

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**TOPIKAL VE SUBKONJONKTİVAL BEVACİZUMAB (AVASTİN)  
UYGULAMASININ DENEYSSEL KORNEAL  
NEOVASKÜLARİZASYON MODELİNDEKİ İNHİBİTÖR  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Veysi ÖNER**

ANKARA, 2008

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**TOPIKAL VE SUBKONJONKTİVAL BEVACİZUMAB  
(AVASTİN) UYGULAMASININ DENEYSEL KORNEAL  
NEOVASKÜLARİZASYON MODELİNDEKİ İNHİBİTÖR  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Veysi ÖNER**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**Prof. Dr. Yonca A AKOVA**

**Dr. Cem Küçükerdönmez**

ANKARA, 2008

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimi almamda ve bu çalıŐmanın gerçekleŐtirilmesinde emeği geçen baŐta tez danıŐmanım Prof. Dr. Yonca A. Akova ve Dr. Cem Kkerdnmez olmak üzere, ğretim yeleri Prof. Dr. Sibel Oto, Prof. Dr. Grsel Yılmaz, Prof. Dr. Ahmet Akman, Doç. Dr. Dilek Dursun Altınörs, Doç. Dr. Őansal Gedik, Yrd. Doç. Dr. İmren Akkoyun, Uzm. Dr. Sezin Akça Bayar ve histopatolojik çalışmaları yapan Patoloji ABD ğretim yesi Doç. Dr. Banu Bileziki ve asistan Dr. Aysel olak ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

**Dr. Veysi NER**

Haziran 2008, Ankara

## ÖZET

Bu çalışma yüksek ve düşük doz topikal ve subkonjonktival bevacizumab (Avastin, Genentech Inc., San Fransisco, Ca, USA) uygulamasının sıçan modelinde korneal neovaskularizasyondaki inhibitör etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Sprague-Dawley türü, 20 erkek sıçanın korneaları gümüş nitrat çubukları kullanılarak kimyasal olarak koterize edildi. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı: düşük doz (grup 1) ve yüksek doz (grup 2) topikal bevacizumab (Avastin) gruplarına sırasıyla günde 2 defa 4 mg/ml ve 12.5 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin), subkonjonktival enjeksiyon grubuna (grup 3) 1. 3. 5. ve 7. günlerde 0.05 ml/1.25 mg subkonjonktival bevacizumab ve kontrol grubuna (grup 4) günde 2 defa topikal suni gözyaşı uygulandı. Dijital fotoğraflar çekildi ve bir bilgisayar programı (Pixcavator Image Analyzer, Intelligent Perception, WV, USA) kullanılarak incelendi. Onuncu günde bütün sıçanlar sakrifiye edilerek gözleri enükle edildi. Korneal kesitler alınarak histopatolojik değişiklikler incelendi. Ortalama neovasküler korneal alan kontrol grubunda %  $63.32 \pm 13.10$  (ortalama  $\pm$  SS), grup 3'te (subkonjonktival enjeksiyon) %  $50.22 \pm 15.73$ , grup 1'de (düşük doz topikal bevacizumab) %  $26.76 \pm 10.23$  ve grup 2'de (yüksek doz topikal bevacizumab) %  $25.52 \pm 12.45$  olarak bulundu. Kontrol grubu ile grup 1 (düşük doz topikal bevacizumab) ve grup 2 (yüksek doz topikal bevacizumab) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p_1, p_2 < 0.01$ ). Fakat grup 3 (subkonjonktival enjeksiyon grubu) ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Korneal kesitlerin histopatolojik incelemesinde düşük ve yüksek doz topikal bevacizumab ile tedavi edilen gözlerde kontrol grubuna göre daha az neovasküler korneal alan ve korneada daha az sayıda eritrosit içeren damar olduğu görüldü. Topikal bevacizumab (Avastin) uygulaması deneysel korneal neovaskularizasyonu azaltmaktadır ancak subkonjonktival bevacizumab (Avastin) enjeksiyonunun bu konudaki etkisi yetersiz görünmektedir. Sonuçlar topikal bevacizumab uygulamasının doz arttırılmasına gerek kalmadan (4 mg/ml veya 12.5 mg/ml) korneal anjiyojenezi inhibe ettiğini göstermektedir. Topikal bevacizumab (Avastin), klinik kullanımda korneal neovaskularizasyon tedavisine katkı sağlayabilir.

## ABSTRACT

This study was carried out to evaluate and compare the inhibitory effects of topical high dose, low-dose and subconjunctival bevacizumab (Avastin, Genentech Inc., San Francisco, Ca, USA) on corneal vascularization in a rat model. Corneas of 20 Sprague-Dawley male rats were chemically cauterized with silver nitrate sticks. Animals were divided in four groups: low-dose (group 1) and high-dose (group 2) topical bevacizumab groups that received twice daily instillation of 4 mg/ml and 12.5 mg/ml bevacizumab, subconjunctival injection group (group 3) that received 0.05 ml (1.25mg) of bevacizumab on day 1, 3, 5 and 7; control group (group 4) that received only topical artificial tear drops twice daily, respectively. Digital photographs of the corneas were taken and analyzed using an image analysis software (Pixcavator Image Analyzer, Intelligent Perception, WV, USA). On day 10, all animals were sacrificed and the eyes were enucleated. Corneas were excised and examined for changes in histology. The mean percentage of neovascularized corneal area in the control group was  $63.32 \% \pm 13.10$  (mean  $\pm$  SD),  $50.22 \% \pm 15.73$  in group 3 (subconjunctival injection),  $26.76 \% \pm 10.23$  in group 1 (low dose topical bevacizumab) and  $25.52 \% \pm 12.45$  in group 2 (high dose topical bevacizumab). The differences between control group and group 1 (low dose topical bevacizumab) and group 2 (high dose bevacizumab) were found to be statistically significant ( $p_1, p_2 < 0.01$ ). However, there was no statistically significant difference of mean percentage values between group 3 ( subconjunctival injection ) and control group ( $p > 0.05$ ). In histopathological examination of the excised corneas, treated eyes with low and high dose bevacizumab (Avastin) showed significantly less neovascular area and number of vessels than the control group. Topical application of bevacizumab (Avastin) reduces experimental corneal vascularization compared with the control group, but the effect of subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) seems to be insufficient. These results suggest that topical bevacizumab is able to inhibit corneal angiogenesis, without increasing the dosage (4mg/ml or 12.5mg/ml for topical form). Clinical use of topical bevacizumab may have an additional effect in the treatment for corneal neovascularization.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
Teşekkür.....	iii
Özet .....	iv
Abstract.....	v
Kısaltmalar ve simgeler dizini .....	vii
Şekiller dizini .....	ix
Tablolar dizini .....	x
Giriş.....	1
Genel Bilgiler.....	3
Gereç ve Yöntem.....	20
Bulgular.....	23
Tartışma.....	34
Sonuç.....	40
Kaynaklar .....	41

## KISALTMALAR VE SİMGELER

5-FU	: 5-Florourasil
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
YBMD	: Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu
bFGF	: basic Fibroblast Growth Factor
cAMP	: cyclic Adenosine Mono Phosphate
COX	: Cyclooxygenase
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FDA	: Food and Drug Administration
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor
HGSF	: Hepatocyte Growth Factor-Scatter factor
IGF	: Insuline-like Growth Factor
IL	: Interlökin
IRS	: Insuline Receptor Substrate
kDa	: kilodalton
kg	: kilogram
LMWH	: Low Molecular Weight Heparine
mg	: miligram
ml	: mililitre
mRNA	: messenger Ribonucleic Acid
MCP	: Monocyte Chemoattractant Protein
MMPs	: Matrix Metalloproteinases
nm	: nanometre
NSAİDs	: Non-steroid Anti-İnflamatuar Drugs
ODN	: Oligodeoxynucleotide
PAF	: Platelet Activating Factor
PDGF	: Platelet-derived Growth Factor
FDT	: Fotodinamik Tedavi
PEDF	: Pigment Epithelium Derived Factor
PGE2	: Prostaglandin E2

PGF	: Placenta Growth Factor
PI-3K	: Phosphotidil Inositole-3 Kinase
siRNA	: small interferring Ribonucleic Acid
ss	: standart sapma
TA	: Triamsinolon Asetonid
TGF- $\alpha$	: Transforming Growth Factor- $\alpha$
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosing Factor- $\alpha$
TIMPs	: Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinases
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	: Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor
VPF	: Vasküler Permiabilite Faktörü



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	SayfaNo:
1	Bütün gruplardaki sıçanların gözlerinde oluşan korneal neovaskülarizasyonun tüm korneal alana oranlarının ortalama değerleri.....24
2	Düşük doz topikal bevacizumab (Grup 1) uygulanan sıçan gözünde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon .....25
3	Yüksek doz topikal bevacizumab (Grup 2 ) uygulanan sıçan gözünde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon.....26
4	Subkonjonktival bevacizumab (Grup 3) uygulanan sıçan gözünde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon .....27
5	Suni gözyaşı damlatılan (Grup 4, kontrol grubu) sıçan gözünde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon .....28
6	Düşük doz topikal bevacizumab (Grup 1) uygulanan sıçan gözünden alınan korneanın H&E kesitinin histopatolojik incelemesi .....30
7	Yüksek doz topikal bevacizumab (Grup 2) uygulanan sıçan gözünden alınan korneanın H&E kesitinin histopatolojik incelemesi .....31
8	Subkonjonktival bevacizumab (Grup 3)) uygulanan sıçan gözünden alınan korneanın H&E kesitinin histopatolojik incelemesi .....32
9	Suni gözyaşı uygulanan (kontrol grubu) sıçan gözünden alınan korneanın H&E kesitinin histopatolojik incelemesi .....33

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b><u>Sayfa No:</u></b>
1	Korneal neovaskularizasyon ile ilişkili hastalıklar .....5
2	Anjiyojenik faktörler .....9
3	Anti-anjiyojenik faktörler.....12
4	Korneal neovaskularizasyon tedavisinde düşünölen medikal ve cerrahi tedavi seçenekleri .....24
5	Gruplardaki sıçanların gözlerinde ortalama neovasköler korneal alan ve eritrosit içeren damar sayıları .....29

# 1. GİRİŞ

Kimyasal ve termal hasar, Stevens-Johnson Sendromu, kontakt lens kullanımına bağlı keratopati, konjenital aniridi, keratitler, multiple endokrin bozukluk gibi birçok patolojik durum korneal neovaskularizasyon ve skara yol açmaktadır. Sonuçta kronik inflamasyon, persistan epitelyal hasar, stromal skar ve neovaskularizasyon gelişmekte bu da görme keskinliğinde azalmaya yol açmaktadır<sup>1</sup>. Bu tür hastalıklarda keratoplasti sonrası prognoz kötüdür. Alternatif cerrahi tedavi olarak amniyotik membran transplantasyonu ile birlikte korneal kök hücre transplantasyonu (limbal transplantasyon veya keratoepitelyoplasti) ve son zamanlarda kültürde üretilmiş kök hücre transplantasyonu oküler yüzeyin düzeltilmesine katkıda bulunmaktadır. Ancak limbal kök hücre transplantasyonunda allogreft kullanıldığında rejeksiyon riski, hastanın hayat kalitesini düşüren uzun süreli immünsüpresan kullanımı ve bilateral hastalıklarda otogreft yapılamaması gibi çeşitli problemler söz konusu olmaktadır.<sup>2</sup>

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)' nn korneal neovaskularizasyon ile sıkı ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yavaş salınımlı VEGF polimer implantlarının korneal neovaskularizasyonu uyardığı bildirilmiş olup deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde yüksek korneal VEGF mRNA ve protein düzeylerinin yüksek VEGF reseptör düzeyleri ile birlikteliği gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan patolojik çalışmalar, neovaskularizasyonlu kornealarda VEGF ve reseptörlerinin normal kornealardan daha yüksek konsantrasyonda mevcut olduğunu göstermiştir.<sup>3</sup>

Bevacizumab (Avastin), insanlarda kullanılabilir hale getirilmiş VEGF molekülüne karşı sentezlenen uzun etkili bir fare antikoruudur. Ticari olarak mevcut olup metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde FDA onayı almıştır. İlerlemiş göğüs ve böbrek kanserleri tedavisi için faz 3 çalışmalar devam etmektedir.<sup>4</sup>

Sonuçlar, farklı etyolojilere bağlı gelişen (yüksek miyopi, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu gibi) koroidal neovaskülarizasyonların tedavisinde intravitreal bevacizumab (Avastin) uygulamasının etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca diyabetes mellitus ve retinal vasküler tıkanıklıklara bağlı gelişen retina ve iris neovaskülarizasyonun da oldukça iyi sonuçlar elde edilmektedir.<sup>5,6,7,8,9</sup>

Bu deneysel çalışmada, topikal ve subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının korneal neovaskülarizasyon modelindeki inhibitör etkisinin araştırılması ve bu yöntemlerin karşılaştırılmasını amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Korneal Neovaskülarizasyon

#### 2.1.1. Giriş

Korneanın saydam ve damarsız olması optik performansı açısından çok önemlidir<sup>10</sup>. Neovaskülarizasyon önceden damarsız olan bir bölgede yeni damar yapılarının oluşmasıdır ve iki mekanizmayı içermektedir:

##### 1.Vaskülojenez

##### 2.Anjiyojenez

Vaskülojenez, özellikle embriyojenez sırasında, kemik iliği anjiyoblastlarından yeni damarların oluşmasıdır. Anjiyojenez ise önceden var olan damar yapılarından yeni damarların oluşmasıdır. Tümörlerde, korneal ve retinal hastalıklarda anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki denge anjiyojenik faktörler tarafına kaydığında meydana gelmektedir.<sup>11,12,13</sup>

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

Korneanın ve diğer oküler yapıların neovasküler ve infeksiyöz hastalıkları önemli bir halk sağlığı problemidir<sup>14</sup>. ABD’de genel popülasyondaki korneal neovaskülarizasyonun sıklığı ve prevalansı ile ilgili çalışma yoktur. Ancak 1996’da Massachusetts Göz ve Kulak Hastanesi’nin göz servisine başvuran genel hasta popülasyonunun %4.14’ünde korneal neovaskülarizasyon olduğu saptanmıştır. İncelenen 835 hastanın 35’inde gözlenen korneal neovaskülarizasyonun etyolojisinde , kontakt lens kullanımı (14 hasta), kapak inflamasyonu (7 hasta), geçirilmiş cerrahi (5 hasta), ön segment neovaskülarizasyonu (2 hasta), travma (1 hasta), trikiyazis (1

hasta), herpes simpleks infeksiyonunun (1 hasta) rol aldığı tespit edilmiştir. Ulusal Körlüğü Önleme Derneğine (National Society to Prevent Blindness) 1976'da 33.7 milyon göz muayene başvurusu olmuştur ve buna göre ABD'de 1.4 milyon insanda korneal neovaskülarizasyon olduğu tahmin edilmektedir<sup>15</sup>. Korneal transplantasyon sonrası elde edilen dokuların histopatolojik incelemelerinde % 20'sinde neovaskülarizasyon olduğu görülmüştür. Ancak bu konuda popülasyon tabanlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Korneal neovaskülarizasyon ile sık birlikteliği olan Herpes simpleks infeksiyonu yalnızca ABD'de 500 bin hastada rapor edilmiştir. ABD'de yumuşak kontakt lens kullananlarda neovaskülarizasyon prevalansı 125 bin ile 470 bin arasındadır<sup>16</sup>.

Korneal neovaskülarizasyon, dünyada milyonlarca insanın görmesini kaybetmesine sebep olan şiddetli ön segment infeksiyonlarıyla ilişkilidir. Yalnızca klamidyal infeksiyonlar dünyada 400 milyon insanı etkilemekte olup, Kuzey Afrika, Ortadoğu, Hindistan ve Güney Asyada sık görülmektedir. Bu enfeksiyonlar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 1970'teki raporuna göre dünyada 6 milyon insanda körlük nedenidir. Onkoserkiyazis ise özellikle ekvatoryal Afrika, Orta ve Güney Amerika'da 50 milyon insanı etkilemekte ve 1 milyon insanda körlük nedenidir. Bütün bu veriler korneal neovaskülarizasyonun göz hastalıklarında önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir<sup>16</sup>.

### **2.1.3. Etyoloji ve Patogenez**

Korneal hasar sonrasında yara iyileşmesi genellikle neovaskülarizasyon olmadan gerçekleşir. Ancak çeşitli inflamatuvar, infeksiyöz, dejeneratif ve travmatik hastalıklara bağlı yara iyileşmesi korneal neovaskülarizasyona yol açabilmektedir<sup>16</sup> (Tablo-1).

---

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

---

İnflamatuvar hastalıklar
Oküler 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, klamidya, 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 neovaskularizasyonun etyolojisi tam olarak anlaşılamamış olup mevcut bilgilerin çoğu hayvan modellerinden elde edilmiştir<sup>17</sup>. Limbal sınırda bir korneal hasar olduğunda epitelyal defekt korneal epitel ve komşu limbal epitel tarafından kapatılmaktadır. Limbal epitel normal korneal epitele dönüşen kök hücreler içermektedir. Limbal kök hücre yıkımına yol açan hasarlar konjonktival epitel ile onarılmaktadır. Konjonktiva epiteli goblet hücreleri içerir ve vaskularizedir. Bu epitelyal fenotip optik açıdan kötüdür ve görme keskinliğini düşürür. Sıklıkla kimyasal yanıklar ve Stevens-Johnson Sendromu ile ilişkili olan bu epitelyal fenotip

korneanın fonksiyonunu bozmakta, tekrarlayan korneal erozyonlara yol açmakta, düzensiz optik yüzeye bağlı görme keskinliğini düşürmekte ve bariyer fonksiyonunu bozmaktadır. İlginç olarak hayvan modellerinde korneal damarların selektif olarak yok edilmesi anormal kornea epitelinin değişerek normal kornea epitelinin birçok fenotipik özelliklerini taşımasına yol açmaktadır<sup>18</sup>. Bu veriler ışığında antianjiyojenik tedavinin hasarlı korneal epitelin normal korneal epitele dönüşmesini sağlayabileceği öne sürülmektedir<sup>16</sup>.

Önemli bir oküler komplikasyon olan korneal neovaskülarizasyon; korneal skar, ödem, lipid birikimi ve inflamasyona sebep olabilmekte ve görme keskinliğini azaltmaktadır. Kornea nakli sonrası histopatolojik olarak vaskülarize olduğu saptanan korneal greftler arasında greft kaybı %30'dan fazla oranda görülmüştür<sup>19</sup>. Vaskülarize korneal greftlerin prognozunun kötü olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır<sup>20</sup>.

Neovasküler korneanın optik kalitesi birkaç nedenden dolayı azalmaktadır<sup>10</sup>:

1. Damarlarda dolaşan kan hücrelerinin oluşturduğu opasite
2. Damar duvarlarının düzensiz yapısının beklenenden fazla sapmalara sebep olması
3. Damarların arasındaki kollajenin yerleşiminin bozulması
4. Geçirgen damarların etrafındaki dokuda ödem, sıvı ve lipid birikimi
5. Yüzeysel pannus olan olgularda korneal yüzey düzensizliği

Genel popülasyon için korneal neovaskülarizasyon ile en sık ilişkili durum kontakt lens kullanımındır. Farklı prevalans tahminlerine rağmen korneal neovaskülarizasyon vakalarının % 10-30'unu oluşturduğu düşünülmektedir. Gaz geçirgen sert kontakt lenslere kıyasla yumuşak kontakt lens kullanımında korneal neovaskülarizasyon daha sık görülmekte ve bu oran kullanım süresinin uzaması ve kontakt lensin gece gözde kalmasıyla artmaktadır<sup>21</sup>. Kontakt lens kullanımına bağlı



korneal neovaskularizasyonun patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır ancak hipoksi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir<sup>14</sup>.

Kornea ve konjonktivanın immünolojik ve infeksiyöz hastalıkları korneal neovaskularizasyondan sorumlu anjiyojenik moleküllerin üretilmesine sebep olabilmektedir. Bu yüzden inflamatuvar hastalığı olan hastaların uzun süreli takiplerinde, örneğin atopik keratokonjonktivitlerde, korneal neovaskularizasyon görülme oranının %60'lara varabildiği bildirilmiştir<sup>22</sup>.

Keratit nedeniyle yapılmış kornea nakilleri sonrası elde edilen korneal dokular incelendiğinde en sık infeksiyöz ajanın herpes virüs ailesi (Daha çok herpes simpleks ve herpes zoster) olduğu tespit edilmiştir. Korneal neovaskularizasyon interstisyel, nekrotizan ve rekürren epitelyal keratitler sonrası gelişmektedir. Deneysel veriler herpes virüslerine bağlı meydana gelen oküler hastalığın paterninin viral DNA tarafından belirlendiğini göstermektedir<sup>23</sup>. Herpetik korneal neovaskularizasyon sonrasında stromaya lipid sızıntısı korneal opasifikasyona yol açmaktadır. Pupiller bölgeyi kaplayan lipid keratopati görme keskinliğinde azalmaya yol açmaktadır<sup>10</sup>.

Trahom, Klamidya trahomatisin sebep olduğu bir kronik konjonktivit olup dünyada önlenebilen körlüklerin en önemli sebeplerinden biridir. Bu vakaların hemen tamamında korneal neovaskularizasyon ve fibröz pannus oluşumu mevcuttur<sup>14</sup>.

Onkoserkiyazis, Onkoserka volvulus'un filariyal parazitlerinin sebep olduğu korneal neovaskularizasyona sebep olan önemli körlük nedenlerinden bir tanesidir. Zamanla fibrovasküler pannus gelişir hemen bütün kornea opaklaşma ve neovaskularizasyon ortaya çıkmaktadır<sup>14</sup>.

Daha çok inflamatuvar durumlarda görülmesine rağmen korneal neovaskularizasyon Terrien gibi dejeneratif hastalıklarda ve aniridi gibi konjenital hastalıklarda da görülebilmektedir<sup>19,24,25</sup>. Ancak bu durumlarda bile patogeneizde inflamasyonun da etkili olabileceği düşünülmektedir<sup>22</sup>.

Korneal neovaskularizasyon alkali kimyasal maddelere bağlı oluşan geniş hasarın onarımının bir parçasıdır. Ancak neovaskularizasyon şiddetli hasarın onarımında geç fazla patolojik olabilmektedir. Bu fazda epitelizasyon tamdır ancak limbal kök hücre hasarına bağlı olarak korneayı fibrovasküler pannus kaplayabilmektedir<sup>14</sup>.

Kornea, oftalmik arterin dalları olan siliyer arterlerin oluşturduğu, limbal bölgede yer alan perikorneal pleksustan beslenir. Korneal neovaskularizasyon özellikle perikorneal pleksustaki kapiller ve venüllerden köken alan yeni damarlar tarafından oluşturulur ve çok değişik şekillerde görülebilir. Genellikle  klinik formda incelenir<sup>10</sup>:

1. Yüzeyel neovaskularizasyon
2. Vasküler pannus
3. Derin neovaskularizasyon

Yüzeyel neovaskularizasyonda damarlar yüzeyel marjinal arkuattan köken almıştır ve epitel boyunca uzanır, korneal travma, hafif kimyasal yanık, inflamasyon ve infeksiyonlarda görülebilmektedir. Vasküler pannusta limbustan periferik korneaya kollajen ve damarlar uzanmaktadır. Derin neovaskularizasyon Bowman tabakasından Descemet zarına kadar herhangi bir seviyede gelişmekte ve genellikle ciddi n segment hasarlarında görülebilmektedir<sup>26,27,28</sup>.

#### **2.1.4. Korneal Neovaskularizasyonun Moleküler Temelleri**

Korneanın damarsız yapısının korunması için bazal durumlarda anjiyojenik faktörlerin seviyelerinin düşük, anti-anjiyojenik faktörlerin seviyelerinin yüksek olmasına ihtiyaç vardır. Bu denge anjiyojenik faktörler tarafına kaydığında neovaskularizasyon meydana gelmektedir<sup>29</sup>. Bütün infeksiyöz keratitler korneal neovaskularizasyona sebep olabilmesine karşın, Akantamoeba keratitlerinin çok şiddetli ve uzun süreli olanlarında bile neovaskularizasyon oluşmadığı durumlar

rapor edilmiştir. Bu hastalıkta bazen korneal neovaskularizasyon gelişmekle birlikte göreceli olarak az görülmesi korneada kompleks bir anjiyojenik ve anti-anjiyojenik dengenin sözkonusu olduğunun düşündürmektedir<sup>30</sup>. Kornea anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörlerin çalışılması için değişik çalışmalarda model olarak kullanılmıştır<sup>16</sup>.

### 2.1.5. Anjiyojenik Faktörler

Korneada çalışılmış olan anjiyojenik faktörler Tablo-2’de listelenmiştir<sup>16</sup>.

---

**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)

---

#### 2.1.5.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Son yıllarda insanlarda hayvan modellerinde inflame ve vaskülarize kornealarda vasküler endotelyal büyüme faktörünün yüksek seviyelerde olduğu

gösterilmiştir<sup>31,32</sup>. VEGF ilk önce vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak tanımlanmış, sonrasında damar endoteli için spesifik bir mitojen ve anti-anjiyojenik faktör olduğu gösterilmiştir. VEGF ekspresyonu embriyonik, fizyolojik ve patolojik damar oluşumu ile paralellik göstermektedir<sup>33,34</sup>. VEGF ve tirozin kinaz reseptörlerinin (flt-1 ve flk-1/KDR) bazı sistemlerdeki yer ve zamana göre salınım paternleri, VEGF'ün birçok biyolojik olay ile ilişkili vaskülojenik ve anjiyojenik olaylarda kilit rol oynadığını göstermektedir<sup>35,36</sup>. VEGF'ün gen ekspresyonu; steroid hormonlar, cAMP, protein kinaz C agonistleri, polipeptid büyüme faktörleri, oksijen, serbest radikaller, glukoz, kobalt ve demir gibi lokal ve sistemik sinyallerle düzenlenmektedir<sup>37,38</sup>.

VEGF bilinen beş farklı izoformdan oluşan bir peptid ailesidir (VEGF 115, VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206)<sup>39</sup>. Ayrıca reseptörlerine farklı şekilde bağlanarak anjiyojenez ve lenfanjiyojenez regüle eden diğer üyeler VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D' dir<sup>40,41</sup>. VEGF-B etkisiz bir damar endotel hücre mitojenidir. VEGFR-1 reseptörüne bağlanmakta fakat VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerine bağlanmamaktadır. VEGF-C ve VEGF-D damar endotel hücreleri için güçlü mitojeniktir. Vasküler geçirgenlik aktivitesi bütün VEGF izoformlarında bulunurken, damar endotel hücre mitojeni olma özelliği sadece VEGF121 ve VEGF165 izoformları için geçerlidir. Ayrıca VEGF121, VEGF165 ve VEGF189'a göre daha anjiyojeniktir<sup>42,43</sup>.

Başlıca makrofajlar, T hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, astrositler ve düz kas hücreleri tarafından üretilmektedir. İnflamasyon ve hipoksi durumlarında seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. VEGF anjiyojenezisin proteolitik aktiviteler (orijinal damarların membranlarının erimesi), endotel hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve kapiller tüp oluşumu gibi çoğu basamaklarını aktive etmektedir. VEGF'ün korneal anjiyojenezis için gerekliliği, rat modelinde stromaya anti-VEGF antikoru içeren implantlar yerleştirilerek neovaskülarizasyonun durdurulması ile gösterilmiştir<sup>44</sup>. Bu sonuç VEGF bloke eden peptid kullanılarak tavşan modelinde tekrar elde edilmiştir<sup>45</sup>.

### 2.1.5.2. Fibroblast Büyüme Faktörü

Başka bir anjiyojenik faktör olan temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) korneal anjiyojenez modellerinde geniş kapsamlı olarak kullanılmıştır. Temel fibroblast büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir. Bu aile geliştirmekte olan ve olgun dokularda hücreler arası farklılaşma, anjiyojenez, mitojenez ve yara iyileşmesi sırasında yüksek oranda salınan 23 adet yapısal olarak ilişkili heparin bağlayan peptitten oluşmaktadır. FGF aynı kökenli reseptörlerine (FGFR-1, -2, -3, -4) bağlanarak etki etmektedir. FGF-1 normal korneal epitelde üretilmektedir, FGF-2'nin keratosit-damar endotel hücreleri ortak kültüründe hasar sonrası üretimini arttırdığı gösterilmiştir<sup>46</sup>. İlginç olarak bFGF normal kornealarda Bowman ve Descemet membranlarına bağlanırken neovasküler kornealarda damar bazal membranlarına bağlanmaktadır. Yeni damarların matürasyon derecesine bağlı olarak normal limbal hücrelerde ve yeni oluşan korneal damarlarda bağlanma gücü farklılık göstermektedir<sup>47</sup>.

### 2.1.5.3. Matriks Metalloproteinazları

Yara iyileşmesi ile ilişkili ekstraselüler matriks yıkım ve yapımına granülasyon dokusunda anjiyojenez eşlik etmektedir. Korneal yara iyileşmesinin özelliklerinden bir tanesi bu vasküler reaksiyonun olmamasıdır. Matriks metalloproteinazları, ekstraselüler matriksin yeniden yapılandırılmasında ve anjiyojenezde rol alan bir grup çinko-bağlayan proteolitik enzimlerdir<sup>16</sup>. Bunlar proenzimler olarak salınır ve ekstraselüler matrikste bazı proteinazlar tarafından aktive edilir. 24 bilinen MMPs arasından 8 tanesi korneada tanımlanmıştır. Bunlar kollajenaz 1 ve 3 (MMP-1 ve -13), jelatinaz A ve B (MMP-2 ve -9), stromelizin (Mmp-3), matrilizin (MMP-7) ve membran tipi MMP'dir (MMP-14)<sup>48,49</sup>. Korneal anjiyojenez sırasında seviyelerinin yükseldiği gösterilmiş olmasına<sup>50,51</sup> rağmen anjiyojenez regülasyonundaki rolü şüphelidir, aynı molekül pro- veya anti-anjiyojenik davranabilmektedir. Buna bağlı olarak MMP-2 (jelatinaz A)'nin aktivasyonu anti-anjiyojenik fragmanlar salılabilmekte, potansiyel anjiyostatik

faktörlerin üretilmesine sebep olabilmekte veya anjiyogenezi aktive edebilmektedir<sup>52,53,54</sup>.

### 2.1.6. Anti-anjiyojenik Faktörler

Korneada çalışılmış olan anti-anjiyojenik faktörler Tablo-3’de listelenmiştir<sup>19</sup>.

**Tablo-3:** Anti-anjiyojenik faktörler

---

Endostatin
Angiostatin
Prolactin
Matriks metalloproteinases (MMPs)
Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMPs)
Thrombospondin
Arresten
Canstatin
Tumstatin
Pigment epithelium derived factor (PEDF)
Tumor necrosis factor $\alpha$
Interleukin-4 (IL-4)
Interleukin-13 (IL-13)

---

#### 2.1.6.1. Anjiyostatin

Plazminojenin proteolitik bir fragmanı olan anjiyostatin, güçlü bir anti-anjiyojenik faktördür<sup>55</sup>. İlk olarak Lewis akciğer kanser hücrelerinden izole edilmiş ve damar endotel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Gözde anjiyostatin ve ona benzeyen fragmanların implantasyonu sonrasında FGF veya anjiyogenin ile oluşturulmuş korneal neovaskülarizasyonun inhibe olduğu gösterilmiştir<sup>56,57</sup>. Anjiyostatinin korneal üretimi ile ilgili birkaç kanıt mevcuttur<sup>58,59</sup>:

1. Korneal epitelde anjiyostatinin ekstrahepatik sentezi gösterilmiştir<sup>60</sup>.
2. Anjiyostatin kontakt lens kullanan hastaların gözyaşı film tabakasından izole edilmiştir (hipoksi ile indüklenerek)<sup>61</sup>.
3. Anjiyostatinin üretiminden sorumlu bütün matriks metalloproteinazları korneada tespit edilmiştir<sup>55,56</sup>.

### **2.1.6.2. Endostatin**

Endostatin kollajen 18'in proteolitik fragmanlarından elde edilen bir diğer anti-anjiyojenik faktördür. İn vitro olarak FGF-2 ve VEGF'ün indüklediği damar endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiği ve farede tümör progresyonunu azalttığı gösterilmiştir<sup>62</sup>. Kollajen tip 13 ağırlıklı olarak vasküler ve epitelyal bazal membranda yer alan bir nonfibriler kollajendir. Gözde retina (iç limitan membran ve pigment epiteli), lens kapsülü, ve korneada bulunmaktadır<sup>63,64</sup>. Kollajen 13'ün proteazlar tarafından parçalanmasıyla anti-anjiyojenik özellikler gösterebilen endostatin-benzeri fragmanlar (MMPs, katepsin L, ve elastaz) ortaya çıkmaktadır<sup>65</sup>. Endostatin implante edilen kornealarda FGF'ün indüklediği korneal neovaskülarizasyon inhibe olmaktadır<sup>66</sup>.

### **2.1.6.3. Pigment Epitelinden Elde Edile Faktör (PEDF)**

Güçlü bir antianjiyojenik ve nörotrofik faktör olan PEDF, ilk olarak retinoblastom hücresinden izole edilmiş ve daha sonra retina pigment epiteli, iris ve korneada tanımlanmıştır<sup>67</sup>. İnsan korneasında epitel ve endotelde varlığı gösterilmiştir. Beynin hemen bütün bölgeleri de dahil olmak üzere birçok fetal ve erişkin insan dokularında üretilmektedir. PEDF serin proteaz inhibitör ailesine ait olup korneaya PEDF bloke eden implantlar yerleştirildiğinde korneal neovaskülarizasyon gelişimi kolaylaşmaktadır. Ayrıca rekombinant PEDF, bFGF tarafından indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir. PEDF bir major neovaskülarizasyon inhibitörü olup korneayı, vitreusu ve retinayı invaze etmeye çalışan damarların uzaklaştırılmasından sorumludur<sup>68</sup>.

Gözde damar olmaması gereken üç bölge vardır. Bunlar:

1. Vitreus
2. Ön kamarayı dolduran aköz hümör
3. Kornea

PEDF gözün bu dokularının damarsız durumlarının devamı için gerekli bir faktördür<sup>68</sup>.

### 2.1.7. Tedavi

Korneal neovaskülarizasyona sıklıkla görme keskinliğini düşüren ve medikal ve/veya cerrahi olarak tedavi edilmesi gereken stromal ödem, lipid birikimi, keratitler ve skar oluşumu eşlik etmektedir. Tablo-4 'te insan çalışmalarında ve hayvan modellerinde kullanılan tedavi seçenekleri listelenmiştir<sup>16</sup>.

---

*Tablo-4 Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde medikal ve cerrahi tedavi*

---

Steroidler
Non-steroid anti-inflamatuar ajanlar (NSAİİ )
1-25(OH) D3
Platelet aktive edici faktör (PAF)
Siklosporin A
FK506
Talidomid
Prolaktin
Curcumin
Ras farnesiltransferaz inhibitörleri
Metotreksat
Argon lazer
Elektrokoagülasyon
Fotodinamik tedavi
Limbal transplantasyon
Amniyotik membran transplantasyonu
Konjonktival transplantasyon

---



### 2.1.7.1. Medikal Tedavi

Topikal kortikosteroidler aktif olarak proliferere olmakta olan korneal damarların tedavisinde ana tedavi seçeneği olarak günümüze kadar gelmiştir<sup>16</sup>. Steroidlerin anti-anjiyojenik etkilerinin anti-inflamatuvar etkilerinin sonucu olduğu düşünülmektedir. İnflamatuvar hücrelerin kemotaksisini inhibe etmekte, pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe etmektedir. Steroidler ayrıca damar endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu direkt olarak da inhibe etmektedir<sup>69,70</sup>.

Prostaglandinler korneal yara iyileşmesi ve anjiyojenez sırasında üretilmektedirler. Korneal neovaskularizasyonun hayvan modellerinde Fosfolipaz A2 veya siklooksijenaz (COX) inhibitörleri (steroidler veya nonsteroid anti-inflamatuvar ajanlar) tarafından sentezleri inhibe edildiğinde korneal anjiyojenez önemli ölçüde azalmaktadır<sup>71,72</sup>.

Non-steroid anti-inflamatuvar ajanlar oküler yüzeyel hastalıklarında sıklıkla kullanılmaktadır. Korneada iki tip COX enzimi bulunmuştur, COX-1 ve COX-2. COX-2 enziminin VEGF ligand ve reseptörlerinin ekspresyonunu ayarladığı<sup>73,74</sup>, insanda ve deneysel olarak kanserlerde önemli bir pro-anjiyojenik protein olduğu gösterilmiştir<sup>75,76</sup>. Seçici enzim inhibitörlerinin korneal anjiyojeneze etkileri değişkenlik göstermektedir. COX-2 enziminin seçici inhibisyonu prostaglandin E2 (PGE2)'nin bazal korneal sentezini %20 oranında azaltmakta ve bu etki yara iyileşmesi sırasında % 80'e çıkmaktadır<sup>77</sup>. COX-2 enziminin seçici inhibisyonu (NS-398) ve COX-1 ve COX-2 enzimlerinin seçici olmayan inhibisyonunun (indometazin) benzer etki gösterdiği ve neovaskularizasyonu kısmi olarak engellediği gösterilmiştir<sup>78</sup>.

IL-1 reseptör antagonistinin topikal uygulanması<sup>79</sup>, oktretid (uzun etkili bir somatostatin analogu),<sup>80</sup> siklosporin A<sup>81</sup>, FK 506<sup>82</sup>, plazminojen fragmanları<sup>56,66,83</sup>, spironolaktan<sup>84</sup>, talidomid<sup>85</sup>, amilorid<sup>86</sup>, curcumin<sup>51,87</sup>, PAF antagonisti<sup>88</sup> gibi birçok molekülün korneal neovaskularizasyonda anti-anjiyojenik etkisi gösterilmiştir. Fakat medikal tedavi, daha çok aktif olarak gelişmekte olan damarlara etki ettiği için birçok araştırmacı korneal neovaskularizasyonda cerrahi tedavi seçeneklerini araştırmaktadır. Araştırmaların amacı sadece penetran keratoplastiye gidişi

engellemek değil aynı zamanda yapılan keratoplastinin başarı oranını arttırmak ve ömrünü uzatmaktır<sup>16</sup>.

### 2.1.7.2. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi ile ilgili çalışmalar ikiye ayrılmaktadır. Birinci grubu argon lazer, elektrokoagülasyon ve fotodinamik tedavi gibi farklı teknikler kullanarak oluşan korneal damarları tıkamak amacıyla yapılan çalışmalar, ikinci grubu konjonktival limbal greft ve amniyotik membran transplantasyonu gibi oküler yüzeyi düzeltmeyi amaçlayan çalışmalar oluşturmaktadır.

577 nm sarı ışık kullanılarak yapılan lazer fotokoagülasyon yerleşmiş korneal damarları tedavi etmek için denenen bir yöntemdir. Bu teknik hayvan çalışmalarında nispeten güvenli görünmektedir<sup>89,90</sup> ve insanlarda penetran keratoplasti öncesi (korneal neovaskülarizasyonun rekürensini önlemek için) ve sonrasında (korneal neovaskülarizasyonu tedavi etmek için) klinik olarak önemli korneal neovaskülarizasyonda denenmiştir. Penetran keratoplasti sonrası korneal neovaskülarizasyonda bir miktar azalma görülmesine rağmen, keratoplasti öncesi yüksek riskli hastalardaki etkinliği açık değildir. Ayrıca ileri derece korneal neovaskülarizasyonlarda çok kullanışlı bir yöntem gibi görünmemektedir.

Fotodinamik tedavi (FDT) fotosensitize edici bir ajanın sistemik dolaşıma enjekte edilmesiyle veya oküler yüzeye uygulanmasıyla yapılan bir diğer yöntemdir. Bu fotosensitize edici ajan yeni damarlarda birikir ve daha sonrasında bir lazer ışığıyla seçici olarak bu damarlar oklude edilir. Koroidal neovaskülarizasyonda klinik olarak kullanılan bu teknik korneal neovaskülarizasyonun hayvan modellerinde denenmektedir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Tedavi edilmiş korneaların histopatolojik incelemelerinde tromboze olmuş ve endoteli ileri derecede hasarlı korneal damarlar görülmüştür. Ancak zarar oranının ve etkinliğin iyi belirlenmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır<sup>91,92</sup>.

Anjiyojenik uyarıyı azaltmak için konjonktival, limbal greft veya amniyotik membran transplantasyonu ile oküler yüzeyi düzeltme yöntemi de araştırılmaktadır. Tek taraflı veya iki taraflı oküler yüzey hastalıklarında oto ve allogreft limbal konjonktival transplantasyonun korneal neovaskülarizasyonu azalttığı gösterilmiştir<sup>93</sup>. Ayrıca amniyotik membran transplantasyonun da anti-anjiyojenik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir<sup>94</sup>. Amniyotik membranda anti-anjiyojenik moleküller ve öncü maddeler (trospondin 1 ve kollajen 18 gibi) bulunmuş ve bunların mekanizmada rol aldığı düşünülmektedir<sup>95,96</sup>. Ülserasyon, neovaskülarizasyon ve konjonktival metaplazi içeren şiddetli oküler yüzey hastalıklarında tedavi için limbal otogreft ve allogreft transplantasyonu gerekebilmektedir. Bu teknik vaskülarize kornealarda etkili görünmektedir. Burada iki mekanizma söz konusudur:

1) Kök hücre hasarını tedavi ederek kronik korneal ülserasyona bağlı anti-anjiyojenik uyarıyı azaltmak

2) Direkt olarak damar endotel hücrelerini inhibe etmek<sup>97</sup>.

## **2.2. Anti-VEGF Stratejiler**

Anti-VEGF stratejiler yeni damar oluşumunu yavaşlatma ve durdurmakta etkili görünmektedir. Fakat bu stratejiler damarların gerilemesinde değişken etki göstermektedir. VEGF'ün azalması sadece yeni gelişmekte olan damarlara etki etmekte, olgunlaşmış damarlara etki etmemektedir. Yeni damarlar oluştuğunda hemen lökositler tarafından olgunlaştırılmakta ve etrafı mural hücreler (perisitler) tarafından sarılmaktadır. 10-14 günlük süre içerisinde yeni oluşan damarlar belli bir olgunluğa erişmekte ve VEGF blokajına dirençli hale gelmektedir<sup>98,99</sup>. Bu direncin mural hücrelere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Tümör anjiyojenezi ile ilgili çalışmalardan elde edilen bilgiler, damar yapısından perisitler uzaklaştırıldığında bu yeni damarların VEGF blokajına duyarlı hale geldiğini göstermektedir<sup>103</sup>. Perisitlerin işe katılması ve olgunlaşma işlemlerinde

PDGF gibi bazı büyüme faktörleri rol almaktadır. Perisitlerin damarlardan ayrılması için bu faktörler inhibe edilebilirse VEGF inhibisyonu yeni oluşan damarların geriletilmesinde etkili olabilir<sup>99</sup>.

Lucentis (ranibizumab, Genentech, Inc) ve Macugen (pegaptanib sodyum; Eyetech Pharmaceuticals), göz hastalıkları için ileri klinik gelişme aşamasında olan anti-VEGF ilaçlardır<sup>100</sup>. Bevacizumab (Avastin; Genentech Inc., San Francisco, CA), ilerlemiş kolorektal kanserlerin tedavisi için 5-Fluorouracil (5-FU) ile kombine olarak, intravenöz kullanımı FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış bir anti-anjiyojenik ilaçtır<sup>101</sup>. Bazı neovasküler göz hastalıklarında ‘onay dışı’ (off-label) kullanımında kısa süreli umut verici sonuçlar elde edilmiştir<sup>102,103,104</sup>.

Ranibizumab (Lucentis, Genentech) yüksek affiniteli bir antikor fragmanıdır. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD) tedavisinde intravitreal olarak kullanılmaktadır. Bu yolla verilen bir ilacın iç limitan membranı geçip subretinal alana geçebilmesi için 50 ile 70 kDa arasında bir moleküler ağırlığa sahip olması gerekmektedir<sup>105</sup>. Ranibizumab rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş hümanize edilmiş bir fare antikorudur ve bütün VEGF izoformlarını bloke etmektedir. Faz 2 çalışmaları boyunca YBMD tedavisinde her 4 haftada bir intravitreal olarak uygulanmıştır<sup>100</sup>.

Pegaptanib sodyum (Macugen, Eyetech Pharmaceuticals) VEGF165’i spesifik olarak inhibe eden bir aptamerdir<sup>106</sup>. Aptamerler spesifik bir şekle giren, bir antikor gibi davranarak hücre dışı hedeflere yüksek afinite ile bağlanan kimyasal olarak sentezlenmiş oligonükleotidlerdir<sup>107</sup>. Stabilesini güçlendirmek ve endojen ribonükleazlara dirençli hale getirmek için bu aptamerin (Macugen) yapısı değiştirilmiştir. VEGF165’e yüksek afinite ve spesifite ile bağlanmakta ve reseptörüyle etkileşmesini engellemektedir. Faz 3 çalışmaları boyunca YBMD tedavisinde 6 haftada bir uygulanmıştır<sup>100</sup>.

Macugen ve Lucentis’in faz 1, faz 2 ve faz 3 çalışmaları tamamlanmıştır. Her iki bileşim de güvenli ve iyi tolere edilebilir görünmektedir. Erken fazdan elde edilen görsel sonuçlar ve geniş kontrolsüz çalışmalar ümit vericidir<sup>108,109</sup>. Her iki ilaç da yaş tip YBMD’de görsel stabilite ve artış sağlamıştır<sup>100</sup>.

Bevacizumab (Avastin; Genentech, Inc; San Francisco CA) FDA (Food and Drug Administration) tarafından metastatik kolorektal kanserlerin tedavisi için onaylanmış, direkt VEGF'i inhibe eden, insanlarda kullanılabilir hale getirilmiş monoklonal bir antikordur<sup>110</sup>. 'Onay dışı' (off label) kısa süreli çalışmalarda, eksudatif tip yaşa bağlı maküla hastalığında intravitreal ve sistemik kullanımı ile ilgili ümit verici sonuçlar elde edilmiştir<sup>111-116</sup>. Ayrıca iris ve retina neovaskülarizasyonu ile giden proliferatif diyabetik retinopati tedavisinde, maküler ödem gelişmiş santral retinal ven tıkanıklığında ve neovasküler glokomda bevacizumabın intravitreal kullanımı ile ilgili olumlu sonuçlar yayınlanmıştır<sup>117,118,119</sup>.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesinin Deneysel Çalışma Laboratuvarında, Deneysel Çalışma Etik Kurulunun onayıyla gerçekleştirildi (Onay no: DA 07/14).

#### 3.1. Hayvan Modeli

Ağırlıkları 300 ile 450 gr arasında değişen 20 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. 50 mg/kg intramüsküler ketamin hidroklorid ile sedasyona ek olarak % 0.5 proparakain hidroklorid ile topikal anestezi yapıldı. Korneal neovaskülarizasyonu indüklemek için Mahoney ve ark' nın tarif ettiği gümüş nitrat ile koterizasyon tekniği kullanıldı. Her hayvanın sağ gözünün santral korneası % 75 gümüş nitrat % 25 potasyum nitrat ile kaplı bir çubuk ile mikroskop altında 10 saniye süreyle koterize edildi. Fazla gümüş nitrat 5 ml dengeli tuz solüsyonu ile yıkanıp uzaklaştırıldı. Bütün işlemler aynı araştırmacı (VÖ) tarafından gerçekleştirildi.

Koterizasyon sonrası sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı;

Grup 1 (n=5): Düşük doz (4 mg/kg) topikal bevacizumab, günde 2 defa uygulandı.

Grup 2 (n=5): Yüksek doz (12.5 mg/kg ) topikal bevacizumab, günde 2 defa uygulandı.

Grup 3 (n=5): Subkonjonktival bevacizumab (0.05 cc/1.25 mg) enjeksiyonu, günaşırı uygulandı.

Grup 4 (kontrol grubu) (n=5): Topikal suni gözyaşı, günde 2 defa uygulandı.

Uygulamalara koterizasyondan hemen sonra bütün gruplarda aynı günde başlandı, 10 gün süreyle devam edildi.

### 3.2. Biyomikroskopik Değerlendirme

Bütün sıçanların 3. ve 9. günlerde biyomikroskopik muayenesi yukarıda tanımlanan anestezi işleminde yapıldı. Dokuzuncu günde mikroskopa monte edilmiş bir Fujifilm dijital fotoğraf makinesi ile x25 büyütmede kornea fotoğrafları çekildi. çnc günde bütün sıçanların korneal yanık evrelemesi benzer çalışmalarda yapıldığı gibi yapıldı <sup>120</sup>:

Evre 0: Korneal yüzeyden kabarık bl oluşumu yok

Evre 1: Yüzeyden hafif kabarık, küçük bl oluşumu

Evre 2: Yüzeyden orta derece kabarık, orta büyüklükte bl oluşumu

Evre 3: Büyük bl oluşumu

Fotoğraflarda damarlarla kaplı kornea alanının tüm kornea alanına oranı hesaplandı. Bu hesaplamalar 'Pixcavator Image Analyzer Intelligent Perception, WV, USA' programı kullanılarak yapıldı. Neovaskülarizasyonun olduğu alan piksel birimiyle hesaplandı, tüm alan oranı ise yüzde (%) olarak hesaplandı. Fotoğrafları çeken kişi (CK) hangi ratın hangi grupta olduğunu bilmemekte (tek-kr) idi. Korneal yanık evrelemesi ve neovaskülarizasyon yüzdesi hesaplandıktan sonra bütün sıçanlar 10. günde sakrifiye edildi.

### 3.3. Histopatolojik Değerlendirme

50 mg/kg intramüsküler ketamin hidroklorid enjeksiyonundan sonra sıçanlar sakrifiye edildi ve enükleasyon yapıldı. Enkleasyonun hemen ardından fikse edici sıvının tüm globa girebilmesi için 27 gauge iğne kullanılarak, limbustan 1 mm mesafeden globlar saat 3 ve 9 meridyenlerinden perfore edildi. Globlar %10 formaldehid içinde muhafaza edildi. 24 saat sonra formaldehitten sonra çıkarılarak dehidrate edildi ve parçalara ayrıldı. Daha sonra parafin içine gömülerek hematoksilen ve eozinle boyanmak üzere 8 mikronluk kesitler alındı. Bu kesitlerin

mikroskopik incelemesinde x20 büyütmede kornea santralinden limbusa doğru eşit alan kaplayacak şekilde fotoğraflar çekildi. Bu fotoğraflar kullanılarak aynı korneal alana denk gelen ve eşit korneal alan içeren bölgelerdeki, içinde eritrosit görülen kan damarlarının sayısı ve kapladığı toplam korneal alan hesaplandı.

### **3.4. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS Ver 10.0 programı ile yapıldı. Karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. 0.05'in altındaki p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

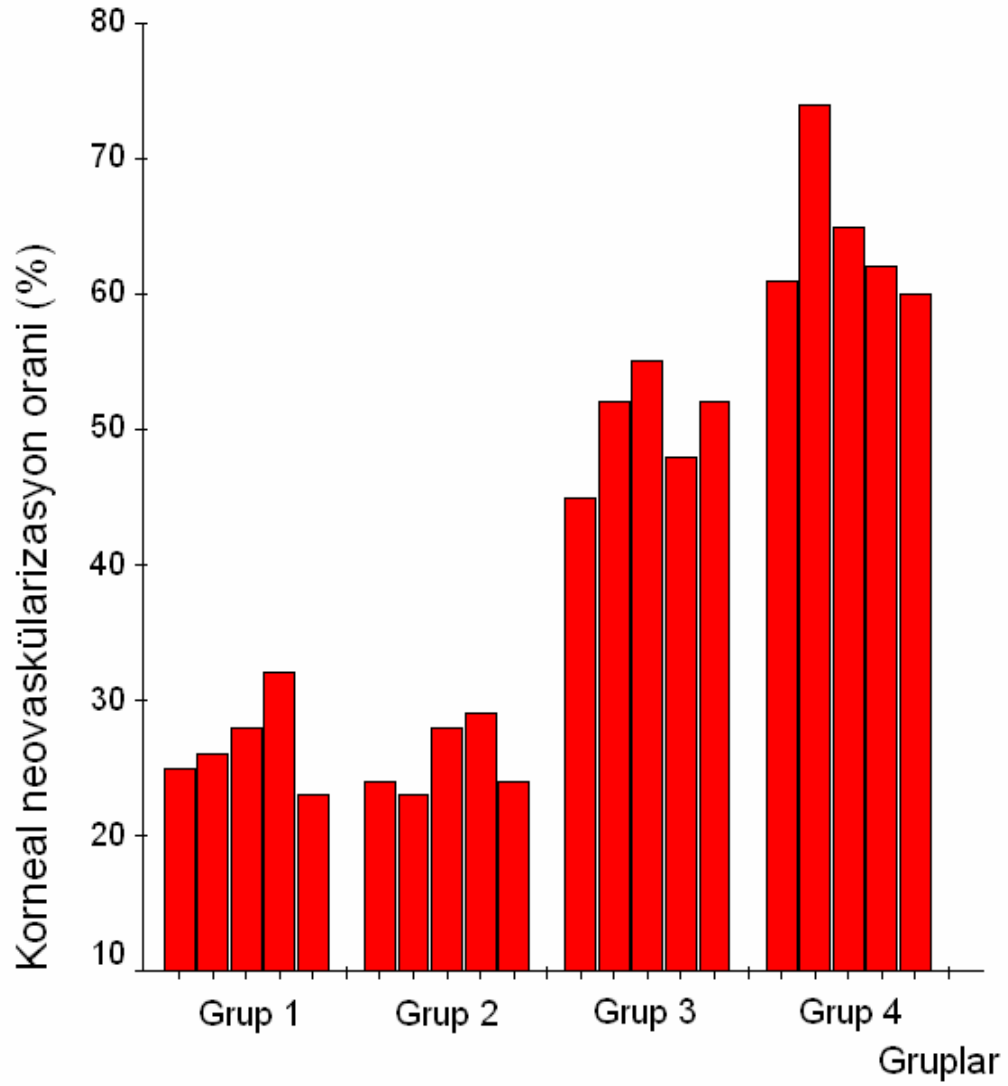


## 4.BULGULAR

### 4.1. Biyomikroskopik Bulgular

Bütün sıçanların korneal yanıkların Evre 3 ve Evre 4 olduğu gözlendi ve tamamı değerlendirmeye alındı. Gruplar arasında ortalama korneal yanık evre derecesi açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

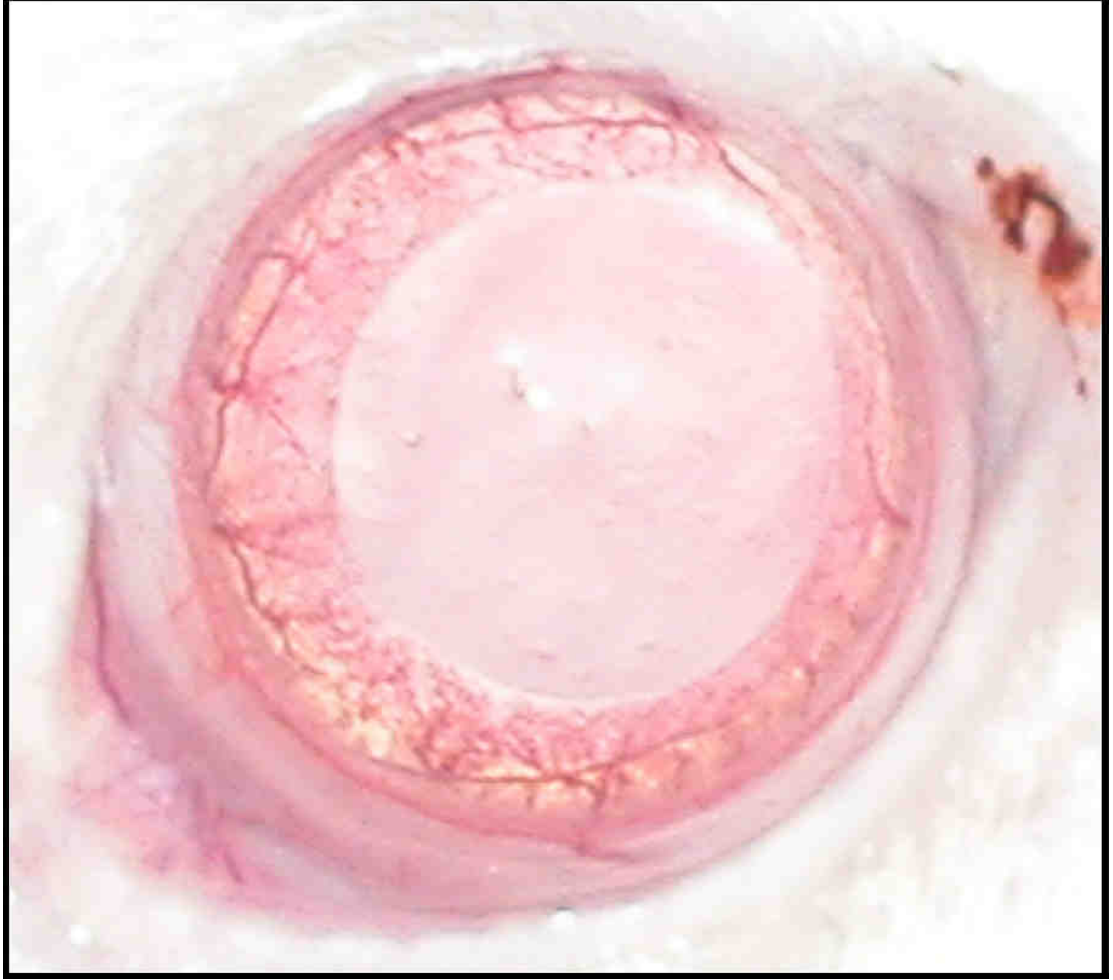
Dokuzuncu günde gruplardaki sıçanların gözlerinde oluşan korneal neovaskülarizasyonun tüm korneal alana oranlarının ortalama değerleri Şekil 1’de gösterilmiştir. Topikal (düşük ve yüksek doz) bevacizumab (Avastin) tedavisi uygulanan gözlerde, kontrol grubuna göre daha düşük oranda korneal neovaskülarizasyon geliştiği gözlendi. Grup 1 (4 mg/ml topikal bevacizumab) ve grup 2 (12.5 mg/ml topikal bevacizumab)’de korneal neovasküler damarlarda kontrol grubuna göre sırasıyla % 36.6 ve % 38.2 azalma saptandı. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p_{1,2} <0.01$ ). Ancak, grup 3 (0.05 cc/1.25 mg subkonjonktival bevacizumab)’te gözlenen korneal neovaskülarizasyon oranı kontrol grubuna daha düşük bulunmuş olmasına rağmen, bu azalma (% 13.10) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Grup 1 ve 2 (topikal düşük ve yüksek doz bevacizumab) arasında korneal neovaskülarizasyon oranları açısından bir farklılık saptanmazken, bu gruplarda grup 3 (subkonjonktival bevacizumab)’e göre daha düşük oranda neovaskülarizasyon geliştiği izlendi ( $p<0.01$ ). (Şekil 2, 3, 4, 5 )



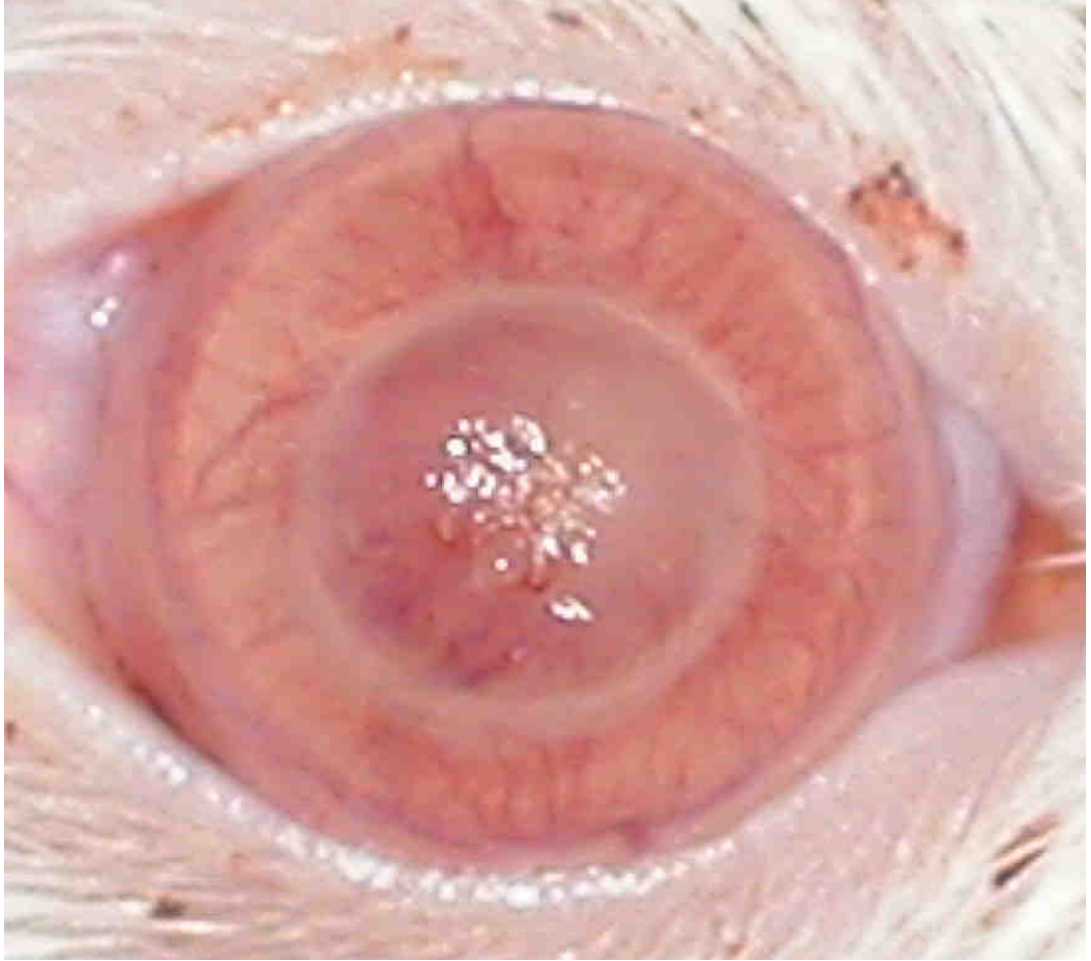
**Şekil 1.** Günde 2 defa 4 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin) (Grup 1), günde 2 defa 12.5 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin) (Grup 2), günde 1.25 mg/0.05 cc subkonjonktival bevacizumab (Grup 3) ve günde 2 defa suni gözyaşı uygulanan (Grup 4) sıçan gözlerinde 9. günde çekilen fotoğraflarda korneal neovaskularizasyon oranları. Grup 1:  $\% 26.76 \pm 10.23$ , Grup 2:  $\% 25.52 \pm 12.45$ , Grup 3:  $\% 50.22 \pm 15.73$ , Grup 4:  $\% 63.32 \pm 13.10$ .



**Şekil 2.** Günde 2 defa 4 mg/ml topikal bevacizumab (Grup 1) uygulanan sıçan gözünde 9. günde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon



**Şekil 3.** Günde 2 defa 12.5 mg/ml topikal bevacizmab (Grup 2 ) uygulanan sıçan gözünde 9. günde çekilen fotoğrafta korneal neovaskularizasyon



**Şekil 4.** Günaşırı 1.25 mg/0.05 cc subkonjonktival bevacizumab (Grup 3) uygulanan sıçan gözünde 9. günde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon



**Şekil 5.** Günde 2 defa suni gözyaşı damlatılan (Grup 4, kontrol grubu) sıçan gözünde 9. günde çekilen fotoğrafta korneal neovaskülarizasyon

## 4.2. Histopatolojik Bulgular

Bütün gruptaki sıçanların kornealarından elde edilen histopatolojik kesitlerin incelenmesinde her gruptaki ortalama neovasküler kornea alanları ve eritrosit içeren damar sayıları Tablo-5'te gösterilmiştir.

Grup 1 (düşük doz topikal bevacizumab) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan  $380.2 \pm 39.9 \mu\text{m}^2$ , grup 2 (yüksek doz topikal bevacizumab) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan  $362.2 \pm 32.3 \mu\text{m}^2$ , grup 3 (subkonjonktival bevacizumab) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan  $785.9 \pm 141.2 \mu\text{m}^2$ , grup 4 (kontrol grubu) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan  $875.8 \pm 151.1 \mu\text{m}^2$  olarak ölçülmüştür. Grup 1 ve 2 (düşük doz ve yüksek doz topikal bevacizumab) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan ile grup 4 (kontrol grubu) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Grup 3 (subkonjonktival bevacizumab) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan ile grup 4 (kontrol grubu) sıçanların gözlerinde neovasküler korneal alan arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

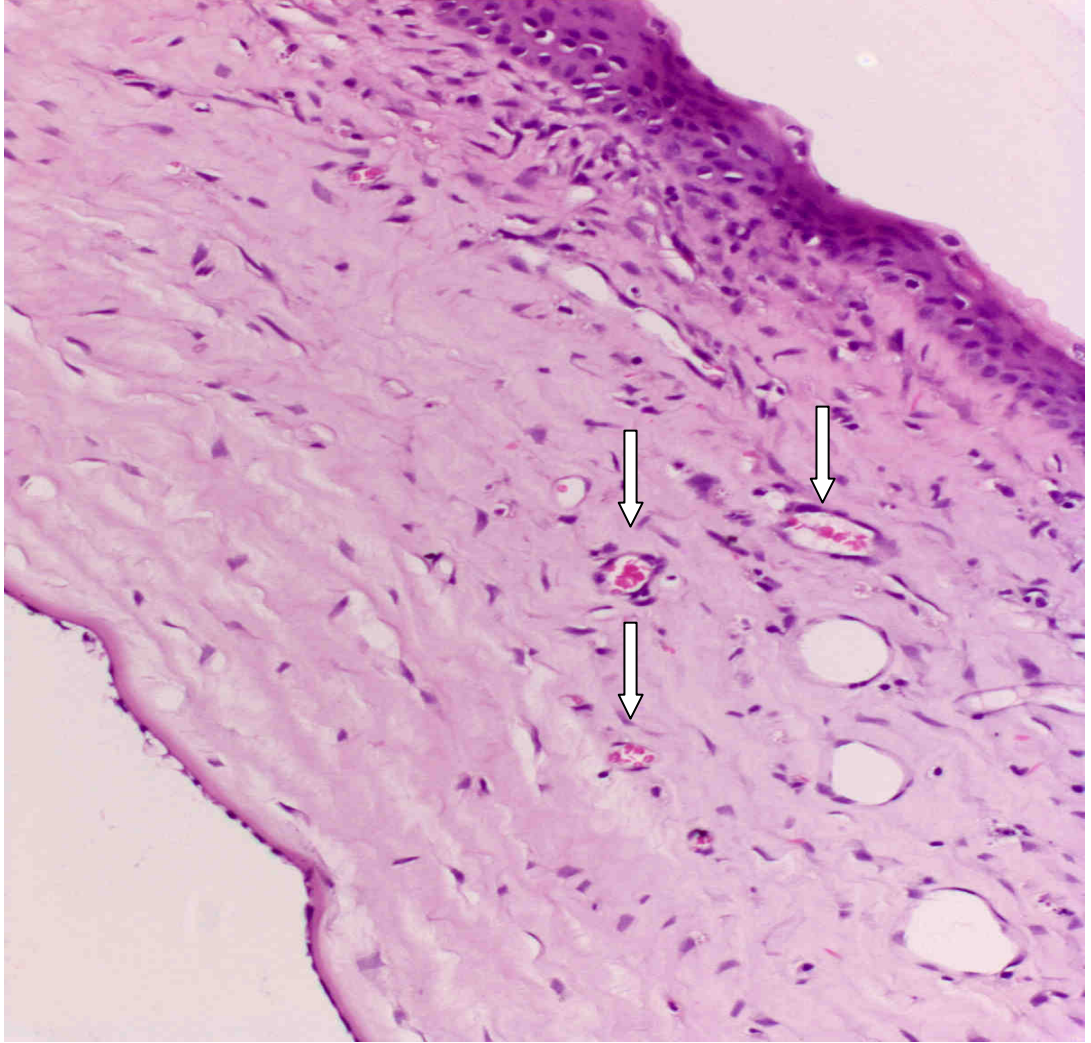
**Tablo-5** Gruplardaki ratların gözlerindedeki ortalama neovasküler korneal alan ve eritrosit içeren damar sayıları

Gruplar	Neovasküler korneal alan( $\mu\text{m}^2$ ) $\pm$ ss	Eritrosit içeren damar sayısı $\pm$ ss	p değeri
Grup 1	$380.2 \pm 39.9$	$8.5 \pm 2.3$	$p < 0.01$
Grup 2	$362.2 \pm 32.3$	$8.0 \pm 2.1$	$p < 0.01$
Grup 3	$785.9 \pm 141.2$	$15.5 \pm 3.4$	$p > 0.05$
Grup 4	$875.8 \pm 151.1$	$28.0 \pm 2.9$	

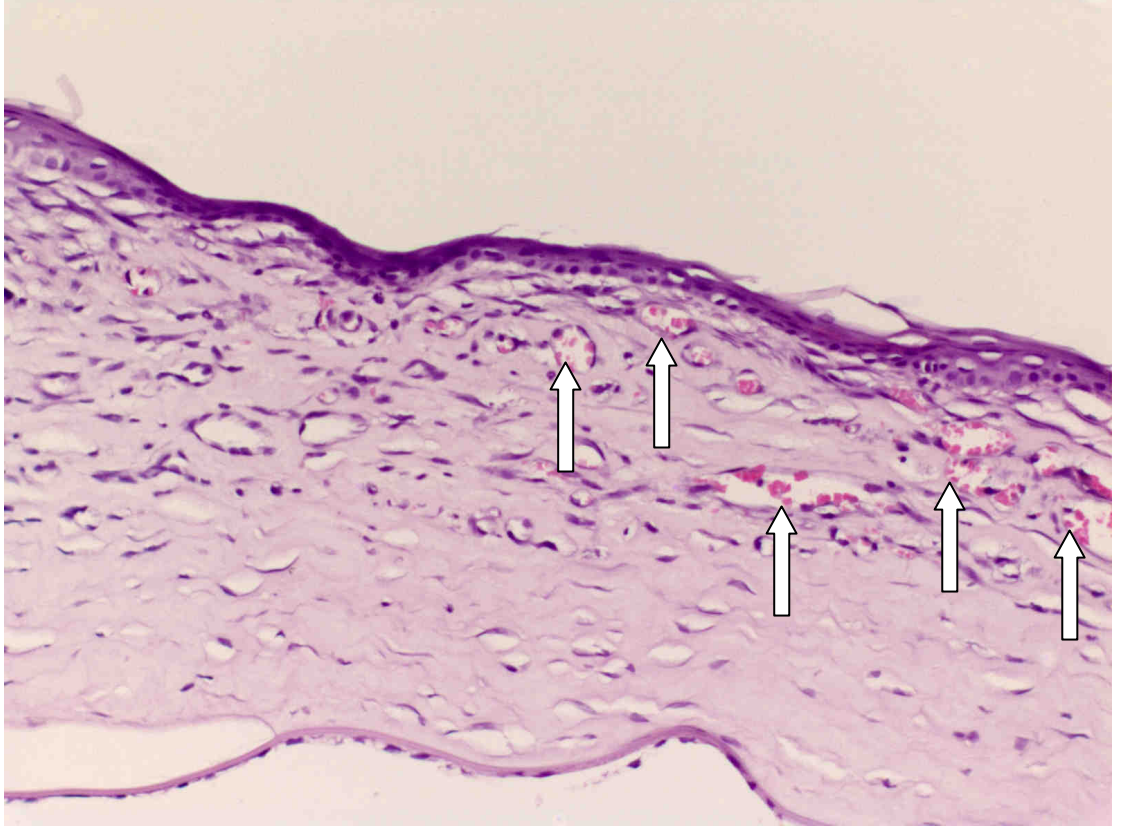


**Şekil 6.** Günde 2 defa 4 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin) uygulanan sıçan gözünden 10. günde alınan korneanın Hematoksilen & Eozin kesitinin (limbusla santral korneaya eşit mesafede bir alan) ile histopatolojik incelemesi (Az sayıda eritrosit içeren damar olduğu ve görülmektedir)

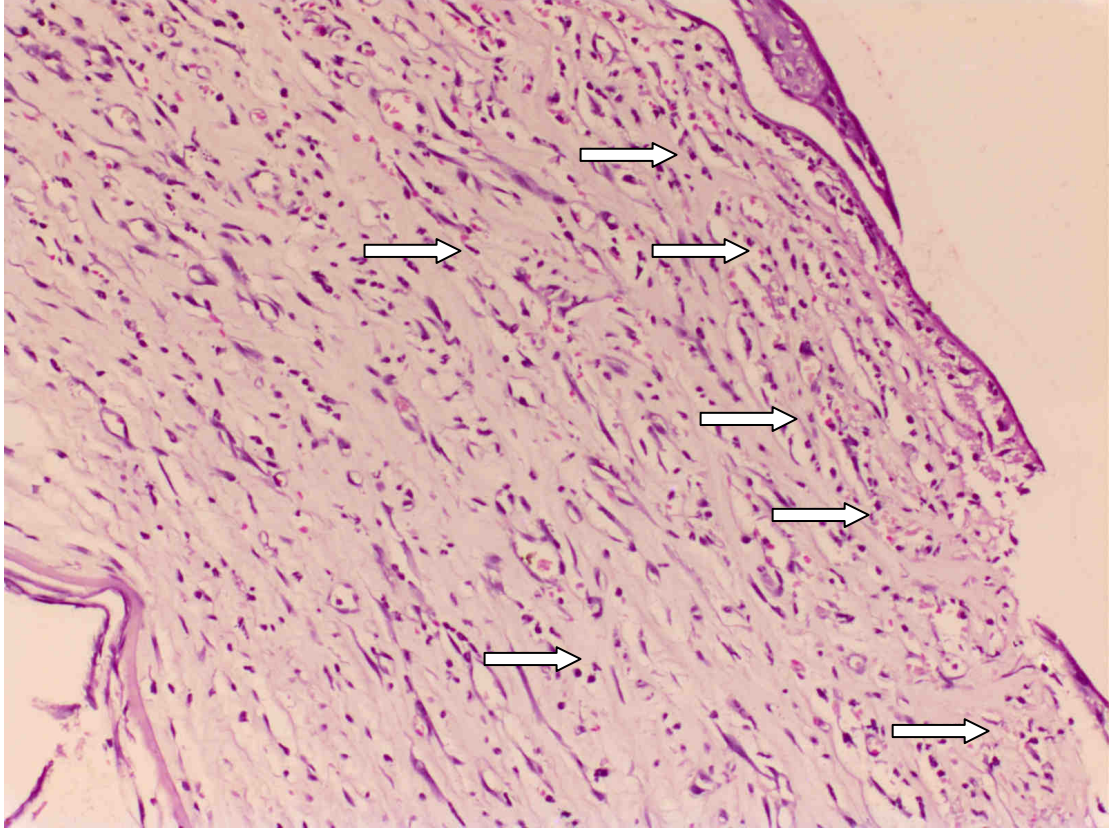




**Şekil 7.** Günde 2 defa 12.5 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin) uygulanan sıçan gözünden 10. günde alınan korneanın Hematoksilen & Eozin kesitinin (limbusla santral korneaya eşit mesafede bir alan) histopatolojik incelemesi (Az sayıda eritrosit içeren damar olduğu görülmektedir)



**Şekil 8.** Günaşırı 1.25 mg/0.05 cc subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulanan sıçan gözünden 10. günde alınan korneanın Hematoksilen & Eozin kesitinin (limbusla santral korneaya eşit mesafede bir alan) ile histopatolojik incelemesi (Çok sayıda eritrosit içeren damar olduğu görülmektedir)



**Şekil 9.** Günde 2 defa suni gözyaşı uygulanan (kontrol grubu) sıçan gözünden 10. günde alınan korneanın Hematoksilen & Eozin kesitinin (limbusla santral korneaya eşit mesafede bir alan) histopatolojik incelemesi (Çok sayıda eritrosit içeren damar olduğu ve görülmektedir)

## 5. TARTIŞMA

Korneal neovaskularizasyon için son yıllarda kullanılan tedaviler medikal, lazer fotokoagulasyon ve cerrahidir.

Murata ve ark<sup>121</sup>'nin yaptıkları deneysel çalışmada 4 tavşanın korneasına bFGF salgılayan plak yerleştirdikten sonra subkonjonktival enjeksiyon şeklinde 2 mg triamsinolon asetonid (TA) uygulanmıştır. 4 tavşandan oluşan kontrol grubuna da subkonjonktival enjeksiyon şeklinde distile su uygulanmıştır. 4 hafta sonra yapılan alan hesaplamalarında TA uygulanan grupta kontrol grubuna göre korneal neovaskularizasyonun daha az olduğu görülmüş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca subkonjonktival enjeksiyondan 15 gün sonra yüksek performans yağ kromatografisi (high-performance liquid chromatography) ile TA düzeyleri ölçülmüş ve hala etkili düzeyde olduğu gösterilmiştir.

Kwon ve ark<sup>122</sup>'nin yaptığı deneysel çalışmada antifungal bir ajan olan ve aynı zamanda immünsüpresan etkileri de gösterilmiş olan rapamisinin korneal neovaskularizasyonu önlemedeki etkisi araştırılmıştır. 6 adet tavşanın korneasına stroma içine bFGF salgılayan plak yerleştirilmiş (kontrol grubu) , 6 adet tavşanın korneasına ise bFGF ve rapamisin salgılayan plak yerleştirilmiştir (rapamisin grubu). On gün sonra korneal neovaskularizasyonun kapladığı alan hesaplanmış alan ve korneal kesitler histopatolojik olarak incelenmiştir. bFGF'ün indüklediği korneal neovaskularizasyonu rapamisinin anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Kontrol grubunda korneal neovaskularizasyon oranı ortalama %27.61 olarak hesaplanırken rapamisin grubunda ortalama % 9.88 olarak hesaplanmıştır.

Riazi-Esfahani ve ark<sup>123</sup>'nin yaptığı çalışmada doksisisiklin, triamsinolon, düşük moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) ve flurbiprofenin deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde etkileri araştırılmıştır. Gümüş nitrat/potasyum nitrat çubuklar kullanılarak 36 sıçanın 36 gözünün santral korneası koterize edilerek

korneal neovaskularizasyon indüklenmiştir. Ratlar 5 gruba ayrılarak topikal doksisisiklin, triamsinolon, LMWH, flurbiprofen ve tuz solüsyonu 7 gün süreyle uygulanmıştır. Her grupta skar ve neovaskularizasyon ile kaplı korneal alanlar dijital fotoğraflar ve bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmıştır. LMWH ve flurbiprofenin uygulandığı gruplardaki korneal neovaskularizasyonda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Triamsinolon ve doksisisiklin uygulanan gruplarda ise korneal neovaskularizasyonda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. Korneal neovaskularizasyonu topikal triamsinolonun %51.6, topikal doksisisiklinin %35.5 oranında azalttığı gösterilmiştir.

Demir ve ark.<sup>124</sup>'nin yaptığı deneysel çalışmada bir somatostatin analogu olan oktreotidin korneal neovaskularizasyonu önlemedeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada korneal neovaskularizasyonu indüklemek için gümüş nitrat ile koterizasyon tekniği kullanılmıştır. Sıçanların yarısına sistemik olarak 7 gün boyunca 30 mikrogram oktreotid uygulanmış, diğer yarısına ise (kontrol grubu) herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Biyomikroskopik ve histolojik inceleme yapılarak iki gruptaki korneal neovaskularizasyon karşılaştırılmış ve oktreotid uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterilmiştir.

Berdugo ve ark.<sup>125</sup>'nin yaptığı deneysel çalışmada insülin reseptörü IRS-1 (Insulin receptor substrate) blokörü olan antisens oligodeoksinükleotid (ODN)' in sıçan korneal neovaskularizasyon modelindeki antianjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Korneal neovaskularizasyonu indüklemek için epitelyal ve limbal debridman uygulanmış, bir grup sıçana subkonjonktival olarak antisens ODN uygulanmış kontrol grubuna ise subkonjonktival tuz solüsyonu uygulanmıştır. Antisens ODN uygulanan grupta kontrol grubuna göre korneal neovaskularizasyonda anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca antisens ODN'nin VEGF sentezini anlamlı bir şekilde azaltmazken IL1 $\beta$  sentezini azalttığı gösterilmiştir. Korneal neovaskularizasyon IL1  $\beta$  sentezi engellenerek baskılanmıştır.

Dell ve ark.<sup>126</sup>'nin yaptığı deneysel çalışmada PDGF blokajının korneal neovaskularizasyonu baskılamadaki rolü araştırılmıştır. Korneal neovaskularizasyon

sıçanların limbal epiteli uzaklaştırılarak indüklenmiş ve 7 gün sonra yeni damarlar oluşuktan sonra PDGF reseptör-  $\beta$  inhibitörü AG 1296 , fosfotidilinositol 3-kinaz (PI-3K) inhibitörleri wortmwnin ve LY294002 , bir intraperitonel pompa yardımıyla verilmiştir. Her üç grupta da kontrol grubuna göre benzer oranlarda korneal neovaskülarizasyonun baskılanmış olduğu ve PDGF mRNA düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir.

Murata ve ark<sup>127</sup>,nın yaptıkları çalışmada VEGF için hazırlanmış küçük engelleyici RNA'ların (small interfering RNAs(siRNAs)) insan retinal pigment epitelyal hücre dizisi ARPE-19 hücrelerinde VEGF düzeylerine etkisi (in vitro) ve korneal neovaskülarizasyona etkisi (in vivo) araştırılmıştır. siRNA uygulamasının ARPE-19 hücrelerinde minimal toksisite ile VEGF mRNA sentezini anlamlı bir şekilde azalttığı ve sütün ile indüklenen korneal neovaskülarizasyon modelinde korneal neovaskülarizasyonun şiddetini azalttığı gösterilmiştir.

Yoon ve ark<sup>128</sup>,nin yaptığı deneysel çalışmada verteporfin kullanılarak yapılan fotodinamik tedavinin tavşan korneal neovaskülarizasyon modelindeki anti-anjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Korneal neovaskülarizasyon sütün ile indükledikten 1 hafta sonra tedaviye başlanmıştır. Tavşanlara 1 haftalık aralıklarla 2 veya 3 defa verteporfin kullanılarak fotodinamik tedavi uygulanmıştır. Biyomikroskopik ve histolojik olarak korneal neovaskülarizasyon incelenmiştir. İki defa fotodinamik tedavi uygulanan grupta kontrol grubuna göre 3. gün, 1. hafta, ve 2. haftada korneal neovaskülarizasyon alanlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterilmiştir.

Castro ve ark<sup>129</sup>,nin yaptığı deneysel çalışmada seçici olmayan siklooksijenaz (COX) inhibitörleri (indometazin), seçici siklooksijenaz-1 (COX-1) inhibitörü (SC-560), seçici siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü (NS-398)'nün deneysel modellerdeki anti-anjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Deneysel modellerde koroidal neovaskülarizasyon argon lazer ile, korneal neovaskülarizasyon alkali koterizasyon ile indüklenmiştir. İndometazin, SC-560 ve NS-398'in lazerle indüklenen koroidal neovaskülarizasyon tedavisinde etkisiz olduğu gösterilmiştir. Ancak indometazin ve NS-398'in alkali koterizasyon ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyon tedavisinde kısmen etkili olduğu gösterilmiştir. SC-560'ın ise

deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde anti-anjiyojenik etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Du ve ark<sup>130</sup>'nın yaptığı çalışmada insan limbal kök hücreleri, insan amniyotik membranında çoğaltılarak bunların tavşan modelinde kök hücre yetmezliği tedavisindeki etkisi araştırılmıştır. Çoğaltılan insan korneal limbal kök hücreler tavşan modeline limbal hasardan 1 ay sonra transplante edilmiştir. Transplantasyon sonrası incelemelerde hasarlı tavşan kornealarının tamamen rekonstrükte olup epitelyal bütünlük gösterdiği gösterilmiştir. Korneal neovaskularizasyonun minimal düzeyde veya hiç olmadığı gösterilmiştir.

Tsai ve ark<sup>131</sup>'nin yaptığı deneysel çalışmada limbal transplantasyon ile konjonktival transplantasyonun korneal yüzey hasarı tedavisindeki etkileri karşılaştırılmıştır. 24 tavşanda yapılan çalışmada korneal yüzey hasarı n-heptanol ile epitelyal debridman yapılarak ve cerrahi olarak limbal zon uzaklaştırılarak oluşturulmuştur. Bir gruba limbal transplantasyon, bir gruba konjonktival transplantasyon yapılmış kontrol grubuna ise herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Takiplerde 6 ay sonunda kontrol grubundaki bütün kornealarda ilerleyici vaskularizasyon ve konjonktivalizasyon gösterilmiştir. Limbal transplantasyon yapılan bütün kornealarda vaskularizasyonda anlamlı azalma gösterilmiştir. Ancak konjonktival transplantasyon yapılan korneaların biri hariç tamamında ilerleyici korneal neovaskularizasyon gösterilmiştir.

Manzano ve ark<sup>132</sup>'nin yaptığı çalışmada deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde topikal bevacizumab (Avastin)'ın 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)'ın korneal neovaskularizasyonu % 40 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da 4 mg/ml topikal bevacizumab (Avastin) bu çalışmaya benzer oranda (%36.56) korneal neovaskularizasyonu baskılamış olduğu

gözlemlenmiştir. Ancak bizim çalışmamızda buna ek olarak 12.5 mg/ml (yüksek doz) topikal ve subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının anti-anjiyojenik etkileri araştırılmış ve bunlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Yüksek doz (12.5 mg/ml) topikal bevacizumab (Avastin) uygulamasının bu çalışmaya benzer oranda korneal neovaskülarizasyonu baskıladığı ve doz arttırılmasına gerek olmadığı, subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir.

Barros ve ark<sup>133</sup>'nin yaptığı deneysel çalışmada subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının korneal neovaskülarizasyon modelindeki anti-anjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Yirmi sıçan kullanılarak yapılan çalışmada korneal neovaskülarizasyon 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 neovaskülarizasyonun kapladığı kornea alanları hesaplanmıştır. Kontrol grubunda % 53.56, G0 grubunda %35.57, G3 grubunda % 30.60 ve G5 grubunda % 35.86 oranında korneal neovaskülarizasyon olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının korneal neovaskülarizasyon modelindeki anti-anjiyojenik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulamasının korneal neovaskülarizasyon modelinde anti-anjiyojenik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca bu çalışmadaki subkonjonktival bevacizumab (Avastin) uygulaması bizim çalışmamızdaki topikal bevacizumab (Avastin) uygulaması kadar etkili olmamıştır. Bu durum bizim çalışmamızda güneşli yapılan subkonjonktival uygulamanın teknik olarak konjonktival hasara sebep olarak mevcut inflamasyonu arttırmasıyla ilişkili olabilir. Bu da subkonjonktival uygulamanın daha az sıklıkla yapılması ve yanında bir anti-inflamatuvar ajanın kullanılmasının daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kim ve ark<sup>134</sup>'nin yaptığı klinik çalışmada korneal neovaskülarizasyonu olan 7 hastanın 10 gözüne 3 ay boyunca günde 2 defa topikal bevacizumab (Avastin) (%)



1.25) uygulanmış, biyomikroskop muayeneleri ve göziçi basıncı ölçümleriyle oftalmolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. On gözün 7'sinde 1 aylık tedaviden sonra korneal neovaskülarizasyonda azalma görülmüştür. Yan etkiler 2. ayda görülmeye başlanmış, 10 gözün 6'sında epitelyopati (epitel defekti, epitelyal erozyon) görülmüştür.

Günümüze kadar korneal neovaskülarizasyon tedavisinde değişik tedavi şekilleri çok sayıda çalışmada araştırılmış, çoğu tedavilerin kısmen etkili olduğu gösterilmiş ancak tam etkili bir tedavi şekli gösterilememiştir. Bu, korneal neovaskülarizasyonun patofizyolojisinde çok sayıda faktörün rol almasıyla açıklanabilir. Özellikle anti-inflamatuvar ve anti-immünolojik etkileriyle steroidler ve bizim çalışmamızda olduğu gibi anti-VEGF ajanların yeni gelişmekte olan damarların gerilemesinde önemli derecede etkili olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda anti-VEGF ajan olan bevacizumab (Avastin) kullanılmış önemli derecede inflamasyon sözkonusu olmasına rağmen ayrıca anti-inflamatuvar ajan kullanılmamıştır. Buna rağmen topikal bevacizumab (Avastin)'ın korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kombine tedavilerin özellikle topikal bevacizumab (Avastin)'ın topikal veya subkonjonktival steroidlerle kullanılmasının daha etkili olabileceğini ve bununla ilgili çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından kolorektal kanserlerin tedavisi için uygulanmış ve çeşitli etyolojilere bağlı oluşan oküler neovaskülarizasyonun tedavisinde intravitreal kullanımının etkili olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiş, bir anti-VEGF ajan olan bevacizumab (Avastin)'ın dünyada ve ülkemizde önemli körlük nedenlerinden biri olan korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde topikal ve subkonjonktival uygulamasının etkileri araştırılmış, birbirleriyle ve plaseboyla karşılaştırılmıştır. Topikal uygulamanın etkili olduğu gösterilmiş ancak subkonjonktival uygulamanın etkinliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Subkonjonktival uygulamanın etkisinin yetersiz olmasının fazla sıklıkta yapılmasının teknik olarak konjonktivada hasara sebep olması ve bu nedenle inflamasyonu arttırmasıyla ilişkili olduğunu ve bir steroid veya non-steroid anti-inflamatuvar ajanla uygulandığında daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca kombine tedavilerin özellikle topikal bevacizumab (Avastin)'ın topikal veya subkonjonktival steroidlerle kullanılmasının daha etkili olabileceğini ve bununla ilgili çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKÇA

1. Yiqin Du, Jing Chen ve ark. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells on amniotic membrane. *Mol Vis* 2003; 9:635-643.
2. Takahiro Nakamura, Ken-1-Ichi Endo ve ark. The successful culture and autolog transplantation of rabbit of oral mukozal epithelial cells on amniotic membrane. *Inves Ophthalmol & Vis Sci*, 2003; 44:106-116.
3. Philips GD, Stone AM ve ark. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1994; 8:961-965.
4. Avery RL, Pearlman J ve ark. Intravitreal bevacimuzab (Avastin) in the treatment of proliorative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006 Oct; 113(10):1695.
5. Manzano R, Peyman G ve ark. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab( Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007 Jun; 91(6):804-7.
6. Rich RM, Rosenfeld PJ ve ark. Short term safety and efficacy intravitreal bevacimuzab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006 May-Jun; 26(5):495-511.
7. Grisanti S, Biester S ve ark. Intracameral bevacizumab for iris rubeosis. *Am J Ophthalmol* 2006 July; 142(1):158-160.
8. Sakaquchi H, İkuno Y ve ark. Intravitreal injection of bevacizumab for choroidal neovascularization caused by pathological myopia. *Br J Ophthalmol* 2007 Feb;91(2):161-5.

9. Oshima Y, Sakauchi H ve ark. Regression of iris neovascularization after intravitreal injection of bevacizumab in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2006 July; 142(1): 155-158.
10. 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.
11. Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as the therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103:1231-1236.
12. Beck L, D'Amore PA: Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11:365-373.
13. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.
14. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43:245-269.
15. Colby KA, Adamis AP: Prevalence of corneal neovascularization in a general eye service population (abstract). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: S593 .
16. Jin-Hong Chang, Eric E. Gabison, Takuji Kato ve ark. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12:242-249.
17. Amano S, Rohan R, Kuroki M ve ark. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation- related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:18-22.
18. Huang AJW, Watson BD, Hernandez E, Tseng SCG: Induction of conjunktival transdifferentiation on vascularized corneas by photothombotic occlusion of corneal neovascularization. *Ophthalmolgy* 1988; 95:228-235.

19. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17:611-613.
20. Völker-Dieben HJ. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aus N Z J Ophthalmol* 1987; 15:11-18.
21. Papase E. Corneal vascularization and contact lenses. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2006; 81: 309-312.
22. Power WJ, Tugal-Tutkun I, Foster CS. Long-term follow-up of patients with atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1998, 105:637-642.
23. Centifanto-Fitzgerald YM, Yamaguchi T, Kaufman HE ve ark. Ocular disease pattern induced by herpes simplex virus is genetically determined by a specific region of viral DNA. *J Exp Med* 1982; 155:475-489.
24. Lopez JS, Price FW Jr., Whitcup SM ve ark. Immunohistochemistry of Terrien's ve Mooren's corneal degeneration. *Arch Ophthalmol* 1991; 109:998-992.
25. Fromer CH, Klintworth GK: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization 3 studies related to vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Am J Pathol* 1976; 82:157-170
26. Austin P, Brown SI: Inflammatory Terrien's marginal corneal disease. *Am J Ophthalmol* 1976; 82:189-192.
27. Efron N: Vascular response of the cornea to contact lense wear. *J Am Optom Assoc* 1987; 58:836-846.
28. Henkind P: Ocular neovascularization. The Krill memorial lecture. *Am J Ophthalmol* 1983; 85:287-301.
29. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-10934.

30. Kremer I, Cohen EJ, Eagle RC ve ark. Histopathological evaluation of stromal inflammation in Acanthamoeba keratitis. *CLAO J* 1994; 20:45-48.
31. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2514-2522.
32. Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M: Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization. *Cornea* 2000; 19:526-533.
33. Breier G. Angiogenesis in embryonic development-a review. *Placenta* 2000; 21:11-15.
34. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Hematol* 2001; 106:148-156.
35. Ng IO, Poon RT, Lee JM ve ark. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and FLK-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001, 116:838-845.
36. Mesuda Y, Shimizu A, Mori t ve ark. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001; 159;:599-608.
37. Shima DT, Kuroki M, Deutsh U ve ark. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, and characterization transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 1996; 271:3877-3883.
38. Bjorndahl MA, Cao R, Burton JB ve ark. Vascular endothelial growth factor-a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2005; 65:9261-9268.

39. Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, ve ark. A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor, VEGF 115. *J Biol Chem* 1998; 273:3033-3038.
40. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U ve ark. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Current Opin Biothechnol* 1999; 10:528-535.
41. Li X, Eriksson U. Novel of VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D. *Int J Biochem CellBiol* 2001; 33:421-426.
42. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L ve ark. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer* 2000; 83:63-68.
43. Zheng M, Deshpande S, Lee S ve ark. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001; 75:9828-9835.
44. Amano S, Rohan R, Kuroki M ve ark. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound-and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 ; 39:18-22.
45. Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B ve ark. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J* 2000, 19:1525-1533.
46. Hayashi N, Nakayasu K, Okisaka S: Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factor through corneal neovascularization *in vivo* and *in vitro*. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1996; 100:587—591.
47. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I ve ark. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990 ; 31:323-333.

48. Lu PC, Ye H, Maeda M ve ark. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:20-27.
49. Ye HQ, Maeda M, Yu FS, Azar DT: Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) ve kollajenaz 3 (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2894-2899.
50. Kwanta A, Sarman S, Fagerholm P ve ark. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated cornea neovascularization. *Exp Eye Res* 2000; 70:419-428.
51. Mohan R, Sivak J, Ashton P ve ark. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem* 2000; 275:10405-10412
52. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL ve ark. Disruption of angiogenesis by PEX , a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998; 92:391-400
53. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevensen WG ve ark. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 1999; 274:29568-29571.
54. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H ve ark. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998; 58:1048-1051.
55. O'Reilly MS, Holmgren N, Shin Y ve ark. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79:315-328.
56. Cao R, Wu HL, Veitonmaki N ve ark. Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5728-5733.



57. Shin SH, Kim JC, Chang SI ve ark. Recombinant kringle 1-3 plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 2000; 19:212-217.
58. Hernandez-Quintela E, Azar DT, O'Reilly MS ve ark. The role of angiostatin in the cornea after wounding. *IOVS* 1999; 40:S97.
59. Chang JH, Azar DT, Hernandez-Quintela ve ark. Characterization of angiostatin in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: S832.
60. Twining SS, Wilson PM, Ngamkitidechakul C: Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1 alpha and-1 beta. *Biochem J* 1999; 339:705-712.
61. Sack RA, Beaton R, Sathe S. Diurnal variations in angiostatin in human tear fluid: a possible role in prevention of corneal neovascularization. *Current Eye Res* 1999; 18:186-193.
62. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y ve ark. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-285.
63. Halfriter W, Dong S, Schurer B ve ark. Collagen 13 is basement membrane heparane sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998; 273:25404-25412.
64. Lin HC, Chan JH, Jain S ve ark. Endostatin localization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:S832.
65. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T ve ark. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000; 486:247-251.
66. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA ve ark. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1 and METH-2 are members of a new family of proteins with angioinhibitory activity. *J Biol Chem* 1999; 274:23349-23357.

67. Ortego J, Escribano J, Becerra SP ve ark. Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium : syntesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996 ; 37:2759-2767.
68. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type 1 collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* 2002; 277:45400-45407.
69. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G ve ark. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:1954-1962.
70. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S. Effects of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41 :154-158.
71. Harvey PT, Cherry PM. Indometasin and dexamethasone in the suppression of corneal neovascularization. *Can J Ophthalmol* 1983; 18:293-295.
72. Haynes WL, Proia Ad, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989 ; 30:1588-1593.
73. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S ve ark. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is modulated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Met* 1999; 17:687-694.
74. Skold M, Culheim S, Hammaber H ve ark. Induction of VEGF and VEGF receptors in the spinal cord after mechanical spinal injury and prostaglandin administration. *Eur J Neurosci* 2000; 12:3675-3686.
75. Dempke W, Rie C, Grothey A ve ark. Cyclooxygenase-2 a novel target for cancer chemotherapy? *Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:411-417.

76. Fosslein E. Review: Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31:325-348.
77. Yamada M, Kawai M, Kawai Y ve ark. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Current Eye Res* 1999; 19:300-304.
78. Edelma JL, Castro MR, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1112-1123.
79. Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Toical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea* 1998; 14:403-409.
80. Demir T, Celiker UO, Kukner A ve ark. Effect of octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 1999; 77:386-390.
81. Benelli U, Ross JR, Nardi M ve ark. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery: inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:274-282.
82. Benelli U, Lepri A, Del Tacca M ve ark. FK-506 delays corneal graft rejection in a model of corneal xenotransplantation. *J Ocul Pharmacol Ther* 1996; 12:425-31.
83. Kim JH, Kim JC, Shin SH ve ark. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF and VEGF. *Exp Mol Med* 1999; 31:203-209.
84. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B ve ark. New activity of spironolactone: inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation* 1996; 94:2566-2571.
85. Keynon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997; 64:971-978.

86. Sood AK, Gupta P, Chug P. Topical amiloride accelerates healing and delays neovascularization in mechanically produced corneal ulcers in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999; 21:491-497.
87. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R ve ark. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4:376-383.
88. Cohen RA, Gebhardt BM, Bazan NG. A platelet-activating factor antagonist reduces corneal allograft inflammation and neovascularization. *Curr Eye Res* 1994; 13:139-144.
89. Nirankari VS: Laser photocoagulation for corneal stromal vascularization. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1992; 90:595-669.
90. Nirankari VS, Dandona L, Rodrigues MM: Laser photocoagulation of experimental corneal stromal neovascularization: efficacy and histopathology. *Ophthalmology* 1993; 100:111-118.
91. Primbs GB, Casey R, Wamser K ve ark. Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29:832-838.
92. Gohto Y, Obana A, Kanai M ve ark. Treatment parameters for selective occlusion of experimental corneal neovascularization by photodynamic therapy using a water soluble photosensitizer, ATX-S1(Na). *Exp Eye Res* 2001; 72:13-22.
93. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S ve ark. Allograft conjunktival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995; 102:1020-1025.
94. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K ve ark. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:431-441.

95. Hao Y, Ma DH, Hwang DG ve ark. Identification of anti-angiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348-352.
96. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of cornea neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995; 9:32-46.
97. Breier G. Angiogenesis in embryonic development-a review. *Placenta* 2000; 21:11-15.
98. Ishida S, Yamashiro K, Usui T ve ark. Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nat Med* 2003; 9:781-788.
99. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N ve ark. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003; 111:1287-1295.
100. AP Adamis, DT Shima. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005; 25 (2) 111-118.
101. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W ve ark. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23); 2335-2342.
102. Kahook MY, Schuman JS, Noecker RJ. Intravitreal bevacizumab in a patient with neovascular glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2006; 37 (2);144-146.
103. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD ve ark. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006; 113(3);363-372.
104. Davidorf FH, Mouser JG, Derick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab(Avastin) injection. *Retina* 2006; 26(3);354-356.

105. Marmor MF, Negi A, Maurice DM. Kinetics of macromolecules injected into the subretinal space. *Exp Eye Res* 1985; 40:687-696.
106. Bell C, Lynam E, Landfair DJ ve ark. Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; 35:533-542.
107. Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem* 1995; 270:13581-13584.
108. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase 2 study results. *Ophthalmology* 2003; 110:979-986.
109. Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2002; 22:143-152.
110. Yang JC, Haworth L, Sherry RM ve ark. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:427-434.
111. Michels S, Rosenfeld PJ, Pulafito CA ve ark. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005; 112:1035-1047.
112. 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.
113. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD ve ark. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006; 113:363-372.

114. Steinbook R. The price of sight-ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1409-1412.
115. Moshfeghi AA, Rosenfel PJ, Puliafito CA ve ark. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration;: twenty-four-week results of an uncontrolled open label clinical study. *Ophthalmolgy* 2006; 113:2002.e1-12.
116. Bashshur ZF, Bazarbachi A, Shakal A ve ark. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006; 26:352-354.
117. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006; 26:352-354.
118. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006; 26:275-278.
119. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36:336-339.
120. Manzano RP, Peyman GA, Khan P ve ark. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). 2007 Nov; 35(8):745-8.
121. Murata M, Shimizu S, Horiuchi S, Taira M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244:205-209.
122. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. *Exp and Mol Med* 2006 Apr; 38:173-179

123. Riazi-Efsahani M, Peyman GA, Aydın E ve ark. Prevention of corneal neovascularization: Evaluation of various commercially available compounds in an experimental rat model. *Cornea* 2006 Aug; 25(7):801-805
124. Demir T, Çeliker ÜO, Kükner A ve ark. Effect of octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 1999; 77:386-390.
125. Berdugo M, Andrieu-Soler C, Doat M ve ark. Downregulation of IRS-1 expression causes inhibition of corneal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4072-4078.
126. Dell S, Peters S, Müther P ve ark. The role of receptor inhibitors and PI-3 kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1928-1937.
127. Murata M, Takanami T, Shimizu S ve ark. Inhibition of ocular angiogenesis by diced small interfering RNAs (siRNA) specific to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Curr Eye Res* 2006; 31:171-180.
128. Yoon KC, Ahn KY, Kim KK ve ark. Experimental inhibition of corneal neovascularization by photodynamic therapy with verteporfin. *Curr Eye Res* 2006; 31:215-224.
129. Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2004; 79:275-285.
130. Du Y, Chen J, Funderburgh JL ve ark. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membran. *Molecular Vision* 2003; 9:635-43.
131. Tsai R J-F, Sun T-T ve ark. Comparison of limbal and conjunktival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 1990; 97:446-455.



132. 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.
133. Barros LFM, Belfort R. The effects of the subconjunktival injection of bevacizumab (Avastin). *An Acad Bras Cienc* 2007; 79(3): 389-394
134. Kim SW, Ha BJ, Kim EK ve ark. The Effect of Topical Bevacizumab on Corneal Neovascularization. *Ophthalmology* 2008 Apr [Epub ahead of print]