



**T.C.**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA  
BEVACİZUMAB, RANİBİZUMAB VE AFLİBERCEPTİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. MEHMET TAHİR ESKİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DÜZCE-2017**



T.C.

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA  
BEVACİZUMAB, RANİBİZUMAB VE AFLİBERCEPTİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. MEHMET TAHİR ESKİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.Kuddusi Teberik

DÜZCE-2017

## ÖNSÖZ

Göz Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve cerrahi deneyimlerini paylaşan Değerli Hocalarım Prof.Dr.Murat KAYA, Yrd.Doç.Dr.Kuddusi TEBERİK'e,

Tez çalışma konumun belirlenmesinden itibaren çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde, her aşamasında bana yol gösteren ve destek olan tez Hocam Yrd.Doç.Dr.Kuddusi TEBERİK'e, Patoloji preperatlarının değerlendirilemesinde desteğini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Pembe Oltulu'ya, istatistiksel analiz için Prof. Dr. Handan Ankaralı'ya,

İhtisasım boyunca beraber çok şey paylaştığımız, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Bu uzun eğitim hayatı boyunca hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan ve hep desteğini hissettiğim çok kıymetli annem, babam, eşim Elif ve kızım Duru'ya teşekkür ederim.

Dr. MEHMET TAHİR ESKİ

## ÖZET

**Amaç:** Deneysel kornea neovaskülarizasyonu geliştirilen ratlarda bevacizumab, ranibizumab ve afliberceptin etkinliğinin kontrol grubuyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 24 adet 250-300 gr ağırlığındaki Wistar-Albino türü erkek ratlar kullanıldı. Çalışmadaki 24 rat 4 farklı gruba ayrıldı. Her grup aynı şartlar altında aynı miktarda besin ile, aynı ortam ısısı ve ışığı altında takip edildi. Gruplardaki ratlar 1 - 6 arası kulak numarasıyla numaralandırıldı. Kornea merkezinde yanık oluşturmak için gümüş nitrat uygulandı, neovaskülarizasyonun gelişmesi için 10 gün beklendi. Ratlarda spontan oluşturulan gruplara bevacizumab, ranibizumab ve aflibercept subkonjonktival uygulandı. Düzenli aralıklarla takip edilerek 21 gün sonunda tüm gruplardaki kornealar alındı ve patolojik olarak incelendi.

**Bulgular:** Kontrol grubunda, vasküler endotelial growth faktör (VEGF) yüzde ortalaması, Tünel boyama (sayı/1hpf), enjeksiyon sonrası knv/tüm alan oranı ve ana damar sayısı bakımından diğer 3 gruptan da anlamlı düzeyde yüksek bulundu ancak gruplar arasında anlamlı farka rastlanılmadı. Eozinofil sayısı kontrol ve ranibizumab grubunda bevacizumab ve aflibercept grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

**Sonuç:** Çalışmamızda sık gördüğümüz kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde henüz ruhsatı olmayan anti-VEGF moleküllerinin etkili olduğuna dair sonuçlar elde ettik. Bu sonuçların daha büyük gruplarda, yeni yaklaşımların geliştirilmesi ile ileride bu tür hastaların tedavisi için alternatif bir yöntem olacağını düşünmekteyiz .

**Anahtar Sözcükler:** Deneysel kornea neovaskülarizasyonu, bevacizumab, ranibizumab, aflibercept, tünel boyama

## İNGİLİZCE ÖZET(ABSTRACT)

### COMPARISON OF BEVACİZUMAB, RANİBİZUMAB AND AFLIBERCEPTIN IN EXPERIMENTAL CORNEA NEOVASCULARIZATION IN THE RATS

**Purpose:** This study was aimed to compare the efficacy of bevacizumab, ranibizumab and afliberceptin in rats with corneal neovascularization compared with the control group

**Materials and Methods:** In our study, 24 male Wistar-Albino species and 250-300 gr male rats were used. The 24 rats in the study were divided into 4 groups as 6 rats in each group. Each group was followed under the same conditions with the same amount of food, under the same ambient temperature and light. The rats in each group were numbered 1 to 6 and ear numbered. Corneal neovascularization was expected to develop by creating corneal burns in the corneal center in each group. Bovacizumab, ranibizumab and aflibercept were applied to the spontaneously formed groups in the rats and the corneas were taken at 21 days after being checked at regular intervals.

**Results:** Average of VEGF%, Tunnel dye ( count/1hpf), after injektion KNV/all area, and after injektion count of main vessels were found significantly high three groups compared to the control group but between the three groups weren't find significant differences. Count of eosinophil; control and ranibizumab group were found significantly high compared bevacizumab and aflibercept group.

**Conclusion:**

In our study, we found that anti-VEGF molecules, which are not yet licensed, are effective in the treatment of corneal neovascularization, which we have seen frequently. We believe that these results will be an alternative method for the treatment of such patients in the future with the development of new approaches in larger groups

**Key Words:** Experimental corneal neovascularization, bevacizumab, ranibizumab, aflibercept, tunnel coloring

## KISALTMALAR

VEGF Vasküler endotelial growth faktör

FGF: Fibroblast growth faktör

GİB: Göz içi basıncı

HSV-1: Herpes simpleks virüs tip--1

KA: Karbonik anhidraz

KNV: Kornea neovaskülarizasyonu

NK: Natural killer

NO: Nitrit oksit

NSAİİ :Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar

S: Steroidler

TNF- $\alpha$  : Tümör nekroz faktör

## İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
Özet	ii
İngilizce Özet (Abstract)	iv
Kısaltmalar	v
1. Giriş ve amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.1 Kornea Anatomisi	2
2.1.1.A. Epitel ve Bazal Membran	3
2.1.1.B. Bowman Zarı	4
2.1.1.C. Stroma Tabakası	5
2.1.1.D. Descement Membranı	6
2.1.1.E. Endotel Tabakası	7
2.1.2. Kornea biyomekaniği	8
2.1.3. Konjonktiva	9
2.1.4. Sklera	10
2.2. Kornea neovaskülarizasyonu	11
2.2.1. Kornea Neovaskülarizasyonu Epidomiyolojisi	12
2.2.2. Kornea neovaskülarizasyonu nedenleri	14
2.2.3. Korneal Neovaskularizasyonun moleküler zemini	15
2.2.4. Vasküler Endotelyal Buyume Faktörü (VEGF)	21
2.2.5. Tümör nekrozis faktör (TNF)	23
2.2.6. Fibroblast Buyume Faktörü (FGF)	23
2.2.7. Anjiostatin	24
2.2.8. Endostatin	24
2.1.9. Tedavi	24
2.1.9.1. Medikal Tedavi	25
2.1.9.2. Cerrahi Tedavi	26
2.2.10. Anti-VEGF Tedavi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1. Anestezi oluşumu	33
3.2. Korneada oluşan yanık ve neovaskülarizasyon alanların değerlendirilmesi	33
3.3. Histopatolojik inceleme	35
3.4. İstatistiksel Analiz	40
4. BÜLGULAR	41
4.1 Kornea Yanık Derecelerinin Karşılaştırılması	41
4.2 Biyomikroskopik bulgular	41
4.3 İstatistiksel Analiz	43
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKLAR	55

## 1. GİRİŞ

Kornea damarlanması olmayan bir dokudur. Kornea neovaskülarizasyonu ise kornenin tabakalarına doğru damarlanmanın oluşmasıdır. Bu durum tüm dünyada var olan kalıcı körlük nedenlerinden birisidir. Kornea neovaskülarizasyonuna neden olan çeşitli sebepler mevcuttur. Buna infeksiyonlar, travmatik olaylar, kimyasal yanıklar, kornea transplantasyonu ve kontakt lens takılması örnek olarak verilebilir. Bu olayların tamamında temel mekanizma korneada VEGF (Vasküler endotelial growth faktör) düzeyinin artmasıdır. Kornea neovaskülarizasyon tedavisinde steroidler, curcumin, infliximab, metotreksat, suramin, bevacizumab, ranibizumab, epigallocatechin gibi birçok madde denenmiştir. Fakat klinik uygulamada kornea neovaskülarizasyonunun kesin tedavisi bulunamamıştır. Bunun yanında yayınlanan son makalelerde; kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde verilen anti-VEGF'lerin kornea neovaskülarizasyonunu azalttığı görülmüştür. Son yıllarda yapılan bütün çalışmalar anti-VEGF'ler üzerine odaklanmıştır (1,2,3).

Bunlardan birisi olan ranibizumab intravitreal enjeksiyon ile senil maküla dejenerasyonu, retinal ven dal tıkanıklığı ve diyabetik retinopati gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bunun yanında; ranibizumabın klinik uygulamada kullanılmasında kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde de yapılmış deneysel çalışmaları mevcuttur(4).

Diğer bir anti-VEGF ise bevacizumab'tır. Bevacizumab, VEGF-A ve onun tüm izoformlarına bağlanabilen monoklonal bir antikordur. Kanseri ve oküler neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılan ve faydası yapılan çalışmalarla gösterilmiş bir moleküldür. Son yıllarda bevacizumabın topikal ve subkonjonktival uygulamalarının kornea neovaskülarizasyonunu geriletmediği veya neovaskülarizasyonun ilerlemesini durduğuna dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (1).

Üçüncü ve en son çıkan molekül aflibercepttir. Aflibercept VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanmasının yanında VEGF-B ve plasental growth faktör



1-2'ye de yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Aflibercept molekülü, oftalmolojide senil maküla dejenerasyonu, diyabetik retinopati v.b. hastalıkların yanısıra metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde de kullanılmaktadır. Bunun yanında ranibizumab ve bevacizumab gibi son yıllarda deneysel kornea neovaskülarizasyonunda da etkili olduğu görülmüştür(5).

Yapmayı planladığımız bu çalışmanın; son yıllarda üzerinde durulan, oftalmolojide çok önemli bir sorun olan ve kesin çözümü hala bulunamamış olan kornea neovaskülarizasyonu tedavisine ışık tutacağına inanıyoruz.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Kornea Anatomisi**

Kornea embroyojenik olarak gelişimi anne karnında hayatın 8. haftasında baslar. İlk olarak yüzeyel ektodermden kornea epiteli ve desme zarı gelişmektedir. Korneanın köken aldığı iki doku, nöroektoderm ve mezenşim kökenlidir. Mezenşim hücrelerinin 2.trimesterde göçüyle kornea stroması ve Bowman katı oluşmaktadır(6,7).

Kornea, skleranın 1/3'lik ön kısmında saat camı şeklinde yerleşmiş durumdadır ve ortalama +43 diyoptrilik (D) kırma gücüne sahip, saydam, optik özelliği olan vaskülarize olmayan bir dokudur. Ön kısımdan gözü sarması nedeniyle globu koruyuculuk görevi de vardır. Korneanın şekli elipse benzemektedir dolayısıyla horizontal ve vertikal çapları farklılık göstermektedir. Erişkinde horizontal çap ortalama 12.5 mm, vertikal çap ortalama 11.5 mm kadardır. Kornea dokusunun kalınlığı ise merkezde ortalama 540 µm, periferde 650 µm'dir. Korneanın ön ve arka eğrilik çapları da şeklinden dolayı farklılık göstermektedir. Ön eğrilik yarıçapı 7.8 mm, arka eğrilik çapı 6.8 mm'dir. Korneanın ön yüzey kırma gücü ortalama +48 D, arka yüzeyinin kırma gücü ortalama -5 D olmak üzere toplam kırıcılık gücü +43 D'dir(7-10).

Yenidoğanlarda ise kornea çapı ve buna bağlı olarak kırıcılık gücü farklılık gösterir. Kırıcılık gücü ortalama +50 D iken vertikal çap 10'mm dir. Korneanın gelişimi 6 yaşına kadar devam etmektedir(11-13).

İnsan vücudunda innervasyonu en yoğun olan bir doku da korneadır. Korneanın duyarlılığı konjonktivadan 100 kat daha fazladır. Korneanın innervasyonu N. trigeminus'un oftalmik dalından çıkan uzun siliyer sinirler ile olur. Bu uzun siliyer sinirler duyuşal sinirlerdir. Korneaya doğru uzanan sinirler; skleral, episkleral ve konjonktival seviyelerden korneaya penetre olur ve sonra dallanırlar. Sinirler korneaya girince miyelin kılıflarını kaybederler ve ağ oluştururlar; bu ağ stroma, Bowman ve epitel tabakaları seviyesindedir. Bu sinirler duyuşal sinir olduğu için geniş bir alana yayılarak sonlanırlar. Korneanın ağrıya çok duyarlı olmasının sebebi budur. Korneadaki nörotransmitterler ise; asetilkolin, katekolamin, substans P, kalsitonin gen bağımlı peptit, nöropeptit Y, intestinal peptit, galanin ve metyanin-enkefalin'dir(7,14, 15).

Korneanın hem lenfatik sistemi yoktur hem de avasküldür. Kornea damarsız olduğundan ihtiyaçlarını gözyaşından, limbusta bulunan damarlardan, hümör aközden almaktadır. Lenfatik akış, limbus epiteli altında bulunan lenfatik ağ ile olmaktadır. Korneanın oksijen ihtiyacı ise kapaklar kapalı iken konjonktivaki arter ve venlerden, kapaklar açıkken gözyaşı yoluyla havadan ve glukoz ihtiyacı ön kamara sıvısından sağlanır(14-16).

## **2.1.1 KORNEA TABAKALARI**

### **2.1.1.A. EPİTEL TABAKASI**

### **2.1.1.B. BOWMAN TABAKASI**

### **2.1.1.C. STROMA TABAKASI**

### **2.1.1.D. DESCEMENT TABAKASI**

### **2.1.1.E. ENDOTEL TABAKASI**

#### **2.1.1.A. EPİTEL TABAKASI**

Kornea epiteli; yaklaşık olarak 50 µm kalınlığında olup, çok katlı non keratinize hücrelerden meydana gelir. Embriyolojik hayatta ektodermden köken alır. Kornea epitel tabakası, üç tabakadan oluşmaktadır. En altta bazal hücre tabakası, onun üstünde kanat hücreleri, en üstte de çok katlı yassı

hücrelerden oluşur. En altta bulunan bazal hücreler tek katlı prizmatik hücrelerden oluşur ve altındaki bazal membrana hemidesmozomlar ile bağlıdır. Onun üstünde bulunan kanat hücreleri 2-3 kat kübik poligonal hücre tabasından oluşur. En üstte bulunan yassı hücreler ise 7-8 kat hücreden oluşur. Hücrelerde mikrovillus ve villus gibi çıkıntılar mevcuttur ve bu çıkıntılar üst tabakalara doğru çıkıldıkça yassılaşıyor ve çıkıntılarını kaybeder. Dolayısıyla bu da en üstte bulunan epitelin çabuk dökülmesine neden olabilmektedir. Fakat, bu bariyer görevi yapan göz yaşı tabakası stabilizasyonu sayesinde önlenmektedir. Korneal kök hücreler limbusun bazal hücre tabakasında lokalizedir. Yenilenme kapasitesi çok yüksek olan bu hücreler ortalama 7 günde rejenere olur. Üst kısımda bulunan hücreler dökülerek göz yasına karışır. Perilimbal bazal epitel hücrelerinin devamlı çoğalmasıyla ve sonrasında yüzeyel hücrelere farklılaşarak diğer tabakalar oluşur. Epitel hücreleri birbirine çok sayıda tight junction ve zonula okludensler aracılığıyla tutunmuşlardır. Bu sayede epitel tabakasının diğer bir önemli görevi olan mikroorganizmalara karşı bariyer görevi yapar. Epitel tabakasında ayrıca tip 4 kollajen, laminin, heparin, lenfositler, langerhans hücreleri, makrofajlar bulunmaktadır (7,15, 17-18).

### **2.1.1.B.BOWMAN TABAKASI**

Bowman tabakası epitelin bazal membranına ve stromaya sıkıca yapışıktır. Bowman tabakasının travmalara karşı direçli olmasının sebebi Tip 1 ve tip 3 kollajen fibrillerinden zengin olmasıdır (6,14,16).

Bu tabakada hücre yoktur. Bu nedenle hasarlanınca yenilenemez. Korneada bulunan duyu sinirleri Bowman tabakasında seyrederek epitel hücreleri arasına kadar gelir ve buralarda sonlanır. Bunların hasarında rejenere olmadığı için skar dokusu gelişir. Ortala kalınlığı 8-10 mikrondur. Ve bu kalınlık yaşam boyu değişmez. Bowman tabakasının diğer bir önemli görevi de bariyer görevidir yani epitel tabakası ile stroma arasında bariyerdir (7,17, 19).

### 2.1.1.C.STROMA TABAKASI

Kornea kalınlığının %90'ını oluşturan ve ortalama kalınlığı 500 µm olan tabaka stroma tabakasıdır. Stromanın, tüm vücutta olduğu gibi ortalama %75'i sudur. Stromanın saydamlığını veren bu su oranıdır. Bu oranın artışı saydamlığın bozulmasına ve kornea ödemeine neden olur. Stromanın su dışında ağırlığının %80'i kollajenden, %15'i ara maddeden ve %5'i hücrelerden oluşur. Tip 1 ve 5 kollajenler birbirine paralel olarak uzanarak düzenli lameller tabaka oluşturur. Birbirine tutunmuş bu lifler ortalama 220 tanedir ve 2-3 µm kalınlık oluşturur. Kollajen lifler skleradaki lifler ile devam eder. Ayrıca korneayı bütünlemesine kat ederek bir ucundan diğerine uzanır. Bununla birlikte proteoglikanların oranları ve konsantrasyonları arkadan öne doğru çeşitlilik gösterir. Ayrıca ön stroma tabakası arka stroma tabakasına göre daha az su oranına sahiptir. Lens kristallerinin benzeri olan diğer moleküller korneanın optik özelliklerinin kontrol edilmesinde rol oynar. Bu proteinler keratositler tarafından salgılanır ve epitel hücrelerinin arasında bulunur. Ön stromada bulunan lameller kısa, aralarında daha geniş boşluklar yer alır ve dardır. Arka stromanın uzun, geniş ve kalın olan lamelleri limbusun bir ucundan bir ucuna uzanır. Aralarındaki inter lameller sayesinde bağlantı sağlanır. Korneanın elastisitesi çok değildir. Örnek vermek gerekirse normal göz tansiyonunda kornea dörtte biri kadar esner stromada bulunan kollajen fibrillerin özel dizilimi sayesinde korneanın saydamlılığı oluşur. Bu dizilim sayesinde korneaya gelen ışığın saçılması azalır. Yani korneaya dağınık olarak ışık demetlerinin düzeltilmesinde rol oynar. Saçılım önde daha fazladır. Refraktif index epitelde 1.401, stromada 1.380 ve arkasında 1.373 dür. Dolayısıyla refraktif index önde düşük ama saçılım daha fazla ama arkaya doğru refraktif index artar ve saçılım azalır. Işığın dalga boyutundan küçük olan kafes şeklinde dizilimdeki kollajen liflerden dolayı kornea saydamlılığını sürdürür. Glikozaminoglikan osmotik etkileri ve negatif yüklerinden dolayı birbirlerini iterek stromanın bilinen yapısını oluşturur. Glikozaminoglikanlar arasında az sayıda ve yassı şekilde keratositlerden oluşur. Kollajen ve mukoprotein sentezleyen ve yaralanmadan sonra fibrositlere dönüşen keratositler stroma için vazgeçilmezdir. Ayrıca stromanın

yüzde 78 su içermesi nedeniyle kornea saydamlılığını devam ettirir. Sağlam bir epitel, sağlam endotelial bariyerler ve endotelin pompa fonksiyonu sayesinde korneanın hidrasyonu belli oranda kalır. Endotelde bulunan ısıya bağımlı  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - ATPaz enzimi sayesinde iyonların hareketi dengede kalır. Ayrıca negatif yüklü glikozaminoglikanların birbirlerini itme prensibi sayesinde şişme basıncı oluştururlar. Göz içi basıncından dolayı da dışarı doğru bir basınç oluşur. Böylece itme basıncı ile göz için basıncı birbirini dengeler bu iki basınç birbirine eşit olur. Korneanın hidrasyonu kornea tabakalarında farklılık gösterir yani önden arkaya doğru korneanın hidrasyonu artar endotele yaklaştıkça hidrasyon artar (7,15).

Stroma tabakası bazı farkları olsada yapı olarak skleraya benzer. Farkları ise daha çok ara madde, daha az su içermesi ve fibril dizilimi sklera'ya göre çok daha düzenlidir. Bu sayede kornea saydam kalır. Keratan sülfat ve kondrotin sülfat gibi glikozaminoglikanlar stromanın ortasındaki ara maddesini oluşturur. Bundan başka kollajen tip1,5,6, lumikan, dekorin gibi proteoglikanlar vardır. Stromadaki keratositler şekil ve büyüklük açısından çeşitleri mevcuttur, fakat keratositler 3 boyutlu spiral şeklinde bir ağ oluşturarak stroma tabakasını oluşturur. Keratositler stromadaki kollajen lifler arasında yassı fibroblast şeklinde yer alırlar. Bu fibroblastlar stromada bulunan maddeleri hem üretirler hem sindirmekle görevlidirler. Keratositlerin sayısı yıllar içinde aynı endotel hücreleri gibi azalır fakat bu azalma endotel hücrelerinden daha azdır. Bununla birlikte geçirilmiş cerrahi işlemler yine keratositlerin azalmasına neden olur. Bundan başka stromada az da olsa makrofajlar, lenfositler ve schwann hücreleri bulunur(6,7,16,20).

#### **2.1.1.D. DESCEMENT TABAKASI**

Descement membranı, stroma ile endoteli ayıran, endotelin bazal membranı olup 10 mikron kalınlığında gerçek bir membran yapısına sahiptir.

Direnci yüksek bir yapıda olduğu için keratitlerde bile proteolitik enzimlere karşı sağlam kalır. Descement membranı 2 kısımdan oluşur. Bu membran anne karnındaki dönemde birikerek oluşan anterior bantlı bir bölge ve yaşam boyunca endotel tarafından oluşturulan posterior bantsız bir

bölgeden oluşmaktadır. Descement membranında yer alan ekstrasellüler matrix elemanları laminin, fibronektin ve tip 4 kollajen'dir. Bu yapılar sayesinde perforasyon, keratit ve travmalara en güçlü bariyer görevi kornea katmanıdır. Descement zarının ön kısmı stromaya göz içi basıncının etkisiyle yapışık durur. Cerahi sırasında veya herhangi bir travma sırasında kolaylıkla kolaylıkla ayrılabilir. Bunun onarımı ise yine endotel tarafından yapılmaktadır. Descement membranı; açığı elemanı olan schwalbe çizgisini oluşturarak sonlanır(7,14,16,22-24).

### **2.1.1.E. ENDOTEL**

Tek sıralı poligonal hücrelerden oluşan endotel tabakası yaşam boyunca stromada bulunan fazla sıvıyı dışarı pompalamaktadır. Hekzagonal yapıda olan hücreler sıkı parmaklı uzantılar sayesinde mozaik paternde dizilimi ile endotel oluşur. Hücreler arasında bulunan makula okludens, zonula okludensler ve makula adherensler sıkı bağlantılar sayesinde humor aközün geçişi önlenir. Endotel hücre sayısı ortalama 500 hücre/mm<sup>2</sup> nin altına indiğinde kornea saydamlığı bozulur ve kornea ödemi gelişir. Endotelde bulunan hücrelerin bariyer ve aktif pompa fonksiyonu sayesinde kornea saydamlığı sağlanır. Fakat kornea avasküler olduğu için glikoz, oksijen, aminoasit gibi temel ihtiyaçları için fizyolojik sınırlarda aköz hömörün geçişine izin verilir. Endotel hücreleri yenidoğan bir kişide ortalama 3000-4000 hücre/mm<sup>2</sup>, hücreler kübik ve 10 mikron kalınlığında iken erişkin yaşlara gelince ortalama 2500 hücre/mm<sup>2</sup> poligonal ve 5 mikron kalınlığındadır. Hücre sayısı yılda %0.6 düşüş gösterir ve komşu hücreler azalan hücrelerin oluşturduğu boşluğu kapatmak amacıyla genişler. Endotel hücrelerinin sayısı endotel yüzeyi boyunca değişiklik gösterir fakat en fazla sayı periferdedir. Hücrelerin rejenerasyon kapasitesi yoktur. Endotelde hasar geliştiğinde o bölgeye endotel hücreleri göç edebilirler ya da gerek hacimlerini artırarak gerekse de hücrelerin uzaması ve genişlemesi ile hasarlı bölgeyi kapatabilirler. Sonrasında yeniden hücreler arası bağlantılar sağlanmakta ve bariyer görevine kaldığı yerden devam etmektedir. Endotel hücreleri, metabolik olarak aktiftirler bundan dolayı hücre içi organelleri

(özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleusları iridir) gelişmiştir. Endotel hücreleri nöral krest kaynaklıdır. İnsan endotel hücreleri invivo olarak çoğalmazlar fakat hücre kültüründe bölünürler. Son yapılan çalışmalarda periferik korneada endotelyal kök hücrelerin varlığı gösterilse de endotel kök hücreleri yıllar içinde azalmaktadır. Endotel, bir yandan aköz humorun stromaya geçişini engellerken bir yandandan stromada bulunan suyun dışarı taşınmasını sağlar. Çeşitli çalışmalarda endotelin aköz humore 6-7ml/saat su taşıdığını gösterilmiştir. Na-K ATPaz pompası korneanın saydamlığını sağlayan endotel hücrelerinde (ortalama her hücrede 1,5 milyon adet mevcut ve hücrelerin alt ve yan kısımlarında çok sayıda) bulunan en önemli iyon transport mekanizmasıdır. Bundan başka Na-H pompası da bulunmaktadır. Bu pompa ise adından da anlaşılacağı gibi Na hücre içine, hidrojeni hücre dışına atmaktadır. Diğer bir mekanizma ise karbonik anhidraz (KA) enzim sistemidir. Diğer pompalar gibi KA sisteminin de inhibisyonu korneal ödeme neden olmaktadır (6,14-16 24-27).

### **2.1.2 KORNEA BİYOMEKANİĞİ**

Sıkı ve düzenli bir yapıya sahip olan kornea, kollajen fibrillerden oluşur. Lamellere sarılı olan ve birbirine paralel olarak dizilen bu kollajen fibriller limbusun bir ucundan diğerine kadar uzanır. Korneanın belirli kıvamda bir sertliği vardır. Bu rijidite göz içi basıncını (GİB) ölçmek istediğimizde sonucu etkilemektedir. Hava kuvvetinden faydalanılarak yapılan ölçümler kornea üzerinde baskı oluşturur böylece korneal histerezis dediğimiz korneanın sertlik derecesini ölçebiliriz.

Korneadaki su azaldığında korneadaki stres arka tabakalara doğru uniform bir şekilde yayılır. Fakat kornea ödemli olduğunda stres ön lamelde kalır. Ekstraselüler matrikste bulunan bu lamellerin etrafında glikozaminoglikanlar vardır. Bu tabakalar arasında kaymaya karşı oluşan direnç az olduğu için kolayca hareket edebilir. Stroma ise bundan biraz farklıdır. Stroma esnek olmayan izotropik olmayan bir yapıya sahiptir. Bundan dolayı korneanın hidrasyonuna bağlı olarak stres kuvveti değişmekte gerilim kuvveti kornea boyunca düzensiz şekilde dağılmaktadır.

Bu tip ölçümler sayesinde kornea biyomekaniği; biyoelastisite, hidrasyon, bölgesel ve santral fakometre, vizkosite gibi faktörleri içermektedir (15).

### **2.1.3 KONJONKTİVA**

Kornea neovaskülarizasyonunda (KNV), konjontiva ve sklera da etkilidir.

Konjontiva, göz kapaklarının globa bakan yüzeyini ve limbusa kadar olan göz yüzeyini kaplayan mükoz yapıya sahip yarı geçirgen bir zardır. Konjontiva ön siliyer arter ve palpebral arterleden beslenir. Lenf sistemi ise göz kapakalarına benzer olup preauriküler ve submandibüler lenf bezlerine drene olur. Konjontiva immünite açısından çok önemli göreve sahiptir. Konjontiva; fornix, bülber konjontiva, palpebral konjontiva ve semilunar kıvrımlardan oluşur. Üst fornix, levator kasının düz kas lifleri tarafından oluşur. Gözdeki rektus kaslarının devam eden lifleri gözün temporal kısmındaki konjontivaya ve plikaya uzanırlar. Fornix bu sayede oluşur. Tarsta bülanan konjontiva tarsiya tutunur fakat bülber konjontiva bundan farklı olarak tenona gevsek tutunmuştur. Fakat limbus bölgesinde tenon ile konjontiva birleşir.

Palpebral konjontiva; arkasındaki tarsal plak ile kapak kenarındaki mukokutanöz bileşke arasında yer alır. Bülber konjontiva ise limbusa kadar devam ederek limbusta Vogt palizadları denilen kabarıkları oluşturmaktadır. Karünkül denilen kıl folikülleri, lakrimal bezler, ter bezleri ve sebace bezler içeren kutanöz doku gözün medial kısmında yer almaktadır. Konjontivanın innervasyonu ise 5. kranial sinirin oftalmik dalının dalları ile olmaktadır.

Konjontiva histolojisini incelediğimizde epitel tabakası non keratinize yapıda olduğu bunun yanında globda skuamoz epitel, tars üzerinde kübik epitel, fornixte silindirik epitel olduğu görülür.

Konjontivadaki goblet hücreleri ise en fazla göz kapağı tarafındaki tarsal konjontivada yer alır. Konjontivadaki immünitede en önemli yapı ise konjontiva ile ilişkili lenfoid doku (CALT)'dır. Bu yapıda, lenfatikler ve bunlarla ilgili arter ve venler, lenfositler ve plazma hücrelerinin toplu halde olduğu yapılar mevcuttur (15,28).



#### **2.1.4. SKLERA**

Sklera yapısında tip 1 kollajen, fibronektin, elastin, proteoglikanları içerir. Fakat bunlar korneadaki dizilim kadar düzenli değildir. Skleranın iç kısmı, üveal dokuların suprakoroidal ve suprasiliyer kısımlarıyla kaynaşmıştır. Dış kısmında ise episklere vardır. Episklere damarsal yapılardan zengin bir ağa sahiptir. Dış kısmında tenon bulunmaktadır. En üstte konjonktival damar mevcuttur. Onun altında yüzeyel episkleral ağ mevcuttur. En altta ise derin damarsal ağ mevcuttur. En derindeki tabaka skleranın yüzeyel bölümünü besler.

Skleranın innervasyonunu ise uzun arka siliyer sinir sağlar. Bu sinirler yüzeyel sklerada yer alır. Fakat bazen bu sinirin dalları skleranın içinde halka oluşturarak Axenfield halkası denilen ciliyer cismin önünde bir nodül oluşmasına neden olur.

Sklera normalde beyaz bir yapıya sahiptir fakat sklera incelendiğinde veya su oranı arttığında saydamlığı artabilir(15,29).

#### **2.2 KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONU**

Kornea, sadece refraktif yüzey oluşturmamakta ayrıca glob içinde mekanik bir engel oluşturmaktadır. Saat camı şeklinde olan kornea hem saydamdır hem de avaskülerdir. Fakat bu avasküler yapıda ön segmentte meydana gelen keratit gibi inflamasyon durumlarında, korneanın hipoksisine bağlı iskemisinde ve her çeşit kornea hasarında vaskülarizasyon oluşabilir. Yukarıda bahsedildiği gibi kornea etrafında bulunan damarsal ağdan köken alan damarlar kornea üzerine doğru ilerler ve kornea üzerinde ödeme, inflamasyon sonucunda skar gelişebilir. Bu da görmede azalmaya neden olmaktadır. Korneada anjiojenik faktörler, anti-anjiojenik faktörler ve sitokinler mevcuttur. Fakat bunlar arasında belirli bir denge mevcuttur. Bu dengenin anjiojenik faktörler tarafına kayması KNV'na neden olmaktadır. KNV'nin en sık sebepleri arasında; korneada meydana gelen enfeksiyonlar,

kimyasal yanıklar, travma, inflamasyona neden her türlü olay ve kornea transplantasyonu sonrasında cevap olarak oluşan vaskülarizasyon yer almaktadır (7,30-34).

Korneanın damarsal yapısı diğer organlardan farklıdır. Kornea avasküler yapıda olduğu için beslenmesi çevresindeki limbal bölgedeki pleksuslardan olmaktadır. Bu pleksus ofalmik arterin dalı olan siliyer arter tarafından oluşturulmaktadır. Dolayısıyla KNV limbal bölgede yer alan bu pleksustan oluşmaktadır (35).

'Cogan' (36) KNV'nin yüzeysel, interstisyel ve derin olmak üzere 3 kısımda gelişmektedir. Yüzeysel KNV pannus olarak bilinmektedir. Yüzeysel KNV'de damarlar ve inflamasyon epitelin altındaki Bowman tabakasında oluşur. Gözü tutan trahom korneanın daha çok üst kısımlarını tutarken, exposure keratopati ve bülloz keratopati korneanın descement membranına yakın yerlerini tutmaktadır. Pannusta damarlar daha çok küçük arteriollerden ve büyük venulden veya çok sayıda küçük kapiller yataktan oluşur. Bunun yanında buradaki damarlar genelde keskin bir açılma göstermezler. Fasiküler keratitte ise durum biraz daha farklıdır. Bu durumda damarlar sadece yüzeysel damarların yanında istersistiyel tabakayı da tutmaktadır. Tekrarlayan Herpetik enfeksiyonlarda tutulum yüzeysel korneada oluşur ve damarlanmada yüzeysel korneada meydana gelir ve flicteküler keratitle genelde beraber seyreder. Bu durumlardan farklı olarak radyasyona veya hardal gazına maruz kalanlarda korneada yüzeysel KNV'nin geliştiği görülmüştür.

İntersistiyel keratitte yüzeysel KNV'den farklı olarak damarlar genelde düzdür ve dallanma fırça benzeridir. Fakat meydana gelen istersistiyel damarlanmada genelde damar yüzeyle ilişkilidir ve oluşan hasar diğer tabakaları da etkilemektedir.

İntersistiyel KNV'nin çeşitli klinik formları vardır. Konjenital sifiliz, Meniere like sendromundaki keratopati, sklerokeratit, rozasea gibi kollajen doku hastalıklarında görülen marjinal keratit bunlara örnek verilebilir.

Derin KNV ise özellikle korneanın descement membranı gibi alt tabakalarını tutar. Derin stromada meydana gelen interstisyel keratit

sonucunda derin KNV oluşabilmektedir. Bunun haricinde bilinen derin KNV ye neden olan başka hastalık yoktur (36).

KNV'de kornea tabakalarına göre oluşan neovaskülarizasyon klinikte farklı formlarda karsımıza çıkar. Örneğin herpese bağlı keratitte stromanın alt tabakalarında neovaskülarizasyon gelişirken, korneanın yüzeyinde gelişen periferik kornea hastalıklarında pannus gelişir (35).

### **2.2.1 Kornea Neovaskülarizasyonu Epidemiyolojisi**

Bjoern O. Bachmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada USA'da kornea neovaskülarizasyonu kimyasal yanık, iskemi, infeksiyon ve inflamasyon nedeniyle oluşmaktadır ve toplam körlüklerin %4.14 oluşturmakta bu da yaklaşık 1.4 milyon insanı etkilemektedir (9). Bu konuda literatür tarandığında Türkiye'de yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat bu sayının fazla olması kornea neovaskülarizasyonunun ne kadar önemli bir sağlık problemi olduğunu düşündürmektedir.

Bunun yanında KNV'li hastalar genel popülasyona göre daha fazla sayıda muayene olmaya gelmektedirler. Bu problemin toplum içinde kesinlikle daha fazla mercek altına alınıp incelenmesi gerekmektedir. Maalesef KNV, kornea hastalıkları içinde çok önemli bir yer tutmakta ve sonunda görme kaybına neden olmaktadır (34,37).

### **2.2.2 Kornea Neovaskülarizasyonunun Nedenleri**

Travma, inflamasyon, infeksiyon ve dejeneratif hastalıklar korneada yeni damar oluşumuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda oluşan yeni damarlar; lipid birikimine, korneal skara, ışığa geçirgen tabakanın bozulmasına ve sonuçta görmede azalmaya neden olmaktadır (38).

Travmatik nedenler arasında kimyasal yaralanmalar önemli bir yer tutmaktadır. Kimyasal yaralanmalar tüm oküler travmaların %7.7 ile %18 arasında yer tutar (1).

Bundan başka sert kontakt lens kullanımı ile yüzeysel pannus nadiren görülürken yumuşak kontakt lenslerle sık görülmektedir. Derin stromal KNV ise uzun süre kontakt lens kullanımıyla ilişkilidir (39).

Bundan başka trikiyazis ve geçirilmiş ön segment cerrahileri de sık KNV nedenlerindedir (4,37-39).

Enfeksiyona bağlı gelişen KNV ise streptokokal ve klamidyal keratokonjonktivitlerde sık rastlanmaktadır.

Bundan başka tüberkülozis ve sifilizde KNV nedenleri arasındadır. *Chlamydia trachomatis*'in neden olduğu Trahom hastalığı ise temelde konjonktivanın hastalığıdır fakat ileri dönemde meydana gelen iskemi ve pannus neticesinde körlüğe neden olmaktadır. Dünya sağlık örgütü, 1970'li yıllarda Asya'da 6 milyon körlük olduğunu bildirmiştir.

*Onchocerca volvulus*'un neden olduğu Onchocerciasis, özellikle Afrika ve Güney Amerika'da sık görölmektedir. 50 milyon kişinin bu hastalığa yakalandığını, 1milyon kişinin ise bu sebepten dolayı kör olduğu bildirilmiştir (37).

Enfeksiyon etkenlerinden en önemlilerinden birisi Herpes simpleks virüs tip1(HSV-1)'dir. HSV-1, oküler morbiditenin en önemli nedenlerinden birisidir. Korneayı innerve eden gangliyonda reaktivasyon - iyileşme rekürrenslerinin oluşması sonucu KNV gelişmektedir. Erken evrede birçok olayinflamatuvarcevaba neden olarak, viral replikasyon, spesifik sitokinlerin üretilmesi ve korneal neovaskülarizasyon gibi bir sonraki patalojiye neden olmaktadır. Korneal anjiogenezis ise kalıcı korneal hasara neden olmaktadır. Viral replikasyonun sonunda kornea stromasınainflamatuvarhücreler gelir. HSV-1'e bağlı KNV'de yer alan hücreler ise CD4 T hücreleri, makrofajlar ve nötrofillerdir. Bunlardan salınan VEGF ve birçok mediatör ise anjiogenezde yer almaktadır (40-42).

İnflamatuvar hastalıklardan Steven Jahson sendromu öncelikle epiteli tutar ardından stromaya doğru ilerler sonunda KNV'ye neden olur. Göz kapağı inflamasyonuna sekonder oluşan KNV'de bir inflamatuvar durumdur. Greft rejeksiyonu dainflamatuvarsüreç ile başlayıp sonuçta KNV'ye neden olan başka bir patalojidir (37).

Dejeneratif hastalıklardan Terrien marjinal dejenerasyon ve pterjium KNV sebepleri arasındadır (37).

**Tablo: Kornea Neovaskülarizasyonu nedenleri**

(1,4,37-42)

<i>Dejeneratif nedenler</i>	<i>Pterijum</i> <i>Terrien Marjinal dejenerasyonu</i>
<i>İnflamatuvar nedenler</i>	<i>Steven - Jahnson sendromu</i> <i>Greft rejeksiyonu</i> <i>Göz kapağı inflamasyonu</i>
<i>Enfektif nedenler</i>	<i>Streptokokal</i> <i>Clamidyal</i> <i>Tüberkülozis</i> <i>Sifiliz</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Onchocerca volvulus</i> <i>Herpes simpleks virüs tip1(HSV-1)</i>
<i>Travmatik nedenler</i>	<i>Kimyasal yaralanmalar</i> <i>Sert ve yumuşak kontakt lens kullanımı</i> <i>Trikiyazis</i> <i>Geçirilmiş ön segment cerrahileri</i>

### **2.2.3. Korneal neovaskularizasyonun moleküler zemini**

KNV, vaskülogenezis ve anjiogenezis olmak üzere iki kısımda meydana gelir. Embriyogenezde; kemik iliğinden köken alan angioblastlar rol alır. Bu hücreler oluşmuş damarsal yapılara doğru göç ederek yeni damar oluşumuna neden olur. Anjiogenezis, mevcut damarlardan yeni damar oluşumudur ve KNV'nin patofizyolojisinden sorumludur. Bunun yanında korneada anjiogenik faktörler ( fibroblast growth faktör, VEGF) ile anti-anjiogenik faktörler (anjiostatin, endostatin, pigment epitel kaynaklı growth faktör) bir denge halindedir. Bunlardan anjiogenik faktörlerin artması veya anti anjiogenik faktörlerin azalması durumunda KNV süreci başlamaktadır(43- 46).

Anjiogenezis mevcut kapillerlerden yeni damar oluşumunu ifade eden bir terim olmakla birlikte gelişme çağı ve yara iyileşmesi dışında görülmemektedir. Anjiogenez için pozitif ve negatif faktörlerin kendi arasındaki dengesi sayesinde dengede kalmaktadır. Fakat kanser buna ters bir durumdur çünkü kanserde bu denge bozulmaktadır ve yeni damarlar oluşmaktadır. Bu konuda 'Judah Folkman' ilk kez tümörlerin metastaz yapması ve büyümesinde yeni damar oluşumu mekanizmasında öncülük eden isim olmuştur. Anjiogenezis daha önce var olan damarların ve kapiller ağın büyümesi ve yeniden biçimlenmesidir. Kanser, iskemik kalp damar hastalığı, yara iyileşmesinde, retinopatilerde ve enflamasyonda mevcut kan damarlarından yeni damarlar meydana gelir. Anjiogenezis hem primitif hücrelerden yeni damar oluşumunu hem de kemik iliğinden gelişen prekürsör hücrelerin yeni damar oluşumunu tarifler. Mevcut sistemde var olan damarların tomurcuklanması sonucu anjiogenez meydana gelir. Anjiogenezis ilk basamağı damarların dilatasyonu ve damarsal geçirgenliğin artışıdır. Böylece plazmada bulunan proteinler ve inflamatuvar faktörler ekstraselüler alana geçişi artar. Burada biriken bu maddeler daha sonra gelecek olan endotel hücreleri için zemin oluşturmaktadır. Ekstraselüler matrix alan çöküntü faktörleri ise buradaki enzimleri aktive etmekte bu da damar duvarının yıkımına neden olarak hem endotel hücrelerinin göçünü

arttırmakta hem de anjiogenik büyüme faktörlerinin salınımını arttırmaktadır. Böylece anjiogenezis temeli oluşmaktadır.

Anjiogenezisde vazodilatasyon nitrik oksit salınımı ile baslar. VEGF bağılı olarak vasküler geçirgenlik artar ve damar içinde bulunan proteinler ekstraselüler matrikse geçer. Bu proteinler endotel hücreleri için bir temel oluşturur. Trombosit - endotelyal hücre adezyon molekülü ve vasküler endotelyal cadherin, aracılığıyla damarsal geçiş artar. Bunun tam tersi mekanizmayla anjiopietin damar cidarını sıkılaştırarak geçirgenliği azaltır. Endotel hücrelerinin damar dışına çıkması için endotel hücreleri arasındaki bağlantıları zayıflaması gerekmektedir. Anjiopietin-2 ise damar etrafında bulunan düz kas hücrelerinin yapışmasını ve damar dışı yapıların gevşemesinde görev almaktadır. Bunun yanında endostatinin ise anjiogenezini inhibe etmesi plazmin düzeyini arttırarak olmaktadır.

Vaskülogenezis ise vasküler endotel prekürsör hücre olan anjioblastların çoğalmasdır. Bu anjioblastlar endotelyal ve hematopietik hücreleri oluşturmaktadır. Anjioblastlar ise yolk salktan gelişmektedir. Anjioblastlar VEGF, VEGF-2, FGF tarafından farklılaşmaya uğramaktadır. Bunun yanında VEGFR-1 bunların tam tersi etki yapmaktadır yani anjioblastların farklılaşmasını inhibe etmektedir.

Anjiopietin, endotel hücrelerinin alana geçişini ve damarların tomurcuklanmasını arttırır. Ayrıca VEGF molekülünü aktive eder. Fakat VEGF molekülü ile farkı vardır. VEGF molekülü endotel hücre ağı organizasyonunu başlatabilirken anjiopietin başlatamaz. Sadece VEGF molekülünün başlattığı ağları sağlamlaştırır. Benzer şekilde anjiopietin-2'de VEGF molekülü varlığında anjiogeniktir.

Dolayısıyla tomurcuklanma; pozitif ve negatif faktörler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Anjiostatin, endostatin, antitrombosit-3, interferon-B ve trombosit faktör anjiogenezisi inhibe eder.

Damarların lümen oluşumu ise endotel hücreleri birleşmesi sonucu ile olur. Damarların uzaması ise endotel hücrelerinin incilmesi ve eski

damarlarla birleşmesi sonucu olur. Lümen çapı ise anjiostatin ve VEGF ile artmaktadır. Trombospondin ise lümen oluşumunu azaltmaktadır.

Endotel hücreleri, oluşan damara geldikten sonra ömür boyunca bulunduğu yerde kalır. Fakat endotel hücrelerinde de apoptozis görülebilmektedir. Örnek vermek gerekirse retinada ve overlerde damarlar fizyolojik olarak gerilemektedir. Damar lümeninin daralması ve trombus sonucu da patolojik olarak endotel hücrelerinin apoptozisi görülmektedir. Bundan başka erken doğan çocuklarda prematüreye bağlı olarak verilen fazla oksijen VEGF düzeyinin azalmasına neden bu da retinal damarların azalmasına neden olarak prematür retinopatisine neden olmaktadır. Tüm bunlardan farklı olarak anjiostatin, interferon alfa, vasküler endotelial büyüme inhibitörü, reaktif oksijen molekülleri endotel apoptozisini arttırmaktadır.

Endotel hücreleri bulunduğu dokunun lokal fizyolojik ihtiyaçlarına göre belirli özelliklere sahip olurlar. Böylece bulunduğu dokunun kendine has ihtiyaçlarını karşılamış olurlar.

Embriyolojik hayatta retinada bulunan santral arter ve venin primitif yapılarının vaskülogenezis ile oluştuğu fakat damarsal yoğunluğun ve uç dallarının oluşumunun anjiogenezis yoluyla zamanla oluştuğu görülmüştür. Bunun yanında diyabetik retinopati, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, iskemik retina hastalıkları temel oluşum mekanizması anjiogenezistir. Sonuç olarak oküler neovaskülarizasyonda temel olay anjiogenezistir.

Patolojik neovaskülarizasyonda VEGF-A miktarının artması sonucu endotel hücrelerinin artması ve anjioblastların aktive olmasıyla anjiogenezis meydana gelmektedir.

Hem anjiogenezis hem vaskülogenezis arasında birçok fark olmasına rağmen temel olarak ikisinde de VEGF-2 reseptörünün aktivasyonunda fazlalık gibi ortak yönleri vardır. Dolayısıyla hem anjiogenezis hem de vaskülogenezis neovaskülarizasyonda etkilidir.

Vasküler olgunlaşmanın gerçekleşmesi periendothelial hücreler sayesinde olmaktadır. Bu hücreler endotel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonun engellenmesi ve matriksin üretimini artırılması damarların



olgunlaşmasını sağlar. Böylece damarların sağlamlaşması olur ve daha dayanıklı hale gelir.

Kan damarları etrafına düz kas geldiğinde damar stabilizasyonu sağlanmış olur fakat diyabetik hastalar perisit hücreleri azaldığı için damarların sağlamlığı azalır bu da anevrizma ve rüptür ihtimalini kolaylaştırır. Dolayısıyla normal insanlarda düz kas ile kaplanması hem damarların esneme yeteneğini artırır hem de vazo motor özellik sahibi olurlar (47).

'Takayuki Asahara', vaskülogenezin temelini oluşturur. Çeşitli kan hücrelerinin büyümesi ve birleşmesi sonucu vaskülogenez meydana gelir. Bunun devamı ise dolaşımdaki kan hücrelerinin farklılaşması sonucu arteriovenöz damar sistemi oluşur (48,49).

Temelde damar oluşumunda endotelial hücreler rol oynar. Bu hücreler ise hematopoietik kök hücrelerden köken alır. Bu kök hücreler olan endotelial progenitör hücreler veya anjioblastlar kan adacıklarının periferinde yer almaktadırlar. Bu hücreler endotelial progenitör hücreler CD34 antijeni içermektedir (50).

Bu hücreler endotelial hücrelere dönüşmektedir. Neovaskülarizasyonun olduğu hayvan deneylerinde homolog, heterolog ve otolog endotelial progenitör hücrelerin olduğu görüldü. Bu hücreler kemik iliği kaynaklı hücrelerdir ve neovaskülarizasyonun temelini oluşturmaktadır. Korneal-limbal kaynaklı neovaskülarizasyonda kemik iliğinden gelişen hücrelerin korneada olduğu tespit edilmiştir. Limbusta iskemiye, kornea zedelenmesine ve tümörlere bağlı neovaskülarizasyonda kemik iliğinden gelen endotelial progenitör hücreler patağonezinde yer almaktadır. Vaskülogeneziste periferik kandan, dalaktan ve kemik iliğinden gelen progenitör hücreler ile pluripotent kök hücreler yer almaktadır.

Vaskülogenez ve endotel hücre proliferasyonu yetişkinlerde durmuştur. Bunun yanında anjiogenez yetişkinlerde fizyolojik durumlarda devam edebilmektedir. Örnek vermek gerekirse; yara iyileşmesi, ovulasyon ve plesantanın olgunlaşmasıdır. Fakat bazı patolojik durumlarda da anjiogenez devam edebilmektedir. Retinopatiler, iskemi ve tümör gelişimi bunlar arasındadır (51,52).

Korneal hasar sonucu VEGF artışı meydana gelir fakat bundan sonra salgılanan anti-VEGF ile kornea vaskülarizasyonu inhibe olur (53).

Bunun yanında bu hücrelerin bağlandığı hedef dokularda Tie-2 reseptörlerinin olduğu görülmüştür. Bu; damar gelişimi ve olgunlaşması için gereklidir (54).

**ANJİOJENİK FAKTÖERLER:** Vascular endotelyal growth faktör (VEGF), fibroblast growth faktör-1,2 (FGF-1, FGF-2), and hepatosit growth faktör (HGF) (55).

Vücutta bulunan anjiojenik faktörler ve anti-anjiojenik faktörler arasında belli bir denge vardır. Anjiojenik faktörlerin artması ve/veya anti-anjiojenik faktörlerin azalması neovaskülarizasyona neden olur. Antijenik ve anti-anjiojenik faktörler tabloda verilmiştir.

<b>Anjiojenik faktörler</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Faktör (VEGF), Tümör Nekroz Faktör (TNF-<math>\alpha</math>) Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF-1), FGF-2) Hepatocyte Growth Faktör (HGF) Anjiyopoetin-1 Tgf-<math>\beta</math> Il-6 Ve Il-8 Plasental Büyüme Faktörü Transforming Büyüme Faktörü -<math>\alpha</math> Epidermal Büyüme Faktörü Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör Anjiojenin Gelişimsel Regüle Edilen Endotelyal Lokus-1(Del1) Folistatin Midkine Proliferin Leptin</i>
-----------------------------	---

<b>Anti-anjiojenik faktörler</b>	<i>Anjioyostatin</i> <i>Endostatin</i> <i>Anti-anjiojenik antitrombin-3</i> <i>Kartilaj kaynaklı inhibitör</i> <i>Fibronektin fragmanı</i> <i>Büyüme ile regüle olan onkogen</i> <i>Heparinazlar</i> <i>IL-12</i> <i>Kringle 5</i> <i>2 metoksiestradiol</i> <i>Plasental ribonukleaz inhibitörü</i> <i>Plazminojen aktivatör inhibitörü</i> <i>Trombosit faktör-4</i> <i>Retinoidler</i> <i>Tetrahidrookortizol-S</i> <i>Vaskülostatin</i> <i>Vazostatin</i> <i>Trombospondin-1 ve 2</i> <i>VEGF inhibitörü</i> <i>İnsan makrofaj metalloelastazi</i> <i>Angiyopoietin-2</i> <i>Prolaktin derivesi</i> <i>İnterferon-<math>\alpha</math> ve <math>\beta</math></i>

Tablo 2.2.3

(47,55-57).

## 2.2.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF molekülü; fibroblast, keratosit, T hücreleri, retina pigment hücreleri, perisitler ve düz kas hücrelerinden salgılanmaktadır (57).

VEGF molekülü ilk 20 yüzyıl sonlarında tümör hücrelerinde damarsal geçirgenliği arttıran faktör olarak izole edildi. VEGF molekülü hem embriyolojik vaskülogenezde hem de patolojik anjiogenezde rol oynamaktadır. VEGF molekülünün insan vücudunda 5 farklı izotipi vardır bunlar VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ' dir. Vücudun herhangi bir bölgesinde meydana gelen oksijensiz ortam hipoksi bu VEGF düzeyinin artmasına neden olmakta sonuçta anjiogenez meydana gelmektedir. VEGF-A'nın çok çeşitli farklı izoformları vardır. Gözde ise VEGF-165 ve VEGF-121 izoformları tespit edilmiştir. İkisinin farklı fonksiyonları mevcuttur. VEGF-165 patolojik damarlanmadan sorumlu ilen VEGF-121 fizyolojik göz damalarının gelişiminde görevlidir. Bunun dışında VEGF-115, 189 ve 206'da vardır (58).

VEGF molekülünün bağlandığı en çok bilinen 3 reseptörü vardır. Bunlar VEGFR-1-3'dür. VEGFR-1-2 kan damarlarında bulunurken VEGFR-3 hem kan damarlarında hem lenf damarlarında bulunmaktadır. Bu reseptörler hücrelerin göçünden sorumludur. VEGF molekülü bu reseptörlere bağlandıktan sonra anjiogenez aktive olur ve VEGF-A vasküler endotel hücrelerini etkilemekte vasküler geçirgenlik artmakta ve endotel hücreleri arasındaki bağları zayıflatmakta ve bu da endotel hücrelerinin göçünü aktive etmektedir. Fakat bunun patolojik etkisi ise artan geçirgenlik nedeniyle kan damarlarından geçen damar içindeki sıvının retinada ödem oluşturmasıdır (47,59,60,61).

VEGF ve VEGF reseptörü; embriyogenik, patolojik ve neonatal anjiogenezde rol oynamaktadır. Bunun yanında VEGF birçok alt dalı olmakla birlikte hepsinin farklı fonksiyonu bulunabilmektedir. Örneğin VEGF-120 anjiogenez başlatabilmesine rağmen bitirememektedir.

VEGFR-3 hem fetal hayatta hem de patolojik anjiogeneziste etkili iken VEGF-C erişkinde patolojik anjiogeneziste etkilidir.

Bununla birlikte VEGF salınımını arttıran ve azaltan faktörler mevcuttur. Arttıran faktörler FGF, PDGF, TNF, nitrit oksit(NO), IL-1 ve IL-6 dır. VEGF salınımı inhibe edenler ise IL-10 ve IL13 dür (62).

Proinflamatuvar sitokin diye bilinen IL-1, IL-6, IL-8, TNF alfa anjiogenezisi aktive etmektedir. Bunun mekanizması ise bu sitokinler VEGF'i aktive eder bu da neovaskülarizasyona neden olmaktadır. VEGF'in belirli görevleri bulunmaktadır. Tabiki en çok bilinen görevi anjiogenezisi uyarmasıdır. Bundan başka damarlarda geçirgenliği arttırmak ve damarda delik açılması, iskemi ve hipoksi durumlarında nöron ölümünü azaltmak ve proinflamatuvar etki gibi görevleri vardır.

VEGF molekülü; kandaki anjioblast hücreleri için kemotaktik etki yapmakta, dolayısıyla kemik iliğinden başlayıp farklılaşmasına kadar olan süreci aktive etmekte ve sonuçta anjiogenezisi arttırarak neovaskülarizasyona neden olmaktadır. Bunlar, VEGF'in direk etkileri olup indirek olarak da neovaskülarizasyona neden olmaktadır. VEGF molekülü artınca, dokuda bulunan matriks metalloproteinazları aktive etmektedir. Sonuçta bu durum damar çeperinde yıkıma neden olmakta ve endotel hücrelerinin göçü ile anjiogenezis aktive olmaktadır. Bundan başka, diğer bir indirek etki de nitrik oksit sentataz enzimini attırmakta bu da endotel hücrelerinin çoğalmasına neden olmaktadır.

VEGF ile yapılmış çeşitli çalışmalarda; VEGF kornea, iris, retina ve koroid neovaskülarizasyonunda etkili olduğu görülmüştür. Yaş tip yasa bağlı maküla dejenerasyonu, koroid neovaskülarizasyonunda VEGF-A düzeylerinin artmış olduğu görüldü. Bundan başka retinal ven dal tıkanıklığı, iris neovaskülarizasyonu, retina dekolmanı ve prematür retinapatisi gibi hastalıklarda VEGF-A düzeyinin artmış olduğu tespit edildi. Korneadaki durum biraz farklıdır. Kornea tabakalarından epitel, stroma ve endotel tarafından VEGF salınmaktadır. Ayrıca limbustaki damarlardan, stromada oluşan damarlardan ve bir miktarda keratositlerden VEGF salınmaktadır.

Korneada herhangi bir şekilde gelişen skar veya inflamasyon sonucunda da makrofaj gibi hücrelerden VEGF salınmakta ve dolayısıyla neovaskülarizasyon meydana gelmektedir. Bu oluşan yeni damarlardan VEGF-1 ve VEGF-2 reseptörleri aktive olmaktadır.

Bununla birlikte VEGF damar duvarının parçalanması, endotel hücrelerinin göçü ve proliferasyonu, yeni kapiller oluşumu gibi anjiogenezis temel basamaklarını aktive etmektedir. Ek olarak bir endotel hücresi 100 adet tümör hücresini inhibe edebilir (47,63,64).

### **2.2.5 Tümör nekroz faktör(TNF- $\alpha$ )**

Mast hücreleri ve natürel kiler hücreleri tarafından salınan TNF- $\alpha$  bir proinflamatuvar sitokindir. Salgılandıktan sonra mononükleer hücreleri aktive etmektedir. Böylece daha fazla TNF- $\alpha$  salgılanmasına neden olacak ve inflamasyon aktivasyonu artacak. TNF- $\alpha$ ; IL-1, IL-6, IL-8 ile benzer etkili proinflamatuvar bir sitokindir. Yani tüm bu etkileri ile immün sistemin önemli bir düzenleyicisidir. Bunun yanında kuru göz ve kornea greft reddi gibi inflamatuvar durumlarda TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinler artar. Tüm bunların yanında anjiogenezis aktive ederek kornea neovaskülarizasyonu indüklemektedir (36,65).

### **2.2.6 Fibroblast growth faktör( FGF)**

Fibroblast growth faktör; mezodermal ve nöroektodermal kökenli hücrelerin farklılaşmasında görevli olan ve karaciğer kaynaklı bir proteindir. FGF'nin fizyolojik ve patolojik anjiogenezisi aktive ettiği en önemli rolleri arasındadır. Bunun yanında kan damarlarındaki endotel hücrelerinin çoğalmasında da FGF'nin rolü vardır. Fibroblast büyüme faktörünün bilinen 4 farklı reseptörü vardır. Korneada bulunan reseptörü FGF reseptör-1'dir. Bunun yanında FGF korneanın Bowman ve Descement membranına bağlanmaktadır (66- 69).

### **2.2.7 Anjiostatin**

Anjiostatin plazminojenin parçalanması sonucu oluşan ve ATP sentetaz aracılığıyla endotel hücrelerinin çoğalmasını sağlayan bir moleküldür.

Anjiostatin, interferon- $\alpha$ , vasküler endotelyal büyüme inhibitörü, reaktif oksijen molekülleri, endotel apoptozisini arttırmaktadır. Benzer şekilde lümen çapı ise anjiostatin ve VEGF ile artmaktadır. Anjiostatin, antitrombosit-3, interferon- $\beta$  ve trombosit faktör anjiogenezisi inhibe eder (15, 70).

### **2.2.8 Endostatin**

Endostatin tip-8 kollajenin yani heparan sülfatın yıkılması sonucu oluşan bir moleküldür. Endostatin ise anjiogenezi inhibe etmesi plazmin düzeyini arttırarak olmaktadır. Endostatin de antitrombosit 3, interferon- $\beta$  ve trombosit faktör gibi anjiogenezisi inhibe eder. Endostatin; kornea, lens kapsülü ve retinada bulunmaktadır (15,71).

### **2.2.9. KNV'de Tedavi**

Kornea neovaskülarizasyonu, limbusdaki damarsal yapıların kornea tabakaları arasına yürümesi ve yeni damarların oluşması sonucu meydana gelir. Korneanın çeşitli tabakalarında vaskülarizasyon gelişmesi çeşitli klinik durumların oluşmasına yol açmaktadır. Neovaskülarizasyon gelişmiş bir korneada kan damarları yok olmaz sadece gerileyerek hayalet damarlara dönüşür. Dolayısıyla görmenin korunması için neovaskülarizasyon gelişimi ve ilerlemesi önlenmelidir. Bunun için medikal ve cerrahi tedavi olarak iki seçeneğimiz mevcuttur.

KNV'de hayvan deneylerinde kullanılan medikal tedaviler; steroidler, non-steroid antiinflamatuvar tedaviler, siklosporin-A, metotreksat, talidomid, prolaktin, trombosit aktive edici faktör, araşidonik asit inhibitörleri, curcumin iken cerrahi tedaviler; elektrokoagülasyon, fotodinamik tedavi, limbal transplantasyon, amniyon membran transplantasyonu ve konjonktiva transplantasyonudur (33,34,36,72).

### 2.2.9.1. Medikal Tedavi

Kornea neovaskülarizasyonu uzun yıllardır çeşitli tedaviler denenmiş bir hastalıktır. Daha önceki yıllarda araşidonik asit inhibitörleri; kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde kullanılıyordu.

Korneada neovaskülarizasyonu ve korneada yara iyileşmesi sırasında prostaglandinler üretilmektedir. Dolayısıyla bu yolağın inhibe edilmesi araşidonik asit oluşumunu engelleyecek dolayısıyla kornea neovaskülarizasyonu engellenmiş olacak (75).

Bunun yanında benzer etki ile non-steroid antiinflamatuvar ilaçlarda (NSAİİ) kullanılmaktadır. NSAİİ hem COX-1 hem de COX-2 yolağını inhibe etmektedir. Dolayısıyla anjiogenezis inhibe olmaktadır. Sadece COX-1 sadece COX-2 veya her ikisini de inhibe eden ilaçlar mevcuttur. Fakat bunların hepsi tamamen neovaskülarizasyonu engellememekte kısmi etki göstermektedir (76,77).

Kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde vazgeçilmez tedavilerden birisi de topikal steroidlerdir. Steroidlerin hem anti-inflamatuvar hem de anti-anjiogenik etkileri mevcuttur. Bu sayede hem inflamatuvar sitokinler inhibe olur hem de anti-inflamatuvar etki ile inflamatuvar hücrelerin çoğalması ve olay yerine gelmesi inhibe olmaktadır. Bunun yanında steroid kullanımına bağlı özellikle yüksek intraoküler basınç ve arka subkapsuler katarakt gelişebilmektedir (33,72).

Diğer bir medikal tedavi yöntemi de siklosporin-A'dir. Siklosporin-A, CD-8 T lenfositlerin ve natural killer (NK) hücrelerin fonksiyonunu bozmadan sadece CD4+ T hücrelerini engelleyen, yarılanma ömrü ortalama 6 saat kadar olan ve karaciğerde metabolize olup safra ile atılan, 11 aminoasitlik bir moleküldür. Bu molekül özellikle IL-2, IL-3 ve IL-4 reseptörünü inhibe eder. Sonuçta B lenfositlerin ve T lenfositlerin çalışmasını bozarak antikor oluşumunu azaltır. İmmün sistemin baskılanmasına neden olur. Siklosporin-A; VEGF'ün çalışmasını inhibe ettiği için anjiogenezis inhibe etmekte ve neovaskülarizasyonu azaltmaktadır (75,78- 82).



Ayrıca sesamol, curcumin, plazminojen fragmanları, spironolakton, talidomid'in kornea neovaskularizasyonda damarsal gerilemeye neden olduğu birçok hayvan deneyinde gösterilmiştir.

Ek olarak, medikal tedavinin kornea neovaskularizasyonunda ki etkisi cerrahi tedaviye gidişatı azaltmak veya cerrahi tedavinin başarısını artırmaktır (74,83-89).

#### **2.2.8.2 Cerrahi Tedavi**

Cerrahi tedavi yöntemlerinden birisi lazer fotokoagülasyondur. Hem hayvan üzerinde yapılan deneylerde hem de keratoplasti öncesi ve sonrasında insan çalışmalarında olumlu etkileri görülmüştür. Fakat günümüzde etkinlik ve güvenilirlik açısından tercih edilmemektedir.

Diğer bir tedavi yöntemi ise fotodinamik tedavidir. Bu tedavide intravenöz verilen verteporfirin maddesi ışıkla aktive olmaktadır ve neovasküler dokulara etki ederek anjiogenezisi inhibe etmektedir. Bu tedavinin en büyük üstünlüğü sağlıklı dokuların korunmasıdır. Fakat yapılmış hayvan deneylerinde olumlu sonuçlar olsa da sonuçları tam kestirilememektedir (90,91).

Bunlardan başka, amniyotik membran transplantasyonu ve oto ve/veya allogreft konjonktiva transplantasyonu da KNV'de etkili olduğu görülmüştür. Bu etkiyi hem anjiogenezisi engelleyerek hem de endotel hücrelerini inhibe ederek göstermektedirler (92-94).

#### **2.2.10. Anti-VEGF Tedaviler**

VEGF, korneanın stroma, epitel ve endotel tabakalarından salgılanır. Limbusdaki damarlardan ve stromada yeni oluşan damarlardan VEGF salınır. Oluşan VEGF molekülünün korneada neovaskularizasyonu için yeterli olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla anti-VEGF molekülleri neovaskularizasyonu inhibe etmektedir.

Bevasizumab, VEGF'nin tüm izoformlarını tanıyan ve insanlaştırılmış monoklonal antikordur. Bevasizumab ilk olarak ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından metastatik kolon kanserinin tedavisi için onaylanmış anti-anjiyogenik bir ilaçtır (95).

Bunun yanında göz hastalıklarında da faydası görülmüş ve kullanılmaya başlanmıştır (96). Ayrıca yapılan çeşitli hayvan deneylerinde göze uygulanan bevacizumabın kornea neovaskülarizasyonunu azalttığı görülmüştür (97).

Bevasizumab sadece VEGF-A'ya karşı bir antikor olup diyabetik retinopatide görülen retina neovaskülarizasyonunda tedavisinde, santral retinal ven tıkanıklığına bağlı maküla ödemi tedavisinde ve glokoma bağlı neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılabilir (98).

İlk olarak bevacizumab hayvan deneylerinde topikal olarak kullanılmış ve korneadan geçtiği fakat bu geçişin yeterli olmadığı görülmüştür. Subkonjonktival uygulanan tedavi ile kornea neovaskülarizasyonunda da gerileme olduğu tespit edilmiştir.

Topikal kullanımın sonucunda neovaskülarizasyonda azalma olduğu fakat yeterli oranda ve tüm VEGF'lere bağlanmadığı için neovaskülarizasyonu tamamen kaybetmediği görülmüştür. Erken yapılan subkonjonktival bevacizumabın kornea neovaskülarizasyonunu engellediği, geç yapıldığında ise neovaskülarizasyonu azalttığı fakat tamamen kaybolmadığı görülmüştür. Kornea transplantasyonu sonucu greft reddini engellemek için topikal veya subkonjonktival bevacizumab uygulamasının neovaskülarizasyonu azalttığı bildirilmiştir. .

Herpetik keratite bağlı anjiojenik veya anti-anjiojenik faktörlerin dengesinde bozulma sonucu KNV gelişmektedir. Buna bağlı bevacizumab uygulaması ardından neovaskülarizasyonun kaybolduğu görülmüştür. Kimyasal yanıklara bağlı korneada oluşan skar ve inflamasyon sonucu neovaskülarizasyon gelişmektedir. Bu tür KNV'lerde de uygulanan bevacizumabın etkili olduğu görülmüştür.

Bevacizumabın bundan başka intrakamaral ve intravitreal uygulamasının da kornea neovaskülarizasyonunu engellediği görülmüştür (99).

Bevacizumab'ın topikal, subkonjonktival, intravitreal uygulamalarının sistemik yan etkileri görülmüştür. Daha önceleri sistemik uygulanan bevacizumab myokard infarktüsü, serebrovasküler hastalık gibi

komplikasyonlara neden olabilmekteydi fakat sonraki oküler uygulamalar ile bu durum azaldı. Bunun yanında bevacizumabın sistemik dolaşıma geçmesi nedeniyle diğer gözde de etkilerinin olabildiği ile ilgili çalışmalar mevcuttur (100,101).

Bevacizumabın oküler yan etkilerinin çeşitliliği fazladır. Subkonjonktival hemorajiden, vitreus hemorajisine kadar gidebilen lens hasarı, ani görme kaybı, korneal abrazyon ve keratit hatta endoftamliye kadar uzanabilen çeşitliliktedir. Fakat kullanım alanı da çok geniş olduğu için ve komplikasyonlar sık görülemediği için bevacizumab sık kullanılan bir ilaçtır(102,103).

Bevacizumabın anti-anjiyoenik etkisi sayesinde diyabetik retinopatili hastalarda vitrektomi öncesi veya sonrasında bevacizumab enjeksiyonu yapılması kanama riski azaltarak görme sonucunu arttırmaktadır (104).

Bevacizumabın şu an itibariyle göz hastalıklarında kullanım izni yoktur. Fakat diyabetik retinopati, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, prematür retinopatisi, neovasküler glokom ve kornea neovaskülerizasyonunda kullanılabilir (105).

Ayrıca retinal damarlarda meydana gelen okluzyona bağlı maküla ödemi tedavisinde kullanılabilir (106).

Kornea neovaskülerizasyonunda da yine topikal, subkonjonktival ve intravitreal yolla yapılan bevacizumabın neovaskülerizasyonu engellediği görülmüştür (107).

Neovasküler glokom ve prematür retinopatisinde de anti-anjiyoenik etkileri sayesinde neovaskülerizasyonun tedavisinde kullanılmaktadır (108).

Ranibizumab, bevacizumaba göre VEGF-A'ya daha yüksek afinite ile bağlanır (109).

Ranibizumab rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiştir ve bütün VEGF izoformlarını inhibe eder. Ranibizumab humanize edilmiş bir fare antikordur (110).

Ranibizumab VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanır. Bunun yanında sadece göz hastalıkları için spesifik olarak oluşturulmuş bir antikor parçasıdır. Bu parçacık tam antikordan Fc parçasının çıkarılması ile oluşur. Bu parça

sayesinde hem retinanın tüm katmanlarına geçebilmekte, hem hücreye bağlı sitotoksosite riski azalmakta hemde sistemik dolaşıma geçtiğinde yarılanma ömrü kısalmakta ve yıkılımı kolaylaşmaktadır.

Ranibizumabın anti-anjiojenik özelliğini oluşturan temel mekanizmalardan biri de endotel proliferasyonunu engellemesidir. Bunu da VEGF-A165, VEGF-A 121'e bağlanarak endotel çoğalmasını inhibe ederek yapmaktadır. Bunun yanında VEGF'in neden olduğu damar geçirgenliği artışına inhibe etmektedir (111).

Diğer bir molekül de aflibercept'tir. Ranibizumab gibi VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanmaktadır. VEGFR-1 ile VEGFR-2'nin Fc parçasının birleştirilmesi sonucu oluşan bir moleküldür (5,112).

Aflibercept 115 kDA ağırlığında rekombinant bir füzyon proteini olup VEGF dimerlerini kapan gibi yakalar ve VEGF reseptöre ulaşmadan etkisi inhibe edilmiş olur. Ayrıca plesantal growth faktöründe reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek anjiojenik etkiyi engellemiş olur. Afliberceptin bazı görülen yan etkileri ise subkonjoktival hemoraji, hiperemi, ağrı, göz içi basıncının artması olup sistemik yan etkileri ise bülantı, hipertansiyon ve kalp yetmezliğidir (113,114).

Afliberceptin kolon kanserleri için üretilmiş formunun yanında oküler formu da vardır.

Aflibercept daha uzun etki süresi sayesinde hem bevacizumab hemde ranibizumaba göre daha potent olduğu için tercih edilen bir molekül olduğu bulunmuştur (5,115).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyssel hayvan çalışmamız Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları ve Biyoistatistik Anabilim Dalları ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı katkılarıyla yapıldı. Çalışmamızda 24 adet 250-300 gr ağırlığındaki Wistar-Albino türü erkek ratlar kullanıldı. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Arastırma Merkezi tarafından temin edilen hayvanlar üzerinde gerçekleştirildi. Oluşturulan tüm gruplar ideal sıcaklık ve nem ortamında, ayrı kafesler içerisinde tutuldu. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu'nun 10.06.2016 tarihli 2016/ 49 sayılı numaralı izni ile gerçekleştirildi.

Çalışmadaki 24 rat her grupta 6 rat olacak şekilde 4 farklı gruba ayrıldı. Her grup aynı şartlar altında aynı miktarda besin ile, aynı ortam ısı ve ışığı altında takip edildi. Çalışma sırasında 2 adet rat çalışmayı bitiremedi. Ayrıca 2 adet ratın korneal yanık oluşturulduktan sonra gözü perfore olduğu için toplam 4 rat çalışma dışında tutuldu. Her gruptaki ratlar 1'den 5'e kadar kulak numarasıyla numaralandırıldı.

Gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

- 1.grup (kontrol grubu)
- 2.grup (bevacizumab grubu)
- 3.grup (ranibizumab grubu)
- 4.grup (aflibercept grubu)

Seçilen ratlar oftalmolojik muayeneden geçirildi. Sağlam ve sağlıklı olan ratlara ketamin+ xylasin verilerek genel anestezisi sağlandı. Daha sonra irritasyonu engellemek için Alcain® (propakain, Alcon) damla damlatıldı. Ameliyat mikroskobu altında gerekli anestezi ve analjezi sağlandıktan sonra sağ göz kornea santraline gümüş nitrat emdirilmiş 2 mm çapında daire şeklinde kesilmiş filtre kağıdı ile kimyasal yanık oluşturuldu. Yanık için 10 saniye bekletildi.

Yanık oluştuğu görüldükten sonra göz etrafından kalabilecek kimyasal partiküllerin ortamdaki uzaklaştırılması için konjonktiva ve kornea 15 ml % 0.9

sodyum klorür izotonik ile yıkanarak temizlendi . Yanık sonrası ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Korneal yanığın oluşturulduğu gün 1. gün olarak kabul edildi.

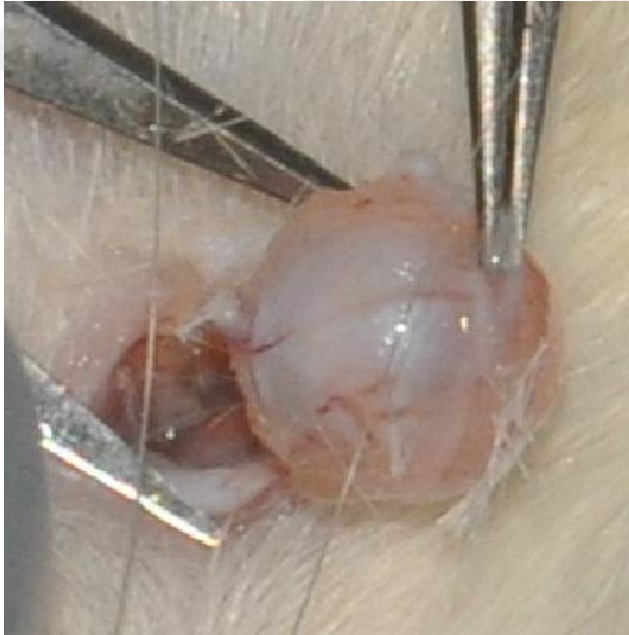
Her gruptaki ratlar neovaskülarizasyon oluşması için 10 gün takip edildi. Bu sırada ratların düzenli aralıklarla oftalmolojik muayeneleri ve kilo takipleri yapıldı. Tüm ratlarda 10 gün sonra kornea neovaskülarizasyonu olduğu görüldü. Tüm ratlara yeniden genel ve topikal anestezi uygulandıktan sonra 1. gruba ( kontrol) subkonjonktival salin solüsyonu verildi. İkinci gruptaki ratlara subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonu 0,05 ml (25 mg/ml), (Altuzan® flakon 100 mg/4 ml konsantre infüzyon çözeltisi, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, İsviçre lisansı ile Genentech Inc., Güney SanFransisko, ABD) enjekte edildi. Üçüncü gruptaki ratlara subkonjonktival ranibizumab enjeksiyonu 0,05 ml 10 mg/mL ( Ranibizumab, (Lucentis® ,Novartis Sağlık, Gıda ve Tarım Ürünleri San. Tic. A.Ş., her Flakon 0,23 ml'si 2,3 mg ranibizumab içerir) enjekte edildi. Son gruptaki ratlara subkonjonktival aflibercept enjeksiyonu 0,05 ml 25 mg/mL aflibercept (Eylea®) (Bayer Türk Kimya San. Tic. Ltd. Şti.) (Her bir flakon, 2 mg aflibersept içeren 50 mikrolitre) enjekte edildi. Subkonjonktival uygulamalar deneyde bir defaya mahsus uygulandı.

Subkonjonktival enjeksiyonlar 30 gauge enjektör ile mikroskop altında limbusun 2 mm gerisinden süperior bülber konjonktiva altına yapıldı. (Şekil3.1)

Yirmibirinci günün sonunda ratların sağ gözleri enükleasyon yapıldı. (Resim 3.2) Cerrahi olarak alınan tüm göz küreleri %10'luk formaldehite koyuldu. Ratların kanları da alındıktan sonra intraperitoneal Xylazine verilerek solunum arresti ile sakrifiye edildi.



Şekil 3.1 Subkonjonktival enjeksiyonun yapılışı



Resim 3.2 Gözlerin enükle edilmesi

### 3.1 ANESTEZİ OLUŞUMU

Ratlara hem genel anestezi hem de topikal anestezi uygulandı. Genel anestezi ve analjezi için intramusküler 50 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun®, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. Topikal anestezi için rat kornealarına birkaç damla % 0.5'lik proparakain hidroklorid(Alcain®, Alcon, Fort Worth, Texas, ABD ) damla damlatıldı.

### 3.2 KORNEADA OLUŞAN YANIK VE NEOVASKÜLARİZASYON ALANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bütün ratların 3. ve 10. günlerde mikroskopik muayenesi yukarıda tanımlanan anestezi işlemi sonrasında yapıldı.

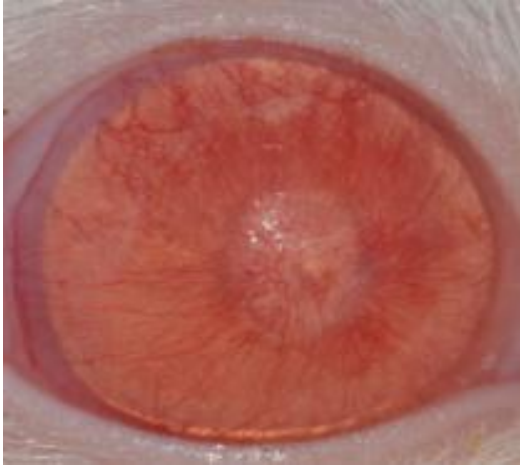
Onuncu günde Nikon dijital fotoğraf makinesi ile x25 büyütmede kornea fotoğrafları çekildi. Onuncu günde bütün ratların korneal yanık evrelemesi benzer çalışmalara göre yapıldı (116).

Evre 0: Korneal yüzeyden kabarıklık oluşumu yok

Evre 1: Yüzeyden hafif kabarıklık, küçük bül oluşumu

Evre 2: Yüzeyden orta derece kabarıklık, orta büyüklükte bül oluşumu

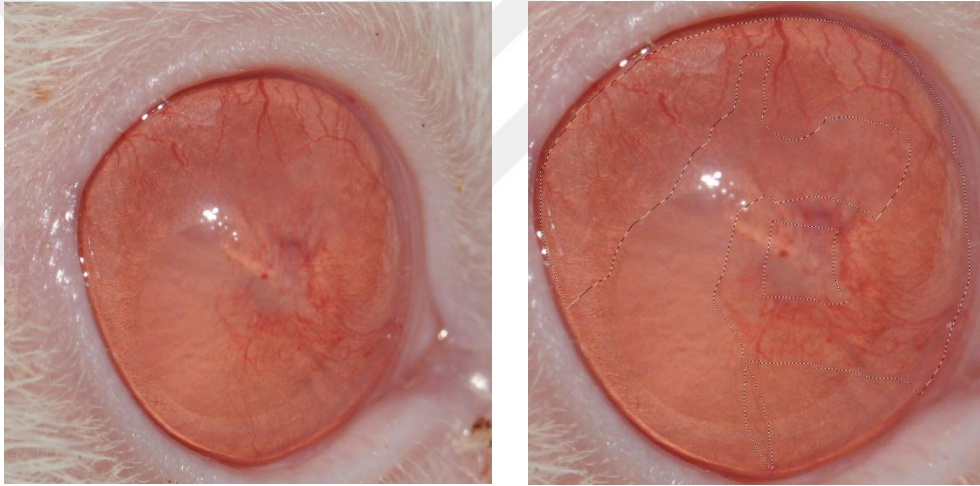
Evre 3: Büyük bül oluşumu



**Resim 3.2.1** Korneal yanık sonucu neovaskülarizasyon



Kornea yanık evrelemesinde evre 2 ve üzeri olanlar çalışmaya dahil edildi. Fotoğraflar değerlendirildi ve damarlarla kaplı kornea alanının tüm kornea alanına oranı hesaplandı. Bu hesaplamalar 'Pixcavator Image Analyzer Intelligent Perception, WV, USA' ve 'Adobe Photoshop Adobe Systems complex, San Jose, California, U.S.' programı kullanılarak yapıldı. İki programda çıkan yüzdelerin ortalaması alınarak kornea neovaskülarizasyonlu alanın tüm alana oranı piksel cinsinden tespit edildi. Neovaskularizasyonun olduğu alan piksel birimiyle hesaplandı, tüm alan oranı ise yüzde (%) olarak hesaplandı. Fotoğraflar tek kişi tarafından ve hangi ratın hangi grupta oluşunu bilinmeden çekildi. Korneal yanık evrelemesi ve neovaskularizasyon yüzdesi hesaplandıktan sonra bütün ratlar 21. günde sakrifiye edildi.



### 3.2.2. Digital fotoğraf makinesiyle digital inceleme

Neovaskülarizasyon oluşan korneaların üzerinde oluşan ana damar sayıları Nikon dijital fotoğraf makinesi ile x25 ile çekildikten sonra sayıldı. Yirmibirinci günde fotoğraları çekilerek ana damar sayıları incelendi. Ana damar sayılarının gruplar arasındaki farkının anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak incelendi.

### 3.3.Histopatolojik inceleme

Enükle göz materyallerinin histolojik analizleri için %10'luk tamponlu formole alındı. Dokular 48 saat bu solüsyonda tespit edildikten sonra;

- Çeşme suyunda yıkama (12 saat)
- %70'lik alkol (1 saat)
- %80'lik alkol (1 saat)
- %96'lık alkol (1 saat)
- Absol alkol I (1 saat)
- Absol alkol II (1 saat)
- Ksilol I (1 saat)
- Ksilol II (1 saat)
- %50 Ksilol + %50 Parafin (15 dakika)
- Vakumlu etüvde 58-60 derecedeki sıvı parafin içerisinde 8 saat bekletildikten sonra bloklandı. Hazırlanan bu bloklardan lizinli lamlara 5-6 µm kalınlığında 4'er adet kesit alındı. Kesitlerden biri hematoksilen eozinle boyandı. Diğer 3 kesite manuel immunohistokimya yöntemi ile **CD31, VEGF ve TUNNEL** uygulandı. Lamlar entellan yardımıyla lamelle kaplanıp ışık mikroskobu altında çift kör olarak değerlendirildi.
- Histopatolojik incelemelerde Olympos marka mikroskop kullanıldı.

#### Hematoksilen eozin kesitlerinde;

**1-Neovaskülarize damar sayısı** 3 adet X40 büyütme alanında CD31 yardımı ile adet olarak sayıldı (**Resim3.3.1**).

**2. İmmunhistokimyasal VEGF** boyası boyanma yoğunluğuna göre değerlendirildi (**Resim 3.3.2**).

0: boyanma yok

1: hafif yoğunlukta

2: orta yoğunlukta

3: şiddetli yoğunlukta

**3-TUNNEL boyamasında** boyanan hücrelerin 3 adet X40 büyütme alanındaki sayısı verildi. Sonuçlar tablo haline getirilip istatistiksel olarak değerlendirildi (**Resim 3.3.3**).

**4-Korneal stromal ödem** uluslararası skorlama kriterlerine göre 0-3 arası yoğunluğa göre skorlandı (117,118), (**Resim3.3.4**).

0: ödem yok

1: hafif ödem

2: orta ödem

3: şiddetli ödem

**5-Etkilenme alanında iltihap hücre çeşidi ve yüzde olarak yoğunlukları** belirlendi (**Resim3.3.5**).

**6-Etkilenme alanında kornea stromasında stromal fuziform hücre selularitesi** uluslararası skorlama kriterlerine göre 0-3 arası yoğunluğa göre skorlandı (127,128), (**Resim 3.3.6**).

0: normal

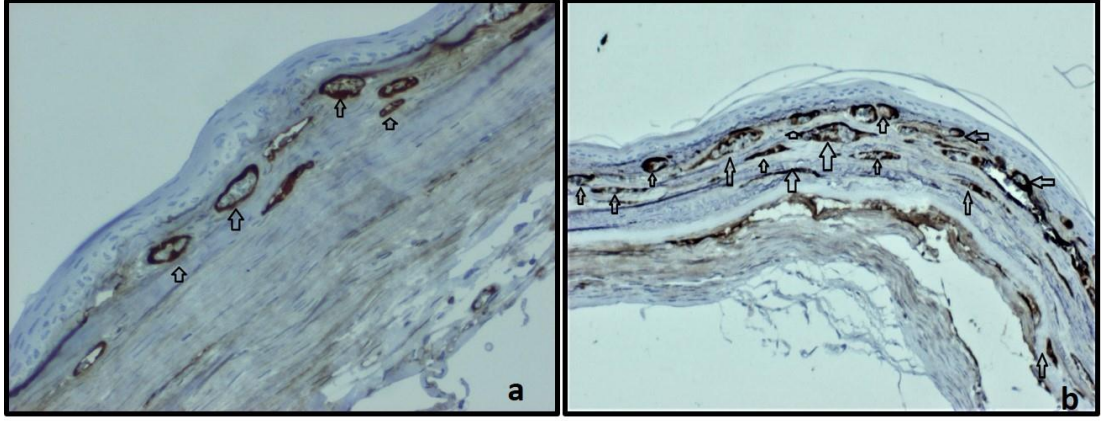
1: hafif selularite artışı

2: orta selularite artışı

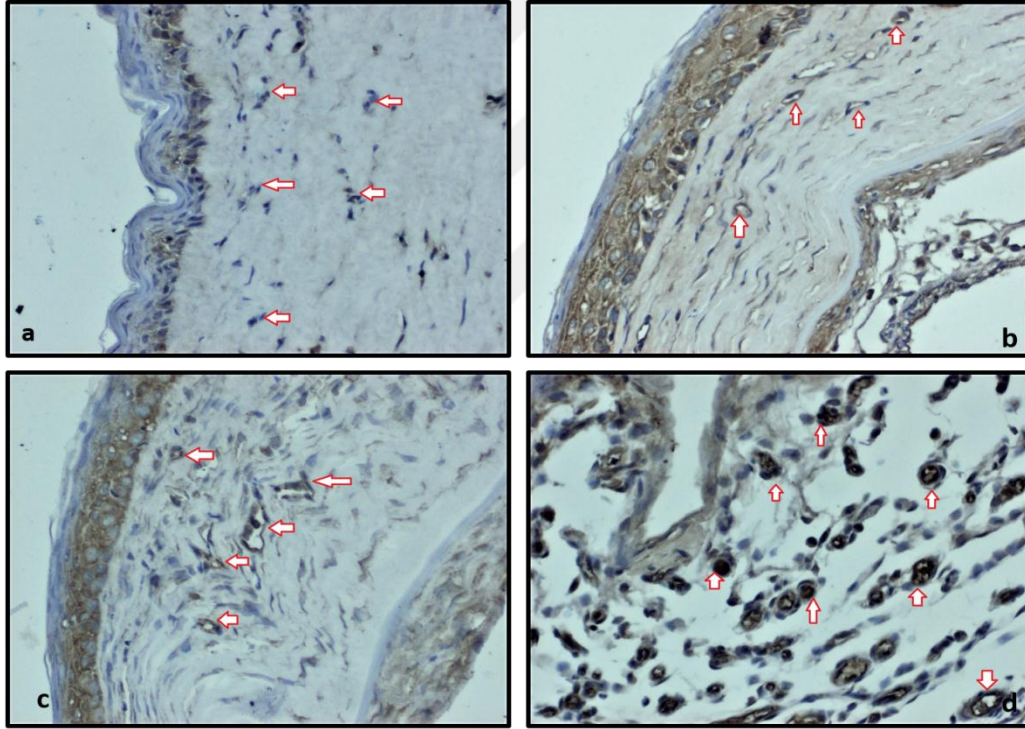
3: şiddetli selularite artışı

**7-Etkilenme alanında iltihap hücre sayısı** 1 adet x40 büyütme alanında sayıldı adet olarak verildi.

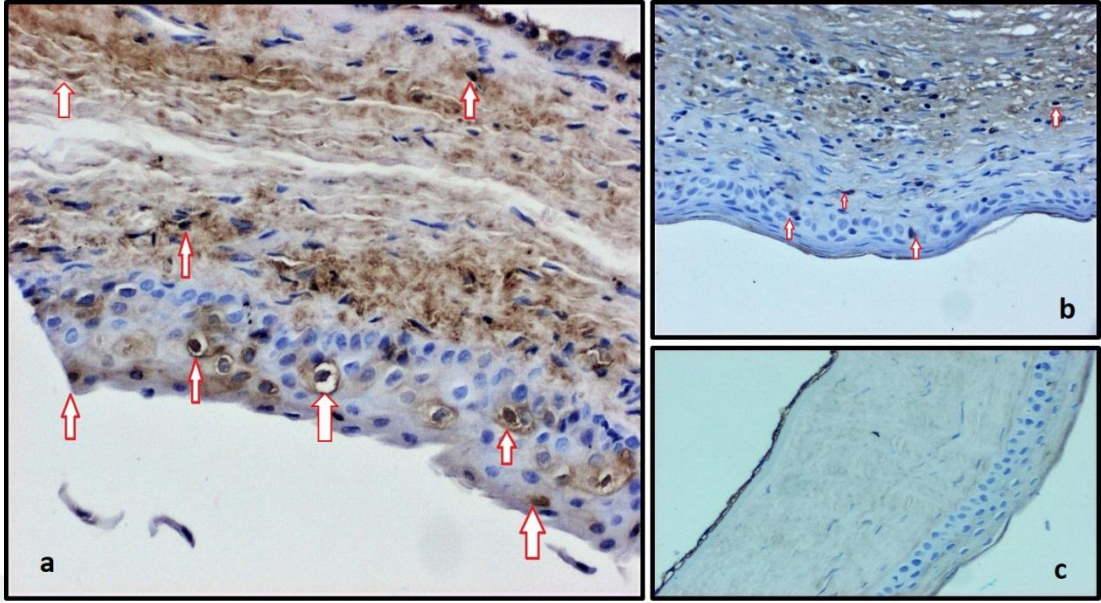
**8-Etkilenen kornea yüzey alanının** (damar ödem ve selülaritenin arttığı alan) tüm korneal alana oranı yüzde olarak verildi.



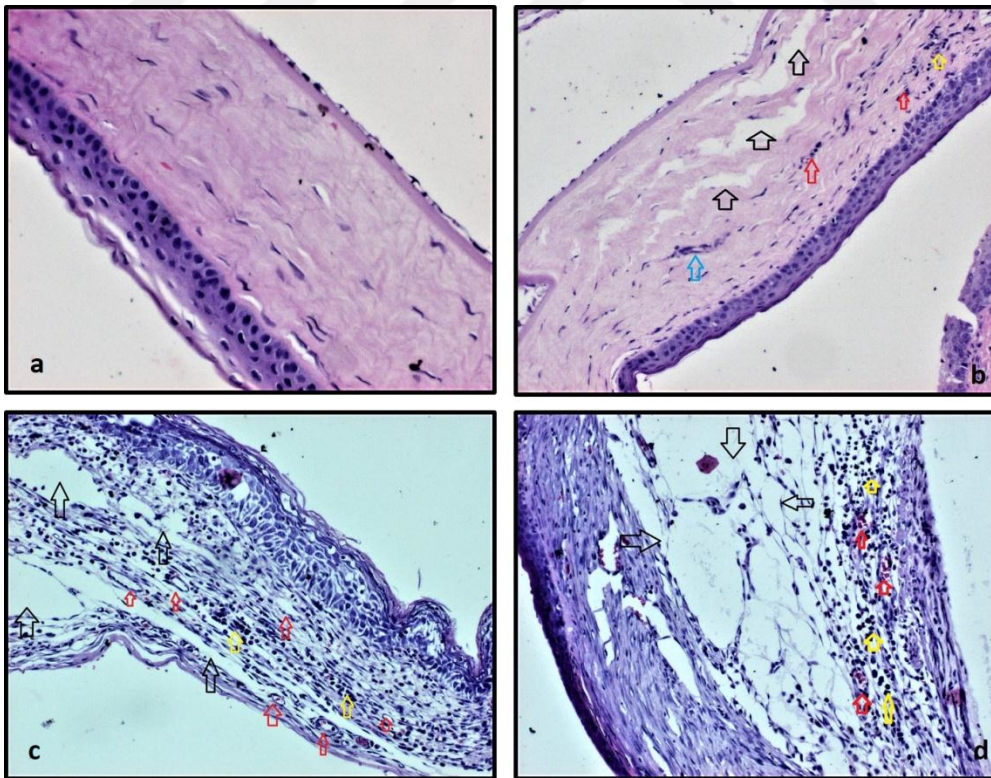
**Resim3.3.1:** CD31 a)X200, b)X100; CD31 ile stoplazmik pozitiflik gösteren, kornea stromasında gözlenen neovaskularize damarlar



**Resim 3.3.2:** VEGF, X200; Damarlarda VEGF pozitifliği: **a)** negatif-skor 0, **b)** hafif pozitif-skor1, **c)** orta derecede pozitif-skor2, **d)** şiddetli pozitiflik-skor3

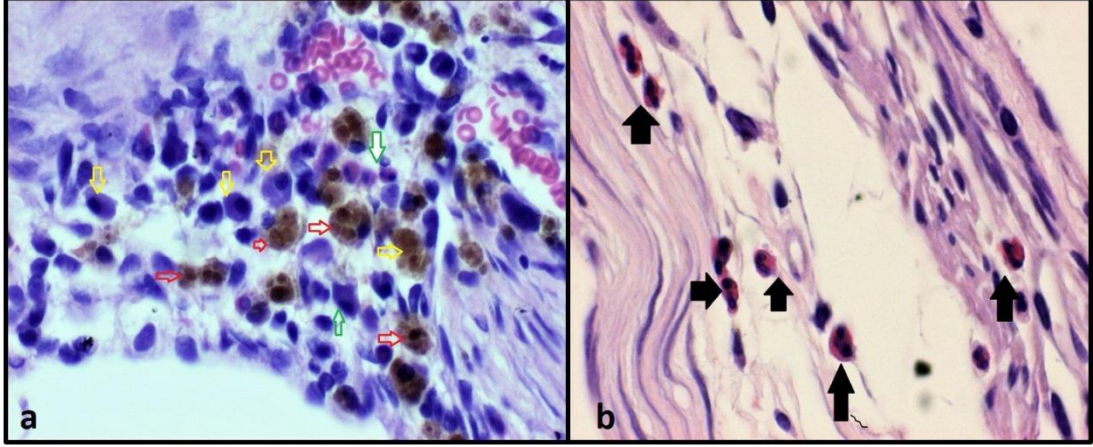


**Resim 3.3.3:** TUNNEL a) X200, epitel ve stromada 7-8 adet nükleer TUNNEL pozitif hücre, b) X200, epitel ve stromada 3-4 adet nükleer TUNNEL pozitif hücre, c) X100; TUNNEL negatif

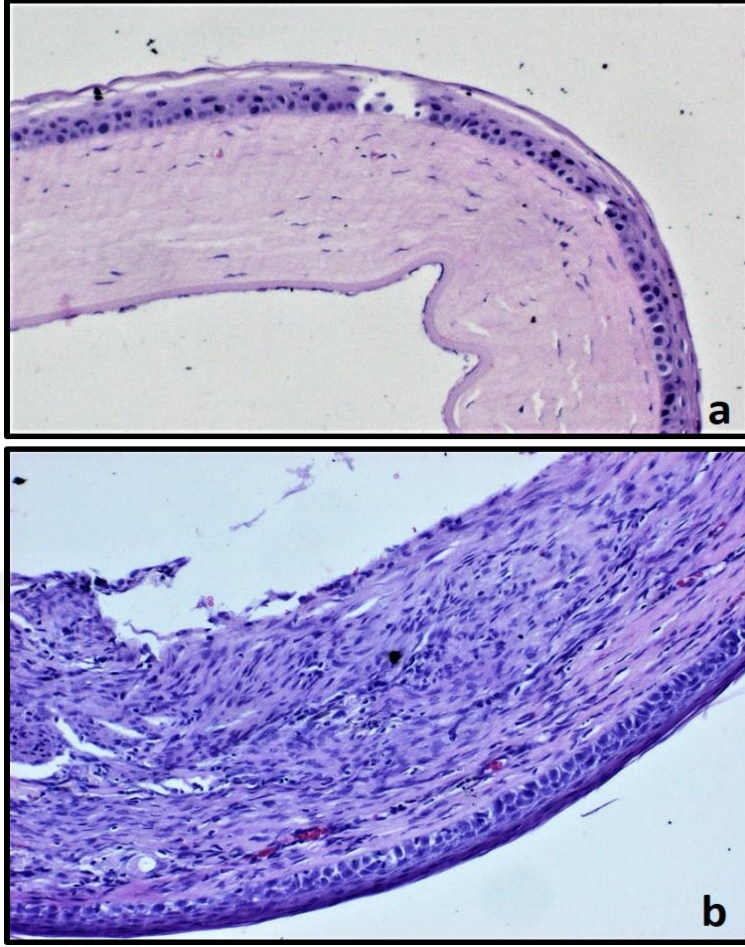


**Resim3.3.4:** H&E, X100 a) Korneal ödem ,iltihap, damar yok, b) hafif ödem (siyah ok), az sayıda damar (kırmızı ok) ve seyrek iltihap hücreleri (sarı ok), c) orta şiddette

ödem(siyah ok), damarlar (kırmızı ok) ve sayıca artmış iltihap hücreleri (sarı ok), **d** şiddetli ödem (siyah ok), damarlar (kırmızı ok) ve sayıca artmış iltihap hücreleri (sarı ok).



**Resim3.3.5:** H&E **a)** X400, iltihap hücreleri makrofajlar (kırmızı), plazmositler (sarı), eozinofiller (yeşil), **b)** X600, Eozinofiller



**Resim 3.3.6:** H&E, X100; Kornea stromasında keratosit selularitesi **a)** selülarite yok, **b)** belirgin selularite

### **3.4 İstatiksel analiz**

Elde edilen veriler bilgisayar ortamında SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicađo, Illinois, USA) istatistik programı ile değerlendirilmiştir. Araştırmanın tüm verileri için öncelikle tanımlayıcı istatistikler uygulanmıştır. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve farklı gruplar Dunn testi ile belirlendi. Elde edilen 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

## 4.BÜLGULAR

### 4.1.Kornea Yanık Derecelerinin Karşılaştırılması

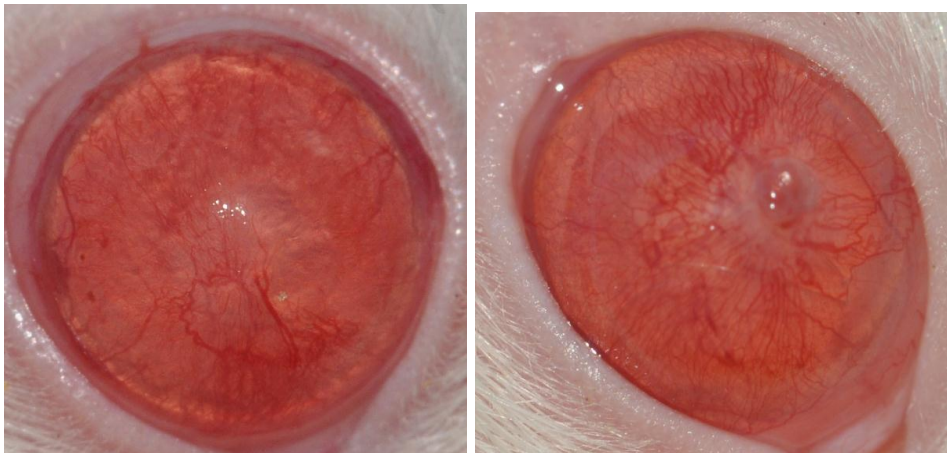
Kornealarda oluşan yanık dereceleri tüm gruplarda Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildi (116). Elde edilen veriler tüm gruplar için aşağıdaki gibidir (Tablo 4.1.)

Grup- Rat No	1	2	3	4	5
Kontrol grubu	2	3	2	3	3
Subkonjonktival Bevacizumab	3	2	2	2	3
Subkonjonktival Ranibizumab	3	3	3	2	2
Subkonjonktival Aflibercept	2	2	3	2	3

Tablo 4.1 Korneal yanıkların gruplara göre derecelenmesi

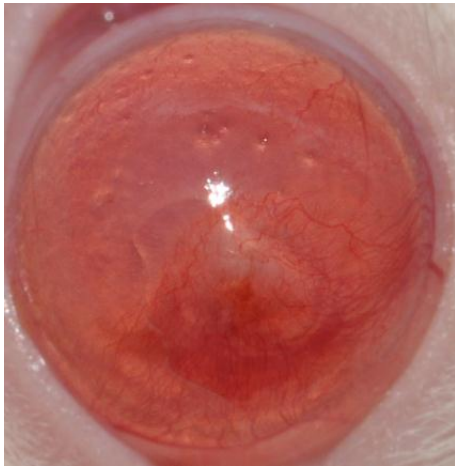
### 4.2. Biyomikroskopik Bulgular

Bütün ratların oftalmolojik muayeneleri yapıldı ve tüm korneal yanıkların Evre 2 ve Evre 3 olduğu gözlemlendi ve ratların tümü değerlendirilmeye alındı.

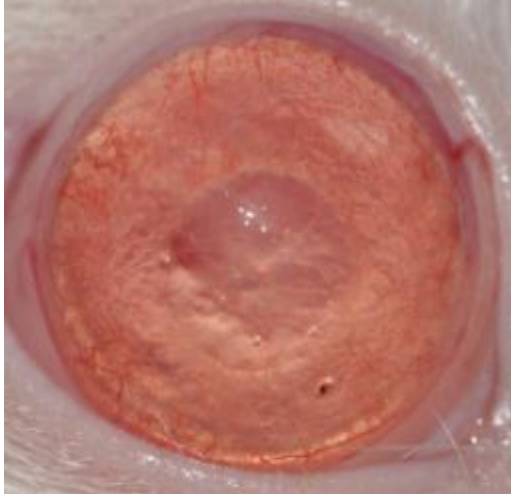


Resim 4.2.1-1 Kontrol grubu

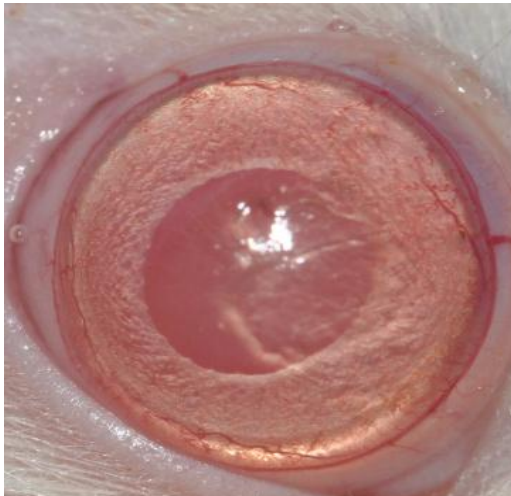




**Resim 4.2.1-2 Bevacizumab grubu**



**Resim 4.2.1-3 Ranibizumab grubu**



**Resim 4.2.1-4 Aflibercept grubu**

### 4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde edilen bulgular Tablo 4.3' de topluca verildi.

Ölçülen Özellikler	Grup	N	Mean	SD	Median	Mean Rank	P
DAMAR SAYISI Adet/4hpf)	Bevacizumab	5	19,20	11,03	20,0	8,10	0.339
	Ranibizumab	5	27,40	12,80	25,0	13,10	
	Aflibercept	5	19,60	3,91	20,0	8,10	
	Kontrol	5	25,40	13,50	25,0	12,70	
Vegf %	Bevacizumab	5	62,00 <sup>a</sup>	13,04	60,0	11,00 <sup>a</sup>	<b>0.015</b>
	Ranibizumab	5	31,40 <sup>a</sup>	33,16	20,0	6,10 <sup>a</sup>	
	Aflibercept	5	45,00 <sup>a</sup>	21,79	40,0	7,70 <sup>a</sup>	
	Kontrol	5	83,00 <sup>b</sup>	8,37	85,0	17,20 <sup>b</sup>	
VEGF Yoğunluğu	Bevacizumab	5	2,00	,00	2,0	11,50	0.374
	Ranibizumab	5	1,60	,55	2,0	7,90	
	Aflibercept	5	1,80	,45	2,0	9,70	
	Kontrol	5	2,20	,84	2,0	12,90	
Tünel (Sayı/1hpf)	Bevacizumab	5	5,00 <sup>a</sup>	1,58	5,0	10,20 <sup>a</sup>	<b>0.019</b>
	Ranibizumab	5	3,60 <sup>a</sup>	2,41	3,0	6,70 <sup>a</sup>	
	Aflibercept	5	4,20 <sup>a</sup>	,84	4,0	7,80 <sup>a</sup>	
	Kontrol	5	7,60 <sup>b</sup>	1,14	8,0	17,30 <sup>b</sup>	
Ödem Yoğunluk/1hpf	Bevacizumab	5	,40	,55	,0	6,80	0.395
	Ranibizumab	5	1,20	,45	1,0	12,20	
	Aflibercept	5	1,20	1,10	2,0	11,80	
	Kontrol	5	1,20	1,30	1,0	11,20	
Stromal Selülerite Yoğunluk/1hpf	Bevacizumab	5	1,60	1,52	2,0	10,00	0.854
	Ranibizumab	5	2,20	,45	2,0	12,40	
	Aflibercept	5	1,80	,84	2,0	9,80	
	Kontrol	5	1,80	,84	2,0	9,80	
İltihap/1hpf	Bevacizumab	5	70,00	75,83	50,0	9,80	0.872
	Ranibizumab	5	84,00	69,95	45,0	12,10	
	Aflibercept	5	69,00	75,86	50,0	10,90	
	Kontrol	5	69,20	102,73	30,0	9,20	
İltihap Hücre Yoğunluğu(%)	Bevacizumab	5	60,00	54,77	100,0	8,30	0.583
	Ranibizumab	5	100,00	,00	100,0	12,50	
	Aflibercept	5	98,00	4,47	100,0	10,80	

Toplam	Kontrol	5	80,20	45,33	100,0	10,40	
Pnl	Bevacizumab	5	20,60	39,01	3,0	8,10	0.160
	Ranibizumab	5	19,00	20,66	10,0	9,50	
	Aflibercept	5	51,00	24,08	60,0	15,60	
	Kontrol	5	21,00	23,02	15,0	8,80	
Eozinofil	Bevacizumab	5	0 <sup>a</sup>	,00	,0	5,50 <sup>a</sup>	<b>0.014</b>
	Ranibizumab	5	32,40 <sup>b</sup>	37,27	10,0	15,40 <sup>b</sup>	
	Aflibercept	5	5,00 <sup>a</sup>	11,18	,0	7,70 <sup>a</sup>	
	Kontrol	5	24,80 <sup>b</sup>	32,14	10,0	13,40 <sup>b</sup>	
Lenfosit	Bevacizumab	5	7,60	10,55	3,0	5,50	0.109
	Ranibizumab	5	22,00	21,97	15,0	10,10	
	Aflibercept	5	40,00	20,31	30,0	14,20	
	Kontrol	5	29,20	21,92	31,0	12,20	
Plazmosit	Bevacizumab	5	2,80	4,09	,0	7,40	0.291
	Ranibizumab	5	24,00	27,70	10,0	14,10	
	Aflibercept	5	5,40	4,56	5,0	11,20	
	Kontrol	5	4,00	4,18	5,0	9,30	
Makrofaj	Bevacizumab	5	29,00	40,68	,0	11,70	0.642
	Ranibizumab	5	2,60	3,29	2,0	12,10	
	Aflibercept	5	0,60	1,34	0	8,30	
	Kontrol	5	1,20	2,17	0	9,90	
Korneal Yüzeysel Etkilenme Miktarı %	Bevacizumab	5	34,40	35,30	30,0	9,80	0.263
	Ranibizumab	5	46,00	17,82	50,0	13,00	
	Aflibercept	5	17,20	19,02	10,0	6,50	
	Kontrol	5	48,00	27,97	45,0	12,70	
Yanık Derecesi	Bevacizumab	5	2,60	0,55	3,0	11,50	0.859
	Ranibizumab	5	2,60	0,55	3,0	11,50	
	Aflibercept	5	2,40	0,55	2,0	9,50	
	Kontrol	5	2,40	0,55	2,0	9,50	
Enjeksiyon Öncesi Kmv/Tüm Alan	Bevacizumab	5	72,24	2,46	72,0	12,40	0.423
	Ranibizumab	5	70,63	6,67	73,5	10,80	
	Aflibercept	5	67,62	4,17	66,5	6,80	
	Kontrol	5	71,22	6,91	74,2	12,00	
Enjeksiyon Öncesi Anadamar Sayısı	Bevacizumab	5	19,80	2,17	21,0	12,40	0.629
	Ranibizumab	5	19,40	1,95	20,0	10,90	
	Aflibercept	5	18,00	2,92	17,0	7,70	
	Kontrol	5	19,60	2,07	19,0	11,00 <sup>a</sup>	
Enjeksiyon Sonrası	Bevacizumab	5	32,66 <sup>a</sup>	7,83	34,2	10,80 <sup>a</sup>	<b>0.006</b>
	Ranibizumab	5	21,71 <sup>a</sup>	11,66	21,2	7,00 <sup>a</sup>	

Knv/Tüm Alan	Aflibercept	5	19,55 <sup>a</sup>	13,44	21,1	6,20	
	Kontrol	5	63,68 <sup>b</sup>	10,76	70,1	18,00 <sup>b</sup>	
Enjeksiyon Sonrası Anadamar Sayısı	Bevacizumab	5	9,80 <sup>a</sup>	4,87	9,0	8,60 <sup>a</sup>	<b>0.037</b>
	Ranibizumab	5	8,40 <sup>a</sup>	2,51	8,0	6,40 <sup>a</sup>	
	Aflibercept	5	11,80 <sup>a</sup>	6,53	10,0	10,30 <sup>a</sup>	
	Kontrol	5	18,40 <sup>b</sup>	3,58	19,0	16,70 <sup>b</sup>	

Tablo 4.3: İstatistiksel analiz tablosu

Ortalama korneal yanık evre derecesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0,859$ ).

VEGF % ortalaması kontrol grubunda diğer 3 gruptan (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) da anlamlı düzeyde yüksek bulundu, ancak 3 grup arasında (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı farka rastlanmadı ( $p:0,015$ ,  $p<0,05$ ).

Tünel boyamada tünel(sayı/1hpf) ortalaması kontrol grubunda diğer 3 gruptan da(subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı düzeyde yüksek bulundu ancak 3 grup arasında (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı farka rastlanmadı ( $p=0,019$ ,  $p<0,05$ ).

Eozinofil ortalaması kontrol ve ranibizumab grubunda diğer 2 gruptan da anlamlı düzeyde yüksek bulundu ancak diğer 2 grup arasında anlamlı farka rastlanmadı ( $p:0,014$ ,  $p<0,05$ ).

Enjeksiyon sonrası knv/tüm alan ortalaması kontrol grubunda diğer 3 gruptan (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı düzeyde yüksek bulundu ancak 3 grup arasında (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı farka rastlanmadı ( $p:0,006$ ,  $p<0,05$ ).

Enjeksiyon sonrası anadamar sayısı ortalaması kontrol grubunda diğer 3 gruptan (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı düzeyde yüksek bulundu ancak 3 grup arasında (subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) anlamlı farka rastlanmadı ( $p:0,037$ ,  $p<0,05$ ).

Enjeksiyon öncesi anadamar sayısı ve knv/tüm alan ilişkisi arasında dört grup arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı ( $p=0,423$ ,  $p=0,629$ ).

Bu sayılan ölçümlerin dışında 4 grup arasında anlamlı farka rastlanmadı (Tablo 4.3).

## 5.TARTIŞMA

KNV, tedavisiz kaldığında körlüğe neden olabilen en önemli oftalmolojik sorunlardan birisidir. Bu nedenle etkin bir tedavinin verilmesi oldukça önemlidir (119).

KNV'nin görmeyi etkileyen çeşitli mekanizmaları vardır. Bunlar; damar geçirgenliğinin artması ile damar dışına çıkan kan hücrelerinin korneada oluşturduğu beyazlık, kornea yüzeyinde damarların ilerlemesiyle oluşan kornea yüzeyinin bozulması, oluşan damarlardan dışarı çıkan lipit ve diğer maddelerin korneada opasite oluşturması ve düzenli kollajen sisteminin bozulmasıdır. KNV tedavisinde ilk basamak buna neden olan durumun ortadan kaldırılmasıdır. Bunlar arasında varsa keratit tedavisinin verilmesi, korneada bulunan sütünlerin alınması, kontakt lens kullanımının durdurulması, korneayı irrite eden veya korneal travmaya neden olan etkenin ortadan kaldırılması, allerjenlerin ortamdan uzaklaştırılması yer alır.

Bugüne kadar KNV tedavisinde en çok kullanılan yöntem topikal steroidler olmuştur. Topikal uygulama kolaylığı ve maliyetinin uygun olması sebebiyle steroid ilaçlar çok tercih edilmesine rağmen katarakt, glokom, enfeksiyona yatkınlık gibi bilinen çeşitli yan etkileri de mevcuttur. Bu yan etkilerinden dolayı steroidlerden başka yeni moleküller de denenmiştir.

KNV tedavisinde yukarıda bahsedildiği gibi NSAİİ, siklosporin, metotreksat, argon laser fotokoagülasyon, elektrokoagülasyon, fotodinamik tedavi, limbal ve amniyon membran transplantasyonu gibi tedaviler denenmiştir. Fakat uygulamada ve sonucunda gelişen yan etkiler nedeniyle yeni tedavi olanaklarını aramaya itmiştir. Günümüzün güncel tedavi yaklaşımı anti-VEGF'ler olmuştur (71-89,120).

Bevacizumab VEGF-A ve onun tüm izoformlarına bağlanarak etki gösteren rekombinant bir monoklonal antikordur. Ranibizumab ise VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanıp vasküler permabiliteyi azaltan monoklonal

antikordur. Hem bevacizumab hem de ranibizumab senil maküla dejenerasyonunda kullanılmaktadır. Daha önce yapılmış çeşitli hayvan deneylerinde bevacizumabın farklı dozlarda, topikal veya subkonjonktival uygulamalarının KNV'yi azalttığı gösterilmiştir. Ranibizumab ve bevacizumab ile yapılmış birçok hayvan deneyi çalışmasında alkali yanığa bağlı oluşan KNV'de etkinliklerinin olduğu görülmüştür (120).

Hosseini ve arkadaşlarının (121) yaptığı deneysel çalışmada alkali yanık oluşturdukları rat kornealarını iki gruba ayırmışlardır. Bir gruba subkonjonktival bevacizumab diğer gruba ise subkonjonktival salin solüsyonu verilmiştir. Hayvanlar 3 hafta takip edilmiş ve bevacizumab verilen grupta daha az neovaskülarizasyon geliştiği, vaskülarizasyonda %32 azalma olduğu ve oluşan damarların daha kısa olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda da benzer şekilde bevacizumab, ranibizumab ve afliberceptli gruplarında kontrol grubuna göre damarlanmasının daha az olduğu ve oluşan damarların da daha kısa olduğu görüldü.

Anjiogenezin ilk basamağı olan NO salınması damar dilatasyonuna yol açarak damar içindeki hücrelerin damar dışına çıkmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla inflamatuvar hücreler de damar dışına çıkmaktadır ve o bölgede inflamasyon oluşumu başlamaktadır. Hücreler tarafından salınan mediatörler endotel hücrelerini ve fibroblastları aktive ederek VEGF, PDGF gibi mediatörlerin çoğalmasına neden olmaktadır. İnflamasyon sadece anjiogenezis sırasında olmamaktadır. Travma, enfeksiyon gibi durumlar sonucunda da ortaya çıkan doğal bir savunma durumudur. Dolayısıyla inflamasyon durumunda inflamatuvar hücrelerin çoğalması da anjiogenezis için bir belirteçtir. Neovaskülarizasyon olan bölgede fibroblast, monosit, lenfosit, nötrofil gibi hücrelerin görülmesi de bize anjiogenezis hakkında bilgi vermektedir (1,2,4,5, 122-125). Çalışmamızda histopatolojik incelemelerde literatürle uyumlu olarak fibroblast, monosit, lenfosit, nötrofil incelemeleri yapıldı.

Hasheimen ve ark. (2) 50 rat üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada 5 grup oluşturmuşlar ve ilk 4 gruba subkonjonktival sırasıyla salin, 1, 5, 25 mg/ml bevacizumab ve son gruba topikal bevacizumab verilmiş ve salin

verilen grubu kontrol grubu olarak almışlardır. Digital fotoğraflama ile yapılan neovaskülarizasyon alan hesaplamasında 2. ve 4. (1 ve 25 mg/ml) bevacizumab verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olan daha az KNV görüldüğünü bildirmişlerdir. Bevacizumab verilen gruplarda kontrol grubuna göre histopatolojik değerlendirmede de inflamasyon ve neovaskülarizasyonun daha az olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda KNV'yi engellemenin doz bağımlı olduğunu fakat etkinliğin doz arttıkça doğru orantılı olarak artmadığını ifade etmişlerdir.

Akar ve ark. (124) yaptığı çalışmada ise subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab ve pegaptinibin etkinliğini karşılaştırılmıştır. Deneyde 16 sıçan korneası rastgele olarak 4 gruba ayrılmış ve bevacizumab grubuna 0,05 ml/1,25 mg subkonjonktival bevacizumab, ranibizumab grubuna 0,05 ml/0,5 mg subkonjonktival ranibizumab, pegaptanib grubuna 0,05 ml/0,15 mg subkonjonktival pegaptanib sodyum ve kontrol grubuna 0,05 ml salin verilmiştir. İki hafta sonunda yapılan kontrollerde anti-VEGF tedavisi alan (bevacizumab, ranibizumab ve pegaptinib) üç grupta da korneal vaskularizasyonda kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu bulunmuştur. Ranibizumab ve pegaptinib sodyum tedavisi uygulanan gruplarda neovaskularizasyon azalma oranı arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Subkonjonktival bevacizumab uygulanan grupta ise diğer anti-VEGF gruplarına göre anlamlı olarak korneal neovaskularizasyonda azalma olduğu görülmüştür. Histolojik incelemelerde de tedavi verilen her üç grupta da kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha az damarlanma olduğu görülmüştür. Bevacizumab verilen grupta ranibizumab ve pegaptanib verilen gruplardan daha az damarlanmanın olduğu ve bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir. Fakat ranibizumab ile aflibercept grupları arasında anlamlı farklılık olmadığını söylemişlerdir.

Hurmeriç ve ark (125) yaptığı deneysel çalışma da ise bevacizumab, Pegaptanip sodyum ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Enjeksiyonun 10. gününde kornealar histolojik olarak incelenmiş ve sonuçta bevacizumabın pegaptanibe göre daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Korneal neovaskülarizasyon alanları kontrol grubunda % (73±6.67), bevacizumab verilen grupta % (59.84±6.85), pegaptanip verilen grupta ise % (82.69±5.59) olarak bulunmuştur. En az vaskülarizasyon alanı bevacizumab grubunda olduğu ve bu azalmanın diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde histolojik incelemede de en az damarlanma bevacizumab grubunda iken en fazla damarlanmanın kontrol grubunda bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edildi.

Bevacizumab ilk bulunan anti-VEGF moleküllerinden biri olduğu için bununla ilgili yapılmış birçok klinik çalışma mevcuttur. Bevacizumab'ın değişik dozlarda, değişik verilme yolları ve süreleri ile farklı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların hemen hepsinde elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre anlamlı derecede az damarlanma ve daha az fibroblast aktivitesi ve hücrel aktivite olmuştur (2,3,5,43,99,123). Bizim çalışmamızda da buna benzer sonuçlar elde edilmiştir.

KNV'de çeşitli anti-VEGF tedavi protokolleri denenmektedir. Bevacizumab; VEGF-A reseptörüne bağlanarak etki gösteren, kolorektal kanserlerde sistemik olarak kullanılan, büyük molekül yapısına sahip off-label ilaçtır. Daha küçük molekül olan Ranibizumab ise ven tıkanıklığı ve diyabete bağlı maküla ödemi ve neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılan VEGF-A molekülüne bağlanan bir ilaçtır. Bevacizumaba göre en önemli dezavantajı pahalı bir tedavi yöntemi olmasıdır (30).

Öner ve ark. (126) ratlarla yaptığı deneysel çalışmada birinci gruba 0.05 ml/1.25 mg bevacizumab subkonjonktival yol ile 1.,4., ve 7. günlerde, ikinci gruba ise günde 2 defa topikal 12.5 mg/ml topikal damla uygulamışlardır. Sonuçta her iki grupta da verilen bevacizumabın neovaskülarizasyonu azalttığını bildirmişlerdir.

VEGF molekülü: VEGF-A,B,C,D,E ve plasental büyüme faktörü gibi alt formları içermektedir. Anjiogenezisin en önemli mediatörü VEGF-A'dır.



Dolayısıyla çalışmalarda VEGF-A'yı bağlayan anti-VEGF'ler neovaskülarizasyonu engelleyeceği düşünülmektedir. En güncel ve en efektif tedavi de bundan dolayı anti-VEGF ajanlardır. Özdemir ve ark. yaptığı hayvan deneyi çalışmasında bir gruba topikal bevacizumab, bir gruba subkonjonktival bevacizumab uygulanırken kontrol grubuna subkonjonktival salin verilmiştir. Neovasküler alan oranı kontrol grubunda  $82.5 \pm 22.1$ , subkonjonktival grupta  $42.7 \pm 15.0$ , topikal grupta  $55.8 \pm 18.2$  olarak bulunmuştur. Bevacizumab alan grubun oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bunun yanında bevacizumab alan grupta neovaskülarizasyonun, inflamasyonun ve fibroblast aktivitesinin daha az olduğunu bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Fakat topikal ile subkonjonktival gruplar arasında hem neovasküler alan hem de histopatolojik değerlendirme bakımından istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ifade etmişlerdir (1).

Dastjerdi ve ark.(127) hayvan deneylerinden farklı olarak kornea transplantasyonu yapılan hastalarda topikal ve subkonjonktival bevacizumabın etkinliğini değerlendirilmişlerdir. Sonuçta subkonjonktival bevacizumab verilen grupta diğerlerine göre KNV'de daha fazla gerileme olduğunu göstermişlerdir.

Ahmed ve ark.(43) yaptığı benzer deneysel çalışmada grupları; günde 3 defa verilen topikal bevacizumab (grup1), subkonjonktival 5 mg/ml bevacizumab (grup 2), subkonjonktival 10 mg/ml bevacizumab (grup3) ve son olarak subkonjonktival salin verilen kontrol grubu olarak oluşturmuşlardır. Bir haftanın sonunda grup 1'de (topikal damlalı grup) neovasküler indeksin kontrol grubundan daha düşük olduğu bulundu. İkinci gün sonunda 2. ve 3. gruplarda (subkonjonktival bevacizumab) kontrol grubuna göre neovasküler indeksin istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Histopatolojik degerlendirmede ise tedavi verilen her 3 grupta da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha az damar olduğunu bulmuşlardır. Bunun yanında subkonjonktival tedavi verilen 2 grupta ise topikal gruba göre anlamlı derecede daha az damarlanmanın olduğunu görmüşlerdir. Fakat 5mg/ml ve 10mg/ml verilen grup arasında ise

istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise tedavilerin hepsi subkonjontival verildiği için üç grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede az damarlanma olduğu görüldü.

Türkçü ve ark. (4) 30 rat üzerinde yaptığı çalışmalarında ranibizumab kullanmışlardır. İlk grup kontrol grubu olarak alınarak sadece göz yaşı damlası verilmiş, ikinci gruba günde 2 defa topikal ranibizumab, üçüncü gruba günde 4 defa ranibizumab, 4. ve 5. gruba 1.,3, ve 7. günde sırayla subkonjontival 0.5 mg / 0.05 ml ve 1mg / 0.1 ml ranibizumab vermişlerdir. Digital fotoğraflarla değerlendirilmesi sonucu neovaskülerizasyon alanınınin tedavi gurubunun hepsinde kontrol grubuna göre daha az olduğunu belirtmişlerdir. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmamıştır. Histopatolojik incelemelerde hematoksilen eozin, immunhistokimyasal CD34 ve von-Willebrand faktör bakılmıştır. Tedavi gruplarında kontrol grubuna göre daha az inflamasyon hücreleri, daha az damar ve fibroblast aktivitesi olduğunu göstermişlerdir.

Ruti ve ark (5) yaptığı hayvan deneyi çalışmasında topikal olarak bevacizumab, aflibercept ve kontrol grubu olmak üzere 3 grup oluşturmuşlardır ve bu grupların hepsine günde iki defa topikal damla damlatmışlardır. Yedinci ve 10.günlerde aflibercept damlatılan grupta diğer iki gruba göre neovaskülerizasyon alanınınin daha az olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında immun histokimyasal çalışmalarda hematoksilen eozin ile boyamada aflibercept uygulanan grupta boyanma %29, bevacizumab uygulanan grupta %92 ve kontrol grubunda %86 olarak bulmuşlardır ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, CD31 ile yapılan immunflouresans boyamada ise bevacizumab ve kontrol grubunda endotelial çoğalma olduğu görülmesine rağmen aflibercept grubunda görülmediğini bildirmişlerdir. Anti VEGF ilaçların subkonjontival olarak verildiği çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi.

Avisar ve ark.(99) yaptığı çalışmada kornea neovaskülerizasyonu yapıldıktan sonra subkonjontival, ön kamara ve intravitreal bevacizumab uygulanan gruplar ile kontrol grubu olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur.

Vaskülarizasyon alanı (%), immunhistokimyasal incelemeler ve serumda VEGF düzeyi incelenmiştir. Vaskülarizasyon alanının yüzdesi bevacizumab verilen grup ile kontrol grubu arasında çalışmamıza benzer şekilde istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. Onuncu gün sonunda vaskülarizasyon alanının yüzdesini kontrol grubunda  $51 \pm 24.7$ , subkonjonktival grupta  $39.7 \pm 14.5$ , ön kamara verilen grupta  $19.8 \pm 1.2$  ve intravitreal verilen grupta  $24.2 \pm 14.9$  olarak bulmuşlardır. Vaskuler endotel hücreleri için kullanılan CD31 ile immunhistokimyasal boyama sonuçları bakımından tedavi alan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve daha az olduğunu söylemişlerdir. Yani bevacizumab alan grupta kontrol grubuna göre daha az damar endoteli görülmüştür.

Dursun ve ark. (119) 50 rat ile yaptıkları çalışmalarında kimyasal olarak koterize ettikleri sıçan kornealarını rastgele 3 gruba ayırmışlardır. İlk gruba 0.1 ml salin solüsyonu (Kontrol), ikinci gruba subkonjonktival 2,5 mg bevasizumab ve üçüncü gruba ise subkonjonktival 1 mg ranibizumab uygulamışlardır. Üç hafta sonra digital fotoğraf analizinde bevasizumab ve ranibizumab gruplarında kontrol grubuna göre; korneal neovaskularizasyon alanı ve damar uzunluğu bakımından istatistiksel olarak anlamlı ve daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda bevacizumabın ranibizumaba göre neovaskülarizasyon alanı ve damar boylarına göre istatistiksel olarak daha anlamlı ve daha az olduğunu bulmuşlardır. Sonuçlar açısından yakın bulgular elde ettik. Fakat farklı olarak çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı.

Storobinsky ve ark (123) 119 fare üzerinde yaptığı çalışmada bir grup bevacizumab diğer grup kontrol grubu (tedavi verilmedi) olarak alındı. Sekizinci gün sonunda neovaskülarizasyon alanı tedavi verilen grupta diğer gruba göre daha az olduğu bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğu ifade edilmiştir. İntravitreal ve ön kameraya verilen bevacizumabın subkonjonktival verilen gruba göre neovaskülarizasyon alanı ve histokimyasal incelemelerdeki bulguların daha az olduğunu bununda istatistiksel açısından anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ön kamara ve intravitreal

uygulamalar yapılmamasına rağmen çalışmamızda subkonjonktival uygulamadan yüksek etki elde edildi.

Park ve ark. (3)12 tavşanın 24 gözünde yapmış oldukları çalışmada 4 farklı grup oluşturulmuştur. İki gruba afliberceptin 2 farklı dozu ( 2mg/0.5ml (grup 1), 2mg/5ml(grup 2)), topikal bevacizumab 2.5mg/ml (grup 3) ve dengeli tuz solüsyonu verilen grup (grup 4) olmak üzere 4 farklı grubun kornealarından sütür geçirilerek deney yapmışlardır. Neovaskülarizasyon alanı açısından çalışmamıza benzer olarak tedavi alan 3 grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğunu göstermişlerdir.

Yukarıda incelediğimiz çalışmaların birçoğunda bizim çalışmamızda da olduğu gibi neovaskülarizasyon alanının incelenmesinde digital görüntülemeyle elde edilen fotoğraflar kullanılmıştır. Neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına piksel cinsinden incelenmesiyle elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Hemen her makalede farklı bilgisayar programı kullanılmıştır. Bu programlar kantitatif ve semi kantitatif yöntemlerle ölçülmektedir. Dolayısıyla makaleler arasında farklılıkların oluşmasına neden olabilmektedir. Bunun için çalışmamızda Pixcavatör ve Photoshop programları gibi 2 farklı program kullanıldı.

Aflibercept, 115 kDA ağırlığında rekombinant bir füzyon proteini olup VEGF dimerlerini kapan gibi yakalar ve VEGF reseptöre ulaşmadan etkisini inhibe eder. Ayrıca plesantal growth faktörün de reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek anjiojenik etkiyi engellemiş olur. Afliberceptin bazı görülen topikal yan etkileri subkonjoktival hemoraji, hiperemi, ağrı, göz içi basıncının artması olup sistemik yan etkileri ise bulantı, hipertansiyon ve kalp yetmezliğidir (113).

Afliberceptin kolon kanserleri için üretilmiş formunun yanında oküler formu da (Eylea® ( Bayer) vardır.

Aflibercept daha uzun etki süresi sayesinde hem bevacizumab hemde ranibizumaba göre daha potent olduğu için tercih edilen bir molekül olduğu bulunmuştur (5, 128).

## 6.SONUÇ

Kornea neovaskularizasyonu tüm dünyada ve ülkemizde çok fazla görülen ve körlüğe neden önemli bir hastalıktır. KNV tedavisinde yukarıda bahsediliği gibi çok çeşitli tedaviler denenmiştir ve denenmektedir. Bunlar içinde en güncel olanı şüphesiz Anti-VEGF'lerdir.

Şu an için ülkemizde 3 adet Anti-VEGF bulunmaktadır. Bunlar; bevacizumab, ranibizumab ve aflibercept'tir. Bu anti-VEGF moleküllerin KNV' de faydalı olduğuna dair gerek deneysel çalışmalarda gerek klinik çalışmalar mevcuttur. KNV'de kullanım ruhsatı olmayan bu moleküller endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamız sonucunda 3 molekülünde kontrol grubuna göre etkin olduğu fakat gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur. Daha geniş serilerde deneylerin yapılması bu moleküller arasında ki farklılıkları ortaya çıkarabileceği kanaatindeyiz.

Anti-VEGF moleküllerinin en önemli dezavantajlarından birisi fiyatıdır. Şu an için KNV'de endikasyon dışı kullanım ile bu ilaçların uygulanması tedavi için ilacın kullanımını kısıtlamaktadır.

Sonuç olarak Anti-VEGF moleküller KNV tedavisinde etkilidir. Daha büyük çalışma gruplarında daha farklı uygulamalar ile bu önemli halk sağlığı problemine karşı doğru bir yöntemin bulunacağını düşünmekteyiz.

## 7.KAYNAKLAR

1. Comparison of the effects of subconjunctival and topical anti-VEGF therapy (bevacizumab) on experimental corneal neovascularization Ozdemir Ozdemir, Ozgul Altintas, Levent Altintas, Berna Ozkan, Cigdem Akdağ, Nurşen Yüksel, Arq Bras Oftalmol. 2014;77(4):209-13
2. Prevention of Corneal Neovascularization: Comparison of Different Doses of Subconjunctival Bevacizumab with Its Topical Form in Experimental Rats; Mohammad Naser Hashemian, Hadi Z-Mehrjardi,Sasan Moghimi, Maryam Tahvildari, Hoda Mojazi-Amiri; Ophthalmic Res 2011;46:50–54
3. Inhibitory Effect of Topical Aflibercept on Corneal Neovascularization in Rabbits; Yi-Ryeung Park, and Sung Kun Chung; Cornea, October 2015, Volume 34, Number 10, 1303-1307
4. Topical and subconjunctival ranibizumab (lucentis) for corneal neovascularization in experimental rat model, Fatih Mehmet Turkcu, Yasin Cinar, Gul Turkcu, Alparslan Sahin, Abdullah Kursat Cingu, Harun Yuksel, Muhammed Sahin, Adnan Yıldırım,Ihsan Caca, Cutan Ocul Toxicol, 2014; 33(2): 138–144
5. Efficacy of topical aflibercept versus topical bevacizumab for the prevention of corneal neovascularization in a rat model Ruti Sella, Orly Gal-Or, Eitan Livny, Mor Dachbash, Yael Nisgav, Dov Weinberger, Tami Livnat, Irit Bahar, Experimental Eye Research 146 (2016) 224-232
6. Bengisu Ü. Göz hastalıkları,4.baskı: Kornea Anatomisi ve Fiziyojisi. Ankara, Palme yayıncılık, 1998; 69-72
7. Del Monte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. J Cataract Refract Surg. 2011;37:588-598.
8. Özdemir Ö. Kornea transplantasyonu. Medikal Network Oftalmoloji Dergisi 1995; 2(1): 6-9
9. Arffa RC. Disease of the cornea ,fourth edition. Mosby Co. 1997,
10. William MH. Adler's Physiology of the eye, Ninth edition, Mosby Co.1992

11. Myron Yanoff, Jay S Duker. Ophthalmology. In: Ming XW, Carol LKarp, Robert P Selkin, Dimitri TA. Mosby edition. Chapter 5: 12.1-12.18
12. Duke –Elder S. System of Ophthalmology. Henry Kimpton London, St Louis.1965; Vol III: 648.
13. Tucker SM. Corneal diameter, axial length, intraocular pressure in premature infants. Ophthalmology 1992; 99:1296
14. Ozcetin H. Klinik Göz Hastalıkları. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul. 2003;39-120
15. American Academy of ophthalmology, Yüzeysel Hastalıkları ve kornea, 8.cilt ,2010-2011, 4-9sf
16. Aydın P, Akova AY. Temel Göz Hastalıkları. Güneş Kitapevi, Ankara. 2001;122- 187
17. Derman Tıbbi yayıncılık, Kornea hastalıkları 2015, 1-19
18. Gipson IK, Joyce NC, Zieski JD, The anatomy and cell biology of the human cornea limbus, conjoktiva and adnexa, Foser CS, Azar DT, Dolhman CH. The cornea scientific Foundations clinic practice 4th philadelphia: Lipincott Williams wilkins 2005; 1-35
19. Newell FW anatomy of kornea Oftalmology, Principles and concept 1992;13;8-13
20. Tripathi CR, Chlam KV, Cibis GW, Kadron HR. Biochemistry and metabolism Principles Of Ophthalmology, Taylor Francis, San Francisco, American Academy Of Ophthalmology; 1999 – 2000;310-15
21. Nishida T. Basic Science: Cornea, sklera and ocular adnexia anatomy, biochemistry, physiology and biomechanics. Krachmer HJ, Mannis JM, Holland JE. Cornea Second Edition. Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005;3-43
22. Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları 2005; 2: 7-25.
23. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Regard G. Corneal collogens. Pathol Biol 2001; 49. 353-363.

24. Klinik oftalmoloji sistemik yaklaşım,güneş tıp kitapevi Kanski Jack J, 7.baskı, 167-200
25. Tripathi CR, Chlam KV, Cibis GW, Kadron HR. Biochemistry and metabolism Principles Of Ophthalmology, Taylor Francis, San Francisco, American Academy Of Ophthalmology; 1999 – 2000;310-15
26. Nishida T. Basic Science: Cornea, sklera and ocular adnexia anatomy, biochemistry, physiology and biomechanics. Krachmer HJ, Mannis JM, Holland JE. Cornea Second Edition. Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005;3-43
27. Pepose JS, Ubels JL. Cornea and Sclera. In: Adler's Physiology of the Eye.10. Baskı . Mosby, 2003;59-92
28. Klinik oftalmoloji sistemik yaklaşım,güneş tıp kitapevi Kanski Jack J, 7.baskı, 132-140
29. Klinik oftalmoloji sistemik yaklaşım,güneş tıp kitapevi Kanski Jack J, 7.baskı, 252-260
30. Korneal Neovaskularizasyon Tedavisinde Bevasizumab Kullanımı, Tuba Celik, Mustafa Koşker, TJO 45; 1: 2015
31. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. Curr Opin Ophthalmol. 2001;12:242-249
32. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Ağnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, GerberHP, De Falco S, Witta J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. Nature. 2006; 443:993-997
33. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. Surv Ophthalmol. 1998;43:245-269
34. Bachmann BO, Bock F, Wiegand SJ, Maruyama K, Dana MR, Kruse FE, Luetjen-Drecoll E, Cursiefen C. Promotion of graft survival by



- vascular endothelial growth faktör a neutralization after high-risk corneal transplantation. Arch Ophthalmol. 2008;126:71-77.
35. Burger PC, Chandler DB. Experimental corneal neovascularization; biomicroscopic, angiographic and morphologic correlation. Cornea 4;35-41,1985
  36. Corneal vascularization, David G. Cogan, Investigative Ophthalmology April 1962
  37. Ocular Neovascularization: An Epidemiologic Review, Patricia Lee, Md, Cindy C. Wang, And Anthony P. Adamis,, Survey Of Ophthalmology Volume 43 Number 3; 11-12, 1998
  38. Topical and subconjunctival ranibizumab (lucentis) for corneal neovascularization in experimental rat model; Fatih Mehmet Türkcü, Yasin Cinar, Gul Türkcü, Alparslan Şahin, Abdullah, Kürşat Cingü, Harun Yüksel, Muhammed Şahin, Adnan Yıldırım, İhsan Çaça, Cutan&Ocul Toxicol, 2014; 33(2): 138–144
  39. American Academy of ophtalmology, 8.cilt, Yüzey Hastalıkları ve kornea 2010-2011, 92.
  40. Anti-VEGF monoclonal antibody-induced regression of corneal neovascularization and inflammation in a rabbit model of herpetic stromal keratitis Mario Saravia, Gustavo Zapata, Paula Ferraiolo, Lourdes Racca, Alejandro Berra Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (2009) 247:1409–1416
  41. Wağner EK, Bloom DC Experimental investigation of herpes simplex virus latency. Clin Microbiol Rev 1997,10(3):419– 443
  42. Carr DJ, Harle P, Gebhardt BM, The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. Exp Biol Med Maywood 2001 ,226(5):353–366
  43. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model; Abdulgani Ahmed, Hasanreisoglu Berati, Akyurek Nalan, and Sepici Aylin. Departments of Ophthalmology, Pathology and Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Gazi University,

- Ankara, Turkey, *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009; 37: 730–736
44. Beck L, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11:365–75.
  45. Isner JM, Ashara T. Angiogenesis and vasculogenesis for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1993; 103: 1231–6.
  46. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27–31.
  47. Göz Hastalıkları ve Anti-VEGF Tedavi Birinci Baskı 2010,1-17
  48. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11: 73–91.
  49. Risau W, Sariola H, Zerwes H-G, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cell-derived embryoid bodies *Development.* 1988;102:471– 478
  50. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis *Science.* 1997;275:965–967
  51. Denekamp J. Vasculature as a target for tumor therapy. In Hammerson F, Hudlicka O, eds. *Progress in Applied Microcirculation* Basel Karger, 1984; 28.
  52. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674.
  53. Bock F, König Y, Dietrich T, Zimmermann P, Baier M, Cursiefen C. Inhibition of angiogenesis in the anterior chamber of the eye. *Ophthalmologe.* 2007;104:336-344
  54. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization Takayuki Asahara, Haruchika Masuda, Tomono Takahashi, Christoph Kalka, Christopher Pastore, Marcy Silver, Marianne Kearne, Meredith Magner, Jeffrey M. Isner; *Circulation Research* August 6, 1999

55. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization Jeffrey M. Isner and Takayuki Asahara, The Journal of Clinical Investigation ,May 1999, Volume 103, Number 9
56. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. Intern Rev Immunol 2002; 21: 33-49
57. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of transcriptional unit and characterization of transcriptional and post transcriptional regulatory sequences J Biol Chem 1996; 271: 3877-83
58. Neufeld G, Cohen T. Vascular endothelial growth factor and its receptors. FASEB J. 1999; 13:9-21
59. Kolodin A, LeVengood D. Neuropilin is semaphorin 3 receptor. Cell 1997;90:753-61
60. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. J Cellular Biochem 1991; 47; 211-218
61. Shin, Y. J., J. S. Choi, et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats. J Neuroimmunol 2010; 229 (1-2): 81-90
62. Levy A.P, Levy N.S. , Transcriptional regulation of rat endothelial growth factor gene by hypoxia. J. Biol. Chem. 1995;270: 13333-40
63. Roselyne Bine'truy-Tournaire, Caroline Demangel, Bernard Malavaud, Roger Vassy, Sylvie Rouyre, Michel Kraemer, Jean Ploue, Claude Derbin, Ge' rard Perret and Jean Mazie Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis The EMBO Journal Vol.19 No.7.1525-1534, 2000
64. Levy A. P., Levy N. S. Transcriptional regulation of rat endothelial growth factor gene by hypoxia. J. Biol. Chem. 1995;270;13333-13340
65. American Academy of ophthalmology, 8.cilt, Yüzey Hastalıkları ve kornea 2010-2011, 175-177

66. .Bikfalvi A, Klein S, Pintucci, G.Rifkin, 1997 Endocr. Rev. 18,
- 67.Evaluation anthropology For the article “Genera of the human lineaje,” by Camilo J. Cela-Conde and Francisco J. Ayala, which appeared in issue PNAS13, June 24, 2003,
- 68.Adamis AP, Meklir B, Joyce NC, In situ injury induced relaease of basic fibroblast growth factör from corneal epitelial cells. Am J Pathol 1991;139:961-967
- 69.Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C., Murray J. Klačsbrun, M. 1988 Science 223, 1296–1299
- 70.Griselli F, Li H, Bennaceur- Gricelli A, Soria J, Opolan P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H, Angiostatin gene transfer: inhibition of growth in vivo by blokage of endotethlial cell proliferation association with mitosis arrest. Proc Natl Acad USA 1998; 95:6367-72
- 71.O Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin an endogenous inhibitör of angiogenezis an tumor growth cell 1997; 88: 277-85
- 72.Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971;285:1182-1186.
- 73.Göz Hastalıkları ve Anti-VEGF Tedavi Birinci Baskı Murat Karacorlu 2010,173-178
- 74.Jin-Hong Chang, Eric E. Gabison, Takuji Kato ve ark. Corneal neovascularization. Curr Opin Ophthalmol 2001; 12:242-249.
- 75.Effect of Inhibitors of Arochidonic Acid Metabolism on Corneal Neovascularization in the Rat William L. Haynes, Alan D. Proia, and Gordon K. Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 30, No. 7, July 1588-93
- 76.Skold M, Culheim S, Hammaber H ve ark. Induction of VEGF and VEGF receptors in the spinal cord after mechanical spinal injury and prostaglandin administration. Eur J Neurosci 2000; 12:3675-3686.
- 77.Edelma JL, Castro MR, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with growth and regression of blood vessels in the rat cornea. Invest Ophtalmol Vis Sci 1999; 40:1112-1123.

78. Kayaalp O, rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 10. Baskı, Hacettepe Tas Kitapevi, 2002:420-423
79. P Střeštíková, Petra Střeštíková, B. Otová, M. Filipec, K. Mašek & H. Farghali Different mechanisms in inhibition of rat macrophage nitric oxide synthase expression BY FK 506 AND siklosporinA 04 Feb 2001 23(1) 67-74
80. Gabriela L. Hernández, Olga V. Volpert, Miguel A. Íñiguez, Elisa Lorenzo, Sara Martínez-Martínez, Raquel Grau, Manuel Fresno, and Juan Miguel Redondo Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Angiogenesis by Cyclosporin A: Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2, J. Exp. Med. 193(5) 2001:607-620
81. Ben Ezra D, Griffin BW, Maftzir G ve ark. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38:1954-1962.
82. Effect of combined topical heparin and steroid on corneal neovascularization in children. Michels R, Michels S, Kaminski S, Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 2012 Nov-Dec;43(6):452-8
83. Benelli U, Ross JR, Nardi M ve ark. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery: inhibition by cyclosporin A. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38:274-282.
84. Kim JH, Kim JC, Shin SH ve ark. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF and VEGF. Exp Mol Med 1999; 31:203-209
85. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B ve ark. New activity of spironolactone: inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. Circulation 1996; 94:2566-2571.
86. Chen PR, Lee CC, Chang H, Tsai CE. Sesamol regulates plasminogen activator gene expression in cultured endothelial cells: a potential effect on the fibrinolytic system. J Nutr Biochem 2005;16:59-64.

87. Keynon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997; 64:971-978.
88. Jacklin A, Ratledge C, Welham K, Bilko D, Newton CJ. The sesame seed oil constituent, sesamol, induces growth arrest and apoptosis of cancer and cardiovascular cells. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:374–80.
89. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R ve ark. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4:376-383.
90. Klinik oftalmoloji sistemik Yaklaşım,güneş tıp kitapevi Kanski Jack J, 7.baskı, 625,626
91. Primbs GB, Casey R, Wamser K ve ark. Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29:832-838.
92. Breier G. Angiogenesis in embryonic development-a review. *Placenta* 2000; 21:11-15.
93. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K ve ark. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:431-441.
94. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S ve ark. Allograft conjunktival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995; 102:1020-1025.
95. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333:328-335.
96. Avila MP, Farah ME, Santos A, Carla L, Fuji G, Rossi J, Nau J. Three-year safety and visual acuity results of epimacular 90 strontium/90 yttrium brachytherapy with bevacizumab for the treatment of subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina.* 2011;32:10-18.

97. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chevez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin) Br J Ophthalmol. 2007;91:804-807.
98. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. Retina 2006; 26:352-354
99. Avisar I, Weinberger D, Kremer I. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injections on corneal neovascularization in a mouse model. Curr Eye Res. 2010;35:108-115
100. Nomoto H, Shiraga F, Kuno N, Kimura E, Fujii S, Shinomiya K, Nugent AK, Hirooka K, Baba T. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50:4807-4813.
101. Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. N Engl J Med. 2011;364:1897-1908
102. Shima C, Sakağuchi H, Gomi F, Kamei M, Ikuno Y, Oshima Y, Sawa M, Tsujikawa M, Kusaka S, Tano Y. Complications in patients after intravitreal injection of bevacizumab- Acta Ophthalmol. 2008;86:372-376.
103. Awadein A. Subconjunctival bevacizumab for vascularized rejected corneal grafts. J Cataract Refract Surg- 2007;33:1991-1993
104. Friedlander SM, Welch RM. Vanishing disc neovascularization following intravitreal- bevacizumab(avastin) injection. Arch Ophthalmol. 2006;124(9):1365
105. Campochiaro PA. Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 ;47(2):462-74.
106. 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
107. 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.
108. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernandez-Rojas, Salazar N, Chan RV. Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina*, 2008;28(3 Suppl):S19-25.
109. Hosseini H, Nejabat M. A potential therapeutic strategy for inhibition of corneal neovascularization with new anti-VEGF agents. *Med Hypotheses.* 2007;68:799-801.
110. AP Adamis, DT Shima. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005; 25 (2) 111-118.
111. Göz Hastalıkları ve Anti-VEGF Tedavi Birinci Baskı Murat Karacorlu 2010,23-27
112. Aflibercept: AVE 0005, AVE 005, AVE0005, VEGF Trap - Regeneron, VEGF Trap (R1R2), VEGF Trap-Eye. *Drugs R. D.* 9, 2008, 261-269.
113. Türkiye klinikleri oftalmoloji Diyabetik retinopati özel sayısı , 2014;7:2 44-53
114. Evoy KE, Abel SR, 2013. Aflibercept: newly approved for the treatment of macular edema following central retinal vein occlusion. *Ann. Pharmacother.* 47, 819-827.
115. Semeraro F, Morescalchi F, Duse S, Parmeggiani F, Gambicorti E, Costagliola C, Cohen N, Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization. 2009 *Vis.* 15, 2326-2338.
116. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985; 4:531–535



117. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology - a systematic review Robert Klopfleisch: Klopfleisch BMC Veterinary Research 2013, 9:123
118. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research K. N. Gibson-Corley, A. K. Olivier, and D. K. Meyerholz: Veterinary Pathology 50(6)
119. Dursun A, Arıcı,M.K., Dursun F,Ozec,A.V., Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model Int J Ophtalmol 2012 Vol.5, No.4,Aug 18,
120. Dimitri T Azar, Corneal angiogenic,privilege, angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis and wound healing. Trans Am Ophtalmol Soc 2006;104: 264-302
121. Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, Yazdchi T, Sedagat A, Noori F: Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. Clic experiment ophtamology 2007; 35(8):745-748
122. Carla Costa, Joaço Incio, Raquel Soares. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? Angiogenesis. 2007 :10:149–166
123. Olga Dratviman-Storobinsky, Bat-Chen R. Avraham Lubin, Murat Hasanreisoglu, Nitza Goldenberg-Cohen, Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization, Molecular Vision 2009; 15:2326-2338
124. Akar E.E., ONER V, KüçükerdönmezC, Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model, Int J Ophtalmology V:6, No:2, April,2013

125. Volkan Hürmeriç , Fazıl Cüneyt Erdurman , Tarkan Mumcuoğlu  
Deneysel Kornea Neovaskülarizasyonu Modelind Subkonjonktival  
Bevacizumab ve Pegaptanib Sodyum Enjeksiyonunun Etkinliğinin  
Karsılaştırılması, T. Oft. Gaz.2009, 39, 349-354,
126. Oner V, Küçükerdonmez C, Akova YA, Colak A, Karalezli A.  
Topical and subconjunctival bevacizumab for corneal  
neovascularization in an experimental rat model. Ophthalmic Res.  
2012;48(3):118-23
127. Dastjerdi MH, Saban DR, Okanobo A, Nallasamy N, Sadrai Z,  
Chauhan SK, et al. Effects of topical and subconjunctival  
bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. Invest  
Ophthalmol Vis Sci. 2010;51(5):2411-7.
128. Semeraro F, Morescalchi F, Duse S, Parmeggiani F, Gambicorti  
E, Costagliola C, Cohen N, 2009. Effect of subconjunctival and  
intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression  
levels in a mouse model of corneal neovascularization. Mol. Vis. 15,  
2326-2338.