

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

**KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA YENİ BİR
BİYOBENZER BEVACİZUMAB'IN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ARMAĞAN YUVARLAK**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. MEHMET CÜNEYT ÖZMEN**

**ANKARA
KASIM 2016**

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

**KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA YENİ BİR
BİYOBENZER BEVACİZUMAB'IN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ARMAĞAN YUVARLAK**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. MEHMET CÜNEYT ÖZMEN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 215/234
proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
KASIM 2016**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında bana büyük katkıları olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Cüneyt ÖZMEN'e, eğitimimde büyük emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Berati HASANREİSOĞLU, Prof. Dr. Fikret AKATA, Prof. Dr. Meral OR, Prof. Dr. Kamil BİLGİHAN, Prof. Dr. İbrahim Feyzi HEPŞEN, Prof. Dr. Gökhan GÜRELİK, Prof. Dr. Şengül Özdek, Doç. Dr. Onur KONUK, Doç. Dr. Ahmet Murat Hondur, Doç. Dr. Bahri AYDIN, Doç. Dr. Zeynep AKTAŞ, Doç. Dr. Murat HASANREİSOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Erdem YÜKSEL ve Yrd. Doç. Dr. Tuba ATALAY'a ;

Tezimdeki fotoğrafların çekilmesinde büyük yardımları olan Op. Dr. Mehmet Özgür ÇUBUK, Teknisyen Kenan TEMİZ ve Zafer YILDIRIM'a ;

Tezimin önemli bir bölümünü oluşturan histopatolojik değerlendirmenin yapılmasını sağlayan Prof. Dr. Ümit BAĞRIAÇIK ve Uzm. Dr. Arda İNAN'a ;

Asistanlığım süresince, zor zamanlarımda, tez sürecimde sürekli yanımda olan Dr. Hüseyin Baran ÖZDEMİR ve Dr. Ahmet Yücel ÜÇGÜL'e, klinikte ve özel hayatımda sürekli yardımına koşan bütün asistan, hemşire, teknisyen ve personel arkadaşlarıma ;

Her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem, babam, kardeşim ve hayatımdaki en büyük şansım Merve ERDOĞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Armağan YUVARLAK

ANKARA-2016



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Armağan YUVARLAK
Baba Adı	Bereket
Doğum Yeri/Tarihi	Antalya / HATAY 26.09.1987
Diploma Tarihi / Diploma No	18.8.2011 398
Mezun Olduğu Fakülte	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Gazi Üniversitesi Göz Hastalıkları
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Kornea Neovaskülarizasyonunda Yeni Bir Biyobenzer
Bovacizimab'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi

JÜRİ KARARI: Tezini başarılı bulmuşlardır.

JÜRİ ÜYELERİ

ÜYE
Prof. Dr. İhsan Gökhan GÜRELİK
T.C. Gazi Üniversitesi
Göz Hastalıkları
Göz Hastalıkları Öğretim Üyesi
Dip. No: 92011131

BAŞKAN
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÇİMEN
T.C. G.Ü. Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları
Dip. No: 95.311.163

ÜYE
Başkent Üniversitesi Hastanesi
Prof. Dr. Gürsel YILMAZ
Dip. No: 4402
Göz Hastalıkları Uzmanı

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ	1
2	GENEL BİLGİLER.....	3
2.1	KORNEA’NIN AVASKÜLARİTESİ-NEOVASKÜLARİZASYONU.3	
2.2	EPİDEMİYOLOJİ.....	4
2.3	RİSK FAKTÖRLERİ VE ETİYOLOJİ	5
2.3.1	HERPES SİMPEKS ENFEKSİYONU	7
2.3.2	KONTAKT LENS KULLANIMI.....	7
2.3.3	KORNEA YANIKLARI.....	8
2.3.4	KORNEA NAKLİ	9
2.4	PATOGENEZ.....	11
2.5	SINIFLANDIRMA.....	16
2.6	KNV’DE PRO VE ANTİANJİYOJENİK FAKTÖRLER	17
2.6.1	ANJİYOJENİK AJANLAR.....	17
2.6.1.1	VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ	19
2.6.1.2	FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ	21
2.6.1.3	MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR	22
2.6.2	ANTİANJİYOJENİK AJANLAR.....	23
2.6.2.1	ENDOSTATİN	25
2.6.2.2	ANJİYOSTATİN	25
2.6.2.3	PİGMENT EPİTELİ KAYNAKLI FAKTÖR	25
2.7	KNV’NİN KÖRLÜK YAPAN HASTALIKLARDA ROLÜ	26

2.8	TEDAVİ.....	27
2.8.1	TEDAVİ TARİHÇESİ.....	27
2.8.2	MEDİKAL TEDAVİ.....	29
2.8.2.1	STEROİDLER	30
2.8.2.2	ANTİ VEGF AJANLAR	30
2.8.3	CERRAHİ TEDAVİ	33
3	GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1	DENEY HAYVANLARI	36
3.2	KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU OLUŞTURULMASI.....	36
3.3	BEVACİZUMAB VE ANTİ-HUMAN VEGF GU01 TEDAVİLERİ .	37
3.4	KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU ALANI ANALİZİ.....	38
3.5	İMMÜNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	40
3.6	İSTATİKSEL ANALİZ.....	40
4	SONUÇLAR.....	40
4.1	KNV ALAN ANALİZİ	40
4.2	İMMUNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	44
5	TARTIŞMA	46
6	SONUÇ	58
7	KAYNAKLAR	59
8	ÖZET	78
9	SUMMARY	80
10	ÖZGEÇMİŞ	82

KISALTMALAR

VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
FDA	: Amerika İlaç ve Gıda Dairesi
KNV	: Kornea neovaskularizasyonu
NV	: Neovaskularizasyon
PK	: Penetran keratoplasti
ECM	: Ekstraselüler matriks
MMP	: Matriks metalloproteinaz
VEGFR1	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 1
VEGFR2	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2
HSV	: Herpes simpleks virüsü
TIMP-1	: Metallopeptidaz 1 doku inhibitörü
RGP	: Sert gaz geçirgen
İL	: İnterlökin
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
PGF	: Plasental büyüme faktörü
İGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
TNF	: Tümör nekroz faktörü
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
CTGF	: Bağ doku büyüme faktörü
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein 1
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
M1MMP	: Membran tip 1 matriks metalloproteinaz
PEDF	: Pigment epiteli kaynaklı faktör
kda	: Kilo dalton
İg	: İmmunoglobulin
PDR	: Proliferatif diyabetik retinopati
ml	: Mililitre
mg	: Miligram

ŞEKİLLER

ŞEKİL 1: KORNEA ANJİYOGENEZİ OLUŞUMU	12
ŞEKİL 2: VEGF RESEPTÖRLERİ	21
ŞEKİL 3: YEDİNCİ GÜNDE GELİŞEN KNV ALAN ÖLÇÜMLERİ.....	42
ŞEKİL 4: ENJEKSİYON SONRASI KNV AZALMA YÜZDELERİ.....	42



RESİMLER

RESİM 1: KERATOPLASTİ SONRASI KNV GÖRÜNÜMÜ	10
RESİM 2: IMAGEJ PROGRAMI İLE KNV ALANI ÇEVRELEMESİ	39
RESİM 3: KNV AMELİYAT MİKROSKOBU GÖRÜNTÜLERİ:	43
RESİM 4: GRUPLARDAKİ HİSTOPATOLOJİK GÖRÜNÜM.	45



TABLÖLÄR

TABLO 1 KNV ETİYOLOJİSİ.....	6
TABLO 2 KNV PATÖMEKANİZMASI	15
TABLO 3 NV'NİN AYIRT EDİCİ ÖZELLİKLERİ.....	17
TABLO 4 ANJİYOJENİK FAKTÖRLER.....	18
TABLO 5 ANTİANJİYOJENİK FAKTÖRLER.....	24
TABLO 6 KNV MEDİKAL TEDAVİSİNDE ÇALIŞILMIŞ İLAÇLAR.....	29
TABLO 7 BEVACİZUMAB'IN KLİNİK KULLANIMI	32
TABLO 8 KNV'DE KULLANILAN CERRAHİ YÖNTEMLER.....	34
TABLO 9 GRUPLAR.....	38

1 GİRİŞ

Sağlıklı kornea avasküler yapıdadır ve bu özellik net görebilmek için büyük önem taşımaktadır (1). Limbustaki normalde var olan damar yapılarından oluşan yeni damarların, saydam korneanın çeşitli katmanlarını invaze etmesine kornea neovaskülarizasyonu (KNV) denmektedir. KNV dünya genelinde milyonlarca insanın görmesini tehdit eden önemli bir sağlık problemidir. Enfeksiyon, inflamasyon, iskemi, dejenerasyon, travma ve limbal hücre yetmezlikleri bu problemin oluşmasının temel sebepleridir (2).

Güncel farmakolojik tedavide sıkça kullanılan kortikosteroidler ve non steroid antiinflamatuvar ilaçların glokom, katarakt ve kornea incelmesi gibi önemli yan etkileri bulunmaktadır (3).

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) KNV gelişiminde majör rolü bulunmaktadır (4). VEGF inhibisyonunun KNV'yi azalttığı gösterilmiştir (5, 6).

Bevacizumab (Altuzan, Roche, İsviçre) VEGF reseptörlerine karşı geliştirilmiş, KNV'yi azaltmada etkisi gösterilmiş bir rekombinant humanize monoklonal antikordur (7, 8). Bu ilaç Amerika İlaç ve Gıda Dairesi (US Food Drug Administration-FDA) tarafından metastatik kolon kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri, glioblastoma multiforme, renal hücreli karsinom ve serviks kanseri tedavisi için onay almış olsa da, off-label olarak yaygın bir biçimde, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD), retinal ven tıkanıklığı,

proliferatif diyabetik retinopati (PDR) ve neovasküler glokom hastalarında kullanılmaktadır (7, 9-14). Bevacizumab'ın patent süresi ABD'de 2019, Avrupa'da 2022 yılında sona ermektedir. Bevacizumab'ın 2015 yılındaki satışlarının yaklaşık 7 milyar dolara ulaşması onu biyobenzer ilaç üreticileri için popüler bir hedef haline getirmektedir. Şu anda dünya çapında tahmini olarak 15 farklı biyobenzer bevacizumab geliştirme çalışması yürütülmektedir (15).

Bevacizumab'ın oftalmik kullanım için hazır bir formunun ve dozajının olmaması, kullanımını ve yaygınlaşmasını kısıtlayan önemli bir engeldir. Ayrıca bevacizumabın göz içi tedavileri için hazırlanma aşamasında kontaminasyon olabilmekte, bu durum ağır göz enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir (16, 17).

Anti-Human VEGF GU01, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Laboratuvarında hibridoma yöntemi kullanılarak üretilen, HiTrap Protein G HP klonu kullanılarak Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) cihazında saflaştırılmış, bevacizumabla potansiyel biyobenzer olan, fare kökenli monoklonal immunoglobulin G (İgG) antikorudur.

Bu çalışmada tavşan gözlerinde sütür ile indüklenmiş KNV'de , subkonjonktival bevacizumab ile subkonjonktival Anti-Human VEGF GU01 tedavilerinin etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 KORNEA'NIN AVASKÜLARİTESİ VE NEOVASKÜLARİZASYONU

Kornea'nın beslenmesi, oftalmik arterden dallanan siliyer arterlerin oluşturduğu limbal perikorneal pleksus tarafından sağlanır. Neovaskülarizasyon (NV) bu pleksustan filizlenen yeni kapiller ve venüllerin avasküler korneaya invaze olmasıyla oluşur (18, 19). NV çoğunlukla damarların stromaya girmesiyle gelişse de, %10 gibi bir oranda epitel ve bowman tabakası arasında da gelişebilmektedir (20). Esasen NV, hasarlanan veya enfeksiyona maruz kalmış korneayı iyileştirmek amacıyla oluşan doğal bir savunma mekanizmasıdır. Ancak bu durum genellikle korneanın saydamlığının azalmasına ve sonuç olarak görme keskinliğinin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca NV, kornea nakli cerrahilerinde rejeksiyon riskini de büyük oranda arttırmaktadır (21).

Kornea'nın avaskülaritesi anjiyojenik-antianjiyojenik denge ile sağlanmaktadır. NV bu dengenin anjiyojenik tarafa kaymasıyla meydana gelmektedir. Kornea'nın antianjiyojenik mekanizmaları 7 maddede özetlenebilir:

1 Sıkı kollajen yapısının oluşturduğu mekanik savunma

2 Kornea epitelinin anjiyostatik özelliği

3 Ön kamarada gelişen gecikmiş tip hipersensivite reaksiyonu

4 Yaygın kornea innervasyonu

5 Anjiyojenik faktörlerin düşüklüğü

6 Limbus hücrelerinin bariyer fonksiyonu

7 Potent antianjiyojenik faktörlerin aktif üretimi (22-24).

Bu koruyucu mekanizmalar aşağıdaki sıralanan durumlarda yeterli olamamakta ve denge anjiyojenik tarafa kaymaktadır. Bu durumlar 5 maddede özetlenebilir:

1 Travma

2 İnflamasyon

3 Enfeksiyon

4 Hipoksi

5 Limbal kök hücre yetmezliği (22-24).

2.2 EPİDEMİYOLOJİ

KNV dünyada milyonlarca insanın görmesini tehdit eden ve körlüğe neden olabilen önemli bir halk sağlığı problemidir. Genel popülasyonda KNV'nin prevalans ve insidans çalışmaları yoktur. 1996 yılında Massachusetts Göz ve Kulak Hastanesi'nin göz servisine başvuran hasta popülasyonunun **% 4,14'ünde** KNV tespit edilmiştir. ABD'de her yıl yaklaşık **1,4 milyon** insanda KNV gelişmektedir. Kornea nakli sonrası elde edilen kornea örneklerinin **% 20'sinde** KNV olduğu görülmüştür (25, 26).

KNV farklı durumlar sonucu oluşan ortak bir sekeldir. Bu durumlardan biri olan klamidya enfeksiyonları, yaklaşık 6 milyon insanın, onkoserkiyazis yaklaşık 1 milyon insanın körlüğüne sebep olmaktadır. KNV ile sık birlikteliği olan herpes simpleks enfeksiyonu sadece ABD'de 500 000 insanı etkilemektedir.

Yine yumuşak lens kullanımı ABD'de 125 000 ile 470 000 insanda KNV'ye neden olmaktadır (2, 25, 27).

Türkiye'de KNV ile bir prevelans çalışması olmamakla beraber Askeri hastanelere başvuran 1 777 500 genç erkekte yapılan, görme problemlerinden ötürü askeri maluliyet oranlarının incelendiği bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada kornea ve lens problemleri birlikte değerlendirilmiş ve kornea ve lens hastalıklarından dolayı görme keskinliği snellen eşeline göre 0,1'den az olan, bu sebeple askerlikten muaf sayılan hasta prevelansı **%0,101** olarak bulunmuştur (28).

İran'da KNV'nin değerlendirildiği 5190 40-64 yaş arası yetişkinde yapılan bir prevelans çalışmasında KNV oranı **%3,65** olarak bulunmuştur (29).

2.3 RİSK FAKTÖRLERİ VE ETİYOLOJİ

KNV'de en sık izlenen ve öncelikli olan durumlar enflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif ve travmatik bozukluklardır. Bu durumlar tablo 1'de özetlenmiş olup sonraki kısımlarda detaylandırılacaktır.

Tablo 1 KNV ETİYOLOJİSİ

1 Enflamatuvar Bozukluklar
(26, 30)

- *Oküler pemfigoid*
- *Atopik konjonktivit*
- *Rozasea*
- *Greft reddi*
- *Lyell's sendromu*
- *Stevens-Johnson sendromu*
- *Graft versus host hastalığı*

2 Enfeksiyöz Keratitler
(26, 31, 32)

Viral

- *Herpes simpleks virüsü (HSV)*
- *Herpes zoster*

Bakteriyel

- *Psödomonas*
- *Klamidya Trachomatis*
- *Sfiliz*

Fungal

- *Candida*
- *Fusarium*
- *Aspergillus*

Parazitik

- *Onkoserkiyazis*

3 Dejeneratif-Konjenital Bozukluklar
(20, 33, 34)

- *Pterjium*
- *Terrien marjinal dejenerasyon*
- *Aniridi*

4 Travmatik – İyatrojenik - Diğer Bozukluklar (2)

- *Kontakt lens*
- *Alkali yanıklar*
- *Ülserasyon*
- *İyatrojenik*
- *Kök hücre yetmezliği*

2.3.1 HERPES SİMPLİKS ENFEKSİYONU

Gelişmiş ülkelerde herpetik oküler yüzey hastalıkları yıllık insidansı ve prevalansı sırasıyla 100 000'de 5,9-20,7 ve 100 000'de 149'dur (35).

HSV ile enfekte epitel hüclerinin KNV'ye sebep olan VEGF-A sentezlediği gösterilmiştir (36). Herpes simpleks keratiti fare modelinde VEGF-A'nın, vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 1 ve 2'ye (VEGFR1 ve VEGFR2) bağlanmasının önlenmesi NV'yi azaltmaktadır (37).

VEGF dışındaki bazı moleküller de ekstraselüler matriksi (ECM) bozup NV'nin büyümesini kolaylaştırmaktadır. Bu moleküllerden biri olan matriks metalloproteinaz-9'un (MMP-9) HSV enfeksiyonu sonrası korneada arttığı gösterilmiştir. Bu MMP'ler enfeksiyonun erken aşamasında nötrofiller tarafından sentezlenmektedir. MMP-9'un, metalloproteinaz 1 doku inhibitörü ile (TIMP-1) ile inhibisyonu, HSV ile uyarılan NV'yi inhibe etmektedir (38).

2.3.2 KONTAKT LENS KULLANIMI

Genel popülasyonda KNV'nin en sık karşılaşılan sebebi kontakt lens kullanımındır. KNV hastalarında yapılan bir çalışmada kontakt lens etiyojisi %10-30 olarak bulunmuştur. Sert gaz geçirgen lensler (Rigid Gas Permeable-RGP) yumuşak lenslere göre KNV'den daha az sorumludur. Buradaki esas sebep hipoksidir (39). Uzun süre lens kullananlarda korneada meydana gelen hipoksinin erken bulgusu limbusta izlenen hiperemidir (40). Kontakt lensle uyumak hipoksiyi ve korneadaki anjiyojenik faktörleri arttıran önemli bir durumdur (41).

Son zamanlarda yumuşak kontakt lenslerde çok daha yüksek oksijen geçişi sağlayan silikon hidrojel materyallerin kullanılmasıyla, KNV gelişiminde büyük oranda azalma izlenmiştir (42).

KNV en sık olarak uzun süre kullanılan afakik kontakt lenslerin kullanımı sonrası ortaya çıkmaktadır (43).

Yumuşak kontakt lense bağlı gelişen hipoksi proenflamatuar ve anjiyojenik etkileri olan araşidonik asit metabolizmasını stimüle etmektedir. Aseptomatik kontakt lens kullanıcılarında bile İnterlökin 6 (İL-6), İL-8 gibi proenflamatuar ve anjiyojenik sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (44).

2.3.3 KORNEA YANIKLARI

KNV ve KNV'ye sekonder gelişen korneal opasifikasyon, alkali yanık sonrası körlüğün en sık sebebidir (2). Tedavide rutin olarak topikal steroid kullanılmaktadır. Ancak tedaviye rağmen NV, dem, lipid birikimi ve skar gelişimi izlenebilmektedir. Steroidler epitel iyileşmesini geciktirdiği için akut dönemde verilmesini kısıtlamaktadır. Deneysel alışmalarda VEGF'in, alkali yanıktan 6 saat sonra anlamlı olarak arttığı, 12-48 saatte de maksimum seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (45, 46). VEGF ikinci pikini 4-8. günler arasında yapmaktadır (45). VEGF alkali yanıklarda goblet hücrelerinin korneayı invaze etmesinde, dolayısıyla NV ve konjonktivalizasyonda önemli rol almaktadır (47). Bevacizumab'ın rat kornealarında, kimyasal yanık modelinde, enflamatuar hücre infiltrasyonunu ve sitokin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (48). Deneysel

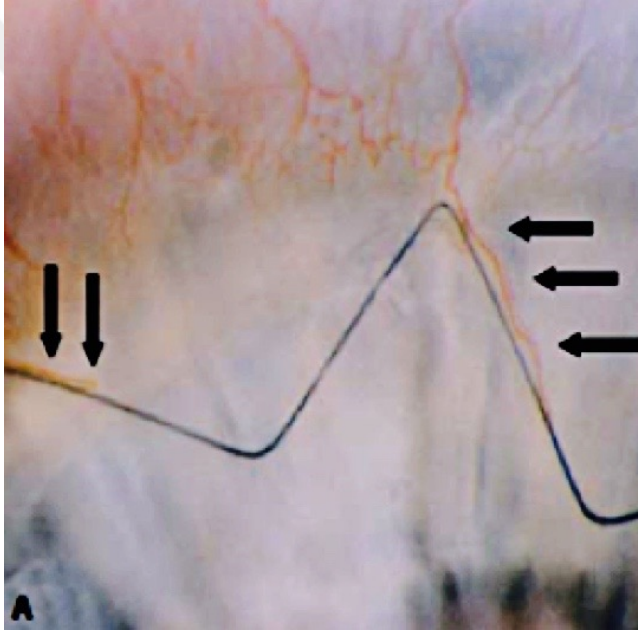
çalışmalarda ilk 24 saatte başlanılan tedavinin, sonrasında başlanılan tedaviye göre kornea Őeffaflıęını korumada daha başarı olduğu gösterilmiştir. Tedaviye sadece 3 gün sonra başlanması bile klinik sonuçları değiştirebilmektedir (49, 50).

2.3.4 KORNEA NAKLİ

Kornea nakli dünyada en sık yapılan ve en yüksek başarı oranlarına sahip solid organ transplantasyonudur (51). Vaskülarize olmayan kornealarda 5 yıllık cerrahi başarı oranı %81'dir (52). Cerrahi inflame veya vaskülarize bir alıcı yatakta gerçekleştirildiğinde bu oran %20-40'lara düşmektedir (53). NV bu cerrahideki başarısızlıkların en büyük sebeplerinden biridir. Rejeksiyon olasılığı vaskülarize kadran miktarı ile korele olmaktadır. 702 kornea greftinin incelendiği bir çalışmada 1 veya 2 kadranda (1-15 damar) izlenen KNV'nin greft yetmezliği için yüksek risk, 3 veya 4 kadranda (16 ve daha fazla damar) izlenen KNV'nin greft yetmezliği için çok yüksek risk taşıdığı belirtilmiştir (21). Yüksek riskli keratoplastilere Steven Johnson sendromu, kornea ülseri, kornea yanığı, vaskülarize lökom ve önceden geçirilmiş greft rejeksiyonu olması, yüksek riskli keratoplastilere örnek gösterilebilir (54).

Düşük riskli keratoplastilerde bile postoperatif 1 yıl içerisinde yaklaşık %50 hastada ılımlı miktarda yeni damarların grefte doğru ilerlediği, yaklaşık %10 hastada da bu damarların donör korneaya ulaştığı görülmüştür. NV sıklıkla resim 1 de görüldüğü gibi, sütürün dış dönme hizasından başlayıp sütür trasesi boyunca ilerlemektedir (55, 56).

Kornea grefti rejeksiyonu patogenezinde lenfanjiyogenezin önemli rolü olduğu çalışmalarca gösterilmiştir (57-59). Anti VEGF tedavi hem lenfanjiyogenezi hem de hemanjiyogenezi inhibe ederek greft ömrünü arttırmaktadır . Hemanjiyogenez ve lenfanjiyogenezin inhibisyonu, normal riskli kornea nakillerinde bile greft ömrünü uzatabilmektedir (60).



Resim 1: *Keratoplasti sonrası KNV görünümü*

Penetran keratoplasti (PK) sonrası KNV gelişimi için risk faktörleri 5 madde de özetlenebilir:

1 Cerrahi öncesi var olan KNV

2 Persistan epitel defekti

3 Sütür düğümünün alıcı yatakta bırakılması

4 Aktif blefarit varlığı

5 Geniş alıcı yatak kullanılması (26).

2.4 PATOGENEZ

Vaskülogenez intrauterin dönemde izlenen, de novo olarak endotelial progenitör hücrelerden yeni damarların oluşmasıdır. Anjiyogenez ise mevcut damarlardan yeni damarların filizlenmesi olayıdır. KNV bir anjiyogenezdir (61).

Anjiyogenez proanjiyojenik ve antianjiyojenik sinyallerin, vasküler endotelial hücrelerin, perisitlerin ve çevredeki ECM'nin rol aldığı kompleks bir süreçtir (62).

Kornea anjiyogenezi aşağıdaki sıra ile gerçekleşir (Şekil 1):

1 Herpes simplex enfeksiyonu ya da alkali yanık gibi başlatıcı bir stimulus

2 Latent periyod

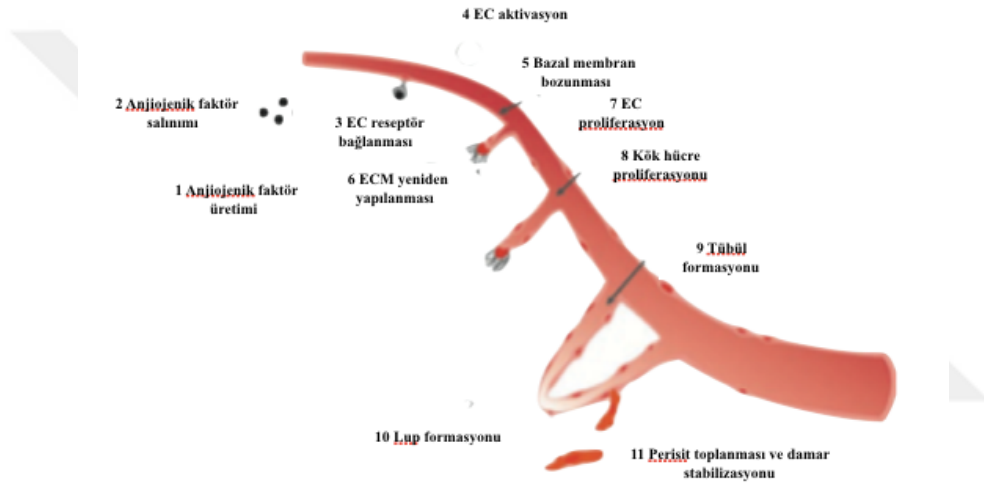
3 Limbal damarların dilatasyonu

4 Venül ve kapiller damarların enzimatik yıkımı

5 Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve stimulusa doğru migrasyonu

6 Endotel hücrelerinin uzayarak yeni damar filizlerini oluşturması, lümen ve vasküler loop formasyonu oluşumu, kan akımının başlaması

7 Damarların arteriol ve venüllere matürasyonu (63-65).



Şekil 1: Kornea anjiyogenezi oluşumu

Doku hasarına yanıt olarak korneadaki stromal keratositler, epitel hücreleri ve enflamatuar hücrelerden, endotel hücrelerinin reseptörlerine bağlanan VEGF gibi proanjiyojenik maddeler salınır. Aktive endotel hücreleri migrasyon ve proliferasyon gösterir. Normal koşullarda kornea, antianjiyojenik kuvvetleriyle anjiyojenik mekanizmaları bloke eder ve avaskülaritesini korumaya çalışır. Ancak patolojik koşullarda bu yeterli olmayabilir ve NV meydana gelir (66).

Normal matür damarların sağlamlığını sağlayan bir çok faktör vardır. Normal damarlarda ECM ile kuvvetli bir bağ ve destek sağlayan Tip 4 kollajen bazal membranı ve kavşak adezyon molekülü (Junctional adhesion molecule-JAM-1) ile sıkı bağlantı alanları bulunmaktadır. Bu özellikler damar içeriğinin dışarı sızmasını engellemekte, damar stabilitesini korumaktadır. Ancak patolojik durumlarda bu destekler geçici olarak kaybolur. Damarlarda proliferasyon ve migrasyon gerçekleşir, yeni damar tübüleri oluşur. Bir süre sonra perisitlerin damarları çevrelemeye başlamasıyla, bu yeni damarlar da olgunlaşır ve normal damar özelliklerini taşır (67).

ECM'nin, endotel hüclerinin kendi aralarında ve çevre dokuyla olan ilişkilerinde ve damarların kollabe olmasını önlemede, etkin rolü vardır. Ancak yeni damarların filizlenmesi sırasında ECM'deki proteolitikler aktive olur ve ECM çözünmeye uğrar. Bu çözünmeye oluşan yeni geçici matrikstekki fibrin ve fibronektin gibi maddeler, endotel hüclerinin yeni hedeflerine tutulmasını ve iskelet yapısını kazanmasını sağlar (61).

ECM çözünmesinde MMP'ler, plazminojen aktivatörleri, heparinazlar, kinazlar, triptazlar ve katepsinler gibi proteinazlar rol alır. Bu proteinazların aktivitesi, matrikste bağlı bulunan ve yeni damarların oluşmasını sağlayan VEGF, fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor-FGF) ve transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor-TGF) gibi proanjiyojenik aktivatörlerin serbestleşmesini sağlar (61, 68-70).

Sağlam olgun damar formasyonları için endotel hücrelerinin perisitlerle ve düz kas hücreleriyle etkileşim içinde olması gerekmektedir. Eğer bu hücrelerde eksiklik olursa damar permeabilitesi ve fragilitesi artar, kanama meydana gelir. Bu durum patolojik anjiyogenezde de karşımıza çıkmaktadır (71).

KNV'ye neden olan durumlar ve patomekanizmaları tablo 2 de özetlenmiştir (20, 72):



Tablo 2 PATOMEKANİZMA**HASTALIKLAR/DURUMLAR**

1 Kornea inflamasyonu/enfeksiyonu

- Keratitler (en sık HSV)
- Greft reddi
- Otoimmün hastalıklar

2 Kornea hipoksisi

- Uzun süreli düşük dk indeksli kontakt lens kullanımı

3 Limbal antianjiyojenik bariyer defekti

- Herediter (Aniridi)
- Kazanılmış (kimyasal hasar)

4 Sekonder/iyatrojenik

- Keratoplasti sonrası
 - Kornea yara iyileşmesi sonrası
-

Gelişen NV'nin en önemli sonucu, görme keskinliğinin ve görme kalitesinin düşmesidir.

Bunun birkaç nedeni mevcuttur:

1 Kan hücrelerinin oluşturduğu opasite

2 Düzensiz damar duvarının neden olduğu sapmalar

3 Damarların arasındaki kollajenin yerleşiminin bozulması

4 Damarların komşuluğunda ödem, hemoraji ve lipid birikiminin olması

5 Pannusun oluşturduğu kornea düzensizlikleri (23).

2.5 SINIFLANDIRMA

KNV klinikte üç farklı görünümle karşımıza çıkar.

1 Vasküler pannus: Kornea periferinde bağ doku proliferasyonu ile birlikte olan yüzeysel NV görünümüdür. Daha çok trahom, atopik keratokonjonktivit, stafilkokal blefarit , vernal konjonktivit ve kontakt lens kullanımı gibi oküler yüzeysel problemleri ile ilişkilidir.

2 Stromal NV: En sık karşılaşılan görünüm olup stromal keratitlerle ilişkilidir.

3 Derin NV: Herpetik ve sfilitik stromal keratitlerde izlenen Desme membranı üzerindeki NV'lerdir (25, 73).

Yüzeysel ve derin NV'nin ayırt edici özellikleri tablo 3 de gösterilmiştir (33).

Tablo 3 **ORİJİN** **KARAKTER**

<u>Yüzeysel NV</u>	<i>Konjonktiva damarları</i>	<i>Limbusta devam eden, süperfisyal stromal yüzeye yayılan, parlak kırmızı, keskin sınırlı, dallanan, irregüler epitel proliferasyonuna neden olan damarlar</i>
<u>Derin NV</u>	<i>Anterior siliyer damarlar</i>	<i>Limbusta kaybolan, derin stromal tabakalara yayılan, koyu kırmızı, belirsiz, paralel ve radyal uzanan, epitelde proliferasyona neden olmayan damarlar</i>

2.6 KNV'DE PROANJİYOJENİK VE ANTİANJİYOJENİK FAKTÖRLER

Kornea'nın avaskülaritesi için, antianjiyojenik faktörlerin yüksek, proanjiyojenik faktörlerin düşük olduğu bir ortama ihtiyaç vardır. Proanjiyojenik faktörlerin dengeyi bozduğu durumlar NV ile sonuçlanmaktadır (74).

Yalnız bu süreç tamamen aydınlatılabilmiş değildir. Örneğin şiddetli inflamasyonla karakterize Akantomoeba keratitinde, diğer keratitlerden daha az KNV gelişmektedir. Bu durum korneada kompleks bir anjiyojenik ve antianjiyojenik dengenin söz konusu olduğunu ve hala aydınlatılması gereken noktalar olduğunu düşündürmektedir (32).

2.6.1 ANJİYOJENİK AJANLAR

Korneadaki anjiyojenik ajanlar tablo 4'te özetlemiştir (2, 75):

Tablo 4 ANJİYOJENİK FAKTÖRLER

- *VEGF*
 - *Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1*
 - *PGF*
 - *FGF*
 - *Transforme Edici Büyüme Faktörü- α ve β (TGF α) (TGF β)*
 - *İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)*
 - *MMP'ler*
 - *Leptin*
 - *İntegrinler*
 - *İL-1*
 - *İL -6*
 - *İL -8*
 - *Tümör Nekrozu Faktörü- α ve β (TNF α) (TNF β)*
 - *Anjiyopoetin-1*
 - *Hepatosit büyüme faktörü (HGF)*
 - *Epidermal Büyüme Faktörü*
 - *Bağ Doku Büyüme Faktörü (CTGF)*
 - *Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)*
 - *Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör*
 - *Anjiyogenin*
 - *Doku Faktörü*
 - *Monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1)*
-

2.6.1.1 VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

1948 yılında Michaelson normal ve patolojik NV'nin bilinmeyen bir madde tarafından uyarıldığını düşünmüş ve bu maddeye X faktörü ismini vermiştir (76). 1983 yılında Senger ve arkadaşları, damar geçirgenliğini arttırdığını düşündükleri vasküler geçirgenlik faktörü (Vascular permeability factor-VPF) ismini verdikleri bir maddeyi tanımlamışlardır (77). 1989 yılında Ferrara ve arkadaşları, hipofiz hücrelerinde endotelyal proliferasyonu uyardığını iddia ettikleri " VEGF " isminde bir faktör tanımlamışlardır (78).

VEGF, hem anjiyogeneze hem vaskülogenezde önemli rolü olan 48-kDa'luk bir homodimerik glikoprotein ailesidir. VEGF inhibisyonu kanser, YBMD ve diyabetik retinopati tedavilerinde uzun yıllardır etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda bu inhibisyonun KNV tedavisinde de etkili olduğu gösterilmiştir (79, 80). VEGF-A bu ailenin keşfedilen en önemli üyesidir. VEGF-A geninde aminoasit sayısına göre VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 ve VEGF-206 isimli 5 farklı izoform üretilmektedir. VEGF-165 dominant izoformdur (81). VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D bilenen diğer VEGF'lerdir. VEGF-E ve VEGF-F ise virüsler tarafından kodlanan bazı yılanların zehirinde tespit edilmiş VEGF ilişkili proteinlerdir. VEGF-A etkisini primer olarak vasküler endotel hücrelerinde gösterse de; monosit, makrofaj, nöronlar, kanser hücreleri ve böbrek epitel hücrelerine de etkileri bulunmaktadır (82). VEGF-A, normal ve patolojik anjiyogenezin bir çok aşamasında etkili olan, ek olarak vasküler permeability artırıcı ve vazodilatatör özellikleri olan potent bir anjiyojenik stimülatördür (83-

85). VEGF'in damar permeabilitesini arttırıcı özelliği histaminden 50 000 kat kuvvetli bulunmuştur (86).

VEGF-A anjiyogenezi arttırıcı özelliklerini

1 Endotel hücre proliferasyonu

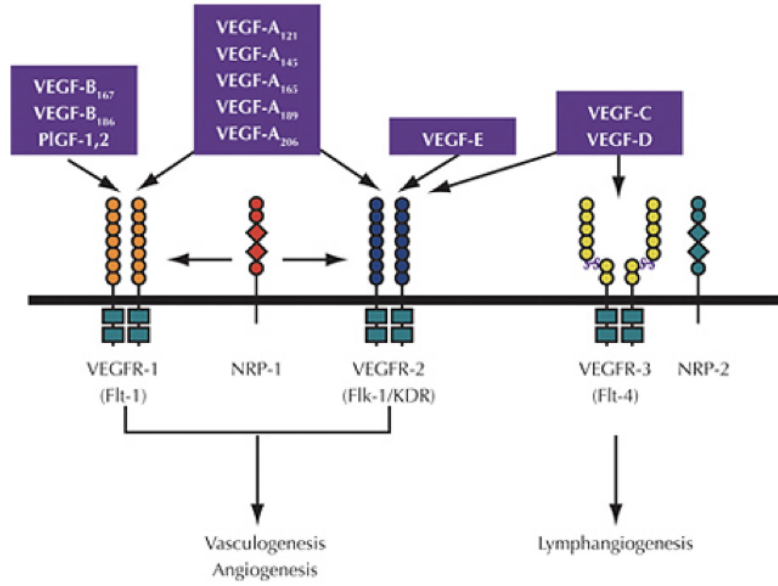
2 Endotel migrasyonu

3 Proteolitiklerin aktivasyonu

4 Kapiller tüp formasyonu oluşturarak göstermektedir (62).

VEGF-B ve VEGF-C embriyojenik anjiyogenez ve lenfanjiyogenezle ilgilidir. VEGF-D ise akciğer bronşiollerinde lenfatik damarlanmada görevlidir. PGF ise iskemi, inflamasyon, yara iyileşmesi ve kanser hücrelerinde vaskülogenez ve anjiyogenezde görevlidir (87).

VEGF etkisini genel olarak endotel hücrelerinden daha az oranda monosit ve makrofajlardan eksprese edilen, tirozin kinaz (VEGFRs) reseptörlerine bağlanarak gösterir (88, 89). VEGF-A VEGFR1 ve VEGFR2'ye bağlanır. VEGF'in bilinen etkilerini oluşturan esas reseptör VEGFR2'dir. VEGFR1 az bilinen ve VEGFR2 sinyalini ayarlama görevi olduğu düşünölen reseptördür. VEGF-B ve PGF VEGFR1'e bağlanmaktadır. VEGF-E VEGFR2'ye bağlanmaktadır. VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR3 e bağlanır ve lenfanjiyogenezden sorumludur (90, 91). VEGF'ler ve reseptörleri şekil 2'de özetlenmiştir:



Şekil 2: VEGF reseptörleri

2.6.1.2 FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ

Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiyogenez modellerinde sık kullanılan bir ajandır (2, 92). bFGF, FGF ailesinin bir üyesidir. Bu aile dokularda hücrel farklılaşma, anjiyogenez, mitogenez ve yara iyileşmesinde sırasında yüksek oranda salınan, 23 adet heparin bağlayıcı peptidi kapsamaktadır. FGF anjiyojenik özelliklerini FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4 adlı tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak göstermektedir (93). FGF ailesinden FGF-1 sağlıklı kornea epitel ve endotelinde düşük oranda bulunmaktadır (94). FGF-2'nin ise keratosit-endotel ortak kültüründe hasar sonrası üretildiği gösterilmiştir (95). Normalde kornea epitelinden salgılanan ancak bowman tabakasına bağlanamayan bFGF, epitel hasarı sonrası bowman tabakasına bağlanabilmektedir (96). bFGF'nin VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D üretimine aracılık ettiği gösterilmiştir

(66). Anti-bFGF ajanlarının invitro olarak endotel tübül formasyonunu, invivo olarak da KNV'yi inhibe edebilmektedir (97).

2.6.1.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

MMP'ler anjiyogenezin diğer bir anahtar mediatörüdür. MMP'ler, anjiyogenez sırasında ECM'nin ve vasküler bazal membranın tahrip edilip yeniden yapılanmasını sağlayarak NV ve lenfanjiyogeneze neden olan çinko bağlayan proteolitik enzimlerdir. MMP'ler substrat olarak ECM'deki kollajen, fibronektin, laminin ve hücre yüzey moleküllerini kullanırlar. MMP ailesi jelatinazlar, kollajenazlar, stromelizinler, membran tip MMP'ler ve diğerleri olarak 5 gruba ayrılırlar. Bu grupta bulunan 25 enzimin 15 tanesi korneada tespit edilmiştir. Bunlar kollajenaz 1 ve 3 (MMP-1 ve 13), jelatinaz A ve B (MMP-2 ve 9), stromelizin (MMP-3), matrilizin (MMP-7) ve membran tipi MMP'dir (MMP-14) (98, 99). MMP'lerin anjiyogenez sırasında korneadan salınımı artar (100, 101). Fakat anjiyogenezdeki kesin rolü henüz netleşmemiştir. Çünkü MMP'ler ECM'yi zndrdkten sonra endotel hücrelerinin dokuya invaze olmasını sağlar. Bu durum, antianjiyojenik prekürsörlerin de serbestleşmesini sağlayarak aynı anda hem proanjiyojenik hem antianjiyojenik özellikler göstermesini sağlamaktadır (99, 102, 103).

MMP-2, proanjiyojenik özelliklerini ECM çözünmesini ve matrikse bağlı büyüme faktörlerinin (VEGF gibi) ve sitokinlerin salınmasını sağlayarak göstermektedir (99, 104, 105).

MMP-7, katalitik aktivitesiyle birlikte anjiyogenezi regüle eden VEGFR1, plazminojen ve kollojen 18'i serbestleştirir (106). MMP-7, kollajen 18 serbestleşmesi ile endostatin miktarını arttırdığından, aynı zamanda potent bir antianjiyojenik etki de gösterebilmektedir (102).

Membran Tip-1 MMP(M1MMP) anjiyogenez için en önemli MMP'dir. Bunun sebebi, farelerde eksikliğinin 3-4 hafta içinde ölüme neden olduğunun gösterilmesidir (99). M1MMP yara iyileşmesi sırasında kornea endotel hücreleri ve stromal keratositlerde artmaktadır. M1MMP'nin inhibisyonu vasküler gelişimi yavaşlatmaktadır (107).

2.6.2 ANTİANJİYOJENİK AJANLAR

Korneada etkili olan antianjiyojenik ajanlar tablo 5'te özetlenmiştir (2, 75):

Tablo 5 ANTIANJİYOJENİK FAKTÖRLER

- *Anjiyostatin*
 - *Endostatin*
 - *Prolaktin*
 - *MMP'ler*
 - *MMP doku inhibitörü*
 - *İnsan makrofaj Metalloesterazı*
 - *Trombospondin 1- 2*
 - *Trombosit faktör-4*
 - *Anjiyopoetin 2*
 - *Antitrombin-3*
 - *Arresten*
 - *Kanstatin*
 - *Tumstatin*
 - *Pigment Epiteli Kaynaklı Faktör (Pigment epithelium derived factor-PEDF)*
 - *TNF*
 - *İL-4*
 - *İL-12*
 - *İL-13*
-

2.6.2.1 ENDOSTATİN

Endostatin etkisini, VEGF aracılı endotel migrasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ederek gösterir (108). Endostatin bFGF ile oluşturulan KNV'yi anlamlı şekilde azaltmaktadır (109). Endostatin antianjiyojenik etkisini, VEGF reseptörlerini inhibe ederek ve kaspaz 3 aktivitesini artırıp endotel apoptozisini arttırarak gösterir (110, 111). Endostatinin ayrıca lenfanjiyogenezi de inhibe etme özelliği mevcuttur (112).

2.6.2.2 ANJİYOSTATİN

İlk olarak Lewis akciğer kanser hücrelerinden izole edilen, plazminojenin proteolitik bir fragmanı olan anjiyostatin, güçlü bir antianjiyojenik faktördür. Anjiyostatin etkilerini endotel proliferasyonunu, migrasyonunu ve tübül formasyonunu inhibe ederek gösterir (113-115). Anjiyostatinin ayrıca vasküler endotel hücrelerinde apoptozisi indükleme özelliği de mevcuttur (116). bFGF ve anjiyogenin ile indüklenen KNV'de, anjiyostatinin inhibe edici özellikleri gösterilmiştir (113, 114).

2.6.2.3 PİGMENT EPİTELİ KAYNAKLI FAKTÖR

PEDF ilk olarak retinoblastom hücrelerinde, sonrasında retina pigment epiteli, iris ve korneada tespit edilen potent bir antianjiyojenik ve nörotrofik bir faktördür (117). Korneada PEDF blokajı sonrası KNV gelişimi kolaylaşmaktadır. Ayrıca rekombinant PEDF, bFGF tarafından oluşturulmuş KNV'yi inhibe

etmektedir (118). PEDF vitreusu ve retinayı invaze etmeye çalışan damarların uzaklaştırılmasından sorumlu olan major bir neovaskularizasyon inhibitörüdür (119).

2.7 KNV'NİN KÖRLÜK YAPAN HASTALIKLARDA ROLÜ

Kornea hastalıkları dünyada, çoğunlukla gelişmekte olan ülkelerde, yaklaşık 10 milyon insanın ünilateral veya bilateral körlüğünden sorumludur (120).

Gelişmiş ülkelerde, kontakt lense ve blefarite bağlı olarak gelişen değişken derecelerdeki yüzeysel NV zararsız kabul edilmektedir (121). Buna karşılık stromal vaskularizasyonla giden HSV enfeksiyonu ve diğer enfeksiyonlar körlüğe ve kornea nakli cerrahilerinin başarısızlığına neden olmaktadır (25). Kontakt lense bağlı gelişen bakteriyel kornea ülserasyonları da, vaskularize kornea skarına neden olabilmektedir (122).

Gelişmekte olan ülkelerde KNV ve skarla seyreden kornea hastalıkları çocuklarda ve yetişkinlerde körlüğün majör etkenidir (120). Afrika'da kornea hastalıklarına bağlı olarak körlükler, çocuklarda daha çok vitamin A eksikliği ve kızamık hastalığına bağlı gelişmektedir. 16 yaş altı şiddetli görme kaybı olan çocuklarda yapılan bir çalışmada vitamin A eksikliği ve kızamık hastalığına bağlı gelişen korneal körlük oranı %35 olarak bulunmuştur (123). Zimbabve'de benzer popülasyonda yapılan bir çalışmada korneal körlük oranı %75 bulunmuştur (124).

2.8 TEDAVİ

KNV tedavisi zor ve problemlı bir süreçtir (125). Tedavide çeşitli cerrahi ve medikal yöntemler olup bunlar değişken derecelerde başarı sağlamaktadır. Tedavide amaç hem yeni damarların oluşmasını önlemek hem de mevcut damarlarda gerileme sağlamaktır (126).

2.8.1 TEDAVİ TARİHÇESİ

KNV'yi tedavi edebilmek için geçmişte bir çok invaziv (pannus eksizyonu, cerrahi/diatermik peritomi, bariyer olarak skar dokusu oluşturmak, koter, kriyoterapi, lameller cerrahi) ve non invaziv (iyonize radyasyon) teknik denenmiştir (127).

1964 yılında Lavergne ve Colmant pannus dokusunun cerrahi olarak çıkarılmasından, diatermik peritomiden ve koterizasyondan bahsetmiştir (128). 1968 yılında Ey ve arkadaşları, bu yöntemlerin detaylarını ve karşılaştırmalı analizlerini ortaya koymuştur (129).

Ey ve arkadaşları, aynı zamanda skar dokusunu neovaskülarizasyon için bir bariyer olarak kullanmayı düşünmüştür. Ancak klinik uygulamalarda damarların skar dokusunun etrafından ve arasından ilerlediğini izlenmişlerdir. Aynı literatürde yer alan bir başka tedavi olan ısı ile koterizasyonla ilgili detaylar bulunmamaktadır (129).

Konjonktiva 360 derece kesilip 4 mm posteriora suture edilerek, KNV önlenmek istenmiştir. Ancak yöntemin denendiği tüm vakalarda başarısız

olunmuştur (130). Korneadaki damarlara kriyoterapi uygulanmış. Ancak rekanalasyon, ara yüz hemorajileri, derin ülserasyon ve perforasyon gibi komplikasyonlar gelişmiştir (129, 130).

Leigh'nin sırasıyla santral lameller, periferik anüler ve santral penetran keratoplastiden oluşan karmaşık tekniği 2-3 hastada başarılı olmuştur (131).

Beta radyasyon da KNV tedavisinde kullanılmıştır. Ancak başlangıç zamanlardaki coşku ve heyecan, geç dönemdeki ağır komplikasyonların yayınlanmasıyla son bulmuştur (132-136).

2.8.2 MEDİKAL TEDAVİ

KNV'nin medikal tedavisinde günümüze kadar çalışılmış ilaçlar tablo 6'da özetlenmiştir:

Tablo 6 KNV MEDİKAL TEDAVİSİNDE ÇALIŞILMIŞ İLAÇLAR

-
- | | |
|--|---|
| • <i>Steroidler (137)</i> | • <i>TNP-470 (Fumagillin analogu) (157)</i> |
| • <i>NSAI'ler (138)</i> | • <i>Polisülfat heparin (158)</i> |
| • <i>Anti-VEGF'ler (139)</i> | • <i>Pazopanib (159)</i> |
| • <i>Siklosporin (140)</i> | • <i>Talidomid (160)</i> |
| • <i>SiRNA (141)</i> | • <i>Suramin (161)</i> |
| • <i>Nodinhbit-1 (142)</i> | • <i>İnfliksimab (162)</i> |
| • <i>Oligonükleotid (Aganirsen) (143, 144)</i> | • <i>Everolimus (163)</i> |
| • <i>Doksisiklin (145)</i> | • <i>Sunitinib (163)</i> |
| • <i>Anjiyogenin (146)</i> | • <i>Transtuzumab (164)</i> |
| • <i>Tigesiklin (147)</i> | • <i>Altın Partikülleri (165)</i> |
| • <i>Yeşilçay (Epigallocatechin Gallate) (148)</i> | • <i>Hiperbarik oksijen (166)</i> |
| • <i>Antianj.peptidnanofiberler (149, 150)</i> | • <i>Somatostatin (167)</i> |
| • <i>T-PA peptid (151)</i> | • <i>Oktreotid (168)</i> |
| • <i>C vitamini (152)</i> | • <i>Rapamisin (169)</i> |
| • <i>İtrakonazol (153)</i> | • <i>Metotreksat (170)</i> |
| • <i>Curcumin (154)</i> | • <i>D3 vitamini (171)</i> |
| • <i>Klaritromisin (155)</i> | • <i>Resveratrol (172)</i> |
| • <i>Moksifloksasin (155)</i> | • <i>P-PEDF-SAINT-18 (173)</i> |
| • <i>Endostatin (156)</i> | • <i>Setuksimab (174)</i> |
-

2.8.2.1 STEROİDLER

Steroidlerin antianjiyojenik etkileri ilk olarak Jones tarafından 1950 yılında ortaya koyulmuştur (137). Sonrasında kortizon, deksametazon, hidrokortizon, prednizolon, metilpredzinolon, medroksiprogesteron, triamsinolon ve anekortav asetatın KNV'yi inhibe edici etkisi üzerine bir çok çalışma yapılmıştır (128, 137, 175-178). Steroidler antianjiyojenik etkilerini hücre kemotaksisini inhibe ederek, proenflamatuvar sitokinleri inhibe ederek, plazminojen aktivatörünü inhibe ederek ve prostaglandin sentezini inhibe ederek göstermektedir (179-181).

Klinik çalışmalar keratoplasti öncesi ve sonrası steroid kullanımının KNV'ye bağlı rejeksiyon oranını azalttığını göstermiştir (56). Bununla birlikte steroidler her çalışmada etkili olmamıştır (128, 182, 183). Ayrıca steroid kullanımının glokom, kornea incelmesi, kornea perforasyonu, katarakt ve herpes virüs keratiti gibi ciddi yan etkileri mevcuttur (184, 185).

2.8.2.2 ANTI VEGF AJANLAR

Anti VEGF ajanların KNV'yi azaltmadaki etkisi hem hayvan, hem de insan çalışmalarıyla gösterilmiştir. Pegaptanib Sodyum (Macugen, Eyetech Pharmaceuticals), bevacizumab (Altuzan, Roche, İsviçre), ranibizumab (Lucentis, Novartis, Basel, İsviçre; Genentech, Roche) ve aflibercept (Eylea, Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, New York, Bayer, Basel, Switzerland) başlıca anti-VEGF'lerdir.

Pegaptanib sodyum patolojik oküler neovaskularizasyonun ve damar permeabilite artışının primer sorumlusu olan VEGF165'i spesifik olarak inhibe eden bir RNA aptameridir (186). Aptamerler spesifik bir şekile giren, bir antikor gibi davranarak hücre dışı hedeflere yüksek afinite ile bağlanan kimyasal olarak sentezlenmiş oligonükleotidlerdir (187). Bu ilacın insanlarda kullanılan ilk aptamer olması ve YBMD'ye bağlı koroidal neovaskularizasyonda FDA onaylı kullanılan ilk anti VEGF ajan olması dolayısıyla tarihi önemi vardır (188). Pegaptanib sodyum'un KNV'de kullanımıyla ilgili çok fazla çalışma yoktur. Pegaptanib sodyum diğer anti VEGF'ler kadar olmasa da KNV tedavisinde etkili bulunmuştur (189, 190).

Bevacizumab VEGF-A'nın bütün izoformlarını (VEGF-115, VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206) inhibe eden, 149 kilo dalton (kda) ağırlığında, rekombinant, humanize, monoklonal İgG1 antikorudur. Yapısal olarak insan kaynaklı bir ana iskelet ve ona bağlı fare kaynaklı bir belirleyici bölgeden oluşmaktadır (%93 insan, %7 fare). Bu antikor VEGF-A'ya yüksek özgüllükle bağlanarak VEGF'i inhibe etmekte, bu da anormal damar formasyonunu inhibe etmekte ve kapiller permeabiliteyi azaltmaktadır (191). Bevacizumab FDA tarafından metastatik kolon kanseri için onaylanmış olup, off label olarak eksudatif YBMB, PDR ve rubeozis iridis hastalığı gibi neovasküler oftalmolojik hastalıklarda sıkça kullanılmaktadır (9, 11, 192, 193). Kornea alanında ilk olarak 1998 yılında Yatoh ve arkadaşları, 2004 yılında Cursiefen ve arkadaşları, VEGF inhibisyonunun farelerde greft ömrünü uzattığını tespit

etmişlerdir (60, 139). Deneysel çalışmaların çoğunluğunda bevacizumabın KNV'yi geriletmediği görülmüştür. Bu çalışmalarda etkinin olgunlaşmış damarlardan ziyade yeni gelişen damarlar üzerine olduğu görülmüştür. Çalışmalarda anlamlı yan etki izlenmemiştir (60, 80, 194, 195). Bevacizumab'ın KNV tedavisinde etkisi insan çalışmalarında da gösterilmiştir (80, 196, 197). Klinik uygulamalarda bevacizumabın kullanıldığı durumlar tablo 7'de listelenmiştir (49, 79, 80, 198-203).

Tablo 7 BEVACİZUMAB'IN KORNEA PATOLOJİLERİNDE KLİNİK KULLANIMI

- | | |
|----------------------------------|--|
| • <i>Herpetik keratit</i> | • <i>Periferik ülseratif keratit</i> |
| • <i>Büllöz keratopati</i> | • <i>Romatoid keratit</i> |
| • <i>Kornea skarı</i> | • <i>İnterstisyel keratit</i> |
| • <i>Kornea ülseri</i> | • <i>Oküler Skatrisyel Pemfigoid</i> |
| • <i>Keratoplasti öncesi</i> | • <i>Terrien Marjinal Dejenerasyon</i> |
| • <i>Keratoplasti sonrası</i> | • <i>Post travma</i> |
| • <i>Greft reddi</i> | • <i>Mutipl cerrahilere bağlı kornea incelmeleri</i> |
| • <i>Graft Versus Host</i> | • <i>Kimyasal hasar</i> |
| • <i>Limbal hücre yetmezliği</i> | • <i>Kuru göz</i> |
| • <i>Pterjium</i> | • <i>Rozasea keratiti</i> |
| • <i>Steven-Johnson Sendromu</i> | • <i>Post lazer in situ keratomileusis</i> |
| • <i>Familiyal Disotonomi</i> | |

Ranibizumab, VEGF-A'nın tüm izoformlarını inhibe eden, 48 kDa ağırlığında, rekombinant, humanize, monoklonal antikorun Fab fragmanıdır.

Ranibizumab, bevacizumab için üretilmiş olan antikorun, Fc parçasının kopartılmasıyla elde edilmiş ve VEGF-A ya olan afinitesi kuvvetlendirilmiş bir ajandır. Ranibizumab YBMD, diyabetik retinopati ve retinal ven oklüzyonlarında FDA onaylı olup bu hastalıkların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (204-206). Ranibizumab'ın KNV tedavisinde kullanıldığı sınırlı sayıdaki çalışmada KNV'yi azalttığı görülmüştür (3, 207-209).

Aflibercept, insan IgG1'inin Fc parçasıyla, VEGFR-1'in ikinci ve VEGFR-2'nin üçüncü bağlanma bölgelerinin birleştirilmesiyle oluşturulan tamamen humanize bir rekombinant proteindir (210, 211). Aflibercept'in VEGF'e olan afinitesi, VEGF'in VEGFR1 ve VEGFR2'ye olan afinitesinden daha yüksektir. Aflibercept'in VEGF-A izoformları yanında VEGF-B, PlGF1, ve PlGF-2 inhibisyonu da yapması ekstra bir avantaj gibi gözükmektedir. Aflibercept'in VEGF-A165'e bağlanma kapasitesi ranibizumabdan 94, bevacizumabdan 120 kat daha fazladır (212). Aflibercept, FDA'dan YBMD, retinal ven tıkanıklığı, diyabetik retinopati hastalıklarında onaylıdır ve bu hastalıklarda yaygın olarak kullanılmaktadır. KNV tedavisinde afliberceptin kullanıldığı sınırlı sayıdaki çalışmalarda, afliberceptin KNV'yi geriletmediği görülmüştür (213, 214).

2.8.3 CERRAHİ TEDAVİ

KNV'nin cerrahi tedavisinde kullanılan yöntemler tablo 8'de gösterilmiştir (215-220). KNV'de uygulanmış cerrahi yöntemler, oklüde edici ve oküler yüzeyi düzeltici yöntemler olarak iki grupta değerlendirilebilir.

Tablo 8 KNV TEDAVİSİNDE KULLANILAN CERRAHİ YÖNTEMLER

1 Oklüde Edici Yöntemler

- *Argon lazer*
- *Sarı lazer*
- *Yag lazer*
- *Fotodinamik terapi*
- *Yüzeyel keratektomi*
- *İnce iğne diatermi*

2 Oküler Yüzeyi Düzeltici Yöntemler

- Limbal kök hücre transplantasyonu
 - Amniyotik membran transplantasyonu
 - Konjonktival transplantasyon
-

Hemoglobinin argon lazeri absorpsiyon kapasitesi çok yüksek olduğu için, argon lazer hemoglobinle dolu damarları koagüle edebilmektedir (221). Argon lazer klinikte daha çok lipid keratopati ve penetran keratoplastili hastalarda denenmiştir (222). Ancak kornea incilmesi, kornea ektazisi ve intrakorneal hemoraji gibi komplikasyonlarından dolayı yaygınlaşmamıştır (223).

Sarı lazer medikal tedaviye yanıt vermeyen greft reddine bağlı oluşan KNV hastalarında ve keratoplasti öncesi KNV bulunan hastalarda denenmiştir. Nirankari sarı lazerin oksihemoglobin ve indirgenmiş hemoglobin tarafından absorbe edildiği için daha az enerji gerektirdiğini belirtmiştir. Bu açıdan sarı lazer argon lazerden daha avantajlı gözükmetedir (223).

2001 yılında Sharma 30 gözde KNV'yi tedavi etmek için Yag lazer kullanmış ve olumlu sonuçlar raporlamıştır (224). Yine 2016 yılında yapılan bir hayvan çalışmasında Yag lazer etkili ve güvenli bulunmuştur (225).

2007 yılında Yoon 18 hastanın 18 gözünde KNV'yi geriletmek için vertaporfinle fotodinamik tedavi kullanmış ve 1 yıllık takip sonunda 9 gözde total oklüzyon sağlanmış, ancak bu yöntemin yüksek maliyetli oluşu vurgulanmıştır (226). Ayrıca 2016 yılında yapılan bir çalışmada, subkonjonktival bevacizumab tedavisinin FDT ile kombinasyonun daha etkili olduğu belirtilmiştir (227).

İnce iğne diatermi ilk olarak Pillai, Dua ve arkadaşları, tarafından 2000 yılında tanımlanan bir başka oklüzyon yöntemidir (216). Bu yöntemin uzun dönem sonuçlarının değerlendirildiği bir çalışmada herpes enfeksiyonuna bağlı gelişen KNV'de ince iğne diatermi tedavisi anlamlı görme artışı sağlamıştır (228).

Oküler yüzeyi düzeltici yöntemlerden amniyotik membran transplantasyonunun amniyotik membranın üzerindeki antianjiyojenik maddeler sayesinde KNV'yi geriletmeye etkili olabilmektedir (229, 230). Diğer yüzey düzeltici yöntemlerden limbal konjonktival kök hücre transplantasyonun veya ex vivo limbal kök hücre transplantasyonunun KNV'yi azalttığı gösterilmiştir (218, 231).

3 GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlanmıştır (Onay kodu G.Ü.ET-15.025, 17.04.2015). Çalışma randomize ve çift kör kontrollü olarak yürütülmüştür.

3.1 DENEY HAYVANLARI

Çalışmada Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 2,5-3 kg ağırlığında, 15 adet, sağlıklı, erişkin, erkek, Albino, Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Çalışma öncesinde tavşanların kornealarında herhangi bir hasar ve NV olmadığı konfirme edildi. Çalışmada kullanılan hayvanlar, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) uygun nem ve oda sıcaklığında, 12 saat karanlık-aydınlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış kafeslerde ayrı ayrı tutuldu. Günlük standart yem ve su, ad libitum olarak verildi. Hayvanlara işlemler intramusküler olarak 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine ile genel anestezi uygulaması sonrası uygulandı.

3.2 KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU OLUŞTURULMASI

Çalışma GÜDAM laboratuvarlarında yapıldı. Genel anestezi sonrası göz hareketlerini minimize etmek için ek olarak topikal %0,5'lik proparakain hidroklorid (Alcaine; Alcon, Teksas) uygulandı. KNV modeli oluşturulması için ilk olarak 1985 yılında Williams tarafından tanımlanmış sütür modelinin

modifikasyonu uygulandı. Ameliyat mikroskobu (Möller-Wedel FS 3000, Haag Streit) altında, 15 tavşanın sağ gözüne, süperior limbus mesafesinden 1-1,5 mm uzaklıkta ve 3 mm genişlikte bir adet 7-0 siyah ipek sütün (FSSB, Almanya), orta stromaya yerleştirildi. Bütün sütünler aynı araştırmacı tarafından yerleştirildi (MCÖ). Bu sırada perforasyon oluşturulmamasına dikkat edildi. Enfeksiyonun önlenmesi için moksifloksasin damla (Vigamox, Alcon, Teksas) 1 hafta boyunca, günde iki kez, topikal olarak uygulandı. Yedinci günde genel ve topikal anestezi sonrası bütün sütünler kaldırıldı. Sütün alınmadan önce, bütün gözlerde belirgin miktarda NV oluştuğu fotoğraflanarak konfirme edildi.

3.3 BEVACİZUMAB VE ANTİ-HUMAN VEGF GU01 TEDAVİLERİ

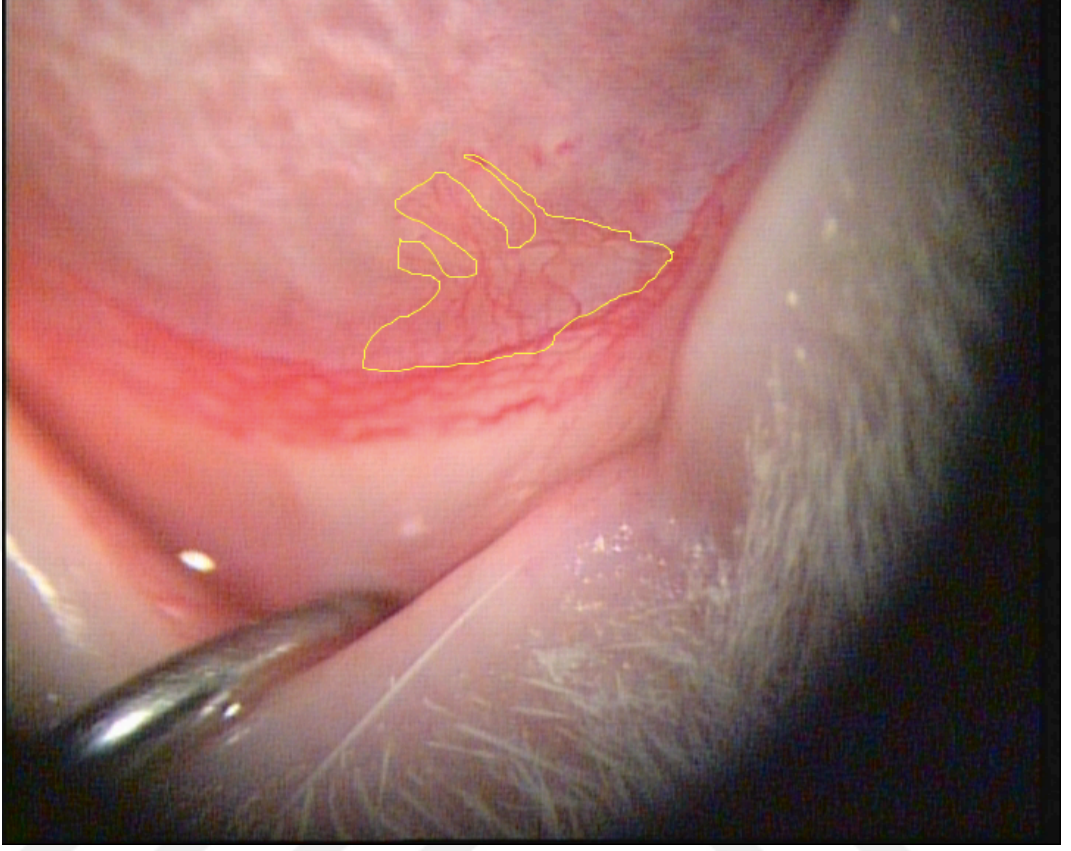
Yedinci günde, sütün materyali alındıktan hemen sonra, 15 tavşan randomize olarak 3 gruba ayrıldı. 1. gruptaki 5 göze (kontrol grubu) 0,1'er ml (mililitre) dengeli tuz solüsyonu (BSS, Alcon, Teksas), 2. gruptaki 5 göze (bevacizumab grubu) 0,1 ml/2,5mg (miligram) Altuzan, 3. gruptaki 5 göze (biyobenzer grubu) 0,1 ml/2,5mg Anti-Human VEGF GU01 enjeksiyonları, neovaskularizasyonun geliştiği bölge hizasından, limbustan 1 mm uzaklıktan, 30 Gauge iğne ile, subkonjonktival olarak yapıldı. Bütün enjeksiyonlar insülin enjektörleriyle, tek doz olarak, aynı araştırmacı tarafından yapıldı (MCÖ).

Anti Human GU01, hibridoma yöntemiyle, HiTrap Protein G HP klonu kullanılarak FPLC cihazında saflaştırılıp üretildi.

Tablo 9 GRUPLAR	TEDAVİ
1 <u>Kontrol grubu (N=5)</u>	• 0,1 ml BSS
2 <u>Bevacizumab grubu (N=5)</u>	• 0,1 ml/2,5 mg Bevacizumab
3 <u>Biyobenzer grubu (N=5)</u>	• 0,1 ml/2,5 mg Anti-Human VEGF GU01

3.4 KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU ALANI ANALİZİ

KNV alanını belirlemek için, sütür uygulaması sonrası yedinci ve on dördüncü günlerde, ameliyat mikroskobu (Möller-Wedel FS 3000, Haag Streit) ve ameliyat mikroskobuna monte edilmiş kayıt sistemi yardımıyla (Avermedia), X16'lık büyütmede standart görüntüler kaydedildi. Korneadaki neovasküler alan ImageJ (Wayne Rasband at Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD) programı yardımıyla, milimetre kare cinsinden hesaplandı. Standardizasyon için X16'lık büyütmede çekilen bir cetvel fotoğrafı kullanıldı. Alan hesaplaması öncesinde cetvel üzerinden 1 mm'lik bir çizgi çizildi ve bu ölçüm alan hesabının milimetrik ve standardize olarak yapılabilmesi için kaydedildi. Mouse yardımıyla limbustan sütür hattına uzanan neovasküler bölge çevrelendi (örnek resim 2). Enjeksiyonlar öncesi hesaplanan alan %100 olarak kabul edildi. Enjeksiyonlar sonrası 1. haftada kalan neovaskülerizasyon yüzde olarak hesaplandı. Sonrasında neovaskülerizasyon gerileme yüzdeleri kaydedildi. Bu ölçümler gruplara uygulanan tedaviye kör iki araştırmacı tarafından yapıldı (AY-MÖÇ).



Resim 2: ImageJ programı ile KNV alanı çevrelemesi

3.5 HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Sütürasyonların 14, enjeksiyonların 7. gününde, bütün hayvanlar sakrifiye edildi. Sağ gözlere enükleasyon uygulandı. Neovasküler alanın olduğu kornea bölgeleri limbus sağlam bırakılacak şekilde çıkarıldı. Bu dokular 24 saat formaldehit içinde muhafaza edildi ve sonrasında parafin içine gömüldü. Hematoksilen-eozin ve CD31 ile boyanmak üzere 4'er mikronluk kesitler alındı. Hazırlanan örnekler X100'lük büyütmede değerlendirilip fotoğraflandı.

3.6 İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS Ver 22 programı ile yapıldı. Tedavi öncesi gelişen KNV alanları Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Tedavi sonrası ikili olarak KNV alanı gerileme yüzdeleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. P değerleri <0,05 olduğunda, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 SONUÇLAR

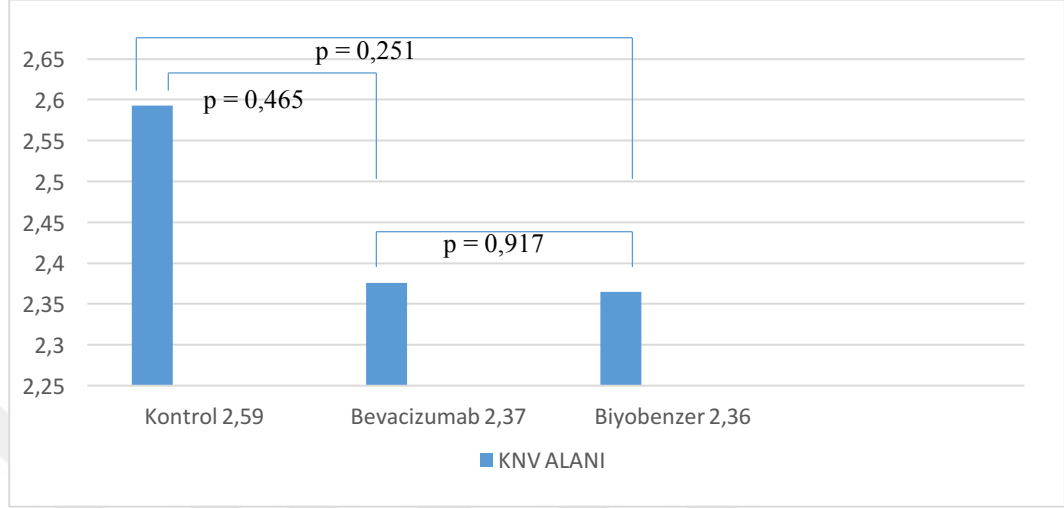
4.1 KNV ALAN ANALİZİ

Sütürasyon sonrası yedinci günde bütün gözlerde yeterli düzeyde KNV izlendi. Hiçbir gözde enfeksiyon, perforasyon ya da başka bir komplikasyon izlenmedi. Sütürler alındıktan sonra kontrol, bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında hesaplanan neovaskülarizasyon alanları sırasıyla $2,59 \pm$

0,34, $2,37 \pm 0,40$, $2,36 \pm 0,44$ idi ve bu değerler arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$). (şekil 3 - resim 2)

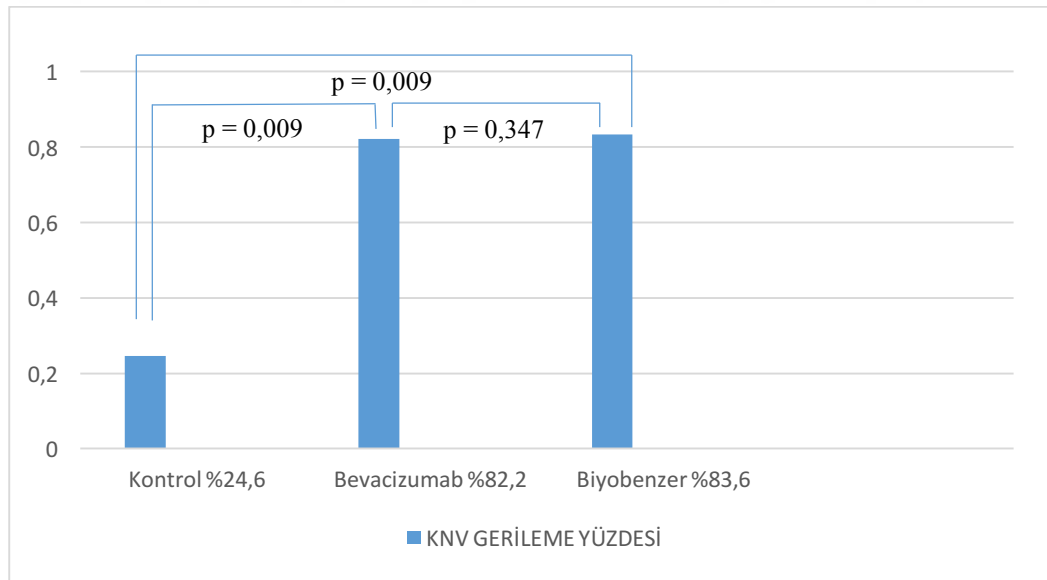
Bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında, kontrol grubuna göre neovaskülarizasyon alanları daha fazla azalma gösterdi (Kontrol grubu: $\%24,6 \pm 0,03$, bevacizumab grubu: $\%82,2 \pm 0,03$, biyobenzer grubu: $\%83,4 \pm 0,03$ ($p < 0,05$). Bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında, KNV azalma oranları arasında istatistiksel olarak bir fark izlenmedi ($p > 0,05$). (şekil 4 – resim 2) Hiçbir gözde epitel defekti, enfeksiyon ya da herhangi bir komplikasyon izlenmedi.

TEDAVİ ÖNCESİ KNV ALAN ÖLÇÜMLERİ VE P DEĞERLERİ

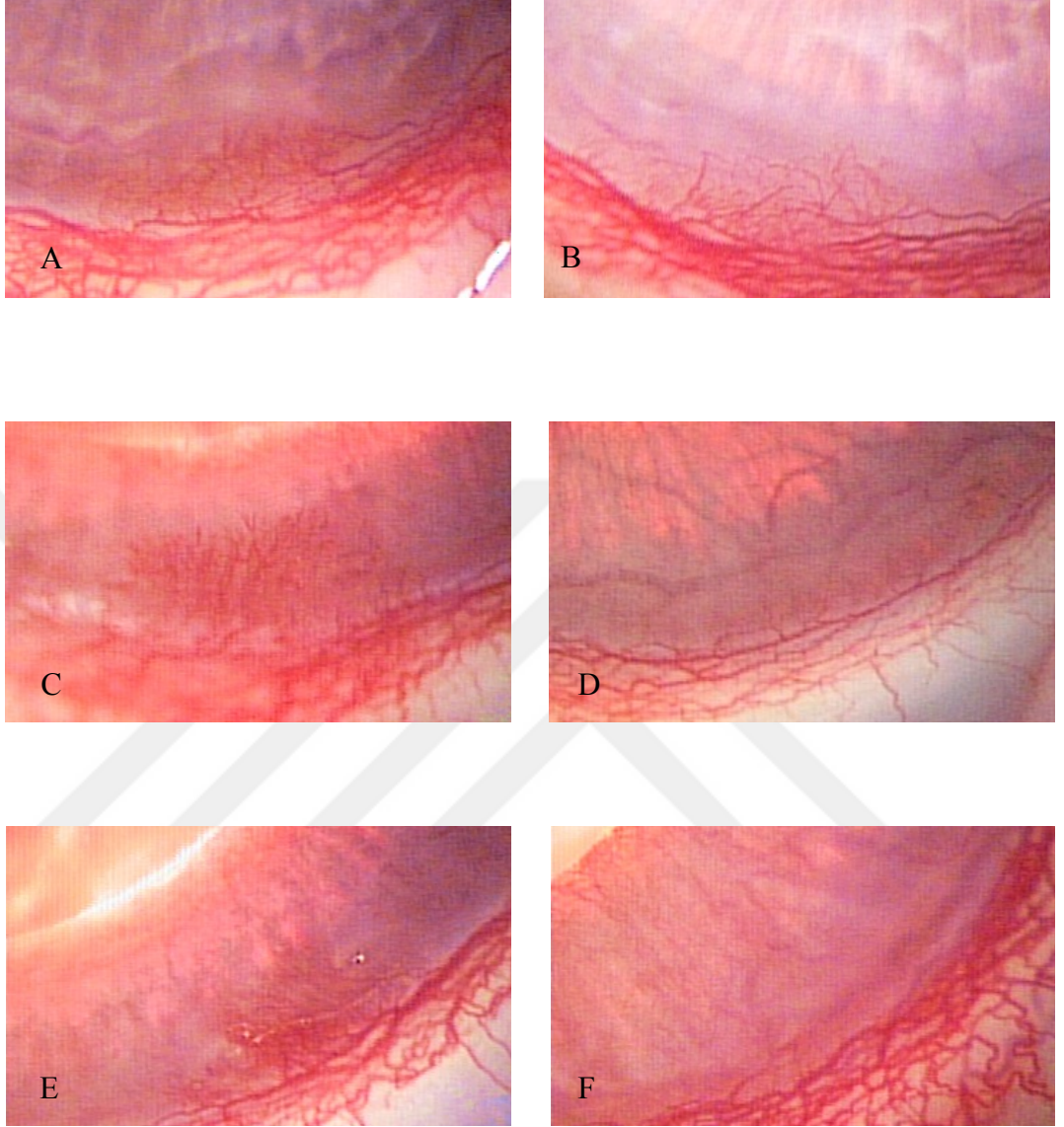


Şekil 3: Sütürasyon sonrası yedinci günde gelişen KNV alan ölçümleri ve Mann-Whitney U testi ile p değerleri: gruplar arasında anlamlı fark izlenmemekte

TEDAVİ SONRASI KNV GERİLEME YÜZDELERİ VE P DEĞERLERİ



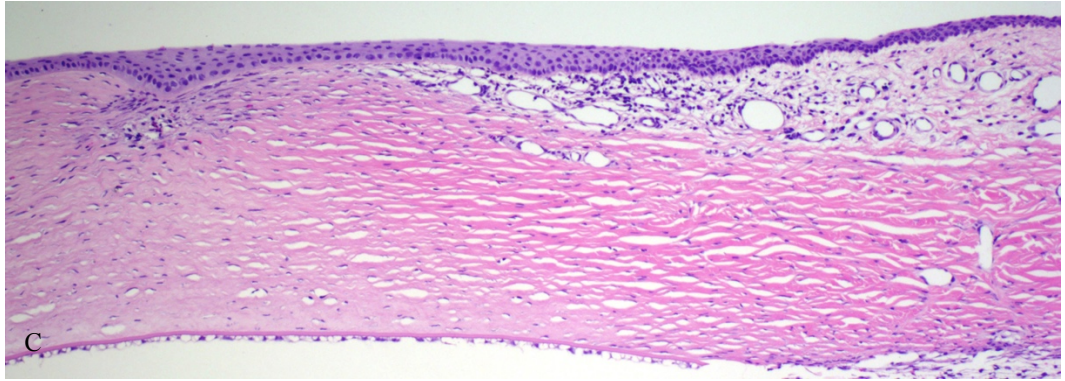
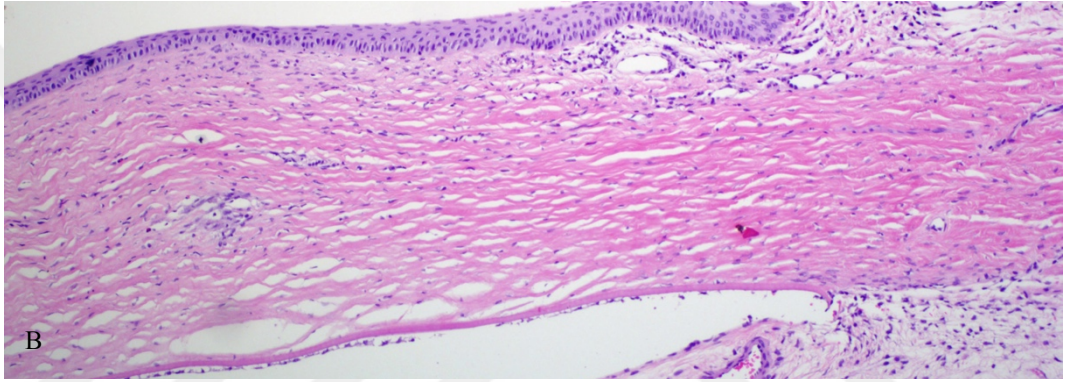
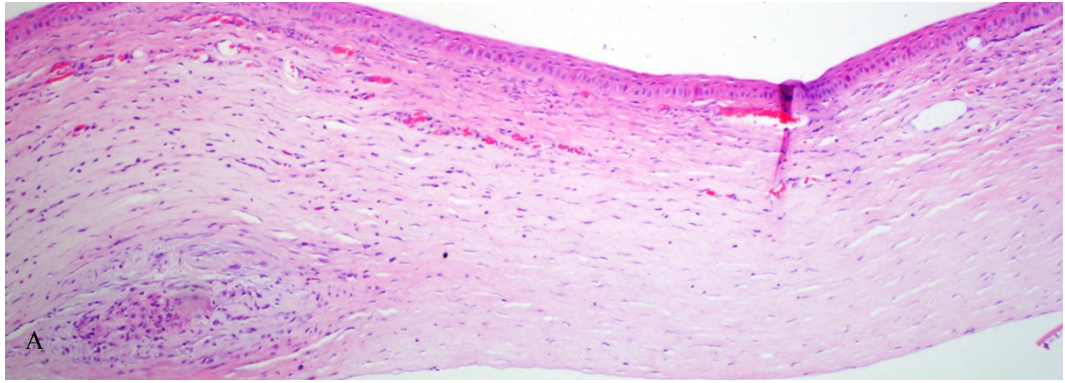
Şekil 4: Enjeksiyonlar sonrası yedinci günde KNV azalma yüzdeleri ve Mann Whitney U testi ile p değerleri: Bevacizumab ve Anti-Human VEGF GU01, KNV'yi kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaltmakta. Bevacizumab ve Anti-Human VEGF GU01 tedavilerinin etkinliği arasında anlamlı bir fark izlenmemektedir.



Resim 3: Kontrol (A,B), bevacizumab (C,D) ve biyobenzer (D,E) gruplarındaki ameliyat mikroskobu görüntüleri: İlk olarak sütürasyon sonrası 1. Haftada sütür alınır alınmaz alınan KNV görüntüleri (A,C,E). Subkonjonktival enjeksiyonlardan 1 hafta alınan kornea görüntülerinde bevacizumab ve biyobenzer gruplarında kontrol grubuna göre KNV'de anlamlı miktarda azalma izlenmekte (B,D,F). Bevacizumab ve Anti-Human VEGF GU01 tedavileri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark izlenmemektedir.

4.2 HİSTOLOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Hematoksilen eozin boyamasında kontrol grubunda çok sayıda damar yapıları ve içinde eritrosit kümeleri izlenirken, bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında çok az damar oluşumları ve eritrositler izlenmektedir (resim 3). CD31 ile İmmunhistokimyasal değerlendirmede kontrol grubu da dahil olmak üzere, boyanma düzeyleri yeterli olmadığından gruplar arasında boyanma farklılığını değerlendirebilecek veri elde edilememiştir .



Resim 4: Kontrol (A), bevacizumab (B) ve biyobenzer (C) gruplarındaki, sütür hizasında oluşan skar görünümü ve limbal vasküler ağ. Kontrol grubunda çok sayıda damar yapıları ve içinde eritrosit kümeleri izlenirken, bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında çok az damar oluşumları ve eritrositler izlenmektedir.

5 TARTIŞMA

Biyobenzer terimi biyolojik ajanlara yüksek oranda benzeyen ancak etki gücü, güvenilirliği ve saflığı özdeş olmayan maddeler için kullanılmaktadır (232-234). Biyobenzer ilaçlar dünya çapında hastaların ilaca ulaşımını kolaylaştırmakta ve bu sayede hastalıklarla mücadelede daha başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Küçük moleküllü ilaçların kopyalanması tam olarak yapılabilmektedir. Ancak biyobenzer ilaçların üretimi daha kompleks bir süreçtir. Üretim aşamasındaki küçük bir yapısal farklılık ilacın etkisi ve güvenilirliğinde anlamlı değişikliklere neden olabilmektedir (233, 234).

İki somatik hücre sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması anlamına gelen, monoklonal antikor üretiminde önemli bir dönüm noktası olan hibridoma yöntemi, 1975 yılında Georges Köhler ve Cesar Milstein tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem, koyun alyuvarları ile immünize edilen dalak hücreleri ile antikor sentezleyemeyen fare myeloma hücrelerinin virüs aracılığıyla birleştirilmeleri sonucunda, sadece alyuvarlara karşı antikor sentezledikleri ve devamlı üreyebildikleri gözlemlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Sonraki çalışmalarda virüs çalışmalarındaki verimsizlik nedeniyle kanser (myeloma) hücrelerinden yararlanılmıştır. Bu yöntemde immünize fare dalak B lenfosit hücresiyle, myeloma hücreleri birleştirilerek sonsuz sayıda çoğalan ve sonsuz sayıda, antijene spesifik monoklonal antikor üreten hibrid hücreler oluşturulmaktadır. Hibridoma tekniği, monoklonal antikor üretiminde bu güne kadar kullanılan en etkili yöntemlerden biridir. Bu yöntem araştırmaya yönelik ve

tanısal materyaller olarak kullanılan monoklonal antikörlerin geliştirilmesinde birçok ticari firma tarafından rutin olarak kullanılmaktadır (235, 236). Biz de bu çalışmamızda üniversitemizin immünoloji laboratuvarında hibridoma yöntemiyle üretilen, potansiyel biyobenzer bevacizumab Anti-Human VEGF GU01 ile bevacizumabın, deneysel KNV modelinde etkisini karşılaştırdık.

Bevacizumab, ticari olarak 4 ml'lik prezenvarsız tek şişe olarak bulunmakta, oküler kullanımlar için bu şişelerden insülin enjektörlerine küçük dozlar hazırlanmaktadır. Bu hazırlama aşamasındaki aksaklıklar dünyada farklı bölgelerde mikrobiyal kontaminasyona, endoftalmi salgınlarına ve ağır görme kayıplarına yol açmıştır (16, 237-240). Ancak farklı olarak oküler kullanım için hazırlanan bevacizumabın enfeksiyon riskini arttırmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (241, 242). Bu konuda hala görüş birliği sağlanamamıştır. Biz bevacizumabın hazırlanma aşamasında ülkeler arasında bir standardizasyon olmadığı için, kontaminasyon ve enfeksiyon riskinin olduğunu, bu sebeple de oftalmik kullanımlar için bevacizumabın hazır ticari formlarının oluşturulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Amerika'da tek doz bevacizumabın oftalmik kullanımlar açısından hastalara maliyeti yaklaşık 50 dolarken, diğer anti-VEGF'lerin maliyeti 2000 doları bulmaktadır. Bu açıdan bakıldığında bevacizumab kullanımının yaygınlaşmasının, bu ilaç grubundaki harcamaları önemli oranda azaltma potansiyeli bulunmaktadır (243).

Biz de çalışmamızda, üniversitemizde hibridoma yöntemiyle kullanılarak üretilen, HiTrap Protein G HP klonu kullanılarak FPLC cihazında saflaştırılmış, bevacizumabla potansiyel biyobenzer olan, fare kökenli monoklonal İgG antikoru olan Anti-Human VEGF GU01'in KNV üzerine olan etkisini, bevacizumabla karşılaştırdık. Bevacizumab (%82,2) ve biyobenzer gruplarında (%83,6), kontrol grubuna göre (%24,6) anlamlı azalma izledik. Bu sonuçları histopatolojik bulgularla destekledik. Çalışmamızda bevacizumab ile Anti-Human VEGF GU01'in KNV geriletici etkilerini benzer bulduk ($p = 0,347$). Bu çalışma, Anti-Human VEGF GU01'in biyobenzer bevacizumab olarak geliştirilmesi çalışmalarını desteklemesi açısından önem taşımaktadır.

KNV tedavisiyle ilgili bir çok deneysel ve klinik çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda en çok bevacizumabın üzerinde durulmuştur.

İlk olarak 1998 yılında Yatoh ve arkadaşları, VEGF inhibisyonunun farelerde greft ömrünü uzattığını tespit etmişlerdir (139). Daha sonra bevacizumabın KNV'yi azaltıcı etkinliği, bir çok hayvan çalışmasıyla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda en çok kimyasal yanık ve sütür modelleri kullanılmıştır. İlk olarak Cogan 1949 yılında kimyasal yanık oluşturarak KNV modelleri oluşturmuştur (244). 1985 yılında Williams ve arkadaşları, tavşanlarda KNV sütür modelini tanımlamışlardır (245). Ayrıca korneal mikrocep ve intrastromal proanjiyojenik faktör enjeksiyonu modelleri de mevcuttur. Sütür modelinin diğer yöntemlerden avantajı gerçeğe en yakın model olmasıdır (246). Biz de bu sebeple çalışmamızda sütür ile indüklenmiş KNV modelini kullandık.

KNV tedavisi seçiminde damarların matürasyon derecesi önemli olmaktadır. Matür damarların geliştiği durumlarda, ilk olarak Pillai ve arkadaşlarının raporladığı, ince iğne koterizasyon yöntemi gibi cerrahi yöntemlerin daha etkili olduğu düşünülmektedir (216, 247). Farmakolojik tedavi aktif damar oluşumu sırasında daha etkili olmaktadır. Cursiefen ve arkadaşları, klinik olarak KNV gelişiminden iki hafta sonra damarların %80'inin perisitlerle çevrildiğini göstermiştir. Perisitlerle çevrili damarların farmakolojik ajanlara duyarlılığı azalmaktadır (126). Lin ve arkadaşları, tavşanlarda cerrahi olarak limbal yetmezlik oluşturdukları çalışmalarında subkonjonktival 2,5 mg bevacizumab tedavisine cerrahiden hemen sonra, bir hafta sonra ve bir ay sonra başlamış ve tedaviyi haftada iki kez olacak şekilde bir ay boyunca tekrarlamışlardır. Bu çalışmalarında tedaviye hemen ve 1 hafta sonra başladığı gruplarda bevacizumabın etkili olduğunu, tedaviye 1 ay sonra başlanan grupta bevacizumabın etkisiz olduğunu göstermişlerdir (247). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda tedavi etkinliği, KNV oluşumundan sonraki erken dönemde, karşılaştırılması planlandı. Birinci haftada, sütür alındıktan hemen sonra, bevacizumab ve Anti-Human VEGF GU01 enjeksiyonları yapıldı ve ikinci hafta sonunda %80'in üzerinde KNV alanında gerileme izlendi.

Bevacizumab KNV tedavisinde subkonjonktival, topikal veya intrastromal yolla uygulanabilmektedir. Papatianassiou ve arkadaşlarının yaptıkları meta analiz çalışmasında, hem subkonjonktival hem de topikal tedavinin KNV'yi anlamlı miktarda geriletmediğini gösterilmiştir (248). Özdemir ve

arkadaşları, ratlarda subkonktival ve topikal bevacizumabın etkinliğini karşılaştırmış ve iki yöntemde de KNV'de anlamlı ve benzer azalma gözlemlemişlerdir (249). Dastjerdi ve arkadaşları, farelerde topikal ve subkonjonktival bevacizumabın etkinliklerini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada topikal yöntemin etkisinin subkonjonktival yönteme göre daha yüzeysel olduğu bulunmuştur (250). Ancak Kim ve arkadaşlarının ratlarda yaptıkları benzer bir çalışmada, topikal yöntem subkonjonktival yöntemden daha üstün bulunmuştur (251). Hashemian bevacizumabı bir olguda intrastromal olarak kullanmış ve KNV'de dramatik bir gerileme izlemiştir (252). Mackenzie bir olguda bevacizumab ile ıslatılmış korneal shield kullanmış ve 11 haftalık tedavisi sonrası bu yöntemin KNV'yi geriletmediğini raporlamıştır (253). Topikal yöntemde sağlıklı kornea epitelinin sıkı bağlantıları 149 kda'lık bevacizumab gibi büyük moleküllerin geçişine engel olabilmektedir (254). Fakat neovaskülarizasyon epitel bağlantılarını bozmakta, bu durum ilaç penetrasyonunu kolaylaştırabilmektedir (255). Nomoto ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, tavşanlarda subkonjonktival 1,25 mg bevacizumab enjeksiyonunun iris ve siliyer cisimdeki yarı ömrünü 1,8-2,8 hafta arası bulmuşlar. Aynı çalışmada subkonjonktival, topikal ve intravitreal bevacizumabın farmakokinetik özellikleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda topikal uygulamanın emiliminin çok düşük olduğu gösterilmiş ve oküler neovasküler hastalıklarda topikal tedavinin etkisiz olabileceği yorumlanmıştır (256). Ancak bu çalışma tavşanların sağlıklı gözlerinde yapılmış olduğu için topikal uygulamanın ilaç penetrasyonunun düşük olduğunu

düşünmekteyiz. KNV’de epitel bütünlüğü bozulduğu için topikal uygulamada da ilaç etkinliğinin olabileceğini düşünmekteyiz. Biz çalışmalarda daha yaygın kullanımı olması sebebiyle subkonjonktival tedavi yöntemini kullandık. Ancak KNV’de Anti-Human VEGF GU01’in, intrastromal ve topikal olarak da, kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu konuyla ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KNV’de subkonjonktival bevacizumabın dozajı ve kullanım sıklığı ile henüz bir görüş birliği sağlanamamıştır. Acar ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada 24 KNV’li hastada tek doz 2,5 mg ve 5 mg subkonjonktival bevacizumab kullanmış. İki dozda da KNV’de anlamlı ve benzer bir gerileme saptamıştır (257). Hashemian ve arkadaşları, 100 tane rat üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 1 mg, 5 mg ve 25 mg subkonjonktival bevacizumab tedavisinin KNV’yi geriletici etkisini benzer bulmuşlardır (258). Biz çalışmamızda tedavi dozumuzu 2,5 mg olarak belirledik. Bu dozla hem bevacizumabla, hem Anti-Human VEGF GU01’le, KNV’de etkin ve benzer bir azalma izledik.

KNV’de bevacizumabın etkisini değerlendiren insan çalışmalarının sayıları artmaktadır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalardan biri Türkiye’de yapılmıştır. Erdurmuş ve arkadaşları, 2007 yılında 2 hastada subkonjonktival 2,5 mg tek doz bevacizumabın etkisini incelemiş ve 1 hastada dramatik iyileşme izlemişlerdir (259).

Petsoglou ve arkadaşları, bu konuyla ilgili ilk randomize, plasebo kontrollü, çift kör çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Bevacizumab’ın etkisi,

limbustan en az 2 mm korneaya doğru ilerlemiş, yeni gelişmiş 30 KNV'li hastada değerlendirilmiştir . Altı aydan uzun süredir var olan KNV'li hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Hastalara aylık olarak, 3 doz, 2,5 mg, subkonjonktival bevacizumab veya saline enjeksiyonu uygulanmıştır. Üç ayın sonunda KNV alanı karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda bevacizumab alan 15 hastada KNV alanı ortalama %36 azalırken, salin alan 15 hastada KNV alanı ortalama %90 oranında artmış bulunmuştur (p = 0,007). Subkonjonktival bevacizumab alan gruptaki 10 hastada, KNV alanında, ortalama %92 oranında azalma izlenmiştir. Ancak görme keskinliklerinde iki grup arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (260).

Belghmaidi ve arkadaşları, 112 kornea nakli planlanan KNV'li hastada prospektif olarak KNV alanlarını takip etmiştir. Hastaların hepsine topikal steroid verilmiştir. Hastaların %29'una subkonjonktival bevacizumab, %22'sine intrastromal bevacizumab enjeksiyonları uygulanmıştır. KNV alanının total kornea alanına oranı 120. günde ortalama %45'ten (minimum %16- maksimum %82) %28'e (minimum 0-maksimum %69) gerilemiştir. Ancak görme keskinliğinde anlamlı bir gelişme izlenmemiştir (261).

KNV tedavilerinin görme keskinliği üzerine olan etkisi tartışma konusudur. Bachmann ve arkadaşlarının 11 adet makaleyi derledikleri çalışmalarında, 131 hastanın 142 gözünde, KNV tedavisinin görme keskinliği üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların 10'unda bevacizumab, birinde aganirsen kullanılmıştır. Hastalar ortalama 2,8 ile 8,3 ay arasında takip edilmiştir. Hastaların yaş ortalamaları 36 ile 58 arasında bulunmuştur. Bu

çalışmaların on tanesinde, KNV’de anlamlı azalma izlenmesine karşın, sadece 4 tanesinde görme keskinliğinde anlamlı artış izlenmiştir (262).

Kornea transplantasyonu, % 90’lık başarı oranıyla tüm organ nakilleri içerisinde en başarılı olan yöntemdir (263). Cerrahi, inflame veya vaskülarize bir alıcı yatakta gerçekleştirildiğinde, başarı oranları %20-40’a kadar düşebilmektedir (53). Fasciani ve arkadaşları, 27 yüksek riskli KNV’li hastanın 27 gözünde, yalnızca subkonjonktival ve intrastromal + subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonlarının greft ömrü üzerine olan etkisi incelemiştir. Kornea yüzeyinin en az 2/3 ünü kapsayan KNV’li hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar randomize olarak iki gruba ayrılmıştır (olgu grubu: 8 post herpetik löküm 6 greft rejeksiyonu, kontrol grubu: 6 post herpetik lökom+ 7 greft rejeksiyonu). Olgu grubundaki hastalara, cerrahiden önce, aylık olarak toplam 3 doz 5 mg bevacizumab uygulanmıştır. Son enjeksiyondan ortalama 6,3 ay sonra, 9 hastaya penetran, 5 hastaya lameller cerrahi uygulanmıştır. Cerrahi sonunda hastalara 5 mg subkonjonktival bevacizumab uygulanmıştır. Kontrol grubunda 7 hastaya penetran, 6 hastaya lameller cerrahi uygulanmıştır. Cerrahi sonrası hastalara, 1 ay topikal 3x1 ve oral 25 mg deksametazon verilmiştir. Hastalar cerrahiden sonra ortalama 26 ay takip edilmiştir. Bu süre sonunda olgu grubunda hiçbir hastada rejeksiyon bulgusu görülmezken, kontrol grubundaki 6 hastada, ortalama 3,8 ay sonra steroid tedavisine yanıt vermeyen greft rejeksiyonu görülmüştür (264). Dekaris ve arkadaşları, yüksek riskli gözlerde, penetran keratoplasti sonrası, subkonjonktival ve topikal bevacizumabın greft ömrüne olan etkisini

değerlendirmişler. Elli hastanın elli gözüne (2 SJS, 5 kimyasal yanık, 7 post travmatik vaskülarize lökom, 19 greft rejeksiyonu, 11 post enfeksiyöz vaskülarize lökom, 6 kornea ülseri) penetran keratoplasti uygulanmıştır. 10 hastaya ek olarak otolog kök hücre nakli veya amniyontik membran transplantasyonu uygulanmıştır. Bütün hastalara cerrahi sonrası 25 mg subkonjonktival bevacizumab uygulanmıştır. İki kadrandan fazla NV bulunan gözlerde, 12 haftaya kadar, topikal bevacizumab 25 mg/ml 12 haftaya kadar kullanılmıştır. Üç yıllık takip sonunda, hastaların %70'inde greft saydamlığı korunmuştur. Sadece 1 hastada iyileşmeyen epitel defekti izlenmiştir (265). Bu çalışmalar ışığında yüksek riskli hastalarda bevacizumab kullanımının yaygınlaşmasının, kornea transplantasyonunda başarı oranlarını arttırabileceğini düşünmekteyiz. Faz çalışmaları tamamlandığında, kendi çalışmamızda KNV'yi geriletici etkisi bevacizumabla benzer bulunan Anti-Human VEGF GU01'in, üretimi ve yaygınlaşması, ilaç teminini ve kullanımını kolaylaştırabilecek ve yüksek riskli penetran keratoplastilerde cerrahi başarı oranlarını arttırabilecektir.

VEGF reseptörlerinin kornea endotel hücrelerinden de eksprese edildiği gösterilmiştir (266). Bu sebeple KNV tedavisinde kullanılan bevacizumabın kornea endoteline sitotoksik olabileceği ile ilgili kaygılar bulunmaktadır. Lichtinger ve arkadaşları, 10 hastada, 1,25 mg subkonjonktival ve intrastromal kombine bevacizumab enjeksiyonlarının, kornea endoteline olan etkilerini incelemiştir. Hastalara 4-6 hafta arayla toplam üçer enjeksiyon uygulanmış. Birinci, üçüncü ve altıncı ayda, konfokal mikroskopla endotel sayıları ve

morfolojileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, bütün takiplerde endotel sayısı ve endotel morfolojisinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (267).

Topikal bevacizumab uygulamasının kornea epiteline olan etkisi tartışma konusudur. Kim ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, 7 hastanın 10 gözüne, 1 ay boyunca 12,5 mg(%12,5) topikal bevacizumab 2x1 uygulamışlardır . Bir ayın sonunda 6 gözde epitelyopati izlenmiştir (8). Koenig ve arkadaşları, 27 hastanın 30 gözüne, topikal 5 mg/ml bevacizumab 5x1'i 1 yıl boyunca uygulamışlardır. Bu çalışmada sadece 2 hastanın iki gözünde persistan epitel defekti izlenmiştir. Bir hastada spontan kornea perforasyonu gerçekleşmiştir (268). VEGF'in nörotrofik etkilerinin gösterilmesinden sonra oküler yüzeyde VEGF nörolizasyonunun nörotrofik keratite sebep olabileceği düşünülmüştür (269). Ancak topikal bevacizumabla yapılan geniş sayılı insan çalışmalarında topikal uygulamanın güvenilir olduğu görülmektedir (264, 265). Bu konuyla ilgili doz karşılaştırmalı klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Biz çalışmamızda Anti-Human VEGF GU01'i subkonjonktival olarak uyguladık ve hiçbir gözde epitel defekti izlemedik.

Bevacizumab'ın KNV'yi geriletici etkisinin, diğer anti-VEGF ilaçlarla veya farklı ilaçlarla karşılaştırıldığı bir çok deneysel çalışma vardır. Sella ve arkadaşları, ratlarda kimyasal yanık modelinde 25mg/ml, 2x1, 1 haftalık topikal bevacizumab ve 25mg/ml, 2x1, 1 haftalık topikal aflibercept tedavisinin etkinliklerini karşılaştırmıştır. Çalışmada topikal aflibercept, bevacizumabdan etkili bulunmuş ($p < 0,001$) (214). Gal-or ve arkadaşları, ratlarda kimyasal yanık

modelinde subkonjonktival 25mg/ml 0,08 ml aflibercept ile subkonjonktival 25mg/ml 0,05 ml bevacizumabı karşılaştırmıştır. Çalışmada subkonjonktival aflibercept bevacizumabdan etkili bulunmuştur ($p < 0,05$) (213). Kim ve arkadaşları, tavşanlarda korneal sütün modelinde 0,05 ml/0,5 mg Ranibizumab ile 0,05 ml/5 mg bevacizumabı karşılaştırmıştır. Çalışmada iki ilacın etkisi benzer bulunmuştur ($p = 0,012$) (207). Park ve arkadaşları, tavşanlarda korneal sütün modelinde, subkonjonktival 0,05ml/5 mg bevacizumab ile subkonjonktival 0,05ml/0,25 mg takrolimus ve topikal 5mg/5ml 4x1 takrolimus karşılaştırmıştır. Çalışmada topikal ve subkonjonktival takrolimusun etkisi bevacizumab ile benzer bulunmuştur (270). Akar ve arkadaşları, ratlarda kimyasal yanık modelinde subkonjonktival 0,05 ml/1,25 mg bevacizumab ile subkonjonktival 0,05 ml/0,5 mg ranibizumabı ve 0,05 ml/0,15 mg pegaptanib sodyumu karşılaştırmışlardır. Çalışmada 3 ilacın etkisi de benzer bulunmuştur ($p < 0,05$) (190). Yoo ve arkadaşları, tavşanlarda korneal sütün modelinde subkonjonktival 0,1 ml/2,5 mg bevacizumab ile subkonjonktival 0,1 ml/0,25 mg ve 0,1 ml/2,5 mg tocilizumabı karşılaştırmışlardır. Çalışmada 2,5 mg tocilizumab ile bevacizumabın etkisi benzer bulunmuştur ($p < 0,05$) (271). Ko ve arkadaşları, tavşanlarda korneal sütün modelinde subkonjonktival 0,1ml/2,5 mg ve topikal 5mg/ml, 2x1, bevacizumab ile subkonjonktival 0,1ml/0,25 mg ve topikal 0,5mg/ml, 2x1, sunitibi karşılaştırmışlar. Çalışmada sunitininin hem topikal hem subkonjonktival formu bevacizumabdan etkili bulunmuştur (272). Bu karşılaştırmalarla ilgili uzun süreli takipli klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bevacizumab KNV tedavisinde farklı yöntemlerle kombine olarak da kullanılmıştır. Elbaz ve arkadaşları, pediatrik hasta grubunda ince iğne diatermi ve adjuvan bevacizumab tedavilerinin etkinliklerini değerlendirmiştir. 9 hastanın 9 gözüne Pillai'nin tanımladığı tekniğe uygun olarak ince iğne diatermi uygulandıktan sonra, 25 mg/ml bevacizumab (damarların olduğu her kadrana yaklaşık 0,1 ml intrastromal ve subkonjonktival olarak) uygulanmıştır. Hastaların ortalama yaşı 8,4 (minimum 5-maksimumum 15), ortalama takip süresi 18,7 ay (minimum 5-maksimum 35) olarak belirtilmiştir. Hastaların üçünde herpes simpleks keratiti, üçünde komplet kornea anestezisi ve birinde blefarokeratokonjonktivit olduğu izlenmiştir. İki hastaya da HSV keratiti ve dermoid tümörden dolayı kornea nakli yapılmıştır. Sonuç olarak KNV'de 9 hastanın 8'inde komplet, birinde parsiyel regresyon izlenmiş. Tedavi öncesi (0,66 logMAR) ve tedavis sonrası (0,50 logMAR) görme keskinliklerinde anlamlı fark izlenmiş ($p < 0,05$) (273). You ve arkadaşları, konvansiyonel tedaviye yanıt vermemiş 12 hastanın 12 gözünde, fotodinamik tedavi ile 0,1 ml /2,5 mg subkonjonktival bevacizumab kombinasyonunun etkinliğini değerlendirmiştir. Hastaların ortalama yaşı 60 (minimum 20-maksimum84) ortalama takip süresi 15 ay (minimum 12- maksimum 19 ay) olarak belirtilmiştir. KNV etiolojisinde hastaların beşinde HSV keratiti, dördünde kornea ülser, birinde kornea perforasyonu, birinde büllöz keratopati, birinde korneada yabancı cisim olduğu, KNV'lerin 8'inin eski, 4'ünün yeni olduğu belirtilmiştir. Sonuçta 8 hastada (%66) komplet, 3 hastada (%25) parsiyel oklüzyon izlenmiştir. Bir hastada (%8) total

revaskularizasyon oluşmuştur. Bir hastada hafif stromal bulanıklık dışında başka bir oküler komplikasyon izlenmemiştir (274). KNV’de kombinasyon tedavilerinin popülaritesi her geçen gün artmaktadır.

6 SONUÇ

Günümüze kadar KNV tedavisi için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda en çok bevacizumab üzerinde durulmuştur. Biz çalışmamızda üniversitemizde üretilen potansiyel biyobenzer bevacizumab olan Anti-Human VEGF GU01’in, KNV geriletici etkisini bevacizumabla karşılaştırdık. Her iki ilaç grubunda, kontrol grubuna göre KNV’de anlamlı gerileme izledik. Çalışmamızda bevacizumab ile Anti-Human VEGF GU01’in, KNV geriletici etkilerini benzer bulduk. Bu çalışma Anti-Human VEGF GU01’in KNV geriletici etkisinin gösterildiği ilk deneysel çalışmadır. Bu veriler, Anti-Human VEGF GU01’in biyobenzer bevacizumab olarak üretilmesi çalışmalarının devam etmesini desteklemektedir. İleri preklinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7 KAYNAKLAR

1. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Surv Ophthalmol.* 2012;57(5):415-29.
2. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001;12(4):242-9.
3. Ferrari G, Dastjerdi MH, Okanobo A, Cheng SF, Amparo F, Nallasamy N, et al. Topical ranibizumab as a treatment of corneal neovascularization. *Cornea.* 2013;32(7):992-7.
4. 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(9):2514-22.
5. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(1):18-22.
6. Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, et al. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J.* 2000;19(7):1525-33.
7. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(2):328-35.
8. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology.* 2008;115(6):e33-8.
9. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2006;113(3):363-72 e5.
10. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* 2006;113(10):1695 e1-15.
11. Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, Haddad ZA, El Haibi CP, Nouredin BN. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(1):1-9.
12. Figueroa MS, Contreras I, Noval S, Arruabarrena C. Results of bevacizumab as the primary treatment for retinal vein occlusions. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(8):1052-6.
13. Yeung SN, Paton KE, Waite C, Maberley DA. Intravitreal bevacizumab for iris neovascularization following proton beam irradiation for choroidal melanoma. *Can J Ophthalmol.* 2010;45(3):269-73.
14. Hasanreisoglu M, Weinberger D, Mimouni K, Luski M, Bourla D, Kramer M, et al. Intravitreal bevacizumab as an adjunct treatment for neovascular glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2009;19(4):607-12.

15. <http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/Biosimilars-of-bevacizumab> 2016 [
16. Falavarjani KG, Modarres M, Hashemi M, Parvaresh MM, Naseripour M, Zare-Moghaddam A, et al. Incidence of acute endophthalmitis after intravitreal bevacizumab injection in a single clinical center. *Retina*. 2013;33(5):971-4.
17. Frost BA, Kainer MA. Safe preparation and administration of intravitreal bevacizumab injections. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2238.
18. Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK. Experimental corneal neovascularization: biomicroscopic, angiographic, and morphologic correlation. *Cornea*. 1985;4(1):35-41.
19. Yaylali V, Ohta T, Kaufman SC, Maitchouk DY, Beuerman RW. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea*. 1998;17(6):646-53.
20. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea*. 1998;17(6):611-3.
21. Hill JC. The relative importance of risk factors used to define high-risk keratoplasty. *Ger J Ophthalmol*. 1996;5(1):36-41.
22. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006;443(7114):993-7.
23. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2006;104:264-302.
24. Cursiefen C, Chen L, Saint-Geniez M, Hamrah P, Jin Y, Rashid S, et al. Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11405-10.
25. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol*. 1998;43(3):245-69.
26. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, Goren MB, Rapuano CJ, Laibson PR, et al. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea*. 1995;14(6):604-9.
27. Roodhooft JM. Leading causes of blindness worldwide. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 2002(283):19-25.
28. Gundogan FC, Kocak N, Akyildiz R, Yolcu U, Ilhan A, Aydin I, et al. The prevalence and causes of visual impairment in young Turkish men. *Pak J Med Sci*. 2015;31(4):837-42.
29. Hashemi H, Khabazkhoob M, Emamian MH, Shariati M, Yekta A, Fotouhi A. The frequency of occurrence of certain corneal conditions by age and sex in Iranian adults. *Cont Lens Anterior Eye*. 2015;38(6):451-5.
30. Power WJ, Tugal-Tutkun I, Foster CS. Long-term follow-up of patients with atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*. 1998;105(4):637-42.
31. Centifanto-Fitzgerald YM, Yamaguchi T, Kaufman HE, Tognon M, Roizman B. Ocular disease pattern induced by herpes simplex virus is genetically determined by a specific region of viral DNA. *J Exp Med*. 1982;155(2):475-89.

32. Kremer I, Cohen EJ, Eagle RC, Jr., Udell I, Laibson PR. Histopathologic evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba* keratitis. *CLAO J*. 1994;20(1):45-8.
33. Lopez JS, Price FW, Jr., Whitcup SM, Li Q, de Smet M, Chan CC. Immunohistochemistry of Terrien's and Mooren's corneal degeneration. *Arch Ophthalmol*. 1991;109(7):988-92.
34. Gornig H, Kohlmann H, Merrem C. [Clinical, secretary and immunologic studies in Terrien disease]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1988;193(5):465-70.
35. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*. 2001;20(1):1-13.
36. Wuest TR, Carr DJ. VEGF-A expression by HSV-1-infected cells drives corneal lymphangiogenesis. *J Exp Med*. 2010;207(1):101-15.
37. 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(20):9828-35.
38. Lee S, Zheng M, Kim B, Rouse BT. Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1105-11.
39. Papas E. Corneal vascularisation and contact lenses. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2006;81(6):309-12.
40. Papas EB. The role of hypoxia in the limbal vascular response to soft contact lens wear. *Eye Contact Lens*. 2003;29(1 Suppl):S72-4; discussion S83-4, S192-4.
41. Sack RA, Sathe S, Beaton A. Tear turnover and immune and inflammatory processes in the open-eye and closed-eye environments: relationship to extended wear contact lens use. *Eye Contact Lens*. 2003;29(1 Suppl):S80-2; discussion S3-4, S192-4.
42. Dumbleton KA, Chalmers RL, Richter DB, Fonn D. Vascular response to extended wear of hydrogel lenses with high and low oxygen permeability. *Optom Vis Sci*. 2001;78(3):147-51.
43. Liesegang TJ. Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J*. 2002;28(1):12-27.
44. Mieval PA, Bonazzi A, Jiang H, Dunn MW, Schwartzman ML. The effect of hypoxia on endogenous corneal epithelial eicosanoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(8):2170-6.
45. Yan J, Zeng Y, Jiang J, Zhou J, Yin Z, Wang Z, et al. The expression patterns of vascular endothelial growth factor and thrombospondin 2 after corneal alkali burn. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;60(1):105-9.
46. Edelman JL, Castro MR, 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(6):1112-23.
47. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, Stechschulte SU, Kirchhof B, Dartt DA, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(1):117-23.

48. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res.* 2009;34(2):85-91.
49. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, et al. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol.* 2008;86(3):322-8.
50. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan AH. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea.* 2008;27(3):357-62.
51. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet.* 2012;379(9827):1749-61.
52. Williams KA LM, Bartlett CM, et al. Corneal Graft Registry 2007 Report. Adelaide, Australia: Flinders University Press; 2007:69–70. <http://dSPACE.flinders.edu.au/dSPACE/handle/2328/1723> 2007 [
53. The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol.* 1992;110(10):1392-403.
54. Dana MR. Angiogenesis and lymphangiogenesis-implications for corneal immunity. *Semin Ophthalmol.* 2006;21(1):19-22.
55. Cursiefen C, Martus P, Nguyen NX, Langenbacher A, Seitz B, Kuchle M. Corneal neovascularization after nonmechanical versus mechanical corneal trephination for non-high-risk keratoplasty. *Cornea.* 2002;21(7):648-52.
56. Cursiefen C, Wenkel H, Martus P, Langenbacher A, Nguyen NX, Seitz B, et al. Impact of short-term versus long-term topical steroids on corneal neovascularization after non-high-risk keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239(7):514-21.
57. Dietrich T, Bock F, Yuen D, Hos D, Bachmann BO, Zahn G, et al. Cutting edge: lymphatic vessels, not blood vessels, primarily mediate immune rejections after transplantation. *J Immunol.* 2010;184(2):535-9.
58. Ling S, Qi C, Li W, Xu J, Kuang W. Crucial role of corneal lymphangiogenesis for allograft rejection in alkali-burned cornea bed. *Clin Exp Ophthalmol.* 2009;37(9):874-83.
59. Patel SP, Dana R. Corneal lymphangiogenesis: implications in immunity. *Semin Ophthalmol.* 2009;24(3):135-8.
60. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(8):2666-73.
61. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653-60.

62. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(4):331-71.
63. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation.* 2003;108(21):2613-8.
64. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
65. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987;235(4787):442-7.
66. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(3):208-48.
67. Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Bernasconi S, et al. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood.* 2002;100(3):905-11.
68. Lutun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2(5):407-16.
69. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):346-55.
70. Jackson C. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11(3):295-9.
71. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9(6):685-93.
72. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, Stulting RD, Sugar A, Fink NE, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology.* 1994;101(9):1536-47.
73. Volker-Dieben HJ, D'Amario J, Kok-van Alphen CC. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1987;15(1):11-8.
74. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267(16):10931-4.
75. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol.* 2002;21(1):33-49.
76. C M. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1948;68:137-80.
77. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219(4587):983-5.
78. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851-8.

79. Dastjerdi MH, Al-Arfaj KM, Nallasamy N, Hamrah P, Jurkunas UV, Pineda R, 2nd, et al. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(4):381-9.
80. Bock F, Konig Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246(2):281-4.
81. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991;47(3):211-8.
82. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(1):1-29.
83. Aiello LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl.* 2000;77:S113-9.
84. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:97-132.
85. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* 1996;149(1):293-305.
86. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* 1990;50(6):1774-8.
87. Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2008;9(12):1190-221.
88. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992;255(5047):989-91.
89. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001;26(1):25-35.
90. Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization. *Cornea.* 2000;19(4):526-33.
91. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 2004;113(7):1040-50.

92. Rogers MS, Birsner AE, D'Amato RJ. The mouse cornea micropocket angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2007;2(10):2545-50.
93. Kojima T, Chang JH, Azar DT. Proangiogenic role of ephrinB1/EphB1 in basic fibroblast growth factor-induced corneal angiogenesis. *Am J Pathol.* 2007;170(2):764-73.
94. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Expression of basic fibroblast growth factor in rabbit corneal alkali wounds in the presence and absence of granulocytes. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005;83(3):374-8.
95. Hayashi N, Nakayasu K, Okisaka S. [Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factor through corneal neovascularization in vivo and in vitro]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 1996;100(8):587-91.
96. 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(2):323-33.
97. Kurokawa M, Doctrow SR, Klagsbrun M. Neutralizing antibodies inhibit the binding of basic fibroblast growth factor to its receptor but not to heparin. *J Biol Chem.* 1989;264(13):7686-91.
98. Kato T, Kure T, Chang JH, Gabison EE, Itoh T, Itohara S, et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett.* 2001;508(2):187-90.
99. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
100. 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(11):2517-24.
101. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(1):1-19.
102. Azhagiya Singam ER, Rajapandian V, Subramanian V. Molecular dynamics simulation study on the interaction of collagen-like peptides with gelatinase-A (MMP-2). *Biopolymers.* 2014;101(7):779-94.
103. Gioia M, Monaco S, Van Den Steen PE, Sbardella D, Grasso G, Marini S, et al. The collagen binding domain of gelatinase A modulates degradation of collagen IV by gelatinase B. *J Mol Biol.* 2009;386(2):419-34.
104. Dean RA, Butler GS, Hamma-Kourbali Y, Delbe J, Brigstock DR, Courty J, et al. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol Cell Biol.* 2007;27(24):8454-65.
105. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol.* 2005;169(4):681-91.

106. Kajanne R, Miettinen P, Mehlem A, Leivonen SK, Birrer M, Foschi M, et al. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *J Cell Physiol.* 2007;212(2):489-97.
107. Page-McCaw A. Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(1):14-23.
108. Chang JH, Javier JA, Chang GY, Oliveira HB, Azar DT. Functional characterization of neostatins, the MMP-derived, enzymatic cleavage products of type XVIII collagen. *FEBS Lett.* 2005;579(17):3601-6.
109. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27872-9.
110. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11721-6.
111. Shao XJ, Chi XY. Influence of angiostatin and thalidomide on lymphangiogenesis. *Lymphology.* 2005;38(3):146-55.
112. Brideau G, Makinen MJ, Elamaa H, Tu H, Nilsson G, Alitalo K, et al. Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res.* 2007;67(24):11528-35.
113. Cao R, Wu HL, Veitonmaki N, Linden P, Farnebo J, Shi GY, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5728-33.
114. 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(2):212-7.
115. 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(2):315-28.
116. Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, et al. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6367-72.
117. 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(13):2759-67.
118. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8):3566-70.
119. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45400-7.

120. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):214-21.
121. Dixon JM, Lawaczeck E. Corneal vascularization due to contact lenses. *Arch Ophthalmol.* 1963;69:72-5.
122. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(7):834-8.
123. Gilbert CE, Wood M, Waddel K, Foster A. Causes of childhood blindness in east Africa: results in 491 pupils attending 17 schools for the blind in Malawi, Kenya and Uganda. *Ophthalmic Epidemiol.* 1995;2(2):77-84.
124. Schwab L, Kagame K. Blindness in Africa: Zimbabwe schools for the blind survey. *Br J Ophthalmol.* 1993;77(7):410-2.
125. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, Becker MD, Volcker HE. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998;36(6):461-6.
126. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Kuchle M, Schlotzer-Schrehardt U. Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(1):101-6.
127. Gupta D, Illingworth C. Treatments for corneal neovascularization: a review. *Cornea.* 2011;30(8):927-38.
128. Lavergne G, Colmant IA. Comparative Study of the Action of Thiotepea and Triamcinolone on Corneal Vascularization in Rabbits. *Br J Ophthalmol.* 1964;48:416-22.
129. Ey RC, Hughes WF, Bloome MA, Tallman CB. Prevention of corneal vascularization. *Am J Ophthalmol.* 1968;66(6):1118-31.
130. Mayer W. Cryotherapy in corneal vascularization. *Arch Ophthalmol.* 1967;77(5):637-41.
131. Leigh AG. Treatment of gross corneal opacification by lamellar and annular lamellar keratoplasty. *Br J Ophthalmol.* 1955;39(11):641-6.
132. Ainslie D, Snelling MD, Ellis RE. Treatment of corneal vascularisation by strontium 90 beta plaque. *Clin Symp.* 1962;13:29.
133. Ainslie D, Snelling MD. Postoperative irradiation of corneal grafts. Its possible effect on the immunological reaction. *Lancet.* 1961;2(7209):954-6.
134. Duggan HE. Results using the strontium-90 beta-ray applicator on eye lesions. *J Can Assoc Radiol.* 1966;17(3):132-7.
135. Fraser H, Naunton WJ. Treatment of Non-Malignant Corneal Conditions with Radioactive Isotopes: A 5-Year Survey. *Br J Ophthalmol.* 1961;45(5):358-64.
136. Barron A, McDonald JE, Hughes WF. Long-term complications of beta-radiation therapy in ophthalmology. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1970;68:113-28.
137. Jones IS, Meyer K. Inhibition of vascularization of the rabbit cornea by local application of cortisone. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1950;74(1):102-4.

138. Deutsch TA, Hughes WF. Suppressive effects of indomethacin on thermally induced neovascularization of rabbit corneas. *Am J Ophthalmol.* 1979;87(4):536-40.
139. Yatoh S, Kawakami Y, Imai M, Kozawa T, Segawa T, Suzuki H, et al. Effect of a topically applied neutralizing antibody against vascular endothelial growth factor on corneal allograft rejection of rat. *Transplantation.* 1998;66(11):1519-24.
140. Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol.* 1992;110(3):405-7.
141. Han H, Son S, Son S, Kim N, Yhee JY, Lee JH, et al. Reducible Polyethylenimine Nanoparticles for Efficient siRNA Delivery in Corneal Neovascularization Therapy. *Macromol Biosci.* 2016.
142. Huang X, Han Y, Shao Y, Yi JL. Efficacy of the nucleotide-binding oligomerization domain 1 inhibitor Nodihit-1 on corneal alkali burns in rats. *Int J Ophthalmol.* 2015;8(5):860-5.
143. Rocha EM, Nominato LF, Reinach PS. Re: Cursiefen et al.: Aganirsen antisense oligonucleotide eye drops inhibit keratitis-induced corneal neovascularization and reduce need for transplantation: the I-CAN study (*Ophthalmology* 2014;121:1683-92). *Ophthalmology.* 2015;122(5):e28.
144. Cursiefen C, Viaud E, Bock F, Geudelin B, Ferry A, Kadlecova P, et al. Aganirsen antisense oligonucleotide eye drops inhibit keratitis-induced corneal neovascularization and reduce need for transplantation: the I-CAN study. *Ophthalmology.* 2014;121(9):1683-92.
145. Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, Yong-ping L, Hong-jie M, Ying Z, et al. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res.* 2008;33(8):653-60.
146. Lee SH, Kim KW, Joo K, Kim JC. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmol.* 2016;16:57.
147. Goktas S, Erdogan E, Sakarya R, Sakarya Y, Yilmaz M, Ozcimen M, et al. Inhibition of corneal neovascularization by topical and subconjunctival tigecycline. *J Ophthalmol.* 2014;2014:452685.
148. Koh CH, Lee HS, Chung SK. Effect of topical epigallocatechin gallate on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea.* 2014;33(5):527-32.
149. Senturk B, Cubuk MO, Ozmen MC, Aydin B, Guler MO, Tekinay AB. Inhibition of VEGF mediated corneal neovascularization by anti-angiogenic peptide nanofibers. *Biomaterials.* 2016;107:124-32.
150. Elbadawy HM, Mirabelli P, Xeroudaki M, Parekh M, Bertolin M, Breda C, et al. Effect of connexin 43 inhibition by the mimetic peptide Gap27 on corneal wound healing, inflammation and neovascularization. *Br J Pharmacol.* 2016;173(19):2880-93.
151. Kim HK, Choi JS, Lee SW, Joo CK, Joe YA. A Novel Peptide Derived from Tissue-Type Plasminogen Activator Potently Inhibits Angiogenesis and Corneal Neovascularization. *J Cell Biochem.* 2016.

152. Lee MY, Chung SK. Treatment of corneal neovascularization by topical application of ascorbic acid in the rabbit model. *Cornea*. 2012;31(10):1165-9.
153. Goktas S, Sakarya R, Erdogan E, Sakarya Y, Ozcimen M, Dursunoglu D, et al. Antiangiogenic effect of itraconazole on corneal neovascularization: a pilot experimental investigation. *Ophthalmic Res*. 2014;52(4):170-4.
154. Pradhan N, Guha R, Chowdhury S, Nandi S, Konar A, Hazra S. Curcumin nanoparticles inhibit corneal neovascularization. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(10):1095-106.
155. Uehara H, Das SK, Cho YK, Archer B, Ambati BK. Comparison of the Anti-angiogenic and Anti-inflammatory Effects of Two Antibiotics: Clarithromycin Versus Moxifloxacin. *Curr Eye Res*. 2016;41(4):474-84.
156. Yoshida J, Wicks RT, Zambrano AI, Tyler BM, Javaherian K, Grossman R, et al. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Injection of Fc-Endostatin, a Novel Inhibitor of Angiogenesis. *J Ophthalmol*. 2015;2015:137136.
157. Jousseaume AM, Beecken WD, Moromizato Y, Schwartz A, Kirchhof B, Poulaki V. Inhibition of inflammatory corneal angiogenesis by TNP-470. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(11):2510-6.
158. Li ZN, Yuan ZF, Mu GY, Hu M, Cao LJ, Zhang YL, et al. Inhibitory effect of polysulfated heparin endostatin on alkali burn induced corneal neovascularization in rabbits. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(2):234-8.
159. Amparo F, Sadrai Z, Jin Y, Alfonso-Bartolozzi B, Wang H, Shikari H, et al. Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):537-44.
160. Abbas A, Khan B, Feroze AH, Hyman GF. Thalidomide prevents donor corneal graft neovascularization in an alkali burn model of corneal angiogenesis. *J Pak Med Assoc*. 2002;52(10):476-82.
161. Lee HS, Chung SK. The effect of subconjunctival suramin on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*. 2010;29(1):86-92.
162. Kim JW, Chung SK. The effect of topical infliximab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*. 2013;32(2):185-90.
163. Cakmak H, Ergin K, Bozkurt G, Kocaturk T, Evlicoglu GE. The effects of topical everolimus and sunitinib on corneal neovascularization. *Cutan Ocul Toxicol*. 2016;35(2):97-103.
164. Guler M, Yilmaz T, Ozercan I, Elkiran T. The inhibitory effects of trastuzumab on corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol*. 2009;147(4):703-8 e2.
165. Cho WK, Kang S, Choi H, Rho CR. Topically administered gold nanoparticles inhibit experimental corneal neovascularization in mice. *Cornea*. 2015;34(4):456-9.
166. Henkind P. Hyperbaric Oxygen and Corneal Neovascularisation. *Lancet*. 1964;2(7364):836-8.

167. Wu PC, Liu CC, Chen CH, Kou HK, Shen SC, Lu CY, et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003;241(1):63-9.
168. Demir T, Celiker UO, Kukner A, Mogulkoc R, Celebi S, Celiker H. Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand*. 1999;77(4):386-90.
169. Olsen TW, Benegas NM, Joplin AC, Evangelista T, Mindrup EA, Holland EJ. Rapamycin inhibits corneal allograft rejection and neovascularization. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(11):1471-5.
170. Jousseaume AM, Kruse FE, Volcker HE, Kirchhof B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1999;237(11):920-7.
171. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S. Effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(1):154-8.
172. Doganay S, Firat PG, Cankaya C, Kirimlioglu H. Evaluation of the effects of resveratrol and bevacizumab on experimental corneal alkali burn. *Burns*. 2013;39(2):326-30.
173. Kuo CN, Chen CY, Chen SN, Yang LC, Lai LJ, Lai CH, et al. Inhibition of corneal neovascularization with the combination of bevacizumab and plasmid pigment epithelium-derived factor-synthetic amphiphile INTERACTION-18 (p-PEDF-SAINT-18) vector in a rat corneal experimental angiogenesis model. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):8291-305.
174. Tunik S, Nergiz Y, Keklikci U, Akkus M. The subconjunctival use of cetuximab and bevacizumab in inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012;250(8):1161-7.
175. Ahuja OP, Nema HV. Experimental corneal vascularization and its management. *Am J Ophthalmol*. 1966;62(4):707-10.
176. McDonald PR, Leopold IH, Vogel AW, Mulberger RD. Hydrocortisone (compound F) in ophthalmology; clinical and experimental studies. *AMA Arch Ophthalmol*. 1953;49(4):400-12.
177. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol*. 1983;101(4):640-3.
178. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(10):1954-62.
179. Ebrahim Q, Minamoto A, Hoppe G, Anand-Apte B, Sears JE. Triamcinolone acetonide inhibits IL-6- and VEGF-induced angiogenesis downstream of the IL-6 and VEGF receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(11):4935-41.
180. Murata M, Shimizu S, Horiuchi S, Taira M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(2):205-9.

181. Jorgensen KA, Stoffersen E. Hydrocortisone inhibits platelet prostaglandin and endothelial prostacyclin production. *Pharmacol Res Commun.* 1981;13(6):579-86.
182. Robin JB, Regis-Pacheco LF, Kash RL, Schanzlin DJ. The histopathology of corneal neovascularization. Inhibitor effects. *Arch Ophthalmol.* 1985;103(2):284-7.
183. Leopold IH, Purnell JE, Cannon EJ, Steinmetz CG, Mc DP. Local and systemic cortisone in ocular disease. *Am J Ophthalmol.* 1951;34(3):361-71.
184. Fel A, Aslangul E, Le Jeune C. [Eye and corticosteroid's use]. *Presse Med.* 2012;41(4):414-21.
185. Shakiba Y, Mansouri K, Arshadi D, Rezaei N. Corneal neovascularization: molecular events and therapeutic options. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2009;3(3):221-31.
186. Bell C, Lynam E, Landfair DJ, Janjic N, Wiles ME. Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999;35(9):533-42.
187. Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem.* 1995;270(23):13581-4.
188. Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(2):123-32.
189. Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, Yilmaz B, Ozdemir O, Caglar Y, et al. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model. *Curr Eye Res.* 2011;36(11):1005-13.
190. Akar EE, Oner V, Kucukerdonmez C, Aydin Akova Y. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model. *Int J Ophthalmol.* 2013;6(2):136-40.
191. Han YS, Lee JE, Jung JW, Lee JS. Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(4):541-8.
192. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Michels S, Marcus EN, Lenchus JD, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty-four-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology.* 2006;113(11):2002 e1-12.
193. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina.* 2006;26(3):352-4.
194. 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(5):557-63.
195. 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(6):804-7.

196. Awadein A. Subconjunctival bevacizumab for vascularized rejected corneal grafts. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(11):1991-3.
197. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea.* 2008;27(2):142-7.
198. You IC, Kang IS, Lee SH, Yoon KC. Therapeutic effect of subconjunctival injection of bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2009;87(6):653-8.
199. Gerten G. Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularization in corneal transplant surgery. *Cornea.* 2008;27(10):1195-9.
200. Jacobs DS, Lim M, Carrasquillo KG, Rosenthal P. Bevacizumab for corneal neovascularization. *Ophthalmology.* 2009;116(3):592-3; author reply 3-4.
201. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(6):834-6.
202. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization in recurrent pterygium. *Curr Eye Res.* 2008;33(1):23-8.
203. Doctor PP, Bhat PV, Foster CS. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Cornea.* 2008;27(9):992-5.
204. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;355(14):1419-31.
205. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Massin P, Schlingemann RO, et al. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118(4):615-25.
206. Campochiaro PA, Brown DM, Awh CC, Lee SY, Gray S, Saroj N, et al. Sustained benefits from ranibizumab for macular edema following central retinal vein occlusion: twelve-month outcomes of a phase III study. *Ophthalmology.* 2011;118(10):2041-9.
207. Kim EK, Kong SJ, Chung SK. Comparative study of ranibizumab and bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea.* 2014;33(1):60-4.
208. Ahn YJ, Hwang HB, Chung SK. Ranibizumab injection for corneal neovascularization refractory to bevacizumab treatment. *Korean J Ophthalmol.* 2014;28(2):177-80.
209. Liarakos VS, Papaconstantinou D, Vergados I, Douvali M, Theodossiadis PG. The effect of subconjunctival ranibizumab on corneal and anterior segment neovascularization: study on an animal model. *Eur J Ophthalmol.* 2014;24(3):299-308.
210. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med.* 2003;9(1):47-52.
211. Aflibercept: AVE 0005, AVE 005, AVE0005, VEGF Trap - Regeneron, VEGF Trap (R1R2), VEGF Trap-Eye. *Drugs R D.* 2008;9(4):261-9.

212. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15(2):171-85.
213. Gal-Or O, Livny E, Sella R, Nisgav Y, Weinberger D, Livnat T, et al. Efficacy of Subconjunctival Aflibercept Versus Bevacizumab for Prevention of Corneal Neovascularization in a Rat Model. *Cornea*. 2016;35(7):991-6.
214. Sella R, Gal-Or O, Livny E, Dachbash M, Nisgav Y, Weinberger D, et al. Efficacy of topical aflibercept versus topical bevacizumab for the prevention of corneal neovascularization in a rat model. *Exp Eye Res*. 2016;146:224-32.
215. Baer JC, Foster CS. Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser. *Ophthalmology*. 1992;99(2):173-9.
216. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(8):2148-53.
217. Primbs GB, Casey R, Wamser K, Snyder WJ, Crean DH. Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1998;29(10):832-8.
218. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S, Bocaccio F, Rymer S, Fernandes S, et al. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1995;102(7):1020-5.
219. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(4):431-41.
220. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*. 2000;343(2):86-93.
221. Reed JW, Fromer C, Klintworth GK. Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. *Arch Ophthalmol*. 1975;93(10):1017-9.
222. Cherry PM, Faulkner JD, Shaver RP, Wise JB, Witter SL. Argon laser treatment of corneal neovascularization. *Ann Ophthalmol*. 1973;5(8):911-20.
223. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1986;93(10):1304-9.
224. Sharma A, Samal A, Narang S, Gutpa A, Ram J, Gupta A. Frequency doubled Nd:YAG (532 nm) laser photocoagulation in corneal vascularisation: efficacy and time sequenced changes. *Indian J Ophthalmol*. 2001;49(4):235-40.
225. Kumar J, Gehra A, Sirohi N. Role of Frequency Doubled Nd: Yag Laser in Treatment of Corneal Neovascularisation. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(4):NC01-4.
226. Yoon KC, You IC, Kang IS, Im SK, Ahn JK, Park YG, et al. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol*. 2007;144(3):390-5.

227. Hamdan J, Boulze M, Aziz A, Alessi G, Hoffart L. [Corneal neovascularisation treatments compared: Subconjunctival bevacizumab injections and/or photodynamic therapy]. *J Fr Ophtalmol*. 2015;38(10):924-33.
228. Trikha S, Parikh S, Osmond C, Anderson DF, Hossain PN. Long-term outcomes of Fine Needle Diathermy for established corneal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(4):454-8.
229. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348-52.
230. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol*. 1995;9(1):32-46.
231. Guarnieri A, Moreno-Montanes J, Alfonso-Bartolozzi B, Sabater AL, Garcia-Guzman M, Andreu EJ, et al. Quantification of corneal neovascularization after ex vivo limbal epithelial stem cell therapy. *Int J Ophthalmol*. 2014;7(6):988-95.
232. European Medicines Agency (2014) Guideline on similar biological medicinal products. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf. 2015.
233. US Food and Drug Administration (2015) Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm291128.pdf>. 2015.
234. World Health Organization, Expert Committee on Biological Standardization (2009) Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf. 2009.
235. DePinho RA, Feldman LB, Scharff MD. Tailor-made monoclonal antibodies. *Ann Intern Med*. 1986;104(2):225-33.
236. Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, et al. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol*. 2003;21(12):1509-12.
237. Goldberg RA, Flynn HW, Jr., Isom RF, Miller D, Gonzalez S. An outbreak of streptococcus endophthalmitis after intravitreal injection of bevacizumab. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(2):204-8 e1.
238. Sheyman AT, Cohen BZ, Friedman AH, Ackert JM. An outbreak of fungal endophthalmitis after intravitreal injection of compounded combined bevacizumab and triamcinolone. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(7):864-9.
239. Goldberg RA, Flynn HW, Jr., Miller D, Gonzalez S, Isom RF. Streptococcus endophthalmitis outbreak after intravitreal injection of bevacizumab: one-year outcomes and investigative results. *Ophthalmology*. 2013;120(7):1448-53.

240. Gonzalez S, Rosenfeld PJ, Stewart MW, Brown J, Murphy SP. Avastin doesn't blind people, people blind people. *Am J Ophthalmol.* 2012;153(2):196-203 e1.
241. VanderBeek BL, Bonaffini SG, Ma L. Association of compounded bevacizumab with postinjection endophthalmitis. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133(10):1159-64.
242. Ng DS, Kwok AK, Chan CW, Li WW. Intravitreal bevacizumab: safety of multiple doses from a single vial for consecutive patients. *Hong Kong Med J.* 2012;18(6):488-95.
243. Avastin, Eylea and Lucentis – What's the Difference? <http://www.aao.org/eye-health/diseases/avastin-eylea-lucentis-difference> 2016 [
244. Cogan DG. Vascularization of the cornea; its experimental induction by small lesions and a new theory of its pathogenesis. *Arch Ophthalmol.* 1949;41(4):406-16.
245. Williams KA, Grutzmacher RD, Roussel TJ, Coster DJ. A comparison of the effects of topical cyclosporine and topical steroid on rabbit corneal allograft rejection. *Transplantation.* 1985;39(3):242-4.
246. Montezuma SR, Vavvas D, Miller JW. Review of the ocular angiogenesis animal models. *Semin Ophthalmol.* 2009;24(2):52-61.
247. Lin CT, Hu FR, Kuo KT, Chen YM, Chu HS, Lin YH, et al. The different effects of early and late bevacizumab (Avastin) injection on inhibiting corneal neovascularization and conjunctivalization in rabbit limbal insufficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(12):6277-85.
248. Papathanassiou M, Theodoropoulou S, Analitis A, Tzonou A, Theodossiadis PG. Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization: a meta-analysis. *Cornea.* 2013;32(4):435-44.
249. Ozdemir O, Altintas O, Altintas L, Ozkan B, Akdag C, Yuksel N. Comparison of the effects of subconjunctival and topical anti-VEGF therapy (bevacizumab) on experimental corneal neovascularization. *Arq Bras Oftalmol.* 2014;77(4):209-13.
250. Dastjerdi MH, Saban DR, Okanobo A, Nallasamy N, Sadrai Z, Chauhan SK, et al. Effects of topical and subconjunctival bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2411-7.
251. Kim J, Kim D, Kim ES, Kim MJ, Tchah H. Topically administered bevacizumab had longer standing anti-angiogenic effect than subconjunctivally injected bevacizumab in rat corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol.* 2013;6(5):588-91.
252. Hashemian MN, Zare MA, Rahimi F, Mohammadpour M. Deep intrastromal bevacizumab injection for management of corneal stromal vascularization after deep anterior lamellar keratoplasty, a novel technique. *Cornea.* 2011;30(2):215-8.
253. Mackenzie SE, Tucker WR, Poole TR. Bevacizumab (avastin) for corneal neovascularization--corneal light shield soaked application. *Cornea.* 2009;28(2):246-7.

254. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci.* 1998;87(12):1479-88.
255. Huang AJ, Watson BD, Hernandez E, Tseng SC. Induction of conjunctival transdifferentiation on vascularized corneas by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization. *Ophthalmology.* 1988;95(2):228-35.
256. Nomoto H, Shiraga F, Kuno N, Kimura E, Fujii S, Shinomiya K, et al. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(10):4807-13.
257. Acar BT, Halili E, Acar S. The effect of different doses of subconjunctival bevacizumab injection on corneal neovascularization. *Int Ophthalmol.* 2013;33(5):507-13.
258. Hashemian MN, Moghimi S, Kiumehr S, Riazi M, Amoli FA. Prevention and treatment of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with corticosteroid in experimental rats. *Ophthalmic Res.* 2009;42(2):90-5.
259. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(10):1577-9.
260. Petsoglou C, Balaggan KS, Dart JK, Bunce C, Xing W, Ali RR, et al. Subconjunctival bevacizumab induces regression of corneal neovascularisation: a pilot randomised placebo-controlled double-masked trial. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(1):28-32.
261. Belghmaidi S, Hajji I, Ennassiri W, Benhaddou R, Baha Ali T, Moutaouakil A. [Management of corneal neovascularization prior to corneal transplantation: Report of 112 cases]. *J Fr Ophtalmol.* 2016;39(6):515-20.
262. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. The association between corneal neovascularization and visual acuity: a systematic review. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(1):12-9.
263. Rocha G, Deschenes J, Rowsey JJ. The immunology of corneal graft rejection. *Crit Rev Immunol.* 1998;18(4):305-25.
264. Fasciani R, Mosca L, Giannico MI, Ambrogio SA, Balestrazzi E. Subconjunctival and/or intrastromal bevacizumab injections as preconditioning therapy to promote corneal graft survival. *Int Ophthalmol.* 2015;35(2):221-7.
265. Dekaris I, Gabric N, Draca N, Pauk-Gulic M, Milicic N. Three-year corneal graft survival rate in high-risk cases treated with subconjunctival and topical bevacizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253(2):287-94.
266. Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea.* 2007;26(8):977-82.
267. Lichtinger A, Yeung SN, Kim P, Amiran MD, Elbaz U, Slomovic AR. Corneal endothelial safety following subconjunctival and intrastromal injection of bevacizumab for corneal neovascularization. *Int Ophthalmol.* 2014;34(3):597-601.

268. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(10):1375-82.
269. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol*. 2004;187(2):246-53.
270. Park JH, Joo CK, Chung SK. Comparative study of tacrolimus and bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*. 2015;34(4):449-55.
271. Yoo AR, Chung SK. Effects of subconjunctival tocilizumab versus bevacizumab in treatment of corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*. 2014;33(10):1088-94.
272. Ko BY, Kim YS, Baek SG, Lee GW, Kim JM, Jean WS, et al. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival and topical bevacizumab and sunitinib in a rabbit model. *Cornea*. 2013;32(5):689-95.
273. Elbaz U, Mireskandari K, Shen C, Ali A. Corneal Fine Needle Diathermy With Adjuvant Bevacizumab to Treat Corneal Neovascularization in Children. *Cornea*. 2015;34(7):773-7.
274. You IC, Im SK, Lee SH, Yoon KC. Photodynamic therapy with verteporfin combined with subconjunctival injection of bevacizumab for corneal neovascularization. *Cornea*. 2011;30(1):30-3.

8 ÖZET

Kornea Neovaskülarizasyonunda Yeni Bir Biyobenzer Bevacizumab'ın Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Bu randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışma, tavşan gözlerinde sütür ile indüklenmiş kornea neovaskülarizasyonunda subkonjonktival bevacizumab ile potansiyel biyobenzer bevacizumab olan Anti-Human VEGF GU01'in, tedavilerinin etkinliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. On beş tane Yeni Zelanda tavşanının sağ gözüne, KNV oluşturmak amacıyla 7-0 siyah ipek sütür atıldı. Birinci haftada, yeterli KNV oluştuğu izlendikten sonra, bütün sütürler alındı. Ameliyat mikroskobu ile korneaların görüntüleri alındı. KNV ImageJ programı yardımıyla hesaplandı. Tavşanlar randomize olarak üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 0,1 ml dengeli tuz solüsyonu (n=5), bevacizumab grubuna 0,1 ml/2,5 mg bevacizumab (n=5), biyobenzer grubuna 0,1/2,5 mg Anti-Human VEGF GU01 (n=5) subkonjonktival olarak uygulandı. 1 hafta sonra alınan görüntülerdeki KNV alan değişimi yüzde olarak hesaplandı. Sakrifasyon sonrası histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler, hematoksil-eozin ve CD31 boylarıyla yapıldı. On dördüncü günde, KNV alanındaki gerileme oranları bevacizumab (%82,2) ve biyobenzer (%83,6) grubunda, kontrol grubuna göre (%24,6) daha yüksek bulundu (p = 0,009). Bevacizumab ve biyobenzer

gruplarındaki KNV gerileme oranları arasında bir fark izlenmedi ($p = 0,347$). Histolojik değerlendirmede bevacizumab ve biyobenzer gruplarında, kontrol grubuna göre daha az damar yapıları izlendi. Sonuç olarak çalışmamızda, tavşan gözlerinde, sütür ile indüklenmiş kornea neovaskülarizasyonunda, bevacizumab ile Anti-Human VEGF GU01 etkili bulundu. Bu veriler, Anti-Human VEGF GU01'in biyobenzer bevacizumab olarak geliştirme alışmalarının devam etmesini desteklemektedir. İleri prelinik ve klinik alışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Bevacizumab, Biyobenzer, Anti-Human VEGF GU01, kornea neovaskülarizasyonu.

9 SUMMARY

The Effect Of A New Biosimilar Bevacizumab On Corneal Neovascularization

This study is aimed to compare the effect of subconjunctival bevacizumab and Anti-Human VEGF GU01 (potential biosimilar) on suture induced corneal neovascularization (CNV) in rabbit eyes. CNV was induced by sutures (7-0 silk) in the right eyes of 15 rabbits. On seventh day, corneal sutures were removed after sufficient neovascularization was confirmed. Photographs were taken a surgical microscope (Möller-Wedel) . CNV area is calculated with ImageJ program. Rabbits randomly were divided into three groups and were treated with sunconjunctival 0,1ml balanced salt solution (control group, n=5), 0,1 ml/2,5 mg bevacizumab (bevacizumab group, n=5) and 0,1 ml/2,5 mg Anti-Human VEGF GU01 (biosimilar group, n=5). One week after suturation, CNV area changes were calculated as a percentage. After sacrifice, histological and immunohistochemical staining were made by using hematoxlin and eosin and anti CD31. On day 14, the mean percentages of regression areas of CNV in bevacizumab (%82,2) and biosimilar (%83,6) groups were higher compared control group (%24,6) ($p = 0,009$). There were no difference between bevacizumab and biosimilar groups ($p = 0,347$). Histopathology showed that bevacizumab and biosimilar groups presented less neovascularization than the

control group. These results suggest that bevacizumab and Anti-Human VEGF GU01 have same effect for the inhibition of CNV. These data support the development process of Anti-Human VEGF GU01 as a potential biosimilar to bevacizumab. Further preclinical and clinical studies are needed.

Key words: Bevacizumab, biosimilar, Anti-Human VEGF GU01, Corneal neovascularization.



10 ÖZGEÇMİŞ

Adı : Armağan

Soyadı : YUVARLAK

Doğum Yeri ve Tarihi: Antakya/HATAY, 26.09.1987

Eğitimi

İhtisas Eğitimi : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıklar ABD

Üniversite : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Lise : Antakya Hüseyin Özbuğday Lisesi

Yabancı Dili : İngilizce

Üyelikleri : Türk Oftalmoloji Derneği

Bilimsel Etkinlikleri :

Sözel Bildirileri

- 1- Yuvarlak A, Özdek Ş. Standart Anti-VEGF Tedavinin Yetersiz Kaldığı Olgularda Aflibercept. TOD 48. Ulusal Kongre. Kasım 2014
- 2- Yuvarlak A, Üçgül AY, Ceylanoğlu Serbest K, Özmen MC, Yüksel E, Bilgihan K. Dilüe Alkol ve İyontoforez Yardımlı Korneal Çapraz Bağlama Tedavisi (DAI-CXL) ve Standart Tedavi (Dresden Protokolü) Ağrı Skorları ve Morbidite Yönünden Karşılaştırılması. TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015

- 3- Şahin S, Gürpınar İkiz GD, Yuvarlak A, Üçgül AY, Hasanreisöğlü CM, Gürelik G, Özdek Ş, Hepşen İF, Aktaş Z. Maküler Ödem Tedavisinde Kullanılan Deksametazon İmplant Uygulamasının Göz İçi Basıncı ve Katarakt Progresyonu Üzerine Olan Etkisi. TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015
- 4- Üçgül AY, Yuvarlak A, Çubuk MÖ, Hasanreisöğlü M, Gürelik G, Özdek Ş, Hepşen İF, Aktaş Z. İntıvıtreal Anti-VEGF Tedavisinin Göz İçi Basıncı Üzerine Etkisi. TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015
- 5- Bilgihan K, Yuvarlak A, Yüksel E, Özdemir B, Ceylanöğlü Serbest K, Yalınbaş D, Gürelik G. Epitel Korumalı Kornea Çapraz Bağ Tedavisinde Yeni Bir Yöntem: Dilüe Alkol ve İyontoforez Yardımlı Korneal Çapraz Bağlama (DAI-CXL). TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015
- 6- Yalınbaş D, Yüksel E, Özmen MC, Ceylanöğlü Serbest K, Yuvarlak A, Özdemir B, Bilgihan K. Dilüe Alkol ve İyontoforez Yardımlı Korneal Çapraz Bağlama Tedavisi ve (DAI-CXL) ve Standart Tedavi (Dresden Protokolü) Sırasında İntıvıtreal Korneal Değişimlerinin İncelenmesi. TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015
- 7- Üçgül AY, Aktaş Z, Yuvarlak A, Çubuk MÖ, Hasanreisöğlü M, Özdek Ş, Gürelik G, Hepşen İF. Psödoeksfoliasyon Sendromu Olan ve Olmayan Olgularda İntıvıtreal Ranibizumab Tedavisinin Göz İçi Basıncı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması. TOD 50. Ulusal Kongre. Kasım 2016

Poster Sunumları

- 1- Üçgül AY, Özmen MC, Yuvarlak A, Özdek Ş. Subinternal Limitan Membran Hemoraji gelişen olguda Nd:YAG Lazer İnternal Limitan Membranotomi. TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015
- 2- Bektaş Ç, Yuvarlak A, Yalçın NG, Çubuk MÖ, Atalay HT, Aktaş Z, Hepşen İF. Primer Konjenital Glokomlu Olgularda Cerrahi Tedavi Yöntemlerinin ve Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. TOD 49. Ulusal Kongre. Kasım 2015
- 3- Yuvarlak A, Aydın B, Üçgül AY, Yüksel E, Özmen MC, Akata F. Dalk Cerrahisinde Big Bubble Tekniğinin ve Manuel Diseksiyon Tekniğinin Sonuçlarının Karşılaştırılması. TOD 50. Ulusal Kongre. Kasım 2016

Yayınları

- 1- Hasanreisoglu M, Atalay HT, Yuvarlak A, Aktaş Z, Aydın B. Multiple Evanescent White Dot Syndrome in a Case of Idiopathic Retinal Vascular Tortuosity. Journal of Retina-Vitreous. Vol 24. Num 2. 2016
- 2- Güler E, Kulak AE, Totan Y, Yuvarlak A, Hepşen İF. Comparison of a new optical biometry with an optical low-coherence reflectometry for ocular biometry. Contact Lens Anterior Eye. 2016