

**T.C.**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALKALİ YANIKLARINDA OLUŞAN KORNEAL  
NEOVASKÜLARİZASYON TEDAVİSİNDE  
KULLANILAN BEVACİZUMAB'IN  
OKSİDAN/ANTİOKSİDAN DENGE ÜZERİNDEKİ  
ROLÜ**

**Elif ERDEM KÜÇÜK**

**Fizyoloji Anabilim Dalı**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**Danışman**

**Prof. Dr. Ebru BEYTUT**

**2014-KARS**

**T.C.**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALKALI YANIKLARINDA OLUŞAN KORNEAL  
NEOVASKÜLARİZASYONUN TEDAVİSİNDE  
KULLANILAN BEVACİZUMAB'IN  
OKSİDAN/ANTIOKSİDAN DENGE ÜZERİNDEKİ  
ROLÜ**

**Elif ERDEM KÜÇÜK**

**Fizyoloji Anabilim Dalı**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**Danışman**

**Prof. Dr. Ebru BEYTUT**

**2014-KARS**

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde Elif ERDEM KÜÇÜK' ün Prof. Dr. Ebru BEYTUT danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “Alkali yanıklarında oluşan korneal neovaskularizasyon tedavisinde kullanılan bevacizumab'ın oksidan/antiokidan denge üzerindeki rolü” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/02/2014

**Tez Savunma Jürisi**

**Başkan:** Prof.Dr. Ebru BEYTUT

**Üye:** Yrd.Doç.Dr. Metin EKİNCİ

**Üye:** Yrd.Doç.Dr. Birkan TOPÇU

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../ 2014  
gün ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serpil DAĞ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bana ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sevgili danışman hocam Prof.Dr. Ebru BEYTUT'a, çalışmamda bana gösterdikleri yardım ve destekten dolayı Tıp fakültesi Göz Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç. Dr. Metin EKİNCİ, Fizyoloji Anabilim Dalı Üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Hamit USLU, Yrd.Doç.Dr. Birkan TOPÇU, Uzm.Dr. Osman İBİŞ, Gözde ATİLA ve diğer öğretim elemanlarına ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen eşim, ailemin tüm bireylerine ve emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AgNO<sub>3</sub></b>	: Gümüş nitrat
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>CAT</b>	:Katalaz
<b>CTGF</b>	: Connective tissue growth factor
<b>DFO</b>	: Desferrioksamin
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>FAB</b>	:Antigen binding fragment
<b>FC</b>	: Cristalizable fragment
<b>FGF</b>	: Fibroblast growth factor
<b>GPx</b>	: Glutatyon peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutatyon Redüktaz
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>GST</b>	: Glutatyon S-Transferaz
<b>HGSF</b>	: Hepatocyte growth factor-scatter factor
<b>HO<sup>·</sup></b>	: Hidroksil Radikali
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Su
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:Hidrojen peroksit
<b>HOCl</b>	: Hipoklorid
<b>IGF</b>	: Insulin-like growth factor
<b>IL-8</b>	:Interlökin-8
<b>KDR</b>	:Kinase insert domain receptor
<b>KOH</b>	:Potasyum Hidroksil
<b>MCP-1</b>	: Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>MMPs</b>	: Matrix metalloproteinases
<b>m- RNA</b>	:Messenger Ribonucleic Acid
<b>NH<sub>4</sub></b>	:Amonyum
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NPDR</b>	:Non Proliferatif Diabetik Retinopati
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	: Süperoksit radikali

<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyonu
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>PBS</b>	:Phosphate buffered saline
<b>PDGF</b>	: Platelet-derived growth factor
<b>PGF</b>	:Placenta growth factor
<b>RCOO<sup>-</sup></b>	: Organik peroksit radikali
<b>ROM</b>	: Reaktif oksijen medyatörleri
<b>RO</b>	: Alkoksil radikali
<b>ROO<sup>-</sup></b>	: Peroksil radikali
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>RPE</b>	: Retina pigment epiteli
<b>SO<sub>4</sub></b>	: Sülfat
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TAS</b>	: Total antioksidan seviye
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	: Transforming growth factor- $\alpha$
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor- $\beta$
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	: Tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>TOS</b>	: Total oksidan seviye
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü Reseptörü
<b>VPF</b>	: Vasküler Permeabilite Faktörü
<b>YBMD</b>	:Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa</b>
Şekiller Dizini	I
Tablolar Dizini	II
Grafikler Dizini	III
Resimler Dizini	IV
<b>1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER</b>	<b>1</b>
1.1.Kornea	3
1.1.1.Kornea Anatomisi	3
1.1.1.1.Epitel Tabaka	3
1.1.1.2. Bowman Tabakası	4
1.1.1.3. Stroma	5
1.1.1.4. Desme membranı	5
1.1.1.5. Endotel tabakası	5
1.1.2. Kornea Fizyolojisi	6
1.1.2.1. Epitel fizyolojisi	6
1.1.2.2. Endotel fizyolojisi	6
1.1.3. Korneanın İşlevleri	7
1.1.4. Kornea Saydamlığı	7
1.1.5.Kornea Dehidratasyonu	8
1.1.6.Kornea Geçirgenliği	8
1.1.7. Korneanın İnnervasyonu	9
1.1.8. Korneanın Metabolizması	9
1.1.3. Korneal Yara İyileşmesi	9

1.1.3.1. Epitel yara iyileşmesi	10
1.1.3.2. Stromal yara iyileşmesi	11
1.1.3.3. Endotel yara iyileşmesi	12
1.1.4. Korneal Neovaskülarizasyon	12
1.1.4.1. Korneal Neovaskülarizasyonun Moleküler Temellerinde Anjiyojenik Faktörler	15
<b>1.2.VEGF</b>	16
1.2.1. Göz Hastalıklarının Vegf ile İlişkisi	20
1.2.2. Anti-VEGF Tedavisi	21
1.2.3. Bevacizumab	22
<b>1.3.OKSİDAN ve ANTİOKSİDAN SİSTEMLER</b>	23
1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri	23
1.3.1.1. Süperoksit Radikali	25
1.3.1.2. Hidrojen Peroksit	25
1.3.1.3. Hidroksil Radikali	26
1.3.1.4. Singlet Oksijen	27
1.3.1.5. Total Oksidatif Stres	27
1.3.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Olan Zararlı Etkileri	27
1.3.2.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu	28
1.3.2.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu	29
1.3.2.3. Karbonhidratlara Etkileri	29
1.3.3. Oksidatif Stres ve DNA Lezyonları	30



1.3.4.Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları	31
1.3.4.1. Antioksidan Sistemler	31
1.3.4.2. Enzimatik Antioksidanlar	33
1.3.4.2.1 Süperoksit Dismutaz (SOD):	33
1.3.4.2.2.Katalaz (CAT):	34
1.3.4.2.3.Glutatyon Peroksidaz (GPx):	34
1.3.4.2.4.Glutatyon Redüktaz (GR):	34
1.3.4.2.5.Glutatyon-S-Transferazlar (GST):	34
1.3.4.3.Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri	35
1.3.4.3.1. Glutatyon (GSH):	35
1.3.4.3.2. Vitamin C (Askorbik Asit):	35
1.3.4.3.3.Vitamin E (Tokoferol):	35
1.3.4.3.4. Vitamin A ( $\beta$ -Karoten):	36
1.3.4.3.5. Seruloplazmin	36
1.3.4.3.6.Ferritin	36
1.3.4.3.7. Transferrin ve Laktoferrin:	36
1.3.4.3.8.Haptoglobin ve Hemopeksin:	36
1.3.4.3.9.Desferrioksamin (DFO):	36
1.3.5. Total Antioksidan Kapasite	37
1.3.6.Serbest Oksijen Radikallerinin Gözle İlişkisi	38
<b>2. MATERYAL VE METOT</b>	<b>39</b>
<b>2.1.MATERYAL</b>	<b>39</b>

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler	39
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzeme	39
<b>2.2. METOT</b>	40
2.2.1. Deneklerin Seçimi	40
2.2.2. Korneada alkali yanığı oluşturulması	41
2.2.3 İlaçlar	41
2.2.4 Korneaların ve kan örneklerinin alınması	41
2.2.5 Kornea dokusunun homojenizasyonu	42
<b>2.3 TAS ve TOS Değerlerinin Kit ile Belirlenmesi</b>	42
2.3.1 Plazma ve Doku Antioksidan ve Oksidan düzeylerinin Belirlenmesi	42
2.4. Total Antioksidan Seviye (TAS)	42
2.5. Total Oksidant Seviye (TOS)	43
<b>3.BULGULAR</b>	
3.1. Plazma Total Antioksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması	44
3.2. Eritrosit Total Antioksidan Düzeylerinin Gruplara Arası Karşılaştırması	45
3.3. Kornea Total Antioksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması	46
3.4. Plazma Total Oksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması	47
3.5. Eritrosit Total Oksidan Düzeylerinin Gruplara Arası Karşılaştırması	48
3.6. Korneadaki Total Oksidan Düzeylerinin Gruplara Arası Karşılaştırması	49
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	51
<b>5.ÖZET</b>	57

<b>6.ABSTRACT</b>	59
<b>7.KAYNAKLAR</b>	61
<b>8.ÖZGEÇMİŞ</b>	73

	<b>Sayfa</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>No</b>
<b>Şekil 1.</b> Stromal yara iyileşmesinde keratosit hücre dönüşümü	11
<b>Şekil 2.</b> VEGF'nin reseptör etkileşimi aracılığıyla oluşan etkileri.	17
<b>Şekil 3.</b> VEGF İzoformları	18
<b>Şekil 4.</b> VEGF Reseptörleri	19

<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Korneal neovaskularizasyon ile ilişkili hastalıklar	13
<b>Tablo 2.</b> Korneada çalışılmış olan anjiyojenik faktörler	15
<b>Tablo 3.</b> Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları	24
<b>Tablo 4.</b> Plazma, Eritrosit ve Kornea gruplarının Total Antioksidan Düzeyleri	44
<b>Tablo 5.</b> Plazma, Eritrosit ve Kornea Gruplarının Total Oksidan Düzeyleri	47

<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Grafik 1.</b> Kornea yanığı grubu, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların plazma TAS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).	45
<b>Grafik 2.</b> Kornea yanığı grubu, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların eritrosit TAS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).	46
<b>Grafik 3.</b> Kornea yanığı grubu, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların kornea TAS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).	47
<b>Grafik 4.</b> Korneada alkali yanığı oluşturulan grup, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların plazma TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).	48
<b>Grafik 5.</b> Korneada alkali yanığı oluşturulan grup, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların eritrosit TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).	49
<b>Grafik 6.</b> Korneada alkali yanığı oluşturulan grup, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların kornea TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).	50

## 1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Kornea yanığı gibi göz hastalıklarında ve diğer organ patolojilerinde vasküler geçirgenliğin artmasına ve neovaskülarizasyonun gelişmesine neden olan en önemli anjiyogenik faktörün, hücreler tarafından salgılanan ve yeni damar oluşumunda bir protein olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda, vasküler endotelin proliferasyonunu inhibe edici maddelerin bir denge halinde bulunduğu da ifade edilmektedir. Ancak bu dengenin kornea dejenerasyonuna neden olan neovaskülarizasyon prolife edici faktörlerin lehine bozulduğu da bir gerçektir (18).

VEGF, endotel hücre mitozunu ve damar geçirgenliğini arttıran bir faktördür. Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Hipoksi varlığında VEGF' nin m- RNA sentezini 30 katına çıkardığı bilinmektedir (68,83). Hipoksiye bağlı sitümlasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF ve diğer büyüme faktörleri, artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olurlar (111). Korneal dejenerasyonlara neden olan neovaskülarizasyonlarda endotelin- I' e bağlı retina kan akımı azalması ve oksidatif strese neden olan diğer ajanlar (VEGF medyatörleri), VEGF duyarlılığı bulunduğundan, VEGF etkisi ile nonproliferatif damarsal anormalliklerde ortaya çıkarlar. Bununla birlikte, Anti VEGF ajanları, VEGF adı verilen yeni kan damarlarının oluşumunu tetikleyen kimyasal sinyali tanırlar ve bloke ederler (54).

Retina metabolik aktivitesi en yüksek dokulardan biri olarak oksijen radikallerinin oluşumu için uygun bir ortam teşkil eder. Retinada oksidatif stresten korunmak için enzimatik (Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit dismutaz gibi...), non enzimatik (E vitamini, C vitamini, karotenoidler...) antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur (129). Tüm bu bilgilerden yola çıkarak yaptığımız literatür araştırmalarında Anti-VEGF ajanlar hakkında edinilen bilgi ve deneyim arttığı zaman istenmeyen yeni damar oluşumuna neden olan oksidatif stres ve sekonder tüm hastalıkların engellenebileceği ve bununla birlikte yine yapılan literatür taramalarında Bevacizumab'ın korneal vaskülarizasyona etkisi ile ilgili çalışmaların

oldukça sınırlı olduğu ve bu ajanların korneadaki oksidan ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmanın yapılmadığı dikkat çekmiştir. Bu nedenle çalışmada deneysel neovaskülürizasyon oluşturularak tedavi amacıyla kullanılan Anti-VEGF ajanlarının korneadaki oksidan ve antioksiadan dengeyi nasıl etkilediğini saptamak amaçlanmıştır.



## **1.1.KORNEA**

### **1.1.1.KORNEA ANATOMİSİ**

Embriyolojik olarak kornea, nöroektoderm ve mezenşim olmak üzere iki dokudan köken almaktadır. İlk olarak kornea epitel ve desme zarı intrauterin hayatın 8. haftasında yüzeysel ektoderm tabakasından gelişmekte daha sonra da nöroektodermden endotel tabaka oluşmaktadır. 5. ayda mezenşim dokunun kaybolmasıyla kornea stroması ve yüzey tabakada bu hücrelerin yoğunlaşmasıyla da Bowman katı gelişmektedir (16,123).

Makroskopik olarak bakıldığında skleranın devamı ve 1/3 ön kısımda yer alan saydam ve optik özelliğe sahip olan kısım Korneadır(3). Skleraya adeta saat camı gibi yerleşen ve 40-45 Dioptri (D) kırma gücüne sahip olan Korneanın konveks bir yüzeyi vardır. Kornea optik görevi dışında dış ortama karşı koruyuculuk görevini de üstlenmiştir (3,123).

Normal kalınlığı merkezde 520 µm, periferde 650 µm'dir. Erişkinde horizontal çapı 12.6 mm, vertical çapı 11.7 mm, ön eğrilik yarıçapı 7.8 mm ve arka eğrilik yarıçapı 6.8 mm' dir (3,135). Yeni doğan döneminde vertikal kornea çapı 10mm'dir.Kırıcılık gücü yaklaşık 51 D'dir. Bir yaşında erişkin seviyeye ulaşır (93,127)

Kısaca kornea 5 anatomik tabakadan oluşur:

- 1- Epitel tabakası
- 2- Bowman tabakası
- 3- Stroma
- 4- Descement membranı
- 5- Endotel tabakası

#### **1.1.1.1.Epitel Tabaka :**

40-50 mikron kalınlığına sahip olan kornea epitel, korneanın 1/10'luk kısmını oluşturur. 5 ile 7 tabaka arasında oluşan bu kısımda üç tip hücre vardır:

1-Yüzeysel hücre

2-Poligonal kanatsız hücre

3-Kolumnar bazal hücre

Yüzeysel hücrelerin, elektron mikroskopik incelemede çok sayıda mikrovillus ve plika içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin yüzeyi mikrokaliks ile örtülüdür. Bu yapıları sayesinde epitel tabakanın gözyaşı filmine yapışmasına yardımcı olurlar. Hücreler arasındaki bu sıkı bağlantılar sayesinde hücreler arasında anatomik bariyer oluşturulmuştur (93).

Tek sıra halinde bazal membran üzerinde dizili duran Kolumnar hücreler mitotik aktiviteye sahiptirler. Çoğalıp öne doğru ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar. Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunur. Tonofilamanlar ile hücrenin iskeleti korunur. Aktin filamanlar ise yara iyileşmesi sırasında hücre göçünde rol alır (93).Yenilenme kabiliyeti çok yüksek olan kornea epiteli, gözyaşı, aköz hümör ve limbal kapillarlardan beslenir. Oksijen ihtiyacını atmosfer konjonktiva ve kapak damarları ile aközden temin eder. Glukozu ise aközden sağlar. Laktik asit birikimi, epitel hücre membranını harap ederek bazal hücreyi bazal membrana yapıştırıp kornea ödemeine sebep olur. Bu da kistik değişiklikler, erozyon ve neovaskülarizasyonu oluşturur. Ödem oluşumu görme bozukluklarına, ışık yansımaları ve düzensiz astigmatizmaya yol açar. Keza, epitel tabakası olmadığında stromal iyileşme gecikir (127,132).

#### **1.1.1.2. Bowman Tabakası :**

Bowman tabakası, kısa kollojen fibrillerden oluşan, 8 -14 µm kalınlıkta, travmalara karşı oldukça dirençli bir tabakadır. Mikroorganizma ve tümör hücrelerine karşı bariyer oluşturarak bunların korneaya invazyonlarını engeller. Yenilenme yetenekleri olmadığından dolayı travmalardan sonra ince bir tabaka halinde iyileşir ancak eski haline geri dönemezler (74).

### **1.1.1.3. Stroma :**

Kornea kalınlığının %90'ını oluşturan stromanın %78'i sudur ve 500 µm kalınlığındadır. Mukopolisakkaritlerle lameller tarzda ayrılan kollajen lif demetleri birbirlerine paralel olarak uzanırlar. Bu da lameller greftte alt tabakaların kolayca ayrılmasını sağlar. Fibril dizilişlerinde oluşan herhangi bir patoloji şeffaflığı olumsuz etkiler. Travma, enfeksiyon ve distrofi gibi anomaliler stromada ödem ve skar dokusunun oluşumuna neden olur (74).

### **1.1.1.4. Desme membranı :**

Stromanın arka kısmında 10 µm kalınlığında bir tabakadır. Elastik özelliğe sahip olmakla birlikte, kalınlığı yaşın ilerlemesiyle artar. Bazal membranı iç kısımdaki endotelyumdur. Bu nedendir ki korneanın endotelial hastalıkları bu membranın yapısında karakteristik değişikliklere yol açar. Açıya 2 mm uzaklıkta sonlanarak Schwalbe çizgisini oluşturur (74).

### **1.1.1.5. Endotel tabakası :**

Endotel hücreleri, doğumdan sonra yaklaşık 3500 – 4000 hücre / mm<sup>2</sup> iken erişkinlerde 2500-3000 hücre / mm<sup>2</sup> düzeyindedir. Bu tabakada yaklaşık 350 – 400 bin hücre bulunmaktadır (4). Bu hücreler, 4-5 mm kalınlığında, 18-20 mm genişliğinde poligonal hücrelerdir. Aközle direkt temas halinde olan bu tabaka, korneayı besler. Endotel tabakasında ısıyla değişebilen aktif pompa mekanizması mevcuttur. Çocukluk döneminde mevcut olan Endotelial hücre bölünmesi yaşın ilerlemesi ile birlikte kaybolur. Yaşın ilerlemesiyle hücre sayısında azalma, büyüklüğünde ise artış olur. Bu yüzden kornea nakillerinde genç donörlerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Hücre sayısı 300-400 mm<sup>2</sup>'nin altına düştüğünde ödem şekillenir. Aşırı stres ve travma, endotel hücrelerini fibroblast benzeri hücrelere dönüştürebilmektedir. Korneada endotel kaybı olduğunda kendilerini yenileyemeyen bu hücreler genişleyerek kayıp olan yerleri doldururlar (79,133)

## 1.1.2. KORNEA FİZYOLOJİSİ

### 1.1.2.1. Epitel fizyolojisi

Korneanın lipit geçirgen özelliğe sahip olan epitel ve endotel hücreleri gerek mekanik bariyer, gerekse sıvı ve iyon dengesinin sağlanmasıyla korneanın korunmasında önemli görevlere sahiptirler. Korneada metabolik olarak aktif olan keratosit, endotel ve epitel hücreleri canlılıklarını devam ettirebilmek için enerjiye ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijen, kornea epitel tabakasına difüzyonla gözyaşı aracılığıyla sağlanırken, göz kapalı iken ise limbal damarlar aracılığı ile sağlanır (41). Aköz humör aracılığıyla aminoasit ve vitaminler temin edilir. Epitel hücrelerinin başlıca enerji kaynağı glikoz ve glikojen depolarıdır. Çoğunlukla humör aközden elde edilen glikozun % 10'u ya da daha azı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilmektedir. Glikojen depolama özelliğine sahip olan epitel hücreleri, hipoksi ve travma gibi durumlarda bu depoları kullanabilmektedirler. Kornea hücreleri glikozu % 65 sıklıkta aerobik ve anaerobik glikoliz yoluyla, geri kalanını da pentoz-fosfat şantı ve özellikle epitel tabakada trikarboksilik asit siklusu ile metabolize ederler. Epitel hücreleri, aralarında bulunan sıkı bağlantılar nedeniyle, iyon geçirgenliğine en fazla direnç gösteren hücrelerdir. Bu özellikleriyle, stromanın su dengesine katkıda bulunurlar (12).

### 1.1.2.2. Endotel fizyolojisi

Endotel hücrelerinin ana enerji kaynağı aköz humörden sağlanan glikozdur. Aktiviteleri için anaerobik, daha az olarak da aerobik yolları kullanırlar. Endotel hücrelerinin en önemli görevi, korneanın şeffaf ve saydam kalmasını sağlamaktır. Bunu yaparken hem aktif bir pompa gibi çalışır, hem de mekanik bir bariyer oluştururlar. Endotel hücreleri normal pompa fonksiyonu için gerekli oksijeni aköz humörden sağlarlar. Kornea endoteli dehidratasyon görevini yaptığı sürece, stromanın su içeriği % 78 ve kalınlığı 530  $\mu$  civarında kalarak normal fonksiyonlarını sürdürür. Endotel hücreler arasındaki sıkı bağlantılar (tight junction ve gap junction) bariyer görevi görürler. Endotel hücrelerin dış kenarlarına lokalize olan sodyum-potasyum-adenozintrifosfaz (Na-K-ATP'az) pompa sistemi ile su ve elektrolitler dengelenerek, aynı seviyede tutulur. Bu pompa, enerji harcayarak sodyumun hücre

dışına çıkmasını sağlar, bunu suyun hücreyi terk etmesi izler. Böylece kornea stromasından ön kamaraya doğru devamlı sıvı geçişi olurken, korneanın şeffaflığı korunur. Korneadan ön kameraya geçen sıvının geri dönmesi endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile önlenmektedir. Hekzagonal yapıda olan endotel hücreleri, sıvı regülasyonu için ideal dizilimi oluşturmaktadır. Bu geometrik düzen maksimum sayıda hücre ve maksimum sayıda pompa yoğunluğunu temin etmektedir. Korneanın şeffaflığının korunması, endotel hücrelerinin etkin fonksiyonlarının yanı sıra, korneada damarsal yapıların bulunmamasına, sinir liflerinin miyelinsiz olmasına ve stroma takasındaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine de bağlıdır (21,128).

Korneanın duysal innervasyonu trigeminal sinirin Oftalmik dalı ve uzun siliyer sinirler aracılığı ile sağlanır. Sinir lifleri limbusta miyeline sahip iken, korneada miyelinlerini kaybederler. Özellikle ön stromada ve Bowman tabakası altında yoğunlaşan sinir lifleri, epitel tabakada uzantılar gösterirler. Descemet membranı ve endotel tabaka sinirsel uyarıma sahip değildirler. Ağrıya çok duyarlı olan korneada ağrı ve soğuk reseptörleri daha fazla bulunmaktadır (92).

### **1.1.3. Korneanın İşlevleri**

Kornea, kırıcılık, saydamlık, dehidratasyon ve ilaç geçirgenliği gibi önemli özelliklere sahip; skleranın devamı ve ön kısmın üçte birlik bölümünde yer alan saydam ve optik özelliği olan bölümdür (17).

### **1.1.4. Kornea Saydamlığı**

Korneanın saydamlığı için gerekli ilk şart, kollajen demetlerinin birbirlerine paralel ve düzgün dizilimidir. Fibriller birbirleri ile aynı uzaklıktadır. Ancak kornea saydamlığının devamı sadece kollajen liflerin düzgün ve simetrik dizilimine bağlı değil; aynı zamanda kollajen demetlerin uzaklığı ışık dalga boyundan kısa olduğu sürece devam eder. Göz içi basıncının ani artışı glikozaminoglikan yapı içinde düzgün dizilmiş kollajen demetlerinin dağılımını değiştirdiğinden kornea saydamlığı değişebilir. Ayrıca korneanın saydamlığının korunabilmesinde bir başka önemli şartta onu çevreleyen sıvıların osmotik basınçlarının en az intersitisyel sıvı basıncı düzeyinde olmasıdır (17,132).

### **1.1.5.Kornea Dehidratasyonu;**

Toplam ağırlığının %75 – 80'i su olankorneanın su içeriği 5 faktöre bağlıdır:

1. Gerek mekanik gerekse kimyasal faktörlerin bozulmasına bağlı olarak korneanın endotel ve epitel tabakalarının anatomik bütünlüğünün bozulması korneada su tutulumunu kaçınılmaz yapar. Keza, epitel hücreleri gözyaşına karşı, endotel hücreleri ise aköz hümöre karşı bariyer oluşturmak suretiyle endotel hücreleri aktif bir pompa gibi çalıştırarak dehidratasyona neden olurlar.
2. Kornea stromasında bulunan glikozaminoglikanlar buraya hidrofilik bir özellik kazandırır. Bu nedenle de stromaya doğru sürekli bir su akımı vardır (132).
3. Kornea metabolizmasının bozulması, endotel hücrelerin aktif pompa fonksiyonunu bozarak suyun korneada tutulumuna yol açar (101).
4. Göz yüzeyindeki buharlaşma sıvıyı azaltmak suretiyle gözyaşının osmolaritesini arttırarak kornea dehidratasyonuna neden olur.
5. Göz içi basıncının aşırı derecede yükselmesi hem korneadaki endotel hücre fonksiyonlarını bozarak, hem de stromaya karşı aköz hidrostatik basıncı arttırarak kornea ödemeine yol açar (132).

### **1.1.6.Kornea Geçirgenliği;**

Lipit yapıda olan kornea epiteli özellikle ilaçlar için önemli bir bariyer oluşturmakla birlikte, oksijen, glikoz ve ilaç gibi maddelerin geçirgenliği korneanın katlarıyla ilişkilidir. Kornea epiteli kaldırıldığında suda eriyen maddelerin penetrasyonu logaritmik olarak artar. Hidrofilik yapıya sahip olan stroma ise suda eriyen maddelere karşı geçirgenken, lipofilik maddelere karşı geçirgen değildir.

Kornea geçirgenliğini etkileyen diğer mekanizmalar ise şunlardır;

1. Maddenin kimyasal yapısı ( hidrofilik – lipofilik)
2. Maddenin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu
3. Maddelerin pH düzeyi ve osmolaritesi

#### 4. Yüzey gerilimi ve ıslanma açısı (132)

##### **1.1.7. Korneanın İnnervasyonu;**

Sinir yönünden çok zengin olan korneadaki sinirlerin tümü duyu sinirleridir. N. Trigeminus'un oftalmik dalından (V1) gelen uzun arka siliyer sinirler ön ve arka dala ayrılarak korneaya ulaştıkları noktada miyelin kılıflarını kaybederler. Ön kısma giden sinirler epitel bazal membranda sonlanırken, endotel tabakasında sinir lifi mevcut değildir. Korneada fonksiyonu tam bilinmemekle beraber sempatik sinir lifleri de tespit edilmiştir (3).

##### **1.1.8. Korneanın Metabolizması:**

Korneanın saydamlığını ve dehidratasyonunu devam ettirebilmek için enerji gereksinimi şarttır. Kornea enerji için gerekli olan glikozunu aköz hümörden alır. Gözyaşı ve limbal kapillarlara yolu ile korneaya glikoz kazancı düşük seviyelerdedir. Glikoz korneada "Krebs siklusu" ile enerjiye dönüştürülür. Krebs siklusu için ise oksijene ihtiyaç vardır. Kornea endoteli enerji için gerekli olan oksijeni aköz hümörden, epitel ve stroma ile limbal damarlardan ve gözyaşında çözünmüş şekilde karşılar. Glikoz glikojen olarak epitel tabakada depolanır. Epitel tabaka stromaya göre çok daha yüksek düzeylerde ATP, glikojen ve oksidatif enzim içerir. Korneanın endotel tabakasının enerji ihtiyacı Krebs siklusunun yanı sıra pentoz fosfat şanti ile de karşılanabilir. Bu sayede kornea epiteli lipid sentezini gerçekleştirebilir. Elektrolit bakımından korneanın stroması  $Na^+$ , epiteli ise  $K^+$  iyonu bakımından oldukça zengindir. Korneanın Krebs siklusu (glikoz) iodoasetat gibi metabolik zehirlerle bloke edildiğinde korneada su tutumu ve ödem gerçekleşir. Keza, ATP yokluğunda epitel ve endotel metabolizması bozularak  $Na^+-K^+$  ATP az pompası çalışmaz, dolayısıyla da korneada elektrolit ve su tutumu görülür (122).

##### **1.1.3. KORNEAL YARA İYİLEŞMESİ**

Korneadaki hasarın büyüklüğü ve etyolojisine göre farklı şekillerde yara iyileşmesi gözlenmektedir. Büyüme faktörü, sitokin ve ekstrasellüler matriks proteinleri yara iyileşmesinde oldukça önemli rollere sahiptirler.

### 1.1.3.1. Epitel yara iyileşmesi

Kornea yara iyileşmesinde ilk basamak olarak gözlenen epitel iyileşmesi 3 fazda gerçekleşir (16):

1. Latent faz (ilk saatlerde görülür)
2. Epitel migrasyon ve proliferasyon fazı
3. Kalıcı hücre adezyon fazı

Epitel bazal hücreler mitoz bölünmeyle her yedi günde bir yenilenirken yaralanmalarda bu süre daha da kısalmıştır. Yaralanmadan sonra bazal hücrelerde, DNA sentezinde ve mitozda duraklama gözlenirken, hemen ardından komşu epitel hücrelerin birbirinden ayrılması ve fibrin ile sarılması oluşur. Yaralanmadan bir saat sonra polimorf nüveli lökositler yara yerine gelerek bazı enzimlerin salınımına ve kemotaksise neden olurlar. Daha sonraki 12-24 saat içerisinde lenfositlerin ve makrofaj hücrelerinin göçü başlar. Epitel hasarı derinleştğinde 10-15 saatlik süre içerisinde bazal hücreler de olaya katılır ve hasarlı bölgeye doğru göç ederler. Latent fazda, hasarlı alan epitel hücreleri tarafından kapanmadan önce bir glikoprotein olan fibronektin ile kaplanır. Fibronektin; Kornea hasarlarında, komşu epitel hücre göçü için gerekli ekstrasellüler matriks görevini görmek yanı sıra hücre adezyonu ve migrasyonundan sorumludur. Epitel hasarı sırasında salgılanan fibronektin, iyileşme sonrasında ortamdan uzaklaşır. Bazal membran hasarı söz konusu olduğunda epitel iyileşmesi 4-6 haftalık sürede gerçekleşir(110,137).

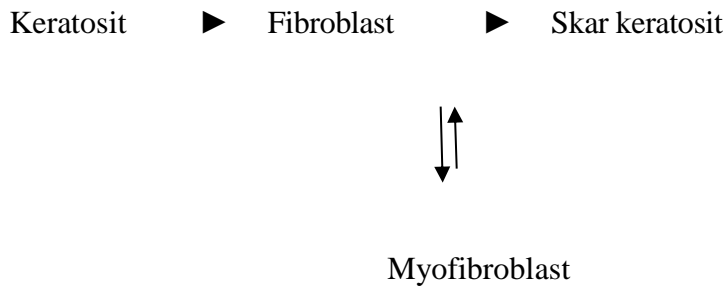
Yüksek mitoz hızına sahip limbal kök hücreleri korneal epitel iyileşmesinde önemli bir role sahiptir. Santral epitel defekti esnasında, periferdeki limbal hücreler merkeze doğru göç ederek, kornea epitelinin devamlılığını sağlarlar. Limbal hücreler hasara uğradığında, periferden santrale olan göç gerçekleşir ancak, normal limbal iyileşme tamamlanmadığı için merkezdeki lezyon kapanmaz bu da kornea epitel iyileşmesinde limbal kök hücrelerinin oldukça önemli olduğunu göstermektedir(39).



### 1.1.3.2. Stromal yara iyileşmesi

Stromal yara iyileşmesi epitel iyileşmeye benzemekle birlikte iyileşme daha uzun sürer ve genellikle kollajen skar dokusu gelişimi ile sonuçlanır. Doku hasarından sonraki iki saat içerisinde polimorf nüveli lökositler yara dokusuna ulaşarak kemotaksisi başlatır ve 72 saat sonra geri çekilirler. Mononükleer hücreler ise 12-24 saat içerisinde yara yerine gelir ve fagositoza yardımcı olurlar. Hasarlı epitel tabakasının alt tarafında apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla, iyileşme tamamen başlar. Daha sonra stromal keratositler aktif fibroblastlardan miyofibroblastlara dönüşürler (63). (şekil-1). Kontraktil özelliklere sahip olan bu hücreler kollajen, glikozaminoglikan ve diğer matriks proteinlerini üretirler. Bir skar protein olan Tip III kollojen, yara kontraksiyonundan sorumlu ekstrasellüler matriks tarafından üretilmektedir. Yeterli seviyede kollajen sentezledikten sonra bu sentez gerek doku gerek enflamatuvar hücreler tarafından üretilen kollajenaz enzimleri ile dengede tutulur. Skar oluştuktan sonra tip III kollajen, stromanın normal yapısında bulunan tip I kollajen ile yer değiştirir. Hiyaluronik asit üretimi stromada ilk hafta içerisinde görülür ve zamanla hiyaluronik asit üretimi durur ve bunun yerine glikozaminoglikanlardan, kondroitin sülfat ve keratin sülfat üretilmeye başlar. Glikozaminoglikanların, yara iyileşmesinde hücre büyümesi ve hücre hareketi için gerekli olan hidrate ortamını sağladıkları ifade edilmektedir (63).

Hasarın ikinci haftası Kontraktil faz başlar. Tıpkı kas hücrelerindeki gibi, miyofibroblastlarda da aktin ve myozin kontraktil üniti oluşmaya başlar (71).



**Şekil 1** Stromal yara iyileşmesinde keratosit hücre dönüşümü.

### 1.1.3.3. Endotel yara iyileşmesi

Epitel hücrelerinin ve keratositlerin aksine, endotel hücrelerde mitotik aktivite yoktur. Korneanın endotel hasarı gerçekleştiğinde buradaki sıvı transport mekanizması bozularak kornea ödemi oluşur. Ölü endotel hücrelerinin yerlerini doldurmak için, komşu endotel hücreleri genişler ve hasar yerine doğru göç ederler. Endotel göçü en fazla cerrahi travma gibi dekompanzasyonun olduğu durumlarda olur (14,92).

Kornea endotel iyileşmesinde, endotel büyüme faktörü ile platelet derived büyüme faktörü reseptörlerinin oldukça önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (57,67). Kornea yaralanmalarında lakrimal bezden elde edilen endotel büyüme faktörünün topikal uygulanmasının, endotel yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (67). Platelet derived büyüme faktörü, endotel hücre dansitesini ve DNA sentezini artırırken, endotel yara kapanma süresini ise kısalmaktadır (67).

### 1.1.4. KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYON

Neovaskülarizasyon, önceden damarsız olan bir bölgede yeni damar yapılarının oluşmasıdır. Bu iki mekanizma ile gerçekleşir.

#### 1.Vaskülojenez

#### 2.Anjiyojenez

Vaskülojenez, özellikle embriyojenez sırasında, kemik iliği anjiyoblastlarından yeni damarların oluşmasıdır. Anjiyojenez ise yeni damarların önceden var olan damar yapılarından oluşmasıdır. Anjiyojenez tümörler, korneal ve retinal hastalıklarda anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki denge anjiyojenik faktörler tarafına kaydığında meydana gelmektedir (13,52,69).

Korneal hasar sonrasında yara iyileşmesi genellikle neovaskülarizasyon olmadan gerçekleşir. Ancak çeşitli inflamatuvar, infeksiyöz, dejeneratif ve travmatik hastalıklara bağlı yara iyileşmesi korneal neovaskülarizasyona yol açabilmektedir.

**Tablo-1:** Korneal neovaskularizasyon ile ilişkili hastalıklar

## İnflamatuvar hastalıklar

Okuler pemfigoid

Atopik konjonktivit

Rozasea,

Korneal doku reddi

Lyell sendromu

Stevens- Johnson sendromu

Graft versus host hastalığı

## İnfeksiyöz keratitler

Viral: Herpes simpleks, herpes zoster

Bakteriyel: Psödomonas, klamidy, sifiliz,

Fungal: Kandida, fuzariyum, aspergillus

Parazitik: Onkoserkiyazis

## Dejeneratif-Konjenital Hastalıklar

Pterijiyum

Terrien'in marjinal dejenerasyonu

Aniridi

## Travmatik-İyatrojenik Hastalıklar

Kontakt lensler

Alkali yanık

Korneal ülserasyon

## İyatrojenik

### Limbal kök hücre yetmezliği

Korneal neovaskülarizasyonun etyolojisi tam olarak anlaşılmamakla birlikte korneal hasar limbal sınırdaki oluştuğunda epitelyal defekt korneal epitel ve komşu limbal epitelyum tarafından kapatılır. Limbal epitelde normal korneal epitele dönüşebilen kök hücreler bulunmaktadır. Limbal kök hücre yıkımına yol açan hasarlar konjonktival epitel ile onarılır. Konjonktiva epitelinde goblet hücreleri vardır ve bunlar vaskülarize bir yapıya sahiptirler. Bu görme keskinliğini azaltır (64,131)

Önemli bir oküler komplikasyon olan korneal neovaskülarizasyon; korneal skar, ödem, lipid birikimi ve inflamasyona neden olarak görme keskinliğini azaltmaktadır (33).

Neovasküler korneanın optik kalitesi birkaç nedenden dolayı azalır (38):

1. Damarlarda dolaşan kan hücrelerinin oluşturduğu opasitede,
2. Damar duvarlarının düzensiz, yapısının beklenenden fazla sapmalara

Sebebi olması durumunda,

3. Damarlar arasındaki kollajen yerleşiminin bozulduğu durumlarda,
4. Geçirgen damarların etrafındaki dokularda ödem, sıvı ve lipid birikimi esnasında,
5. Korneal yüzey düzensizliği durumlarında.

Korneal neovaskülarizasyon alkali kimyasal maddelere bağlı oluşan geniş hasarın onarımının bir parçası olarak kabul edilir. Ancak şiddetli hasarın onarımında neovaskülarizasyon geç fazda patolojik olarak kabul edilmektedir. Bu fazda epitelyasyon tam olarak şekillenmekle birlikte korneayı limbal kök hücre hasarına bağlı olarak korneayı fibrovasküler pannus kaplayabilmektedir (15,82).

Kornea, oftalmik arterin dalları olan siliyer arterlerin oluşturduğu, limbal bölgede yer alan perikorneal pleksustan beslenir. Korneal neovaskülarizasyon özellikle

perikorneal pleksustaki kapilla ve venüllerden köken alan yeni damarlar tarafından oluşturulur ve farklı şekillerde görülebilir. Genellikle üç klinik formda incelenir (79):

1. Yüzeysel neovaskülarizasyon,
2. Vasküler pannus,
3. Derin neovaskülarizasyon.

Yüzeysel neovaskülarizasyonda, damarlar yüzeysel marjinal arkuattan köken alır ve epitel boyunca uzanırlar. Bu durum, korneal travma, hafif kimyasal yanık, inflamasyon ve infeksiyonlarda görülmektedir. Vasküler pannusta, limbustan periferik korneaya kollajen ve damarlar uzanır. Derin neovaskülarizasyon, Bowman tabakasından Descemet zarına kadar gelişebilmekte ve genellikle ciddi ön segment hasarlarında görülmektedir (4,42,61).

#### **1.1.4.1. Korneal Neovaskülarizasyonun Moleküler Temellerinde Anjiyojenik Faktörler**

Korneanın damarsız yapısının koruyabilmesi için bazal durumlarda anjiyojenik faktörlerin seviyelerinin düşük, anti-anjiyojenik faktörlerin seviyelerinin ise yüksek olması gerekir. Bu denge anjiyojenik faktörler tarafına kaydığında neovaskülarizasyon meydana gelir (38). Bütün infeksiyöz keratitler korneal neovaskülarizasyona sebep olabilmesine karşın, Akantamoeba keratitlerinin çok şiddetli ve uzun süreli olanlarında bile neovaskülarizasyon oluşmadığı durumlar bildirilmiştir (53,80).

Korneada çalışılmış olan anjiyojenik faktörler Tablo-2’de gösterilmiştir.

#### **Tablo-2: Anjiyojenik faktörler**

Fibroblast growth factor (FGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Placenta growth factor (PGF)

Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF-  $\beta$ )

Insulin-like growth factor (IGF)

Leptin

Integrinler

Platelet-derived growth factor (PDGF)

Matrix metalloproteinases (MMPs)

Angiogenin

Hepatocyte growth factor-scatter factor (HGSF)

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ )

Connective tissue growth factor (CTGF)

Interleukin-8 (IL-8)

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

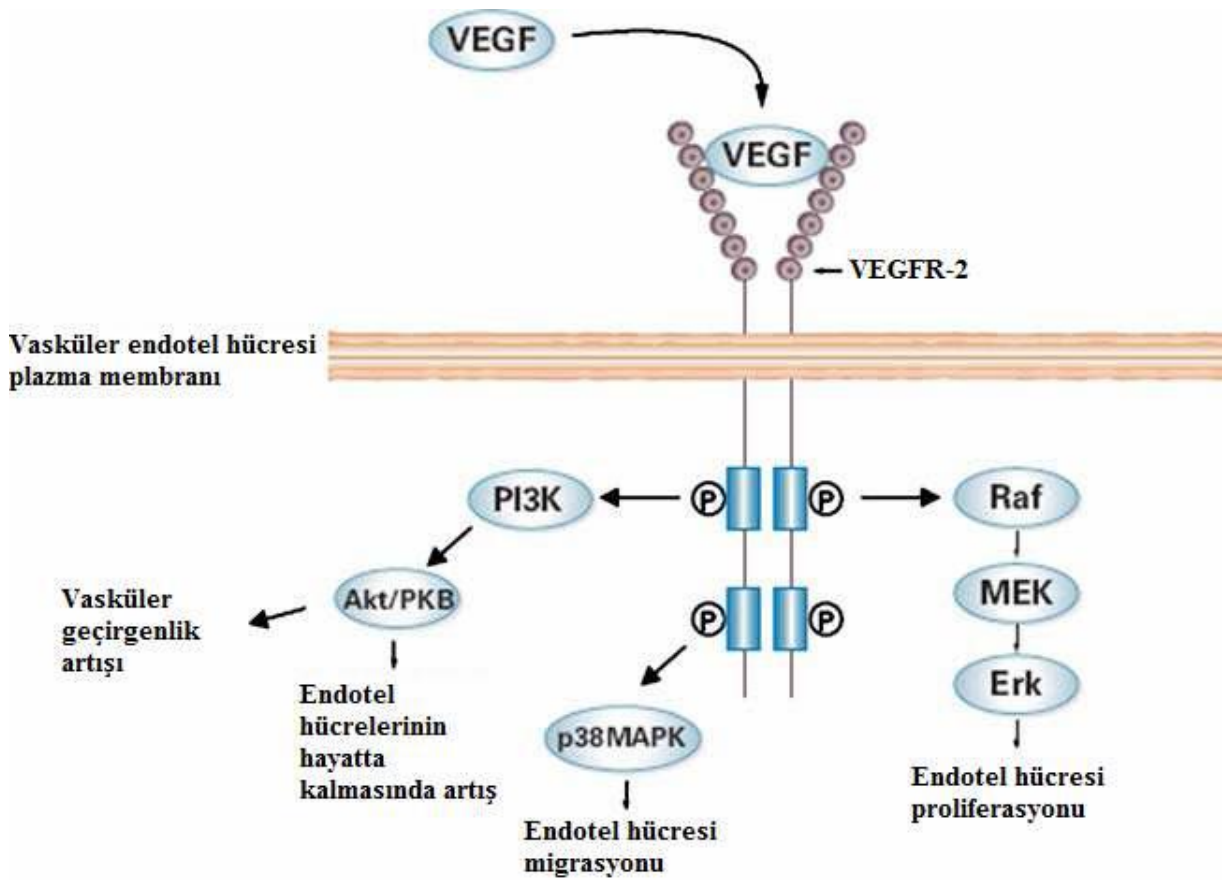
## 1.2. VEGF

Tümör Vasküler Permeabilite Faktörü VPF (112) olarak isimlendirilen VEGF'in asıl tanımlanması 1989 yılında gerçekleşmişti (50).1983 yılında VEGF ailesine ait dört adet izoformu tespit edilmekle birlikte en aktif üyesi VEGF-A olduğu bildirilmiştir. Diğer izoformlardan VEGF-B'nin fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemekte ancak VEGF-C ve VEGF-D'nin lenfanjiyogenez işinde rol aldığı belirtilmektedir (121). Anjiyogenez ve endotel hücrelerinin gelişiminde en etkili olan faktör ise VEGF- A' dır (49).

VEGF-A geni, insan- VEGF olarak bilinir. VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> olarak isimlendirilmiş altı adet izoformu vardır. Bu izoformlardaki sayılar sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir. VEGF<sub>121</sub> izoformu hariç hepsi heparine bağlanır. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub> ve VEGF<sub>165</sub> salgılandığında kolaylıkla diffüze olabilen ve erimiş

formları sıvılarda saptanabilen izoformlardır. VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> ise salgılandığında hücre aracılı olarak kaldıklarından testlerle kolayca saptanamazlar. VEGF'ün orijinal karakteristik formu VEGF<sub>206</sub>'dır. VEGF<sub>165</sub> izoformu, hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanma özelliği olan ve en yüksek biyolojik olarak en yüksek aktiviteye sahip olan dominant bir subtiptir. VEGF<sub>189</sub> heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı artırır (23,120).

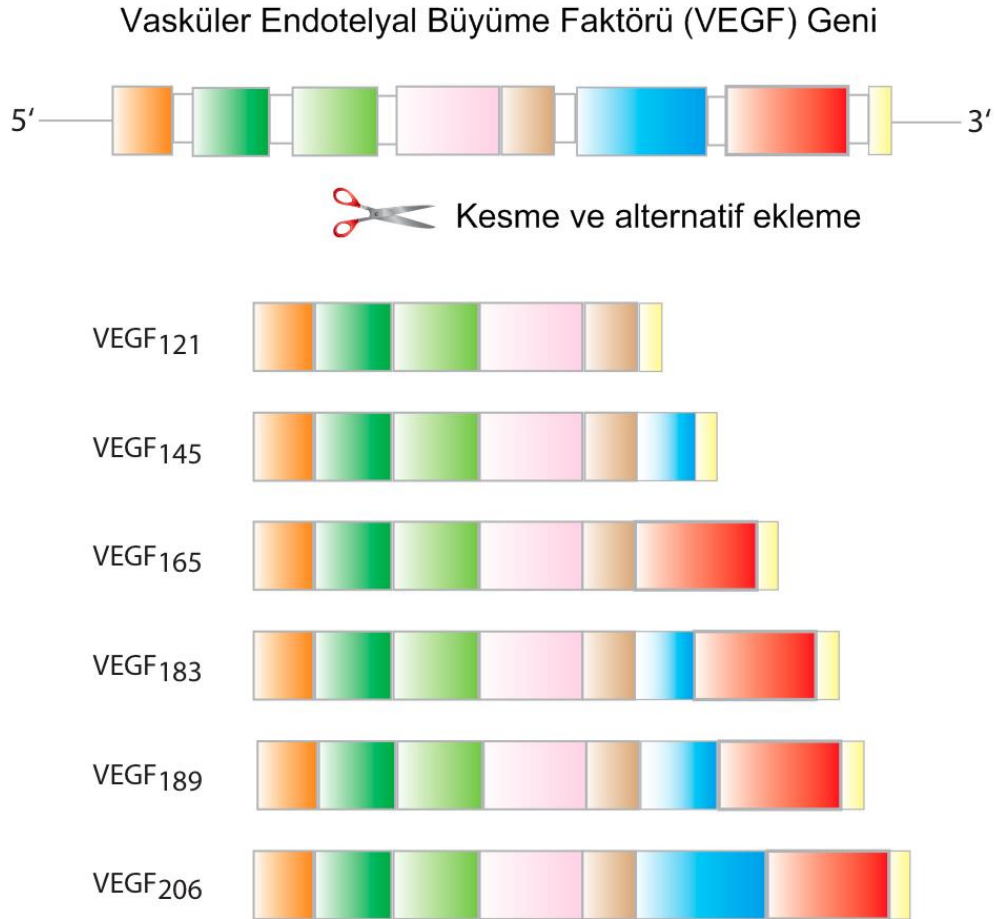
**Şekil 2:** VEGF'nin reseptör etkileşimi aracılığıyla oluşan etkileri.



VEGF'nin çeşitli yollar üzerinden gerçekleştirdiği uyarılar ile, anjiyogenez için gerekli olan endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile birlikte yaşam oranında artış meydana gelir. (PI3K: Fosfoinozid 3-kinaz; Akt/PKB: Protein kinaz B;

p38MAPK: p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz; MEK: mitojen ve ekstraselüler kinaz; Erk: Ekstraselüler düzenlenen kinaz)

**Şekil 3:** VEGF İzoformları



VEGF-A ,VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanma özelliği gösterirken VEGFR-3'e bağlanmaz. Düşük fizyolojik VEGF-A miktarları vasodilatasyon, antitromboz ve düz kas hücre proliferasyonunun baskılanması esnasında üretilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda angiogenik ve vaskülogenik etkiler için ise daha fazla gereklidir. Atherogenez esnasında VEGF-A miktarının sürekli artmasının büyüyen lezyonlarda hipoksi ve inflamasyona sekonder bir cevap olarak oluştuğu ileri sürülmüştür (28,140).



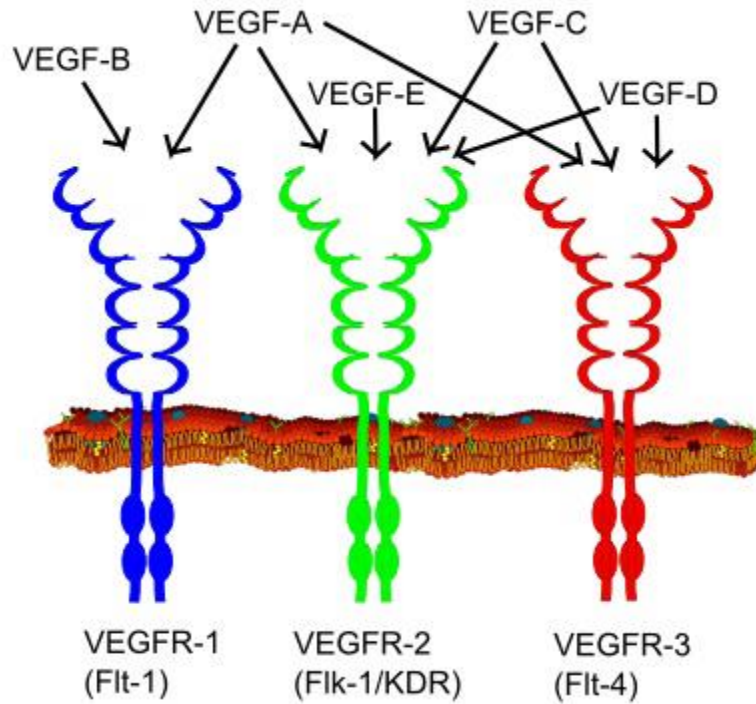
186 aminoasitli bir protein olarak oluşan VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol oynar (108).

VEGF-benzeri protein olarak da bilinen VEGF-C 388 aminoasitten oluşmuştur. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynar. Aynı zamanda VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki de yapar (120).

334 aminoasitten oluşan VEGF A, VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C 'ye benzer fonksiyonlar yapar (108,120). Güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktör olan VEGF- E ise VEGFR-2'ye bağlanarak etkisini gösterir (95,120).

1. VEGFR-1 : Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1)
2. VEGFR-2 : KDR/Flk-1 (kinase domain region/fetal liver kinase-1)
3. VEGFR-3 : Flt-4 (fms-like tyrosine kinase-4)

**Şekil 4:** VEGF Reseptörleri



### 1.2.1. Göz Hastalıklarının VEGF İle İlişkisi

VEGF' nin normal retinada fonksiyonel bir rolünün olduğunu düşündürmektedir. Ancak VEGF-A'nın retinadaki patolojik durumlarda yer alması literatürde daha belirgin bir durumdur. Artmış VEGF-A NPDR'de bir permeabilite faktörü şeklinde etki etmektedir. İnsan retinalarında ve deneysel NPDR'de VEGF-A ve ekstravaze olmuş albümin birlikte lokalize (co-lokalize) olmaktadır. Sıçanlarda ve maymunlarda yüksek dozlarda tekrarlanan VEGF-A enjeksiyonları florosein boyasının retinal damarların sızıntı yapmasına neden olmakta ve NPDR'de görülen değişikliklere benzer retinal değişiklikler oluşturmaktadır (vasküler tortusite = kıvrımlanma ve mikroanevrizmalar gibi). VEGF, endotel proliferasyonu indüklemenin dışında ayrıca, endotel hücreleri için ve muhtemelen retinadaki diğer hücre türleri için bir sürvey/sağkalım faktörü olarak da etki etmektedir. İn vitro koşullarda VEGF, serum açlığı (yokluğu) ile indüklenen apoptosisi önlemektedir. VEGF bağımlılığı, önceden gelişmiş damarlardan çok yeni oluşmakta olan damarların endotel hücreleri için daha önemli gibi görünmektedir. Endotelin perisitler tarafından kaplanması, VEGF bağımlılığının kaybı ile sonuçlanan anahtar olay olduğu öne sürülmüştür. VEGF endotel hücre migrasyonu, proliferasyonu ve artmış vasküler permeabilite açısından önemlidir. En son veriler VEGF-A'nın retinal vasküler permeabilite üzerindeki etkilerini, artmış veziküler transport ve/veya occludin gibi tight-junction proteinlerinin içeriğindeki azalma ile sergilediğini düşündürmektedir. İn vivo olarak, insanlardaki NPDR'de ve deneysel NPDR modellerinde artmış VEGF-A ekspresyonu tanımlanmaktadır. VEGFR-1'in iskemik retinalarda hipoksi ile indüklenmiş upregülasyonunun, VEGF-A duyarlılığını arttırabilecek bir mekanizma teşkil ettiği öne sürülmektedir. Ancak VEGFR-1'in aynı zamanda normal retina mikrodamarlarında da eksprese edilebildiğini gösterilmiştir.(54). Bu reseptörün boyanma paterni, perisitlerde lokalize olduğu yönünde güçlü bir izlenim vermiştir. Bu durum, in vitro ve in vivo şartlarda perisitlerdeki VEGFR-1 ekspresyonu ile uyumludur. Dolayısıyla perisitlerdeki VEGFR-1 sinyallemesi, artmış VEGF-A düzeylerinin başlangıçtaki (ilk) etkilerinden sorumlu olabilir (1).

### 1.2.2. Anti-VEGF Tedavisi

Tümörün büyüebilmesi için, tümör hücrelerine ve neovasküler dokuya besinleri ve oksijeni taşıyacak damarların gelişimi şarttır. Mevcut kan damarlarından yeni damarların gelişmesi anlamına gelen anjiyogenez süreci, çeşitli hastalıklarda hayati bir öneme sahiptir, bu da anjiyogenezi düzenleyen faktörlerin yoğun bir şekilde araştırılması ve anjiyogenezi etkileyen çeşitli moleküllerin tanımlanmasına yol açmıştır. Enflamatuvar hastalıklarda, çeşitli kanserlerde ve göz hastalıklarında (proliferatif diabetik retinopati, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, retina ven tıkanıklıkları) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Anjiyogenezin en önemli merkezi mediatörü olarak tanımlanan VEGF anjiyogenezde anahtar bir rol oynar (49,124).

VEGF, muhtemel temel anjiyojenik faktör olma özelliği yanı sıra; VEGF'ye maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve transselüler gap oluşumuna neden olarak vasküler geçirgenliği de artırır (9).

VEGF, kan-retina bariyerinin bozulmasına, damar geçirgenliği arttırarak retina ödemeine, endotel hücre proliferasyonuna ve neovaskülarizasyon oluşumuna yol açar. VEGF, endotel hücre mitozunu ve damar geçirgenliğini artırır. Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, Müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Hipoksi varlığında VEGF'nin m-RNA sentezi 30 katına çıkar. Deneysel çalışmalar, hipoksiye bağlı retinal iskeminin VEGF sentezini arttırdığını göstermiştir. Hipoksiye bağlı stimülasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF ve diğer büyüme faktörleri, artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur. Bu bilgilere dayanarak kan-retina bariyerinin yıkıldığı, vasküler geçirgenliğin arttığı ve göziçi neovaskülarizasyonun görüldüğü göz hastalıkları için farmakolojik olarak VEGF inhibisyonu yeni bir tedavi stratejisi olmuştur (68,83,88,98,111)

VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek VEGF'nin etkinliği önlenmektedir. Bu mekanizmaların

başlıcaları VEGF ile uyumlu spesifik ardışık oligonükleotidler (aptamer), VEGF alt grubuna etkili monoklonal antikolar, VEGF reseptör blokörleridir (73).

### 1.2.3. Bevacizumab

Bevacizumab, insan VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize etmek için tasarlanmış ve fare epitoplarının insanlara uygulanması ile fareden VEGF'ye karşı elde edilmiş monoklonal antikordur. İki antijen bağlanma bölgesinden (Fab ve Fc) oluşmaktadır. VEGF'nin endotel hücreleri yüzeyindeki flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasının inhibe eder. Bevacizumab Amerikan İlaç Komitesi tarafından metastatik kolorektal kanserli olgularda kullanıma onay verilen ilk anti-anjiojenik ajandır (51,66)

Son yıllarda bevacizumab ilk olarak Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) olgularında koroidal neovaskülarizasyonu geriletme amacıyla kullanılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (103,113). Sistemik bevacizumab uygulanan YBMD'li olgularda 12 haftalık takip süresince görmede artış ve makula kalınlığında azalma saptanmıştır (87). Bevacizumab'ın molekül ağırlığı 150 kDa olduğundan iç limitan membrandan retinaya, retina altı boşluğa ve retina pigment epiteline geçmesinde sorun olacağı düşünülmüş ancak yaş tip YBMD'li bir olgunun intravitreal bevacizumab kullanımına cevap vermesinden sonra intravitreal kullanımı artmıştır (128). İntravitreal bevacizumab'ın retinal toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada ise tavşan gözlerine 2.5mg/0.1 mL bevacizumab uygulanmıştır (107). Yapılan elektrofizyolojik testlerde bevacizumab'ın tavşan gözlerinde retinaya toksik olmadığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada(85), YBMD'li 9 olguya intravitreal bevacizumab injeksiyonu sonrası yapılan elektrofizyolojik tesler sonucunda makula fonksiyonunda iyileşme ve kısa dönemde fotoreseptör toksisitesi gözlenmemiştir. Bu çalışmalar ışığı altında eksudatif YBMD, proliferatif diyabetik retinopati, diyabetik makula ödemi, ven tıkanıklıklarına bağlı makula ödemi, psödotakik kistoid makula ödemi, neovasküler glokom gibi patogenezinde neovaskülarizasyon'nun sorumlu olduğu hastalıkların tedavisinde intravitreal bevacizumab etkinliği araştırılmaya başlanmıştır.

Literatürde bevacizumab oküler yan etkileri konusunda yeterli bir çalışma yoktur. Üveitik reaksiyon, endoftalmi riski, kollateral gelişiminin engellenmesi, maküler iskeminin artması sözü edilen yan etkilerden birkaçıdır. Retina dekolmanı, kataraktın ilerlemesi, endoftalmi, vitre içi hemoraji gibi oküler problemlerin ilacın kendi farmakolojisinden değil uygulama yeri ve işlemi ile ilgili olduğu belirlenmiştir.

### **1.3.OKSİDAN ve ANTIOKSİDAN SİSTEMLER**

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler halinde bulunurlar (132). Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkması veya ilavesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan, organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir (113). Normal metabolizma sırasında ya da patolojik intra ve ekstrasellüler olaylarla ortaya çıkan serbest radikallerin etkileri oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu radikaller ortamdan uzaklaştırılmadığı takdirde, enzim ve proteinleri inaktive ederek (kovalent bağlanma teorisi) veya serbest radikalın kendisi primer olarak (serbest radikal teorisi) hücre hasarına veya ölümüne neden olabilirler (113). Sonuçta serbest radikaller erken yaşlanma, kanser, otoimmün hastalıklar, enflamatuar hastalıklar gibi birçok hastalıkların etyopatogenezinde suçlanmaktadır (9,124).

#### **1.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri**

Oksijenden zengin atmosferde yaşarız ve oksijen birçok metabolik aktivite için gereklidir. Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahip oksijen, yer aldığı biyokimyasal tepkimelerde gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle toksik etki de yapabilmektedir (9,98132). Oksijen radikalleri, biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin en önemlisidir. Serbest oksijen radikalleri, normal hücre metabolizmasında oksijen içeren birçok biyokimyasal indirgenme reaksiyonları (mitokondrilerdeki oksijenli solunum gibi) sonucunda oluşabilmektedir (9,68 (Tablo 3)).

**Tablo 3 :** Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları (111,132).

## I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

## II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon

- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi

- a-) İnhale edilenler
- b-) Alışkanlık yapan maddeler
- c-) İlaçlar

- 3 - Oksidan enzimler

- a-) Ksantin oksidaz
- b-) İndolamin dioksigenaz
- c-) Triptofan dioksigenaz
- d-) Galaktoz oksidaz
- e-) Siklooksigenaz
- f-) Lipooksigenaz
- g-) Monoamino oksidaz

- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

- 5 -Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)

- 6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

### III - Yaşlanma süreci

Vücutta üretilen radikaller her zaman zararlı olarak görülmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Örneğin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin ve eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimleri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı elzem bir koşuldur (68).

En Önemli Serbest Oksijen Radikalleri;  $O_2^-$  (Süperoksit) Radikali,  $H_2O_2$  (Hidrojen Peroksit),  $HO^\cdot$  (Hidroksil Radikali) ve Singlet Oksijen'dir ( $O_2 \uparrow\downarrow$ ) Bunların dışında;  $HOCl$  (Hipoklorid),  $ROO^\cdot$  (Peroksil radikali),  $RCOO^\cdot$  (Organik peroksit radikali),  $HO_2^\cdot$  (Perhidroksil radikali),  $RO^\cdot$  (Alkoksil radikali) gibi reaktif oksijen türevleri sayılabilir.

#### 1.3.1.1. Süperoksit Radikali

Moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan  $O_2^-$  radikali oluşur ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ ).  $H_2O_2$  kaynağı olup canlılarda olduğu ilk gösterilen serbestradikal türevidir. Hücre dışı ortamda endotel hücreleri, lenfositler, trombositler, fibroblastlar ve diğer hücreler tarafından normal hücrel reaksiyonlar sonrası ortaya çıkan zayıf bir oksidan olan  $O_2^-$ 'nin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir (132). Ancak süperoksit radikalleri oksitleyici ve metal iyonları redükleyici etkisi ile oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Aktive edilen fagositik lökositlerden bol miktarda süperoksit üretilerek, fagozom içine ve buldukları ortama verilebilir. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatabilmektedir [9,68,73,88).

#### 1.3.1.2. Hidrojen Peroksit

$O_2^-$ 'e bir elektron eklenirse (süperoksit dismutasyonu) veya oksijenin direkt olarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Dismutasyon spontan olarak veya Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalizle olabilir ( $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2$

+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ). Metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasından dolayı radikal olmamakla birlikte reaktif oksijen kategorisine sokulur (87,113).

Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri sitoplazmaya göre daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini oluşturabilmektedir.

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (68,88,113).

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyal savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. Hidrojen peroksit myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyal ajan olan hipoklorik asidi oluşturur. İnfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan radikaller kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar (132).

### 1.3.1.3. Hidroksil Radikali

En tehlikeli reaktif oksijen radikalidir. Normal biyolojik fonksiyonlarda da kullanılmaktadır. Fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilmektedir (68,88,107). Ana oluşum yolları;

a) Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksit Fe<sup>+2</sup> ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek HO<sup>-</sup> radikali oluşur (Fe<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>+3</sup> + HO<sup>-</sup> + OH<sup>-</sup> ).

b) Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (reaksiyon bakır ve demir tarafından katalizlenir) (O<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup> → O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + HO ).



c) Dokular gamma radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorbe edilmekte ve radyasyon, oksijen ile hidrojen arasında kovalent bağa neden olmaktadır ( $H_2O (X \text{ veya } \gamma \text{ ışını}) \rightarrow H + HO$ ).

d)  $H_2O_2$ 'nin UV ışığına maruz kalması ile de hidroksil radikali oluşabilmektedir ( $H_2O_2 \rightarrow 2 HO.$  ) (68).

Hidroksil radikali biyolojik makromolekülerin bütün türlerine atak yaparak, DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşebilmekte, DNA sarmalında kırılmalara, enzim inaktivasyonuna neden olabilmektedir (85,113). Lipid peroksidasyonu, hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasardır (68,88).

#### **1.3.1.4.Singlet Oksijen**

Oksijenin uyarılmış şekli "singlet oksijen" olarak adlandırılır. Normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik moleküldür. Reaktivitesi çok yüksek bir oksijen türüdür. Singlet  $O_2$ , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksil radikalini oluşturmakta ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu oluşturabilmektedir (68).

#### **1.3.1.5. Total Oksidatif Stres**

Aktif oksijen ürünlerinin, tampon mekanizması olan antioksidanları ve antioksidan enzimleri aşması Oksidatif strese neden olmaktadır. Bu fenomen; aşırı reaktif oksijen ürünlerinin üretimi veya antioksidan mekanizmanın eksikliği sonucu oluşur. Bu reaktif oksijen ürünleri toksiktir ve hücrenin protein, lipid yapıları ve DNA'sına zarar verir. Damar endoteli de kısmen bu durumdan etkilenmektedir (44).

#### **1.3.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Olan Zararlı Etkileri**

Serbest radikaller; hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar. Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler. DNA'yı tahrip ederler.

Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar. Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler. Hücrenin potasyum kaybını arttırmaları. Trombosit agregasyonunu arttırmaları. Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar. Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (35).

### **1.3.2.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu**

Serbest oksijen radikallerin en önemli etkileri lipidler üzerine olup, lipidlerin oksidatif modifikasyonunu katalizlerler. Biyomembranlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerin membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilmekte, dolayısı ile hücre ve organel zarlarında oksidatif hasarlara neden olabilmektedir (10).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlamakta ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Peroksiradikal, elektronları ve diğer duyarlı yağ asitlerini alarak lipid radikal ve lipid hidroperoksitleri oluşturur. Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunu hızlandırır (35). Sonuçta hücre zarının akıskanlığını ve permabilitesini azaltarak geri dönüşümsüz olarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar.

Permeabilite özelliklerinin değişmesi anormal  $Ca^{+2}$  girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına yol açabilmektedir. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanı sıra duyarlı aminoasit kalıntılarını okside eder veya polimeraz zincir reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (24,36).

Peroksiradikali, poliansatüre yağ asidi moleküllerini okside edebilmekte, radikallerin ve aldehidlerin oluşmasına neden olan hidroperoksitlerin meydana gelmesini sağlayabilmektedir. Bu maddelerin yıkılması sırasında oluşan aldehidler uzun ömürlü olduklarından hücre hasarının yayılmasına neden olabilmektedirler. Aldehidler arasında en iyi bilinen sitotoksik ürün üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan malondialdehitdir (MDA) (2). MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesi ile korelasyon gösteren son üründür. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir (2,86).

### **1.3.2.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu:**

Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Proteinlerin, sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkilemesi sonucu protein moleküllerinin yapısı değişmekte amino asitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmantasyonu, agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi hasarlar meydana gelebilmektedir (36,99). Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler. Enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (36,100). Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (2,36,86).

### **1.3.2.3. Karbonhidratlara Etkileri:**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile vücudumuzda  $H_2O_2$ , peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelmektedir (2). Serbest radikallerin gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunan hyalüronik aside oksidatif hasarı katarakta zemin hazırlarken; eklem sinovial sıvısına geçen nötrofillerden extrasellüler sıvıya salınan  $H_2O_2$  ve  $O_2$ , bu bölgedeki hyalüronik asidi parçalayarak enflamatuvar eklem hastalıkları oluşumuna katkıda bulunmaktadır (2,22).

### 1.3.3. Oksidatif Stres ve DNA Lezyonları:

Proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi DNA'da kimyasal-oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde  $10^3$  kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (90).

DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Antioksidan enzim düzeylerindeki azalma, DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. DNA'da tek ve çift dal kırıkları, kontrolsüz baz dizilimi, baz modifikasyonları, DNA-protein arasında çapraz bağlanma oksidatif hasarlarla olabilir (31,46,90). Bu oksidatif DNA hasarları mutasyonlara, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açabilir (125).

Serbest radikaller, DNA'da mutasyonlara ve hücre ölümüne yol açabilirler. DNA'da oksidatif hasar oluşturan radikaller OH ve  $O_2^-$  radikalleridir. OH radikali, DNA'daki dört bazın herhangi birine saldırı yapabilirken,  $O_2^-$  dal kırığından ziyade, guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (26,90).

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içeren ve çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur.  $Fe^{2+/3+}$  ve  $Cu^{1+/2+}$  iyonları; negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı oldukları gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü  $H_2O_2$ 'in hedefi haline getirmektedir (59,90). Doğrudan DNA'da hasar yapamayan  $H_2O_2$ , membranı kolayca geçerek, nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) reaktivitesi çok yüksek olan OH'lerini oluşturarak DNA'da hasara neden olur. Dolayısıyla OH'inin hücre içinde diffüz olarak nükleusa, DNA'ya geçme olasılıkları az olduğu halde reaksiyonlarla hasara neden olabilmektedir. Oluşan OH, radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Yine OH temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (89,90).

Doku kültür ortamının  $Fe^{+3}$  ve  $Cu^{+2}$  iyon konsantrasyonunun artırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve  $H_2O_2$ 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği belirtilmiştir (143).

Yine oksidatif stres hücrede, sitozolik  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nukleustaki  $Ca^{+2}$  bağımlı endonukleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmantasyonuna neden olmaktadır (nükleaz aktivasyonu hipotezi).  $Ca^{+2}$  şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır (58).

DNA'da oksidatif hasar ile başlangıçta dal kırıkları oluşur. Tek dal kırıklarında, karşı daldaki bilgi doğru okunarak "*hasarlı dal onarıcı enzimlerle*" onarılabilir. Bu yüzden çift dal kırıkları daha önemlidir (46).

Organizmada normal şartlarda oluşan düşük düzeylerde oksidatif DNA hasarı, DNA onarım enzimleri sayesinde minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilir. Ancak DNA onarım enzimleri ve DNA polimeraz'ın oksidatif stres altında hasarlanmaları doğru replikasyon ve transkripsiyon olasılığını azaltmaktadır. Onarım tamamlanıncaya kadar, hücreler bölünmelerini genellikle durdurarak kendilerini korumaktadırlar (59,90).

DNA'daki oksidatif hasar yüksek düzeylere ulaştığında hücre ölümü gerçekleşmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Bakır iyonları DNA'da Guanin-Sitozin'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğu için oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz "Guanin" dir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-hidroksideoksiguanozin'dir. 8-hidroksideoksiguanozin, oksidatif DNA baz hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (31,46,60,90)

### **1.3.4.Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları**

#### **1.3.4.1. Antioksidan Sistemler**

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için bir çok savunma mekanizmaları bulunmaktadır (105,139). Bu savunma mekanizmaları arasında oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması, radikallerle tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları kırmak, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu

ve orada aşırı birikimini önlemek sayılabilir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır (35). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önlemek veya geciktirebilmek amacıyla serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere “*antioksidanlar*” ve bu olaya antioksidan savunma denir. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılır (2,32,105,140).

Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapan ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (GSH hariç). Enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise, bilirubin, albumin, ürik asit,  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (2,90,105). Eksojen antioksidan olarak da allopurinol, folik asit, B, C ve E vitamini, flavinoidler, asetilsistein, mannitol, adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (2,90,105).

SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler, aktif oksijen türlerini direkt olarak etkileyen ilk savunma hattı olarak görev yaparlar. Bu savunma sistemleri yetersiz kalırsa ve lipid peroksidasyonu artarsa ikinci sıra savunma sistemleri devreye girer. Antioksidan bir enzim olan fosfolipid hidroperoksid, glutatyon peroksidaz, peroksidleri alkollerle indirgeyerek peroksidize edilmiş membran komponentlerini uzaklaştırma görevi yapar. Antioksidan olarak E ve C vitaminleri birlikte zincir reaksiyonlarını sonlandırarak peroksidlerin daha fazla birikmesini önlerler. Tüm bu savunma yetersiz kaldığında veya tükendiğinde hücre membranı o kadar çok hasara uğrar ki, sonunda hücre ölür.

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

1. Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
2. Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
3. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- a) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denilmektedir. Bilirubin, antioksidan enzimler bu tip bir etki göstermektedirler (2,91).
- b) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir proton aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönüştüren etkidir (ör; Vit’ler, flavinoidler, bilirubin) (2).
- c) Zincir kırıcı : Serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek serbest radikalleri uzaklaştırmaktadırlar (ör; Bilirubin, Hb, seruloplazmin, mineraller ) (2,115,116).
- d) Onarıcı etki: Serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar. Hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir (2,37).

### **1.3.4.2. Enzimatik Antioksidanlar**

#### **1.3.4.2.1 Süperoksit Dismutaz (SOD):**

Substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen perokside ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eden, yapısında bakır, çinko ve manganezin olduğu bir metalloenzimdir ( $2 O_2^- + 2 H^+ (SOD) \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). Oluşan reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında

tutulur. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (2).

#### **1.3.4.2.2.Katalaz (CAT):**

Peroksizomlarda bulunan, yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilen bir enzimdir. Hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırıştırılmaktadır ( $2\text{H}_2\text{O}_2$  (CAT)  $\rightarrow$   $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır (90,105).

#### **1.3.4.2.3.Glutatyon Peroksidaz (GPx):**

GPx, hücrelerin sitozollerinde yerleşmiş ve yapısında selenyum bulunan bir metalloenzimdir. Sitozol ve mitokondrielerde SOD tarafından oluşturulan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve lipid hidroperoksitlerini ortadan kaldırmaktadır. Yalnız kapasitesi sınırlı olup düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunda çalışmaktadır. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (2). Eritrositlerde GPx oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GPx aktivitesindeki azalma,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (2).

#### **1.3.4.2.4.Glutatyon Redüktaz (GR):**

Glutatyon peroksidaz tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutatyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Organizmanın glutatyon deposu sınırlı olduğundan oksidasyona uğramış bu yapıyı ileride yeniden kullanmak için redükte glutatyona dönüştüren enzim glutatyon redüktazdır (2).

#### **1.3.4.2.5.Glutatyon-S-Transferazlar (GST):**

Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli görev almaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksidlere karşı GST'ler selenyum bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstermektedirler. Antioksidan aktivitelerine ek olarak çok önemli başka



biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup bilirubin, hem ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşümlü olarak bağlanarak bunların hücre içi transportunda da görev almaktadırlar (2,36).

### **1.3.4.3.Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri**

#### **1.3.4.3.1. Glutatyon (GSH):**

Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutatyon, HO<sup>·</sup> ve O<sub>2</sub>↑↓ gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Demirin Fe<sup>+2</sup> (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar. N-asetil sistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırır.

#### **1.3.4.3.2. Vitamin C (Askorbik Asit):**

Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C vit'i, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. C vit'in antioksidan etkisinin yanında pro-oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü, vitamin C, Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücresel ajandır. Bu yolla askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Bu prooksidan etki sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (24, 36).

#### **1.3.4.3.3.Vitamin E (Tokoferol):**

α-tokoferol, yağda çözünen ve lipid peroksidasyon zincirini kıran bir antioksidandır. Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membrandan zengin hücre kısımlarında vitamin E konsantrasyonu artmıştır. Çok güçlü bir antioksidan olan α-tokoferol hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal ataklarına karşı korur, oluşan radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Askorbik asit E vitamininin etkisini artırır. E vitamini ve GPx serbest radikal

etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. E vitamini sentezlerini engeller iken GPx oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır.

#### **1.3.4.3.4. Vitamin A ( $\beta$ -Karoten):**

A vitamininin metabolik ön maddesi olan ve yağda çözünen bir antioksidan olan  $\beta$ -karoten son derece güçlü singlet  $O_2$  temizleyicisidir. Serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu engeller (24,36).

#### **1.3.4.3.5. Seruloplazmin:**

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı, bakır içeren ve taşıyan akut faz proteini seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın ferro-oksidad aktivitesi göstererek  $Fe^{+2}$ 'i  $Fe^{+3}$ 'e okside eder. Böylece Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu önleyici etki gösterir (35).

#### **1.3.4.3.6.Ferritin:**

Dokulardaki demiri bağlar, serbest radikal reaksiyonlarında yer almasını engeller.

#### **1.3.4.3.7. Transferrin ve Laktoferrin:**

Transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar, serbest radikal oluşumunu önler.

#### **1.3.4.3.8.Haptoglobin ve Hemopeksin:**

Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek gerekse doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin "hem"i bağlayarak bu demir bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu uyarmasını engeller.

#### **1.3.4.3.9.Desferrioksamin (DFO):**

DFO, ferrik demirin güçlü bir bağlayıcısıdır ve oluşan bu kompleksteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede DFO, demir iyonuna bağımlı lipid peroksidasyonunu önler. DFO, transferrin veya laktoferrine bağılı demir iyonlarını uzaklaştırmada zayıf bir etkinliğe sahiptir.

### **1.3.5. Total Antioksidan Kapasite**

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağılı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemlidir. Çünkü kan antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirmektedir (90). Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin, ürik asit, E vit'i, C vit'i yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır (32,90).

Albumin, ürik asit, askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bunun nedeni, kanda bilirubin, glutasyon, flavinoidler, alfa tokoferol ve beta karoten gibi antioksidan sistemin komponentlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasıdır (9,114).

Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutasyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Ör; yenidoğanda postnatal dönemde fizyolojik şartlarda plazmada ürik asit, C vitamini, ve sülfidril grupları azalırken, bilirubin ve E vit'i düzeyleri artmaktadır. Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (90,102).

### 1.3.6.Serbest Oksijen Radikallerinin Gözle İlişkisi

Son yıllarda neovasküler göz hastalıklarının patogeneğinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Retina oksidatif strese hassastır. Göz için güneş ışığına maruz kalma en önemli oksijen radikali oluşma nedenidir. Retina vücuttaki metabolik aktivitesi en yüksek dokulardan biridir ve önemli bir oksijen radikali oluşum yeridir. Reaktif oksijen medyatörleri (ROM), hücrel metabolizmanın veya fotokimyasal reaksiyonların sonucunda meydana gelebilir. Bu anlamda retina reaktif oksijen türlerinin oluşumu için uygun bir ortam teşkil eder. Öncelikle, retinadaki oksijen tüketimi diğer bütün dokulardan daha fazladır. İkinci olarak retina yüksek oranda ışınlanmaya uğrayan bir dokudur. Üçüncü olarak fotoreseptör dış segment zarları kolaylıkla okside olup hücreye zararlı zincir reaksiyonu meydana getirebilecek şekilde poliansatüre yağ asitlerinden zengin bir yapıya sahiptir. Dördüncü olarak nörosensöriyel retina ve retina pigment epiteli (RPE), yüksek miktarda ışığa duyarlı maddeler içermektedir. Ayrıca bunlara ilave olarak RPE'deki fagositozun kendisi de ROM oluşumu ile sonuçlanabilen oksidatif bir olaydır. Yaşlanma için en yaygın hipotez, serbest radikallere bağlı hücrelerde oksidatif hasar gelişmesidir. Bu hipoteze göre, serbest radikalleri parçalayan enzimler (süperoksitler ve peroksitler gibi) yaşa bağlı hasardan hücreleri korurlar. Zamanla oksidatif stresin birikimiyle geriye dönüşümsüz doku hasarı oluşur ve yaşlılığın fenotipik değişiklikleri görülür. Genetik veya çevresel faktörler gibi risk faktörleri varlığında oksidatif stres patolojik değişikliklerle sonuçlanır. Retinada oksidasyondan korunmak için antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Serbest radikalleri ve peroksitleri parçalayan retina pigment epitelinin, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri ayrıca antioksidan vitamin olarak askorbik asit (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) ve karotenoidleri (lutein ve zeoksantin) içerdiği bilinmektedir (129).

## **2. MATERYAL VE METOT**

Deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskularizasyonda tedavi amacıyla kullanılan Anti VEGF ajanlarından Avastin'in korneadaki Total Antioksidan ve Oksidan Denge Üzerine Etkisini araştırmak üzere 18 adet Yeni Zellanda Albino tavşanı üzerinde yapılan çalışmada: kullanılan materyal, deneklerin seçimi, çalışmaya hazırlanması ve testlerin yapılışı ile elde edilen verilerde kullanılan istatistik değerlendirmeler bulunmaktadır.

### **2.1. MATERYAL**

#### **2.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler**

- Spektrofotometre (PowerWave XS, BioTek, Instruments, USA)
- Etüv (Labart, DHG-9140A, South Korea)
- Vorteks (IKA, Works Inc, USA)
- Soęutmalı santrifüj (Helius, Germany )
- Hassas terazi (Precisa, 205A SCS, Switzerland)
- Derin dondurucu( Arçelik, 2560, Turkey)
- Buzdolabı ( Arçelik, Turkey)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Ependorf, Varipette, Germany)
- Homojenizatör

#### **2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzeme**

- Bevacizumab (Avastin),
- Gümüş nitrat Stickleri
- % 0.5 propocaine hydroclorid

- Serum Fizyolojik
- Tavşan kafesi
- Siyah iğne ucu
- Tavşan yemi
- Vakumlu ve EDATLI kan alma tüpleri (MN -2138M )
- 1.5 ml'lik ependorf mikro santrifüj tüpleri
- Otomatik pipet uçları
- 10 ml'lik cam ve polyetilen santrifüj tüpleri
- TAS (Total Antioksidan Status) Kiti (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye)
- TOS (Total Oksidan Status) Kiti (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye)

## 2.2. METOT

Uygulanan metotların rutin hale getirilmesi için araştırmaya başlamadan önce gerekli ön hazırlıklar yapıldı. Araştırmadan daha iyi sonuçların alınması amacıyla en uygun metotlar seçilmeye çalışıldı.

### 2.2.1. Deneklerin Seçimi

Çalışmamızda, KAÜ Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (KAÜSAM) tarafından temin edilen 6 aylık, 3.0-3.5 kg ağırlığında tavşan kullanıldı. Hayvanlar deney süresi boyunca normal oda ısısında (20-25 °C), 12/12 saat gece/gündüz periyodunda bulunduruldu, su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Çalışma için izin Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (**Karar Sayı No:2011-08**).

Bu çalışmada, korneal yanıktan sonra subkonjektival uygulanan Avastin'in total antioksidan ve oksidan denge üzerine etkisini araştırmak planlandı.

Çalışmada denekler 3 gruba ayrıldı:

**1.GRUP** (n=6): Kontrol grubundaki deneklere herhangi bir uygulama yapılmadı.

**2.GRUP** (n=6): Bütün deneklerin bir gözü AgNO<sub>3</sub>-KOH ile yakılarak oluşturulan deneysel enflamasyon ve neovaskülarizasyonun 3.gününde subkonjonktival serum fizyolojik verildi.

**3.GRUP** (n=6): Tüm deneklerin bir gözü AgNO<sub>3</sub>-KOH ile yakılarak oluşturulan deneysel enflamasyon ve neovaskülarizasyonun 3.gününde subkonjonktival bevazimuzab 1.25 mg/0.1 mL (Avastin, 100 mg/4 mL) verildi.

### **2.2.2. Korneada alkali yanığı oluşturulması**

Çalışmanın 1. gününde ilk iki gruptaki tavşanların gözlerine % 0.5 propocaine hydroclorid ile topikal anestezi uygulandıktan 1 dakika sonra gümüş nitrat Stickleri (%75 gümüş nitrat, %25 Potasyum nitrat) gözün korneası üzerinde 2 dakika bekletilerek alkali yanığı oluşturuldu. Bu uygulamadan sonra tavşanlar topikal olarak antimikrobiyal pomat ve damla ajanları ile tedavi edildi.

### **2.2.3 İlaçlar**

Çalışmanın 3. gününde 3. gruptaki tavşanların tek gözlerine subkonjunktival olarak anti VEGF ajanlarından Bevacizumab 1.25 mg/0.1 mL (Avastin, 100 mg/4 mL) tek doz olarak uygulandı. Kontrol grubundaki (1.grup) tavşanların gözlerine deneme gruplarıyla eşitliği sağlamak amacıyla subkonjunktival olarak serum fizyolojik verildi.

### **2.2.4 Korneaların ve kan örneklerinin alınması**

Kan örnekleri çalışmanın 21. gününde hayvanların kulaklarından yeterli miktarda alındıktan sonra kan örnekleri ise +4 °C 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazmaları polietilen tüplerde -20 °C'de analizler yapılmaya kadar saklandı.deneklere inhalasyon anestezi altında % 2,5 (1,5 MAC) maske indüksiyonu ile sevofluran uygulanıp korneaları 360 derece insüzyonla alındı. Korneaları alındıktan sonra sklera ve konjunktiva 6/0 vikril suture ile kapatılmak suretiyle

antimikrobiyal pomat uygulanarak ameliyata son verildi.. Kornealar ringerli laktat solüsyonu ile yıkanıp yine ringerli laktat solüsyonu içinde; alınan Dokular da metotlarda belirtildiği şekilde homojenize edilerek total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) düzeylerine ticari kit kullanılarak bakıldı.

### **2.2.5 Kornea dokusunun homojenizasyonu**

Alınan kornealar önce hassas terazide tartıldıktan sonra cam tüplere alınıp 1'e 9 oranında PBS tamponu eklendikten sonra Wiggen Hauser marka homojenizatör ile tüpler buzların üzerine yerleştirilip homojenize edildikten sonra +4 °C 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınıp çalışma zamanına kadar -20 °C'de saklandı.

## **2.3 TAS ve TOS Değerlerinin Kit ile Belirlenmesi**

### **2.3.1 Plazma ve Doku Antioksidan ve Oksidan düzeylerinin Belirlenmesi**

Plazma ve dokulardaki antioksidan ve oksidan miktarı Total Antioksidant Status (TAS) Assay Kit ve Total Oksidant Status (TOS) Assay Kit (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü.

## **2.4. Total Antioksidan Seviye (TAS)**

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur (45).

**Reaktif 1:** 75 mM Clark tamponu ( pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 µmol (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O çözülerek hazırlandı.

**Reaktif 2:** 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu ( pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

**Prensip:** Fe<sup>2+</sup>-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu arttırmaktadır. Ancak örneklerdeki



antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar.

### **2.5. Total Oksidant Seviye (TOS)**

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (44).

**Reaktif 1:** 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

**Reaktif 2:** Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

**Prensip:** Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

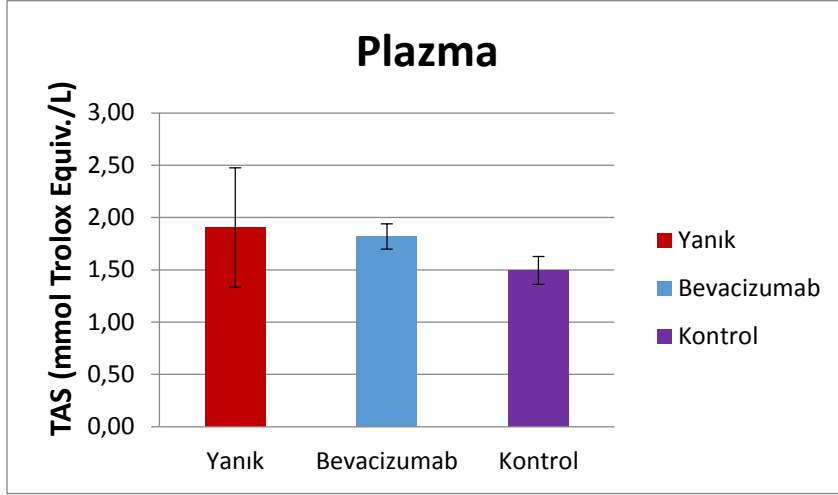
### 3. BULGULAR

**Tablo 4:** Plazma, Eritrosit ve Kornea Gruplarının Total Antioksidan Düzeyleri

GRUPLAR	TOTAL ANTİOKSİDAN		
	PLAZMA	ERİTROSİT	KORNEA
	X±STD	X±STD	X±STD
<b>YANIK</b>	1.90±0.57	1.60±0.40	0.26±0.07
<b>BEVACİZUMAB</b>	1.82±0.12	1.13±0.19	0.40±0.04
<b>KONTROL</b>	1.50±0.13	2.49±0.10	0.04±0.00

#### 3.1. Plazma Total Antioksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması;

Grupların Plazma TAS seviyeleri Grafik 1’ de gösterilmiştir. Buna göre ortalama TAS düzeyleri en yüksek kornea yanığı grubunda iken, Bevacizumab grubunda daha düşük, kontrol grubunda ise en düşük oranda bulundu. Ortalama TAS düzeyi Bevacizumab uygulanan grupta  $1.82 \pm 0.12$   $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , alkali yanığı grubunda  $1.90 \pm 0.57$   $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , kontrol grubunda ise  $1.50 \pm 0.13$   $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$  olarak bulundu (Tablo 1). Gruplardan ortalama TAS değeri alkali yanığı grubunda, Bevacizumab grubu ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmakla birlikte tüm grupların plazma TAS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

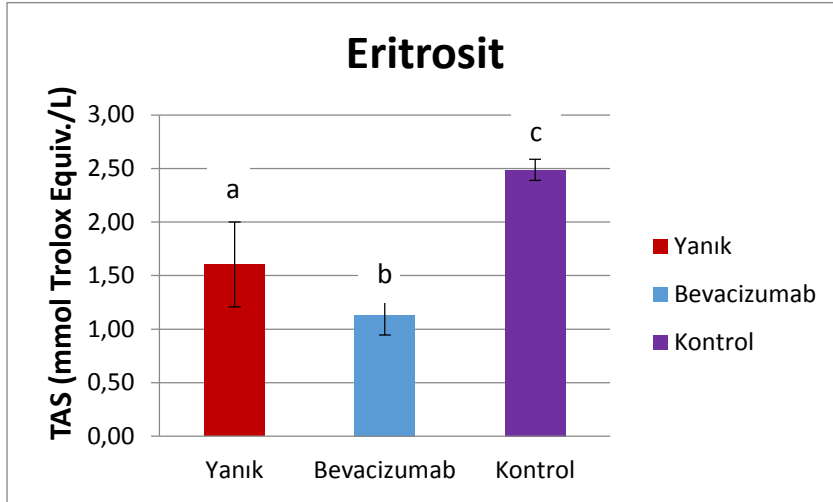


**Grafik 1:** Kornea yanığı grubu, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların plazma TAS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).

$p > 0.05$  Gruplar arası fark önemli değildi.

### 3.2. Eritrosit Total Antioksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

Grupların Eritrosit TAS seviyeleri Grafik 2' de gösterilmiştir. Buna göre ortalama TAS düzeyleri en yüksek bulunduğu grup kontrol grubu olup, korneada yanık oluşturulan grubun eritrosit TAS düzeyi daha düşük seviyede, Bevacizumab uygulanan grup ise en düşük seviyede bulunmuştur. Ortalama TAS düzeyi Bevacizumab uygulanan grupta  $1.13 \pm 0.19 \mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , alkali yanığı grubunda  $1.60 \pm 0.40 \mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , kontrol grubunda ise  $2.49 \pm 0.10 \mu\text{mol Trolox Eqv./L}$  olarak bulundu (Tablo 1). Tüm grupların eritrosit TAS düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak oldukça önemli bir fark bulundu ( $p < 0.001$ ).

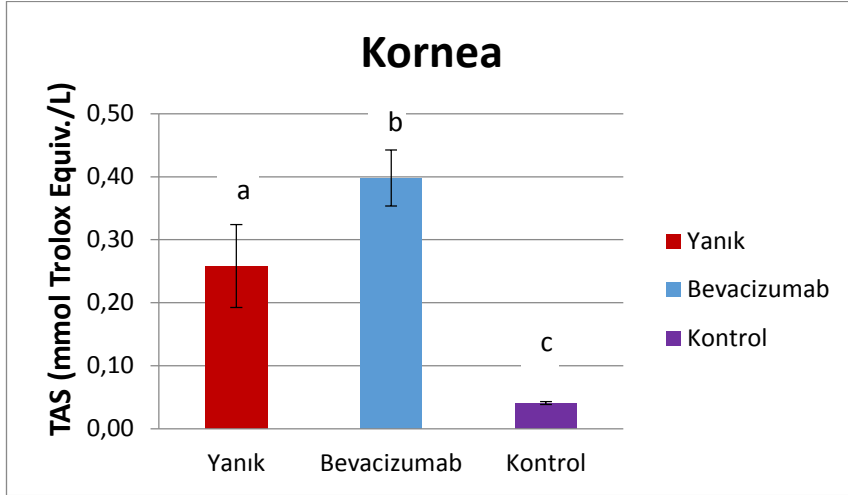


**Grafik 2:** Kornea yanığı grubu, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların eritrosit TAS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).

<sup>a,b,c</sup> : Farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p < 0.001$ ).

### 3.3. Kornea Total Antioksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması;

Grupların Kornea TAS değerleri Grafik 3' de gösterilmiştir. Buna göre ortalama TAS düzeyleri en yüksek Bevacizumab uygulanan grupta, yanık grubunda Bevacizumab grubuna göre daha düşük, kontrol grubunda ise en düşük düzeyde bulundu. Ortalama TAS düzeyi Bevacizumab uygulanan grupta  $0.40 \pm 0.04 \mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , alkali yanığı grubunda  $0.26 \pm 0.07 \mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , kontrol grubunda ise  $0.04 \pm 0.00 \mu\text{mol Trolox Eqv./L}$  olarak bulundu. Tüm grupların kornea TAS düzeyleri arasında da istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.001$ ).



**Grafik 3:** Kornea yanığı grubu, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların kornea TAS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).

<sup>a,b,c</sup>: Farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p < 0.001$ ).

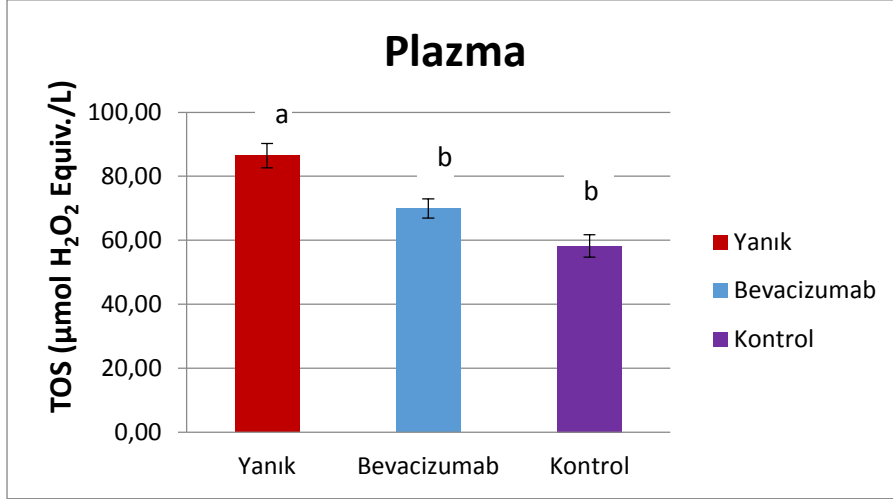
### 3.4. Plazma Total Oksidan Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması;

**Tablo 5:** Plazma, Eritrosit ve Kornea Gruplarının Total Oksidan Düzeyleri

GRUPLAR	TOTAL OKSİDAN		
	PLAZMA	ERİTROSİT	KORNEA
	X $\pm$ STD	X $\pm$ STD	X $\pm$ STD
<b>YANIK</b>	86.42 $\pm$ 3.82	3.67 $\pm$ 0.77	8.08 $\pm$ 0.49
<b>BEVACİZUMAB</b>	69.95 $\pm$ 2.98	1.64 $\pm$ 0.23	8.19 $\pm$ 1.21
<b>KONTROL</b>	58.22 $\pm$ 3.51	3.60 $\pm$ 0.47	2.53 $\pm$ 0.30

Grupların ortalama plazma TOS düzeyleri Grafik 4' de gösterildi. Bevacizumab uygulanan grubun ortalama TOS değeri 69.95 $\pm$ 2.98  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eqv. / L iken yanık grubunun 86.42 $\pm$ 3.82  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eqv. / L, kontrol grubunda ise 58.22 $\pm$ 3.51  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eqv. /L olarak tespit edildi (Tablo 2). Gruplardan kornea yanığı oluşturulan grubun ortalama TOS değeri Bevacizumab uygulanan grup ile kontrol grubuna göre

belirgin olarak yüksek bulundu ( $p<0.01$ ). Bevacizumab uygulanan grup ile kontrol grubunun plazma TOS düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

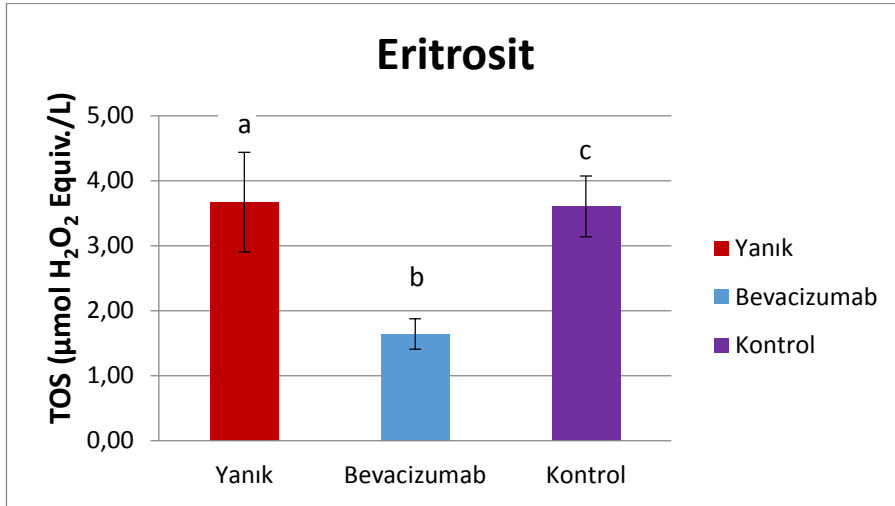


**Grafik 4:** Korneada alkali yanığı oluşturulan grup, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların plazma TOS düzeyleri (µmol Trolox Eqv./L).

<sup>a,b</sup> : Farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p<0.01$ ).

### 3.5. Eritrosit Total Oksidan Düzeylerinin Gruplara Arası Karşılaştırması

Grupların Eritrosit TOS seviyeleri Grafik 5' de gösterilmiştir. Buna göre ortalama TOS düzeyi kontrol ve kornea yanığı oluşturulan gruplarda oldukça yakın değerlerde olup, Bevacizumab grubunda ise en düşük seviyelerde bulunmuştur. Ortalama TOS düzeyi Bevacizumab uygulanan grupta  $1.64\pm 0.23\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , alkali yanığı grubunda  $3.67\pm 0.77\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ , kontrol grubunda ise  $3.60\pm 0.47\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$  olarak bulundu. Tüm grupların kornea TOS düzeyleri arasında istatistiksel olarak çok anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.001$ ).

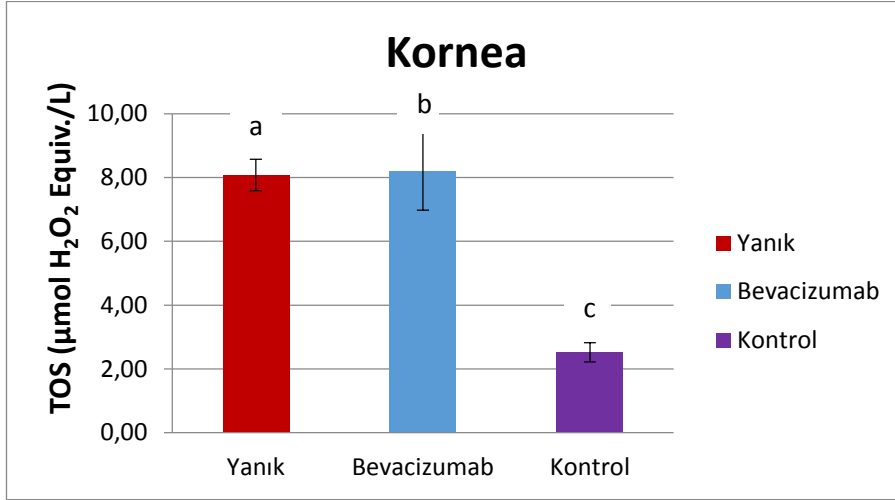


**Grafik 5:** Korneada alkali yanığı oluşturulan grup, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların eritrosit TOS düzeyleri (µmol Trolox Eqv./L).

<sup>a,b,c</sup> : Farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p < 0.001$ ).

### 3.6. Korneadaki Total Oksidan Düzeylerinin Gruplara Arası Karşılaştırması

Grupların Kornea TOS seviyeleri Grafik 6' da gösterilmiştir. Buna göre ortalama TOS düzeyleri en yüksek Bevacizumab uygulanan grupta tespit edilirken, kornea yanığı grubunun TOS düzeyleri Bevacizumab grubuna oldukça yakın değerlerde olmakla birlikte kontrol grubunda ise en düşük oranlarda belirlenmiştir. Ortalama TOS düzeyi Bevacizumab uygulanan grupta  $8.19 \pm 1.21$  µmol Trolox Eqv./L, alkali yanığı grubunda  $8.08 \pm 0.49$  µmol Trolox Eqv./L, kontrol grubunda ise  $2.53 \pm 0.30$  µmol Trolox Eqv./L olarak bulundu. Tüm grupların kornea TOS düzeyleri arasında da istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).



**Grafik 6:** Korneada alkali yanığı oluşturulan grup, kontrol ve bevacizumab uygulanan grupların kornea TOS düzeyleri ( $\mu\text{mol Trolox Eqv./L}$ ).

**a,b,c** : Farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $p < 0.001$ ).



#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Avasküler ve tamamen saydam bir yapıya sahip olan kornea, bazen dış etkenler karşısında bu özelliğini kaybederek ışık geçişini engelleyen opak bir hal alır. Kimyasal yanık, travma ve kontakt lens kullanımı gibi hipoksiye neden olan etkenlerin korneada vaskülarizasyon oluşturduğu bilinmektedir (82 ). Aynı zamanda, görme kaybının başlıca nedenlerinden olan neovaskülarizasyonun, korneanın iyileşme süreci tamamlandıktan sonra istenmeyen bir durum olduğu da ifade edilmektedir. Keza, Korneal hasara neden olan neovaskülarizasyonlarda, endotelin- I ve nitrik okside (NO) bağlı retinal kan akımının azalması hipoksiye neden olur. Hipoksi, endotel hücrelerinin salgıladığı hücrel medyatör dengesindeki patolojik değişikliklerin yol açtığı oksidatif stresi tetikleyerek endotel hücrelerinden fazla sayıda VEGF salgılanmasına neden olur. Bununla birlikte hipoksi, VEGF'ün m-RNA sentezini de artırır (54,68,83). Bu durum da neovaskülarizasyonu önleyecek, durduracak veya geciktirecek tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulur.

Hipoksik ortamda, endotel hücrelerinden oldukça fazla düzeyde salgılanan VEGF, sadece pro-anjiogenik faktör olarak değil aynı zamanda güçlü bir trofik faktör, yani damar endotel ve bazal membranlarını uyararak hasarlı ve/veya sağlıklı konumdaki normal hücre fonksiyonlarının yenilenmesini de sağlar (126). Bazı araştırmacılar (8), alkali yanıklarında humor aközde VEGF düzeylerinde artış bulmuşlardır. Alkali yanıklarında görülen ve altta yatan endotelyal harabiyetin asıl nedeninin, iskemiden kaynaklanan büyüme faktörünün enflamatuvar sitokinleri aşırı arttırarak NO düzeyini değiştirip damarsal enflamasyona yol açması olarak ifade edilmiştir. Keza, neovaskülarizasyon esnasında anjiogenik faktörlerde artış anti anjiogenik faktörlerde ise azalış görülür (27). VEGF' in salınımında en güçlü uyaranlar enflamasyon ve hipoksidir. VEGF, tavşanlarda Kornea neovaskülarizasyonunu tetikleyen önemli bir etken olarak tespit edilmiştir (55). Deneysel hayvan çalışmalarında VEGF antagonistlerinin hem kornea neovaskülarizasyonunda azalmaya hem de kornea greft ömründe azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (34,77).

Anti VEGF maddeler, yeni damarların büyümesinde yavaşlama ve inhibisyon sağlarlar. Bevacizumab (Avastin®) rekombinant humanize murine monoklonal antikordur. Bütün VEGF A izoformlarına bağlanarak onları inhibe eder. Avastin® sistemik olarak korolektal karsinomlu hastalarda kullanılmış ve düşük oranda yan etki gözlenmiştir (48). Bu nedenle düşük doz topikal ve subkonjonktival bevacizumab kullanımının önemli bir yan etki yapması beklenmemektedir. 3.5 ay boyunca göze damlatılan topikal bevacizumabın oküler yüzey toksisitesi ve epitelyum defekti yapmadığı gözlenmiştir (20). Bu ilaç YBMD, diyabetik retinopati klorit ve iris neovaskülarizasyonunda intra vitreal olarak insanlarda hiç yan etki oluşturulmadan kullanılmıştır (5,47,87). Yine yapılan bir çalışma (47), farelerde deneysel olarak oluşturulan neovaskülarizasyonda topikal bevacizumab (4mg/ ml) ile etkili bir kontrol sağlanmıştır. Benzer şekilde iki olguda intrastromal Avastin® 0.05 ml enjeksiyonunun yeni damar oluşumunu yeniletmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (62).

Kornea yanıkları, anjiogenezine neden olan sitokinlerin ve enflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırarak oksidatif strese neden olur. Bu durum da VEGF mediyatörlerinin oluşmasına neden olur çünkü metabolik aktivitesi en yüksek dokulardan olan retina reaktif oksijen türlerine karşı oldukça duyarlıdır. Oksidatif stresten korunmak için retinada diğer dokularda olduğu gibi enzimatik ve non enzimatik savunma sistemleri mevcuttur. Keza, retina bol oksijene ve doymamış lipitlere sahiptir. Bu nedenle retina, lipit peroksidasyonu ve oksijen radikallerinin üretimi için seçilmiş yer olarak bilinir (56).

Serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının nukleustaki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir. Organizmada meydana gelen serbest radikalleri yok eden sürekli çeşitli antioksidan enzimler bulunmaktadır (25). Normal fizyolojik koşullar altında, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge bulunmaktadır. Artmış oksidatif stres, radikal üretiminin artması ya da antioksidan savunma sistemlerinin azalması sonucu meydana gelebilir ve retinopatik hastalarda bu her iki olay içinde delil mevcuttur. Deneysel olarak alkali yanığı oluşturulan tavşanların humor aköz ve serumlarının lipit peroksidasyon düzeylerinde önemli artışlar bildirilmiştir (8).

Bilgihan ve ark. (19) tavşanlarda refraktif korneal cerrahi ameliyatlarından sonra kornea antioksidan düzeylerini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, korneada deneysel olarak oluşturdukları apoptosis sonrasında korneadaki GPx ve SOD enzim aktivitelerini ölçmüşler ve apoptosisli korneanın antioksidan enzim aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir azalış olduğunu bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda, alkali yanığı ile korneal neovaskülarizasyon oluşturulan grubun TAS düzeylerini kontrol grubuna oranla daha düşük düzeylerde belirledik.

Rubowitz ve ark. (104) yaptıkları başka bir çalışmada, tavşanlarda deneysel katarakt sertliği oluşturulduktan sonra korneada endotel hücre sayısında oldukça önemli düşüşler izlemişlerdir. Bunun sonucu katarakt gibi hücre hasarına neden olan intrasellüler yırtılmalarda oluşan hücresel hasarın serbest radikaller tarafından oluşturulmuş olabileceği şeklinde ifade edilmiştir. Biz de çalışmamızda alkali yanığın oluşturduğu korneal hasarın yanık grubunda TOS düzeyinin kontrollere kıyasla oldukça yüksek düzeylerde olduğunu belirledik. Bu da korneal yanığın oluşturduğu hücresel hasarın serbest radikaller tarafından oluşturulmuş olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Yokoi ve ark. (142) retinopatili diyabetik hastaların gözyaşlarında VEGF düzeylerinde önemli bir artış, TOS düzeylerinde ise önemli bir azalış gözlemlemişlerdir. Bunun da VEGF'ne bağlı oluşabilen diyabetik retinopatinin patogenezinde azalan TOS' un önemli bir rol oynayabileceği sonucu çıkarılmıştır. Çünkü, ROS türlerinin oluşumu, anjiogenik olarak VEGF aşırı oluşumuna karşı önemli bir rol oynar. Colavittin ve ark (30) VEGF oluşumunun önemli bir medyatörü olarak bildirilmiştir.

Uşhio ve ark. ROS' un anjiogenik etkisinin endotel hücrelerinde azalan redükte glutasyonun metabolik habercisi olan N asetil sistein tarafından azaldığını ifade etmişlerdir(130). Sun ve ark (117) yaptıkları bir invitro çalışmada, diyabetik retinopatiye bağlı artan VEGF'ün vasküler permeabiliteyi artırması ile birlikte hücre kültürü düzeyinde reaktif oksijen türlerinde aşırı bir artış kaydetmişlerdir. Oksidatif stresin retinopatilerinde artan VEGF ekspresyonu ile sıkı bir ilişkisi vardır. Birçok çalışmada (43,55) retinal vasküler haraplanmalar VEGF düzeyindeki artış ile

ilişkilendirilmiştir. VEGF' deki artış retinopatilerde retinal vasküler harabiyete neden olan oksidatif stresi belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Oksidatif stres retinopatide mikrovaskülarizasyona neden olan oluşumu indükler.

Zhang ve ark.(144) yaptıkları bir çalışmada, kanda süperoksit gibi oksijen radikallerinin aşırı düzeyde artmasının protein kaçağı ve vasküler geçirgenliği arttırarak retinal anjiogenik ve endotelial VEGF artışına neden olduğunu göstermişlerdir.

Bashkaran ve ark.(8) tavşanlarda sodyum hidroksit ile deneysel olarak oluşturdukları alkali kornea yanığının 7. gününde TOS ve lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden MDA düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir fark gözlemişlerdir.

Balcı ve ark. (6), kimyasal ve radyasyon gibi çevresel faktörlere sürekli maruz kalan oküler dokularda oluşan oksidatif stresin katarakt, glokom, yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıklarda önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bu tür radyasyona maruz kalan ratların kornea ve lenslerinde MDA düzeyinde artış antioksidan enzim düzeyinde ise azalış izlenmiştir. Lee ve ark.(81) iskemik retinopati araştırmalarında oksidatif stresin artan VEGF ekspirasyonu ile sıkı bir ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir. Talitha ve ark. (119) yaptıkları bir çalışmada, vasküler permeabilitenin retinal anjiogenezinde diyabetik mikrovaskülarizasyonun anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir. Zhu ve ark. (146) deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda retinal kanda VEGF düzeyinde artış izlemişlerdir. Kowluru ve ark. (78) retinada doymamış yağ asitleri diğer dokulara göre daha zengin olduğundan oksidatif strese daha duyarlıdır.

Bevacizumabın korneal neovaskülarizasyon üzerine olan etkisi ilk olarak Manzano (84) tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada farelerde topikal uygulanan bevacizumabın kimyasal koterizasyon ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyon üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde fare, tavşan ve kobaylar kullanılarak yapılan farklı modellerde bevacizumabın özellikle korneal neovaskülarizasyon oluşmadan önce uygulanması durumunda neovaskularizasyon gelişimini azaltan belirgin etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak neovaskularizasyonlar

oluştuktan sonra bevacizumab uygulaması yapıldığında görülen etki azalmaktadır (65).

Kornea neovaskularizasyon patofizyolojisinde VEGF'in belirgin rolü deneysel kornea neovaskularizasyon modellerinde (40,96), deneysel Herpes simpleks keratit (145) ve insan kornea çalışmalarında gösterilmiştir (97). VEGF'in neovasküler glokomda oynadığı rol araştırılmış ve neovasküler glokomlu hastalarda elde edilen aköz hümörde, VEGF'in ortalama konsantrasyonunun anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Hipoksi altındaki retinadan sekrete edilen VEGF'in, neovasküler glokom sırasında siliyer epitelden de sekrete edilebileceği belirtilmiştir (126).

Wei- Li Chen ve ark (134) yaptıkları bir çalışmada alkali yanığı ile korneal neovaskularizasyon oluşturulan tavşanlarda subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonunun korneal neovaskularizasyonda ciddi iyileşmeler oluştuğunu bildirmişlerdir. Wung- Jae Kim ve ark (136) deneysel olarak korneal neovaskularizasyon oluşturulan tavşanlara uygulanmadan 1 hafta sonra subkonjonktival olarak 1.25 mg/ml bevacizumab uygulamasının 2 hafta sonra korneal dokudaki VEGF düzeylerini önemli bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir.

Manzano ve ark.'nın (84) yaptığı çalışmada, deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde topikal bevacizumab (Avastin)'in anti-anjiyojenik etkisi araştırılmıştır. 16 sıçan kullanılarak yapılan çalışmada bütün sıçanların birer gözlerinin santral korneası gümüş nitrat kalemiyle koterize edildikten sonra 7 gün süreyle bir gruba 4 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin), kontrol grubuna ise topikal tuzlu su uygulanmıştır. Dijital fotoğraf makinesi ile çekilen fotoğraflarda neovaskularizasyonun kapladığı korneal alanlar hesaplanmış ve 4 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin)'in korneal neovaskularizasyonu % 40 oranında azalttığı gösterilmiştir.

Barros ve ark.'nın (7) yaptığı deneysel çalışmada subkonjunktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının korneal neovaskularizasyon modelindeki anti-anjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Yirmi sıçan kullanılarak yapılan çalışmada korneal neovaskularizasyon gümüş nitrat koterizasyon ile indüklenmiştir. 4 gruba ayrılan sıçanlarda 1. gruba (G0) koterizasyondan hemen sonra, 2. gruba (G3) 3. günde, 3. gruba (G5) 5. günde 0.02 ml subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulaması

yapılmış, kontrol grubuna ise subkonjonktival tuzlu su enjekte edilmiştir. 7. Günün sonunda çekilen fotoğraflarda ve bilgisayar programı kullanılarak neovaskularizasyonun kapladığı kornea alanları hesaplanmıştır. Kontrol grubunda % 53.56, G0 grubunda %35.57, G3 grubunda % 30.60 ve G5 grubunda % 35.86 oranında korneal neovaskularizasyon olduğu gösterilmiştir. Farelerde deneysel olarak oluşturulan neovaskularizasyonlarda, topikal Bevacizumab (4mg/ml) ile etkili kontrol sağlanmıştır (84). İki olguda intrastromal Avastin® 0.05ml enjeksiyonu yeni oluşan damarların gerilemesini hızlandırmıştır (62).

Sonuçta çalışmamızda, tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan kornea yanığı modelinde TOS düzeylerinde artış, TAS değerlerinde ise azalış tespit etmekle birlikte, subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonunun kornea yanığında artan TOS düzeylerini azaltmada, TAS düzeylerini ise arttırmada etkili olduğunu gözlemledik. Keza, artan TOS düzeyleri ile neovaskularizasyon arasında pozitif bir korelasyon, azalan TAS düzeyleri arasında ise negatif korelasyon bulunması bu parametreler ile korneal yanıklar arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir. Kolay, basit ve minimal komplikasyon riski olan subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonunun korneal neovaskularizasyonuna da neden olan kornea yanıklarının tedavisinde kullanabilmek için daha uzun süreli randomize çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

## 5.ÖZET

Çalışmada tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyon tedavisinde subkonjunktival olarak uygulanan Bevacizumab (1.25 mg /0.1 ml) gibi anti VEGF ajanının korneadaki total antioksidan ve oksidan düzeylerini nasıl etkilediğini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışma, ağırlıkları 3-3,5 kg arasında değişen 6 aylık toplam 18 adet Yeni Zellanda Tavşanı üzerinde yürütüldü. Bu amaç için, kontrol grubu (n=6), Bevacizumab grubu (n=6) ve kornea yanığı grubu (n=6) olmak üzere toplam 18 adet tavşandan oluşan 3 ayrı grup oluşturuldu.

I. Kornea Yanık Grubu: Bütün deneklerin bir gözü AgNO<sub>3</sub>-KOH ile yakılarak deneysel enflamasyon ve neovaskülarizasyon oluşturulup 3.günde subkonjonktival serum fizyolojik verilen grup.

II. Bevacizumab Grubu: Bütün deneklerin bir gözü AgNO<sub>3</sub>-KOH ile yakılarak deneysel enflamasyon ve neovaskülarizasyon oluşturulup 3.günde subkonjonktival bevacizumabverildi.

III. Kontrol Grubu: Hayvanların tümü çalışma boyunca herhangi bir uygulama yapılmayıp *ad libitum* olarak beslenildi.

Çalışma süresince bütün gruplar *ad-libitum* olarak beslenildi. Çalışmanın 21. gününde kan ve doku örnekleri alınıp Total Oksidan ve Total Antioksidan seviyeleri Spektrofotometre ile ölçülerek belirlendi.

Bevacizumab grubunun plazma Total Antioksidan düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olmayan bir yükseklik gösterdi (p>0.05). En yüksek eritrosit TAS düzeyleri kontrol grubunda tespit edildi. Kornea yanığı oluşturulan grubun eritrosit TAS düzeyi kontrollere göre daha düşük seviyede olmakla birlikte Bevacizumab uygulanan grupta en düşük seviyede bulundu. Bu düşüş istatistiksel açıdan oldukça önemliydi (p<0.001). Kornea TAS düzeyleri ise en yüksek Bevacizumab uygulanan grupta, en düşük kontrol grubunda belirlenmekle birlikte bu düşüş istatistiksel açıdan önemliydi. (p<0.001).

Kornea yanığı oluşturulan grubun plazma Total oksidan düzeyleri hem Bevacizumab uygulanan gruba hem de kontrol grubuna göre belirgin bir yükseliş gösterdi ( $p<0.01$ ). Aynı zamanda, Bevacizumab uygulanan grubun eritrosit TOS düzeyleri kontrol ve kornea yanığı oluşturulan gruplara kıyasla istatistiksel olarak önemli bir düşüş gösterdi. En yüksek kornea TOS düzeyleri Bevacizumab grubunda tespit edilirken, bu yükseliş kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemliydi ( $p<0.01$ ).

Sonuçta çalışmamızda, tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan kornea yanığı modelinde TOS düzeylerinde artış, TAS değerlerinde ise azalış tespit etmekle birlikte, subkonjiktival bevacizumab enjeksiyonunun kornea yanığında artan TOS düzeylerini azaltmada, TAS düzeylerini ise arttırmada etkili olduğunu gözlemledik. Kolay, basit ve minimal komplikasyon riski olan subkonjiktival bevacizumab enjeksiyonunun korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kullanabilmek için daha uzun süreli randomize çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.



## 6.ABSTRACT

The aim of the study is to observe the effects of an anti VEGF agent such as Bevacizumab (1.25 mg /0.1 ml) that is subconjunctivally injected to rabbits during the corneal neovascularization treatment on the total antioxidant and oxidant levels.

The study is made on 6-month old 18 New Zealand rabbits that weigh 3-3.5 kg. Three groups have been formed: control group (n=6), Bevacizumab group (n=6) and corneal burn.

I. Corneal burn Group: One eye of all subjects are burnt with AgNO<sub>3</sub>-KOH. The inflammation and neovascularization that were formed experimentally are treated with subconjunctival physiological saline solution in 3 days.

II. Bevacizumab Group: One eye of all subjects are burnt with AgNO<sub>3</sub>-KOH. The inflammation and neovascularization that were formed experimentally are treated with subconjunctival Bevacizumab in 3 days.

III. Control Group: During the study all subjects are fed *ad-libitum* without any treatment

During the study, all groups are fed *ad-libitum*. On the 21st day of the study, the total antioxidant and oxidant levels of blood and tissue samples are examined.

Total antioxidant levels of the Bevacizumab Group plasma samples showed an insignificant surge ( $p>0.05$ ) with respect to the Control Group. The highest erythrocyte TAS levels were observed in the control group. The erythrocyte TAS levels of the corneal burn group were low with respect to the Control Group while the erythrocyte TAS were at lowest levels in the Bevacizumab Group. This decline was very important in statistical terms ( $p<0.001$ ). Meanwhile, corneal TAS levels were highest in the Bevacizumab Group and lowest in the control group, still this decline was at utmost importance in terms of statistical data. ( $p<0.001$ ).

Total oxidant levels of the corneal burn group's plasma samples showed a significant surge with respect to both Bevacizumab Group and Control Group ( $p<0.01$ ). In

addition, the erythrocyte TOS levels of the Bevacizumab Group significantly declined in statistical terms with respect to the Control Group and Corneal burn Group. The highest corneal TOS levels were examined in the Bevacizumab Group. This upsurge was important compared to the control group ( $p < 0.01$ ).

At the end of the study, it is observed that the TOS levels increased and TAS levels decreased in the corneal burn model and that the subconjunctival injection of Bevacizumab is effective on decreasing the TOS levels and increasing TAS levels in corneal burns. Long-term randomized studies are necessary in order to use the subconjunctival injection of Bevacizumab; an easy and simple procedure with minimal complication, in the treatment of corneal neovascularization.

## 7.KAYNAKLAR

- 1) A.N. Witmera, G.F.J.M. Vrensenb, C.J.F. Van Noordenc, R.O. Schlingemann. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 22 (2003) 1–29
- 2) Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayımları, 1995.
- 3) Arffa RC. Disease of the cornea , fourth edition. Mosby Co. 1997, 6-7
- 4) Austin P, Brown SI: Inflammatory Terrien's marginal corneal disease. *Am J Ophthalmol* 1976; 82:189-192.
- 5) Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ et al. Intravitreal Bevacizumab in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 113;1695, 2006
- 6) Balcı M, Namuslu M, Devrim E Effects of computer monitor-emitted radiation on oxidant/ antioxidant balance in cornea and lens from rats. *Mol Vis*, 2009; 15: 2521- 2525
- 7) Barros LFM, Belfort R. The effects of the subconjunktival injection of bevacizumab (Avastin). *An Acad Bras Cienc* 2007; 79(3): 389-394
- 8) Bashkaran K, E Zunaina, S Bakiah . Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: Experimental animal study *Alternative Medicine* 2011, 11:90
- 9) Bates DO, Hillman NJ, Williams B, et al. Regulation of microvasvular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 587-597.
- 10) Baykal Y, Gök F, Erikçi S. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom* 2002; 14(1): 94-100.
- 11) Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatric Research* 2002; 51:571-578.
- 12) Bazan HE, King WD. Metabolism of phosphoinositides and inositol polyphosphates in rabbit corneal epithelium. *Curr. Eye Res* 5;793-801, 1985
- 13) Beck L, D'Amore PA: Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11:365-373.

- 14) Bednara J, Rodokanaki SA. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 24;149-153,1998
- 15) Benelli U, Ross JR, Nardi M, Klintworth GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery; inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38;274-282,1997
- 16) Bengisu Ü. Kornea. Bengisu Ü, editör. *Göz hastalıkları*. 2. Baskı. İstanbul: Beta basın yayım dağıtım A.Ş; 1985: 55-73.
- 17) Bengisu Ü. Göz hastalıkları,4.baskı: Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi. Ankara, Palme yayıncılık, 1998; 69-72
- 18) Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287–1295.
- 19) Bilgihan K, A Bilgihan, U Adiguzel. Keratocyte apoptosis and corneal antioxidant enzyme activities after refractive corneal surgery *Eye* (2002) 16, 63–68
- 20) Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B et al. Identification of peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF) mediated angiogenesis. *EMBO J* 19;1525 1533,2000
- 21) Bonanoo JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 22;69-94,2003
- 22) Bowry VW, Mohr D, Cleary J, et al. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1995; 270: 5756-63.
- 23) Bren EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*, 102:1358-1367, 2007.
- 24) Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr* 1989; 119: 109–111.
- 25) Büyükakyüz N, Altuğ T, Yaltrık M (2000). Kanser proflaksisinde antioksidan maddelerden E vitamini ve selenyumun önemi. *Dişhekimliğinde Klinik Derg.*, 12: 136-139

- 26) Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531: 5-23.
- 27) Chang JH, Gabison EE. Corneal neovascularization, pathogenesis and inhibition. *Cornea* 6;250-257,1987
- 28) Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the receptor family. *Semin Thromb Hemost* , 26:561-569, 2000.
- 29) Clemens MR. Antioxidant therapy in hematological disorders. In: *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Emeritetal (ed), New York: Plenum Press, 1990:423-433.
- 30) Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 2002; 277:3101-8.
- 31) Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214.
- 32) Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526 - 545.
- 33) Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17:611-613.
- 34) Cursiefen C. Cao J, Chen L et al. Inhibition of lymphangiogenesis and hemangiogenesis after normal risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45;2666-73,2004
- 35) Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4:92-95.
- 36) Çelik H. Malarya (Sıtma) hastalarında oksidatif stres ve mononükleer lenfosit DNA hasarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 2005.
- 37) De Boer J, Hoeijmakers J. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 453-460.

- 38) Dimitri T Azar: Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104:264-302.
- 39) Duha HS. Gomes AP. Corneal epithelial wound healing. *British J Ophthalmol* 78;401-408,1994
- 40) Edelman J, Castro M, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40;1112-1123,1999
- 41) Efron N, Carney LG. Oxygen levels beneath the closed eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 18;93-100,1979
- 42) Efron N: Vascular response of the cornea to contact lense wear. *J Am Optom Assoc*1987; 58:836-846.
- 43) Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 245;1577-1579,2007
- 44) Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J Clin Biochemistry* 2005; 47: 119-29.
- 45) Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J Clin Biochemistry* 2004; 37: 112-9.
- 46) Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 2004; 26: 533-542.
- 47) Feiner L, Barr EE, Shui YB, Holekamp NM, Brantley MA Jr. Safety of intravitreal injection of Bevacizumab in rabbit eyes. *Retina* 26;882-888,2006
- 48) Fernando NH, Hurwits HI. Targeted therapy of colorectal cancer, clinical experience with Bevacizumab. *Oncologist* 9;11-18,2004
- 49) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
- 50) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
- 51) Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 391-400.

- 52) Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.
- 53) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-10934.
- 54) Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al: Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2604-9, 2001
- 55) Gan L, Fagerholm P. Vascular endothelial growth factor and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand* 82;557-63,2004
- 56) Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, et al. 2008. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis *J Nutr Biochem* 19: 491-504
- 57) Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of human eye. *Arch Ophthalmol* 103;785-801,1985
- 58) Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281: 9-19.
- 59) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed., London; O.U. Press. 1999.
- 60) Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999; 443:37-52.
- 61) Henkind P: Ocular neovascularization. The Krill memorial lecture. *Am J Ophthalmol* 1983; 85:287-301.
- 62) Hofling-Lima A, Belfort R Jr, de Freitas D, Farah ME. Intrastromal injection of Bevacizumab for treatment of corneal neovascularization. Program and abstracts of the 2006 Joint Meeting of the American Academy of Ophthalmology and Asia Pacific Academy of Ophthalmology; November 11-14, 2006; Las Vegas, Nevada. Poster 434
- 63) Hogan MJ, Alvarado JA. *Histology of the human eye*. Philadelphia. WB Saunders 55-111,1997

- 64) Huang AJW, Watson BD, Hernandez E, Tseng SCG: Induction of conjunktival transdifferentiation on vascularized corneas by photothombotic occlusion of corneal neovascularization. *Ophthalmology* 1988; 95:228-235.
- 65) Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan AH. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea*. 2008;27:357-62.
- 66) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42.
- 67) Iguchi I, Kamiyama K. Enhancing effect of platelet-derived growth factor on migration of corneal endothelial cells. *Cornea* 14;365-371,1995
- 68) Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2155-2162.
- 69) Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as the therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103:1231-1236.
- 70) Jensen SJK, Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003; 666: 387-392.
- 71) Jester JV, Petrol WM. Corneal stromal wound healing in refractive surgery. The role of myofibroblasts. *Prog Retina Eye Res* 18;311-356,1999
- 72) Jin-Hong Chang, Eric E. Gabison, Takuji Kato ve ark. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12:242-249.
- 73) Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, et al. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in nude mice model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-1140.
- 74) Katryn AH. Fundamentals and principles of Ophthalmology, Src 2; American Academy Of Ophthalmology, s.46
- 75) Kattamis C, Kattamis AC. Oxidative stress disturbances in erythrocytes of  $\beta$ -thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18: 85-88.
- 76) Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33: 110-118.



- 77) Kim B, Tang Q, Biswas PS et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes. *Am J Pathol* 165;2177-22,2004
- 78) Kowluru RA, Kanwar M, Kennedy A Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries *Experimental Diabetes Research (Impact Factor: 1.89)*. 02/2007; 2007:21976. DOI:10.1155/2007/21976
- 79) Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea* 1997; 1:3-27
- 80) Kremer I, Cohen EJ, Eagle RC ve ark. Histopathological evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba keratitis*. *CLAO J* 1994; 20:45-48.
- 81) Lee BMD JD, Walter J Stark MD, Albert S Jun MD PhD. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: a successful alternative to repeat penetrating keratoplasty *Clinical & Experimental Ophthalmology* Volume 39, Issue 3, pages 195–200, April 2011
- 82) Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43:245-269.
- 83) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
- 84) Manzano RPA, Peyman GA, Khan P ve ark. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *British Journal of Ophthalmology* 2007 Jun; 91(6):804.
- 85) Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL. Electrophysiologic findings after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006; 26: 270-274.
- 86) McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 1993; 26: 351-357.
- 87) Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label study. *Ophthalmology* 2005; 112: 1035-1074.
- 88) Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994; 145: 574-584.

- 89) Milligan JR, Ward JF. Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res* 1994. 137: 295-299.
- 90) Minnet C. Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliğinin oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, 2006.
- 91) Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi AM, et al. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys* 1998; 352:165-74.
- 92) Muller LJ, Pels L. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37;476-488,1996
- 93) Myron Yanoff, Jay S Duker. *Ophthalmology*. In: Ming XW, Carol LKarp, Robert P Selkin, Dimitri TA. Mosby edition. Chapter 5: 12.1-12.18.
- 94) Orkin SH, Nathan DG. The Thalassemias. In: Nathan DG, Orkin SH (eds), Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and Childhood*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998; 811-886.
- 95) Ortega N, L'Faqihi FE, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell*, 90:381-390, 1998.
- 96) Philips GD, Stone AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 8;961-5,1994
- 97) Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41;2514-22,2000
- 98) Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1219-1228.
- 99) Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 341-357.
- 100) Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Biochem* 1992; 286(35): 607-11.

- 101) Riordan-Eva P. Anatomy and embryology of the eye. In: Vaughan D, Asbury T, Riordan-Eva P, eds. *General ophthalmology*. 15 th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1999: 8-10. 11.
- 102) Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 175-183.
- 103) Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 331-335.
- 104) Rubowitz A, Assia AI, Rosner M, Topaz M. Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(5): 1866-1870.
- 105) Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2002; 27: 483-486.
- 106) Scott MD, Van den Berg JJM, Repka T, et al. Effect of excess  $\beta$ -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model  $\beta$ -thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest* 1993;91:1706-1712.
- 107) Shahar J, Avery RL, Heilweil G, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006; 26: 262- 269.
- 108) Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB reports*, 41(4):278-286, 2008.
- 109) Shi X, Dong Z, Huang C et al. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biochem* 1999; 194: 63-70.
- 110) Shizuya S, Ohnishi Y. Epithelial repair. Roles of extracellular matrix. *Cornea*
- 111) Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50: 1774-1778.

- 112) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
- 113) Spaide RF, Laud K, Fine HF, et al. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina* 2006; 26: 383-90.
- 114) Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 315-25.
- 115) Stocker R, Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 841-9.
- 116) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235:1043-6.
- 117) Sun j, Xu Y, Sun S, Sun Y Wang X Intermittent high glucose enhances cell proliferation and VEGF expression in retinal endothelial cells: the role of mitochondrial reactive oxygen species *Biochemistry* (2010), 27-35
- 118) Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 1999; 8:42-47.
- 119) Talitha T. Rajah and Paula Grammas. VEGF and VEGF receptor levels in retinal and brain-derived endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (2002) 710–713
- 120) Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 65:550-563, 2005.
- 121) Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med* 2008;9:1190-221.
- 122) Thorft RA, Friend J. Corneal glucose flux. *Arch Ophthalmol* 1971 ; 86: 685
- 123) Tipathi RC, Chalam KV, Cibis GW, Kardon PH, Tipathi BJ, Weleber RG, Wand M. Fundamentals and principles of ophthalmology, American Academy of ophthalmology, Taylor Fran, USA, 1999; 150-4. 3-Özdemir Ö. Kornea transplantasyonu. *Medikal Network Oftalmoloji Dergisi* 1995; 2(1): 6-9.

- 124) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.
- 125) Totter JR. Proc. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1763–7.
- 126) Tripathi RC, Li J, Tripathi BJ, Chalam KV, Adamis AP. Increased level of VEGF in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 105;232- 237,1998
- 127) Tucker SM. Corneal diameter, axial length ,intraocular pressure in premature infants. *Ophtalmology* 1992; 99:1296
- 128) Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 4;389-424,1990
- 129) Turkiye Klinikleri *J Ophthalmol* 2007, 16:114-121
- 130) Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 91:1160-7.
- 131) Volker-Dieben HJ. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aus N Z J Ophtalmol* 1987; 15:11-18.
- 132) Waltman RS, Hart WM. The Cornea In : Moses R.A, editor, *Physiology of the eye*. St. Louis, CV Mosby, 1987; 36-59.
- 133) Waring GO, Laibson PR, Rodrigues M. Clinical and pathologic alterations of Desme's membrane. *Surv Ophthalmol* 1974; 18: 325.
- 134) Wei-Li Chen, Chung-Tien Lin, Nien-Ting Lin. Subconjunctival Injection of Bevacizumab (Avastin) on Corneal Neovascularization in Different Rabbit Models of Corneal Angiogenesis. *IOVS*, April 2009 50- 4
- 135) William MH. *Adler's Physiology of the eye*, Ninth edition, Mosby Co.1992
- 136) Wung- Jae Kim, Jeong H, Chung K. The effect of bevacizumab on cornea neovascularization in rabbits. *Korean J Ophthalmol*. 2010 August; 24(4): 230–236
- 137) Yamada KM. fibronectin peptides in cell migration and wound repair. *The Journal of Clinical Investigation* 105;1507-1509,2000

- 138) Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatological Science* 2001; 27: 1-4.
- 139) Yeşilkaya A, Altınayak R, Korgun DK. The antioxidant effect of free bilirubin on cumenehydroperoxide treated human leukocytes. *Gen Pharmacol* 2000; 35:17-20.
- 140) Yigit A, Yurdakök M. Yeni doğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1997;39:749-765.
- 141) Yla-Herttua S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors. Biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 49:1015-1026, 2007.
- 142) Yokoi N, Komuro A, Nishii M, et al.: Clinical impact of conjunctivochalasis on the ocular surface. *Cornea [Clinical Trial]*. 24 (Suppl. 8):S24-S31 2005
- 143) Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhom L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 1013-1022.
- 144) Zhang H, Zhang M, Tan C. Fast Translation Rule Matching for Syntax-based Statistical Machine Translation Singapore, 6-7 August 2009 1037-1045
- 145) Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol*. 75:9828-35,2001
- 146) Zhu Q, Sun W, Okano K, Chen Y. Sponge Transgenic Mouse Model Reveals Important Roles for the MicroRNA-183 (miR-183)/96/182 Cluster in Postmitotic Photoreceptors of the Retina *J Biol Chem*. 2011 September 9; 286(36): 31749–31760.

## **8.ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında Hatay'ın Kırıkhan ilçesinde doğdum. İlköğretimime Adana' nın Pozantı ilçesinde başlayıp Osmaniye' de bitirdim. Ortaokul ve liseyide Osmaniye'de bitirdim daha sonra Mersin Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik bölümüne başlayıp 2007 yılında mezun oldum. 2008 yılında Kafkas Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde hemşire olarak göreve başladım aynı yıl Kafkas Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans eğitimine başladım. 2011 yılından beri İskenderun Devlet Hastanesinde çalışmaktayım. Evliyim.