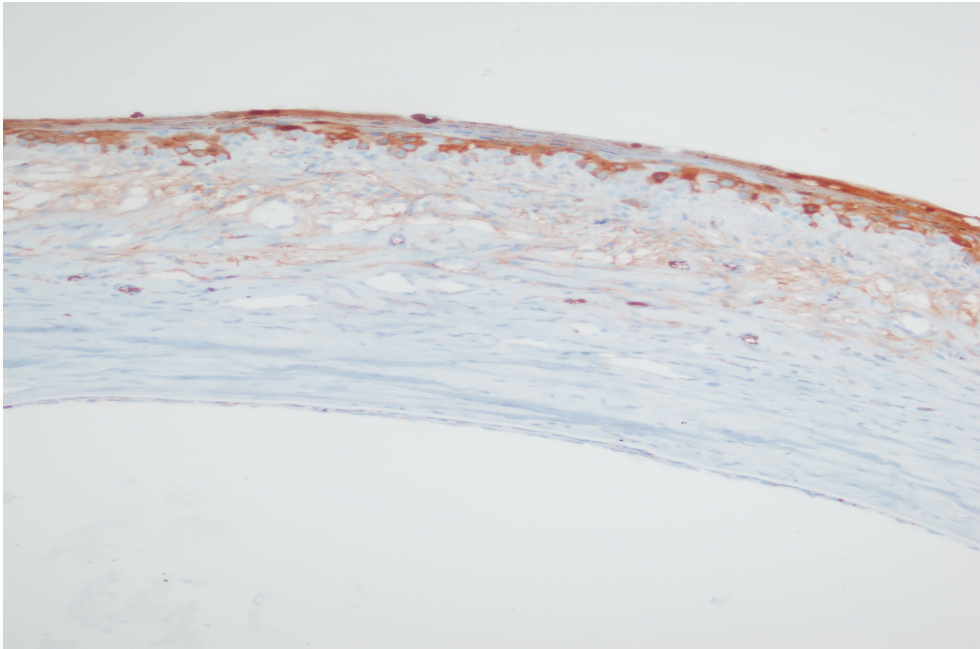
Gruplardaki kornea epitel VEGF immünohistokimyasal boyanma şiddetleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 13, 14, 15, 16, 17).



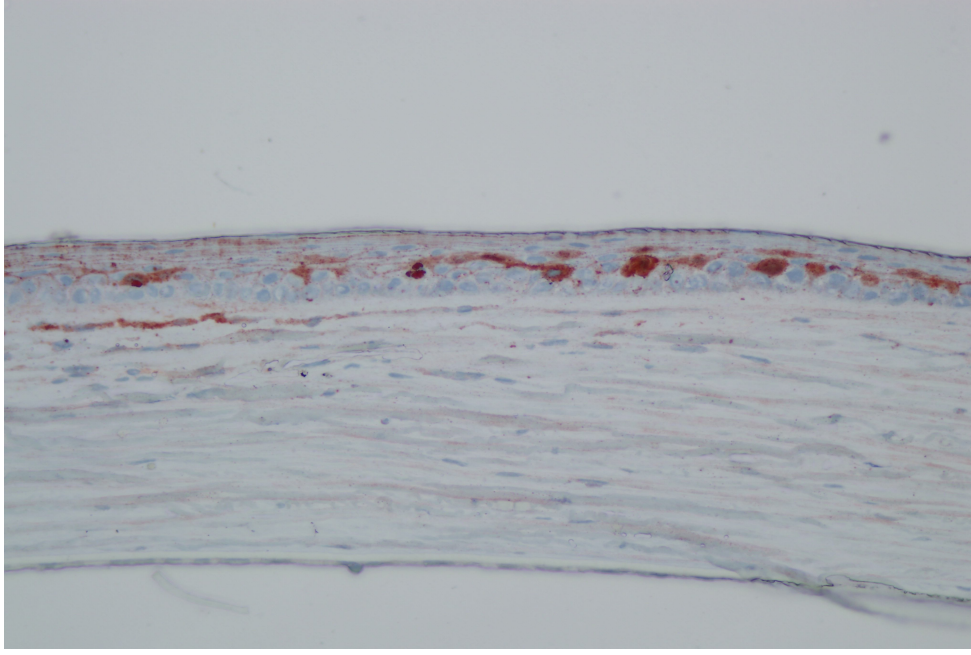
Şekil 13. Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Boyanma epitelin bazal tabakalarında, stromanın ise tüm katlarında yoğunlaşmıştır. Skorlar; epitel: 1, stroma: 0.



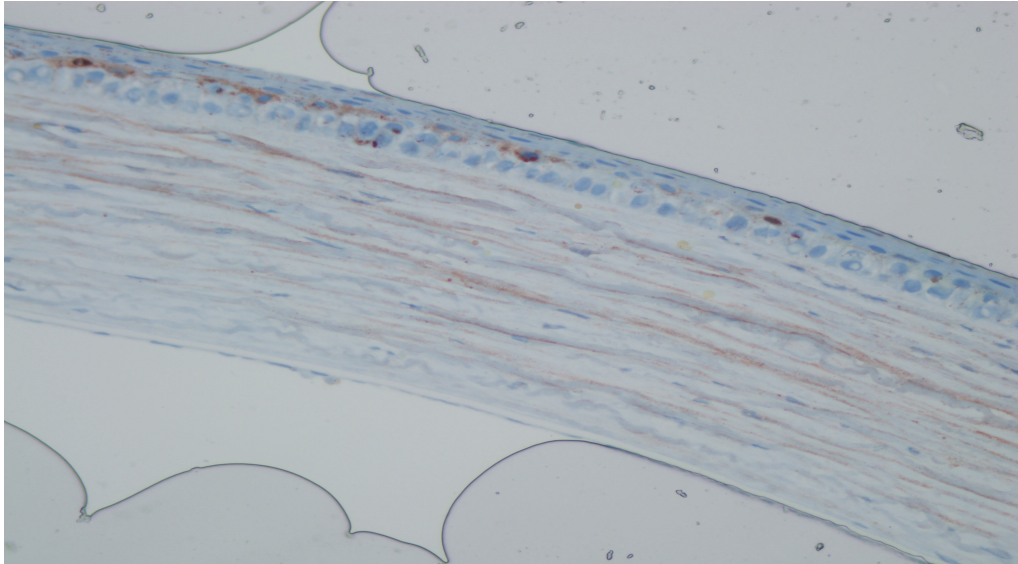
Şekil 14. Sham grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Epitel hücrelerinin dizilimlerinin bozulduğu görülmektedir. Stromada kalınlaşma ve düzenli yapıda bozulma mevcuttur. Skorlar; epitel: 3, stroma: 3



Şekil 15. Trastuzumab grubundaki bir rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Boyanma epitelin bazal tabakalarında yoğunlaşmıştır. Skorlar; epitel: 2, stroma: 1



Şekil 16. Lapatinib tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü. Epitel ve stromanın düzenli yapısının korunduğu izleniyor. Skorlar; epitel: 1, stroma: 1



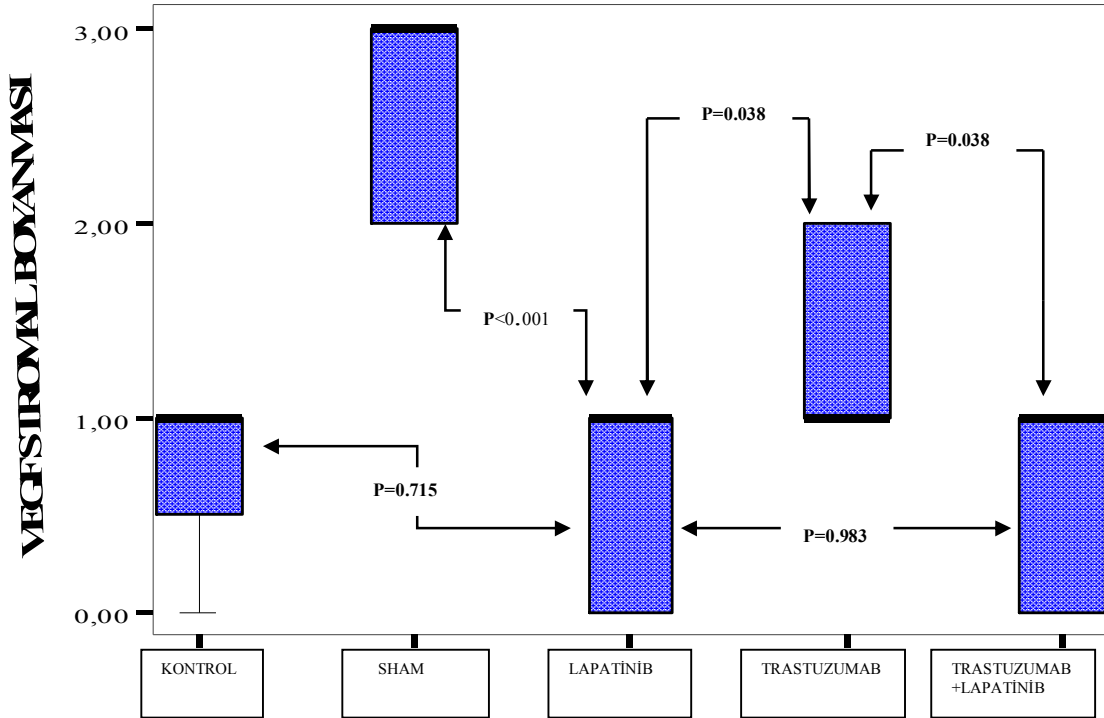
Şekil 17. Lapatinib+Trastuzumab tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü. Epitel ve stromanın düzenli yapısının korunduğu izleniyor. Skorlar; epitel: 1, stroma: 1

3.3. Stromal VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması

Vasküler endotelial growth faktör immünohistokimyasal boyanması özellikle üst stromada yoğun olarak saptandı. Tüm gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.01$) (Tablo 6, Şekil 18).

Tablo 6. Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
	Kontrol	Sham	Lpt	Trst	Lpt+Trst
	(N=7)	(N=7)	(N=7)	(N=7)	(N=7)
Stromal VEGF Boyanma Skoru (Ort.± SD)	0.710 ± 0.48	2.571 ± 0.53	0.571 ± 0.53	1.428 ± 0.53	0.571 ± 0.53



Şekil 18. Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma skorları.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların stromal VEGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p<0.01$). Grup III'teki stromal VEGF boyanma düzeyi, sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p<0.01$), kontrol grubu ile farklılık saptanmadı ($p=0.71$). Grup IV'te grup II'den anlamlı ölçüde düşük stromal VEGF boyanma düzeyi tespit edilirken ($p<0.01$), grup I ile arasında farklılık saptanmadı ($p=0.73$). Yine grup IV'deki stromal VEGF boyanma düzeyi, grup III ve V'in boyanma düzeyinden anlamlı ölçüde yüksek tespit edildi ($p=0.03$ ve $p=0.03$). Grup V'te grup II'den anlamlı ölçüde daha düşük stromal VEGF boyanma düzeyi olduğu görüldü ($p<0.01$). Grup I, grup V ve grup III arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0.71$, $p=0.71$ ve $p=0.92$).

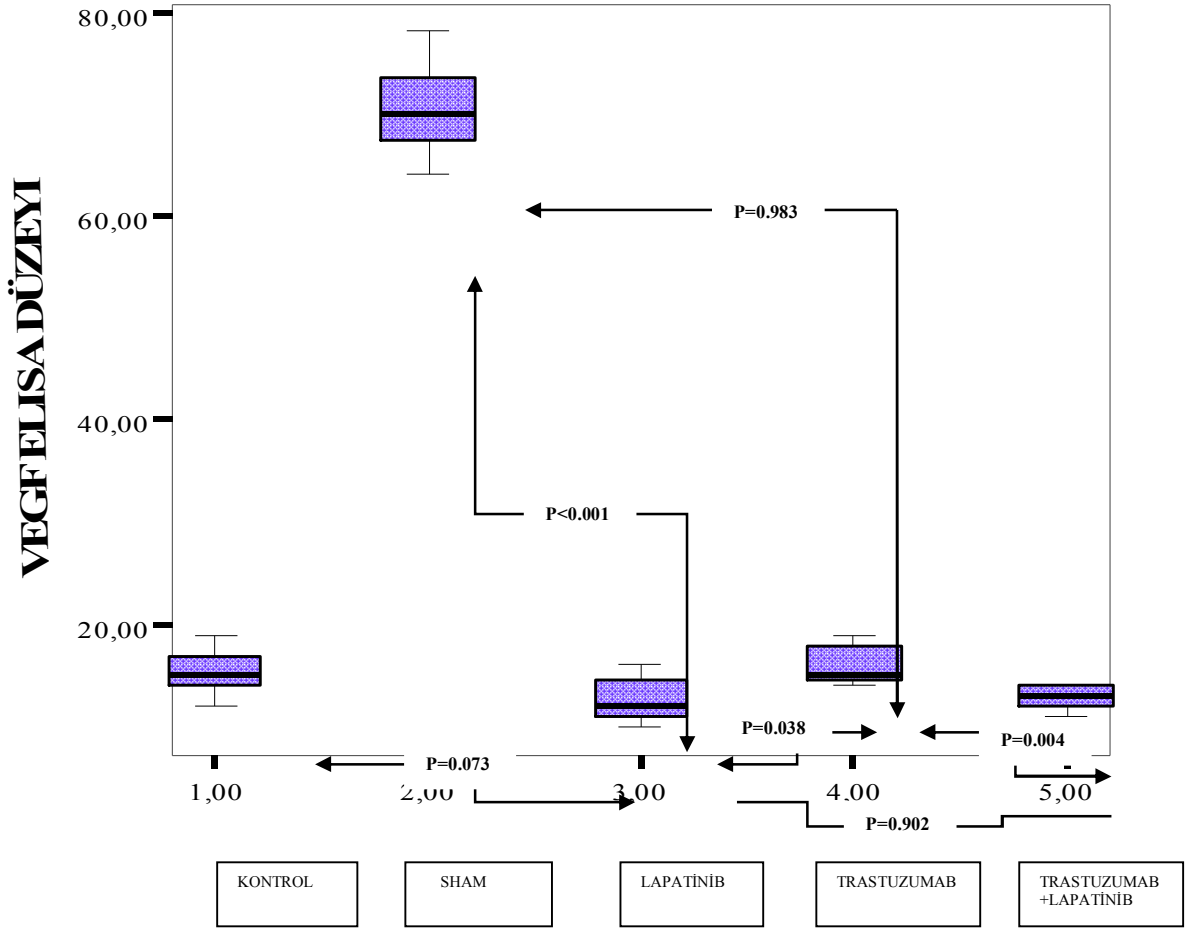
Grublardaki kornea stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma şiddetleri şekillerde gösterilmiştir (Şekil 13, 14, 15, 16, 17).

3.4. Korneal VEGF ELİSA Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda ELİSA yöntemi ile ölçülen VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.01$) (Tablo 7, Şekil 19).

Tablo 7. Grublardaki korneal VEGF ELİSA düzeyleri ve standart sapma değerleri

	Grup I Kontrol (N=7)	Grup II Sham (N=7)	Grup III Lpt (N=7)	Grup IV Trst (N=7)	Grup V Lpt+Trst (N=7)
VEGF ELİSA Düzeyleri Pg/kornea (Ort.± SD)	15.428± 2.50	70.571 ± 4.89	12.714 ± 2.28	16.142 ± 2.19	12.857 ± 1.34



Şekil 19. Gruplardaki korneal VEGF ELİSA düzeyleri.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında grup I'deki korneaların VEGF ELİSA düzeyleri grup II'den anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.01$). Grup III'teki VEGF ELİSA düzeyleri, sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p < 0.01$), kontrol grubu ile farklılık saptanmadı ($p = 0.07$). Grup IV'te grup II'den anlamlı ölçüde düşük VEGF ELİSA düzeyi tespit edilirken ($p < 0.01$), grub I ile farklılık saptanmadı ($p = 0.71$). Yine grup IV'deki VEGF ELİSA düzeyleri, grup III ve V'in VEGF ELİSA düzeylerinden anlamlı ölçüde yüksek tesbit edildi ($p = 0.03$ ve $p < 0.01$). Grup V'te grup II'den anlamlı ölçüde daha düşük VEGF ELİSA düzeyi olduğu görüldü ($p < 0.01$). Grup I, grup V ve grup III arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p = 0.07$, $p = 0.06$ ve $p = 0.92$).

4. TARTIŞMA

Korneanın neovasküler hastalıkları önemli bir halk sağlığı problemidir (138). Saydam ve avasküler yapıda olan kornea, birçok etken karşısında bu özelliğini yitirir ve opak hale dönerek ışık geçişine engel olur. Kimyasal yanık, travma, kontakt lens kullanımı gibi nedenlerle oluşan hipoksi ve enfeksiyon gibi nedenler, korneada yeni damarlanma ile sonuçlanmaktadır. Korneadaki neovaskülarizasyon görmeyi tehdit etmekle kalmayıp, yapılacak keratoplastinin prognozunu da olumsuz olarak etkilemektedir (139, 140).

Deneyssel ve klinik korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda tanımlanan birçok tedavi yöntemi içinde, klinik pratikte korneal greft reddi ve korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde esas olarak steroidler kullanılmaktadır. Fakat steroid kullanımı bazı durumlarda yeterince etkili değildir. Bununla birlikte enfeksiyon, glokom, katarakt oluşumu gibi çeşitli komplikasyonlarla ilişkilidir. Görme kaybının başlıca nedenlerinden birisi olan neovaskülarizasyonu önleyecek, durduracak veya geciktirecek yeni tedavi yöntemlerine gereksinim vardır.

Çalışmamızda Trastuzumab ve Lapatinib'i deneyssel kornea neovaskülarizasyonda tek başına ve beraber kullandık. Etkinliklerini karşılaştırmak amacıyla neovaskülarizasyon oranlarını ve korneal VEGF düzeylerini değerlendirdik.

Lapatinib (Tykerb®) insan epidermal growth faktör reseptör 1 (EGFR/HER1) ve insan epidermal growth faktör reseptör 2 (HER2/ErbB2) tirozin kinazını (TK) inhibe ederek sinyal iletimini önleyen çift etkili selektif inhibitördür (36). Lapatinib etkisini intraselüler olarak TK'ın ATP bağlayan kısmına bağlanarak etki göstermektedir. TK'ın fosforilasyon ve aktivasyonuna engel olmaktadır. Bu sayede sinyal iletimi en baştan bloke edilerek, ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz-1 (ERK1) ve fosfotidilinozitol-3 kinaz (PI3K) gibi birçok yolağın aktivasyonuna da engel olunmaktadır (127-130).

İnsan epidermal growth faktör reseptör-1, VEGF reseptörüne benzer şekilde tirozin kinaz reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER1, EGFR'nün 19 altgruplarından birisidir (121). Bu ailenin aktivasyonu, hücre proliferasyonu, aktivasyonu ve devamlılığı açısından önemlidir. HER1 birçok molekül ile aktive olmaktadır. Bunlar arasında, EGF ve TGF- α yer almaktadır. EGFR'nin ligand ile

birleşimi dimerizasyonuna neden olur. EGFR reseptör ailesi aktivasyonunda dimerizasyon ile homodimerler ve heterodimerler oluşmaktadır. HER1'in uyarılması TK aktivasyonu sonucunda protein kinaz ve fosfatidilinozitol-3-OH kinaz yolunu aktive etmektedir (131). Yapılan çalışmalar sonucunda HER1 aktivasyonunun hücre migrasyonunu, proliferasyonunu, adhezyonunu, apoptozisinin önlenmesinde etkili olduğu ve neovaskülarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (132). EGFR aktivasyonu ile VEGF gibi anjiyogenik moleküllerin salınımını artararak anjiyogenezin hızlandığı bilinmektedir (37). EGFR inhibitörleri sayesinde anjiyogenezin engellenebileceği gösterilmiştir (38).

İnsan epidermal growth faktör reseptör-2, Lapatinibin etkili olduğu ikinci reseptördür ve anjiyogenezde önemli rolü vardır. HER2 aynı zamanda çalışmamızda kullandığımız Trastuzumab'ın etki ettiği reseptördür ve HER1'e oranla anjiyogenez üzerine etkisi daha çok araştırılmıştır. HER2'nin aktivasyonu EGF'ün reseptöre bağlanmasını indükler, fosfatidilinositol 3-OH kinaz, ve mitojen aktive protein kinaz kaskadını içeren multipl hücrel sinyal yolu aktive olur. HER2 reseptörü normal hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda kritik rol oynar (122). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyon, artmış tümör hücre motilitesi, anjiyogenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir (123). İnvitro çalışmalarda da Lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptörlerinin ikisini birden inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptör blokörü olarak, tek başına HER1 reseptör blokörlerinden daha etkin olduğu gösterilmiştir (130).

Yapılan bir çalışmada A549 hücre serisi verilerek farelerde akciğer kanseri oluşturulmuştur. Tümör dokusundaki anjiyogenez yoğunluğu ise CD31 ile tümör kesitleri boyanarak değerlendirilmiş ve Lapatinib'in, kontrol grubuna ve radyoterapi alan gruba göre anjiyogenezi anlamlı derecede geriletmediği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada anjiyogenezde önemli yere sahip, dolaşımdaki endotelial progenitör hücrelerin (CEPs) yoğunlukları da flow sitometrik ölçümlerle periferik kanda değerlendirilmiştir. Lapatinib tedavisi alan grubun istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CEPs miktarı kontrole göre düşük tespit edilmiştir. Tek başına radyoterapi alan grubun kontrole oranla CEPs düzeyi yüksek çıkmasına rağmen, radyoterapi ile beraber Lapatinib alan grubun kontrole göre CEPs düzeyi daha düşük çıkmıştır

(141). Çalışmanın sonunda Lapatinib'in anjiyogenezi kontrol grubuna göre yaklaşık %80 oranında geriletildiği tespit edilmiştir. Lapatinib bu etkisini EGFR reseptör sinyal iletimini bloke ederek anjiyogenik faktörlerin (VEGF ve IL-8) salınımını azaltarak göstermektedir. Bunun yanında Olausen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Lapatinib'in A549 hücre serilerinde VEGFR1 fosforilizasyonunu %70 oranında engellediğini göstermişlerdir. Bu inhibisyon henüz endotel hücrelerinde gösterilemese dahi direk anjiyogenezi inhibe eden bir yolak olarak büyük öneme sahiptir (141-143).

Trastuzumab'a ilave olarak Lapatinib'in bazı kanser türlerinde daha etkin olduğu gösterilmiştir. HER1 ve HER2 ayrı ayrı inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği daha önceki yayınlarda gösterilmiştir (35, 133). Lapatinib aracılığı ile kornea neovaskülarizasyonunu ayrı ayrı önlediği bilinen iki reseptörün birden aynı anda inhibisyonu ile daha etkili tedavi yöntemi hedeflenmektedir.

Trastuzumab (Herceptin®) insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 proteininin (HER2/ErbB2) ekstrasellüler bölgesini seçici olarak hedefleyen rekombinant DNA kökenli IgG yapısında bir insan monoklonal antikordur (120). HER2, EGFR'nün 19 altgruplarından biridir (121). HER2 onkoproteini 3 bölümden oluşur:

- 1) 632 aminoasit'ten oluşan ekstrasellüler alan, burada ligand-bağlayıcı bölge bulunur ve büyüme faktörleri buraya bağlanır.
- 2) 22 aminoasit'ten oluşan transmembran alan.
- 3) 580 aminoasit'ten oluşan intrasellüler alan, bu kısım tirozin kinaz aktivitesi gösterir ve sinyal transduksiyonundan sorumludur.

İnsan epidermal growth faktör reseptör-2 normal hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda kritik rol oynar ve bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyon, artmış tümör hücre motilitesi, anjiyogenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir (122, 123).

Epidermal growth faktör'ün kornea epitel ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği ve insan gözyaşı bileşenleri arasında bulunduğu gösterilmiştir (144). HER2 ve VEGF sinyal yolu moleküler seviyede birbirine bağlıdır. HER2 ve VEGF, hücre proliferasyonu, tümör invazyonu ve anjiyogenez

gibi etkinliklerini indirekt ve direkt yollarla işbirliği içinde gerçekleştirmektedir. HER2 sinyal yolağının VEGF ekspresyonunun kontrolünde önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (145). VEGF endotel hücreleri üzerindeki reseptörleri ile endotel hücrelerinde proliferasyona ve migrasyona neden olarak yeni damar oluşumunu desteklemektedir. HER2'nin hipoksik durumlarda VEGF artışına yol açtığı yapılan önceki çalışmalarda gösterilmesine rağmen yapılan son çalışmalarda bu yolak için hipoksinin şart olmadığı gösterilmiştir (146).

Bunun dışında birçok farklı yolağın içinde bulunduğu farklı mekanizmalarla Ewing hücreli sarkomada *in vivo* ve *in vitro* olarak Trastuzumab ile tedavinin VEGF ekspresyonunu azalttığına dair çalışmalar vardır (147, 148). HER2 ekspresyonunun fazla olduğu meme kanserlerinde yapılan bir çalışmada, Trastuzumab ile tedavi sonrasında tümör boyutlarının azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmanın *in vitro* kısmında damar yoğunluğunun azaldığı tespit edilirken *in vivo* kısmında ise endotel hücre migrasyonunun azaldığı izlenmiştir (149). Trastuzumab ile tedavi edilen tümörlerde kontrol grubuna göre anti-anjiyogenik faktörler daha fazla eksprese olurken, birçok pro-anjiyogenik faktörün ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (147, 150). Yapılan bir çalışmada Trastuzumab ile tedavi edilen tümörde anti-anjiyogenik faktörlerden Trombospondin-1 ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada pro-anjiyogenik faktörlerden TGF-alfa, Anjiopoetin-1, Plazminojen aktivatör inhibitörü-1(PAI-1) ve VEGF ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (151).

Epidermal growth faktör reseptör'ü EGF ile aktive edildiğinde İnterlökin-8 (IL-8), MMP, VEGF ve plazminojen aktivatörleri (PA) gibi anjiyogenik faktörlerin salınımıyla anjiyogenez indüklenir (152). Üretiminde daha çok hipoksinin sorumlu olduğu IL-8 ise özellikle endotel hücreleri üzerinde göstermiş olduğu etki ile anjiyogenezi uyarmaktadır. IL-8 bu etkisini mikrovasküler endotel hücrelerinden sızıntıya neden olarak göstermektedir (153). İnterlökin-8 reseptörlerinin endotel hücrelerinde aktive edilmesi hücre çoğalmasını ve takiben anjiyogenezi indüklemektedir (152). TGF-alfa ise IL-8 ile benzer bir etkiye sahip olup endotel hücreleri için mitojenik etkisinin yanında, anjiyogenezi de uyarmaktadır (154). Anjiyopoetin-1 ise IL-8 ve TGF-alfa'dan farklı bir yol ile daha çok yeni oluşan damarlarda etki göstermektedir. Kapiller damarları güçlendirmekte, perisitleri

stabilize etmekte ve endotel hücre yaşam süresini artırarak yeni oluşan vasküler yapıyı kormaktadır (155).

İnsan meme kanser hücrelerinde EGFR aktivitesinin Anjiyopoetin-2 (Ang-2) ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve Trastuzumab ile Ang-2 bloklanabilir (156). Anjiyopoetin-1 (Ang-1) ve Anjiyopoetin-2 (Ang-2) EGF'ün yeni bir grup ailesine ait üyeleri olup endotelyal reseptör spesifik tirozin kinaz (Tie-2) ile bağlanarak etkisini göstermektedir. Anjiyopoetin ve Tie-2 birlikteliği vasküler yapının bütünlüğünün sağlanmasında önemli role sahiptir. Bu görevi endotel hücreleri ile perisitler arasındaki ilişkinin kurulup devamlılığını sağlamanın yanında VEGF aktivitesinin düzenlenmesi de yer almaktadır (157). Ang-1 ile retinada, VEGF indüklediği vasküler permabilite geriletilmiş ve retinal neovaskülarizasyon engellenebilmiştir. Bu bulgular Ang-1'in retinal neovaskülarizasyonun ve maküler ödemin tedavisi için etkili olabileceğini göstermektedir. Ang-2 ise Ang-1'in endojen antagonisti olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda Ang-2'nin hem patolojik hem de fizyolojik anjiyogenezde önemli rol oynadığını göstermiştir. Bu etkisini gösterirken VEGF üzerinden de birçok yolağı aktive ettiği bildirilmektedir (158, 159).

Sonuç olarak Ang-2, Ang-1'e zıt olarak aslında anjiyogenik bir faktördür ve damarları destabilize eder, yoğun olarak yeni damar yapımı bölgelerinde seviyesi artmış olarak bulunur. Ang-2 nin damarlar üzerindeki destabilizatör etkisi vasküler yapıyı tümör dokusunda VEGF gibi mutajen ajanlara karşı daha duyarlı kılabilir (160). Dolayısıyla Trastuzumab ile Ang-2'nin bloklanması tümör anjiyogenezi ve metastazının önlenmesinde ek bir mekanizma olabilir (156).

Literatürde kornea neovaskülarizasyonun EGFR inhibisyonu ile engellendiğini gösteren iki çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ono ve arkadaşları fare korneasında EGF'le indüklenen anjiyogenezin EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan Gefitinib tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir (140, 152). Güler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Trastuzumab kullanmışlardır. Aynı çalışmada çalışmamıza benzer şekilde rat korneasında kimyasal yanıkla neovaskülarizasyon indüklenmiş ve sonra randomize olarak kontrol ve tedavi grubu oluşturulmuştur. Tedavi grubunda Trastuzumab intraperitoneal yolla sistemik olarak verilmiştir. Deney sonunda Trastuzumab grubunda kontrol grubuna göre neovaskülarizasyon alanının daha küçük olduğu bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan

korneal doku preparatları immün boyalarla VEGF boyanma yoğunlu açısından karşılaştırılmıştır. Trastuzumab ile tedavi edilen grupta, kontrol grubuna göre kornea VEGF boyanma yoğunluğunun anlamlı derecede daha az olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, sistemik Trastuzumab uygulamasının korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduğunu ve VEGF düzeylerini anlamlı oranda azalttığını tespit etmişlerdir (35). Çalışmamızda sistemik olarak Lapatinib ve Trastuzumab uyguladık ve neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduklarını saptadık. Yine benzer şekilde immün boyamalarda VEGF düzeyinin tedavi grubunda anlamlı oranda azaldığını gördük. Çalışmamızda ek olarak korneal VEGF düzeylerini ELİSA yöntemi ile değerlendirdik ve kantitatif olarak VEGF değerlerinin azalma miktarlarını tespit ettik.

Daha önceden de yapılan çalışmalarla benzer şekilde HER1 reseptörüne etkili Trastuzumab'ın, HER1 ve HER2 reseptörlerine etkili Lapatinib'e göre anjiyogenez üzerine daha sınırlı etkiye sahip olduğunu gördük. Lapatinib'in Trastuzumab'a göre daha etkili olmasında Trastuzumab'dan farklı olarak HER2 üzerinde inhibisyonunun yanında HER1 üzerinde de inhibisyon yaparak çift yönlü etki göstermesi olabilir. VEGFR ailesi uyarılıp dimer yapısı kazandıktan sonra etkinlik gösteren bir yapıya sahiptir. Bu dimer yapısını ya heterodimer (HER1/HER2) veya homodimer (HER2/HER2) olarak gerçekleştirir. HER1 ve HER2'nin homodimer ve heterodimer olarak anjiyogenezi uyarıcı etkileri bilinmektedir (152). Bunun yanında HER3 ise HER1 ve HER2'den farklı olarak tek başına aktivite gösteremeyen tirozin kinaz inaktif özelliğe sahiptir. HER3, HER1 ve HER2 gibi anjiyogenezi uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (161). Fakat etkisini ancak HER1 veya HER2 ile heterodimer olarak gösterirken bu etkisinin diğerlerinden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. HER3 aynı zamanda diğer EGFR'den farklı olarak tek başına PI3K/Akt yolağını aktive ederek etki gösterebilmektedir. Bu ise HER2 inhibisyonuna dirençli kanser olgularının nedeni olabilir (162). HER4 ise normal hücre siklusunda birçok görev üstlenmesine rağmen kanser sistematiğindeki yeri henüz tam olarak tanımlanamamıştır (163).

Lapatinib ile ilgili yapılan çalışmalarda CEPs miktarını azaltıcı etkisi, VEGF1R fosforilasyonunu %70 oranında engellemesi ve VEGF ile IL-8 düzeylerini ciddi oranda düşürücü etkisi Trastuzumab'a göre daha etkin olmasının

nedenleri arasında sayılabilir. Bunlara ek olarak HER1 ve HER2'nin aynı anda Lapatinib ile inhibisyonu, tek başına HER2'nin Trastuzumab ile inhibisyonundan farklı olarak, belkide HER3'ün heterodimer oluşturup aktive olmasını da engellemiştir. Bu durum Lapatinib'in Trastuzumab'dan daha etkili olmasının diğer bir nedeni de olabilir. Aynı zamanda bu etki Trastuzumab'a karşı gelişen direncin bir nedeni olarak gösterilmektedir (161).

Çalışmamızdaki korneal immünohistokimyasal boyanma sonuçları incelendiğinde kontrol rat kornealarında da VEGF boyanmasının olduğu görüldü. Daha önce yapılan insan kornea çalışmalarında da enflamasyon olmaksızın VEGF boyanması izlenmiştir. Normal korneal epitel hücrelerinden kaynaklanan VEGF'in fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Limbal kornea damarlarının fizyolojisi için fizyolojik konsantrasyonda VEGF gerekli olabilir. VEGF varlığına karşın mevcut potent antianjiogenik faktörlerin normal kornealarda vaskülarizasyonu engellediği düşünülmektedir (7).

Vasküler endotelial growth faktör immünohistokimyasal boyanması epitel katının bazal hücrelerinde daha yoğundu. Yüzey epitel hücrelerinin ise sitoplazmik organellerini veya aktivitelerini kaybetmelerine bağlı olarak VEGF sekresyonu bazal hücrelere kıyasla daha az olabilmektedir. Stromadaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının üst yarıda daha yoğun olduğu tespit edildi. Yapılan çalışmalarda stromanın anterior bölgesinde VEGF boyanmasının yoğunlaştığı tespit edilmektedir (7). Kornealar neovaskülarizasyon yönünden incelendiklerinde birçok tabakada vaskülarizasyona rastlanabilmektedir. Fakat yapılan çalışmaların büyük kısmında neovaskülarizasyonun esas yerleşiminin anterior stroma olduğu gösterilmiştir (164). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarla uyumludur. Anterior stromanın VEGF uyarısına ve neovaskülarizasyon gelişimine stromanın diğer katlarından daha duyarlı olduğu söylenebilir.

Sham grubundaki kornealarda VEGF immünohistokimyasal boyanması ve histolojik özellikleri kontrol grubundakilerden farklılık göstermektedir. Sham grubunda epitel tabakasındaki hücre sayısının arttığı ve düzenli hücre yapısının bozulduğu görüldü. Stromada ise boyanmanın ön stromada daha yoğun olup, tüm katlarda boyanmanın olduğu tespit edildi. Sham grubundaki kornea stromasında kalınlaşma ve düzenli yapısında bozulma mevcuttu. Daha önceden yapılan

çalışmalarda olduğu gibi korneada oluşturulan kimyasal yanık, enflamasyonu uyarıcı bir etkiye sahip olduğundan bu boyanma özellikleri beklenen değişiklikler olarak değerlendirilmektedir (165, 166). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların hem epitelyal hem de stromal VEGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p=0.01$). Bu bulgular bize kullanılan modelin neovaskülarizasyonun güçlü uyarılarından biri olan VEGF düzeylerini anlamlı oranda artırdığını ve bu şekilde kornea neovaskülarizasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Tedavi gruplarının hem epitel hem de stromal VEGF immünohistokimyasal boyanması karşılaştırıldığında Lapatinib'in tek başına Trastuzumab'dan daha etkili olduğu tespit edildi. Bunun yanında Lapatinib ile kombine Trastuzumab kullanımının ise tek başına Trastuzumab'a göre daha etkili olmasına rağmen, tek başına Lapatinib'den daha etkili olmadığı tespit edildi.

Yapılan çalışmalarda Trastuzumab'a direnç gelişen vakalarda Lapatinib'in tedaviye eklenmesinin daha başarılı sonuçlar alınmasına neden olduğu gösterilmiştir. Trastuzumab'a karşı gelişen direnç mekanizmalarından birisi HER2 inhibisyonu sonucu ortaya çıkan insülin benzeri büyüme faktörü reseptörünün upregülasyonudur. Bu upregülasyon sonucu aktifleşen yolaklar Lapatinib ile inhibe edilmiştir. Trastuzumab'a karşı gelişen direnç sonrası sentezi artan p95 HER2 varyantının Lapatinib tarafından inhibisyonu da çalışmalarda gösterilmiştir (167). Çalışmamızda Lapatinib ile tedavi edilen gruplarda Trastuzumab ile tedavi edilen gruplara oranla neovaskülarizasyonu anlamlı şekilde gerilettik. Fakat kombine tedavinin tek başına Lapatinib tedavisinden hem neovaskülarizasyon hem de VEGF bakımından anlamlı bir farkı olmadığını gördük. Bu bize ileride neovaskülarizasyona yönelik tedavilerimizde kombine tedavinin yerine tek başına Lapatinib tedavisinin yeterli olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda aynı zamanda grupların hepsinden eşit büyüklükte alınan kornealarda ELİSA yöntemiyle VEGF düzeylerini değerlendirdik. Bu şekilde kullandığımız ilaçların VEGF düzeyleri üzerine olan etkilerini kantitatif olarak değerlendirme ve kıyaslama olanağını yakalamış olduk. ELİSA sonuçlarımız değerlendirildiğinde neovaskülarizasyon gözlenmeyen kontrol grubunda VEGF düzeyinin sham grubundan anlamlı düşük olarak tespit ettik. Bu sonuçlar

immünohistokimyasal olarak yapılan ölçümlerle paralellik göstermektedir. Biz yaptığımız çalışma ile bazal korneal VEGF düzeyini ve kimyasal yanık sonrasında görülen yükselme miktarlarını belirledik. Tedavi gruplarına bakıldığında ise Lapatinib grubunun VEGF düzeyi Trastuzumab grubunun VEGF düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmıştır. Bunun yanında Lapatinib+Trastuzumab grubunu ise tek başına Lapatinib grubu ile anlamsız Trastuzumab'dan ise anlamlı düşük olarak tespit edilmiştir. Kornea neovaskülarizasyonuna dönük yapılan çalışmada VEGF düzeyleri arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir (168).

Bu bulgular bize kullandığımız korneal neovaskülarizasyon modelinin VEGF düzeyini anlamlı derecede yükselttiğini ve neovaskülarizasyonun oluşmasında VEGF'in önemli bir yere sahip olduğunu tekrar gösterdi. Bunun yanında kullandığımız Lapatinib ve Trastuzumab'ın her ikisinin de VEGF düzeylerini anlamlı oranda düşürdüğünü tespit ettik. Lapatinib ve Trastuzumab korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde farklı birçok yolla etki göstermektedir.

Bu yolaklar;

- 1) Anjiyogenik faktörler olan EGF ve TGF'ün bloke edilmesi (154, 169).
- 2) Pro-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonu azalırken, anti-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunun artması (147, 148, 150, 152).
- 3) HER1, HER2, p95 HER2 reseptörlerinin inhibisyonu sonucu hücre siklusunun durması (151).
- 4) DNA tamirinin inhibisyonu ve DNA hasarı oluşturulması (150).
- 5) Antikor bağımlı hücrel sitotoksitenin aktivasyonu ve proliferasyonun inhibisyonuyla sitotoksik özellik göstermesi (170).
- 6) Apoptozisi indüklemesi (171).
- 7) CEPs miktarının düşürülmesi (141, 142, 143)
- 8) VEGFR1 fosforilizasyonunu %70 oranında engellenmesi (141).
- 9) VEGF ekspresyonunun azaltılmasıdır (122, 147, 148).

Yaptığımız çalışma sonuçlarına baktığımızda bu yolaklar arasında en önemlisinin VEGF düzeylerindeki azalma olarak tespit ettik. Bu etkinin korneal neovaskülarizasyonu engellemeye yönelik kullandığımız Lapatinib ve Trastuzumab'ın neovaskülarizasyonu önlemeye yönelik birçok etki mekanizması içinde en önemlisi olduğu söylenebilir.

Lapatinib ve Trastuzumab tedavisi ile VEGF düzeylerinde kontrol grubuna yakın düşüş sağlanmasına rağmen kornea neovaskülarizasyonunda parsiyel inhibisyonu ise VEGF'ün tüm izoformlarının tamamen bloke edilememiş olmasına ve neovaskülarizasyonda görev alan fakat tam olarak tanımlanamayan yolakların etkinliğine bağlayabiliriz. Ayrıca Trastuzumab ve Lapatinib'in sistemik uygulamasıyla ilgili farmakokinetik özelliklerinin bilinmemesi nedeniyle, korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda optimum fayda sağlayacak dozaj ve ilaç uygulama sıklığı en etkin biçimde yapılamamış olabilir.

Bu çalışmada Trastuzumab ve Lapatinib'in kornea neovaskülarizasyonu oluşumunda görevli başlıca faktör olan VEGF seviyelerine ve neovaskülarizasyon üzerine etkileri araştırıldı. Neovaskülarizasyon sürecinde VEGF sekresyonunun inhibisyonu dışında birçok mekanizmanın da etkili olduğu bilinmektedir. Bu ayrımı daha net yapabilmek için neovaskülarizasyonda görevli yolakların daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir.

Lapatinib ve Trastuzumab, karmaşık bir olay olan anjiyogenezde görev alan faktör ve sitokinlerin çoğunun salınımını inhibe ederek ve sorumlu reseptörleri inhibe ederek anjiyogenezin önlenmesine katkıda bulunabilir. En önemli anjiyogenik faktörlerden biri olan VEGF'in inhibisyonu tüm patolojik neovaskülarizasyon durumları için esas amaçtır. Çalışmamız sonucunda Lapatinib'in Trastuzumab'a göre daha etkili olduğu tespit edilmiş ve bu durum Lapatinib'in VEGF düzeylerini Trastuzumab'dan daha etkin şekilde azaltmasıyla da paralellik göstermiştir. Kornea neovaskülarizasyonunu engellemeye yönelik Lapatinib'in topikal uygulaması ve optimal dozunun tespiti amacıyla daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

5. KAYNAKLAR

1. Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26: 1-37.
2. Reinhard T, D.F.P. Larkin. *Cornea and External Eye Disease* 2006; 7: 83-84.
3. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; 41: 275-313.
4. Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004; 79: 677-688.
5. Wilson SE, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1999; 40: 2185-2190.
6. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001; 45: 203-210.
7. 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.
8. Yin-Shan Ng, KrillekeD, David T. Shima. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research* 2006; 312: 527 – 537.
9. Quoc TH, Calvin JK. Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 1349-1357.
10. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 133–158.

11. Shiro A, Richard R, Masatoshi K, Michael T, Anthony PA. Requirement for Vascular Endothelial Growth Factor in Wound- and Inflammation-Related Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 18-22.
12. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82: 557-563.
13. Scholl S, Kirchhof J, Augustin AJ. Antivascular endothelial factors in anterior segment diseases. *Dev. Ophthalmol* 2010; 46: 133-139.
14. Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001; 75: 9828-9835.
15. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, Stechschulte SE, Kirchhof B, Dartt DA, et al. VEGF dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 117-123.
16. Mendelson AD, Lo GG, Stock EL. Laser photocoagulation of feeder vessels in lipid keratopathy. *Ophthalmic Surg* 1986; 17: 502-508.
17. Goto S. Q-switched Nd: YAG laser treatment for corneal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 1992; 36: 291-300.
18. Yoon KC, You IC, Kang IS, Im SK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 390-395.
19. BenEzra D, Griffin BW, Maftazir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1954-1962.
20. Wu PC, Liu CC, Chen C, Kou HK, Shen SC, Lu CY, et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241: 63-69.

21. Demir T, Celiker UÖ, Kükner A, Mogulkoc R, Celebi S, Celiker H. Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 1999; 77: 386-390.
22. Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical soluble tumor necrosis factor receptor type I suppresses ocular chemokine gene expression and rejection of allogeneic corneal transplants. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 1666-1671.
23. Becker MD, Kruse FE, Azzam L, Nobiling R, Reichling J, Völcker HE. In vivo significance of ICAM-1 dependent leukocyte adhesion in early corneal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 612-618.
24. Benelli U, Bocci G, Danesi R, Lepri A, Bernardini N, Bianchi F, et al. The heparan sulfate sulferoide inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67: 133-142.
25. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4082-4085.
26. Bocci G, Danesi R, Benelli U, Innocenti F, Di Paolo A, Fogli S, Del Tacca M. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 205-212
27. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2690-2694.
28. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46: 454-460.
29. Ambati BK, Jousseaume AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, et al. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 1063-1068.

30. Jousseaume AM, Kruse FE: Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 920-927.
31. Bahar I, Kaiserman I. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008; 27: 142-147.
32. Ryungsa K, Tetsuya T. Changes in Therapy for Solid Tumors: Potential for overcoming Drug Resistance In Vivo with Molecular Targeting Agents. *Surg Today* 2004; 34: 293–303.
33. Joseph S. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2000; 103: 211–225.
34. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999; 103:159–165.
35. Güler M, Yılmaz T, Özercan B, Elkıran T. The Inhibitory Effects of Trastuzumab on Corneal Neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2009;147:703-708.
36. Spector NL, Xia W, Burris H. Study of the biologic effects of lapatinib a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2502–2512.
37. Van C, Giaccone G, Hoekman K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer* 2005;117:883– 888.
38. Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick G, Ellis L. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2005;11: 397– 405.

39. Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of the human eye. Arch Ophthalmol 1985; 103: 785-789.
40. Arfa RC. Grayson's Disease of the Cornea. St. Louise: Mosby Year Book 1991; 2: 25-32.
41. Özçetin H. Klinik Göz Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri 2003; 4: 62-63.
42. Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları 2005; 2: 7-25.
43. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Regard G. Corneal collogens. Pathol Biol 2001; 49: 353-363.
44. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. Curr Eye Res 1985; 4: 671-677.
45. Agarwal S. Textbook of Ophthalmology. Vol II. Jaypee Company 2002; 3: 942-943.
46. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. Trans Am Ophthalmol Soc 1998; 86: 178-207.
47. İrkeç MK. Gözyaşı tabakasının yapısı, biyokimyası, immünolojisi ve kontakt lensler. Oftalmoloji 1994; 1: 18-20.
48. Efron N, Carney LG. Oxygen levels beneath the closed eyelid. Invest Ophthalmol Vis Sci 1979; 18: 93-100.
49. Newell FW. Anatomy of the cornea. Ophthalmology, Principles and Concepts 1992; 13: 8-13.
50. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. Prog Retin Eye Res 2003; 22: 69-94.

51. Nishida T, Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management. Chine: Elsevier Mosby 2005:3-26.
52. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. Indian J Ophthalmol 2003; 51: 5-15.
53. Zeiske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986; 27: 1-7.
54. Hassell JR, Birk DR. The molecular basis of corneal transparency. Exp Eye Res 2010; 91: 326-335.
55. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. Br J Ophthalmol 1994; 78: 401-408.
56. Lu PC, Ye H, Maede M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 20-27.
57. Jester JV, Petrol WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. Prog Retina Eye Res 1999; 18: 311-356.
58. Dua HS, Forrester JV. Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. Am J Ophthalmol 1987; 104: 481-489.
59. Philipp W, Göttinger W. Leukocyte adhesion molecules in diseased corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34: 2449-2459.
60. Kaufman HE, Barron AB, McDonald MB, Waltman SR. Corneal trauma. The Cornea 1991; 22: 599-642.
61. Petroustos G, Guimaraes R, Giraud J, Poliques Y. Antibiotics and corneal epithelial wound healing. Arch Ophthalmol 1983; 101: 1775-1778.

62. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose, Miller D, Kublin C, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 640-643.
63. Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF. Wound healing. Principles and practice of ophthalmology 1980; 381-386.
64. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 1983; 97: 1653-1657.
65. Nishida T, Nakamura M, Mishima M, Otori T, Hikida M. Interleukin-6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch. Ophthalmol* 1992; 110: 1292-1294.
66. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol* 1983; 95: 353-358.
67. Jones, SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 2000; 19: 5558-5567.
68. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MaCauley S, Van Setten G, Chegini N. Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994; 8: 184-187.
69. Chung JH, Fagerholm P. Treatment of rabbit corneal alkali wounds with human epidermal growth factor. *Cornea* 1989; 8: 122-128.
70. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994; 59: 63-72.
71. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell

proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 1997; 65: 391-396.

72. Song QH, Klepeis V, Nugent MA, Trinkaus-Randall. TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Mol Pathol* 2002; 55: 164-176.
73. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong JW, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 625-637.
74. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989; 86: 802-806.
75. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J. Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res* 1994; 59: 385-392.
76. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor Messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res* 1999; 68: 377-397.
77. Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 779-802.
78. Li D, Tseng SC. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997; 172: 361-372.
79. Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, Wilson SE. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res* 1997; 64: 501-504.

80. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGF beta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 2002; 75: 645-657.
81. You L, Kruse FE, Vilcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 692-702.
82. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1988; 338: 1174-1180.
83. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992; 153: 1-5.
84. Sotozono C. Second injury in the corneal. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 2000; 19: 155-159.
85. Denekamp J. Vasculature as a target for tumor therapy. In: Hammerson F, Hudlicka O, eds. *Progress in Applied Microcirculation*. Basel: Karger, 1984; 28.
86. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
87. Cogan DG. Corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; 1: 253-261.
88. Erdurmus M, Yagci R, Yilmaz B, Hepsen IF, Turkmen C, Aydin B, Karadag R. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization. *Cornea* 2007; 26: 715-719.
89. Lee P, Wang CC. Ocular neovascularization; an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 48: 245-269.
90. Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81: 439-452.

91. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-686.
92. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-285.
93. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 237–268.
94. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF- α . *Cornea* 2007; 26: 70-74
95. Hayahi T, Matsuoko K, Saitoh M. Influence of α -tumor necrosis factor and β -interleukin-1 on production of angiogenetic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J. Obstet. Gynaecol Res* 2006; 32: 15–22.
96. Thakur A, Xue ML, Wang W, Lloyd A, Wakefield D, Willcox MD. Expression of macrophage migration inhibitory factor during *Pseudomonas* keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29: 179-182.
97. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seich Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 3545-3550.
98. Sarah X, Jian-xing M. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* 2007; 26: 1–37.
99. Dimitri BY, Azar M. Corneal Angiogenic privilege: Angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:264-302.

100. Yusufhan Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF):Reseptörleri ve Fonksiyonları. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2007; 29: 128-136.
101. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.
102. Güllü İ. Anjiojenez ve antianjiojenik tedaviler. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma 2004.
103. Ferrara N, Smyth TD. Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Review* 1997; 18: 1-27.
104. Kenneth AT. Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent. *The J.of Biological Chemistry* 1996; 271:603-606.
105. Kim J, Moon S, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor-kB Activation in Endothelial Cells. *The J.of Biological Chemistry* 2001; 276: 7614–7620.
106. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, Dana MR. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J.Clin Invest* 2004; 113: 1040-1050.
107. Kvanta A. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84: 282-288.
108. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 323-333.
109. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and

retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 1993; 36: 282-291.

110. White RR, Shan S, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, Sullenger A. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5028-5033.
111. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2000; 70: 419-428.
112. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
113. Shin SH, Kim JC, Chang SI, Lee H, Chung SI. Recombinant kringle 1-3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 2000; 19: 212-217.
114. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2517-2524.
115. Ortego J, Escribano J, Becerra SP, Coca-Prados M. Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2759-2767.
116. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285: 245-248.

117. Hiscott P, Paraoan L, Choudhary A, Ordonez JL, Al-Khaier A, Armstrong DJ. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25: 1-18.
118. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1352-1358.
119. Cursiefen C, Masli S, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1117-1124.
120. Ryungsa K, Tetsuya T. Changes in Therapy for Solid Tumors: Potential for Overcoming Drug Resistance In Vivo with Molecular Targeting Agents. *Surg Today* 2004; 34: 293–303.
121. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
122. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2000; 103: 211–225.
123. Rowinsky EK. Signal Events: Cell Signal Transduction and Its Inhibition in Cancer. *The Oncologist* 2003;8: 5-17.
124. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol* 1989; 139: 617-23.
125. Nakamura Y, Stozono C, Kinoshita S. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Role in Corneal Wound Healing and Homeostasis. *Exp. Eye Res* 2001; 72: 511-517.
126. Cheryl HB, Daniel K, Marya FM, Rachel T, Kristen LW, Corazon DB, Isaiah J. Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling on Tumor Cells

and Tumor-Associated Endothelial Cells for Therapy of Human Carcinomas. *Am J Pathol* 2002; 161: 929–938.

127. Wood ER, Truesdale AT, Nonaka S, McDonald OB. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6652–6659.
128. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW572016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2001; 1: 85–94.
129. Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; 20: 41–48.
130. Rusnak DW, Affleck K, Cockerill SG. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 7196–7203.
131. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: From mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 32–40.
132. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241–250.
133. Kedar D, Baker CH, Killion JJ, Dinney CP, Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 592–600.
134. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985; 4: 531–535.

135. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 804-807.
136. Singh N, Amin S, Richter E, Rashid S, Scoglietti V, Jani PD, et al. Flt-1 intraceptors inhibit hypoxia-induced VEGF expression in vitro and corneal neovascularization in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 1647-1652.
137. Egbert PR, Laube, S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy *Am J Ophthalmol* 1997; 84: 798-801.
138. Colby KA, Adamis AP: Prevalence of corneal neovascularization in a general eye service population (abstract). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 590-593.
139. Rehany U. Waisman M. Suppression of corneal allograft rejection by systemic cyclosporine-A in heavily vascularized rabbit corneas following alkali burns. *Cornea* 1994; 13: 447-453.
140. Olsen T. Benegas N. Rapamycin inhibits corneal allograft rejection and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1471-1475.
141. Roque D, Paul A.N, Ricardo P. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer* 2010; 10: 178-188.
142. Yokoi K, Thaker PH, Yazici S, Rebhun RR, Nam DH, He J, Kim SJ. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2005; 65: 3716-3725.
143. Olausson KA, Commo F, Tailleur M, Lacroix L, Vitale I, Raza SQ, et al. Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines. *Oncogene* 2009; 28: 4249-4260.

144. Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, et al. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30: 1879-1882.
145. Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and inhibition in cancer. *The Oncologist* 2003; 8: 5–17.
146. Klos KS, Zhou X, Lee S, Zhang L, Yang W, Nagata Y. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. *Cancer* 2003; 98: 1377–1385.
147. Hui G, Shu-Fang J, Zhichao Z, John S, Eugenie SK. Herceptin Down-Regulates HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Enhances Taxol-Induced Cytotoxicity of Human Ewing’s Sarcoma Cells In vitro and In vivo. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 2008–2017.
148. Kristine SK, Xiaoyan Z, Sangkyou L, Lianglin Z, Wentao Y, Yoichi NDY. Combined Trastuzumab and Paclitaxel Treatment Better Inhibits ErbB-2-Mediated Angiogenesis in Breast Carcinoma through a More Effective Inhibition of Akt than Either Treatment Alone. *Cancer* 2003; 98: 1377–1385.
149. Felix B, Yanyan K, Friedrich K, Martin B, Claus C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246:281–284.
150. Rita N, Francisco JE. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters* 2006; 232: 123–138.
151. Izumi Y, Xu L, Tomase E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002; 416: 279-280.
152. Ono M, Kuwao M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFRtargeting drugs. *Clin Cancer Res* 2006; 15: 7242-51.

153. Isabelle D, Annie-Claire D, Nicolas T, Marie FH, Erwin GvM. Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene* 1999; 18: 1447-1456.
154. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol* 1989; 139: 617-623.
155. Chitra S, Pamela FJ, Sybill PB, Peter C. Maisonpierre. Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell*. 1996; 87: 1171–1180.
156. Guilian N, Bradford C. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Regulates Angiopoietin-2 Expression in Breast Cancer via AKT and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Cancer Res* 2007; 67: 1487–1493.
157. Nourhaghighi N, Teichert KK, Davis J, Stewart DJ, Nag S. Altered expression of angiopoietins during blood-brainbarrier breakdown and angiogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 1211–1222.
158. Hackett SF, Wiegand S, Yancopoulos G, Campochiaro PA. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J. Cell Physiol* 2002; 192: 182–187.
159. Oshima Y, Deering T, Oshima S, Nambu H, Reddy PS, Kaleko M, et al. Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor. *J. Cell Physiol* 2004; 199: 412–417.
160. George DY, Samuel D, Nicholas WG, John SR, Stanley JW, Jocelyn H. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 14: 242-248.
161. Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer* 2007; 97: 453-457.

162. Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007; 445: 437-441.
163. Feng SM, Sartor CI, Hunter D. The HER4 cytoplasmic domain, but not its C terminus, inhibits mammary cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1861-1876.
164. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17: 611-613.
165. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007; 10: 149-166.
166. Edelman J, Catro 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.
167. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 628–638.
168. Seungbum K, Sung KC. The Effect of Subconjunctival Combined Treatment of Bevacizumab and Triamcinolone Acetonide on Corneal Neovascularization in Rabbits. *Cornea* 2010; 29: 192-196.
169. Lily Y, Xiao-Li Y, Ala-Eddin A, Gerald B, Nancy EH, Sylvie M, Sylvain M. Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 3460-3469.
170. Sarah C, Linda JB, Tanya R, Jeffrey SM. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology* 1999; 27: 1533-1541.

171. Syed KM, Heidi LW, Carolina G, Gary CC, Rachel S, Michael PD, et al. Neoadjuvant Trastuzumab Induces Apoptosis in Primary Breast Cancers. *Chang J Clin Oncol* 2005; 23: 2460-2468.

6. ÖZGEÇMİŞ

04.08.1980 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ Dumlupınar İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi ise Elazığ Bilgem Koleji'nde tamamladım. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitime başlayıp 2004 yılında bu fakülteden mezun oldum. Altı ay sonra Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Bu süre içinde İngiltere'de Nottingham Üniversitesi Göz Hastalıkları klinik fellow'u olarak çalışma fırsatı buldum. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.