

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU  
OLUŞTURULAN SIÇAN MODELİNDE SUBKONJONKTİVAL  
UYGULANAN EGF VE VEGF İNHİBİTÖRLERİNİN  
NEOVASKÜLARİZASYONA ETKİSİ**

Dr. Ender ŞENER

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2009

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU  
OLUŞTURULAN SIÇAN MODELİNDE SUBKONJONKTİVAL  
UYGULANAN EGF VE VEGF İNHİBİTÖRLERİNİN  
NEOVASKÜLARİZASYONA ETKİSİ**

Dr. Ender ŞENER

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

Etik Kurul Onayı HAEK 5/1-2009

Bitiş: KOÜHADYEK 11/10 23.06.2009

2009

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## Sayfa

### **Konu Başlığı**

İç kapak sayfası

İçindekiler dizini

Simgeler ve kısaltmalar dizini

Şekiller dizini

Tablo dizini

### **1 GİRİŞ VE AMAÇ**

1

### **2 GENEL BİLGİLER**

3

#### **2.1. Kornea anatomisi**

3

2.1.1 Makroskopik anatomi

3

2.1.2. Mikroskopik anatomi

3

2.1.2.1. Epitel ve bazal membran

3

2.1.2.2. Bowman zarı

4

2.1.2.3. Stroma tabakası

4

2.1.2.4 Descement membranı

4

2.1.2.5 Endotel tabakası

5

2.1.3. Vasküler sistem

5

#### **2.2. Kornea yara iyileşmesi**

5

2.2.1. Epitel yara iyileşmesi

5

2.2.2. Stroma yara iyileşmesi

6

2.2.3. Endotel Yara İyileşmesi

6

#### **2.3. Kornea Neovaskülarizasyonu**

7

2.3.1. Anjiojenik faktörler

9

2.3.1.1. Vasküler endotelyal growth faktör

9

2.3.1.2. Epidermal growth faktör

12

2.3.1.3. Fibroblast growth faktör

13

2.3.1.4. Transforming growth faktör alfa ve beta

13

2.3.1.5. Keratinosit growth faktör

14

2.3.1.6. Hepatosit growth faktör

14

2.3.1.7. Platelet derived growth faktör

15

2.3.1.8. İnsülin like growth faktör

15

2.3.1.9. Anjiopoetin	15
2.3.1.10. Matriks metalloproteinazlar	15
2.3.1.11. Eritropoetin	15
2.3.2. Anti-anjiojenik faktörler ve ajanlar	16
2.3.2.1. Anjiostatin	16
2.3.2.2. Endostatin	16
2.3.2.3. Pigment epiteli derived faktör	16
2.3.2.4. Trombospondin-1	16
2.3.2.5. Plazminojen Kringle 5	16
2.3.2.6. Bevasizumab	17
2.3.2.7. Trastuzumab	18
2.3.2.8. Ranibizumab	19
2.3.2.9. Pegaptanib	20
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	21
3.1. Anestezi tekniği	22
3.2. Kimyasal koterizasyon ve subkonjonktival enjeksiyon	22
3.3. Kornea neovaskülarizasyonu alanlarının saptanması ve sakrifikasyon	22
3.4. Histopatolojik inceleme	22
3.5. İstatistiksel analiz	24
<b>4. BULGULAR</b>	25
4.1. Neovaskülarizasyon alanlarının karşılaştırılması	25
4.2. Histopatolojik değerlendirme	31
<b>5. TARTIŞMA</b>	40
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	52
<b>7. ÖZET</b>	54
<b>8. ABSTRACT</b>	55
<b>9. KAYNAKLAR</b>	56

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Ang	Anjiopietin
Ark	arkadaşları
bFGF	bazik Fibroblast growth faktör
DNA	Deoksi ribonükleik asit
D	Dioptri
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Epidermal growth faktör
EGFR	Epidermal growth faktör reseptörü
EPO	Eritropoetin
FGF	Fibroblast growth faktör
VEGFR-1	Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü 1
VEGFR-2	Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü 2
VEGFR-3	Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü 3
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
G	Gauge
HGF	Hepatosit growth faktör
HER2	İnsan epidermal growth faktör reseptör 2
HIF	Hipoksi ile indüklenebilen faktör
İGF	İnsülin like growth faktör
İL	İnterlökin
KGF	Keratinosit growth faktör
K5	Plazminojen kringle 5
MMP	Matriks metalloproteinaz
NO	Nitrik oksit
Na <sup>+</sup> /K ATPaz	Sodyum Potasyum ATPaz
PMNL	Polimorfonükleer lökositler
PDGF	Platelet derived growth faktör
PEDF	Pigment epiteli derived faktör
PDR	Proliferatif diabetik retinopati
Tsp	Trombospondin
TGF	Transforming growth faktör
VEGF	Vasküler endotelyal growth faktör
YBMD	Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil.1:</b> Kontrol grubu ve tüm tedavi grupları arasında korneal neovaskülarizasyon yüzde karşılaştırmaları .....	27
<b>Şekil.2:</b> Normal sıçan korneası .....	27
<b>Şekil.3:</b> Gümüş nitrat ,Potasyum nitrat çubuklarıyla kimyasal yanık oluşturulmuş sıçan korneası .....	28
<b>Şekil.4:</b> Kontrol grubunda olan bir denekteki skar ve yoğun kornea neovaskülarizasyonu .....	28
<b>Şekil.5:</b> Bevasizumab tedavi grubunda olan bir denekteki minimal kornea neovaskülarizasyonu ve santralde skar oluşumu.....	29
<b>Şekil.6:</b> Trastuzumab tedavi grubunda olan bir denekteki kısmi kornea neovaskülarizasyonu.....	29
<b>Şekil.7:</b> Ranibizumab tedavi grubunda olan bir denekteki skara yaklaşmış kornea neovaskülarizasyonu ve santral korneal skar.....	30
<b>Şekil.8:</b> Pegaptanib tedavi grubunda olan bir denekteki kornea neovaskülarizasyonu ve santral korneal skar.....	30
<b>Şekil.9 :</b> Gruplara göre inflamasyon yoğunluğu.....	32
<b>Şekil.10 :</b> Gruplara göre fibroblast aktivite skoru .....	33
<b>Şekil.11 :</b> Gruplara göre neovasküler yoğunluk skoru .....	34
<b>Şekil.12 :</b> Gruplara göre korneal kalınlık grafiği.....	35
<b>Şekil.13 :</b> Kontrol grubu, x100, x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü .....	36
<b>Şekil.14 :</b> Bevasizumab grubu, x200, x400, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü .....	36
<b>Şekil.15:</b> Trastuzumab grubu, x100, x200, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. ....	37
<b>Şekil.16:</b> Ranibizumab grubu, x100, x200, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü.....	38
<b>Şekil.17:</b> Pegaptanib grubu, x100, x200, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü .....	39

## **TABLO DİZİNİ**

<b>Tablo.1 :</b> Korneal neovaskülizasyonla ilişkili hastalıklar .....	<b>8</b>
<b>Tablo.2 :</b> Anjiojenik ve antianjiojenik faktörler.....	<b>9</b>
<b>Tablo.3 :</b> VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri.....	<b>11</b>
<b>Tablo.4 :</b> Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzde ortalamaları, standart sapma değerleri ve gruplarının birbirine göre P değerleri.....	<b>25</b>
<b>Tablo.5 :</b> Grupların histopatolojik açıdan; inflamasyon, fibroblast aktivitesi, neovaskülarizasyon yoğunluğu ve korneal kalınlık değerlendirme sonuçları.....	<b>31</b>

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kornea; göz küresinin ön kısmında yer alan, stromadaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine, damarsız olmasına ve kısmi dehidratasyonuna bağlı olarak şeffaf bir dokudur. Gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur.

Neovaskülarizasyon veya anjiojenez, yeni kan damarlarının oluşumudur ve yara iyileşmesi süreci sırasında hasarlı dokunun onarılmasına, yenilenmesine ve doku büyümesine eşlik eden normal bir süreçtir (1). Fizyolojik anjiojenez doku gelişimi, menstrüel döngü ve yara iyileşmesi gibi olaylarda önemli rol oynar. Fakat gözde neovaskülarizasyon görmeyi tehdit eden bir durumdur ve körlükle bile sonuçlanabilir. İnflamatuar hastalıklar, enfeksiyonlar, dejeneratif veya travmatik hastalıklar korneal neovaskülarizasyonu indükleyebilir (2).

Korneanın avasküler yapısının devamında anjiojenik faktörlerin düşük, antianjiojenik faktörlerin yüksek seviyelerde oluşunun önemi büyüktür. Normalde korneada anjiojenik faktörler ( Fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü vb.) ile anti-anjiojenik moleküller (anjiostatin, endostatin, veya pigment epitel derive faktör ) arasında bir denge vardır (2-4). Çeşitli inflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif hastalıklarda, kimyasal yanık ve bunun gibi travmatik durumlarda, kontakt lens kullanımı ve immünolojik (Stevens-Johnson sendromu, Skatrisyel pemfigoid) hastalıklarda bu denge bozularak anjiojenöz yöne kayar ve korneal neovaskülarizasyonla sonuçlanabilir (2,5,6).

Kornea neovaskülarizasyonunda rol oynayan birçok faktör tespit edilmiştir. Bunların bir kısmı kornea epitel, stroma ve endoteli tarafından üretilir (7,8). Gözyaşı ve aköz hümör de anjiojenik faktörler için kaynak olabilmektedir (5,7,9). Bazı faktörler ise lokal ve sistemik dolaşımdan korneaya gelerek neovaskülarizasyona neden olmaktadır. Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) proteolitik aktivite, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi anjiojenezin birçok basamağında görev alır (5,10,11). Kornea neovaskülarizasyonunda VEGF'in önemli rol oynadığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur ( 12-15 ). Son zamanlarda inflame ve vaskülarize insan ve hayvan kornealarında VEGF'in artmış olduğu da gösterilmiştir (16,17).



Kornea neovaskularizasyonunun engellenebilmesi için birçok tedavi şekli denenmiştir. Argon ve Neodimiyum: Nd:(YAG) lazer fotokoagülasyonu(18,19), fotodinamik tedavi (20), kortikosteroidler, siklosporin-A, somatostatin, somatostatin analogu oktreotid, anti-tümör nekrosis factor- $\alpha$ , anti-intersellular adezyon molekülü, suleparoid (heparan sulfat), talidomid, suramin, genistein, rapamisin, anjiostatin, metotreksat(21-26) gibi doğal ve sentetik birçok madde denenmiştir. Ancak bütün bu çabalara rağmen kornea neovaskularizasyonunun önlenmesi halen önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Bevasizumab VEGF'e spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden monoklonal bir antikordur. Tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatır. Bevasizumabın korneal neovaskularizasyonda inhibitör etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (27-34).

Trastuzumab insan epidermal growth faktörü reseptör 2(HER2) proteinine karşı geliştirilmiş bir antikordur. Trastuzumab meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Trastuzumabın korneal neovaskularizasyonun önlenmesinde etkili olduğunu gösteren bir çalışma vardır ( 35).

Pegaptanib ekstrasellüler VEGF<sub>165</sub>' e yüksek spesifiklik ve afinite ile bağlanarak onun aktivitesini inhibe eden bir oligonükleotiddir. Pegaptanib neovasküler yaş tip yaşa bağlı maküla dejenerasyonun tedavisinde kullanılır.

Ranibizumab insan VEGF-A'sına hedeflenmiş bir rekombinan monoklonal antikordur. Ranibizumab neovasküler yaş tip yaşa bağlı maküla dejenerasyonun tedavisinde kullanılır (27). Ranibizumab ve pegaptanibin korneal neovaskularizasyonun inhibisyonunda kullanılabileceği ileri sürülmektedir (36).

Bizim çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan kornea neovaskularizasyonunda subkonjonktival olarak verilen bevasizumab, trastuzumab, ranibizumab ve pegaptanibin etkinliği araştırıldı. Bevasizumab, trastuzumab, ranibizumab ve pegaptanib uygulanan gruplar kendi aralarında birbirleriyle ve kontrol grubuyla neovaskularizasyon alanları ve histopatolojik olarak da korneal vasküler yoğunluk, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast yoğunluğu ve korneal kalınlık açısından karşılaştırıldı.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kornea Anatomisi**

#### **2.1.1. Makroskopik Anatomi**

Dış ortamla temas halinde bulunan kornea, avasküler ve saydam yapıda olup periferde kalınlaşarak sklera ile devamlılık gösterir. Kornea gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur ve daha arkadaki göz içi yapılarını korur. Refraktif güç önde +48 Dioptri (D), arka yüzde ise -5.8 D olup net kırma gücü +43 D'dir (37,38).

Kornea, dikey çapı 10,5 milimetre (9-11mm), yatay çapı 11,5 milimetre (11-12mm) olup, santral 4 milimetrelik alanda hemen hemen sferiktir, ön-arka yüzler birbirine paraleldir ve kalınlığı santralde 520 mikron kadardır (37). Periferde ise arka yüzeyin eğrilik artışına paralel olarak 1.0 milimetre kalınlığa ulaşır.

#### **2.1.2. Mikroskopik Anatomi**

Kornea; epitel, bowman zarı, stroma, descement membranı ve endotelden oluşan 5 katlı bir yapıya sahiptir, normal şartlarda kan ve lenf damarları içermez .Epitel üzerini prekorneal gözyaşı film tabakası örter.

##### **2.1.2.1. Epitel ve Bazal membran**

Korneanın sürekli yenilenen bu en üst tabakası dış ortama karşı bir bariyer görevi yapar. Bu çok katlı non-keratinize epitelyal yapı yüzey ektoderminden köken almakta ve üç tabakadan meydana gelmektedir. En altta tek katlı kolumnar bazal hücreler, ortada iki-üç katlı kanat hücreleri ve üstte iki katlı yüzeyel yassı hücre şeklinde sıralanmışlardır (37). Limbustaki pluripotent kök hücrelerinden mitozla çoğalan hücreler kornea merkezine doğru ilerleyerek epitelin bazal hücrelerini oluşturur. Çoğalma yeteneği yalnızca bazal hücrelerde vardır. Bazal hücreler, kendileri tarafından sentezlenen bazal membran üzerine oturmuştur ve bazal membrana hemidesmozomlarla bağlıdırlar. Bazal membran epitele yapısal destek sağlar ve epitel hücrelerini stromadan ayıran gerçek bir bariyerdir, yokluğunda epitel hücreleri stromaya invaze olurlar (37,38).

### **2.1.2.2. Bowman Zarı**

Hücre içermeyen bu tabaka , elastik ve kollajen fibrillerin yoğunlaşmasıyla oluşan bir yapıdır ve 8-12 mikrometre kalınlığındadır. Epitel bazal membranı ile stroma arasında yer alır. Kornea stromasının ön bölümü olduğu kabul edilir ve içindeki kollajen fibriller stromal keratositler tarafından sentezlenir ve salgılanır. Tip I ,III, V kollajen ile bunların arasını dolduran Tip VI kollajen filamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Descement membranının aksine travmatize olduğunda rejenere olmaz ve skar dokusu ile iyileşir(38).

### **2.1.2.3. Stroma Tabakası**

Stroma kornea kalınlığının %90'ını oluşturur, santral korneada yaklaşık 450 mikrometre kalınlığa sahiptir ve yaklaşık % 76 oranında su içermektedir. Kollajen lifler büyük oranda Tip I ve az miktarda Tip III, V, VI kollajenden oluşur. Kollajen lifler stromanın ön 1/3'ünde oblik, arka 2/3'ünde ise paralel lameller oluşturur. Lameller içindeki kollajen lifler aynı çapa sahiptir ve birbirlerine paralel olarak tüm kornea boyunca uzanırlar. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde %60 oranda keratan-sülfat ve %40 oranda kondroitin-sülfattan oluşmuştur. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını sağlar. Korneanın fonksiyonel bütünlüğü, kalınlığı, şeffaflığı stromal elemanların yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasına bağlıdır. Ekstrasellüler matriks (ECM) yıkımı temel olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) ile olur. Embriyonik olarak nöral krestten köken alan stroma hücreleri keratositlerdir. Keratositler kollajen lameller arasında yerleşmişlerdir. Normal koşullarda yavaş ama sürekli bir sentetik aktivite ile ECM'nin idamesini sağlayan bu hücreler, akut ödem veya yaralanma sonrasında fibroblast haline gelebilirler. (37,38).

### **2.1.2.4. Descement Membranı**

Descement membranı endotel hücrelerinin bazal membranıdır ve gerçek bir membran yapısındadır. Periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Descement membranı proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençlidir ve ağır keratitlerde bile sağlam kalabilir. Travma nedeniyle bu membran stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve zedelenme durumunda endotel tarafından salgılanarak onarılmaktadır (37,38).

### **2.1.2.5. Endotel tabakası**

Descemet membranının arkasında tek sıra halinde dizilmiş 400.000-500.000 heksagonal hücreden oluşmuştur. Nöral krestten orjin alan endotel hücrelerinin mitotik aktiviteleri doğum sonrası durur ve ölen hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur. Endotel hücreleri doğumda 5000 hücre/milimetrekare iken erişkinde bu sayı 2500-3500 hücre/milimetrekare civarındadır. Endotel hücreleri metabolik olarak aktif hücrelerin karakteristik özelliklerini taşır. Endotel hücre sayısı 500 hücre/milimetrekare altına indiğinde korneal fonksiyonlar bozulmaya başlar. Endotel hücrelerinin apikal yüzlerine yakın yerleşmiş sıkı bağlantı noktaları bulunur. Bunlar epitel kadar olmasa da sıvı geçişine karşı bir bariyer görevi yapar. Sodyum Potasyum ATPaz ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz) enzim sistemi bazolateral membranlarda yerleşmiştir ve her hücrede yaklaşık 1.5 milyon pompa yer almaktadır. Endotelin en önemli görevi korneanın dehidrate durumunu korumak ve dolayısıyla şeffaflığını sağlamaktır (37,38).

### **2.1.3. Vasküler Sistem**

Avasküler yapıda olan kornea periferinde, internal karotid arterin ilk dalı olan oftalmik arterden gelen ön siliyer arterlerin oluşturduğu limbal damar arkı bulunmaktadır. Bu damar arkı eksternal karotid arterin fasiyal dallarıyla anastomoz yapmaktadır. Böylece kornea periferi hem internal karotid arter hem de eksternal karotid arter tarafından beslenmektedir (39).

## **2.2. Kornea Yara İyileşmesi**

### **2.2.1. Epitel Yara İyileşmesi**

Epitel yara iyileşmesinde birçok hücresel yapının ve sinyal moleküllerinin karşılıklı etkileşimi söz konusudur. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi kornea epitel yapısının devamında önemli rol oynar. Hasarlanan epitel hücreleri veya üzeri açılan bazal membrandan, komşu sağlıklı hücrelere dolaşım yoluyla veya gözyaşı filmi aracılığıyla sinyaller yayılır. Ardından komşu hücrelerin yapısında ve hücreler arası bileşkelerde değişimin başladığı bir latent dönem yaşanır. Yaralanmanın ardından hücre göçünün başlamasına kadar geçen süre lag fazı olarak adlandırılır (40). Bu faz büyük ölçüde hücresel organizasyon ve protein sentezi ile ilişkilidir. Lag fazı tamamlandığında, oküler yüzey epitelini yeniden tesis etmek için yaraya komşu hücreler göçe başlar.

Hücrelerin göçü intrastoplazmik aktin-miyozin kontraksiyonu ile oluşan ameboid hareketlerle gerçekleşir. Hücreler bir başka hücre ile temas edene kadar göçlerine devam eder. Defekt tek hücre katıyla örtüldükten sonra mitozla normal epitel kalınlığı sağlanır. Epitel iyileşmesi sırasında bazal hücrelerle limbal kök hücreler arasında bir denge bulunmaktadır. Bu görüş Thoft'un "X,Y,Z" hipotezi ile ortaya konmuştur. X; bazal epitel hücre çoğalmasını, Y; limbal hücre çoğalmasını ve santrale göçünü, Z; yüzeyden epitel hücre kaybını yansıtmak üzere denge konumunda  $X+Y=Z$  olmalıdır (41). Epitel tabakası normal kalınlığına ulaştıktan sonra differansiasyonun gelişmiş safhaları, mikrovillusların, mikropalikaların, glikokalikslerin gelişimi başlar. Bu arada hücreler arası ve hücreler ile bazal membran arası bağlantı kompleksleri oluşturulur.

### **2.2.2. Stroma Yara İyileşmesi**

Stromal iyileşme yeni kollajen sentezi, bunların birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından oluşur. Zedelenmeden sonra stromal yara PMNL'ler görülür. Hasar gören epitel tabakasının altındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. Stroma hasar alanındaki keratositlerin ölümü stroma yara yanıtının ilk basamağıdır (43). Hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla iyileşme kaskadı başlamaktadır. Keratosit proliferasyonu olur. Keratositlerin hasar bölgesine göçü ve mitozun düzenlenmesinde epidermal growth faktör(EGF), bazik fibroblast growth faktör(bFGF) gibi faktörlerin rolü vardır(42). Stromal iyileşme sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedir (43). Kontraktıl özellikte olan bu hücreler kollajenleri, glikozaminoglikanları ve diğer matriks proteinlerini üretmektedir. Miyofibroblastlarda kas hücrelerindeki benzer şekilde aktin ve miyozin kontraktıl ünitleri oluşur (44).

### **2.2.3. Endotel Yara İyileşmesi**

Yaşlılıkta olduğu gibi endotel hücreleri yavaşca kaybolursa, komşu hücrelerin genişlemesiyle boşluklar kapanır. Daha büyük ve çok sayıdaki hücreyi ilgilendiren defekt söz konusu olduğunda ise 250 mikrometre uzaktaki hücreler bile yara yerine doğru uzar ve yara yerini kapatmak üzere ilerler. Yayılma ve göçme sırasında hücreler birbirinden kopmazlar. Tek katlı tabakanın oluşumu tamamlandığında bariyer ve pompa fonksiyonları tekrar devreye girer ve kornea ödemi yavaş yavaş geriler. Birkaç hafta

sonra zedelenme alanını kaplayan endotel yeni descement membranını salgılamaya başlar. (37).

### **2.3. Kornea Neovaskülarizasyonu**

Damar gelişimi iki farklı şekilde meydana gelir:

1. Vaskülojenez: bu embriyoda endotel hücre öncüllerinin farklılaşmasıyla meydana gelen damar oluşumudur. 2. Anjiojenez (neovaskülarizasyon): Neovaskülarizasyon olgun bir damar yatağının normal ağdaki defektleri onaracak ya da anatomik sınırları aşıp doku ve boşlukları istila edecek şekilde gelişmesidir(2,45). Erişkinde anjiojenez yara iyileşmesi, kadınların üreme döngüsü gibi normal biyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Ancak normal biyolojik fonksiyonlar dışında iskemi, inflamasyon, retinopatiler yada tümör gelişimi gibi bazı patolojik durumlarda da anjiojenez görülür. Neovaskülarizasyonun oftalmolojide özel bir önemi vardır, bu önem gözün optik bir organ olması dolayısıyla saydam ortamlara gereksinim göstermesi, ve göz içi dokuların kritik organizasyonundan ileri gelmektedir( 46).

Anjiojenezde dokulara özgü anatomik ve biyokimyasal faktörlerin önemi olmakla birlikte, nedenler ve dokular ne olursa olsun mikroskopik düzeyde olaylar birbirinin aynıdır. Neovaskülarizasyon gelişiminde uzun süre kimyasal faktörlerin rolü üzerinde çalışılmıştır. Yapısal ve fonksiyonel bakımdan hormonlara benzeyen bazı düşük ağırlıklı peptidlerin varlığı tespit edilmiştir. Nanomolar konsantrasyonlarda bile etkili olabilen bu maddeler hormonlardan farklı olarak kan yerine dokulardan elde edilebilmekte ve etkilerini hedef hücrelerin plazma membranlarındaki özgül reseptörlerine bağlanarak göstermektedirler. Birçok hücre tarafından salgılanan, hücre çoğalmasını, göçünü ve hayatınının devamını uyarayan, bazı durumlarda ise bunları engelleyen bu peptidler büyüme faktörleridir. Başta EGF olmak üzere sinir büyüme faktörü, fibroblast growth faktör (FGF), İnsülin-like growth faktör(IGF), tümör nekrozis faktör-alfa, makrofaj growth faktör, granülosit koloni-stimülan faktör, granülosit-makrofaj koloni sitimülan faktör gibi birçok büyüme faktörü izole edilmiştir (46). Hareketlerini otokrin, jukstakrin veya en yaygın biçimde parakrin mekanizmalarla gerçekleştirirler. Bu peptidlerin hücre yüzey reseptörleri tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri deoksi ribonükleik asit (DNA) sentezinin sentez fazını uyarır ve

ardından hücre çoğalması gerçekleşir (47). Göz, birçok büyüme faktörü için hedef doku konumundadır: EGF, FGF, IGF, Platelet-derived growth faktör (PDGF), Transforming growth faktör (TGF) - $\alpha$  ve - $\beta$  gibi.

Normalde kornea avaskülerdir ve bu dokudaki anjiyogenik faktörlerle (VEGF, EGF, FGF vb), anti-anjiyogenik faktörler( pigment epiteli derived faktör(PEDF), anjiostatin, endostatin vb) arasındaki dengeye bağlıdır (2,45). Korneal neovaskülarizasyonla ilişkili çeşitli inflamatuvar, infeksiyöz, dejeneratif ve travmatik hastalıklarda bu denge anjiyözen yöne kayar ve yeni damarların oluşumu ile sonuçlanır. Dolayısı ile birçok hastalıkta anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozularak korneal neovaskülarizasyon indüklenebilir (Tablo 1-2)(2).

**Tablo 1.** Korneal neovaskülarizasyonla ilişkili hastalıklar(2).

<b>Korneal neovaskülarizasyonla ilişkili hastalıklar</b>	
<b>İnflamatuvar hastalıklar</b>	Oküler pemfigoid, Atopik konjonktivit, Rosasea, Greft rejeksiyonu, Stevens-Johnson sendromu, Greft versus host hastalığı
<b>İnfeksiyöz keratitler</b>	<b>Viral</b> (Herpes simpleks, Herpes zoster), <b>Bakteriyel</b> (pseudomonas, Klamidya trokomatozis, Sifiliz) <b>Fungal</b> (Kandida, Fusarium, Asperjillus) <b>Parazitik</b> ( Onkoserkiyazis )
<b>Dejeneratif-Konjenital Hastalıklar</b>	Pterjium, Terrien marjinal dejenerasyon, Aniridi
<b>Travmatik-İatrojenik hastalıklar</b>	Kontakt lens, Alkali yanıklar, Ülserasyon, İatrojenik, Kök hücre defisiti

Kompleks bir süreç olan anjiyenez var olan damarlardan yeni damarların filizlenmesi ve prekapiller ve kapiller arteriyollerin dallanma ve ayrılması ile oluşur. Bu dallanma ve ayrılma periendotelyal hücrelerin var olan damarların içine doğru kıvrılıp büyüyerek damarları uzunlamasına bölmeye ile oluşur(48,49). Anjiyenezin başlangıcındaki en erken adım vasküler permeabilite artışına eşlik eden damar dilatasyonudur(48). Vasküler permeabilite artışı çevre alan içine fibrin, büyüme

faktörleri ve inflamatuvar faktörler gibi plazma proteinlerinin damar dışına çıkmasına yol açar. Damar dışı alana geçen fibrin vaskülarizasyonda önemli rol oynar (50). Birikmiş plazma proteinleri ilerleyen süreçte endotel hücre göçü için destekleyici bir yapısal form oluşturur. Büyüme faktörleri ve inflamatuvar faktörler ECM yıkımına yol açan enzimleri aktive eder. İnflamatuvar hücreler ve endotel hücrelerinin kendilerinden kaynaklanabilen MMP lar ECM bileşenlerini bozarak göç eden endotel hücreleri için gerekli olan yolu açar (43). ECM'in yıkımı sadece endotel hücre göçü için ortam sağlamaz, aynı zamanda VEGF, bFGF ve IGF gibi matrikse bağlı anjiyojenik faktörlerin salınımına da yol açar (51). Bu büyüme faktörleri daha önceden var olan damarlarda ve filizlenen tüb formlarından migrasyona uğrayan endotel hücrelerinin aktivasyonunu uyarır.

### 2.3.1. Anjiyojenik Faktörler

**Tablo 2:** Anjiyojenik ve antianjiyojenik faktörler (2,43,45).

<b>Anjiyojenik faktörler</b>	<b>Antianjiyojenik faktörler</b>
Vasküler endotelyal growth faktör	Thrombospondin
Asidik and basik fibroblast growth faktör	Fibronektin
Plasenta growth faktör	Anjiostatin
Platelet-derived epidermal growth faktör	Endostatin
Platelet-derived growth faktör	İnterferon- $\alpha, \beta, \gamma$
Transforming growth faktör	İnterlökin-12
Epidermal growth faktör	Pigment epitelyumi Derived Faktör
Hepatosit growth faktör	Matriks metalloproteinaz inhibitörleri
Platelet-activating faktör	Platelet factor 4
Tümör nekrozis faktör- $\alpha$	Retinoik asit
İnsulin-like growth faktör	
Anjiogenin	
Anjiopoetin-1	
Granulosit-makrofaj coloni stimulan faktör	
Granulosit coloni-stimulan faktör	
İnterlökin-1,2,6,8	
Prostaglandin E1, E2	
Vascular integrin $\alpha v \beta 3$	
Matriks metalloproteinazlar	
Histamin	
Nitrik oksit sentetaz	
Eritropoietin	
İnterlökin-8	



### 2.3.1.1.Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF)

Homodimerik yapıda, 46 kilodalton ağırlığında olan VEGF ilk defa 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından yüksek düzeyde vaskülarize bir tümörde tanımlandı(45). VEGF vaskulotropin olarak da bilinen, çok fonksiyonlu potent bir sitokindir ve esas olarak endotel hücrelerinden salgılanmaktadır. VEGF endotel hücreleri için spesifik bir mitojen ve anjiyogenik faktördür(43). Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulan VEGF'dür. VEGF ailesi VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF (Plasental büyüme faktörü) ve svVEGF(yılan zehirli VEGF, VEGF-F) adı verilen üyelerden oluşur. Literatürde yer alan çoğu makalede VEGF olarak adlandırılan büyüme faktörü, aslında Human-VEGF' ü ya da diğer adıyla VEGF-A'yı tanımlamaktadır(52). VEGF spesifik bir gen tarafından kodlanır ve yapılarındaki aminoasit sayısına göre belirlenmiş farklı izoformları vardır: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>. En çok bilinen major izoformlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> dir. İnsanlarda en fazla VEGF<sub>165</sub> izoformu bulunur, büyük oranda heparine bağlanarak salgılanmaktadır ve anjiyenezde ana rol oynayan formdur (53).

Vasküler endotelyal growth faktör endotel hücresi yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanıp bu hücreyi etkiler. VEGF reseptörleri :VEGF reseptör-1(VEGFR-1, flt-1), VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk-1/KDR), VEGFR-3(flt-4), çözünebilir – VEGFR-1 (sVEGF-1) ve çözünebilir-VEGFR-2 (sVEGFR-2)dir. VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak endotel hücreleri üzerinde tirozin kinaz yapılı, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile lenf damarları üzerinde ise VEGFR-3 ile gerçekleştirir. VEGFR-1 ve VEGFR-2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salgınır ve anjiyenez ile damar geçirgenliğinde görev alır. VEGFR-3'ün lenfanjiyenezin moleküler regülasyonundan sorumlu olduğu sanılmaktadır(52)(Tablo 3). VEGFR-1 hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimini kontrol eder ve doku mimarisinin belirlenmesinden sorumludur. VEGFR-2 VEGF'ün etkinliği için diğer reseptörlerden daha aktif bir role sahiptir, aktive olduğunda migrasyon ve endotel hücre proliferasyonuna yol açar. Ayrıca kemotaksistede önemlidir. VEGFR-3 ise lenfanjiyenezde rol oynar.

VEGF'nin birçok yararlı etkilerinin yanında, artmış VEGF ekspresyonu neovaskülarizasyonla karakterize oküler hastalıklar, romatoid artrit, psöriazis ve kontakt dermatit gibi hastalıkların progresyonuna yol açar (52). Ayrıca tümör büyümesi, metastazı ve lenfödem gibi patolojik olaylarda da rol aldığı bildirilmiştir . VEGFR'nin aktivasyonu fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz, guanozin trifosfataz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile eder ve DNA transkripsiyonu başlatılır (54). VEGF düzeyi başta Ras ve HER-2 onkojenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, İL-1, İL-6, İL-10, İL-13, FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , İGF-1, TNF- $\alpha$  ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (43,54,55). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan, hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF)-1 de VEGF salınımlarında etkili rol oynamaktadır. Vasküler endotelial growth faktörün salınımlarında en önemli iki faktör hipoksi ve inflamasyondur. Vasküler endotelial growth faktöre maruz kalan damarlarda endotel hücrelerinde fenestrasyon, veziküler organel ve transselüler gap oluşumuyla permeabilite artmaktadır.

**Tablo 3.** VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri (52)

<b>Reseptörler</b>	<b>Büyüme Faktörleri</b>	<b>Biyolojik Etkileri</b>
VEG	VEGF-A, VEGF-B svVEGF, PlGF	Hücre-hücre ve matrix ilişkisinin kontrolü vaskülojenez
VEG	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-E, svVEGF	Anjiyogenez, migrasyon ve metastaz
VEG	VEGF-C, VEGF-D	Lenfanjiyogenez, metastaz
sVEG	VEGF-A, VEGF-B, VEGF PlGF	VEGFR-1'in inhibitörü
sVEG	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D	sVEGFR-1'e benzer

	VEGF-E, svVEGF	
--	----------------	--

VEGF'nin neden olduğu vasküler permeabilite artışı kemotaksisin ve inflamasyonun devamında da önemlidir (56). VEGF endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanında hücre dışı matris yıkımından sorumlu olan MMP'ler, ürokinaz, doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını uyararak invazyon ve metastazı kolaylaştırır. Anjiyenez sırasında dokular içine ilerleyen kapillerin penetrasyonunu sağlayan kollejenaz ve plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonuna yardımcı olur(57,58).

VEGF'nin etkisi ile endotel hücreleri proliferer olur ve bu büyüme faktörüne doğru göç edip dizilerek yeni damarlar için öncü olan tüp formasyonu oluşmasını sağlar. VEGF endotel hücrelerini apoptozise karşı da korumaktadır (59). VEGF'nin kemotaktik olaylarda önemli bir rolü vardır (60). İnflamasyonun geç dönemlerinde etkili olan monositler için güçlü kemotaktik özelliği vardır. VEGF'nin endotel hücrelerinde ICAM-1, VCAM-1 ve P-selektin gibi adezyon moleküllerini artırdığı gösterilmiştir. Bu moleküller sayesinde nötrofil, monosit ve doğal öldürücü hücreler damar dışına çıkmak için endotel hücrelerine yapışmaktadır (61). VEGF kornea neovaskülarizasyonunda çok önemli bir mediatördür ve keratositlerde tespit edilmiştir. Deneysel hayvan modellerinde VEGF'nin tek başına korneal anjiyonezi güçlü bir biçimde uyardığı bildirilmiştir (62). Ayrıca neovaskülarizasyonlu inflame kornealarda yüksek miktarda VEGF tespit edilmiş ve bu faktörün inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu güçlü biçimde azalttığı rapor edilmiştir (12-17). Neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda VEGF damar endotel hücrelerinde, infiltrer lökositlerde, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır (17). Bu çalışmalar VEGF'nin korneadaki anjiyonezde merkezi bir rol oynadığını kuvvetle belirtmektedir (63). Neovasküler oküler hastalıklarda oluşan yeni damarların sebebinin artmış VEGF olduğu gösterilmiştir (60). Bu hastalıkların tedavisinde anti-VEGF ajanlar kullanılmaktadır.

### **2.3.1.2. Epidermal Growth Faktör (EGF)**

EGF epitel hücreleri için potent bir mitojen olan, 6 kilodalton ağırlığında kompakt bir polipeptittir. Epidermal growth faktör reseptörü (EGFR) 175.000 dalton

ağırlığında bir membran glikoproteinidir, kornea epitel ve endotelinde, lens epitelinde mevcuttur. Reseptörde EGF'nin yüksek ve düşük afinite ile bağlandığı bölgeler vardır. Epidermal growth faktörün reseptörüne bağlanması tirozin kinazı aktive eder, fibronektin, hyaluronik asit gibi ECM moleküllerinin salgılanmasına ve kontakt inhibisyonunun olmadığı hücrelerin çoğalmasına neden olan DNA sentezini uyarır. Reseptör fosforilasyonu, hücre göçüne yardımcı olan, hücre iskeletindeki aktinin yeniden düzenlenmesini de sağlar (64). Hem yüksek hem de düşük afiniteli EGFR'leri özellikle limbal bölgede olmak üzere, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Düşük afiniteli reseptörler daha az miktarda stroma keratositlerinde yer almaktadır ve EGF'ün kornea epiteline etkileri olmaktadır (65). Topikal EGF epitel iyileşmesini uyarmakta, özellikle limbal ve periferal kornea epitel rejenerasyonunda maksimum etki göstermektedir (66). EGF normal kornea epitel kalınlığının devam ettirilmesinde de önemlidir. Stromada timidin alınmasını artırır, fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive eder, aktive fibroblastların insizyon yerinde çoğalmasını sağlayacak kemotaksisten sorumludur. Epitel ve stromal iyileşmeye olan etkileri ile gerginliğe karşı yara direncini artırır, ayrıca endotel proliferasyonuna da yol açar(8,65). EGFR'nün bloklanması VEGF'ün ekspresyonunu azaltır(67).

### **2.3.1.3. Fibroblast Growth Faktör (FGF)**

Fibroblast growth faktör ailesi birçok dokuda çoğalma, farklılaşma, göç, ECM depolanması ve anjiojenez gibi olayları düzenleyen protein grubudur. Parçalanmadan korunmak için düşük afiniteli heparan sülfat proteoglikanlarına tutunurlar ve hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar (68). Asidik FGF, bowman zarı ve descement membranında, endotel hücrelerinde, daha az oranda ise epitelde tespit edilmiştir. Lakrimal bez tarafından da salınan bu faktörün, epitel hücrelerinde hem parakrin hem de otokrin etkileri vardır. Asidik ve bazik FGF epitel, endotel ve stroma hücrelerinde mitojeniktir. Bazik FGF, kornea fibroblastlarında DNA sentezini, yara gerginliğine direncini ve endotel hücrelerinde mitotik hızı artırır . Korneal anjiojenez modellerinde FGF yaygın olarak kullanılmaktadır (43). Fibroblast growth faktör neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda vasküler bazal membrana bağlanmaktadır. Yeni damarların maturasyon derecelerine göre değişik yoğunlukta bağlanma söz konusudur (69).

### **2.3.1.4 Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta ( TGF- $\alpha$ , TGF-B)**

Transforming growth faktör- $\alpha$ , EGF gibi gözyaşında bulunur ve olası kaynak yine lakrimal bezlerdir. Ek olarak kornea epitel hücreleri TGF- $\alpha$ , TGF $\alpha$  mRNA'sı ve proteinini içerirler (70). Bu durum EGF ve TGF- $\alpha$  üreten epitel hücrelerinin otokrin mekanizmayla normal epitel sikluslarını devam ettirdiklerini düşündürmektedir.

Transforming growth faktör- $\beta$  ailesi TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'den oluşan yaklaşık 25 kilodalton ağırlığında ve birçok doku tarafından üretilen bir polipeptiddir. TGF- $\beta$  dimerik, inaktif biçimde salgılanır ve latent growth faktör havuzu oluşturmak üzere ECM'ye bağlanır, ekstraselüler veya membrana bağlı enzimlerle aktif hale getirilir (65). TGF- $\beta$  aktivasyonu ECM üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur (71). TGF'ün epitelde stromaya salgılanması ve gözyaşında üretimi stromal hücrelerde çoğalma ve göçe neden olur. TGF limbal fibroblastlarda ve insan korneasında KGF ve HGF'ün regülasyonuna katkıda bulunur (72).

#### **2.3.1.5. Keratinosit Growth Faktör (KGF)**

KGF, FGF ailesinin üyelerinden biri olup, mitojenik aktivite etkinliği vardır. KGF reseptörü mRNA'sının in vitro olarak kornea epitel hücrelerinde anlamlı miktarda bulunduğu ama stroma keratositlerinde çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir (65). Aksine KGF'nin kültüre keratositlerde üretildiği, ancak epitel hücrelerinde üretilmediği tespit edilmiştir. Bu durum KGF'nin stromada üretilip, epitel hücrelerinde parakrin bir mekanizma ile etkili olduğunu göstermektedir. KGF reseptörünün limbal fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde, santral korneaya göre daha fazla olduğunun görülmesi KGF'nin tercihen kök hücrelerin fonksiyonunu düzenlediğini düşündürmektedir (72).

#### **2.3.1.6. Hepatosit Growth Factor (HGF)**

Hepatosit growth faktör mezenşimal orjinli hücrelerden salgılanır, travma, inflamatuvar uyarılar ve koagülasyon kaskadındaki proteazlarla aktif hale gelir. KGF gibi HGF de çeşitli ECM bileşenlerine bağlanabilir. Hepatosit growth faktör reseptörü tirozin kinaz özelliği taşır. Korneada HGF reseptörü en yoğun olarak epitel hücrelerinde bulunur; ancak HGF klasik parakrin etki ile fibroblastlardan üretilerek epitel hücrelerine etki eder (73). Keratinosit growth faktörün tersine, HGF üretimi ve reseptörü kornea santralinde daha yoğundur. Hepatosit growth faktör hücre göçünü uyarır, stroma

fibroblastlarına etkisi minimaldir (72). Hepatosit growth faktör gözyaşında da bulunur ve kornea epitel katının bütünlüğünün sürdürülmesinde katkısının olduğu düşünülmektedir (74).

#### **2.3.1.7. Platelet Derived Growth Faktör (PDGF)**

Platelet derived growth faktör sistein bağlı, 35 kilodalton ağırlığında, A ve B zincirlerinden oluşmuş dimer yapısındadır . PDGF'ün reseptörüne bağlanması mitojenik etkileri indükler (47). PDGF reseptörleri kornea fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde bulunur. PDGF-BB proteini epitel hücrelerinde üretilir ve en yüksek miktarda bazal membrana bağlanır (72). Endotel hücrelerinin ve fibroblastların göçü PDGF-BB ile uyarılır. Fibronektin varlığında PDGF-AA ve -BB epitel hücrelerinin kemotaksisini uyarmaktadır (65).

#### **2.3.1.8. İnsülin Like Growth Faktör (IGF)**

İnsülin like growth faktör-1'in hayvan modellerinde korneada anjiogenik etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (75).

#### **2.3.1.9. Anjiopoetin (Ang)**

Bir çalışmada anjiopoetin (Ang)-1 ve -2'nin sistemik Tie-2 ile inhibisyonu kornea neovaskülarizasyonunda gerilemeye neden olmuştur. Bu gerilemenin VEGF' den bağımsız olduğu düşünülmektedir(76). Ayrıca sıçanlarda Ang-2'nin inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği bildirilmiştir (77).

#### **2.3.1.10. Matriks Metalloproteinazlar (MMP):**

MMP-2'nin kornea neovaskülarizasyonunda üretiminin arttığı tespit edilmiştir (78).

#### **2.3.1.11. Eritropoetin(EPO)**

Eritropoetinin retinal neovaskülarizasyonun oluşumunda etkin bir anjiogenik faktör olduğu gösterilmiştir (79). Asıl olarak hipoksi olmakla birlikte, hipoglisemi,

oksidatif stres, inflamasyon ve hücre içi kalsiyum artışı gibi stres durumlarında eritropoetin ve eritropoetin reseptör ekspresyonu artar (45).

### **2.3.2. Anti-Anjiyojenik Faktörler ve Ajanlar**

#### **2.3.2.1. Anjiostatin:**

Anjiostatin 38 kilodalton ağırlığında, plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olup güçlü bir antianjiyojenik faktördür (80). Anjiostatin ve benzeri fragmanların implantasyonu korneada FGF, anjiogenin veya VEGF'ün uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (81).

#### **2.3.2.2. Endostatin:**

Endostatin 20 kilodalton ağırlığında, kollajen XVIII'ün proteolitik parçalanma ürünüdür ve esas olarak damar endotel bazal membranında bulunur. Kollajen XVIII gözde esas olarak retina, lens kapsülü ve korneada bulunur (82). Endostatin, implante edildiği kornealarda bFGF'nin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (83).

#### **2.3.2.3. Pigment Epiteli Derived Faktör (PEDF) :**

Pigment epiteli derived faktörün korneada yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (84). PEGF güçlü bir antianjiyojenik ve nörotrofik faktördür. İnsan amniyon zarının vaskülarize korneada korneal vaskülarizasyonu inhibe edici etkisi büyük oranda, içerdiği PEDF e bağlanmıştır (84). Pigment epiteli derived faktörü bloke eden antikorlar kornea stromasına yerleştirildiğinde vaskülarizasyonun uyarıldığı tespit edilmiştir (85).

#### **2.3.2.4. Trombospondin-1**

Trombospondin (Tsp)-1 gözde kornea, iris, sklera ve retinada üretilir (86). Korneada Tsp-1 esas olarak kornea epitelinin bazal tabakasında üretilmektedir (87). Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklendiği, anjiogenezin olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında spontan anjiogenezin normal farelerde görülmemesi, Tsp-1'in kornea vaskülarizasyonunun düzenlenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (88).

#### **2.3.2.5. Plazminojen Kringle 5 (K5)**

K5'in angiostatinden daha etkin anti-anjiojenik özelliği olduğu gösterilmiştir (45). Korneal neovaskularizasyonun inhibisyonunda K5'in topikal uygulamasının etkili olduğu gösterilmiştir (89).

### **2.3.2.6. Bevasizumab**

Bevasizumab (Altuzan® 100mg/4ml) insan VEGF'ne spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. 214 aminoasitten oluşur, molekül ağırlığı 149 Kda'dur ve VEGF için iki bağlanma bölgesi içerir. VEGF'ün endotel hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmalarını önleyerek tüm VEGF-A izoformlarını ve onların aktif degradasyon ürünlerini inhibe eder (90). Bevasizumab VEGF'ün biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatır. Vasküler geçirgenliği azaltır. İlk defa metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılmıştır. Bevasizumab'ın kolon kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı vardır. Meme, akciğer, böbrek kanserleri için bevasizumab faz III klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir ( 91). Hiçbir klinik çalışmada bevasizuma karşı immünojenik antikor yanıtı oluştuğunun kanıtı yoktur.

Bevasizumabın henüz oküler hastalıkların tedavisinde kullanım ruhsatı olmamasına rağmen VEGF'ün anjiojenezdeki merkezi rolü, onu çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda; yaşa bağlı maküla dejenerasyonu(YBMD), anjioid streak, yüksek miyopiye sekonder gelişen koroidal neovasküler membran, retinal ven oklüzyonu, diabetik retinopati, korneal neovaskularizasyon, neovasküler glokom ve prematur retinopatide olası bir tedavi seçeneği olarak hedef ajan haline getirmiştir (92).

Proliferatif diabetik retinopatili(PDR) hastalarda bevasizumabın vitrektomi öncesi intraoküler enjeksiyonu fibrovasküler proliferasyonu azaltır ayrıca intraoperatif hemoraji riskini azaltarak cerrahiyi kolaylaştırır (93). PDR'li hastalarda intravitreal bevasizumab enjeksiyonu diabetik vitreus hemorajisinin rezorpsiyonunu artırabilir (94). Santral retinal ven oklüzyonu veya retinal ven dal oklüzyonuna sekonder maküler ödemli hastalarda intravitreal 1,25mg bevasizumab enjeksiyonunun görme keskinliğini iyileştirdiği, maküler ödemi azalttığı ve toksisite işareti görülmediği rapor edilmiştir(95). Bevasizumab YBMD tedavisinde başlangıçta bir pilot çalışmada yaş tip YBMD olan hastalara intravenöz yolla verilmiş ve görme keskinliğinde iyileşme ve



retinal kalınlıkta optik koherens tomoğrafi ile belirlenen azalma olduğu saptanmıştır(96). Küçük vaka serilerinde patolojik miyopi, anjioid streak veya korioretinal enflamasyona sekonder gelişen subfoveal koroidal neovasklermembranlı gözlerde intravitreal bevasizumab enjeksiyonunun etkili ve güvenli olduğu rapor edilmiştir (97-99). Premature retinopatisi ve neovasküler glomda yeni damar oluşumunda VEGF'in etkisi nedeniyle bevasizumab bu hastalıkların tedavisinde bir Őeçenek olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada premature retinopatisinde intravitreal bevasizumab enjeksiyonunun neovaskülarizasyonu gerilettiği saptanmıştır (100). Ehlers ve ark. neovasküler glomda panretinal fotokoagulasyonla intravitreal bevasizumab enjeksiyon kombinasyonunun, tek başına panretinal fotokoagulasyon yapılan gruba göre göz içi basıncını daha etkin ve daha hızlı düşürdüğünü göstermiştir (101). Yazdani ve ark. neovasküler glomu olan 2 hastada intravitreal bevasizumab enjeksiyonunun kısa sürede göz içi basıncını önemli derecede düşürdüğünü ve neovaskülarizasyonu gerilettiğini belirtmiştir (102). Iliev ve ark. intravitreal bevasizumabın neovasküler glomda iris ve açıda neovaskülarizasyonu hızla gerilettiğini açıklamışlardır (103).

Korneal neovaskülarizasyonda VEGF'in merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda bevasizumab kullanımı ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda subkonjonktival veya topikal bevasizumab uygulamalarının korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir( 28-34).

Gözde kullanım ruhsatı olmamakla birlikte, bevasizumab birçok klinikte korneal neovaskülarizasyon tedavisinde ve diğer oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

#### **2.3.2.7. Trastuzumab**

Trastuzumab (Herceptin® ) insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 proteininin (HER2/ErbB2) ekstrasellüler bölgesini seçici olarak hedefleyen rekombinant DNA kökenli IgG yapısında bir insan monoklonal antikordur. Trastuzumab moleküler hedefi meme kanserine karşı olan ve meme kanseri tedavisinde mit verici bir ajan olarak geliştirilmiş(104), ilk kez 1998'de metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. EGF reseptörü, VEGF reseptörüne benzer Şekilde tirozin kinaz reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER2, EGFR'nn

altgruplarından biridir (105). HER2 onkoproteini 3 bölümden oluşur: 1) 632 aa'ten oluşan ekstrasellüler alan, burada ligand-bağlayıcı bölge bulunur ve büyüme faktörleri buraya bağlanır. 2) 22 aa'ten oluşan transmembran alanı, 3) 580 aa'ten oluşan intrasellüler alan, Bu kısım tirozin kinaz aktivitesi gösterir ve sinyal transduksiyonundan sorumludur. ErbB reseptör ailesinin karakteristik özelliklerini taşıyan bu reseptörler normal hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda kritik rol oynar(106). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, artmış tümör hücre motilitesi, invazyonu, anjiojenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir( 107). EGF ve TGF alfa, EGF reseptörlerine bağlanarak endotel hücreleri için mitojenik etki gösterirler ve anjiojenezi uyarırlar(108). HER2'nin aktivasyonu EGF'ün reseptöre bağlanmasını indükler, fosfatidilinositol 3 kinaz, ve mitojen aktive protein kinaz kaskadını içeren multipl hücre sel sinyal yolu aktive olur. Reseptör tirozin kinaz aktivitesi, reseptöre bir antagonist bağlanarak sonlanabilir. HER2'ye karşı geliştirilmiş bir antikor olan trastuzumab HER2'nin internalizasyonu ve dejenerasyonu ile bu sinyal yolunu inhibe eder. Hem yüksek hem de düşük afiniteli EGF reseptörleri özellikle limbal bölgede olmak üzere, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Düşük afiniteli reseptörler daha az miktarda stroma keratositlerinde yer almaktadır (8). EGF anjiojenik faktör olarak bilinir güçlü ve etkin anjiojenik faktörler olan VEGF ve İL-8 gibi faktörlerin ekspresyonunu artırır. EGFR aktivasyonu sıklıkla anjiojenizle ilişkilidir ve ek olarak invazyon ve metastazla da ilişkilidir, bütün bu süreçler EGFR antagonisti tarafından etkilenebilir ve önlenir (109). Trastuzumab'ın korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde etkili olduğunu gösteren bir çalışma vardır (35). Trastuzumab korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde çok hedefli bir terapötik yaklaşım olabilir. Trastuzumab'ın göz hastalıklarında kullanım ruhsatı bulunmamaktadır.

#### **2.3.2.8. Ranibizumab**

Ranibizumab(LUCENTIS ® 3mg/0,3ml) insan vasküler endotelial büyüme faktörü A' ya hedeflenmiş bir rekombinant monoklonal antikor parçasıdır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak E coli'den üretilir. Molekül ağırlığı 48 Kda'dur ve VEGF için sadece bir bağlanma yeri içerir. Tüm VEGF-A izoformlarını ve onların aktif degradasyon ürünlerini (VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>110</sub>) inhibe eder ( 110 ). Bu yolla damar geçirgenliğini azaltır ve anjiojenezi bloke eder. VEGF' e ilgisi bevasizumab'a

göre 10-100 kat daha fazladır (27,111). Ferrara ve ark. ranibizumabın endotel hücre proliferasyonunu, vasküler sızıntıyı ve yeni kan damarı oluşumunu azalttığını göstermiştir(112). Ranibizumab neovasküler yaş tip yaşa bağlı maküla dejenerasyonun tedavisinde kullanılır (27). YBMD tedavisi için FDA onayı vardır. Ranibizumab'ın korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda kullanılabileceği ileri sürülmektedir (36). Fakat literatürde ranibizumabın korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. VEGF'ün anjiogenezdeki merkezi rolü düşünüldüğünde, ranibizumabın tüm VEGF-A izoformlarını ve onların aktif degradasyon ürünlerini (VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>110</sub>) inhibe etmesi ve VEGF'e afinitesinin bevasizumabtan daha yüksek olması ranibizumabın korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde ümit verici yeni bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

### **2.3.2.9. Pegaptanib**

Pegaptanib (MACUGEN® 0,3mg/0,1ml) ekstrasellüler VEGF<sub>165</sub> isoformuna yüksek spesifiklik ve afinite ile bağlanarak onun aktivitesini inhibe eden bir oligonükleotiddir. Spesifik olarak VEGF<sub>165</sub> 'in heparin bağlayıcı bölgesine bağlanarak etki eder. Teorik olarak heparin bağlayıcı bölge içeren diğer büyük VEGF-A izoformlarında bağlar ( 113). Pegaptanib neovasküler yaş tip YBMD tedavisinde kullanılır (114). YBMD tedavisinde kullanılan ilk VEGF'e spesifik tedavi ajanıdır (115,116). Gözde çeşitli VEGF izoformlarından VEGF-165' in patolojik durumlardaki asıl izoform olduğu gösterilmiştir (117). Bu korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda pegaptanibin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Pegaptanib'in korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda kullanılabileceği ileri sürülmektedir (36). Yapılan bir prelinik çalışmada sıçanlarda VEGF<sub>165</sub> içeren metakrilat polimerin stromaya implantasyonu ile indüklenen korneal neovaskülarizasyonda intravenöz pegaptanib verilerek korneal anjiogenezin %65 oranında azaldığı gösterilmiştir (118).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları ve Patoloji Anabilim Dalının katkıları ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları ortalama 250-300 gram olan 30 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile çalışma gerçekleştirildi (Etik Kurul Onayı HAEK 5/1-2009).

Çalışmamızda 30 sıçan randomize olarak 5 gruba ayrıldı. 6 sıçandan oluşan her grup ayrı ayrı kafeslerde tutuldu. Çalışmanın birinci günü bütün deneklere anestezi uygulandıktan sonra deneklerin bir gözüne %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubukla kimyasal koterizasyon uygulandı ve fotoğraflandı. Koterizasyon deneyin birinci günü yapıldı. 8 gün süren deney sürecinde deneklerin gözlerine hiçbir işlem uygulanmadı. Deneyin 8. gününde deneklerin korneal fotoğrafları çekildikten sonra denekler sakrifiye edildi.

Gruplar :

1.grup (kontrol grubu): Kimyasal koterizasyondan hemen sonra 27 gauge (G) iğne ile 0,1ml subkonjonktival serum fizyolojik enjekte edildi.

2.grup (Bevasizumab grubu): Kimyasal koterizasyondan hemen sonra 27 G iğne ile 0,05ml (1,25mg) subkonjonktival bevasizumab enjekte edildi.

3.grup (Trastuzumab grubu): Kimyasal koterizasyondan hemen sonra 27 G iğne ile 0,1ml (4mg/kg) subkonjonktival trastuzumab enjekte edildi

4.grup (Ranibizumab grubu): Kimyasal koterizasyondan hemen sonra 27 G iğne ile 0,05ml (0,5mg) subkonjonktival ranibizumab enjekte edildi.

5.grup (Pegaptanib grubu): Kimyasal koterizasyondan hemen sonra 27 G iğne ile 0,1ml(0,3mg) subkonjonktival pegaptanib enjekte edildi.

### **3.1. Anestezi Tekniği**

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

### **3.2. Kimyasal koterizasyon ve subkonjonktival enjeksiyon**

Kimyasal koterizasyon ve subkonjonktival enjeksiyon aynı cerrah tarafından Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde ameliyathane şartlarında ve standart bir metodla yapıldı. Anestezi ve analjezi uygulanan tüm deneklerin kornealarından birine Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobu altında %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubuk (HemoStop; Hizmet Medikal, İstanbul) 8 saniye süresince kornea santraline temas ettirilerek kimyasal koterizasyon uygulandı. Kornea santralinde 2 milimetrelik alkali yanık oluşturuldu. Hemen ardından küçük bir spanç ile geride kalan gümüş nitrat , potasyum nitrat partikülleri uzaklaştırıldı ve 5ml serum fizyolojikle kornea ve forniks yıkanarak temizlendi. Subkonjonktival enjeksiyon saat 2 ve 10'dan limbustan 1mm uzaklıktan 27G enjeksiyonla uygulandı.

### **3.3. Kornea Neovaskülarizasyon Alanlarının Saptanması ve Sakrifikasyon**

Deneyin 8. gününde anestezi ve analjezi sonrası bütün gruplardaki sıçanların kornea fotoğrafları çekildi. Topcon OMS-75 ameliyat mikroskobunun okülerinden 1X büyütmede Sony dijital DSC-H9 fotoğraf makinesi ile makro ayarında kornea fotoğrafları çekildi. Bu işlemden sonra deneklere izofluran ile inhalasyon anestezisi uygulandı. Denekler genel anestezi sonrası intrakardiyak yüksek doz ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorür verilerek sakrifiye edildi ve enükleasyon uygulandı.

### **3.4. Histopatolojik İnceleme**

Sakrifikasyon sonrası enükleasyon uygulanan deneklerden elde edilen gözler acilen limbusun 1mm uzaklığından girilen 27G iğne ile %10'luk formaldehit ile dolduruldu. Daha sonra gözler aynı fiksatifi içeren kaplara kondu. Fiksasyon sonrasında korneaya neovaskülarizasyon bölgesinden geçecek şekilde 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. Leica SM 2000 R model mikrotom ile 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler hematoksilin-eosin ile boyandı ve Olympus Bx50 ışık mikroskobu ile incelendi. Örnekler yeni damar yoğunluğu, inflamasyon, fibroblast yoğunluğu ve kornea kalınlığı yönünden değerlendirildi.

İnflamasyon, fibroblast aktivitesi ve neovaskülarizasyon yoğunluğunu değerlendirmek için +1 den +3 e kadar skala oluşturuldu.

### **İnflamasyon Yoğunluğu:**

+ : Fokal ,az sayıda miks tip inflamatuvar hücre (lenfosit, nötrofil lökosit, eozinofil lökosit)

++ : + ile +++ arasında kalan durumlar

+++ : Diffüz , yoğun miks tip inflamatuvar hücre

### **Fibroblast Aktivitesi:**

+ : Fokal fibroblast aktivitesi

++ : + ile +++ arasında kalan durumlar

+++ : Yoğun ve yaygın fibroblast aktivitesi

### **Neovaskülarizasyon Yoğunluğu:**

+ : Subepitelyal, ön stromal alanda sınırlı veya fokal damarlanma

++ : + ile +++ arasında kalan durumlar

+++ : Yoğun ve yaygın damarlanma

### **Kornea Kalınlığı**

Kornea kalınlığı oküler mikrotom kullanılarak limbustan 1,25mm uzaklıktan ölçüldü.

### **3.5.İstatistiksel Analiz:**

Neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi dijital bilgisayar imaj analizi kullanılarak Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümünde hesaplandı. Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak alındı. Çalışmanın istatistiksel analizi, Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 13 (SPSS for Windows versiyon 13) paket programı ile yapıldı. Gruplar arası çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı, istatistiksel açıdan anlamlı fark görüldüğünde farklılığın hangi grupla ilişkili olduğunu belirlemek için gruplar arası ikili karşılaştırma Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Belli bir skor verilerek yapılan histopatolojik değerlendirme sonuçları Chi-Square Testi ile analiz edildi. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR:

##### 4.1. Neovaskularizasyon Alanlarının Karşılaştırılması:

Deney sürecinin sonunda saptanan korneal neovaskularizasyon alanları analiz edildiğinde tüm tedavi gruplarında neovaskularizasyon yüzdesi, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha azdı ( $p < 0,05$ ) (şekil-2).

**Tablo 4:** Gruplardaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzde ortalamaları, standart sapma değerleri ve grupların birbirlerine göre p değerleri (Mann-Whitney U testine göre).

	Ort $\pm$ SD	Kontrol	Bevasizumab	Trastuzumab	Ranibizumab	Pegaptanib
Kontrol	77,41 $\pm$ 4,24	-	0,004*	0,004*	0,006*	0,004*
Bevasizumab	46,99 $\pm$ 5,67	0,004*	-	0,004*	0,004*	0,025*
Trastuzumab	57,58 $\pm$ 3,72	0,004*	0,004*	-	0,016*	1*
Ranibizumab	65,26 $\pm$ 4,84	0,006*	0,004*	0,016*	-	0,109*
Pegaptanib	58,02 $\pm$ 7,12	0,004*	0,025*	1*	0,109*	-

SD: standart sapma, Ort: Ortalama, \*: Mann-Whitney U testine göre p değerleri

Korneal neovaskularizasyon alanının, tüm kornea alanına yüzdeleri karşılaştırıldığında; bevasizumab grubunda, kontrol grubuna göre neovaskularizasyon yüzdesinin daha az olduğu görüldü ( $p=0,004$ ). Bevasizumab grubu diğer tedavi ajanları ile karşılaştırıldığında, korneal neovaskularizasyon oluşumunu diğer ajanlardan daha fazla önlediği saptandı ( $p < 0,05$ ). Çalışmamızda korneal neovaskularizasyon inhibisyonunda tedavi grupları içinde en etkili olanın bevasizumab olduğu görüldü (Tablo 4).

Trastuzumab korneal neovaskularizasyon yüzdesi açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında neovaskularizasyonun daha az olduğu görüldü ( $p=0,004$ ). Trastuzumab diğer tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında pegaptanible aralarında anlamlı fark olmadığı ( $p=1$ ), fakat ranibizumabtan daha etkin olduğu saptandı.

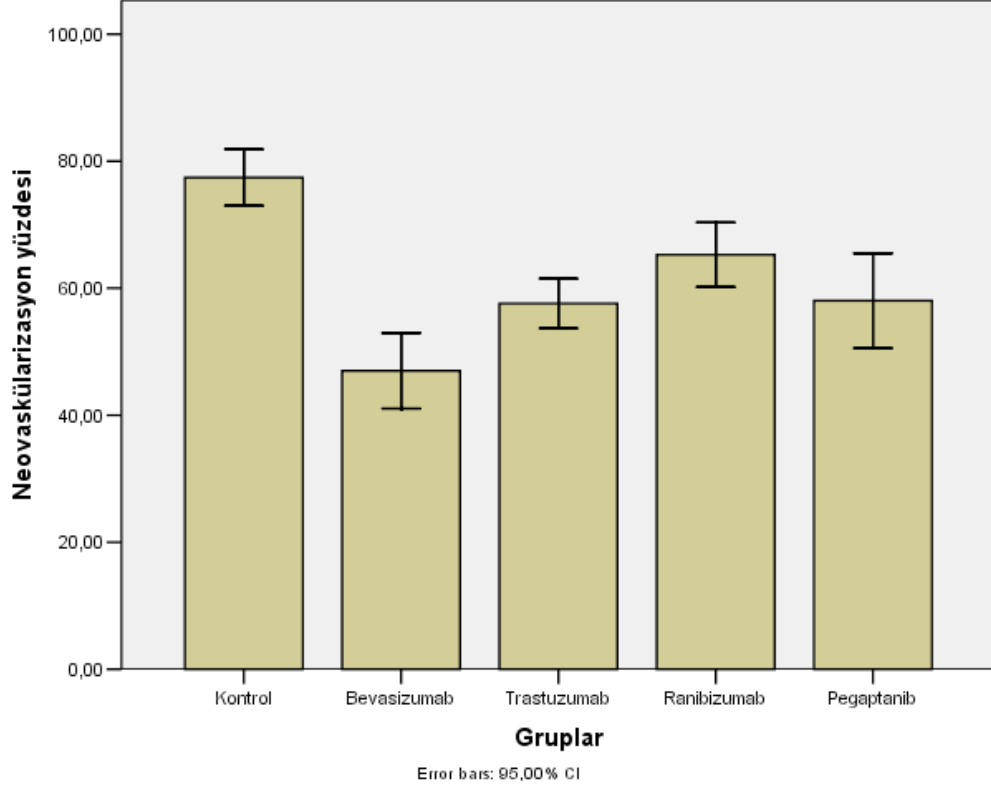


Çalışmamızda trastuzumabın bevasizumabtan daha az etkin, ancak ranibizumabtan daha etkili olduğu ve pegaptanible aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

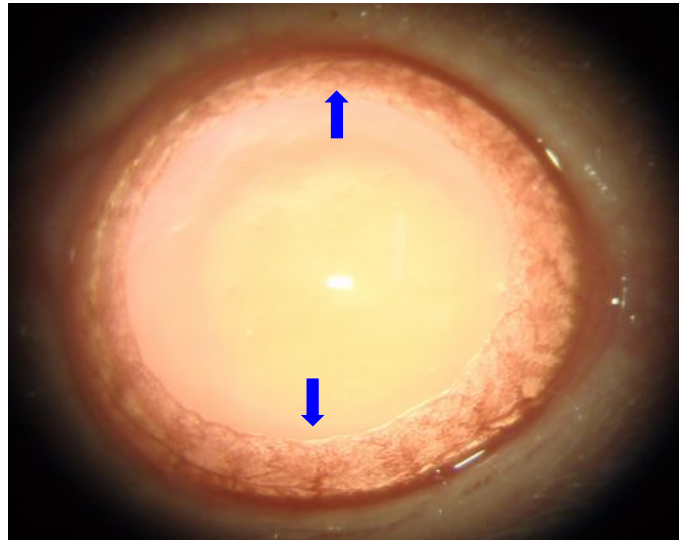
Ranibizumab korneal neovaskülarizasyon yüzdesi açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldı ve neovaskülarizasyonun anlamlı derecede daha az olduğu görüldü( $p=0,006$ ). Çalışmamızda ranibizumab ile pegaptanib arasında neovaskülarizasyon yüzdesi açısından anlamlı bir fark görülmedi( $p=0,109$ ). Fakat ranibizumabın neovaskülarizasyon inhibisyonuna etkisi, bevasizumab ve trastuzumabtan anlamlı derecede daha düşük bulundu( $p<0,05$ ).

Pegaptanibin korneal neovaskülarizasyon yüzdesi  $58,02 \pm 7,12$  olup, kontrol grubundan ( $77,41 \pm 4,24$ ) anlamlı derecede daha az olduğu görüldü( $p=0,004$ ). Pegaptanib diğer tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında neovaskülarizasyon yüzdesinde trastuzumab ve ranibizumabla aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü( $p>0,05$ ).

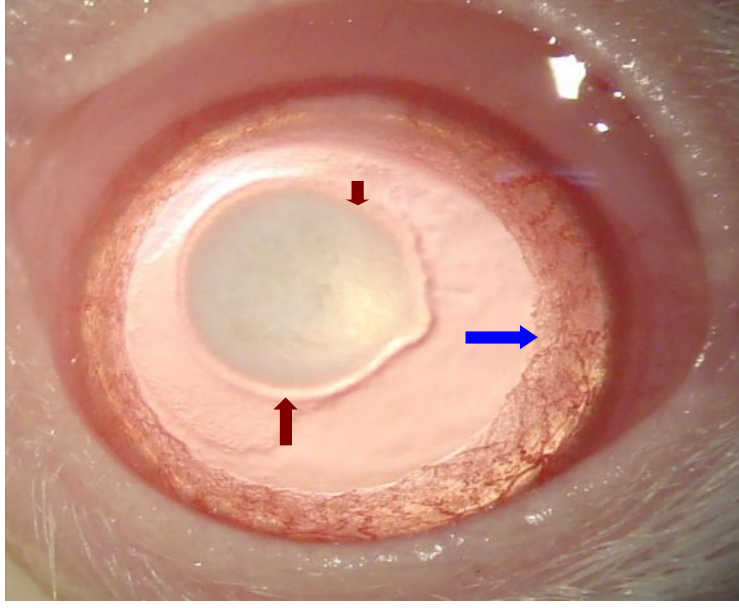
Çalışmamızda trastuzumab ve pegaptanib arasında etki açısından istatistiksel fark olmadığı, ancak bevasizumabtan daha az etkiye sahip oldukları bulundu.



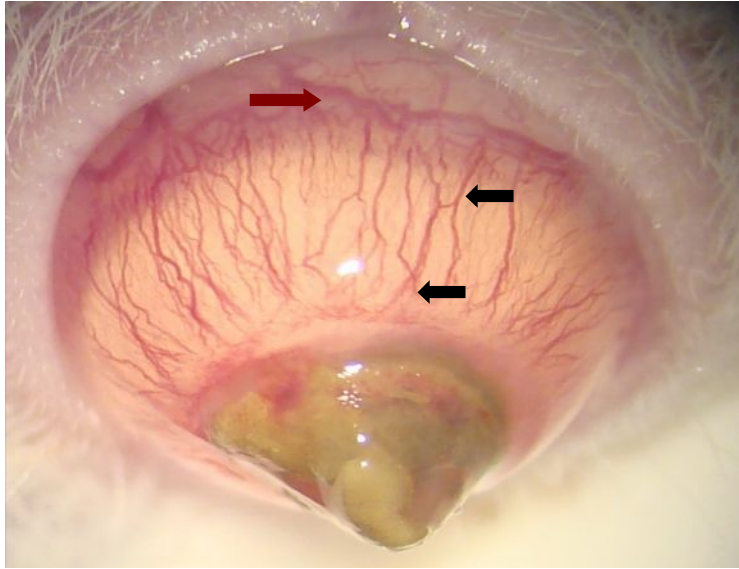
**Şekil 1 :** Kontrol grubu ve tüm tedavi grupları arasında korneal neovaskularizasyon yüzde karşılaştırmaları. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre P değerleri (Mann-Whitney U testine göre: bevasizumab  $p=0,004$  trastuzumab  $p=0,004$  ,ranibizumab  $p=0,006$  pegaptanib  $p=0,004$ )



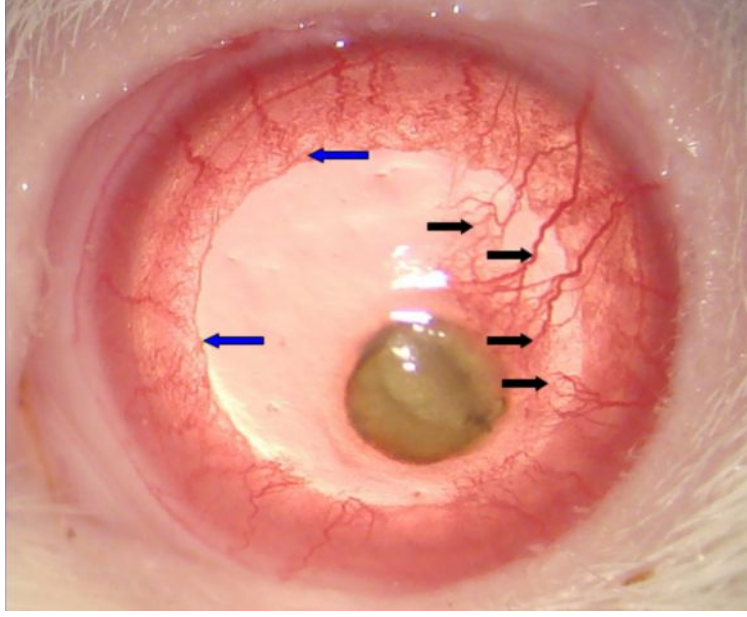
**Şekil 2:** Normal sıçan korneası. Oklar iris kenarını ve iris damarlarını göstermektedir.



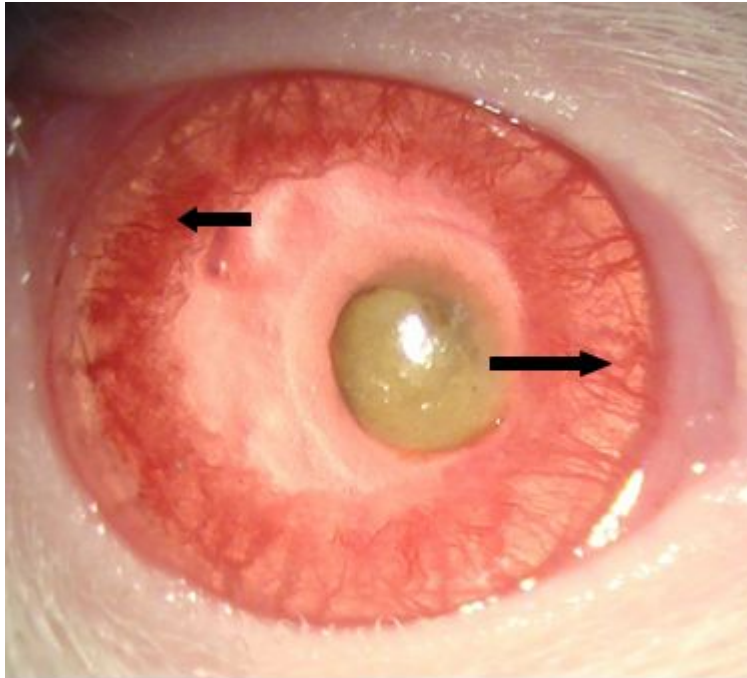
**Şekil 3:** Gümüş nitrat ,Potasyum nitrat çubuklarıyla kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra sıçan korneası. Kahverengi oklar kimyasal yanık sınırını, mavi ok iris kenarı ve iris damarlarını göstermektedir.



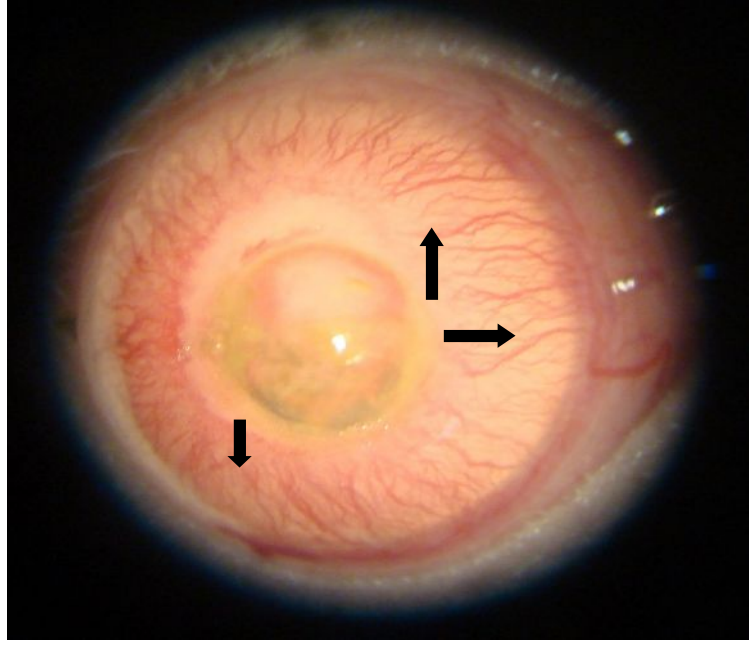
**Şekil 4:** Kontrol grubunda olan bir denekteki skar ve yoğun kornea neovaskülarizasyonu. Kahverengi ok limbal damarları, siyah oklar ise santral skara kadar ilerlemiş total korneal neovaskülarizasyonu gösteriyor.



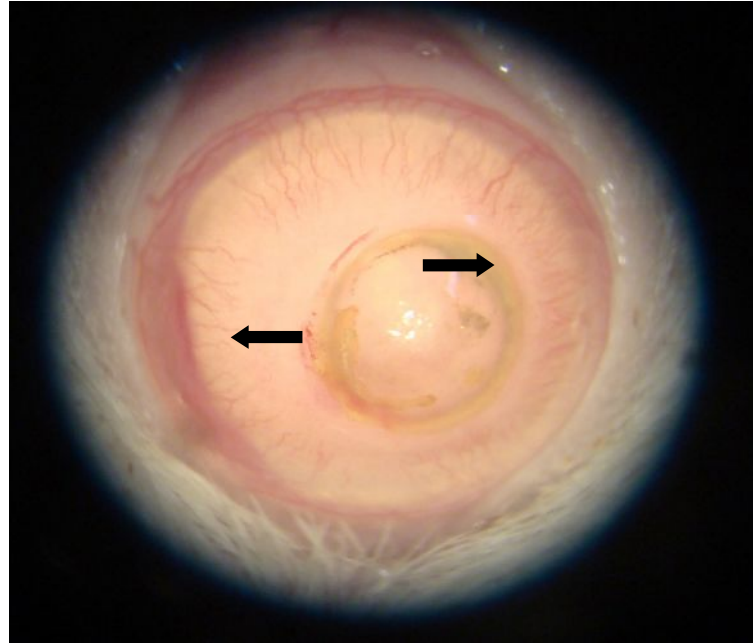
**Şekil 5 :** Bevasizumab tedavi grubunda olan bir denekteki minimal kornea neovaskülarizasyonu ve santralde skar oluşumu izlenmektedir. Siyah oklar neovaskülarizasyonları, mavi oklar iris damarlarını ve iris kenarını göstermektedir.



**Şekil 6 :** Trastuzumab tedavi grubunda olan bir denekteki kısmi kornea neovaskülarizasyonu. Siyah oklar neovaskülarizasyonları göstermektedir.



**Şekil 7** : Ranibizumab tedavi grubunda olan bir denekteki skara yaklaşmış kornea neovaskülarizasyonu ve santral korneal skar. Oklar korneal neovaskülarizasyonları göstermektedir.

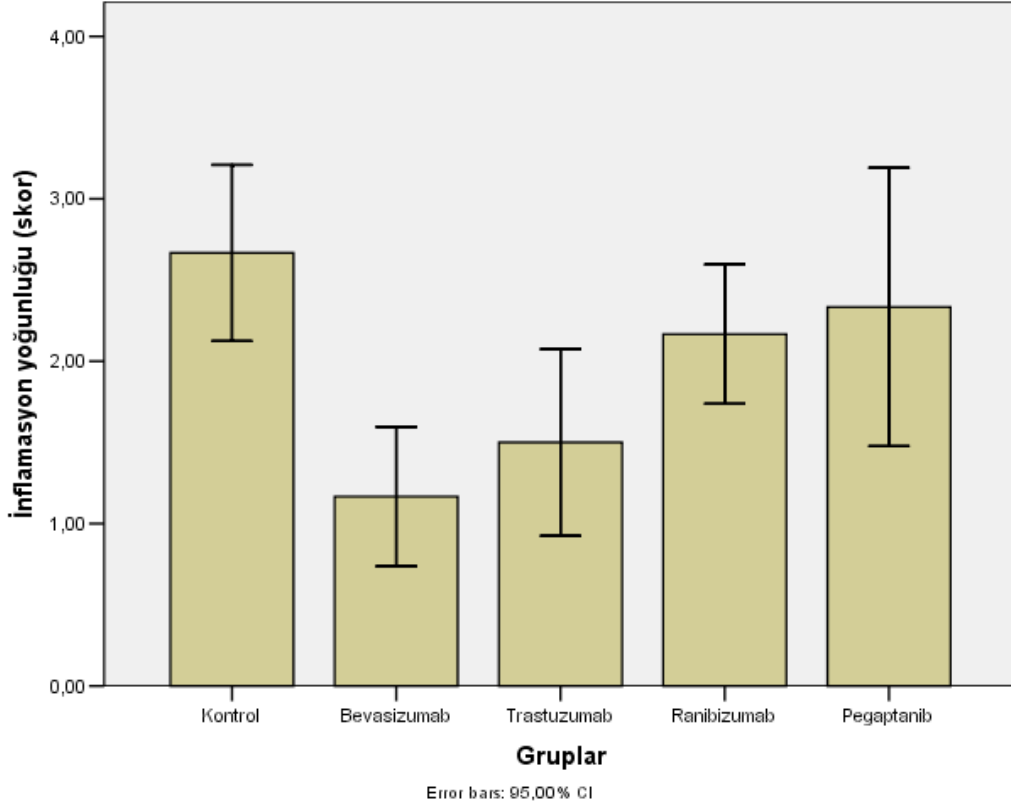


**Şekil 8** : Pegaptanib tedavi grubunda olan bir denekteki kornea neovaskülarizasyonu ve santral korneal skar. Oklar korneal neovaskülarizasyonları göstermektedir.

## 4.2. Histopatolojik Değerlendirme

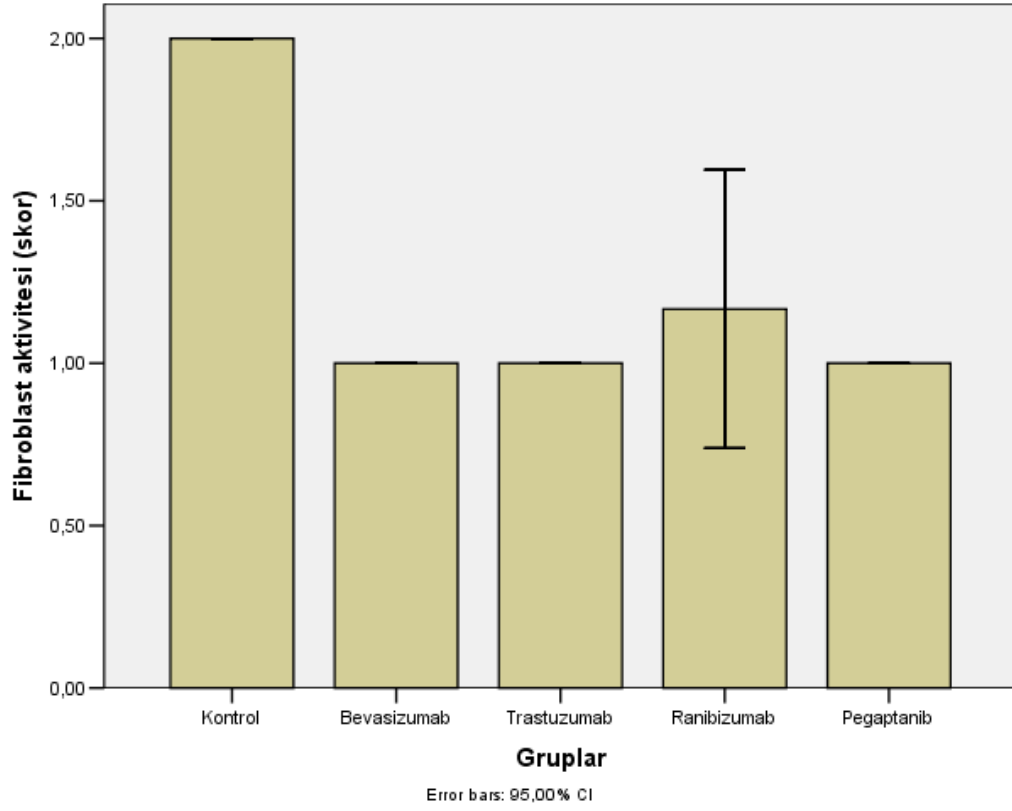
**Tablo 5:** Grupların histopatolojik açıdan: inflamasyon, fibroblast aktivitesi, neovaskülarizasyon yoğunluğu ve korneal kalınlık değerlendirme sonuçları.

	Sıçan No	İnflamasyon yoğunluğu	Fibroblast Aktivitesi	Neovaskülarizasyon yoğunluğu	Korneal kalınlık (mikrometre)
G1 KONTROL	1	++	++	++	200
	2	+++	++	+++	250
	3	+++	++	+++	300
	4	++	++	+++	225
	5	+++	++	+++	300
	6	+++	++	+++	225
G2(BEVASİZ UMAB)	7	+	+	+	175
	8	+	+	+	225
	9	+	+	+	150
	10	+/-	+	+	200
	11	++	+	++	275
	12	+	+	+	175
G3(TRASTUZ UMAB)	13	++	+	++	250
	14	+	+	++	225
	15	++	+	++	275
	16	+	+	+	175
	17	++	+	++	250
	18	+	+	+	200
G4(RANİBİZ UMAB)	19	++	+	++	250
	20	++	+	+	250
	21	++	+	+++	300
	22	+++	+++	+++	250
	23	++	+	++	225
	24	++	+	++	250
G5(PEGAPT ANİB)	25	+++	+	+++	325
	26	++	+	++	325
	27	+++	+	+++	300
	28	+++	+	+++	300
	29	+	+	+	250
	30	++	+	++	275



**Şekil 9 :** Gruplara göre inflamasyon yoğunluğu. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre Chi-Square testi p değerleri ( bevasizumab p=0,009 trastuzumab p=0,027 ranibizumab p=0,121 Pegaptanib p= 0,565).

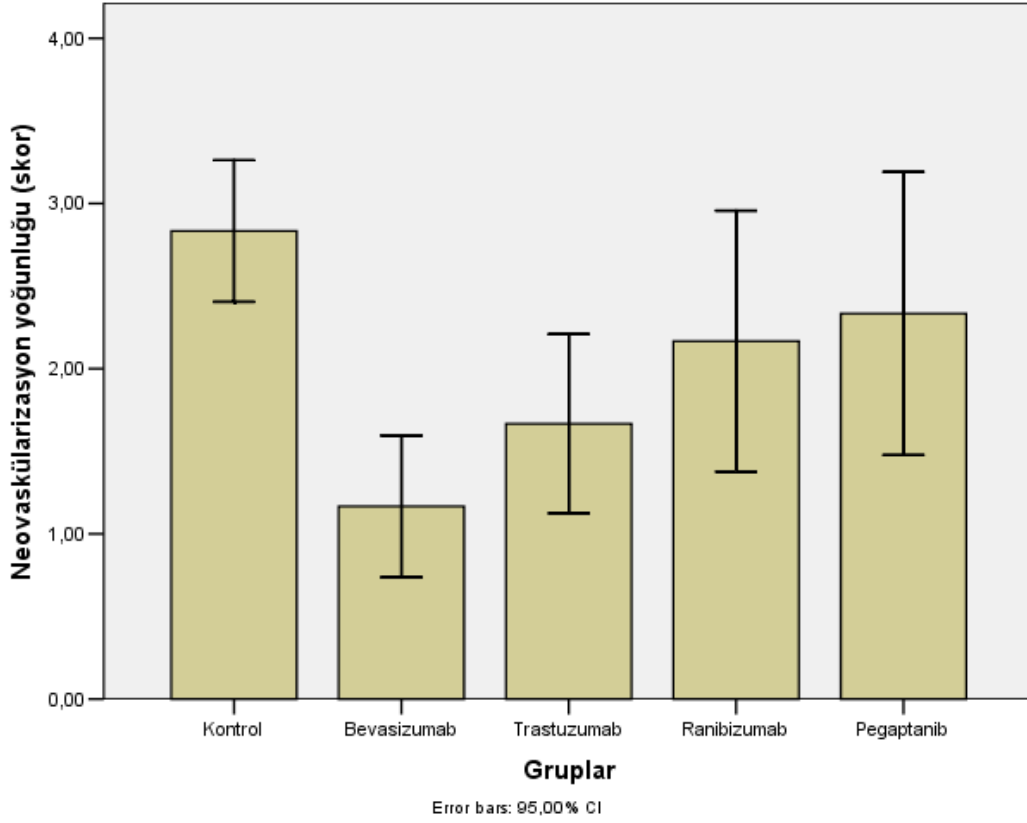
Histopatolojik incelemede tüm gruplar inflamasyon yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,004). Tedavi gruplarındaki inflamasyon yoğunluğu, kontrol grubundaki inflamasyon yoğunluğu ile karşılaştırıldı. Bevasizumab ve trastuzumab gruplarında inflamasyon yoğunluğu kontrol grubundan daha az bulundu (bevasizumab p=0,009 trastuzumab p=0,027). Ranibizumab ve Pegaptanib grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılığın anlamlı olmadığı görüldü(p>0,05). Bevasizumab ve trastuzumab arasında anlamlı fark olmadığı saptandı(p=0,241). Bevasizumab ve trastuzumab diğer iki ilaçtan daha etkin inflamasyon kontrolü sağladı.



**Şekil 10** : Gruplara göre fibroblast aktivite skoru. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre Chi-Square testi p değerleri (bevasizumab p=0,002 trastuzumab p=0,002 ranibizumab p=0,015 Pegaptanib p= 0,002 ).

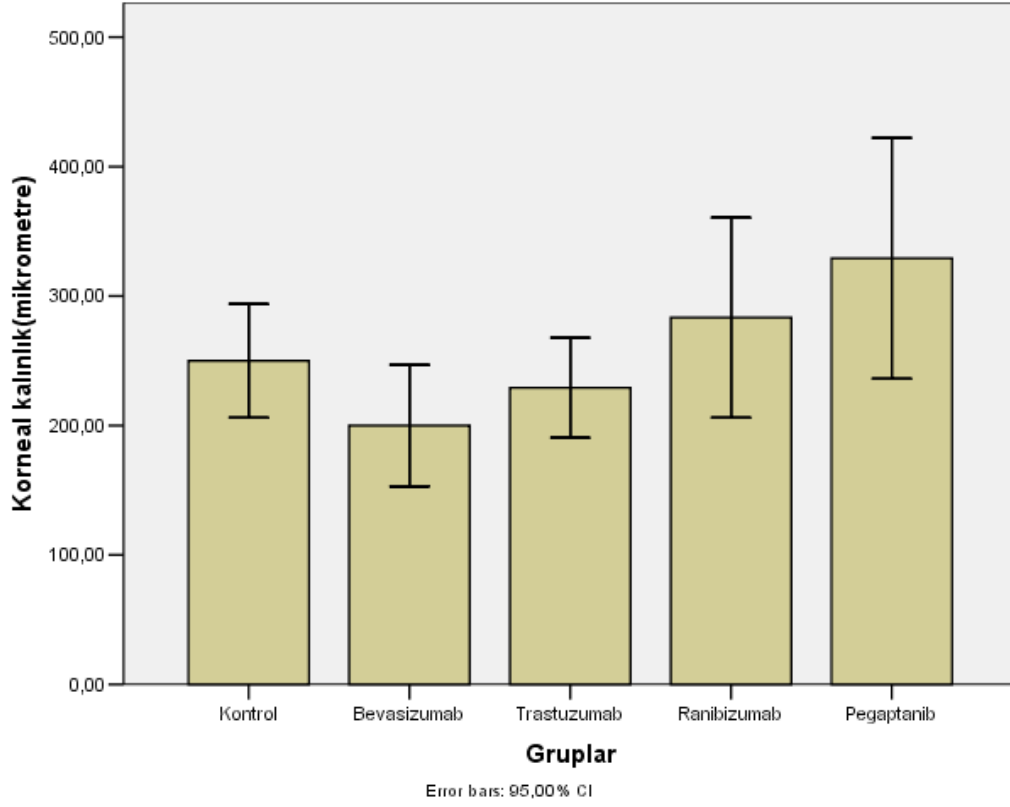
Tüm tedavi grupları fibroblast aktivitesi açısından, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu(  $p < 0,05$ ) ve fibroblast aktivitesinin daha az olduğu saptandı. Bevasizumab, Trastuzumab, Ranibizumab ve Pegaptanib grupları fibroblast aktivitesi yönünden aralarında karşılaştırıldığında farkın anlamlı olmadığı görüldü ( $p=0,392$ ).





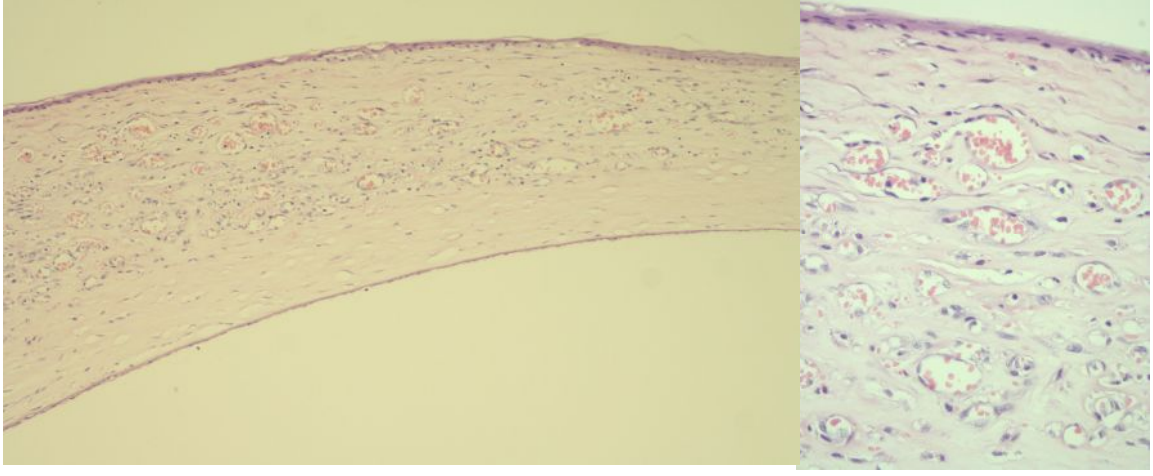
**Şekil 11 :** Gruplara göre neovaskularizasyon yoğunluk skoru. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre Chi-Square testi p değerleri (bevasizumab p=0,007 trastuzumab p=0,012 ranibizumab p=0,193 pegaptanib p= 0,40).

Histopatolojik değerlendirme sonuçları neovasküler yoğunluk açısından incelendiğinde tüm gruplar arasında vasküler yoğunluk farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p= 0,005). Bevasizumab ve trastuzumab gruplarında vasküler yoğunluğun kontrol grubundan daha az olduğu görüldü(sırayla p değerleri: p=0,007 p=0,012 ). Ranibizumab ve pegaptanib grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü(p>0,05). Bevasizumab ve trastuzumabın vasküler yoğunluk açısından aralarında anlamlı fark olmadığı ve benzer etkiye sahip oldukları saptandı. Bevasizumab ve trastuzumab düşük vaskularizasyon yoğunluğunun sağlanmasında diğer iki ilaçtan daha etkin bulundu.

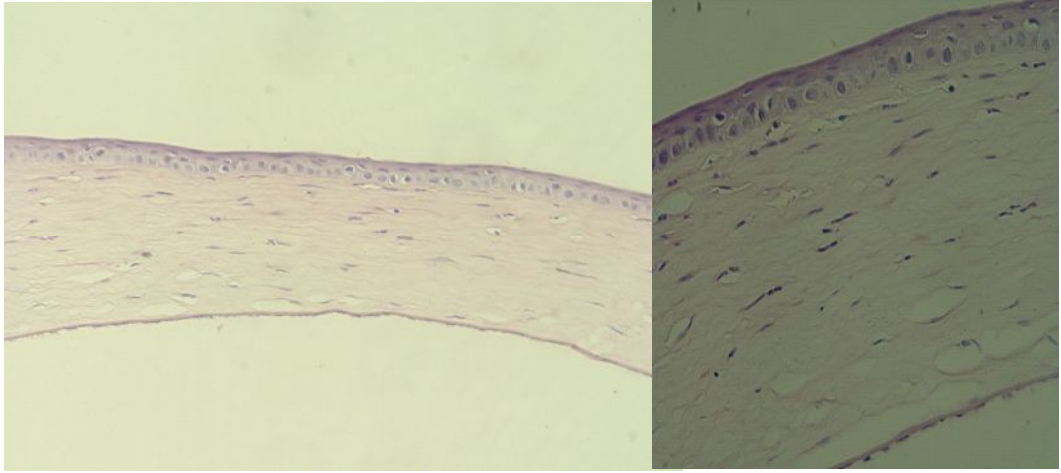


**Şekil 12 :** Gruplara göre korneal kalınlık grafiği. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre Mann-Whitney U testi p değerleri ( bevasizumab  $p=0,062$  trastuzumab  $p=0,463$  ranibizumab  $p=0,452$  pegaptanib  $p=0,059$ ).

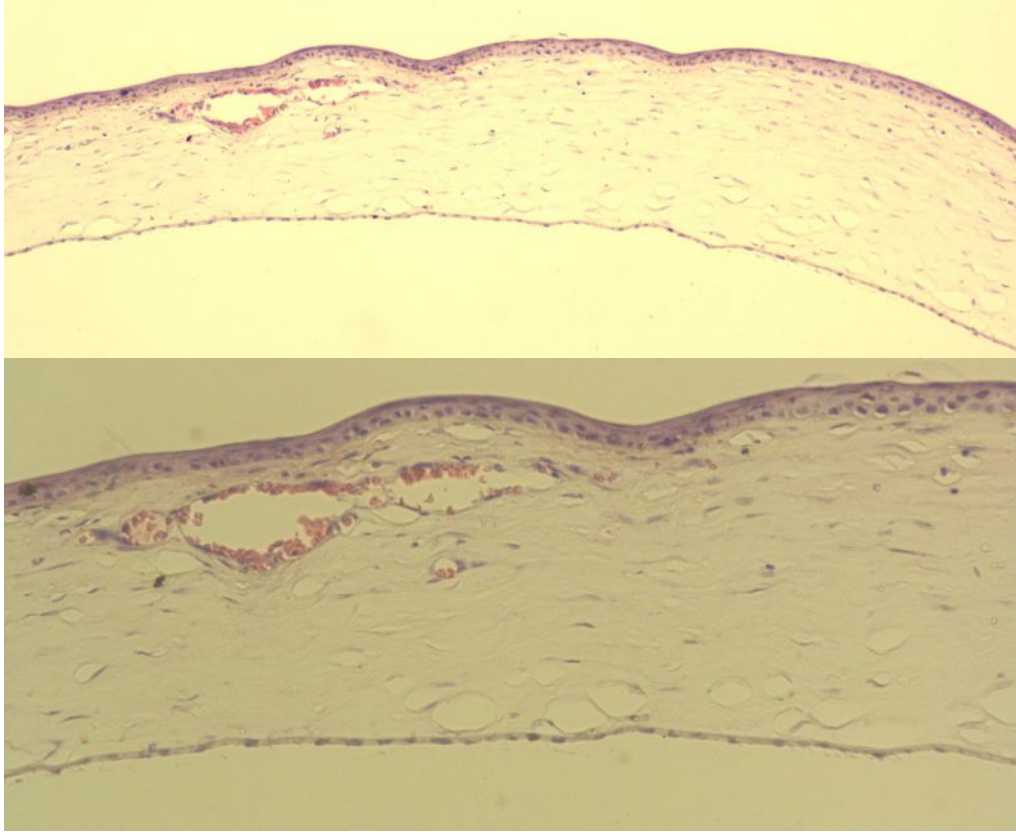
Dört ilaç grubu korneal kalınlık açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldı. Bevasizumab ile trastuzumab arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p=0,223$ ). Fakat bevasizumab ve ranibizumab arasındaki fark anlamlı bulundu ve bevasizumab grubunda kornea daha inceydi ( $p=0,029$ ). Ayrıca bevasizumab ve pegaptanib arasındaki fark da anlamlı bulundu ve bevasizumab grubunda korneanın daha ince olduğu saptandı ( $p=0,008$ ). Trastuzumab ile ranibizumab arasındaki fark anlamsız bulundu ( $p=0,157$ ). Fakat trastuzumab ile pegaptanib arasındaki fark anlamlı bulundu ve kornea trastuzumab grubunda daha inceydi ( $p=0,012$ ).



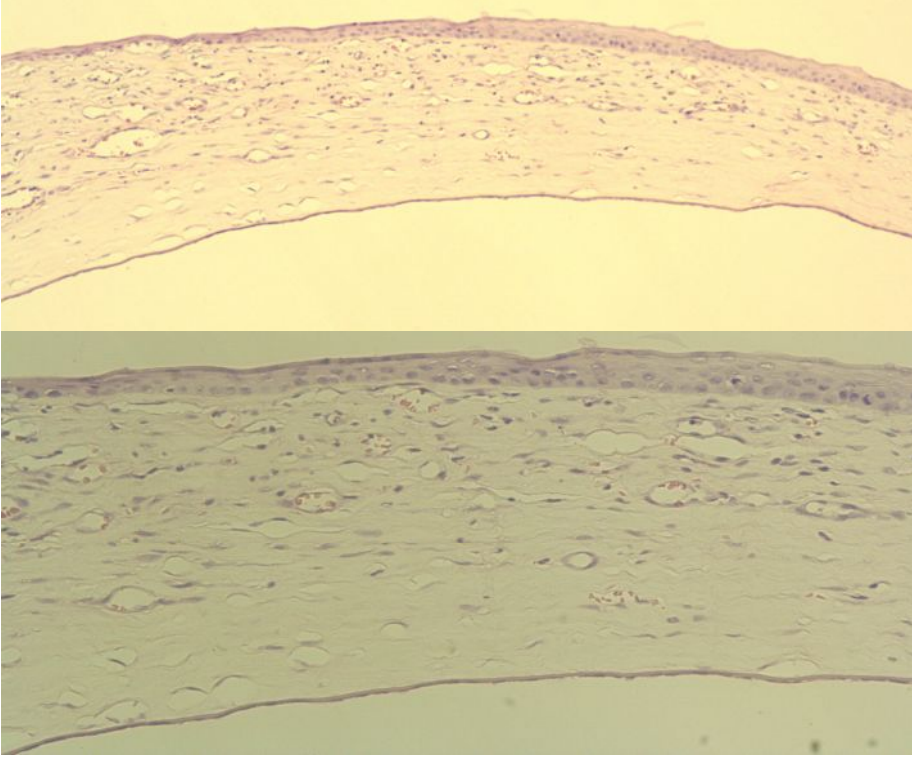
**Şekil 13 :** Kontrol grubu, x100, x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Derin stromal katlarıda tutan yaygın ve yoğun neovaskülarizasyon, yoğun inflamasyon ve artmış fibroblast aktivitesi görülmekte.



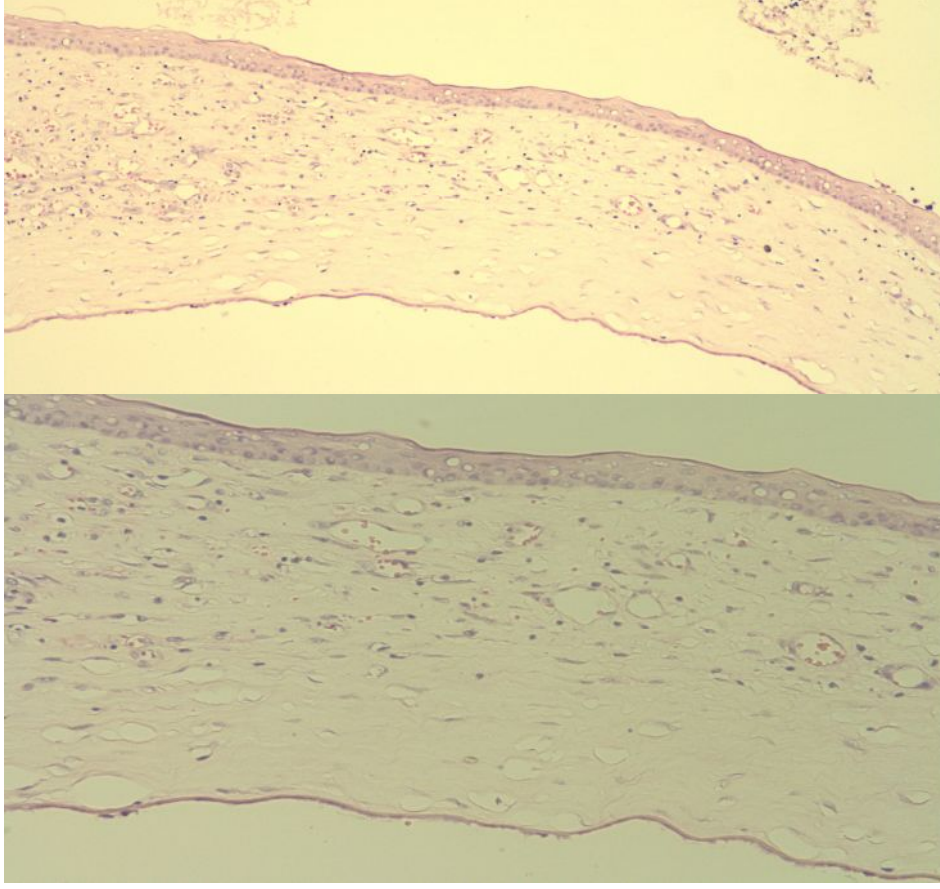
**Şekil 14 :** Bevasizumab grubu, x200, x400, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Vasküler yapıların olmadığı görülmekte.



**Şekil 15 :** Trastuzumab grubu, x100, x200, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Ön stromada fokal vasküler yapılar görülmekte.



**Şekil 16** : Ranibizumab grubu, x100, x200, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler yapılar görülmekte.



**Şekil 17 :** Pegaptanib grubu, x100, x200, Hematoksilen ve Eozin ile boyalı korneal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler yapılar görülmekte.

## 5. TARTIŞMA

Korneanın neovasküler hastalıkları önemli bir halk sağlığı problemidir (119). İnflamatuar, enfeksiyöz, dejeneratif veya travmatik durumlar korneada neovaskülarizasyonu tetikleyebilir. Deneysel ve klinik korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda tanımlanan birçok tedavi yöntemi: steroidler, nonsteroid anti-inflamatuar ajanlar, heparin , suramin, siklosporin A, somatostatin , metotreksat , talidomid (20-25) içinde, klinik pratikte korneal greft reddi ve korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde esas olarak steroidler kullanılmaktadır. Fakat steroid kullanımı bazı durumlarda yeterince etkili değildir ayrıca infeksiyon, glokom, katarakt oluşumu gibi çeşitli komplikasyonlarla ilişkilidir.

Biz çalışmamızda üç farklı anti-VEGF ajanın ve trastuzumabın kimyasal yanıkla indüklenen korneal neovaskülarizasyon inhibisyonundaki etkinliklerini araştırdık ve onların etkinliklerini kendi aralarında karşılaştırdık. Bu dört ajanında korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduğunu gördük. Neovaskülarizasyon yüzdesi açısından bevasizumabın en etkin ajan olduğunu saptadık.

Bevasizumab'ın YBMD, üveit, santral retinal ven oklüzyonu, diabetik retinopati sonucu oluşan maküler ödem( 120-122) tedavisinde intravitreal olarak kullanımının başarılı sonuçlarının açıklanmasından beri birçok araştırmacı tarafından hayvanlarda ve insanlarda korneal neovaskülarizasyonun tedavisi için topikal veya subkonjonktival bevasizumab uygulamasının etkinliği araştırılmıştır.

Kim ve ark. tavşanlarda korneal sütürle indükledikleri neovaskülarizasyonda deneyin 1. gününde ve 1 hafta sonra olmak üzere iki kez 5mg/0,2ml subkonjonktival bevasizumab uygulamışlar, 14. günde çekilen korneal fotoğraf analizleri ve immünohistokimyasal analizde bevasizumabla tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre, neovaskülarizasyonun ve korneal sütür bölgesinde VEGF seviyesinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir (123). Back ve ark. farelerde sütürle indüklenen korneal neovaskülarizasyonda, hem sistemik hemde topikal olarak bevasizumab uygulamışlar, cerrahinin 1. ve 3.günü intraperitoneal olarak 5mg/kg bevasizumab uygulamış ve 7 gün sonra fareler sakrifiye edilmiş ve topikal uygulamadaysa günde 4 kez 5mg/ml bevasizumab damla damlatılmış 5. günde sakrifikasyon yapılmıştır. Topikal veya sistemik olarak verilen bevasizumabın inflamatuvar anjiyenez ve lenfanjiyenezini inhibe

ettiği gösterilmiş(124). Manzano ve ark. sıçanlarda yaptıkları çalışmada deneysel korneal neovaskularizasyonda günde iki kez 4mg/ml bevasizumab topikal damla uygulamanın kimyasal yanık sonrası korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Bevasizumabla tedavi edilen grupta ortalama korneal neovaskularizasyon alanı  $38,2 \pm 15,5$  kontrol grubunda ise  $63,5 \pm 5$  bulunmuştur(125). Hosseini ve ark. tavşan kornealarında kimyasal yanık sonrası gelişen anjiyenezde lezyon sonrası hemen verilen tek doz 2.5mg subkonjonktival bevasizumabın etkili olduğunu göstermiştir. Bevasizumabla tedavi edilen grupta ortalama korneal neovaskularizasyon alanının  $40 \pm 13$  kontrol grubunda ise  $59 \pm 15$  olduğunu bildirmiştir (126). Bizim çalışmamızda deneyin 1. gününde tek doz 1,25mg/0,05ml subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu uygulandı ve tedavi grubunda korneal neovaskularizasyon alanı  $46,9 \pm 5,6$  kontrol grubundaysa  $77,41 \pm 4,2$  bulundu. İlaç uygulama şekli, doz ve denekler farklı olmakla birlikte, bu çalışmaların ortak özelliği bizim çalışmamızda da olduğu gibi bevasizumabın neovaskularizasyonu azalttığını göstermeleridir.

Bevasizumabla ilgili klinik çalışmalar değerlendirildiğinde; Bahar ve ark. korneal neovaskularizasyonu olan hastalara her göze en az iki kez 2,5mg/0,1ml subkonjonktival bevasizumab enjekte ettiklerinde kısa süreli sonuçların, korneal neovaskularizasyonu kısmen gerilettiliğini ve tedavinin iyi tolere edildiğini açıkladılar (32). Koenig ve ark. çeşitli oküler hastalıklara sekonder gelişen korneal neovaskularizasyon tedavisinde 5mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bevasizumab göz damlasını günde beş kez uygulamışlar ve korneal neovaskularizasyon inhibisyonunda, damar çapının azalmasında topikal bevasizumab uygulamasının etkili, göreceli olarak güvenli olduğunu ve iyi tolere edildiğini belirtmişlerdir (127). You ve ark. korneal neovaskularizasyonu olan 29 hastada yaptığı bir çalışmada farklı dozlarda (1,25mg/0,05ml 2,5mg/0,1ml ve 5mg/0,2ml) subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu uygulamışlar. 1,25mg bevasizumab enjekte edilen grupta neovaskularizasyon alanında anlamlı bir değişiklik olmazken, 2.5mg ve 5mg bevasizumab enjekte ettikleri gruplarda neovaskularizasyonda önemli gerileme olduğunu ancak tamamen kaybolmadığını saptamışlardır(128).

Korneal neovaskularizasyonda bevasizumabın etkinliğiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına ve korneal neovaskularizasyonlu hastaların tedavisinde kullanılmasına rağmen, hala en etkin doz ve uygulama sıklığının ne olduğu



belirlenememiştir. İdeal dozajın ve uygulama sıklığının belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürdeki çalışmalarda uygulama zamanı konusundada fikir birliği oluşmamıştır. Barros ve ark. sıçanlarda subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonunun korneal anjiojenezde etkinliğini araştırdıkları çalışmada, tedavi gruplarına üç farklı zamanda subkonjonktival 0,02ml bevasizumab uygulamışlar. Bir gruba kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra, ikinci gruba üçüncü günde ve üçüncü gruba lezyondan sonra beşinci günde enjeksiyon yapılarak, neovaskülarizasyonla kaplı alan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi zamanından bağımsız olarak subkonjonktival bevasizumabın korneal anjiojenez inhibisyonunda etkili olduğu fakat korneal neovaskülarizasyonun total olarak önlenemediği görülmüştür (28). Bununla birlikte Papathanassios ve ark. tavşanlarda kimyasal yanık sonrası indüklenen korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda tek doz 3,75mg subkonjonktival bevasizumabın etkili olduğunu ve özellikle erken tedavinin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir . Deney süreci sonunda (28.gün) korneal neovaskülarizasyon alanı kontrol grubunda  $41\pm 3,6$  geç tedavi grubunda (14.gün bevasizumab enjekte edilen grup)  $13\pm 2,3$  ve erken tedavi grubunda (1.gün bevasizumab enjekte edilen grup)  $4,7\pm 3,1$  olarak bulunmuş. Bizim çalışmamızın aksine erken tedavi grubunda korneal neovaskülarizasyonun neredeyse total olarak inhibe edildiğini rapor etmişlerdir (31).

Hurmeric ve ark. domuzlarda kimyasal yanıkla indüklenen korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda 1.gruba yanığın 1. günü ve sonra 3. günde , 2.gruba yanıktan sonra 3. ve 5. günlerde iki kez 1,25mg/0,1ml subkonjunktival bevasizumab enjeksiyonu uygulamışlar. 1. 2. gruplar ve kontrol grupları arasında dijital fotoğrafla belirlenen kornea yüzey neovaskülarizasyon alanında anlamlı fark olmadığını belirtmişlerdir; ancak kullandıkları farklı bir değerlendirme yöntemi ile limbal neovaskülarizasyonun derecesi ve yanığa olan mesafesine göre belirlenen ve 0 ile +6 arasında derecelendirilen neovaskülarizasyon skoruna göre anlamlı fark bildirmişlerdir. Neovaskülarizasyon skoru sonuçlarına göre kimyasal yanıkla eş zamanlı uygulanan bevasizumabın daha etkin olduğu belirtilmiştir (33). Biz çalışmamızda sıçanlara kimyasal yanıktan hemen sonra tek doz 0,05ml(1,25mg) subkonjonktival bevasizumab uygulanmasının korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiğini saptadık.

Bevasizumabın subkonjonktival enjeksiyonundan sonra absorpsiyonu ve takip eden süreçte korneadaki konsantrasyonu ölçülmemiştir. Edelman ve ark. sıçan kornealarında kimyasal yanıktan 48saat sonra VEGF mRNA ve proteinlerinin pik yaptığını, kimyasal yanıktan sonra 4 gün yüksek seviyede kaldığını, 7. gün seviyesinin düşerek kontrol seviyesine yaklaştığını göstermiştir (129). Subkonjonktival enjeksiyon sonrası ve takibinde korneada bevasizumab konsantrasyonu tam olarak saptanamamasına rağmen korneada VEGF seviyesinin halen yüksek olduğu bir dönemde bevasizumab konsantrasyonunun gereğinden düşük olması, bevasizumabın neovaskülarizasyonu neden tamamen önleyemediğini açıklayabilir. VEGF'in pik yaptığı ve yüksek seyrettiği bir dönemin olması bevasizumab enjeksiyon zamanının önemli olduğuna işaret etmektedir. Barros ve ark. bevasizumabı enjeksiyon zamanından bağımsız olarak etkili bulmuşlar (28), ancak bunun tersine Papathanassios ve ark. erken dönemdeki enjeksiyonun daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (31). Bevasizumabın intravitreal enjeksiyonundan sonra aköz hümördeki yarılanma ömrünün 4,88 gün olduğu belirtilmiştir, bu süre sıçanlarda yüksek VEGF seviye dönemini kapsıyor gözükmektedir. Bevasizumabın erken dönemde(1.gün) enjekte edilmesi stromal yara iyileşmesinin ikinci fazında ilacın maksimum konsantrasyonda olmasını sağlayabilir. Bu fazda keratosit proliferasyonu ve fibroblastlara transformasyon gerçekleşir, bu sürece yüksek seviyede VEGF, TGF, bFGF, PDGF gibi epitelyal ve stromal büyüme faktörleri ve TNF-alfa, IL-1 gibi sitokinler eşlik eder. Bu yüzden erken enjeksiyon daha etkili olabilir, ayrıca Papathanassios ve ark. sonuçları (31) acaba bevasizumab VEGF dışındaki büyüme faktörlerinede etkilimi sorusunu akla getirmektedir. VEGF asıl olarak yeni gelişen damar oluşumu üzerine etkilidir, daha önceden var olan damarlar üzerindeki etkisi sınırlıdır bu da bevasizumabın erken enjeksiyonunun daha etkili olabileceğini desteklemektedir. Bizim çalışmamızda erken dönemde subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu uygulandı, neovaskülarizasyonun baskılanmasında tamamen olmasa da önemli derecede etkili bulundu. Subkonjonktival bevasizumabın farklı dozda, farklı zamanda ve sıklıkta uygulanması alınan sonuçları etkileyebilir. Günümüzde korneal neovaskülarizasyon baskılanmasında bevasizumab kullanılmakla birlikte, bevasizumabın ideal dozunun, enjeksiyon zamanının ve enjeksiyon sıklığının belirlenmesi için yapılacak başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda ranibizumabın korneal neovaskülarizasyon yüzdesini kontrol grubuna göre önemli derecede azalttığı görüldü. Ranibizumabın VEGF-A'ya

bağlanmasıyla VEGF-A ile endotel hücre yüzeyindeki VEGFR1 ve VEGFR2 arasındaki etkileşim önlenerek endotel hücre proliferasyonu, vasküler sızıntı ve yeni kan damarlarının oluşumu önlenir. Yaş tip YBMD'da asıl önemli safha anjiojenezdir. Ferrara ve ark. ilk kez ranibizumabın YBMD'nun tedavisinde etkin ve güvenli olduğunu ,görme keskinliğinin korunması ve iyileşmesine katkıda bulunarak birçok YBMD'lu hastanın tedavisinde potansiyel olarak yeni bir tedavi seçeneği olduğunu gösterdi(112). Bizim çalışmamızda ranibizumab korneal neovaskülarizasyonu azaltmakta etkili bulundu. İlginç olarak bevasizumab grubu korneal neovaskülarizasyon yüzdesi açısından ranibizumab grubuyla karşılaştırıldığında daha etkili bulundu. Bevasizumab ve ranibizumab aynı mekanizmalarla etki etmekte ve her iki ajan da VEGF-A izoformlarının hepsini inhibe etmektedir. Ranibizumabın fare VEGF-A'sına ilgisi düşük olmakla birlikte, VEGF'e afinitesi bevasizumab'tan 10-100 kat daha fazladır.(27,111,112). Bunlara rağmen ranibizumabın daha az etkin olması, ranibizumabın subkonjunktival uygulamasının farmakokinetiğiyle ilgili nedenlere bağlı olabilir. Bu konuda bevasizumabla ilgili bilgilerimiz de sınırlıdır. Ancak intravitreal enjeksiyon sonrası bevasizumabın (1,25mg) yarılanma ömrü 4,9 günken ranibizumabın (0,5mg) yarılanma ömrü 2,8-3,2 gündür, bu süre pirimatlarda bevasizumab için 6,9 gün ve ranibizumab için 3,5 gündür. İntravitreal enjeksiyon sonrası serum pik konsantrasyonu bevasizumabta 3000 (ng/ml), ranibizumabta ise 0-3 (ng/ml) dir. Pirimatlarda intravenöz yoldan sistemik uygulandığında bevasizumabın yarılanma ömrü 21 günken ranibizumabın yarılanma ömrü 1 günden kısadır ve bu özellikle dikkat çekicidir(27). Bu durum ranibizumabın subkonjunktival enjeksiyon sonrası hızla elimine olarak o bölgede yeterli sürede ve konsantrasyonda kalmamış olabileceğini, bu da ranibizumabın niçin bevasizumabtan daha az etkin olduğunu açıklayan olası bir nedendir.

Ayrıca korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde ranibizumabın hangi dozda subkonjunktival uygulanması gerektiğiyle ilgili bir bilgi henüz belirlenmemiştir, literatürde bu konuda bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak benzer mekanizmalarla etki eden diğer bir anti-VEGF ajanı bevasizumabın subkonjunktival uygulanmasının korneal neovaskülarizasyonda etkinliği dozla ilişkili bulunmuştur (128). Biz çalışmamızda ranibizumabın intravitreal uygulama dozunu (0,5mg/0,05ml) subkonjunktival olarak uyguladık. İleri çalışmalarda doz ve uygulama şekli araştırılabilir.

Çalışmamızda bir diğer anti-VEGF ajanı olan pegaptanib subkonjonktival olarak kimyasal yanık sonrası hemen enjekte edildi. Pegaptanibin intravitreal dozu (0,3mg/0,1ml ) subkonjonktival olarak uygulandı. Pegaptanib yaş tip YBMD tedavisinde kullanılır(114). Biz literatürde pegaptanibin korneal neovaskülarizasyona etkisini değerlendiren tek çalışma gördük. Bu prelinik çalışmada sıçanlarda VEGF<sub>165</sub> içeren metakrilat polimerin stromaya implantasyonu ile indüklenen korneal neovaskülarizasyonda 5 gün boyunca günde iki kez intravenöz 1, 3 veya 10mg/kg dozunda pegaptanib(EYEOO1) verilmiş. Damar yoğunluğu 1-4 arasında, uzunluğu 1-5 arasında skorlanmış ve çembersel damar olup olmasına göre 0-1 arasında skorlanarak anjiojenik indeks belirlenmiş, bu sonuçlar yüzde değerlere dönüştürülmüş ve kontrol grubunun anjiojenik indeksi %100 kabul edilmiş. Pegaptanibin korneal anjiojenezi kontrol grubuna göre %65 oranında azalttığı belirtilmiştir (118). Biz çalışmamızda tek doz subkonjonktival pegaptanib enjeksiyonunun korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduğunu bulduk. Pegaptanib, bevasizumab ve ranibizumabtan farklı olarak tüm VEGF izoformlarını inhibe etmez sadece spesifik olarak VEGF<sub>165</sub> bağlanır. Gözde VEGF<sub>165</sub> in patolojik durumlardaki asıl izoform olduğu gösterilmiştir(117). Bu pegaptanibin tüm VEGF izoformlarını bloke etmemesine rağmen nasıl korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiğini açıklayabilir. Yine aynı neden farklı bir şekilde korneal neovaskülarizasyonun tamamen inhibe edilememiş olmasını da açıklayabilir. Bloke edilmeyen VEGF izoformları korneal neovaskülarizasyon gelişimine katkıda bulunmuş olabilir.

Bizim korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonuna etkisini değerlendirdiğimiz üç farklı anti-VEGF ajandan bevasizumab ve pegaptanibin sonuçları daha önce yapılan çalışmalarla uyumluydu ve korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda üç ajanda etkili bulundu.

Bizim çalışmamızda bu üç ajanda korneal neovaskülarizasyonu tamamen önlemedi, bazı çalışmalar dışında bu sonuçlar daha önce yapılan benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumluydu (28,33,125,126). Bizce anti-VEGF ajanlarla korneal neovaskülarizasyonun tamamen önlenememesinin olası nedenleri şu görüşlerle açıklanmaktadır:

1) Anti-VEGF ajanların VEGF blokajı: Anti-VEGF ajanlar aktif VEGF'in tamamını inhibe etmiyor olabilir. Pegaptanib için bu beklenen bir durumdur çünkü asıl

olarak VEGF<sub>165</sub>'e bağlanmaktadır. Bevasizumab ve ranibizumab içinse daha olası neden VEGF dışında başka anjiojenik faktörlerin varlığıdır(130). VEGF blokajından kaçan diğer proanjiojenik faktörlerin artışı anjiojenezi yeniden uyarıyor olabilir (131).

2) Subkonjonktival uygulanan anti-VEGF ajanın farmakokinetiği: Bevasizumab, ranibizumab ve pegaptanibin subkonjonktivadan emilim, dağılım veya dozajının yetersiz olması. Spitzer ve ark. bevasizumab, ranibizumab ve pegaptanibin domuz koroidal endotel hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiklerini ve endotel hücre büyümesini inhibe edici etkilerinin doza bağlı olduğunu gösterdiler (132). Subkonjonktival uygulanan anti-VEGF ajanın metabolizması, yarılanma ömrü, doz sıklığı ve tedavi için en uygun zaman belirlenememiştir. Korneal neovaskülarizasyonda anti-VEGF ajanın etkinliği dokudaki VEGF pik zamanıyla ilişkili olabilir.

3) Kullandığımız deneysel model: Biz çalışmamızda bir sıçan modeli kullandık. Bevasizumabla ilgili erken dönemde yapılan çalışmalarda bevasizumabın fare ve sıçan VEGF-A'sını nötralize etme yeteneğinin olmadığı açıklandı. Yu ve ark. farelerde VEGF-A ile bevasizumabın etkileşiminin çok zayıf olduğunu , çeşitli biyolojik aktivite belirleme analizlerinde immünonötralizasyon sonuçlarının yetersiz olduğunu belirtmişlerdir(133). Lu ve ark. sıçan modelinde koroidal neovaskülarizasyon tedavisinde bevasizumab, ranibizumab ve pegaptanibin intravitreal enjeksiyonunun etkinliğini ve güvenliğini araştırdıkları çalışmada bu üç anti-VEGF ajanında koroidal neovaskülarizasyonda sızıntıyı durdurmakta hiçbir etkinliğinin olmadığını belirttiler(134). Oysa bu ajanların insanlarda koroidal neovaskülarizasyonda etkinliği gösterilmiştir. Daha önce maymunlarla yapılan deneysel çalışmalarda ranibizumabın koroidal neovaskülarizasyonda sızıntıyı anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular bize anti-VEGF ajanların faregiller familyasında VEGF-A'ya ilgisinin gerçekten az olabileceğini düşündürüyor. Bu durum çalışmamızda anti-VEGF ajanların neden korneal neovaskülarizasyonun baskılanmasında kısmen etkili olduğunu açıklayan bir unsur olabilir. Ancak yapılan bir çok çalışmada sıçan modellerinde bevasizumabın, artmış VEGF seviyesiyle birlikte olan korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili bulunması anti-VEGF ajanlarla sıçan VEGF arasında belli düzeyde etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu bulgular Yu ve ark. sonuçlarını desteklememektedir(133).

Çalışmamızda trastuzumabın korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduğu bulundu. Ayrıca trastuzumabın, ranibizumabtan daha etkin olduğu saptandı.

Trastuzumab insan epidermal growth faktör reseptör 2 ( HER2/ErbB2) onkoproteinine karşı geliştirilmiş insan monoklonal antikordur(104). EGF anjiojenik faktörler arasında yer alır. Literatürde trastuzumabın korneal neovaskülarizasyonda etkinliğini araştıran tek çalışma vardır. Güler ve ark. yürüttüğü bu çalışmada 16 sıçan korneasında kimyasal yanıkla neovaskülarizasyon idüklenmiş ve sonra randomize olarak 8'er sıçanın bulunduğu kontrol ve tedavi grubu oluşturulmuş. Tedavi grubunda kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra bir kez 1ml(4mg/kg) trastuzumab intraperitoneal yolla sistemik olarak verilmiş. Deney sürecinin sonunda(8.gün) korneal fotoğraf çekilerek neovaskülarizasyonla kaplı kornea yüzeyi incelendiğinde trastuzumab grubunda kontrol grubuna göre neovaskülarizasyon alanının daha küçük olduğu bulunmuş. Ayrıca bu çalışmada hazırlanan korneal doku preparatları immün boyalarla VEGF boyanma yoğunlu açısından karşılaştırılmış ve trastuzumab ile tedavi edilen grupta, kontrol grubuna göre kornea epitel ve endotel tabakasında VEGF boyanma yoğunluğunun anlamlı derecede daha az olduğu görülmüştür. Stromada ise VEGF boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Güler ve ark., sistemik trastuzumab uygulamasının korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduğunu açıkladılar (35). Bizim çalışmamızda subkonjonktival olarak 0,1ml(4mg/kg) tek doz trastuzumab uygulandı ve neovaskülarizasyon inhibisyonunda etkili olduğu saptandı. Bizim sonuçlarımız Güler ve ark. sonuçlarıyla benzerdir.

EGF'nin insan gözyaşı komponentleri arasında bulunduğu, kornea epitel ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (135). EGF reseptörü kornea epitel, endotel hücreleri ve keratositlerde bulunur. (65). EGFR'ü VEGF reseptörüne benzer şekilde tirozin kinaz reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER2, EGFR'nün altgruplarından biridir. ErbB reseptör ailesinin karakteristik özelliklerini taşıyan bu reseptörler normal hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda kritik rol oynar(106). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, artmış tümör hücre motilitesi, invazyonu, anjiojenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir(107). HER2 ve VEGF sinyal yolu moleküler seviyede birbirine bağlı ve her ikisinde hücre proliferasyonunda işbirliği içindedir ve HER2, VEGF ekspresyonunu kontrol etmektedir (106). HER2 hipoksik durumlarda VEGF artışına yol açar, ayrıca hipoksi dışında başka bir mekanizmayla Ewing hücreli sarkomada trastuzumab ile tedavinin in-vivo ve in-vitro olarak HER2 ve VEGF ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (136,137).

HER2 'nin aşırı ekspresse olduğu meme kanserinde trastuzumab ile tedavi sonrası in vivo olarak tümör volümü ve mikrovasküler yoğunluk azalmış ve in vitro olarak endotel hücre migrasyonunda azalma olduğu saptanmıştır (137,138). EGF, EGFR'nü aktive ettiğinde VEGF, IL-8, MMP ve plazminojen aktivatörleri (PA) gibi anjiojenik faktörlerin salınımla anjiojenez indüklenir (139). İnterlökin-8 mikrovasküler endotel hücrelerinden sızıntıyı arttırmakta ve üretimi hipoksi ile indüklenmektedir (140). İnterlökin-8 reseptörlerinin endotel hücrelerinde aktive edilmesi hücre çoğalmasını ve takiben anjiojenezi indüklemektedir (141). Trastuzumab ile tedavi edilen tümörlerde göreceli olarak kontrol grubunda tedavi edilen tümörlere göre anti-anjiojenik faktörler ekspresse olurken, birçok pro-anjiojenik faktörün ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (136,137,142). Trastuzumab ile tedavi edilen tümörde anti-anjiojenik faktör Trombospondin-1 ekspresyonu artar oysa pro-anjiojenik faktörler VEGF, TGF-alfa, Anjiopoetin-1 ( Ang-1 ), Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 ( PAI-1 ) ekspresyonu azalır (138). TGF-alfa endotel hücreleri için mitojeniktir ve anjiojenezi uyarır (143). Anjiopoetin-1 kapiller damarları güçlendirir, perisitleri stabilize ederek endotel hücre yaşam süresini artırır ve yeni oluşan vasküler yapıyı korur ( 144,145). İnsan meme kanser hücrelerinde HER2 aktivitesinin Anjiopoetin-2 (Ang-2) ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve Trastuzumab ile Ang-2 bloklanabilir (146) . Ang-2 Ang-1'e zıt olarak aslında anti-anjiojenik bir faktördür ve damarları destabilize eder, yoğun olarak yeni damar yapımı bölgelerinde seviyesi artmış olarak bulunur. Ang-2 nin damarlar üzerindeki destabilizatör etkisi vasküler yapıyı tümör dokusunda VEGF gibi mutajen ajanlara karşı daha duyarlı kılabilir (147). Dolayısı ile trastuzumab ile Ang-2 nin bloklanması tümör anjiojenezi ve metastazın önlenmesinde ek bir mekanizma olabilir (146). Ono ve arkadaşları fare korneasında EGF'le indüklenen anjiojenezin EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib tarafından inhibe edildiğini gösterdiler (139).

Bizim çalışmamızda tek doz subkonjonktival trastuzumab uygulaması total olmasa da korneal neovaskülarizasyonu önlemekte etkin bulundu. Trastuzumab korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde şu yollarla etki etmiş olabilir:

1) VEGF ekspresyonunun azaltılması (106,136,137,148,149). 2) Anjiojenik faktörler olan EGF ve TGF'ün bloke edilmesi(143,149). 3) Pro-anjiojenik faktörlerin ekspresyonu azalırken, anti-anjiojenik faktörlerin ekspresyonunun artması(136,137,139,142). 4) HER2 blokajı sonucu hücre siklusunun durması(150). 5)

DNA tamirinin inhibisyonu ve DNA hasarı oluşturulması(142,151). 6) Antikor bağımlı hücrel sitotoksitenin aktivasyonu ve proliferasyonun inhibisyonuyla sitotoksik özellik göstermesi (152). 7) Apoptozisi indüklemesi(153).

Korneal neovaskülarizasyonu parsiyel inhibisyonu ise muhtemelen trastuzumab her ne kadar VEGF ekspresyonunu azaltsa da VEGF'ün tüm izoformlarını tamamen bloke edememiş olmasıyla ilgili olabilir. Ayrıca trastuzumabın subkonjonktival uygulamasıyla ilgili farmakokinetik özelliklerinin bilinmemesi nedeniyle, korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda optimum fayda sağlayacak dozaj ve ilaç uygulama sıklığı en etkin biçimde yapılamamış olabilir.

Çalışmamızda tüm tedavi ajanlarının inflamasyona karşı etkinliği değerlendirildi. İnflamasyon mikrobik enfeksiyon, kimyasal hasar veya travma sonrası ortaya çıkabilen fizyolojik bir cevaptır. Anjiojeneze benzer biçimde inflamasyon hücre kemotaksisi, migrasyonu ve proliferasyonunu düzenleyen proinflamatuvar ve anti inflamatuvar moleküller ile kontrollü bir şekilde ilerlemektedir (154). İnflamasyon ve anjiojenez birçok noktada birleşmektedir. Anjiojenez, inflamasyon bölgesindeki hücreler için gerekli olan besin ve oksijen desteğini sağlayarak inflamasyonu sürdürür. İnflamasyonun ilk basamaklarında üretilen NO damar dilatasyonu ve geçirgenliğini artırarak immün hücrelerin damar dışına geçişini sağlar. İmmün hücrelerce üretilen mediatörler, fibroblastları ve damar endotel hücrelerini hedef alarak anjiojenik faktörleri salgılatır. Aynı zamanda inflamatuvar hücrelerin kendileri de VEGF, Ang, bFGF, HGF, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  gibi anjiojenik faktörler salgılar. Hipoksi hem enflamasyon hem de anjiojenez için önemli bir uyarandır ve HIF üretimine neden olur. Hipoksi ile indüklenebilen faktör artışı VEGF, Ang-2 gibi birçok anjiojenik faktör genini uyarır (155). Nükleer faktör kapa B (NF- $\kappa$ B) inflamasyondaki mediatörler için önemli bir transkripsiyon faktörüdür (155). Birçok çalışma bu faktörün inflamasyon ve anjiojenezle ilişkili olduğunu bildirmektedir (156). Amano ve ark. sıçan kornealarında travmayla birlikte inflamasyonun ve VEGF'ün arttığını ve inflamatuvar neovaskülarizasyonun VEGF'le ilişkili olduğunu gösterdi (13). Edelman ve ark. sıçanlarda koterle indüklenen anjiojenez bölgesinde bulunan lökositlerle, VEGF ürünlerini ilişkili buldu (129). Bock ve ark. farelerde inflamasyonun indüklediği anjiojenez ve lenfanjiojenezin bevasizumab tarafından baskılandığını belirtmiştir (124). Çalışmamızda bevasizumab ve trastuzumab grubunda inflamasyon yoğunluğunun,



kontrol grubundan daha az olduğu saptandı. J.Y. Oh ve ark. kimyasal yanık oluşturulan sıçan kornealarında subkonjunktival uygulanan bevasizumabın inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve sitokinleri azalttığını gösterdi (157). Bizim bevasizumab ve trastuzumabla ilgili sonuçlarımız bu çalışma sonuçlarıyla benzerdi. Fakat ranibizumab ve pegaptanib grupları inflamasyon yoğunluğu için kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark bulunmadı. Bu ranibizumab ve pegaptanibin etkinliğinin yetersiz olduğunun bir göstergesi olabileceği gibi, yetersizlik bu ajanları subkonjunktival uygulamanın farmakokinetiği ile de ilişkili olabilir.

Çalışmamızda dört ilacın da korneal kesitlerde histopatolojik inceleme ile neovaskülarizasyon yoğunluğuna etkisi araştırıldı. Neovaskülarizasyon korneanın birçok tabakasında meydana gelebilse de vaskülarize kornealar incelendiğinde neovaskülarizasyonun esas yerleşiminin anterior stromanın üst ve orta kısmı olduğu gösterilmiştir (158). Ayrıca VEGF boyanmasının stromanın anterior bölgesinde yoğunlaştığı bildirilmiştir (17). Dolayısıyla anterior stroma VEGF uyarısına ve neovaskülarizasyon gelişimine stromanın diğer katlarından daha duyarlı olabilir. Bizim çalışmamızda da vaskülarize kornealarda neovaskülarizasyonun ön stromal bölgede daha yoğun olduğu görüldü. Biz bevasizumab ve trastuzumabın vaskülarizasyon yoğunluğunu kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttığını gördük. Fakat ranibizumab ve pegaptanib gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadı. Bu sonuçlar korneal neovaskülarizasyon yüzde sonuçlarıyla uyumlu değildir. Bunun nedeni ranibizumab ve pegaptanibin neovaskülarizasyonu önlemekte yetersiz olması olabileceği gibi, ranibizumab ve pegaptanibin farmakokinetiği, uygulama dozu ve yöntemiyle ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

Çalışmamızda 4 ajanın da fibroblast aktivitesine etkisini histopatolojik olarak inceledik. Biz çalışmamızda tüm tedavi gruplarında fibroblast aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede az olduğunu gördük. EGF fibroblastlar ve düz kas hücreleri için potent mitojen ve kemotaktik bir faktördür ayrıca anjiojenezde görev alır ve otokrin mekanizmalarla VEGF üretimini arttırmaktadır (159). Trastuzumab EGF inhibisyonuyla fibroblast aktivitesini azaltmış olabilir. VEGF kemotaksiste önemli bir role sahiptir. VEGF'ün neden olduğu vasküler yapılarıdaki permeabilite artışı ve kemotaksis inflamasyonun devamında etkilidir (56,60). Korneada travma sonrası inflamatuvar hücrelerden ve hasarlı keratositlerden çeşitli büyüme faktörleri ( FGF, TGF-

beta, PDGF vb.) ve sitokinler salgılanır. Doku tavması sonrası FGF'ün etkisiyle fibroblastlar da artış olur . Stromal iyileşme sırasında keratositler aktif fibroblastlar olan miyofibroblasta dönüşürler (43). Yoeruek ve ark. tavşanlarda topikal bevasizumab uygulamasının etkinliğini ve güvenliğini araştırdıkları bir çalışmada bevasizumabın yalnızca anti-anjiojenik etkisinin olmadığını bununla birlikte olası antifibrotik etkisinin olduğu vurgulandı (160). Anti-VEGF ajanlar fibroblast aktivitesini, VEGF'ün blokması ile kemotaksisin ve vasküler permeabilitenin azalması ve dolaylı olarak inflamasyonunun baskılanmasıyla azaltmış olabilir.

Biz çalışmamızda tüm tedavi gruplarının korneal kalınlığa etkisini inceledik. Tedavi gruplarından hiçbirinin, kontrol grubuyla aralarında anlamlı bir fark yoktu. Bu ajanların korneayı ödemlendirmedeği ve korneaya toksik etkisinin olmadığını göstergesi olabilir. Ancak bevasizumab grubunda korneal kalınlığın ranibizumab ve pegaptanib gruplarından anlamlı derecede daha az olduğunu gördük. Ayrıca trastuzumab grubundada kornea pegaptanib grubundan daha inceydi. Bunun bevasizumab ve trastuzumabın diğer iki ajandan daha etkin olması ve inflamasyonu daha belirgin biçimde baskılamasıyla ilgili olabileceği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak bevasizumab, ranibizumab, pegaptanib ve trastuzumab korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde etkili bulundu. Çalışmamızda bu dört farklı anti-anjiojenik ajan içinde korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda en etkin olanın bevasizumab olduğu görüldü. Trastuzumabın ikinci en etkin ajan olduğu saptandı ve neovaskülarizasyon yüzde inhibisyonunda ranibizumabtan, vaskülarizasyon ve inflamasyon yoğunluğu açısından ranibizumab ve pegaptanibten daha etkin olduğu bulundu. Ranibizumab ve pegaptanib arasında önemli bir fark saptanmadı. Korneal neovaskülarizasyonun önlenmesi ve tedavisinde anti-anjiojenik ajanların özellikle trastuzumab ve ranibizumabın başka deneysel ve klinik çalışmalarla anti-anjiojenik özelliklerinin ve etkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesi gerektiği düşünüldü.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda tüm tedavi ajanlarının sıçanlarda kimyasal yanıkla indüklenen korneal neovaskülarizasyonda subkonjonktival uygulanmasının neovaskülarizasyon yüzdesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttığı görüldü. Neovaskülarizasyon yüzdesini azaltmakta tüm tedavi ajanları içinde en etkin olanın bevasizumab olduğu saptandı. Neovaskülarizasyon inhibisyon etkinliği: bevasizumab( $46,99 \pm 5,67$ ) > trastuzumab ( $57,58 \pm 3,72$ ) ( $p=0,004$ ) > ranibizumab( $65,26 \pm 4,84$ ) ( $p=0,016$ ) olarak belirlendi. Pegaptanib ile ranibizumab arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Histopatolojik bulgular bevasizumab ve trastuzumabın inflamasyon ve vaskülarizasyon yoğunluğunu anlamlı derecede azalttığını gösterdi. Ranibizumab ve pegaptanibin ise kontrol grubuyla aralarında anlamlı bir fark yoktu. Fibroblast aktivitesi tedavi gruplarının hepsinde kontrol grubundan anlamlı derecede daha azdı. Korneal kalınlık açısından tüm tedavi grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü. Günümüzde özellikle bevasizumab endikasyon dışı olsa da korneal neovaskülarizasyon ve diğer oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bizim bulgularımız anti-anjiojenik ajanların korneal neovaskülarizasyonu azalttığını ve neovaskülarizasyonun önlenmesinde etkin bir tedavi ajanı olduklarını desteklemektedir. Literatürde yer alan birçok çalışmada korneal neovaskülarizasyon için uygulanan anti-anjiojenik tedavilerin etkili olmakla birlikte neovaskülarizasyonu tam olarak önleyemediği saptanmıştır. Bizim bulgularımızda bunu destekliyor.

Korneal neovaskülarizasyonun çözümüne yönelik önerilerimiz:

1) Additif etki: Anti-VEGF'ü olan bir ajanla VEGF dışındaki olası diğer anjiojenik faktörleride inhibe edebilen bir ajanın kombine edilmesi neovaskülarizasyonun önlenmesinde daha etkin olabilir. Trastuzumab bunun için iyi bir seçenek gibi gözükmektedir.

2) Topikal uygulama: Ranibizumabın topikal uygulaması daha etkin ve kararlı konsantrasyon sağlayabilir ayrıca bevasizumabtan daha küçük bir molekül olması absorpsiyonunu kolaylaştırır. Bevasizumab büyük bir moleküldür( $149\text{kDa}$ ) ve hayvan

deneylerinde retinanın tüm katlarını geçmediği belirtilmiştir, ancak korneada topikal uygulama sonrası korneal stromaya penetrasyonunun yeterli olduğu ve ön kamarada tesbit edildiği rapor edilmiştir(160). Ranibizumab antikor parçası olan küçük bir moleküldür(48kDa) ve tavşanlarda retinanın tüm katlarını geçtiği belirtilmiştir(112), dolayısıyla topikal uygulamada korneadan penetre olabilir. Ayrıca ranibizumabın VEGF'e afinitesinin daha yüksek olması neovaskülarizasyonu önlemede bevasizumabtan daha etkin olmasını sağlayabilir.

Bu konularda yapılacak yeni çalışmalarla korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde daha etkin tedavi seçeneklerinin ortaya konmasına katkıda bulunulabilir.

## 7. ÖZET

**Amaç ve kapsam :** Deneysel korneal neovaskularizasyon oluşturulan sıçan modelinde VEGF antikoru olan bevasizumab, ranibizumab, pegaptanibin ve HER2 antikoru olan trastuzumabın subkonjonktival uygulanmasının korneal neovaskularizasyona inhibitör etkisini araştırmak.

**Gereç ve yöntem :** Çalışma kapsamına 30 adet erkek Wistar albino türü sıçan alındı. Sıçanlar her bir grupta 6 denek olacak şekilde randomize beş gruba ayrıldı. Deneklerin bir gözüne kornea santralinde %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubukla kimyasal yanık oluşturuldu. Kimyasal yanık sonrası hemen kontrol grubuna(grup-1) subkonjonktival 0,1ml serum fizyolojik, tedavi gruplarından grup-2'ye 0,05ml(1,25mg) bevasizumab, grup-3'e 0,1ml(1,2mg) trastuzumab, grup-4'e 0,05ml(0,5mg) ranibizumab ve grup-5'e 0,1ml(0,3mg) pegaptanib enjekte edildi. Deneyin 8. gününde denek korneaları dijital fotoğraf makinesiyle fotoğraflandı. Daha sonra sakrifiye edilen deneklerin gözü enükle edildi ve hazırlanan korneal kesitler histopatolojik olarak incelendi. Korneal fotoğraflar dijital imaj analiziyle neovaskularizasyon yüzdesi açısından incelendi.

**Bulgular :** Tedavi gruplarının hepsinde korneal neovaskularizasyon yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az bulundu( $p<0,05$ ). Bevasizumab diğer tüm tedavi ajanlarından daha etkin bulundu( $p<0,05$ ). Bevasizumab ve trastuzumab gruplarında inflamasyon ve vaskularizasyon yoğunluğu kontrol grubuna göre anlamlı derecede azken( $p<0,05$ ), ranibizumab ve pegaptanib gruplarında fark anlamlı değildi( $p>0,05$ ). Fibroblast yoğunluğu tedavi gruplarının hepsinde kontrol grubundan anlamlı derecede daha azdı. Korneal kalınlık açısından tedavi grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü( $p>0,05$ ).

**Tartışma ve sonuç :** Anti-VEGF ajanları ve HER2 antagonisti olan trastuzumab, korneal neovaskularizasyon inhibisyonunda etkilidir.

**Anahtar kelimeler :** Korneal neovaskularizasyon , VEGF , EGF, bevasizumab, trastuzumab, ranibizumab, pegaptanib

## 8. ABSTRACT

**Objective:** To investigate the inhibitory effect of subconjunctival administration of bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib which are VEGF antibody, and trastuzumab which is HER2 antibody in experimentally induced corneal neovascularization in a rat model.

**Material and Method:** Thirty male Wistar-Albino rats weighing 250 g to 300 g were used in the study. The rats randomized to five groups, each group had 6 rats. Silver nitrate sticks (75% silver nitrate, 25% potassium nitrate) were used to induce chemical cauterization on the corneas of 30 eyes. Immediately after chemical cauterization, Group1 received 0,1ml saline, Group2 received 1,25mg/0,05ml bevacizumab, Group3 received 1,2mg/0,1ml trastuzumab, Group4 received 0,5mg/0,05ml ranibizumab and Group5 received 0,3mg/0,1ml pegaptanib by a subconjunctival injection. The corneal surface covered with neovascular vessels was measured on the photographs as the percentage of the total area of the cornea by using computer imaging analysis on the eighth day. After then the rats were sacrificed, and eyes were enucleated corneal sections were analysed by histopathologically.

**Results:** The average neovascularization area in all treatment groups were statistically smaller than control group( $P<0,05$ ). Bevacizumab has been found more effective than the other agents( $P<0,05$ ). In groups received ranibizumab and pegaptanib, inflammation and vascularization density was not significantly different compared with control group( $p>0,05$ ) while in groups received bevacizumab and trastuzumab it was significantly smaller than control group( $P<0,05$ ). In all treatment groups fibroblast density was significantly smaller than control group( $p<0,05$ ). In terms of corneal thickness, there was no significantly difference between treatment groups and control( $p>0,05$ ).

**Discussion and Conclusion:** In our study anti-VEGF agents and trastuzumab(HER2 antibody) were found to be effective in preventing corneal neovascularization.

**Key Words:** Corneal neovascularization, VEGF, EGF, bevacizumab, trastuzumab, ranibizumab, pegaptanib

## 9. KAYNAKLAR

1. Douglas Hanahan and Judah Folkman. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis *Cell*.1996; **86**: 353–364
2. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; **12**: 242-249
3. Yihai Cao. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic Implications.*The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2001; **33**; 357–369
4. Gao, G, Ma, J. Tipping the balance for angiogenic disorders. *Drug Discov. Today* 2002; **7**; 171–172
5. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; **41**: 275-313.
6. Benelli R, Morini M, Carrozzino F, Ferrari N. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation *The FASEB Journal* express article2001; **10**;1096
7. Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004; **79**: 677-688
8. Nakamura Y, Stozono C, Kinoshita S. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Role in Corneal Wound Healing and Homeostasis. *Exp. Eye Res.* 2001; **72**; 511±517
9. Welge-Lüßen U, May CA, Neubauer AS, Priglinger S. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; **12**: 94-99.
10. Yin-Shan Ng, KrillekeD, David T. Shima.VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research.* 2006; **312**; 527 – 537
11. Quoc T. Ho, Calvin J. Kuo Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; **39** ; 1349–1357
12. Singh N, Amin S, Richter E, Rashid S, Scoglietti V, Jani PD, et al. Flt-1 intraceptors inhibit hypoxia-induced VEGF expression in vitro and corneal neovascularization in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; **46**: 1647-1652

13. Shiro Amano, Richard Rohan, Masatoshi Kuroki, Michael Tolentino, and Anthony P. Adamis. Requirement for Vascular Endothelial Growth Factor in Wound- and Inflammation-Related Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;**39**:18-22
14. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004; **82**: 557-563.
15. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seragard S, Sten BR. Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Inflammation-associated Corneal Neovascularization. *Exp. Eye Res.* 2000; **70**; 419±428
16. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, Stechschulte SE, Kirchhof B, Dartt DA, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; **44**: 117-123
17. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; **41**: 2514-2522
18. A Sharma, A Samal, S Narang, A Gutpa, J Ram, A Gupta. Frequency doubled Nd :YAG (532 nm) laser photocoagulation in corneal vascularisation : efficacy and time sequenced changes. *Indian J Ophthalmol.* 2001;**49**: 235-240
19. Kyung Jik Lim, Won Ryang Wee, Jin Hak Lee. Treatment of Corneal Neovascularization with Argon Laser. *Korean J. Ophthalmol.* 1993; **7**: 25-27.
20. Yoon KC, You IC, Kang IS, ImSK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol.* 2007; **144**: 390-395
21. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; **38**: 1954-1962
22. Benelli U, Ross J, Nardi M, Klinword GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery. Inhibition by cyclosporin A. *Invest Opht Vis Sci.* 1997; **38**: 274-282



23. Wu PC, Liu CC, Chen C, Kou HK, Shen SC, Lu CY, et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2003; **241**:63-69
24. Benelli U, Bocci G, Danesi R, Lepri A, Bernardini N, Bianchi F, et al. The heparan sulfate sulfatase inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res.* 1998; **67**: 133-142
25. Bocci G, Danesi R, Benelli U, Innocenti F, Di Paolo A, Fogli S, Del Tacca M. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999; **43**: 205-212
26. Becker MD, Kruse FE, Azzam L, Nobiling R, Reichling J, Völcker HE. In vivo significance of ICAM-1 dependent leukocyte adhesion in early corneal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; **40**: 612-618.
27. Eduardo B. Rodrigues , Michel E. Farah , Maurício Maia , Fernando M. Penha , Caio Regatieri , Gustavo B. Melo , Marcelo M. Pinheiro , Carlos R. Zanetti . Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2009; **28**; 117–144
28. Luiz F.M. , Rubens Belfort Jr. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2007; **79**(3): 389-394
29. Mesut Erdurmus & Yuksel Totan. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; **245**:1577–1579
30. Felix Bock, Yanyan König , Friedrich Kruse, Martin Baier, Claus Cursiefen. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008; **246**:281–284
31. Papathanassiou M, Theodosiadis PG, Vasilios S, Rouvas A, Bourboulis EJ, and Vergados DIA. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal Model. *Am J Ophthalmol.* 2008; **145**:424 – 431
32. Irit Bahar, Igor Kaiserman, McAllum P, Franzco MB, Rootman D and Slomovic A. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008; **27**:142–147

33. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O and H. Durukan A. Effect of Subconjunctival Bevacizumab (Avastin) on Experimental Corneal Neovascularization in Guinea Pigs. *Cornea* 2008;**27**:357–362
34. Han YS, Lee JE, Jung JW, Lee JS. Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 ; **247**(4):541-8.
35. Güler M, Yılmaz T, Özercan B, and Elkiran T. The Inhibitory Effects of Trastuzumab on Corneal Neovascularization. *Am J Ophthalmol.* 2009; **147**(4):703-708
36. Hamid Hosseini, Mahmood Nejabat A potential therapeutic strategy for inhibition of corneal neovascularization with new anti-VEGF agents. *Medical Hypotheses* 2007; **68**, 799–801
37. Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. *Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları* 2005; **2**: 7-25.
38. Michael K. Smolek and Stephen D. Klyce. Cornea. *Duane's Foundations of Clinical ophthalmology.* 2006 Edition Volume 1 Chapter 8
39. Nishida T, Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* Chine: Elsevier Mosby, 2005:3-26.
40. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol.* 2003; **51**: 5-15
41. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol.* 1994; **78**: 401-408
42. Cameron JG, Corneal reaction to injury. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* Chine: Elsevier Mosby, 2005: 115-131.
43. BY Dimitri T. Azar MD. Corneal Angiogenic privilege: Angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2006;**104**:264-302
44. James V. Jester, W. Matthew Petroll and H. Dwight Cavanagh Corneal Stromal Wound Healing in Refractive Surgery: the Role of Myofibroblasts. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1999; **18**; 3, 311- 356

45. Sarah X. Zhang, Jian-xing M. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2007; **26**; 1–37
46. Zengin N, Okudan S, Gündüz K. Oküler neovaskularizasyonunda büyüme faktörlerinin rolü. *Oftalmoloji* 1993; **3**: 385-389
47. Jones, SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 2000; **19**: 5558-5567
48. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001; **16**;49(3):507-21
49. Dijonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003; **314**(1):107-17
50. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; **57**: 673-686.
51. Mousa SA, Lorelli W, Campochiaro PA. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J. Cell Biochem*. 1999; **74**(1):135-43.
52. Yusufhan Yazır Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF): Reseptörleri Ve Fonksiyonları. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*. 2007; **29** (3): 128-136
53. Ishida S, Usui T, Yamashiro T, Kaji Y, Ahmed E. VEGF164 Is Proinflammatory in the Diabetic Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; **44**:2155–2162
54. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; **5**: 237-256
55. İbrahim Güllü. Anjiojenez ve antianjiojenik tedaviler. *XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma 2004*
56. CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak H, Brown LF. Correlation of vascular permeability factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol*. 1996; **114**: 1210-1217
57. Korpelainen EI, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 159-164

58. Ferrara N, Smyth TD. Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Review* 1997;**18**:1
59. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Christiane J. Vascular Endothelial Growth Factor in Esophageal Cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2004;**87**:95–104
60. Kenneth A. Thomas Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent. *The J. of Biological Chemistry*. 1996;**271**; 2 .603-606
61. Kim J, Moon S, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor-kB Activation in Endothelial Cells. *The J. of Biological Chemistry*. 2001; **276**, No. 10 7614–7620
62. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, Dana, MR, Streilein JW. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J. Clin Invest*. 2004 ;**113**(7):1040-50.
63. Kvant A. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006 ;**84**(3):282-8
64. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003; **284**: 31-53.
65. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 113-129
66. Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, Manabe R. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human EGF. *Invest Ophthalmol Vis. Sci*. 1990; **31**: 1773-1778
67. Kerbel RS, Vioria- Petit A, Klement G, Rak J. 'Accidental' anti-angiogenic drugs. anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic agents as examples. *Eur J Cancer*. 2000;**36** (10): 1248-57

68. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem.* 1996; **271**: 29822-29829.
69. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990, **31**: 323-333
70. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor Alpha, Transforming Growth Factor Beta, Acidic Fibroblast Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, and Interleukin-1 Proteins in the Cornea. *Exp Eye Res.* 1994; **59**(1):63-71.
71. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res.* 1997; **65**: 391-396
72. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong JW, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 2001; **20**: 625-637
73. Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2000; **19**: 779-802
74. Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, Wilson SE. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res.* 1997; **64**: 501-504
75. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia.* 1993; **36**: 282-291
76. Singh N, Macnamara E, Rashid S, Ambati J, Kontos CD, Higgins E, Ambati BK. Systemic soluble Tie-2 expression inhibits and regresses corneal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; **332**: 194-199

77. White RR, Shan S, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, Sullenger A. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**: 5028-5033
78. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2000; **70**: 419-428
79. Daisuke Watanabe, Kiyoshi Suzuma, Shigeyuki Matsui, Masafumi Kurimoto, Junichi Kiryu. Erythropoietin as a Retinal Angiogenic Factor in Proliferative Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med* 2005; **353**: 782-92.
80. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994, **79**: 315-328
81. Jung Hwan Kim<sup>1</sup>, Jae Chan Kim, Seung Hwan Shin, Soo-Ik Chang, Hyo Sil Lee, Soo Il Chung. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF, and VEGF. *Experimental and Molecular Medicine*. 1999; **31**, No. 4, 203-209
82. Ohlmann AV, Ohlmann A, Welge-Lussen U, May CA. Localization of collagen XVIII and endostatin in the human eye. *Curr Eye Res*. 2005; **30**: 27-34.
83. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; **42**: 2517-252
84. Chunkui Shao, Jing Sima, Sarah X. Zhang, Ji Jin, Peter Reinach, Zheng Wang, Jian-xing Ma. Suppression of Corneal Neovascularization by PEDF Release from Human Amniotic Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; **45**: 1758-1762
85. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. 1999; **285**: 245-248.

86. Hiscott P, Paraoan L, Choudhary A, Ordonez JL, Al-Khaier A, Armstrong DJ. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2006; **25**: 1-18.
87. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; **47**: 1352-1358.
88. Cursiefen C, Masli S, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; **45**: 1117-1124
89. Zhihong Zhang, Jian-xing Ma, Guoquan Gao, Chaoyang Li, Lihui Luo, Mei Zhang, Wenzhao Yang, Aihua Jiang, Wenhui Kuang, Liying Xu, Jiaqi Chen, Zuguo Liu. Plasminogen Kringle 5 Inhibits Alkali-Burn-Induced Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;**46**:4062–4071
90. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2005; **36**(4):270-1
91. Hampton, T., Monoclonal antibody therapies shine in breast cancer clinical trials. *JAMA* 2005;**293**, 2985–2989.
92. Campochiaro PA.. Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 ;**47**(2):462-74.
93. Friedlander SM, Welch RM. Vanishing disc neovascularization following intravitreal bevacizumab (avastin) injection. *Arch Ophthalmol.* 2006 ;**124**(9):1365
94. Ruiz-Moreno JM, Montero JA, Lugo F, Amat P, Staicu C. Intravitreal bevacizumab in recurrent diabetic vitreous haemorrhage after vitrectomy. *Acta Ophthalmol.* 2008;**86**(2):231-2
95. Beyon SH, Kwon YA, Oh HS, Kim M, Kwon OW. Short-term results of intravitreal bevacizumab for macular edema with retinal vein obstruction and diabetic macular edema. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2007 ;**23**(4):387-94
96. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Michels S, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty-four-week results of an

- uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* . 2006 ;**113**(11):2002.e1-12.
97. Adan A, Mateo C, Navarro R, Bitrian E, Casaroli-Marano RP. Intravitreal bevacizumab (avastin) injection as primary treatment of inflammatory choroidal neovascularization. *Retina*. 2007;**27**(9):1180-6.
  98. Hernandez-Rojas ML, Quiroz-Mercado H, Dalma-Weiszhausz J, Aiello LP. Short-term effects of intravitreal bevacizumab for subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia. *Retina* 2007 ;**27**(6):707-12.
  99. Mandal S, Garg S, Venkatesh P, Mithal C, Vohra R, Mehretra A. Intravitreal bevacizumab for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol*. 2007;**125**(11):1487-92.
  100. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernandez-Rojas ML, Salazar N, Chan RV. Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina* . 2008 ;**28**(3 Suppl):S19-25.
  101. Ehlers JP, Spirn MJ, Lam A, Sivalingam A, Samuel MA, Tasman W. Combination intravitreal bevacizumab/panretinal photocoagulation versus panretinal photocoagulation alone in the treatment of neovascular glaucoma. *Retina* 2008 ;**28**(5):696-702.
  102. Yazdani S, Hendi K, Pakravan M. Intravitreal bevacizumab (Avastin) injection for neovascular glaucoma. *J Glaucoma*. 2007 ;**16**(5):437-9.
  103. Iliev ME, Doming D. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in the Treatment of Neovascular Glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2006;**142**:1054-1056
  104. Ryungsa Kim<sup>1,2</sup> and Tetsuya Toge. Changes in Therapy for Solid Tumors: Potential for Overcoming Drug Resistance In Vivo with Molecular Targeting Agents. *Surg Today* 2004; **34**:293–303
  105. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 **9**;235(4785):177-82.
  106. Joseph Schlessinger Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 2000 Vol. **103**, 211–225, October 13
  107. Rowinsky EK. Signal Events: Cell Signal Transduction and Its Inhibition in Cancer. *The Oncologist*. 2003;**8**:5-17.



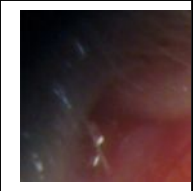
108. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF- $\alpha$  are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol.* 1989 ;**139**(3):617-23.
109. Cheryl H. Baker, Daniel Kedar, Marya F. McCarty, Rachel Tsan, Kristen L. Weber, Corazon D. Bucana, and Isaiah J. Fidler. Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling on Tumor Cells and Tumor-Associated Endothelial Cells for Therapy of Human Carcinomas. *Am J Pathol* 2002, **161**:929–938
110. R B Bhisitkul. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br. J. Ophthalmol.* 2006;**90**:1542-1547
111. Lin RC, Rosenfeld PJ. Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin.* 2007;**47**(1):117-37.
112. Ferrara N, Damico L, Shams N, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina.* 2006; **26**:859–870
113. Peter K. Kaiser. Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases. *Am J Ophthalmol* 2006;**142**:660–668.
114. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004 30;351(27):2805-16.
115. Judy Ruckman, Louis S. Green, Jim Beeson, Sheela Waugh, Wendy L. 2-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF<sub>165</sub>) Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7- encoded domain. *The Journal of Biological Chemistry.* 1998; Vol. **273**, No. 32; 20556–20567,
116. Donald J. D'Amico. Pegaptanib Sodium for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Safety Results of the Two Prospective, Multicenter, Controlled Clinical Trials. *Ophthalmology.* 2006; **113**:6; 992-1001
117. Susumu Ishida, Tomohiko Usui, Kenji Yamashiro. VEGF<sub>164</sub> mediated Inflammation Is Required for Pathological, but Not Physiological, Ischemia-

- induced Retinal Neovascularization. *J. Exp. Med.* 2003 ; Volume **198**, 483–489
118. Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* . 2002 ;**22**(2):143-52.
  119. Lee P, Cindy C, Wang PhD and Anthony P. Ocular Neovascularization: An Epidemiologic Review. *Surv Ophthalmol* 1998;**43**:245–269,
  120. Shree Kurup, Julie Lew, Gordon Byrnes, Steven Yeh, Robert Nussenblatt and Grace Levy-Clarke. Therapeutic efficacy of intravitreal bevacizumab on posterior uveitis complicated by neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2009: **87**: 349–352
  121. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. A Phase 2 Randomized Clinical Trial of Intravitreal Bevacizumab for Diabetic Macular Edema Diabetic Retinopathy Clinical Research Network *Ophthalmology.* 2007 ; **114**(10): 1860–1867.
  122. K Kriechbaum, S Michels, F Prager, M Georgopoulos, M Funk, W Geitzenauer and U Schmidt-Erfurth. Intravitreal Avastin for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a prospective study. *British Journal of Ophthalmology* 2008;**92**:518-522
  123. Tae-im Kim, Sang Woo Kim, Sunwoong Kim, Terry Kim, and Eung Kweon Kim. Inhibition of Experimental Corneal Neovascularization by Using Subconjunctival Injection of Bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008;**27**:349–352)
  124. Felix Bock, Jasmine Onderka, Tina Dietrich, Bjoörn Bachmann, Friedrich E. Kruse, Matthias Paschke, Grit Zahn, and Claus Cursiefen Bevacizumab as a Potent Inhibitor of Inflammatory Corneal Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;**48**:2545–2552
  125. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis P, Kivilcim M. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br.J. Ophthalmol.* 2007;**91**:804-807
  126. Hamid Hosseini, Mahmood Nejabat, Morsal Mehryar, Taher Yazdchi , Ahad Sedaghat and Farajollah Noori. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2007; **35**: 745–748

127. Yanyan Koenig, Felix Bock, Folkert Horn, Friedrich Kruse, Katja Straub, Claus Cursiefen. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 **5**.
128. In-Cheon You, In-Seong Kang, Seung-Hyun Lee and Kyung- Chul Yoon. Therapeutic effect of subconjunctival injection of bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol*. 2008 Nov **18**.
129. Edelman JL, Castro MR, Wen Y. Correlation of VEGF Expression by Leukocytes with the Growth and Regression of Blood Vessels in the Rat Cornea. *Invest Ophthalmol Vis.Sci*. 1999;**40**:1112-1123.
130. David Hui-Kang Maa,b, Jan-Kan Chenc, Fen Zhangd, Kuei-Ying Lina, Jeng-Yuan Yaoa, Jau-Song Yue. Regulation of corneal angiogenesis in limbal stem cell deficiency. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2006; **25** : 563–590
131. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*. 2005 ;**8**(4):299-309.
132. . Martin S. Spitzer, Efdal Yoeruek, Ana Sierra, Barbara Wallenfels-Thilo, Ulrich Schraermeyer, Bernhard Spitzer, Karl U. Bartz-Schmidt, Peter Szurman. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. (2007) **245**:1837–1842.
133. Lanlan Yu, Xiumin Wu, Zhiyong Cheng, Chingwei V. Lee, Jennifer LeCouter, Claudio Campa, Germaine Fuh, Henry Lowman, and Napoleone Ferrara. Interaction between Bevacizumab and Murine VEGF-A: A Reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;**49**:522–527.
134. Fang Lu, Ron A. Adelman. Are intravitreal bevacizumab and ranibizumab effective in a rat model of choroidal neovascularization? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2009) **247**:171–177.
135. Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, Manabe R, Oshiden K, Yanaihara C. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;**30**(8):1879-82.

136. Hui Guan, Shu-Fang Jia, Zhichao Zhou, John Stewart, and Eugenie S. Kleinerman. Herceptin Down-Regulates HER-2/neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Enhances Taxol-Induced Cytotoxicity of Human Ewing's Sarcoma Cells In vitro and In vivo. *Clinical Cancer Research* 2005; Vol. **11**, 2008–2017.
137. Kristine S. Klos, Xiaoyan Zhou, Sangkyou Lee, Lianglin Zhang, Wentao Yang, Yoichi Nagata, Dihua Yu. Combined Trastuzumab and Paclitaxel Treatment Better Inhibits ErbB-2-Mediated Angiogenesis in Breast Carcinoma through a More Effective Inhibition of Akt than Either Treatment Alone. *Cancer* 2003;**98**:1377–85.
138. Izumi Y, Xu L, Tomase E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*. 2002 **21**;416(6878):279-80.
139. Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res*. 2006 **15**;12(24):7242-51.
140. Isabelle Desbaillets, Annie-Claire Diserens, Nicolas de Tribolet, Marie-France Hamou and Erwin G Van Meir. Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene* (1999) **18**, 1447 ± 1456
141. Aihua Li, Seema Dubey, Michelle L. Varney, and Rakesh K Singh. Interleukin-8-Induced Proliferation, Survival, and MMP Production in CXCR1 and CXCR2 Expressing Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Microvascular Research*. 2002; **64**, 476–481
142. Rita Nahtaa, Francisco J. Esteva Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters*. (2006) ; **232** :123–138.
143. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF- $\alpha$  are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol*. 1989 ;**139**(3):617-23.
144. Chitra Suri, Pamela F. Jones, Sybill Patan, Sona Bartunkova, Peter C. Maisonpierre. Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell*. 1996 Vol. **87**, 1171–1180.

145. Thomas I. Koblizek, Cornelia Weiss, George D. Yancopoulos, Urban Deutsch and Werner Risau. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Current Biology*. 1998, **8**:529–532
146. Guilian Niu and W. Bradford Carter. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Regulates Angiopoietin-2 Expression in Breast Cancer via AKT and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Cancer Res*. 2007;**67**(4):1487–93]
147. George D. Yancopoulos, Samuel Davis, Nicholas W. Gale, John S. Rudge, Stanley J. Wiegand and Jocelyn Holash. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 **14**;407(6801):242-8.
148. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Patrick C. Mahon, and Semenza GL. HER2 (neu) Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1a (HIF-1a) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, **21**:p. 3995–4004
149. Lily Yen, Xiao-Li You, Ala-Eddin A, Moustafa, Gerald Batist, Nancy E Hynes, Sylvie Mader, Sylvain Meloche and Moulay A Alaoui-Jamali. Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 2000; **19**, 3460 ± 3469
150. Lane HA, Motoyama AB, Beuvink I, Hynes NE. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol*. 2001;**12** Suppl 1:S21-2.
151. Scott Mayfield, James P. Vaughn, and Timothy E. Kute. DNA strand breaks and cell cycle perturbation in Herceptin treated breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 2001;**70**: 123–129.
152. Sarah Cooley, Linda J. Burns, Tanya Repka, and Jeffrey S. Miller. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology*. 1999; **27** : 1533–1541
153. Syed K. Mohsin, Heidi L. Weiss, M. Carolina Gutierrez, Gary C. Chamness, Rachel Schiff, Michael P. DiGiovanna, Chun-Xia Wang, Susan G. Hilsenbeck, C. Kent Osborne, D. Craig Allred, Richard Elledge, and Jenny



- C. Neoadjuvant Trastuzumab Induces Apoptosis in Primary Breast Cancers..  
*Chang J Clin Oncol.* 2005; **23**:2460-2468.
154. Mary Philip a, Donald A. Rowley b, Hans Schreiber. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology.* 2004;**14**: 433–439.
155. Carla Costa, Joaço Incio, Raquel Soares. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis.* (2007) **10**:149–166
156. Francesco Pacifico a, Antonio Leonardi. NF-kB in solid tumors. *Biochemical pharmacology.* 2006;**72**: 1142 – 1152
157. Joo Youn Oh, Mee Kum Kim, Mi Sun Shin, Hyun Ju Lee, Jin Hak Lee, Won Ryang Wee. The Anti-inflammatory Effect of Subconjunctival Bevacizumab on Chemically Burned Rat Corneas. *Current Eye Research,* 2009; **34**:2,85 – 91.
158. Cursiefen, Claus, Kuchle, Michael, Naumann, Gottfried. Angiogenesis in Corneal Diseases: Histopathologic Evaluation of 254 Human Corneal Buttons with Neovascularization.. *Cornea.* 1988; **17**(6):611.
159. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberleins TJ and Klagsbrun. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: Differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Cell Biology.* 1994; Vol. **91**, pp. 2890-2894.
160. Efdal Yoeruek, Focke Ziemssen, Sigrid Henke-Fahle, Olcay Tatar, Aysegu Tura, Salvatore Grisanti, Karl U. Bartz-Schmidt and Peter Szurman. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol.* 2008; **86**: 322–328.