

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYON OLUŞTURULAN
SIÇAN MODELİNDE TOPİKAL VE SUBKONJONKTİVAL UYGULANAN
BEVASİZUMAB VE ETANERCEPTİN NEOVASKÜLARİZASYONA
ETKİSİ**

Arş. Gör. Dr. Özdemir ÖZDEMİR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYON OLUŞTURULAN
SIÇAN MODELİNDE TOPIKAL VE SUBKONJONKTİVAL UYGULANAN
BEVASİZUMAB VE ETANERCEPTİN NEOVASKÜLARİZASYONA
ETKİSİ**

Arş. Gör. Dr. Özdemir ÖZDEMİR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Özgül ALTINTAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

Etik Kurul Onayı HADYEK 1/4-2010

2010

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
İçindekiler Dizini	i
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller Dizini	iv
Tablo Dizini	vi
1. AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 . Kornea Anatomisi	3
2.1.1. Epitel ve Bazal Membran	3
2.1.2. Bowman Zarı	5
2.1.3. Stroma Tabakası	5
2.1.4. Descemet Membranı	5
2.1.5. Endotel Tabakası	6
2.2. Kornea Yara İyileşmesi	6
2.2.1. Epitel Yara İyileşmesi	6
2.2.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi	6
2.2.3. Stroma Yara İyileşmesi	7
2.2.4. Endotel Yara İyileşmesi	8
2.3. Korneanın Alkali Yanıkları	8
2.4. Korneal Neovaskülarizasyon	9
2.4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	12

2.4.1.1. Bevasizumab	13
2.4.2. Tümör Nekrozis Faktör- α	14
2.4.2.1. Etabercept	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Anestezi Tekniği	18
3.2. Kornea Yanık Alanlarının Değerlendirilmesi	18
3.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi	19
3.4. Histopatolojik İnceleme	21
3.5. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1. Kornea Yanık Alanlarının Karşılaştırılması	27
4.2. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması	28
4.3. Histopatolojik İnceleme	32
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
7. ÖZET	47
8. ABSTRACT	49
9. KAYNAKLAR	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Deneyisel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi	DETAB
Fibroblast büyüme faktörü	FGF
Hematoksilen-Eosin	HE
Işık mikroskobu	IM
İnterlökin	IL
Kilodalton	kDa
Polimorfonükleer lökositler	PMNL
Transforming büyüme faktörü	TGF
Tümör nekrozis faktör	TNF
Tümör nekrozis faktör reseptör tip I	TNFR-I
Tümör nekrozis faktör reseptör tip II	TNFR-II
Vasküler endotelyal büyüme faktörü	VEGF
Vasküler hücresel adezyon molekülü- 1	VCAM-1
Yaşa bağlı makula dejenerasyonu	YBMD

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. a) Gümüş nitrat çubuklarıyla kimyasal koterizasyon. b) Kimyasal koterizasyondan hemen sonraki görünüm.

Şekil 3.2. Subkonjonktival enjeksiyonun yapılışı.

Şekil 3.3. Mahoney ve Waterbury'nin tanımladığı yanık alanının ve korneal neovaskülarizasyonun derecelendirilmesi.

Şekil 3.4. a) Dijital fotoğraf üzerinde b) MATLAB R2007b v7.5 programı kullanılarak hesaplanan neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

Şekil 3.5. Bu örnekte neovaskülarizasyonun derin stromaya kadar indiği, yoğun ve yaygın damarlanma olduğu görüldü. Vaskülarizasyon yoğunluğu ++++ olarak değerlendirildi. Siyah kalın oklar damar yapılarının kesitini ve içerisindeki boyanmış eritrositleri, beyaz kalın ok yanık skar alanında düzensiz ve kalınlaşmış re-epitelizasyonu, siyah ince ok hasarsız descement membranını göstermektedir (Işık mikroskopu (IM), Hematoksilen-eosin, x 400).

Şekil 3.6. Siyah kalın ok kimyasal yakın oluşturulurken stromayı boyayan gümüş pigmentlerini göstermektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +, inflamasyon yoğunluğu ++ ve fibroblast aktivitesi ++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 100)

Şekil 3.7. Beyaz kalın oklar stromada artmış fibroblastları, siyah kalın ok kalın damar yapılarını, siyah ince oklar kapiller düzeyinde ince damar yapılarını göstermektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +++++, inflamasyon yoğunluğu +++ ve fibroblast aktivitesi +++++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 200)

Şekil 3.8. Beyaz kalın oklar stromada artmış fibroblastları, siyah kalın oklar lameller arasında artefakt boşlukları göstermektedir. İnflamasyon yoğunluğu ++ ve fibroblast aktivitesi +++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 200)

Şekil 3.9. Siyah kalın ok kimyasal yanık sonrası oluşan, üzeri re-epitelize olan subepitelyal vezikülü göstermektedir. Siyah ince ok lezyonda çok sayıda bulunan nötrofilleri işaret etmektedir. İnflamasyon yoğunluğu +++ değerlendirildi. (IM, HE, x 100)

Şekil 3.10. Siyah kalın ok yeni damarları ve içerisindeki boyanmış eritrositleri göstermektedir. Siyah ince ok descement dekolmanına işaret etmektedir.

Vaskülarizasyon yoğunluğu +++++, inflamasyon yoğunluğu +++ ve fibroblast aktivitesi +++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 100)

Şekil 3.11. Siyah kalın ok yeni damarları ve içerisindeki boyanmış eritrositleri, siyah ince ok bowman tabakasında çatlak artefaktını göstermektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +++++, inflamasyon yoğunluğu +++ ve fibroblast aktivitesi +++++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 200)

Şekil 3.12. Siyah kalın silyer cismi, beyaz kalın ok irisi, siyah ince oklar ise sklera-korneal ve iris üzerinde genişlemiş ya da yeni oluşmuş damarları göstermektedir. (IM, HE, x 100)

Şekil 4.1. Gruplardaki sıçanların kornea yanık alanları derecelerinin grafikte gösterimi.

Şekil 4.2. Sıçanların korneal neovaskülarizasyon derecelerinin grafik gösterimi.

Şekil 4.3. Tüm grupların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

Şekil 4.4. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre neovaskülarizasyon yoğunluğu.

Şekil 4.5. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre inflamasyon yoğunluğu.

Şekil 4.6. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre fibroblast aktivitesi.

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler.

Tablo 2.2. Korneal neovaskülarizasyonla ilişkili hastalıklar.

Tablo 4.1. Gruplardaki sıçanların kornea yanık alanları dereceleri.

Tablo 4.2. Gruplardaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri.

Tablo 4.3. Gruplardaki sıçanların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

Tablo 4.4. Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi ve gruplar arasında karşılaştırılması.

Tablo 4.5. Histopatolojik inceleme sonuçları.

1. AMAÇ VE KAPSAM

Dış dünyadan aldığımız bilgilerin %80'inden fazlası gözümüz yoluyla edinilir (1). Görsel bilgilerin göze giriş yeri ve insanın görmesini sağlayan gözün optik penceresi korneadır (1,2). Kornea gözün avasküler dokusudur ve ışığı uygun şekilde kırması için saydam kalması gerekmektedir (3).

Gözün kimyasal yaralanmaları epitel yüzeyinde, korneada ve ön segmentte ciddi hasar oluşturarak tek taraflı ya da çift taraflı kalıcı görme kaybıyla sonuçlanabilir (4). Kimyasal yanıklar (alkali yanıklar gibi) kornea stromasının en ciddi yaralanmalarından birisidir. Kimyasal yanıklar persistan ülserasyona, opasifikasyona, skar oluşumuna ve neovaskülarizasyona neden olarak kalıcı görme kaybıyla sonuçlanabilir. Korneada alkali yanıklara bağlı komplikasyonların patogeneğinde, artan hücre popülasyonunun ana bileşenleri mezenkimal hücreler (aktive keratositler ya da myofibroblastlar), makrofajlar ve neovaskülarizasyon faktörleridir (5-7).

Anjiyogenezis varolan damarlardan yeni damarsal yapıların gelişmesi olarak tanımlanmıştır. Korneal neovaskülarizasyon anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin bozulup anjiyogenik tarafa kaymasıyla ortaya çıkar (8). Enfeksiyöz, inflamatuvar, dejeneratif ya da travmatik hastalıklar korneal neovaskülarizasyon oluşturabilir (9). Korneal neovaskülarizasyon skar oluşumuna, lipid depolanmasına, korneal graft reddine yol açtığından ciddi görme kaybına neden olur (10). Vasküler büyüme genelde inflamatuvar hücreler, miyofibroblastlar ve arka segmentte glial ya da aktif pigment epitel hücrelerini de içeren yara iyileşmesi cevabının bir parçasıdır. Vasküler endotelial büyüme faktörü'nün (VEGF) oküler anjiyogenezin bütün formlarında, insanlarda ve hayvan modellerinde korneal neovaskülarizasyonda etkili bir faktör olduğu bulunmuştur (11-13). Steroidler, non-steroid anti-inflamatuvarlar, siklosporin-A, rapamisin, metotreksat gibi çeşitli ilaçlar uygulanmasına rağmen korneal neovaskülarizasyonun etkili şekilde tedavi edilememesi önemli bir sorun olarak durmaktadır (9). Günümüzde korneal neovaskülarizasyonun tedavisi için yeni ajanlar, farklı kullanım yolları, etkin doz ve

doz aralıkları araştırılmaktadır. Son yıllarda yapılan çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar bevasizumabın topikal ve subkonjonktival kullanımının korneal neovaskülarizasyon gelişimini engellediği, diğer anti-VEGF ajanlarla karşılaştırıldığında bevasizumabın korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda daha etkili olduğu gösterilmiştir (14-26).

Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) inflamatuvar, ödematöz, neovasküler ve nörodejeneratif oküler ve ekstraoküler hastalıkların patogeneğinde aktif rol oynamaktadır (27). Alkali yanıklı kornealarda artan sitokinlerden birisi de majör proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'dır (28). Bazı hayvanlarda TNF blokajının korneal allograft yaşam süresini artırdığından korneal allograft rejeksiyonu tedavisinde dikkate alınması gerektiği rapor edilmiştir (29). İnterlökin-4 (IL-4) ya da IL-13 ile TNF- α 'nın birlikte insan korneal fibroblastlarını stimülasyonu hücre yüzeyinde vasküler hücresel adezyon molekülü-1 (VCAM-1) salınımı ile sonuçlanmıştır (30). Anti-TNF monoklonal antikordardan infliximab veya etanercept uygulanarak yapılan anti-inflamatuvar tedavinin koroidal neovaskülarizasyonun regresyonunda ve yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) hastalarında görme keskinliği artışı sağladığı bildirilmiştir (31-34). Etanerceptin çeşitli üveit tiplerinin tedavisinde inflamasyonu baskılamada etkili olduğu gösterilmiştir (35-38).

Bu çalışmada, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda bevasizumab, etanercept ve her ikisinin additif kullanılmasının etkinliğini araştırmayı, subkonjonktival veya topikal yolla uygulanmasının etkinliğini karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİ

2.1 . Kornea Anatomisi

Kornea göz küresinin ön tarafında, limbusta sklera ile bütünleşen ortalama 11.8 mm çapında saydam bölümdür. Kendine özgü saat camı benzeri eğimi, +43 diyoptri kırma gücü ile ışığın kırılmasını sağlayan ana dokudur (39,40). Kornea saydamken devamı olan sklera beyazdır. Kornea ile skleranın birleştiği yere ise limbus denir (41).

Yüzeyel ektodermden köken alan kornea santralde ortalama 500 µm, periferde 800 µm kalınlığa sahiptir (42). Korneanın beslenmesinde glukozun kaynağı aköz humor, oksijenin kaynağı ağırlıklı olarak gözyaşı film tabakasıdır. Endotel oksijen ihtiyacının bir kısmını aköz humorden, epitel de bir miktarını limbal arterlerden sağlamaktaysa da gözyaşı film tabakası oksijenin temel kaynağıdır (1).

Kornea vücudun en yüksek yoğunlukta sinir ucu sonlanmasına sahiptir ve bu konjonktivadakinin 100 katıdır. Sensoryel sinir lifleri uzun silyer sinirlerden gelir ve subepitelyal pleksusu oluşturur. Korneada asetilkolin, katekolaminler, substans P ve kalsitonin gen ilişkili peptidler gibi nörotransmitterler bulunur (43).

Kornea anatomik olarak aşağıdaki 5 tabakadan oluşmaktadır (44):

- Epitel ve bazal membran
- Bowman zarı
- Stroma
- Descemet membranı
- Endotel

2.1.1. Epitel ve Bazal Membran

Kornea epiteli 50 mikron kalınlığındadır. Beş-yedi sıra hücreden oluşmuştur. Bu hücreler üç tabakaya ayrılır.

- Bazal hücre tabakası
- Kanatsız hücreler
- Yüzeysel hücreler

Bazal hücreler epitel bazal membranına hemidesmozomlarla bağlanmış, tek katlı küboidal hücrelerdir (44,45). Bu hücrelerin mitotik aktivitesi vardır. Çoğalıp öne doğru ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar. Bazal hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunur. Tonofilamanlar ile hücrenin iskeleti korunur. Aktin filamanlar ise yara iyileşmesi sırasında hücre göçünde rol alır. Hemidesmozomlar epitel hücrelerini birbirlerine ve bazal laminaya bağlarlar. Gap-junction denilen sıkı bağlantı noktaları ise sadece hücreler arasındaki küçük moleküllerin alışverişine izin verir. Epitel hücreleri korneada çevreden merkeze doğru ilerlerler. Bazal ve kanatsız hücreler arkadan öne doğru ilerler ve dökülürler. Bu X-Y-Z hipotezi olarak bilinmektedir (46). Bazal hücreler kendileri tarafından sentezlenmiş ve yaklaşık 30 nm kalınlığındaki bir bazal membranın üzerine oturmuşlardır. Elektron mikroskopu çalışmaları bu membranın biri gevşek ve şeffaf (lamina lucida) diğeri sıkı (lamina densa) iki tabakadan oluştuğunu göstermiştir. Bazal membranın temel yapıtaşlarından tip IV kollajen lamina densada, fibronektin ve laminin ise her iki tabakada bulunur (47).

Kanat hücreleri ince kanatsız uzantılara sahiptir ve iki-üç kat halinde uzanırlar (44). Bu hücreler hem birbirlerine hem de yüzeysel hücrelere desmozomlarla bağlıdırlar. Kanat hücreleri arasında ayrıca yüksek düzeyde hücreler arası bağlantı ve geçiş sağlayan çok sayıda gap-junction da vardır (47).

Yüzeysel hücreleri birbirine köprülenmelerle tutunmuş, iki kat halinde dizilmiş durumda uzun ve ince bir yapı gösterirler. En dıştaki hücrelerden oluşan yüzeysel alanı, münin adsorbsiyonunu artıracak şekilde mikrovilluslar ve mikroplikalarla genişlemiş durumdadır. Yüzeysel hücreler birkaç günlük ömürlerini tamamladıktan sonra gözyaşı film tabakasına dökülürler. Olağanüstü rejenere olma kabiliyetine sahip bulunduğundan epitelde nedbeleşme oluşmaz (44) .

2.1.2. Bowman Zarı

Hücre içermeyen bu tabaka, yalnızca insanlar ve bazı memelilerde epitel bazal membranı ile stroma arasında bulunur ve ışık mikroskobu ile farkedilir (1). Hasar gördüğünde rejenere olmaz (44). Ön yüzü çok düzenlidir, arka yüzündeki lifler stroma ile devam eder. Bowman zarı limbusta sonlanır (40).

2.1.3. Stroma Tabakası

Kornea kalınlığının yaklaşık % 90'ını oluşturur. Korneanın fiziksel gücü, şeklinin stabilitesi, saydamlığı ve birçok anatomik ve biyokimyasal özelliği stromanın özelliklerine bağlıdır (1,44). Korneanın optik ve mekanik özellikleri doğrudan stromal makromoleküler içerik ve bunların dokuda düzenlenmesinin sonuçlarıdır (43). Büyük ölçüde düzenli aralıklarla sıralanmış kollajen fibrillerinden meydana gelmektedir. Fibriller arasındaki boşluk, stroma tabakaları arasında serpiştirilmiş durumda bulunan modifiye fibroblastlar (keratositler) ile proteoglikan yapısındaki esas madde tarafından doldurulur. Kollajen liflerin tek tip dizilimi, yavaş ancak sürekli yıkım-üretim halinde oluşu saydamlığı için esastır. Kollajen fibriller ve onları üreten keratositler yaklaşık olarak iki-üç yıllık bir yapım-yıkım döngüsüne sahiptir. İğ biçimli olan keratositler aslında fibroblast olup stroma lamellerinin arasına yerleşmişlerdir. Normal sağlıklı stromada dinlenme halinde olan keratositler yara iyileşmesi sırasında son derece aktiftirler. Stromada lizis yapan matriks metalloproteinazlar ve integrinleri salgırlar (1,44).

2.1.4. Descemet Membranı

Kornea endotelinin bazal membranıdır (1). Endotel hücreleri tarafından sentezlenir (47). Gerçek bir bazal membran olduğundan, kaybolan doku fonksiyonel endotel hücreleri tarafından yenilenir (2). Kafes tarzında dizilmiş ince kollajen fibrillerden oluşmaktadır. İn utero oluşan öne yerleşmiş bir bantlı zon ile hayat boyunca endotel tarafından depo edilen bir arkaya yerleşmiş bantsız zondan oluşur (44). Descemet membranı proteolitik enzimlere karşı direnci oldukça yüksek bir yapıdır. Tüm stromanın hızla yıkıldığı ağır nekrotizan keratitlerde bile sağlam kalabilir (47).

2.1.5. Endotel Tabakası

Tek sıra hegzagonal hücrelerden oluşmaktadır. Endotel hücrelerinin arasında desmozom dışında üç bağlantı kompleksine de rastlanır (zonula okludens, makula okludens, makula adherens). Korneanın herhangi bir şişmeye maruz kalmaksızın mevcut yapısını sürdürebilmesinde önemli bir rol oynarlar fakat rejenere olamazlar. İlerleyen yaşla beraber endotel hücrelerinin sayısı da giderek azalır. Böyle bir durum karşısında komşu hücreler genişleyerek ortaya çıkan boşlukları doldururlar (1,44).

2.2. Kornea Yara İyileşmesi

2.2.1. Epitel Yara İyileşmesi

Kornea epiteli düzeyindeki yaralanmalar, kornea epitelinde genellikle tam kat defekt yaratırlar. Zarar gören epitel hücreleri veya üzeri açılan bazal membranda, komşu sağlıklı hücrelere, dolaşım ve gözyaşı filmi ile sinyaller yayılır (1,48,49). Epitel hücreleri IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , interferon- γ , transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), kompleman 5-a , lökotrien B4 gibi birçok eriyebilen sitokin veya prostaglandin sentezleyip salgılayabilirler (50). Yaralanmadan hemen sonra bazal tabakada mitoz durur, defekt kenarındaki hücreler büzülerek kalınlaşırlar ve bazal membrana tutundukları yerlerden ayrılırlar. Daha sonra bu hücreler genişleyerek ve ameboid hareketlerle ilerleyerek bazal tabakadaki defekti kapatmaya çalışırlar. Epitel iyileşmesi sırasında hücrelerin göç etme hızı saatte 60-80 μm ye ulaşır (47). Hücre göçünün yönü kemotaksis veya haptotaksis ile belirlenir. Haptotaksis epitel hücresinin zemin ile yaptığı bağlantıların güçsüz olduğu yerden, daha güçlü olduğu yere doğru hareketidir (1). Defekt tek sıra hücreyle örtüldükten sonra mitozla normal epitel kalınlığı sağlanır (47).

2.2.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi

Vücudun her yerinde olduğu gibi korneada da bazal membran, bazal epitel hücreleri tarafından salgılanır. Kornea epitel hücreleri tarafından salınan tip IV kollajen ve laminin temel içeriğidir. Epitelyal hücre göçü zemin olarak bazal membran gerektirir. Ancak epitel debridmanı sonrası yeni bazal membran gelişimi bir haftadan uzun zaman aldığından geçici matriks olarak fibronektin hücre göçüne

zemin oluşturur. Yani istirahat konumunun sürüdürülmesinde mutlak gerekliliği olan tip IV kollajen bu nedenle akut yaralanma durumlarında yerini fibronektine bırakır. Keratektomi sonrası fibronektin ile geçici matriks oluşurken lezyona komşu alanda göçe hazırlanan epitellerin hemidesmozom ve bağlayıcı fibrilleri çözülür. Bazal membranın gelişimini ve epitelizasyonun tamamlanmasını takiben hemidesmozom ve bağlayıcı fibriller görülmeye başlanır (1,48,49). Yeni hemidesmozomlar bazal membranda daha önce var olan çapa fibrillerinin karşısına gelecek şekilde sentezlenir ve adezyon kompleksleri kısa sürede bütünlüklerine kavuşur. Eğer yaralanma bazal membranı da içeriyorsa, epitelin önce bazal membran sentezlemesi gerekir ki bu durumda adezyon komplekslerinin sentezinin tamamlanması yaklaşık bir yıl sürer (47).

2.2.3. Stroma Yara İyileşmesi

Stromal iyileşme yeni kollajen sentezi, birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve son olarak stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından oluşur. Stromal bir yaralanmayı izleyen saatler içinde önce polimorfonükleer lökositler (PMNL) sonra monositler yara yerine gelir (47). Stroma yara alanındaki keratositlerin ölümü stromal yara yanıtının ilk basamağıdır (1). İn vitro sonuçlar keratosit kemotaksisini çeşitli büyüme faktörlerinin artırdığını göstermiştir (51). Epitel hasarı IL-1, TNF- α , TGF- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi epitel hücrelerinden salınan sitokinlerde artışa neden olur. Bu sitokinler keratositler üzerindeki reseptörlere bağlanarak gen ekspresyonu ve sinyal transdüksiyonu yaparak keratosit fonksiyonlarında değişikliğe ve hücrel farklılaşmaya yol açar (52). Keratositler aktive olduklarında dokunun tamiri için, yara yerine hemen göç ederek yeni kollajen ve glikoprotein sentezlerler. Yeni kollajen sentezi keratositler ve transforme olmuş monositler tarafından yapılır (53,54). Aktive keratositler f-aktin, myosin ve α -aktinin içeren kas lifi demetlerindeki kas hücrelerine benzer hücrelere dönüşürler (55). Bu yeni hücreler fibroblastların ve myofibroblastların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini taşırlar (47,55). Skar dokusunda başlangıçta oluşan ekstraselüler matriks ile nihai matriks aynı değildir. Myofibroblastlar tekrar istirahat halindeki özelliklerine döner, ancak tamamen doğal, hiç değişim göstermemiş keratositler haline gelemeyizler (1).

2.2.4. Endotel Yara İyileşmesi

İnsan endotel hücrelerinde doğumdan sonra neredeyse hiç mitoz görülmez. Yaşlılıkta olduğu gibi endotel hücreleri yavaşça kaybolursa, komşu hücrelerin genişlemesiyle boşluklar kapanır (47). Endotelin santralinde oluşan bir hasar sonrası periferel ve santral hücre yoğunluğu ile hegzagonal hücre yüzdesi düşer, buna karşın hücre boyutlarındaki çeşitlilik (polimegatizm) artar (56-58). Defekt bir kez kapatıldıktan sonra, normal hegzagonal yapının oluşturulması için hücreler yeniden düzenlenir. Birkaç hafta sonra zedelenme alanını kaplayan endotel yeni descemet membranını salgılamaya başlar. Yaklaşık iki-üç ay içinde oldukça homojen, hegzagonal bir yapı elde edilir. Kronik inflamasyon veya fiziksel travma durumunda yeniden düzenlenme gecikir ve hücre kaybı devam eder (47). Her yıl yaşla birlikte sayıları azalan endotel hücreleri, sayıca % 80 oranında azalana dek korneal dehidratasyonu sürdürebilmektedir (1).

2.3. Korneanın Alkali Yanıkları

Tüm hücrelerin hücre membranları fosfolipidlerden oluşmaktadır. Fosfolipidlerse alkaline pH da çözünürler. Alkali yaralanmalar çok hasar vericidir çünkü temas ettiği tüm hücre membranlarını eritirler. Yüzeydeki hücreler hasar gördükten sonra alkali madde daha derinlerdeki dokulara geçer (59). Asit maddeler ile karşılaştırıldığında alkali maddeler hücre membranlarındaki yağ asitlerinin parçalanması ve sabunlaşmasıyla hücrelerin ölümüne yol açarak göze daha çok zarar vermektedir (45,60). Yüzey epiteli bir kez hasarlandıktan sonra alkali maddeler kolayca stromaya penetre olurlar, hızla proteoglikanları ve stromal matriksin kollajen liflerini yıkarlar (61). Alkali maddelerin göze difüzyonu ilerleyicidir ve korneadan başka trabeküler ağ, iris, siliyer cisim, lens, retina ve optik diske zarar verebilirler (45). Hidroksil iyonları kollajen liflerinde ödeme daha sonra kalınlaşmaya ve kısalmaya neden olurlar. Stromada ülserasyon meydana gelebilir. Ülserasyon oluşumunu etkileyen faktörler korneal epitel defekti, inflamasyon, proteolitik enzimlerin serbestleşmesi, anestezi, göz yaşı eksikliği ve kollajen sentezinin bozulmasıdır (62). Kimyasal yaralanmadan sonra ilk 12-24 saat içinde PMNL'ler ve monositler epitel hücreleri ve alkali maddenin yıktığı stromadan kaynaklanan kemotaktik ürünlerin etkisiyle yara yerine gelir. Persistan inflamasyon nedeniyle

epitel hücrelerinin hasarlı korneayı kaplaması geciktikçe degranüle olan PMNL'lerin enzimatik etkisiyle ve monosit lökosit sitokinlerin keratosit kollejenazları stimüle etmesiyle yaralanma sonrası 2. ve 3. haftalar boyunca stromada enzimatik sindirim devam eder.

Klinik olarak, kimyasal yaralanmaların –alkali yanıklar gibi- gecikmiş epitelizasyon, yüzeysel ve derin neovaskülarizasyonla birlikteliği iyi bilinmektedir (4,63). Alkali hasardan sonra keratositlerin anormal kollajenolitik aktiviteleri ve nötrofiller kornea dokusunu yıkmakta, geniş korneal ülserasyonlara neden olmaktadır. Ülserasyonlar ancak korneanın yeniden epitelizasyonu ya da yoğun neovaskülarizasyonla sonlanmaktadır (54). Alkali yanıklarda inflamasyona konjonktivalizasyon ve yeni damar yapıları eşlik etmektedir (64). Yüzeysel korneanın neovaskülarizasyonunda VEGF'nin rol oynadığı gösterilmiştir (65). Patofizyolojik değişiklikler nihai görme prognozunu etkilediğinden düzenlenen tedavi 1) oküler yüzeysel yaralanmasını, hasarını, farklılaşmayı 2) korneal stromal matriks hasarını, ülserasyonu 3) korneal ve stromal inflamasyonu göz önünde bulundurmalıdır (4).

2.4. Korneal Neovaskülarizasyon

Neovaskülarizasyon daha önce avasküler olan alanlarda yeni damarsal yapıların gelişmesidir. Neovaskülarizasyon süreci birbiriyle örtüşen muhtemel iki mekanizma içermektedir: 1) Vaskülogenezis, esas olarak embriyogenezis sırasında, kemik iliği kökenli anjioblastlardan yeni kan damarları oluşumudur. 2) Anjiyogenezis, varolan damarsal yapılardan yeni kan damarları oluşumudur (66,67). Gözün anatomik yapısında yoğun vaskülarize ve tamamen avasküler dokular bir arada bulunmaktadır. Oküler vasküler büyüme normalde embriyojenik gelişim içinde ortaya çıkmakta ve erişkin hayatta olmamaktadır (68). Neovaskülarizasyon ile birlikte olan göz hastalıklarında bu denge bozulmaktadır (69). Anjiyogenezis sık körlük yapan diyabetik retinopati, prematüre retinopati ve YBMD gibi hastalıklarda kritik rol oynar (70). Anjiyogenezin göz hastalıkları ve embriyonel retinal vaskülarizasyonda önemi uzun zamandır bilinmektedir. Anjiyogenezis oluşurken birçok olay basamaklar şeklinde birbirini izleyerek ortaya çıkmaktadır. İlk olarak anjiyogenezise neden olan bir uyarının oluşması (hipoksi, iskemi), daha sonra bu etkenden dolayı anjiyogenik bir faktörün salınması ve ilgili faktör ya da faktörlerin

de bazal membranı parçalaması (matriks metalloproteinaz enzimi aracılığıyla) söz konusudur. Bunu sırasıyla endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, migrasyonu, proliferasyonu ve tüp oluşumu takip eder. Sonuçta yeni kan damarlarının var olandan çoğalması gerçekleşir (71). Yeni tüp yapıda bazal membranın oluşması ve buna perisitlerin de katılmasıyla fonksiyonel kapiller oluşum tamamlanmaktadır (72). Anjiyogenezisi stimüle ve/veya inhibe eden, bir kısmı endojen ve sinerjistik olan birçok faktör ya da hormon tespit edilmiştir (Tablo 2.1.) (71).

Tablo 2.1. Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler.

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

Korneal neovaskülarizasyonun regülasyonu ve hücre adezyonu, kornea inflamasyonunun patogenezinde kritik faktörlerdir. Enfeksiyon, travma, kimyasal yanıklar, termal yanıklar ya da hipoksi neovaskülarizasyona neden olabilir (73). Korneal neovaskülarizasyonla ilişkili çeşitli inflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif ve travmatik hastalıklarda bu denge anjiyogenez yöne kayar ve yeni damarların oluşumuyla sonuçlanır. Dolayısıyla birçok hastalıkta anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozularak korneal neovaskülarizasyon indüklenebilir (Tablo 2) (9).

Tablo 2.2. Korneal neovaskularizasyonla ilişkili hastalıklar.

İnflamatuvar hastalıklar
Oküler pemfigoid
Atopik konjonktivit
Rozasea
Graft reddi
Lyell's Sendromu
Stevens-Johnson Sendromu
Graft Versus Host Hastalığı
Enfeksiyöz keratitler
Viral
Herpes simpleks
Herpes zoster
Bakteriyal
Pseudomonas
Chlamydia trachomatis
Sifiliz
Fungal
Kandida
Fusarium
Aspergillus
Parazitik
Onkoserkiyazis
Dejeneratif-Konjenital hastalıklar
Pterjium
Terrien marjinal dejenerasyonu
Aniridia
Travmatik-İatrojenik hastalıklar
Kontakt lensler
Alkali yanıklar
Ülserasyonlar
İatrojenik hasar
Limbal kök hücre yetmezliği

Korneal neovaskularizasyon esas olarak perikorneal pleksus venüllerinden ve kapillerlerinden filizlenir (74,75). Korneal neovaskularizasyonun şu iki klinik antitesi birbirinden ayırdedilmelidir; birincil olarak stromal keratitler ile ilişkili olan stromal neovaskularizasyon ve asıl oküler yüzey hastalıkları ile ilişkili, kornea periferi yüzeyinde bağ dokusu proliferasyonu ile oluşan vasküler pannus (76).

2.4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGF ilk olarak 1983 yılında yoğun damarlı tümörlerde tanımlanmış 46 kilodalton (kDa) ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir (77). Dört VEGF izoformu tanımlanmıştır (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆). VEGF₁₆₅ dokuların çoğunda bulunan, en sık rastlanan moleküler türüdür (78). Anjiyogenezin proliferasyon, migrasyon, proteolitik aktivite ve kapiller tüp oluşumu gibi birçok basamağını ilerleten, hem patolojik hem de normal anjiyogenezde rol alan potent bir anjiyogenik stimülatördür (79,80). VEGF aynı zamanda vasküler geçirgenliği artırmasından dolayı vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinmektedir (77,79,81). Vasküler geçirgenliği histaminden 5000 kat daha fazla artırma potent aktivitesine sahiptir (82). VEGF biyoaktivitesini, esas olarak endotel hücreleri ve daha az olarak da monosit ve makrofajlarca eksprese edilen, bilinen iki reseptör üzerinden gösterir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-1 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2 (83,84). VEGF'nin bu reseptörlere bağlanması vasküler geçirgenliği ve endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu sağlayan sinyal transdüksiyon kaskadını başlatır (85).

Ekzojen VEGF düşük inflamatuvar cevap ile ya da hiç inflamatuvar cevap olmadan deney hayvanlarında korneadaki anjiyogenezi güçlü bir şekilde uyarmaktadır (86). Kontakt lens kullananlarda, kornea travması ve transplantasyonu sonrası veya inflamatuvar durumlar sonucu oluşan patolojik korneal neovaskülarizasyonda bu faktörün rolü açık değildir. Son yıllarda VEGF'nin tavşan kornealarının saklandığı kültürde üretildiği ve iki haftalık atmosferik hipoksi sonrasında fare korneasında in vivo olarak artmış olduğu gösterilmiştir (87). Normal avasküler korneadan kaynaklanan epitel hücreleri VEGF üretmekte ancak vasküler kornea veya konjonktivadaki epitel hücrelerinin ürettiğinden daha düşük seviyede kalmaktadır. Bu bilgiler korneadaki anjiyogenezde VEGF'nin kısmen rolü olduğunu ileri sürmektedir (88,89).

Oküler anjiyogenezde kullanımı olan VEGF'ye yönelik monoklonal antikolar şunlardır:

Pegaptanib sodyum (Macugen®), YBMD'ye sekonder oküler neovaskularizasyon ve vasküler kaçak gelişiminde baskın rol oynayan VEGF₁₆₅ izoformuna selektif olarak bağlanıp, hem kan damarlarındaki büyümeyi hem de vasküler kaçığı inhibe eden sentetik bir oligonükleotiddir. Pegaptanib YBMD ile ilişkili patolojik koroidal neovaskularizasyonları tedavi etmek ve görme kaybını önlemek için geliştirilmiştir (90,91).

Ranibizumab (rhuFabV2, Lucentis®), VEGF'nin tüm izoformlarına bağlanmak, damar geçirgenliğini ve anjiyogenezisi bloke etmek üzere geliştirilmiş monoklonal antikör fragmanıdır. Ranibizumab VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₁₀ bağlanır ve inhibe eder. Ranibizumabın muhtemelen molekül yapısının küçüklüğü sayesinde retinanın tüm katlarını geçebildiği gösterilmiştir (92).

Bevasizumab (Altuzan®), VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanıp nötralize etme özelliğine sahip humanize monoklonal antikördür ve aşağıda daha ayrıntılı bahsedilmiştir (93).

2.4.1.1. Bevasizumab

Bevasizumab, insan VEGF'sine spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikördür. Bevasizumab, hümanize mürin antikörünün komplementer-determinant bölgeleri VEGF'ye bağlanan, insan antikörü temel bölgelerini içermektedir. Bevasizumab, gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Chinese Hamsterinin over memeli hücresi ekspresyon sisteminde rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur ve spesifik viral inaktivasyon ve çıkarılma aşamalarından oluşan bir süreç ile saflaştırılır. Bevasizumab 214 aminoasitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 149 kDa'dur. Bevasizumab, 5-florourasil/folinik asit veya 5-florourasil/folinik asit/irinotekan ile kombine olarak metastatik kolon ve metastatik rektum kanserinin birinci basamak tedavisinde kullanılır (93-97). Bevasizumab ülkemizde ve diğer ülkelerde göz hastalıklarında endikasyon dışı kullanılmaktadır.

2.4.2. Tümör Nekrozis Faktör- α

Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi, 19 multifonksiyonel sitokinden oluşan, inflamasyon ve apoptoziste önemli rol oynayan bir gen ailesidir (98). TNF ailesinin ilk tanımlanan alt tiplerinden TNF- α (kaşektin), esas olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve sekretuar formu 185 aminoasitten oluşan 17 kDa, membran formu ise 26 kDa olan bir proteindir. Diğer bir alt tipi TNF- β (lenfotoksin) ise 171 aminoasitten oluşan 18 kDa homotrimer yapıda bir glikoproteindir. TNF biyolojik aktivitesini iki reseptörü üzerinden gösterir: Tümör nekrozis faktör reseptör tip I (TNFR-I) ya da p55 çoğu biyolojik etkinin başlamasında rol alan, hücre tipli solübl tümör nekrozis faktör reseptörüdür (sTNFR). Tümör nekrozis faktör reseptör tip II (TNFR-II) ya da p75 ise hücre membranı ilişkili reseptörüdür (98-106).

TNF- α 'nın organizmadaki başlıca etkileri nötrofil ve T hücre aktivasyonu, natural killer hücrelerinin aktivitesinin arttırılması, kemotaksisin uyarılması, inflamasyonun akut faz cevabının uyarılması, endotel hücreleri üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunun uyarılması, çeşitli hücrelerden sitokin üretiminin uyarılması ve bazı hücre tiplerine güçlü sitotoksik etkidir. TNF- α bu etkilerinin yanı sıra apoptozun uyarılması, B hücrelerinin proliferasyonu ve maturasyonunun uyarılması, pirogenezis, septik şok, kemik rezorpsiyonu ve katabolizmanın artırılması gibi etkilere de sahiptir (106-110).

Kimyasal yanık olmuş kornealarda hücre reseptörleri artan sitokinlerden biri de TNF- α 'dır. Buna rağmen TNF- α 'nın hücrese cevapta oynadığı rol hala tam olarak aydınlatılamamıştır (28). Anti-TNF- α tedavisinin artritleri ve bazı üveit formlarını içeren immün aracılı hastalıklarda etkili olduğu gösterilmiştir (111-117). Korneada alkali yanık oluşturulmuş hayvan modellerinde TNF- α 'nın etkileri araştırılmıştır (28,118). Farelerde lazerin indüklediği koroidal neovaskülarizasyonda anti-TNF- α tedavisinin lezyonun boyutunu ve kaçığı azalttığı gösterilmiştir (33,34).

Anti-TNF- α monoklonal antikoru ajanlar İnfliximab, Etanercept, Adalimumab ve Certolizumab Pegol'dür.

İnfliximab (Remicade[®]), anti-TNF- α monoklonal antikordur. % 25 fındık faresi, % 75 insan immunoglobulin IgG1 antikorundan oluşturulmuş 149-kDa'luk kimerik yapıdadır (119).

Adalimumab (Humira[®]), sTNFR'ye bağlanarak etki gösteren insan kaynaklı rekombinan anti-TNF monoklonal antikordur (120).

Certolizumab pegol (Cimzia[®]) Chron's Hastalığı ve romatoid artrit tedavisi faz 3 klinik çalışmalarında olumlu sonuçlar vermiş, polietilen glikole kimyasal olarak bağlı Fab fragmanı içeren, yüksek afiniteye sahip insan kaynaklı anti-TNF monoklonal antikordur (121,122).

Etanercept (Enbrel[®]), TNF- α ve TNF- β 'ya bağlanarak reseptörlere erişmesini engelleyen rekombinan TNF- α reseptör füzyon proteini olarak dimerik yapıda üretilmiştir (123).

2.4.2.1. Etanercept

Etanercept rekombinan DNA teknolojisi ile üretilmiş, insan TNFR 2/p75 ve insan IgG1-Fc proteininin birleştirilmesi ile elde edilen bir füzyon proteindir. TNF, romatoid artrite bağlı enflamasyonda dominant sitokin işlevini görür. Etanercept, TNF'nin kompetitif inhibitörü olarak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını engeller ve biyolojik aktivitesini önler. TNF ve lenfotoksin iki ayrı hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan pro-inflamatuar sitokinlerdir. İki TNFR'de doğal olarak membrana bağlı ve çözünen formdadır. TNF ve lenfotoksinlerin biyolojik aktiviteleri hücre yüzeyindeki TNFR'lere çapraz biçimde bağlanmaları esasına dayanır. Etanercept gibi çözülen dimerik reseptörler, monomerik reseptörlere kıyasla TNF'ye daha yüksek bir afinite gösterirler ve kendi hücre reseptörlerine bağlanan TNF'nin çok daha güçlü kompetitif inhibitörleridir. Etanercept etkisini, TNF'nin hücre yüzeyindeki TNFR'lere bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ederek, biyolojik aktivitelerini yok edip, TNF'ye bağlı gelişen hücresel yanıtlarını önleyerek göstermektedir. Ayrıca etanercept, TNF'nin düzenlediği veya diğer moleküllerin (örneğin, sitokinler, adezyon molekülleri veya proteinazlar) kontrol ettiği biyolojik yanıtları da değiştirebilmektedir. Etanercept, romatoid artrit, poliartiküler tip juvenil kronik artrit, psoriatik artrit, ankilozan spondilit, psoriasis vulgaris tedavisinde kullanılır (33,94,124,125). Etanercept ülkemizde ve diğer ülkelerde göz hastalıklarında endikasyon dışı kullanılmaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

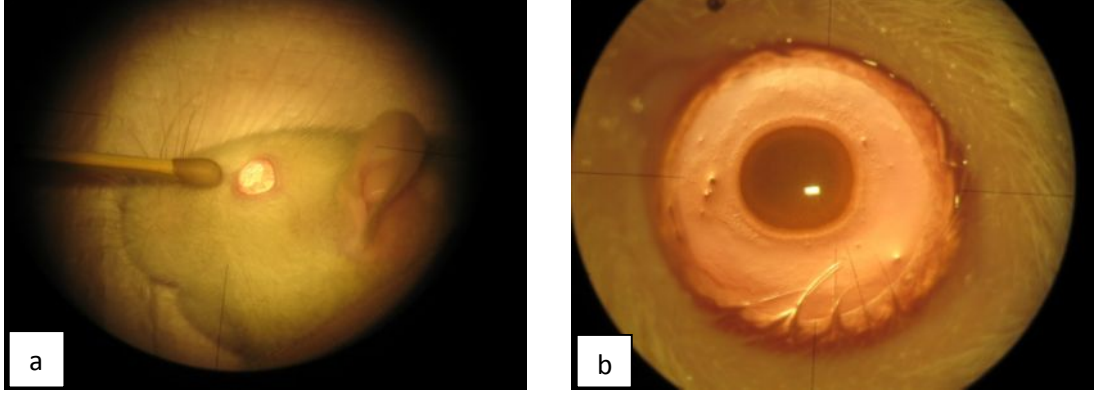
Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları A.D. ve Patoloji A.D. katkılarıyla, Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde (DETAB) gerçekleştirildi. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun HADYEK 1/4-2010 karar numaralı izni ile çalışma yapıldı. Ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen toplam 49 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan çalışmaya alındı. Çalışmayı tamamlayabilen 45 tanesi ile sonuçlar elde edildi. Tüm sıçanlar, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından ruhsatlandırılmış olan DETAB'da, ayrı gruplar halinde, ayrı kafesler içerisinde, optimum nem ve sıcaklıkta, uygun şartlarda ve standart koşullar altında tutuldu.

Sıçanlar her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize 7 gruba (kontrol, subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept, subkonjonktival bevasizumab+etanercept, topikal bevasizumab, topikal etanercept, topikal bevasizumab+etanercept) ayrıldı. Bevasizumab ile etanerceptin additif etkisini araştırmak için bu iki ilaç subkonjonktival bevasizumab+etanercept ile topikal bevasizumab+etanercept grubunda birlikte uygulandı.

Çalışmanın 1. gününde ölen subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept, subkonjonktival bevasizumab+etanercept ile topikal etanercept grubundan birer olmak üzere toplam 4 sıçan çalışma dışı bırakılıp, 45 sıçan ile çalışma tamamlandı.

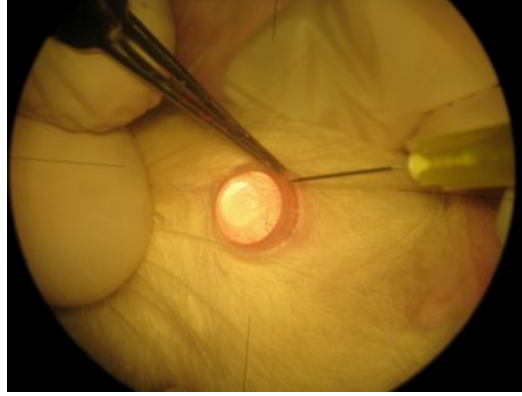
Kontrol grubundaki sıçanlarda dahil olmak üzere tüm sıçanların gözleri muayene edilerek her iki gözünde sağlam ve sağlıklı olan sıçanların sağ gözlerinin kornea santraline %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubukla (HemoStop, Hizmet Medikal, İstanbul) Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde 8 saniye süresince koter yapılarak yaklaşık 2 mm genişlikte kimyasal yanık oluşturuldu (126) (Şekil 3.1.). Kimyasal yanıklar anestezi ve analjezi uygulandıktan sonra Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobu altında yapıldı. Koterizasyondan sonra geride kalabilecek kimyasal partiküllerin ortamdan

uzaklaştırılması için kornea ve forniksler 10 ml % 0.9 sodyum klorür izotonik ile yıkanarak temizlendi.



Şekil 3.1. a) Gümüş nitrat çubuklarıyla kimyasal koterizasyon. b) Kimyasal koterizasyondan hemen sonraki görünüm.

Kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra sıçanlara subkonjonktival enjeksiyonlar yapıldı ya da damlalar damlatılmaya başlandı. Subkonjonktival enjeksiyonlar Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobu altında limbusun 2 mm gerisinden superior bulber konjonktiva altına 30 gauge ucu olan insülin enjektörü ile yapıldı (Şekil 3.2.). Kontrol grubundaki sıçanlar tedavisiz bırakıldı. Subkonjonktival bevasizumab grubundaki sıçanlara 0,05 ml (1,25 mg) bevasizumab ALTUZAN® Flakon 400 mg/16 ml konsantre infüzyon çözeltisi (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, İsviçre lisansı ile Genentech Inc., Güney San Fransisko, ABD) enjekte edildi. Subkonjonktival etanercept grubundaki sıçanlara 0,05 ml (1,25 mg) etanercept ENBREL® Flakon (Wyeth Laboratories, New Lane, Havant, İngiltere) enjekte edildi. Subkonjonktival bevasizumab+etanercept grubundaki sıçanlara 0,05 ml (1,25 mg) bevasizumab ve subkonjonktival 0,05 ml (1,25 mg) etanercept konjonktivanın farklı yerlerinden uygulandı. Topikal yolla tedavi edilen gruptakilere kornealarında kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra hazırlanan damlalar 1 hafta boyunca günde iki kez damlatıldı. Topikal bevasizumab grubundaki sıçanlara %0.9 sodyum klorür izotonik ile seyreltilerek 10 mg/ml dozunda hazırlanan bevasizumab damla damlatıldı. Topikal etanercept grubundaki sıçanlara enjeksiyonluk su ile sulandırılarak 10 mg/ml dozunda hazırlanan etanercept damla damlatıldı. Topikal bevasizumab+etanercept grubuna hazırlanan damlalar 10'ar dakika ara ile damlatıldı. Hazırlanan damlalar buzdolabında +4 derecede saklandı.



Şekil 3.2. Subkonjonktival enjeksiyonun yapılışı.

Tüm gruplarda kimyasal yanık oluşturulması, subkonjonktival enjeksiyon ve damla damlatılması işlemleri aynı araştırmacı (Ö.Ö.) tarafından yapıldı. Deney süresi tamamlanan sıçanlara önce izofluran ile inhalasyon anestezisi uygulandı, genel anestezisi sonrası intrakardiak yüksek doz ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorür verilerek sakrifiye edildi ve enükleasyon uygulandı.

3.1. Anestezi Tekniği





Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0.5'lik proparakain hidroklorid damla damlatıldı.

3.2. Kornea Yanık Alanlarının Değerlendirilmesi

Sıçanlar 8. günde sakrifiye edildikten sonra kornea kimyasal yanık alanları Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde belirlendi (126). Yanık dereceleri oluşan yanığın kabarıklığına göre 0 (kornea yüzeyinde kabarma yok), +1 (kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık), +2 (kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık), +3 (kornea yüzeyinde büyük kabarıklık) şeklinde derecelendirildi (Şekil 3.3.).

3.3. Korneal Neovaskularizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi

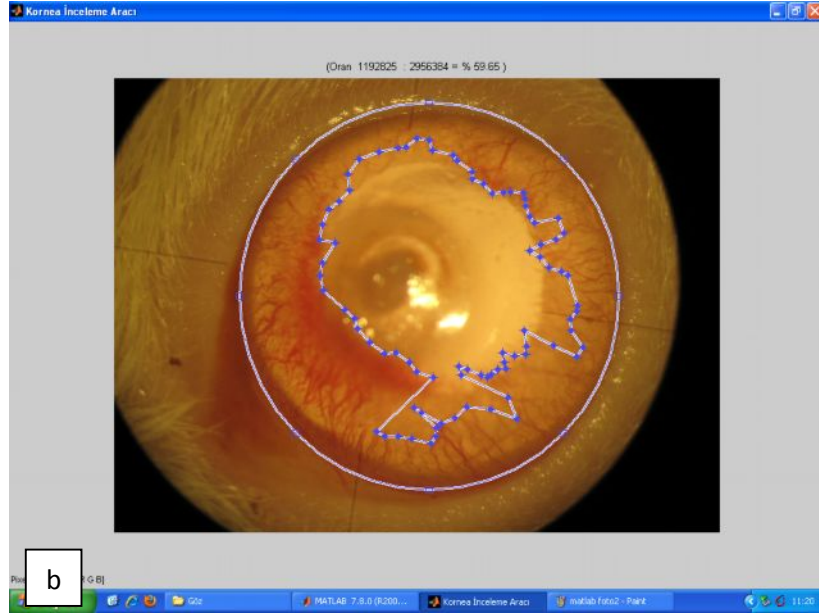
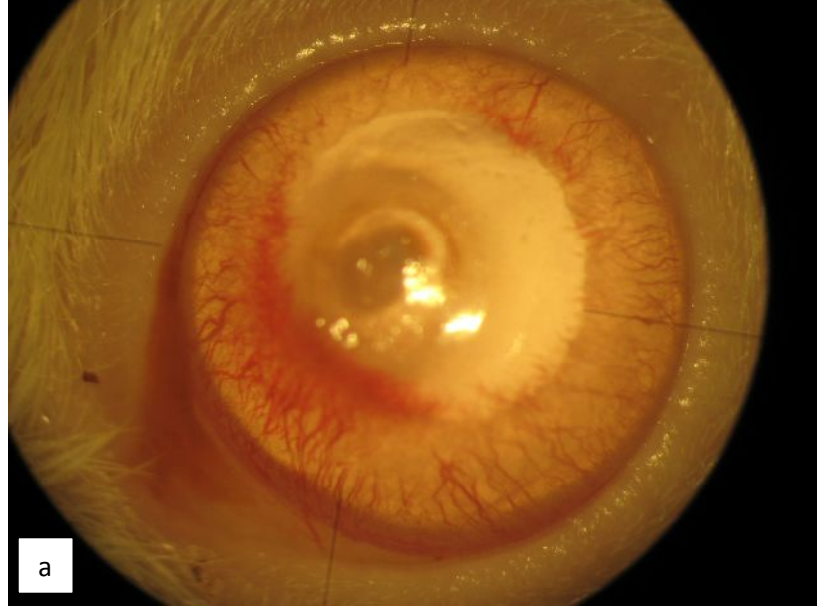
Deneyin 8. gününde tüm sıçan korneaları Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobu altında muayene edilerek korneal neovaskularizasyon dereceleri Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde belirlendi (126). Oluşan neovaskularizasyonun kornea yanık alanına uzaklığına göre: 0 (kornea yüzeyinde neovaskularizasyon yok), +1.5 (1/4 uzaklıkta), +2 (1/3 uzaklıkta), +3 (1/2 uzaklıkta), +4 (2/3 uzaklıkta), +4.5 (3/4 uzaklıkta), +6 (yanık alanına ulaşmış) şeklinde derecelendirildi (Şekil 3.3.).

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

Şekil 3.3. Mahoney ve Waterbury'nin tanımladığı yanık alanının ve korneal neovaskularizasyonun derecelendirilmesi (126).

Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobunun okülerinden aynı büyütmede Canon DIGITAL IXUS 70 fotoğraf makinesi ile fotoğraflar çekildi. Fotoğraflar

üzerinde neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Elektronik Bilgisayar Eğitimi Bölümü'nün katkılarıyla MATLAB R2007b version 7.5. (MathWorks, Natick, Massachusetts, ABD) programı kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. a) Dijital fotoğraf üzerinde b) MATLAB R2007b v7.5 programı kullanılarak hesaplanan neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

3.4. Histopatolojik İnceleme

Sakrifikasyon sonrası enükleasyon uygulanan sıçanlardan elde edilen gözler %10'luk formaldehitte dolu kaplara kondu. Fiksasyon sonrasında limbustan limbusa uzanan ve kornea santralinden geçen kesiler yapılarak örnekler alındı. Dokular yıkandı ve sırasıyla alkol, ksilen, parafin aşamalarından geçirildi. Daha sonra parafin bloklara gömüldü. 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler hematoksilin-Eosin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu ile çalışma gruplarını bilmeyen bir patolog (K.Y.) tarafından incelendi. Örnekler neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından değerlendirildi.

Örneklere +1 den +3'e kadar değerler verilerek bir derecelendirilme oluşturuldu. Neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu ve fibroblast aktivitesi bulunmayan örneklere – (negatif) değeri verildi.

Vaskülarizasyon Yoğunluğu:

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

İnflamasyon Yoğunluğu:

- + : Minimal ya da negatife yakın inflamasyon
- ++ : Fokal, az sayıda mikst tip inflamatuvar hücre (lenfosit, nötrofil lökosit, eozinofil lökosit)
- +++ : ++ ile +++ arasında kalan durumlar
- ++++ : Diffüz, yoğun mikst tip inflamatuvar hücre

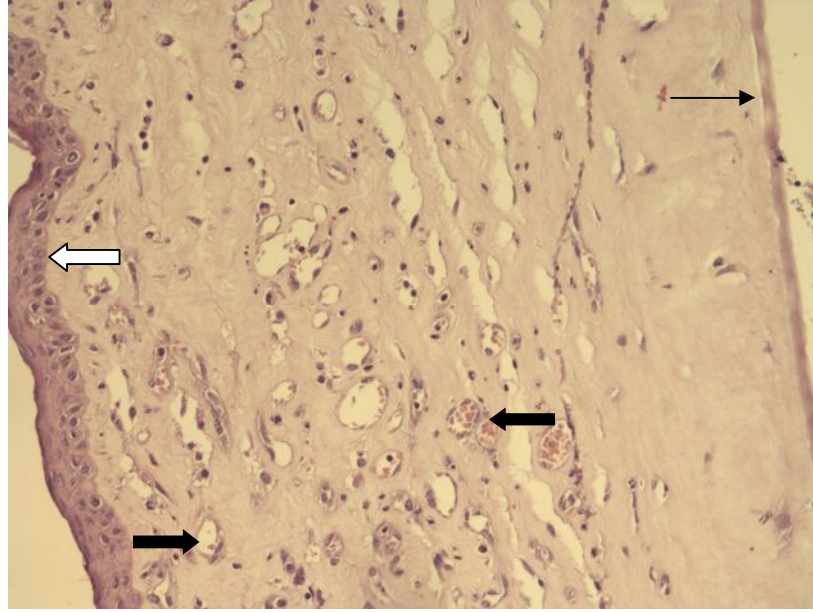
Fibroblast Aktivitesi:

+ : Minimal ya da negatife yakın fibroblast aktivitesi

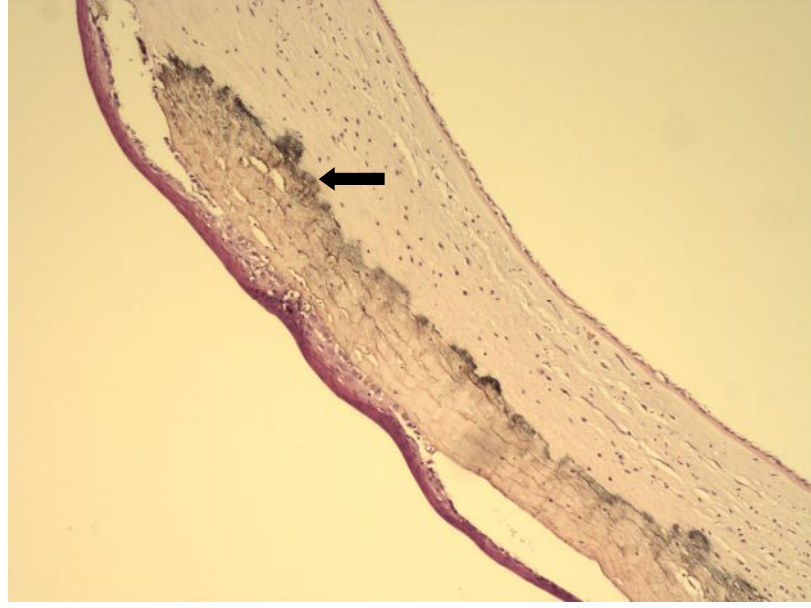
++ : Fokal fibroblast aktivitesi

+++ : ++ ile +++ arasında kalan durumlar

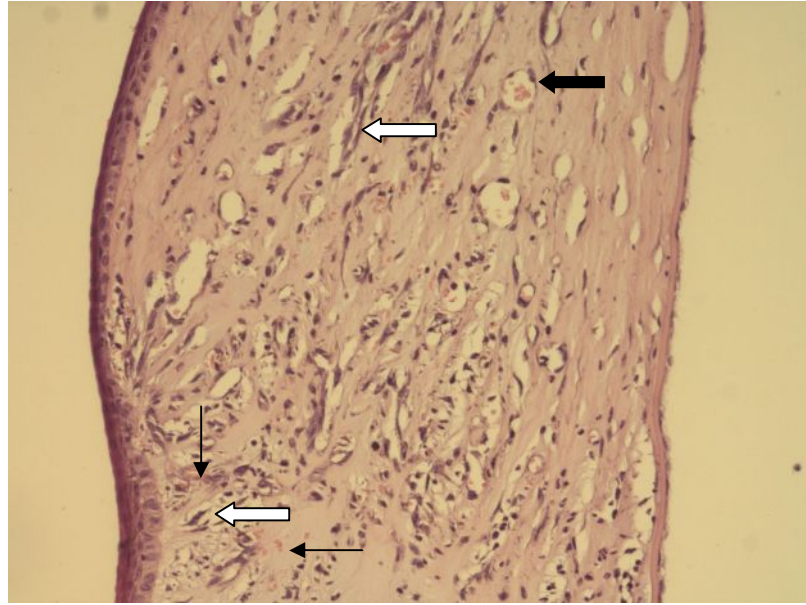
++++ : Yoğun ve yaygın fibroblast aktivitesi



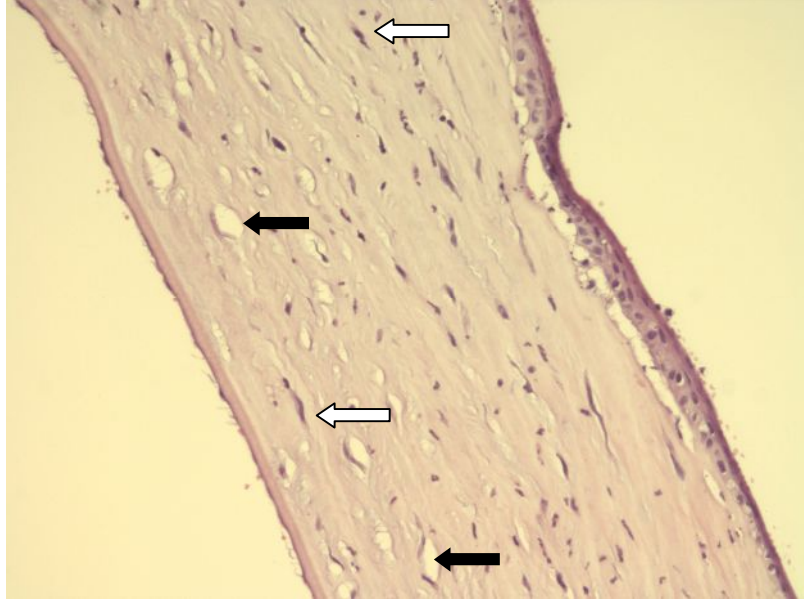
Şekil 3.5. Bu örnekte neovaskülarizasyonun derin stromaya kadar indiği, yoğun ve yaygın damarlanma olduğu görüldü. Vaskülarizasyon yoğunluğu ++++ olarak değerlendirildi. Siyah kalın oklar damar yapılarının kesitini ve içerisindeki boyanmış eritrositleri, beyaz kalın ok yanık skar alanında düzensiz ve kalınlaşmış re-epitelizasyonu, siyah ince ok hasarsız descemet membranını göstermektedir (Işık mikroskopu (IM), HE, x 400).



Şekil 3.6. Siyah kalın ok kimyasal yakın oluşturulurken stromayı boyayan gümüş pigmentlerini göstermektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +, inflamasyon yoğunluğu ++ ve fibroblast aktivitesi ++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 100)



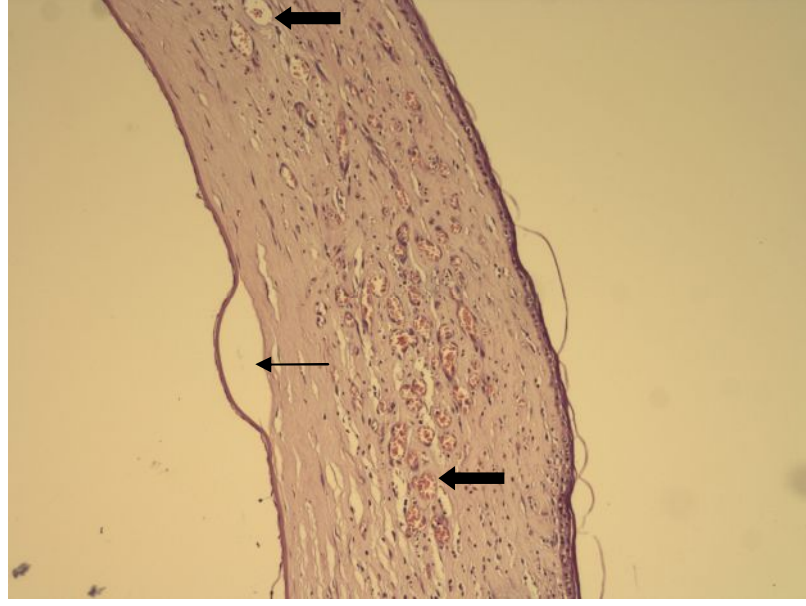
Şekil 3.7. Beyaz kalın oklar stromada artmış fibroblastları, siyah kalın ok kalın damar yapılarını, siyah ince oklar kapiller düzeyinde ince damar yapılarını göstermektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +++++, inflamasyon yoğunluğu +++ ve fibroblast aktivitesi +++++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 200)



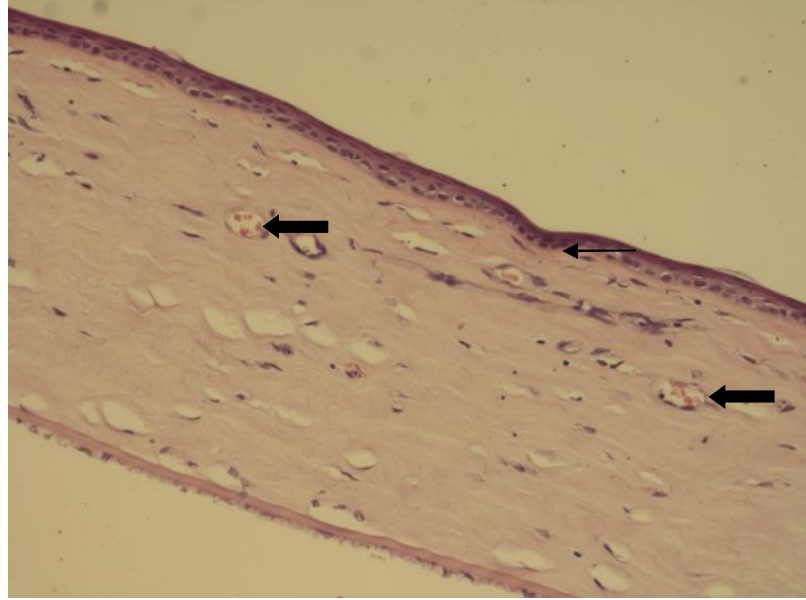
Şekil 3.8. Beyaz kalın oklar stromada artmış fibroblastları, siyah kalın oklar lameller arasında artefakt boşlukları göstermektedir. İnflamasyon yoğunluğu ++ ve fibroblast aktivitesi +++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 200)



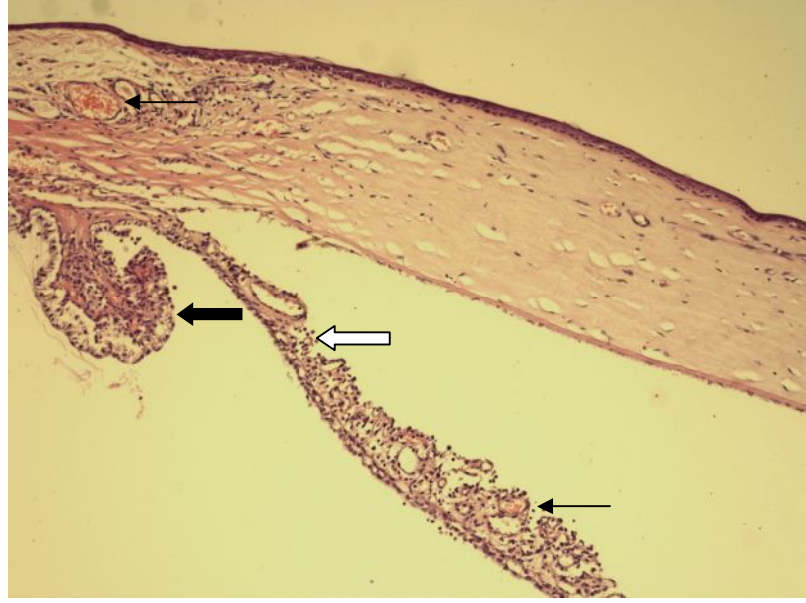
Şekil 3.9. Siyah kalın ok kimyasal yanık sonrası oluşan, üzeri re-epitelize olan subepitelyal vezikülü göstermektedir. Siyah ince ok lezyonda çok sayıda bulunan nötrofilleri işaret etmektedir. İnflamasyon yoğunluğu +++ değerlendirildi. (IM, HE, x 100)



Şekil 3.10. Siyah kalın ok yeni damarları ve içerisindeki boyanmış eritrositleri göstermektedir. Siyah ince ok descemet dekolmanına işaret etmektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +++++, inflamasyon yoğunluğu +++ ve fibroblast aktivitesi +++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 100)



Şekil 3.11. Siyah kalın ok yeni damarları ve içerisindeki boyanmış eritrositleri, siyah ince ok bowman tabakasında çatlak artefaktını göstermektedir. Vaskülarizasyon yoğunluğu +++++, inflamasyon yoğunluğu +++ ve fibroblast aktivitesi +++++ olarak değerlendirildi. (IM, HE, x 200)



Şekil 3.12. Siyah kalın ok silyer cismi, beyaz kalın ok irisi, siyah ince oklar ise sklera-korneal ve iris üzerinde genişlemiş ya da yeni oluşmuş damarları göstermektedir. (IM, HE, x 100)

3.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları alındı. Çalışmanın istatistiksel analizini Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 16 (SPSS, Windows versiyon 16) paket programı ile yapıldı. Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi analiz edilirken gruplar arası çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanıldı. İstatistiksel açıdan anlamlı fark görüldüğünde farklılığın hangi grupta ilişkili olduğunu belirlemek için gruplar arası ikili karşılaştırma Mann-Whitney U Testi ile yapıldı. Belirli bir derece sınıflandırılması kullanılarak yapılan diğer değerlendirilmelerde ise grupları birbirleri ile karşılaştırmak için Chi-Square Testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

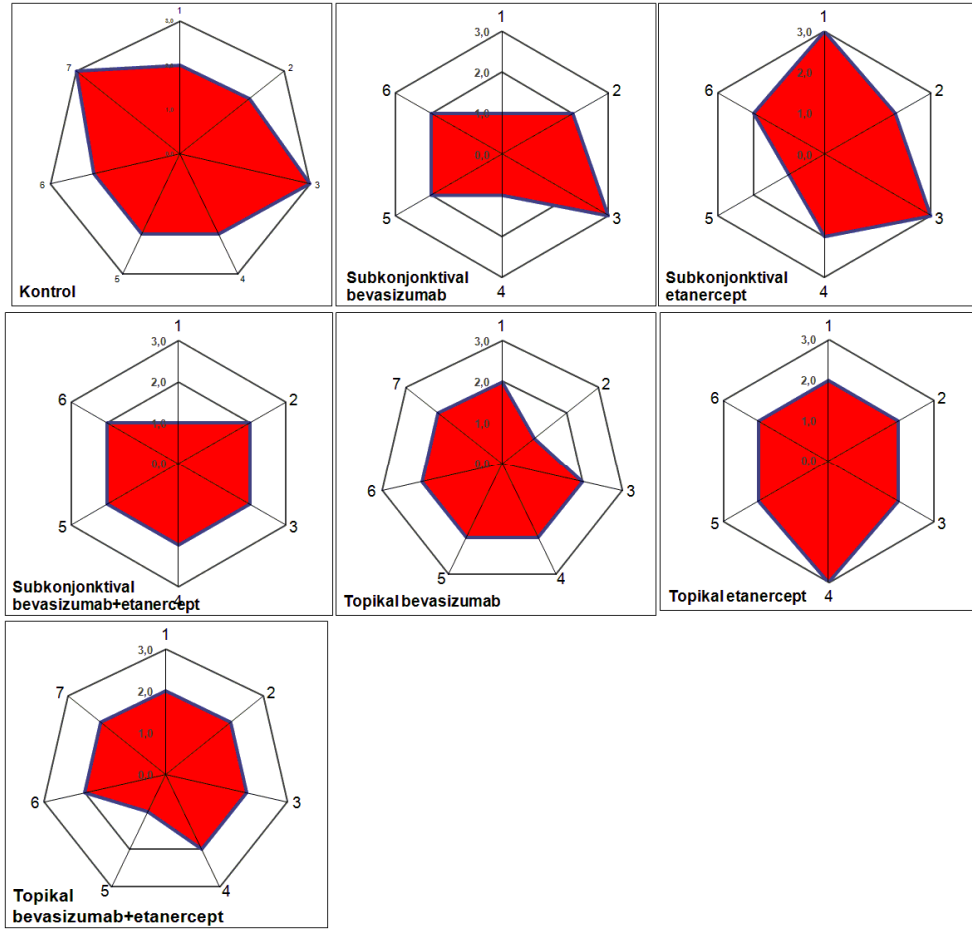
4.1. Kornea Yanık Alanlarının Karşılaştırılması

Kornealarda oluşan yanık alanları tüm sıçanlarda Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildi. Elde edilen veriler tüm sıçanlar için aşağıdaki gibidir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Gruplardaki sıçanların kornea yanık alanları dereceleri.

Gruplar\sıçan no	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	2	2	3	2	2	2	3
Subkonjonktival bevasizumab	1	2	3	1	2	2	
Subkonjonktival etanercept	3	2	3	2	1	2	
Subkonjonktival bevasizumab+etanercept	1	2	2	1	2	2	
Topikal bevasizumab	2	1	2	2	2	2	2
Topikal etanercept	2	2	2	3	2	2	
Topikal bevasizumab+etanercept	2	2	2	2	1	2	2

Kornea yanık alanları dereceleri tüm sıçan gözlerinde +1 ve üzerindedir. Gruplar kontrol grubuyla ve gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi, kornealarda oluşan yanık alanları açısından grupların elde ettiği dereceler benzerdi ($p>0.05$) (Şekil 4.1.).



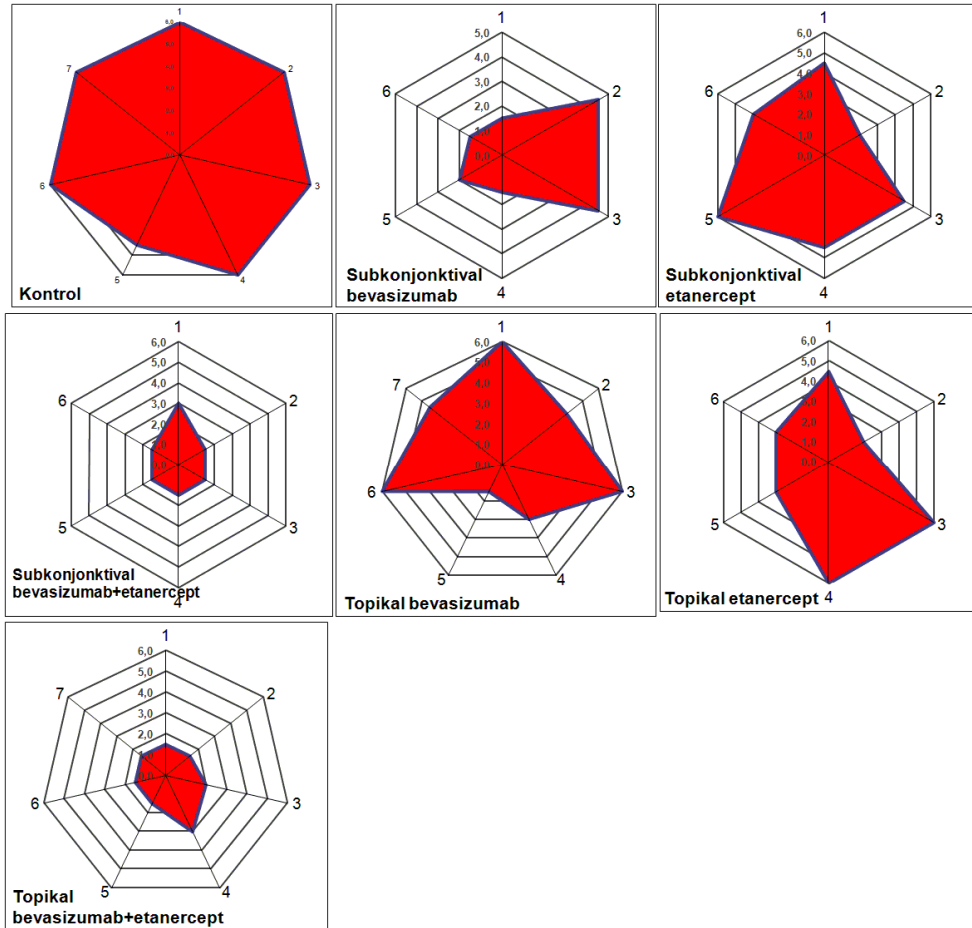
Şekil 4.1. Gruplardaki sıçanların kornea yanık alanları derecelerinin grafikte gösterimi.

4.2. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması

Gruplardaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildi (Tablo 4.2.) (Şekil 4.2.).

Tablo 4.2. Gruplardaki sıçanların korneal neovaskularizasyon dereceleri.

Gruplar\sıçan no	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	6	6	6	6	4.5	6	6
Subkonjonktival bevasizumab	1.5	4.5	4.5	1.5	2	1.5	
Subkonjonktival etanercept	4.5	2	4.5	4.5	6	4	
Subkonjonktival bevasizumab+etanercept	3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
Topikal bevasizumab	6	4	6	3	1.5	6	4.5
Topikal etanercept	4.5	2	6	6	3	3	
Topikal bevasizumab+etanercept	1.5	1.5	2	3	1.5	1.5	1.5



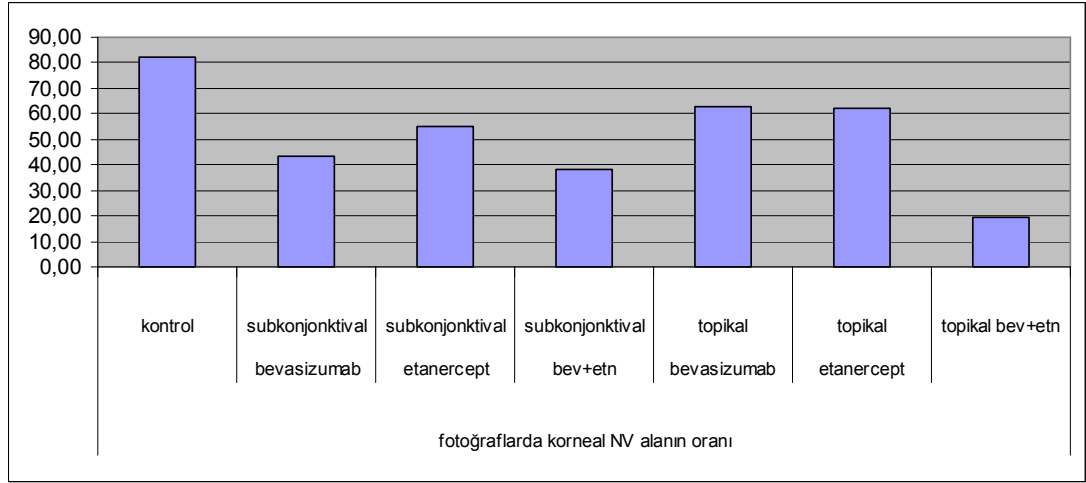
Şekil 4.2. Sıçanların korneal neovaskularizasyon derecelerinin grafik gösterimi.

Tedavi gruplarındaki sıçanların korneal neovaskülarizasyon dereceleri kontrol grubunun dereceleri ile karşılaştırıldı. Tüm grupların elde ettiği dereceler kontrol grubundan daha düşüktü. Fakat subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept, subkonjonktival bevasizumab+etanercept ile topikal bevasizumab+etanercept grubunda istatistiksel açıdan fark anlamlı düzeye ulaşıyordu ($p<0.05$). Subkonjonktival additif grup ile subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept ve topikal additif grup karşılaştırıldığında subkonjonktival additif grubun subkonjonktival etanercept grubundan üstün ($p<0.05$), subkonjonktival bevasizumab ve topikal additif grupla benzer olduğu görüldü. Topikal additif grup ile topikal bevasizumab ve topikal etanercept grubu karşılaştırıldığında aralarında fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

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

Tablo 4.3. Gruplardaki sıçanların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

Gruplar\sıçan no	1	2	3	4	5	6	7	ortalama± SD
Kontrol	76	81	94	78	76	85	87	82.42±6.65
Subkonjonktival bevasizumab	23	65	64	35	44	30		43.50±17.64
Subkonjonktival etanercept	60	40	58	66	54	51		54.83±8.90
Subkonjonktival bevasizumab+etanercept	44	54	44	52	13	22		38.16±16.76
Topikal bevasizumab	70	43	65	67	67	71	58	63.00±9.78
Topikal etanercept	58	40	73	79	60	63		62.16±13.52
Topikal bevasizumab+etanercept	14	25	39	30	8	13	8	19.57±11.95



Şekil 4.3. Tüm grupların fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi.

Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi analiz edildiğinde, istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı fark görüldü ($p=0.00$). Farklılığın hangi gruplarla ilişkili olduğunu belirlemek için gruplar arası ikili karşılaştırma yapıldı (Tablo 4.4.).

Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi açısından tedavi grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunduğu, tüm tedavilerin etkili olduğu görüldü ($p<0.05$). Subkonjonktival uygulama ile topikal uygulama karşılaştırıldığında, subkonjonktival bevasizumab tedavisi ile topikal bevasizumab tedavisi arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunduğu ($p<0.05$), topikal additif tedavinin subkonjonktival additif tedaviden üstün olduğu fakat aralarındaki istatistiki farkın anlamlıya yakın olduğu ($p=0.053$), etanercept grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadığı görüldü ($p>0.05$). Bevasizumab grubu ile etanercept grubu karşılaştırıldığında birbirlerine üstünlükleri olmadığı görüldü ($p>0.05$). Bevasizumab grubu ile bevasizumab+etanercept grubu karşılaştırıldığında ise topikal additif tedavinin topikal bevasizumab tedavisinden daha başarılı olduğu saptandı ($p<0.05$). Subkonjonktival bevasizumab ile subkonjonktival additif tedavi arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$). Etanercept grubu ile bevasizumab+etanercept grubu karşılaştırıldığında topikal additif tedavinin topikal

etanercept tedavisinden daha başarılı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Subkonjonktival etanercept ile subkonjonktival additif tedavi arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($p > 0.05$).

Tablo 4.4. Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi ve gruplar arasında karşılaştırılması.

	Subkonjonktival uygulama (ortalama± SD)	Topikal uygulama (ortalama± SD)	p7
Kontrol	82.42±6.65	82.42±6.65	
Bevasizumab	43.50±17.64	63.00±9.78	0.026*
Etanercept	54.83±8.90	62.16±13.52	0.227
Bevasizumab+etanercept	38.16±16.76	19.57±11.95	0.053
p1	0.003*	0.002*	
p2	0.003*	0.010*	
p3	0.003*	0.002*	
p4	0.262	0.830	
p5	0.629	0.002*	
p6	0.650	0.003*	

p1: kontrol grubu ile bevasizumab grubunun karşılaştırılması.

p2: kontrol grubu ile etanercept grubunun karşılaştırılması.

p3: kontrol grubu ile bevasizumab+etanercept grubunun karşılaştırılması.

p4: bevasizumab grubu ile etanercept grubunun karşılaştırılması.

p5: bevasizumab grubu ile bevasizumab+etanercept grubunun karşılaştırılması.

p6: etanercept grubu ile bevasizumab+etanercept grubunun karşılaştırılması.

p7: subkonjonktival uygulama ile topikal uygulamanın karşılaştırılması.

*: $p < 0.05$

4.3. Histopatolojik İnceleme

Örneklerin neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından histopatolojik inceleme sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.5.).

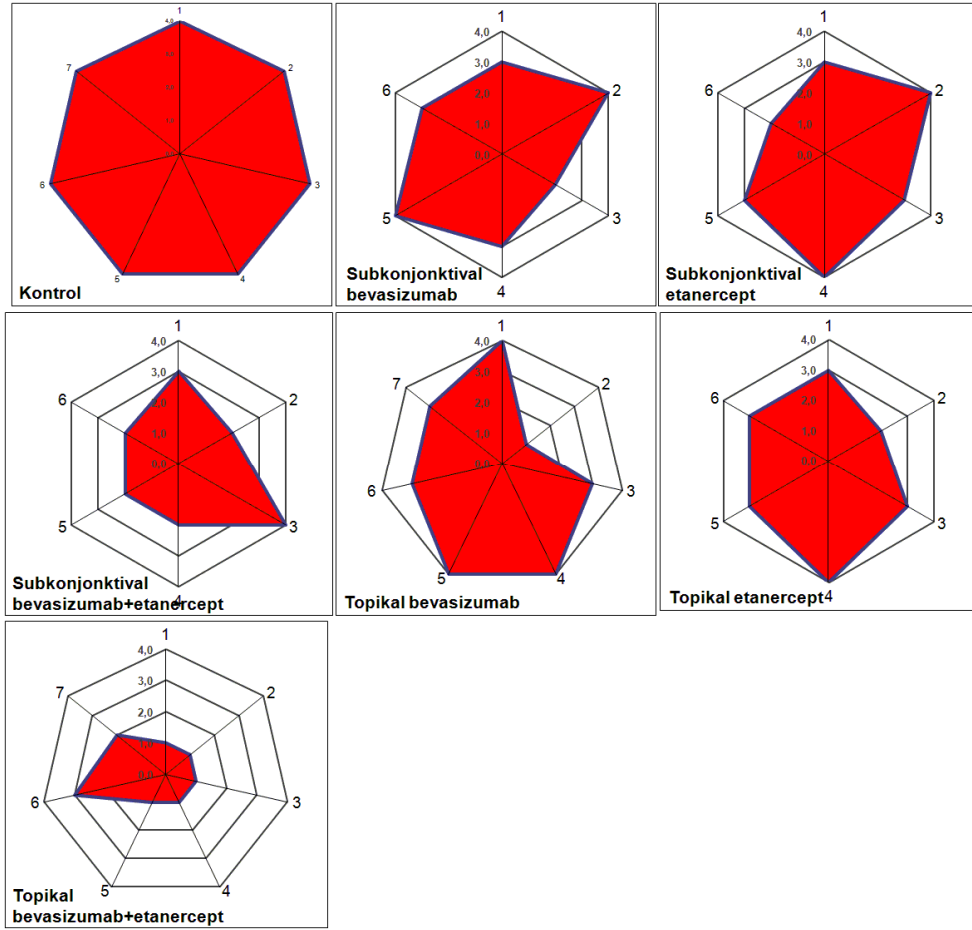
Tablo 4.5. Histopatolojik inceleme sonuçları.

Gruplar	Sıçan no	Neovaskülarizasyon yoğunluğu	İnflamasyon yoğunluğu	Fibroblast aktivitesi
Kontrol	1	++++	++++	+++
	2	++++	++++	++++
	3	++++	++++	+++
	4	++++	++++	+++
	5	++++	++++	++++
	6	++++	++++	++++
	7	++++	++++	++++
Subkonjonktival bevasizumab	1	+++	++	++
	2	++++	++	+++
	3	++	++	++
	4	+++	+++	++
	5	++++	++++	++++
	6	+++	++	++
Subkonjonktival etanercept	1	+++	++++	++++
	2	++++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
	4	++++	++++	+++
	5	+++	+++	+++
	6	++	+++	+++

Subkonjonktival bevasizumab+etanercept	1	+++	+++	++++
	2	++	++	++
	3	++++	+++	+++
	4	++	++	++
	5	++	++	++
	6	++	++++	++
Topikal bevasizumab	1	++++	+++	++++
	2	+	+++	+++
	3	+++	+++	+++
	4	++++	++++	++++
	5	++++	++++	+++
	6	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++
Topikal etanercept	1	+++	++++	+++
	2	++	+++	++
	3	+++	+++	+++
	4	++++	++++	++++
	5	+++	+++	+++
	6	+++	+++	+++
Topikal bevasizumab+etanercept	1	+	++	++
	2	+	+	+
	3	+	++	++
	4	+	+	+
	5	+	++	++
	6	+++	+++	+++
	7	++	+++	+++

Tedavi gruplarındaki sıçanların histopatolojik incelemelerde neovaskülarizasyon yoğunluğu kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept, subkonjonktival bevasizumab+etanercept, topikal etanercept, topikal bevasizumab+etanercept grubunda neovaskülarizasyon

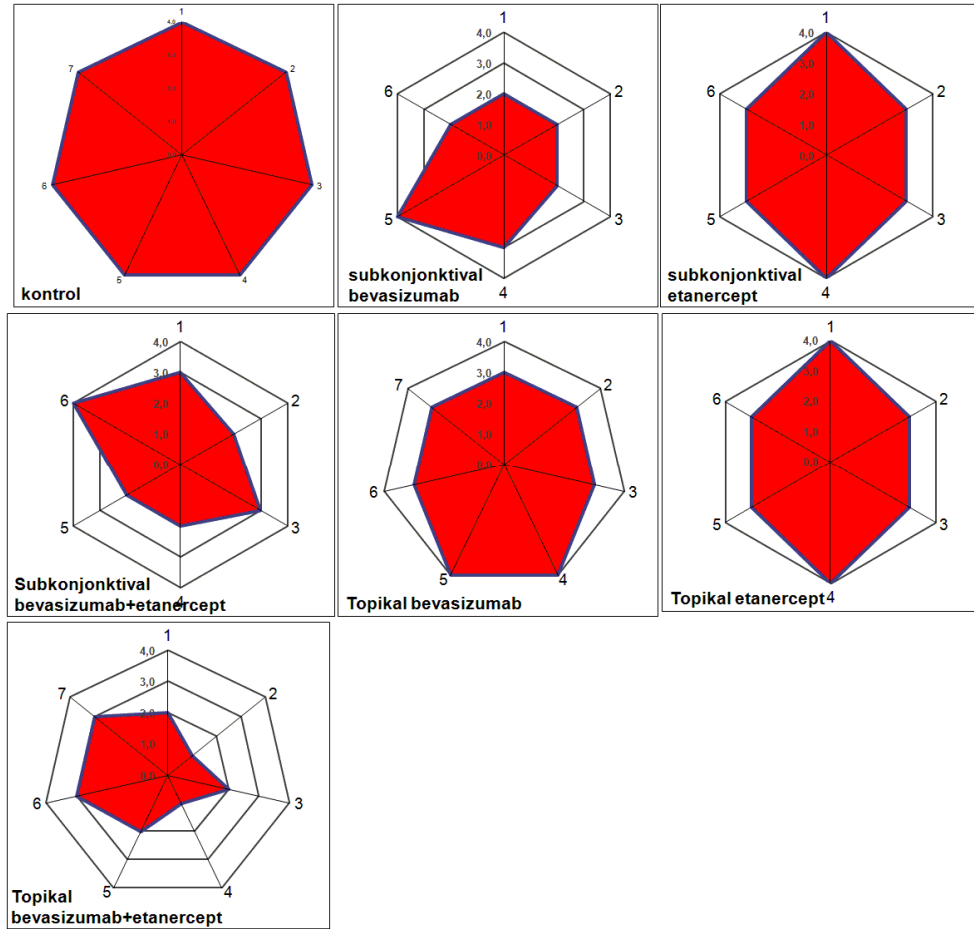
yoğunluğu kontrol grubuna göre daha az bulundu, istatistiksel açıdan fark anlamlıydı ($p<0.05$). Topikal bevasizumab grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlıya yakın olduğu görüldü ($p=0.061$). Diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). Fakat topikal bevasizumab+etanercept grubu ile subkonjonktival bevasizumab+etanercept, topikal bevasizumab, topikal etanercept grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlıya yakın olduğu, topikal additif tedavinin daha iyi sonuçlar verdiği görüldü ($p=0.051$, $p=0.053$, $p=0.051$, sırasıyla) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre neovaskülarizasyon yoğunluğu.

Histopatolojik incelemeler sonucunda tüm gruplar inflamasyon yoğunluğu açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Tüm tedavi gruplarında inflamasyon yoğunluğu kontrol grubundan daha düşük bulundu, istatistiksel açıdan fark

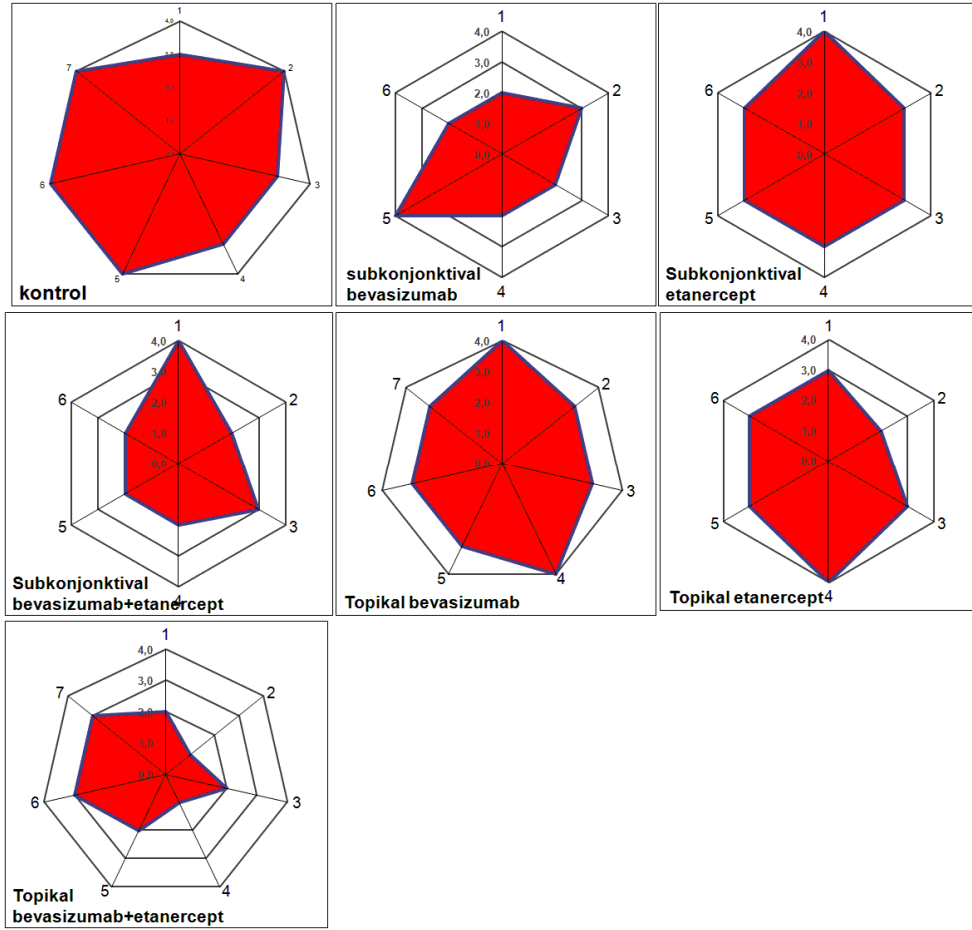
anlamlydı ($p<0.05$). Subkonjonktival bevasizumab ile subkonjonktival etanercept ve topikal bevasizumab grupları karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu, subkonjonktival bevasizumab tedavisinin daha etkili olduğu görüldü ($p<0.05$). Topikal additif tedavinin topikal bevasizumab tedavisinden daha başarılı olduğu ($p<0.05$), topikal etanercept tedavisi ile arasındaki farkın anlamlıya yakın olduğu bulundu ($p=0.054$). Diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre inflamasyon yoğunluğu.

Tedavi gruplarındaki fibroblast aktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival bevasizumab+etanercept ve topikal bevasizumab+etanercept gruplarında fibroblast

aktivitesinin daha az olduğu görüldü ($p<0.05$). Subkonjonktival etanercept, topikal bevasizumab ve topikal etanercept grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadığı saptandı ($p>0.05$). Subkonjonktival bevasizumab ile topikal bevasizumab ve subkonjonktival etanercept grupları karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu, subkonjonktival bevasizumab tedavisinin daha etkili olduğu görüldü ($p<0.05$). Subkonjonktival additif tedavinin subkonjonktival etanercept tedavisinden daha iyi olduğu ($p<0.05$) fakat subkonjonktival bevasizumab tedavisi ile aynı sonuçları verdiği görüldü ($p=1.00$). Topikal additif tedavinin topikal bevasizumab tedavisinden daha etkili olduğu görüldü ($p<0.05$). Subkonjonktival additif tedaviyle topikal additif tedavi arasında fark olmadığı bulundu (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Gruplardaki sıçanların histopatolojik inceleme sonuçlarına göre fibroblast aktivitesi.

5. TARTIŞMA

Sağlıklı insan korneasında herhangi bir damar yapısı bulunmamaktadır. Ancak çeşitli patolojiler sonucunda korneada derin ya da yüzeysel vaskülarizasyonlar oluşabilmektedir. Bu damarlar görme seviyesini olumsuz yönde etkilemekte, inflamasyon oluşturmakta ve kornea nakli gibi ameliyatların prognozu üzerinde olumsuz etki yapmaktadır (65,127-129). Korneal neovakülarizasyonu tedavi etmek için klinisyenler medikal ya da cerrahi yöntemler uygulamaktadır. Topikal kortikostreoidler proliferen olan korneal damarların baskılanmasında temel tedavidir (126,130-132). Streoidlerin yanısıra non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar, rapamisin, siklosporin A ve metotreksat da klinikte kullanılmaktadır (133,134). Cerrahi tedaviler damarları tıkamayı hedefleyen argon lazer, elektro-koagülasyon, fotodinamik tedavi ile oküler yüzeyi onaran konjonktival, limbal ve amniyon zar transplantasyonunu içerir (9).

VEGF'nin oküler anjiyogenezin bütün formlarında, insanlarda ve hayvan modellerinde korneal neovakülarizasyonda etkili bir faktör olduğu bulunmuştur (11-13). VEGF proteolitik aktivite, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve kapiller tüp oluşumu olmak üzere anjiyogenezin birçok basamağında etkili olmaktadır (9). Son yıllarda VEGF inhibitörleri retina, koroid, iris ve kornea neovaskülarizasyonlarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. İnsan VEGF'sine spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden, rekombinant hümanize monoklonal antikor olan bevasizumab insanlarda korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde öne çıkmaktadır. Bevasizumab önceki çalışmalarda topikal ve subkonjonktival uygulanarak çalışılmış fakat bu iki kullanım yolunu karşılaştıran çalışma sayısı sınırlı kalmıştır (135,136).

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre hem subkonjonktival bevasizumab hem de topikal bevasizumab tedavisi etkili bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar hayvan modellerinde benzer yöntemler uygulanarak yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçları desteklemektedir. Şener'in çalışmasında sıçan kornealarında kimyasal yanıkla neovaskülarizasyon oluşturulmuş ve yanık oluşturulduktan hemen

sonra subkonjonktival 0,05 ml (1,25 mg) bevasizumab bir kez uygulanmıştır. Deneyin birinci haftasında fotoğraflar üzerinde neovaskülarizasyon yüzdesi ve histopatolojik örnekler incelenmiştir. Sonuç olarak subkonjonktival bevasizumab uygulanan grupta korneal neovaskülarizasyon % 50'ye, kontrol grubunda % 80'e yakın çıkmıştır. Korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde subkonjonktival bevasizumabın etkili bir tedavi olduğu bildirilmiştir (22). Hürmeriç'in 2009 yılında kobaylarda kimyasal koterizasyon yaptıktan hemen sonra bir kez 1 mg subkonjonktival bevasizumab uygulayarak yaptığı çalışmanın 10. gününde korneal neovaskülarizasyonun kapladığı yüzey alanı % 59, kontrol grubunda % 73 bulunmuştur (137). Hürmeriç'in 2008 yılında yine kobaylarla yaptığı bir başka çalışmada gruplardan birine subkonjonktival bevasizumab kimyasal koterizasyon yapıldıktan hemen sonra ve 3. günde, gruplardan diğerine 3. ve 5. günde yapılmıştır. Deneyin 10. gününde birinci grupta korneal neovaskülarizasyonun kapladığı yüzey alanı % 15, ikinci grupta % 19, kontrol grubundaysa % 23 bulunmuş, koterizasyonda hemen sonra başlanan tedavinin daha etkili olduğunu bildirilmiştir. Bu veriler çalışmamızda fotoğraflar üzerinde neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesinin incelenmesiyle elde ettiğimiz sonuçlarla benzerdir. Bu çalışmalarda fotoğraflar üzerinde korneal neovaskülarizasyonun hesaplanmasında farklı bilgisayar programları kullanılmaktadır. Şener'in çalışmasında dijital bilgisayar imaj analizi, Hürmeriç'in çalışmalarında Adobe Photoshop programı kullanılmıştır. Bu bilgisayar programları fotoğraflar üzerinde korneal neovaskülarizasyonu kantitatif ya da semi-kantitatif yöntemlerle ölçmektedir. Çalışmamızda kullandığımız Matlab Programı neovaskülarizasyonun kornea üzerinde ulaştığı sınırların çalışmacı tarafından belirlenmesine imkan vermesi nedeniyle tercih edilmiştir. İlk kullanılan korneal neovaskülarizasyonu değerlendirme yöntemlerinden birisi de Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlanan yöntemdir (126). Sıçanlara uygulanan bu yöntemde kimyasal koterizasyondan sonra ortaya çıkan korneal neovaskülarizasyon ile santraldaki yanık alanı arasındaki mesafe derecelendirilmektedir. Hürmeriç'in bu yöntemi kullanarak subkonjonktival bevasizumab ile pegaptanib sodyumu karşılaştırdığı çalışmada en az neovaskülarizasyon derecesi bevasizumab grubunda elde edilmiştir (137).

Anjiyogenezde monosit, fibroblast gibi kollajen matriksin yıkımı sonrası ortaya çıkabilen birçok ajan rol almaktadır (138). Şener'in çalışmasında neovaskularizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından subkonjonktival bevasizumab tedavisi kontrol grubuna göre daha başarılı bulunmuştur (22). Oh % 100 alkolle kimyasal yanık oluşturulan sıçan kornealarına uygulanan subkonjonktival bevasizumabın inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve sitokinleri azalttığını bildirmiştir (139). Çalışmamızda histopatolojik örneklerde neovaskularizasyon yoğunluğunun yanısıra neovaskularizasyon patogenezinde rol oynayan fibroblastlar, PMNL'ler, monositler, lenfositler, eozonofiller ve nötrofiller de incelendi.

Subkonjonktival bevasizumab tedavisi çeşitli korneal hastalıklara bağlı oluşan korneal neovaskularizasyonların tedavisinde endikasyon dışı kullanılmaktadır. Erdurmuş'un birisi kuru göz nedeniyle oluşan filamentöz keratite diğeri kornea graft reddine bağlı gelişen korneal neovaskularizasyon bulunan iki hastalı vaka serisinde hastalar subkonjonktival 2,5 mg (0,01 ml) bevasizumab ile tedavi edilmiştir. Hastalar yarıklı lamba ve kornea fotoğraflarıyla takip edilip, birinci hafta sonuçları yayımlanmıştır. Korneal neovaskularizasyonun ilk vakada anlamlı şekilde azaldığı, ikinci vakada küçük damarlarda gerileme olduğu fakat büyük ana damarda değişiklik olmadığı, sonuç olarak subkonjonktival bevasizumabın tedaviye eklenebileceğini bildirilmiştir (140).

Korneal neovaskularizasyon tedavisinde bevasizumabın diğeri bir uygulama şekli de topikal yolla uygulamadır. Manzano sıçanlarla yaptığı çalışmada günde iki kez 4mg/ml topikal bevasizumab damla uygulamasının kimyasal yanık sonrası oluşturulan korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (21). Koenig çeşitli oküler hastalıklara sekonder gelişen korneal neovaskularizasyon tedavisinde 5mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bevasizumab göz damlasını günde beş kez uygulamış ve korneal neovaskularizasyonun inhibisyonunda ve damar çapının azalmasında topikal bevasizumab uygulamasının etkili olduğu ve iyi tolere edildiği sonucuna ulaşmıştır (23).

Topikal bevasizumab tedavisinin pozolojisi konusunda farklı görüşler mevcuttur. Çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 12.5

mg/ml ve 25 mg/ml gibi farklı konsantrasyonlarda topikal bevasizumab kullanılmıştır (14,15,21,25,26,141). Habet-Wilner kimyasal yanıkla korneal neovaskularizasyon oluşturulan ratlarda farklı konsantrasyonlarda kazırlanan (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml) ve günde iki kez uygulanan topikal bevasizumab tedavilerini karşılaştırmıştır. Sonuç olarak 4 mg/ml konsantrasyonunun yeterli olduğunu diğer konsantrasyonların etkisiz kaldığını bildirmiştir (142). DeStafeno iki hastaya 6 ay boyunca günde 4 kez uyguladıkları 10 mg/ml konsantrasyonundaki topikal bevasizumab tedavisinin korneal neovaskularizasyonu geriletmede başarılı olduğunu ve herhangi oküler yan etkiye rastlanmadığını bildirmiştir (141). Çalışmamızda 10 mg/ml dozunda hazırlayıp, günde iki kez damlatılan topikal bevasizumab tedavisi etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesine bakıldığında subkonjonktival bevasizumab tedavisi topikal bevasizumab tedavisinden daha iyi sonuçlar vermiştir. Literatürde subkonjonktival ile topikal bevasizumab tedavisini karşılaştıran çalışmalar mevcuttur. Abdulgani tavşanlarda oluşturulan deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde tek doz yapılan 5 mg (0.2 ml) ve 10 mg (0.4 ml) subkonjonktival bevasizumab ile günde 3 kez damlatılan 12.5 mg/ml topikal bevasizumab tedavisini 1. hafta sonunda karşılaştırmış ve her iki uygulamanın da başarılı olduğunu bildirmiştir. Aköz humorde ölçülen VEGF düzeyinin subkonjonktival grupta topikal gruba göre daha yüksek çıkması topikal bevasizumabın gözyaşından çabuk klerensine ve oküler yüzeye iyi geçememesine bağlanmıştır (135). Dastjerdi farelerde oluşturulan vaskularize yüksek riskli allogenic korneal transplantasyon modelinde 3 hafta boyunca uygulanan 5 mg (0.2 ml) subkonjonktival bevasizumab ile % 2.5'lik (2.5 mg/ml) topikal bevasizumab tedavisini karşılaştırmıştır. Sonuç olarak subkonjonktival bevasizumab grubunda graft reddi daha az bulunmuştur (136). Abdulgani'nin çalışmasında uygulanan subkonjonktival bevasizumab dozu (1.25 mg/0.05 ml) çalışmamızda uyguladığımız dozlara göre yüksektir. Dastjerdi'nin çalışmasında ise hazırlanan topikal damlanın konsantrasyonu çalışmamızda hazırlanan topikal damlanın konsantrasyonundan düşüktür.

İnflamatuar bir stokin olan TNF, inflamasyon oluşumu ve apoptozis dışında, anjiyogenik süreçlerde de önemli bir rol oynamaktadır. Koroidal neovasküler

membrandan elde edilen makrofajların TNF- α sentezleyerek ve retina pigment epitelinden VEGF üretimini tetikleyerek koroidal neovaskularizasyon oluşumunda katkıda bulunduğu bildirilmiştir (143). Deneysel oluşturulan YBMD modelinde, etanerceptin neovaskularizasyon boyutunda ve lezyonda oluşan kaçakta azalma sağladığı gösterilmiştir (33). Kumagai ve ark IL-4 ya da IL-13 ile TNF- α 'nın birlikte insan korneal fibroblastlarını stimülasyonu ile hücre yüzeyinde VCAM-1 ekspresyonu ile sonuçlandığını göstermişlerdir (30). Korneal allograft reddi tedavisinde anti-TNF kullanılması kornea yara iyileşmesi ve inflamasyon süreçlerini etkileyerek graft yaşam süresini artırdığına dair yayınlar mevcuttur (29,144). Karşı görüş olarak Fujita, TNF- α 'nın fibroblastlarda TGF- β 1 ve VEGF ekspresyonunu baskılayarak neovaskularizasyon oluşumunu engellediğini bildirmiştir (145). Zandbelt, Primer Sjögren's Sendromu hastalarına 12 hafta boyunca haftada 2 kez 25 mg/ml dozunda subkonjonktival etanercept uyguladığı çalışmada keratokonjunktivit sicca bulgularında bir azalma tespit edilememiştir (146).

Literatürde korneal neovaskularizasyon, TNF, etanercept anahtar kelimelerini kullanarak tarayabildiğimiz kaynaklarda korneal neovaskularizasyonda etanerceptin etkisine dair bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda dikkat çeken bulgulardan birisi subkonjonktival etanercept ve topikal etanercept ile tedavi edilen gruplarda fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesinin kontrol grubuna göre daha düşük çıkmasıdır. Subkonjonktival ve topikal yolla uygulanan etanercept arasında fark olmaması ve her iki yolla da uygulamanın etkili olması etanerceptin korneal neovaskularizasyon tedavisinde kullanılabileceğine dair ümit vermektedir.

Korneal neovaskularizasyonun Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlanan, fotoğraflar üzerinde korneal neovaskularizasyonun incelenmesine göre nispeten subjektif olan derecelendirilmesiyle elde edilen verilere göre subkonjonktival etanercept tedavisi topikal etanercept tedavisinden daha iyi sonuçlar vermiştir. Fakat histopatolojik örnekler incelendiğinde etanerceptin subkonjonktival ve topikal uygulaması arasında fark olmadığı görülmüştür. Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının incelenmesiyle ortaya çıkan topikal etanercept uygulamasıyla subkonjonktival uygulamanın benzer sonuçlar vermesi dikkate

alındığında her iki tedavinin de korneal neovaskularizasyonun iyileştirilmesinde kullanılabileceğini düşünüyoruz. Elde ettiğimiz verilerin karşılaştırılması için bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya çıkmaktadır.

Etanerceptin yan etkilerine bakılacak olursa en çok bilinen yan etkisi enjeksiyon yerindeki reaksiyondur. Daha az bilinen fakat daha ciddi yan etkileri olarak sepsis, tüberküloz reaktivasyonu, multipl sklerozis, otoantikör üretimi, pansitopeni, lökositoklastik vaskülit, romatoid nodüller ve drug-induced lupusta bildirilmiştir (125,147-149). Bazı vaka sunumlarında retrobulbar optik nöropati ve optik nöritte rapor edilmiştir (125,147,150).

Çalışmamızda karşılaştırdığımız bevasizumab grubu ile etanercept grubunda hem subkonjonktival hem de topikal uygulamaların birbirlerine üstünlükleri olmadığı, her iki tedavi yönteminin de korneal neovaskularizasyon tedavisinde etkili olduğu bulundu. Lichtlen'in yeni yayımlanan çalışmasında maymunlarda oluşturulan deneysel koroid neovaskularizasyonu tedavisinde anti-VEGF ve TNF- α inhibitörleri karşılaştırılmıştır. Gruplardan birine bevasizumab diğer ikisine TNF- α inhibitörleri olan adalimumab ve ESBA-105 intravitreal yolla uygulanmış ve tüm tedavilerin etkili olduğu gösterilmiştir (151).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sık körlük yapan diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi, YBMD, korneal neovaskularizasyon gibi hastalıklarda kritik rol oynayan anjiyogenez, anjiyogenez patogenezinde rol oynayan faktörler ve bu faktörlerin etkin doz ya da kombine uygulanması gibi alanlarda yoğunlaşmaktadır (70,152,153). Colucciello yaş tip YBMD'si bulunan 27 hastanın 30 gözünde intravitreal bevasizumab (1.25 mg/0.05 mL) ile aynı anda uygulanan intravitreal triamsinolon asetonidi (2 mg/ 0.05 mL) kombine uygulamıştır. Çalışmanın sonunda foveal ödemde ve subfoveal sıvıda azalma olduğu bildirilmiştir (154). Schaal yaş tip YBMD'de üstüste yapılan intravitreal bevasizumabın biyoetkinliğinin azaldığını fakat intravitreal bevasizumab ile intravitreal triamsinolon asetonid kombine edildiğinde daha etkili sonuçların ortaya çıktığını göstermiştir (155).

Daha önce korneal neovaskularizasyonun tedavisinde bevasizumab ile diğer bir ajanın additif kullanımına dair çalışma yoktur. Fakat bazı çalışmalarda bu yönde

önerilerde bulunulmuştur. Güler ve Şener korneal neovaskularizasyonla ilgili trastuzumabın etkinliğini gösteren çalışmalarında anti-VEGF ile kombine farklı bir anti-anjiyogenik ajanın kullanılmasının etkili bir tedavi olacağını önermişlerdir (22,153). TNF- α inhibitörleri, TNF- α ya da reseptörlerini engellemekte, VEGF miktarını düşürmekte ve immünomodülatör ajanlarla sinerjistik çalışmaktadır (156). Bevasizumabın yanında additif tedavi olarak etanercepti eklememizin bir diğer nedeni de VEGF ile TNF- α 'nın birbirini etkilemesi ve TNF- α 'nın anjiyogenik faktörler olan VEGF, basic fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve IL-8 ekspresyonunu artırmasıdır (157,158). Bevasizumab sadece VEGF'yi inhibe etmekte, korneal neovaskularizasyon patogeneğinde yer alan diğer faktör ve sitokinlere ise etki göstermemektedir (145). Etanercept ise inflamasyonu, lökosit göçünü, sitokinlerin indüklediği interselüler adezyon molekülü-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi vasküler adezyon moleküllerini azaltmaktadır (112,15161). Etanercept önemli pro-inflamatuar sitokinlerden olan TNF- α ve TNF- β 'nin her ikisini de inhibe etmektedir (35). Fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesine bakıldığında en etkili tedavinin additif tedavi olduğu görülmektedir. Çalışmamız bevasizumab ile etanerceptin additif kullanımının korneal neovaskularizasyon tedavisinde, bevasizumab ile etanerceptin tek başına kullanımına göre daha etkili olduğunu göstermiştir.

Gruplardaki sıçanların korneal neovaskularizasyon dereceleri Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildiğinde en etkili tedavi subkonjonktival ve topikal additif grupta ortaya çıkmıştır. Bu sonuç fotoğraflar üzerinde incelenen neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesine bakıldığında en başarılı tedavinin additif tedavi olmasıyla benzerdir ve bu bulguyu desteklemektedir.

Histopatolojik incelemelerde neovaskularizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi en az additif tedavi uygulanan gruplarda bulunmuştur. Bu sonuç additif tedavinin tek başına uygulanan bevasizumab ve etanercept tedavilerine göre üstünlüğünü gösteren önceki bulgularımızı desteklemektedir.

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

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çeşitli inflamatuvar, enfeksiyöz, travmatik ve korneal graft reddi ile ilişkili korneal neovaskülarizasyon tedavisinde steroidler gibi konvansiyonel ajanların yetersiz kaldığı durumlarda anti-VEGF ajanlar ya da kombine tedaviler kullanılabilir. Anti-VEGF ajanlar ile anti-TNF ajanların kombinasyonu dirençli korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etkili bir alternatif olacaktır.

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde anti-anjiyogenik özellik gösteren tek bir molekül yerine farklı etki mekanizması gösteren iki ayrı molekülün kullanılmasını öneriyoruz. Çalışmamızda additif tedavi tekli tedavilerden daha iyi sonuçlar vermiştir. Tedavide anti-VEGF ajanların yanına additif olarak eklenecek anti-TNF ajanlar korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etkili bulunmuştur.

Günümüzde anti-VEGF ajanlar endikasyon dışı olarak insanlarda korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bizim bulgularımız da subkonjonktival ve topikal bevasizumab tedavisinin korneal neovaskülarizasyon gelişimini azaltmada etkin bir tedavi olduğunu desteklemektedir. Subkonjonktival ve topikal bevasizumab tedavisini karşılaştırdığımızda ise subkonjonktival bevasizumab tedavisinin daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

Anti-TNF ajanlardan etanercept hem topikal hem de subkonjonktival yolla korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılmaya aday bir ilaçtır. Kornea dokusunda etanercept ile yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etanerceptin sistemik, subkonjonktival ve topikal yolla tedavisi üzerine yapılacak çalışmalar etanerceptin etkisini daha çok aydınlatacaktır.

Korneal neovaskülarizasyonun patogenezinde rol oynayan transforming büyüme faktörü, angiopoietin, plazminojen aktivatörü inhibitörü, epidermal büyüme faktörü, matriks metalloproteinazlar gibi diğer anjiyogenik faktörler ve bu faktörlerin inhibisyonu üzerine yapılacak çalışmalar ideal tedavilerin ortaya çıkmasına yardımcı olabilir.

7. ÖZET

Amaç: Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda bevasizumab, etanercept ve her ikisinin additif kullanılmasının etkinliğini araştırmak, subkonjonktival veya topikal yolla uygulanmasının etkinliğini karşılaştırmak.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya alınan 49 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçanın sağ gözleri kimyasal uygulamayla koterize edildi. Çalışmayı tamamlayabilen 45 tanesi ile sonuçlar elde edildi. Denekler kontrol, subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept, subkonjonktival bevasizumab+etanercept, topikal bevasizumab, topikal etanercept, topikal bevasizumab+etanercept olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Alkali yanık oluşturulduktan hemen sonra subkonjonktival gruplara 0,05 ml (1,25 mg) bevasizumab ya da etanercept enjeksiyonu yapıldı. Topikal gruplara 10 mg/ml dozunda hazırlanan bevasizumab ya da etanercept damla günde iki kez damlatıldı. Kontrol grubu tedavisiz bırakıldı. Deneyin 8. gününde gözler enüklü edilmeden önce dijital fotoğraflar çekildi. Histopatolojik örnekler alındı.

Bulgular: Kornealarda oluşan yanık alanları açısından grupların elde ettiği dereceler benzerdi. Fotoğraflar üzerinde neovaskülarizasyon alanları incelenip tüm gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). Subkonjonktival uygulama ile topikal uygulama karşılaştırıldığında, subkonjonktival bevasizumab tedavisinin topikal bevasizumab tedavisinden üstün olduğu bulundu ($p<0.05$). Bevasizumab grubu ile etanercept grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Subkonjonktival additif tedavi ile subkonjonktival bevasizumab ve subkonjonktival etanercept tedavisi arasında fark olmadığı ($p<0.05$), topikal additif tedavinin topikal bevasizumab ve topikal etanercept tedavisinden daha başarılı olduğu saptandı ($p<0.05$). Korneal neovaskülarizasyon dereceleri kontrol grubunun dereceleri ile karşılaştırıldığında subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival etanercept, subkonjonktival bevasizumab+etanercept ile topikal bevasizumab+etanercept gruplarında fark istatistiksel açıdan anlamlı düzeye ulaşıyordu ($p<0.05$).

Sonuç: Elde ettiğimiz veriler korneal neovaskularizasyon tedavisinde bevasizumabın yanısıra etanercept ya da etanercept ile bevasizumab kombinasyonun kullanılmasının yeni bir tedavi yontemi olabileceğini gostermektedir.

Anahtar kelimeler: Korneal neovaskularizasyon, VEGF, TNF, bevacizumab, etanercept.

8. ABSTRACT

Purpose: To compare the effect of subconjunctivally and topically administered bevacizumab and etanercept and to investigate additive effect of bevacizumab and etanercept on experimental induced corneal neovascularization in rats.

Methods: Right eyes of 49 Wistar-Albino rats were chemically cauterized. The subjects were divided into 7 groups: control, subconjunctival bevasizumab, subconjunctival etanercept, subconjunctival bevasizumab+etanercept, topical bevasizumab, topical etanercept, topical bevasizumab+etanercept. 0,05 ml (1,25 mg) bevacizumab or etanercept was injected in subconjunctival groups. Topical groups were instilled with 10 mg/ml drops twice daily. Control group was not treated. Digital photographs were obtained before the eyes enucleated. Corneal sections were analyzed by histopathologically.

Results: The burn stimulus on the cornea were similar between groups. The neovascularization scores in subconjunctival bevasizumab, subconjunctival etanercept, subconjunctival additive, topical additive group were statistically smaller than control group ($p<0.05$). The area of corneal neovascularization analyzed on the photographs of all groups were smaller than control group ($p<0.05$). Subconjunctival bevasizumab group has been found more effective compared with topical bevasizumab group ($p<0.05$). There was no statistically significant differences between subconjunctival etanercept and topical etanercept, and between bevacizumab and etanercept treatment ($p>0.05$). The differences in subconjunctival bevasizumab, subconjunctival etanercept and subconjunctival additive group was not significant ($p>0.05$). Topical additive group has been found more effective compared with topical bevasizumab and topical etanercept group ($p<0.05$).

Conclusion: Our study has shown that etanercept is effective in corneal neovascularization treatment like bevacizumab. Combination of bevacizumab-etanercept is more effective than monotherapy.

Key Words: corneal neovascularization, VEGF, TNF, bevacizumab, etanercept.

9. KAYNAKLAR

1. Nishida T. Basic Science: Cornea, Sclera, and Ocular Adnexa Anatomy, Biochemistry, Physiology, and Biomechanics. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005: 3-26
2. Lang GK. *Göz Hastalıkları El Kitabı*. (Sezen F., çeviri editörü). Ankara: Palme Yayıncılık, 2001.
3. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000; **19**: 113–129
4. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology* 1997; **41**: 275-313
5. Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, et al. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review. *Ophthalmology* 2000; **107**: 1829–1835
6. Saika S, Kobata S, Hashizume N, et al. Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. Immunohistochemical study. *Cornea* 1993; **12**: 383–390
7. Ishizaki M, Zhu G, Haseba T, et al. Expression of collagen I, smooth muscle actin, and vimentin during the healing of alkali-burned and lacerated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; **34**: 3320–3328
8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; **1**: 27-31
9. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Current Opinion in Ophthalmology* 2001; **12**: 242–249
10. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, et al. Corneal neovascularization: pathogenesis and inhibition. *Cornea* 1987; **6**: 250–7
11. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its re-ceptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 2514-2522
12. Senger DR. Molecular framework for angiogenesis. A complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1-7

13. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, et al. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1994; **8**: 961–5
14. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 2545–2552
15. Bock F, Koenig Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* . 2008; **246**: 281–284
16. 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**: 357–362
17. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol* 2006; **142**: 660–668
18. Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea* 2008; **27**: 142–147
19. Kim TI, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008; **27**: 349–352
20. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI. The effect of topical Bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology* 2008; **115**: 33–38
21. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chevez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; **91**: 804–807
22. Şener E. Deneysel korneal neovaskularizasyon oluşturulan sıçan modelinde subkonjonktival uygulanan EGF ve VEGF inhibitörlerinin neovaskularizasyona etkisi. *Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi*. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, 2009.
23. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; **247**:1375–1382

24. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2007; **125**: 834–836
25. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008; **86**: 322–328
26. Uy HS, Chan PS, Ang RE. Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with Stevens–Johnson syndrome. *Cornea* 2008; **27**: 70–73
27. Rodrigues EB, Farah ME, Maia M, Penha FM, Regatieri C, Melo GB, Pinheiro MM, Zanetti CR. Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research* 2009; **28**: 117–144
28. Saika S. Yin and Yang in Cytokine Regulation of Corneal Wound Healing Roles of TNF- α . *Cornea* 2007; **26** (Suppl. 1): 70–74
29. Rayner SA, King WJ, Comer RM, Isaacs JD, Hale G, George AJT, Larkin DFP. Local bioactive tumour necrosis factor (TNF) in corneal allotransplantation. *Clin Exp Immunol* 2000; **122**: 109–116
30. Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T. Synergistic Effect of TNF- α and Either IL-4 or IL-13 on VCAM-1 expression by Cultured Human Corneal Fibroblasts. *Cornea* 2003; **22**(6): 557–561
31. Markomichelakis NN, Theodossiadis PG, Sfikakis PP. Regression of neovascular age-related macular degeneration following infliximab therapy. *Am. J. Ophthalmol* 2005; **139**: 537–540
32. Panagiotis G, Theodossiadis VS, Liarakos PP, Sfikakis IA, Vergados S, Theodossiadis GP. Intravitreal Administration of the Anti-Tumor Necrosis Factor Agent Infliximab for Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol* 2009; **147**: 825–830
33. Shi X, Semkova I, Müther SB, Dell S, Kociok N, Jousen AM. Inhibition of TNF- α reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research* 2006; **83**: 1325–1334
34. Olson JL, Courtney RJ, Mandava N. Intravitreal Infliximab and choroidal neovascularization in an animal model. *Arch Ophthalmol* 2007; **125**(9): 1221–1224

35. Taban M, Dupps WJ, Mandell B, Perez VL. Etanercept (Enbrel)-Associated inflammatory eye disease: Case report and review of the literature *Ocular Immunology and Inflammation* 2006; **14**: 145–150
36. Avunduk MC, Avunduk AM, Oztekin E, Oztekin E, Baltaci AK, Ozyazgan Y, Mogolkoc R. Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp. Eye Res* 2004; **79**: 357–365
37. Reiff A, Takei S, Sadeghi S, Stout A, Shaham B, Bernstein B, Gallagher K, Stout T. Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthritis Rheum* 2001; **44**: 1411–1415
38. Smith JR, Levinson RD, Holland GN, Jabs DA, Robinson MR, Whitcup SM, Rosenbaum JT. Differential efficacy of tumor necrosis factor inhibition in the management of inflammatory eye disease and associated rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001; **45**: 252–257
39. Günalp İ. *Göz Hastalıkları Temel Gözbilim (1.baskı)*. Ankara: Antıp A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları, 2003: 45
40. Bengisu Ü. *Göz Hastalıkları (3.baskı)*. İstanbul:Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., 1990: 63-84
41. Galloway NR, Amoaku WMK, Galloway PH, Browning AC. *Common Eye Diseases and their Management (3rd edition)*. London: Springer-Verlag London Ltd, 1999: 8
42. Goodman RL. *Ophtho Notes: The Essential Guide*. New York: Thieme Medical Publishers, 2003: 94
43. Akyol F. Kornea Anatomisi. Türk Oftalmoloji Derneği. *Kornea*. İstanbul: Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11, 2009: 14
44. Kanski J.J. *Clinical Ophthalmology (fifth edition)*. Oxford: Butterworth Heinemann, 2003: 96
45. Sehu KW, William R L. *Ophthalmic Pathology: An Illustrated Guide for Clinicians*. Haryana:Blackwell Publishing Ltd, 2005: 61
46. Farjo AA, Soong HK. Corneal Epithelium. In: Yanoff M, Duker JS, ed. *Ophthalmology*. Spain: Mosby, 2004: 413-414
47. Akyol N. Kornea Anatomisi ve Fiziyojisi. *Kontak Lensler ve Uygulanması*. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları. İstanbul: Scala, 2005: 7-29

48. Cameron JG. Corneal Reaction to Injury. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005: 115-131
49. Tuli SS, Goldstein M, Schultz GS. Modulation of Corneal Wound Healing. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005: 133-150
50. Iwata M, Yagihashi A, Roat MI, Zeevi A, Iwaki Y, Thoft RA. Human leukocyte antigen-class II-positive human corneal epithelial cells activate allogeneic T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **12**: 3991-4000
51. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; **36**: 2557
52. Wilson SE, Medeiros FW. Ocular Refractive Surgery – Corneal Opacity (Haze) after Surface Ablation. In: Yorito T, Clark AF, Wax MB, ed. *Therapeutics Eye on New Discoveries (first edition)*. Slovenia: Elsevier Ltd, 2008: 135
53. Smolek M. K. Cornea. In: Tasman W, Jaeger E. A. *Duane's Ophthalmology (2007 Edition)*. Lippincott Williams & Wilkins, (CD-ROM edition) 2007.
54. Cameron JD. Surgical and Nonsurgical Trauma. In: Tasman W, Jaeger EA. *Duane's Ophthalmology (2007 Edition)*. Lippincott Williams & Wilkins, (CD-ROM edition) 2007.
55. Jester JV, Barry PA, Lind GJ, et al. Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35**:730
56. Honda H, Higuchi OS, Kani K, Ogita Y. Cell movements in a living mammalian tissue: Long-term observation of individual cells in wounded endothelia of cats. *J Morphol* 1982; **25**: 174
57. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; **26**:443
58. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M, et al. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; **26**: 1191
59. Cameron JD. Pathologic Principles of Ophthalmic Disease. In: Tasman W, Jaeger E. A. *Duane's Ophthalmology (2007 Edition)*. Lippincott Williams & Wilkins, (CD-ROM edition) 2007.

60. Kim T, Khosla-Gupta BA. Chemical and Thermal Injuries to the Ocular Surface. In: Edward J. Holland E.J., Mannis M.J. *Ocular Surface Disease-Medical and Surgical Management*. New York: Springer-Verlag Inc, 2002: 100-112
61. American Academy of Ophthalmology. Toxic and Traumatic Injuries of the Anterior Segment. *External Disease and Cornea*. San Francisco, 2008-2009: 389
62. Arffa R. Chemical injuries. In: *Grayson's diseases of the cornea*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1991: 649-665
63. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989; **3**: 141-157
64. Moore JE, McMullen TCB, Campbell IL, et al. The inflammatory milieu associated with conjunctivalized cornea and its alteration with IL-1 RA gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 2905-2915
65. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 117-123
66. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999, **103**: 1231-1236
67. Beck L, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; **11**: 365-373
68. Garner A. Ocular angiogenesis. *Int Rev Exp Pathol* 1986; **28**: 249-306
69. D'Amore PA. Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35**: 3974-9
70. Jampol LM, Ebroon DA, Goldbaum MH. Peripheral proliferative retinopathies: An update on angiogenesis, etiologies and management. *Surv Ophthalmol* 1994; **38**: 519-40
71. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Intern Rev Immunol* 2002; **21**: 33-49
72. Maragoudakis ME, Missirlis E, Karakiulakis GD, Sarmonica M, Bastakis M, Tsopanoglou N. Basement membrane biosynthesis as a target for developing inhibitors of angiogenesis with anti-tumor properties. *Kidney Int* 1993; **43**: 147-150
73. Uçakhan ÖÖ. Korneanın Patolojik Cevapları. Türk Oftalmoloji Derneği. *Kornea*. İstanbul: Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:11, 2009: 68

74. Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK. Experimental corneal neovascularization: biomicroscopic, angiographic, and morphologic correlation. *Cornea* 1985; **4**: 35–41.
75. Yaylali V, Ohta T, Kaufman SC. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea* 1998; **17**: 646–653
76. Cogan D.G. Corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; **1**: 253–261
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**: 983–985
78. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cellular Biochem* 1991; **47**: 211–218
79. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; **146**: 1029–1039
80. Aiell LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 2000; **77**: 113–119
81. Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthal Res* 1997; **29**: 354–362
82. 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**: 293–305
83. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; **255**: 989–991
84. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1579–1586

85. Zhang SX, Ma J. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* 2007; **26**: 1–37
86. Kenyon BM, Voest EV, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**: 1625-32
87. Maybodi M, Harvey HD, Williams JM, Pepose JS, Fleming TP. Vascular endothelial growth factor is expressed in cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**: 1139
88. Li CH, McConnell A, Garcia J, Hernandez E, Huang AJ. Expression of vascular endothelial growth factor in rabbit ocular surface epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**: 863
89. Bednarz J, Weich HA, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. Expression of genes coding growth factors and growth factor receptors in differentiated and dedifferentiated human corneal endothelial cells. *Cornea* 1995; **14**: 372-81
90. Lewitz Gryziewicz .Regulatory aspects of drug approval for macular degeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; **57**: 2092-8
91. Zhou B, Wang B. Pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006; **83**: 615-9
92. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, et al. Preclinical Pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 2005; **46**: 726-33
93. ALTUZAN ROCHE 400 mg / 16 ml konsantre infüzyon çözeltisi, Prospektusu. Roche Müstahzarları Sanayi Anonim Şirketi, Maslak, İstanbul.
94. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer Therapy. *Biochem and Biophys Res Commun* 2005; **35**: 333-328
95. Gunther JB, Altaweel MM. Bevacizumab (Avastin) for the Treatment of Ocular Disease. *Survey of Ophthalmology* 2009; **54**: 3
96. URL: <http://www.gene.com/gene/products/information//oncology/avastin>
97. Kabbinar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21(1)**: 60-65

98. McDermott, MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol* 2007; **47**: 619–635
99. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/ tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; **115**: 1–20
100. Wajant H, Henkler F, Scheurich P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 2001; **13**: 389–400
101. Tartaglia LA, Goeddel C, Reynolds C, et al. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol.* 1993; **151**: 4637-4641
102. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, et al. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol* 1998; **160**: 943-952
103. Kondo S, Sauder DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF- α induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1713-1718
104. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1717-1725
105. Yamada J, Streilein JW, Dana MR. Role of tumor necrosis factor receptors TNFR-I (p55) and TNFR-II (p75) in corneal transplantation. *Transplantation* 1999; **68**: 944-949
106. Warren JS, Ward PA. The Inflammatory Response. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (Eds), *Williams Hematology*, 6th edition, Part II, Ch: 6, New York, McGRAW – HILL Co, 2001: 67-75
107. Lehrer RI, Ganz T. Biochemistry and Function of Monocytes and Macrophages. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds). *Williams Hematology*. 6th Edition, Part: VII, Ch: 74, New York, McGRAW – HILL Co, 2001: 865-69
108. Fenton RG, Longo DL. Cancer Cell Biology and Angiogenesis. In Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition*, Part: V, Ch: 69, New York, McGRAW – HILL Co, 2005: 453-464

109. Dinarello CA, Gelfand JA. Fever and Hyperthermia. In Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition*, Part: II, Ch: 16, New York, McGRAW – HILL Co, 2005: 104-08
110. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease. In Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition*, Part: XIV, Ch: 331, New York, McGRAW – HILL Co, 2005: 2238-2249
111. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 9784-9788
112. Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1993; **151**: 6602-6607
113. Charles P, Elliott MJ, Davis D, et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; **163**: 1521-1528
114. McComb J, Gould T, Chlipala E, et al. Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy. *J Rheumatol* 1999; **26**: 1347-1351
115. Dick AD, McMenamin PG, Korner H, et al. Inhibition of tumor necrosis factor activity minimizes target organ damage in experimental autoimmune uveoretinitis despite quantitatively normal activated T cell traffic to the retina. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1018-1025
116. Dick AD, Duncan L, Hale G, Waldmann H, Isaacs J. Neutralizing TNF- α activity modulates T-cell phenotype and function in experimental autoimmune uveoretinitis. *J Autoimmunol* 1998; **11**: 255-264
117. Tugal-Tutkun I, Mudun A, Urgancioglu M, Kamali S, Kasapoglu E, Inanc M, Gül A. Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine, and corticosteroids in Behcet's disease: an open-label trial. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 2478-2484

118. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Loss of tumor necrosis factor a potentiates transforming growth factor b-mediated pathogenic tissue response during wound healing. *Am J Pathol* 2006; **168**: 1848–1860
119. Calabrese LH. Molecular differences in anticytokine therapies. *Clin Exp Rheumatol* 2003; **21**: 241–248
120. Weisman MH, Moreland LW, Furst DE, Weinblatt ME, Keystone EC, Paulus HE, Teoh LS, Velagapudi RB, Noertersheuser PA, Granneman GR, Fischkoff SA, Chartash EK. Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther* 2003; **25**: 1700–1721
121. Kaushik VV, Moots RJ. CDP-870 (certolizumab) in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2005; **5**: 601–606
122. Şentürk T. Biyolojik tedaviler-3N1K: Ne, nasıl, ne zaman, kime? *11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi*. 30 Eylül-4 Ekim 2009, Antalya.
123. Zhou H. Clinical pharmacokinetics of etanercept: a fully humanized soluble recombinant tumor necrosis factor receptor fusion protein. *J Clin Pharmacol* 2005; **45**: 490–497
124. ENBREL (etanercept) Prospektusu. WYETH İLAÇLARI A.Ş. Büyükdere cad. Maya Akar Center, No:100 –102, Kat:9, 34394 Esentepe-İstanbul.
125. Fleischmann R, Iqbal I, Nandeshwar P, Quiceno A. Safety and efficacy of disease-modifying anti-rheumatic agents: focus on the benefits and risks of etanercept. *Drug Saf* 2002; **25**: 173–197
126. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985; **4**:531–535.
127. Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 1992; **110**: 405–407
128. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1986; **93**: 1304–1309
129. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 2148–2153

130. Nikolic L, Friend J, Taylor S, et al. Inhibition of vascularization in rabbit corneas by heparin: cortisone pellets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; **27**:449–456
131. Phillips K, Arffa R, Cintron C, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983; **101**: 640–643
132. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, et al. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; **38**: 1954–1962
133. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by Rapamycin. *Exp Mol Med* 2006; **38**: 173–179
134. Lavie G, Mandel M, Hazan S *et al.* Anti angiogenic activities of hypericin in vivo. Potential for ophthalmologic applications. *Angiogenesis* 2005; **8**: 35–42
135. Abdulgani A, Hasanreisoglu B, Akyurek N, Sepici A. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009; **37**: 730–736
136. Dastjerdi MH, Saban DR, Okanobo A, Nallasamy N, Sadrai Z, Chauhan SK, Hajrasouliha AR, Dana R. Effects of topical and subconjunctival bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51(5)**: 2411-2417
137. Hürmeriç V, Erdurman FC, Mumcuoğlu T, Kurt B, Dağlı O, Karaca U, Durukan AH. Deneysel kornea neovaskülarizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanib sodyum enjeksiyonunun etkinliğinin karşılaştırılması. *T Oft Gaz* 2009; **39**: 349-354
138. Clark ER, Hirschler WJ, Kirby-Smith HT, Rex RO, Smith JH. General observations on the ingrowth of new blood vessels into standardized chambers in the rabbit ear, and the subsequent changes in the newly grown vessels over a period of months. *Anat Rec* 1931; **50**: 129-168
139. 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.
140. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; **245**:1577–1579

141. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Opth* 2007; 125
142. Habet-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, Moisseiev J, Rosner M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal Neovascularization. *Acta Ophthalmol* 2009; **22**
143. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**: 1891-1898
144. Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Type I Suppresses Ocular Chemokine Gene Expression and Rejection of Allogeneic Corneal Transplants. *Arch Ophthalmol* 2000; **118**: 1666-1671
145. Gaudric A, Moenner M. Quantification of angiogenesis due to basic fibroblast growth factor in a modified rabbit corneal model. *Ophthalmic Res* 1992; **24**: 181–188
146. Fujita S, Saika S, Kao WW, Fujita K, Miyamoto T, Ikeda K, Nakajima Y, Ohnishi Y. Endogenous TNF α Suppression of Neovascularization in Corneal Stroma in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 3051–3055
147. Imperato AK, Smiles S, Abramson SB. Long-term risks associated with biologic response modifiers used in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2004; **16**: 199–205
148. Kekow J, Welte T, Kellner U, Pap T. Development of rheumatoid nodules during anti-tumor necrosis factor alpha therapy with etanercept. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 843–844
149. Shakoor N, Michalska M, Harris CA, Block JA. Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. *Lancet* 2002; **359**: 579–580
150. Kaipiainen-Seppanen O, Leino M. Recurrent uveitis in a patient with juvenile spondyloarthritis associated with tumour necrosis factor alpha inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2003; **62**: 88–89
151. Lichtlen PD, Lam T, Nork M, Streit T, Urech DM. Relative contribution of VEGF and TNF-alpha in the cynomolgus laser-induced CNV model: Comparing

- efficacy of bevacizumab, adalimumab and ESBA105. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **14**
152. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. Angiogenesis: an update. *Histopathol* 1994; **9**: 807-843.
153. Güler M, Yılmaz T, Özeran İ, Elkıran T. The Inhibitory Effects of Trastuzumab on Corneal Neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2009; **147**: 703–708
154. Colucciello M. Intravitreal bevacizumab and triamcinolone acetonide combination therapy for exudative neovascular age-related macular degeneration: short-term optical coherence tomography results. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008; **24(1)**: 15-24
155. Schaal S, Kaplan HJ, Tezel TH. Is there tachyphylaxis to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy in age-related macular degeneration? *Ophthalmology* 2008; **115(12)**: 2199-2205
156. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 364–371
157. Giraud E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N, Bussolino F. Tumor necrosis factor alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22128-22135
158. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 4015-4023
159. Jousen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, Koizumi K, Dohmen S, Adamis AP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *FASEB J* 2002; **16**: 438-440
160. Koizumi K, Poulaki V, Dohmen S, Welsandt G, Radetzky S, Lappas A, Kociok N, Kirchhof B, Jousen AM. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 2184-2191
161. Maini RN, Taylor PC, Paleolog E, Charles P, Ballara S, Brennan FM, Feldmann M. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab)

treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; **58** (Suppl. 1): 56-60