



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYON MODELİNDE
SUBKONJONKTİVAL BEVASİZUMAB UYGULAMA DOZLARININ
İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Burak ULAŞ

Adana / 2015



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYON MODELİNDE
SUBKONJONKTİVAL BEVASİZUMAB UYGULAMA DOZLARININ
İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Burak ULAŞ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rana YAYCIOĞLU

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA 15/11) ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

Adana / 2015

TEŞEKKÜR

Dört yıllık uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde çok emeği olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, uzmanlık tezimim tüm aşamalarında büyük katkısı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rana Yaycıoğlu'na, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürsel Yılmaz'a, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Aysel Pelit'e, uzmanlık eğitimine başladığım ilk günden bu yana medikal ve sosyal her konuda yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç Dr. Müge Karataş'a, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Handan Canan'a, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen ve akademik anlamda ufkumu genişleten hocam Sayın Doç. Dr. Selçuk Sızmaz'a, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Uzm. Dr. Nedime Keşkek'e, histopatolojik incelemede desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Nebil Bal'a ve kliniğimizde görev yapmakta olan hemşire ve teknik personele teşekkür ederim.

Başkent Üniversitesi Göz Hastalıkları uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı kurucu rektörümüz Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, rektörümüz Sayın Prof. Dr. Ali Haberal'a, Tıp Fakültesi Dekanımız Sayın Prof. Dr. Haldun Müderrisoğlu'na, eğitimim sırasında ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde sağladıkları tüm imkanlardan dolayı Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Müdürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Turgut Noyan'a teşekkür ederim.

Hayat boyu sevgi ve desteklerini hep yanımda hissettiğim annem Bilge Ulaş'a, babam Mehmet Ali Ulaş'a ve ablam Uzm. Dr. Melda Ulaş Güncan'a teşekkür ederim.

Dr. Burak ULAŞ

Adana / 2015

ÖZET

Bu çalışma subkonjonktival bevasizumab uygulamasının rat modeli üzerinde kornea neovaskülarizasyonu inhibisyonunun etkinliğinin araştırılması ve farklı dozlarının etkinliğinin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

Bu deneysel çalışmada 30 adet erişkin Sprague- Dawley türü rat kullanıldı. Rat kornealarının santrali kimyasal olarak koterize edildi. Ratlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Grup 1'e (kontrol grubu) (n=10) 1. günde 0,05 ml subkonjonktival %0,9 NaCl çözeltisi uygulandı. Grup 2'ye (n=10) 1. günde 0,05 ml subkonjonktival bevacizumab (1,25 mg) uygulandı. Grup 3'e (n= 10) 0,05 ml subkonjonktival bevacizumab (1,25 mg) 1., 3., 5. ve 7. günde birer doz uygulanacak şekilde toplam dört doz uygulandı. Bütün ratların 3. ve 9. günde biyomikroskopik muayenesi yapıldı. Dijital fotoğraflar çekilip bilgisayar programı kullanılarak neovaskülarizasyonun toplam kornea yüzeyindeki kapladığı alanlar yüzde olarak hesaplandı. Denekler 10. günde sakrifiye edildi. Korneadan alınan kesitlerde, kan damarı sayısı, enflamasyon durumu ve kollajen düzeni histopatolojik olarak değerlendirildi.

Kornea ödemi ve opasitesi, grup 3'te, grup 2 ve grup 1'e göre anlamlı şekilde düşük saptandı. Korneada ortalama neovasküler alanlar grup 2 ve grup 3'te, grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı, grup 3'te de grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük izlendi. Histopatolojik çalışmada grup 1'e göre damar sayıları karşılaştırıldığında, grup 2 ve grup 3'te damar sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Ayrıca grup 3'te, grup 2'ye göre damar sayısının istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu gözlemlendi. Histopatolojik değerlendirmede, grup 3'te enflamasyon ve ödem skorunun grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu izlendi.

Kornea neovaskülarizasyonu inhibisyonunda subkonjonktival bevasizumab uygulanmasının etkili olduğu görülmüştür. Tedavide çoklu doz uygulanan bevasizumabın tek doz uygulanan bevasizumaba göre daha etkin olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kornea neovaskülarizasyonu, Bevasizumab, Enflamasyon.

ABSTRACT

Evaluation and Comparison of the Inhibitory Effect of Subconjunctival Bevacizumab Application Doses in an Experimental Model of Corneal Neovascularization

This study was carried out to evaluate and compare the inhibitory effects of subconjunctival high dose and low dose bevacizumab on corneal neovascularization in a rat model.

In this study, thirty adult Sprague- Dawley rats were used. The central corneas of the rats were cauterized chemically. The rats were randomly enrolled into three groups. In group 1 (control group) (n=10), on the first day 0.05 ml 0.9% NaCl solution was injected subconjunctivally. In group 2 (n=10), 0.05 ml bevacizumab (1.25mg) was injected on the first day subconjunctivally. In group 3 (n=10), four doses of 0.05 ml bevacizumab (1.25mg) were injected subconjunctivally on the first, third, fifth and seventh day. Biomicroscopic examination of all rats were performed at the third and ninth day. Digital images of the corneas were taken and analyzed using an image analysis software to calculate corneal neovascularization area. All rats were sacrificed on the tenth day. The number of blood vessels, state of inflammation and collagen formation were evaluated histopathologically in corneal sections.

In group 3, corneal edema and opacity scores were significantly lower than group 2 and 1. The mean percentage of neovascularized corneal area in group 1 was significantly higher than group 2 and group 3. The mean percentage of neovascularized corneal area in group 3 was significantly lower than group 2. In histopathological examination, group 2 and group 3 showed significantly less number of blood vessels than group 1. In addition, group 3 showed significantly less number of blood vessels than group 2. In the histopathological evaluation, inflammation and edema scores were observed significantly lower in group 3 than group 1.

Subconjunctival bevacizumab injection treatment has been shown to be effective in inhibition of corneal neovascularization. The multiple dose bevacizumab treatment was more effective compared to single dose bevacizumab treatment.

Keywords: Corneal neovascularization, Bevacizumab, Inflammation.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kornea.....	2
2.1.1. Kornea Embriyolojisi.....	2
2.1.2. Kornea Anatomisi	2
2.1.2.1. Kornea Epitel Tabakası	3
2.1.2.2. Bowman Tabakası	4
2.1.2.3. Stroma Tabakası	4
2.1.2.4. Descemet Membranı	4
2.1.2.5. Endotel Tabakası	4
2.1.3. Korneanın Duyusal İnervasyonu	5
2.1.4. Kornea Vasküler Sistemi	5
2.1.5. Kornea Fizyolojisi ve Metabolizması	6
2.1.6. Kornea İşlevleri	6
2.2. Kornea Neovaskülarizasyonu	6
2.3. Kornea Neovaskülarizasyonunun Moleküler Temelleri	8
2.4. Kornea Neovaskülarizasyonunda Tedavi	9
2.4.1. Kornea Neovaskülarizasyonunda Cerrahi Tedavi	9
2.4.2. Kornea Neovaskülarizasyonunda Medikal Tedavi	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	12
3.1. Hayvan Modeli	12
3.2. Biyomikroskopik Değerlendirme	13
3.3. Histopatolojik Değerlendirme.....	14
3.4. İstatistiksel Analiz.....	15

4. BULGULAR	16
4.1. Biyomikroskopik Bulgular	16
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	20
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR.....	33

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
CTGF	: Bağ Doku Büyüme Faktörü
FDA	: Food and Drug Administration
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GAG	: Glikozaminoglikan
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
MCP	: Monosit Kemoatraktan Protein
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEDF	: Pigment Epiteli Kaynaklı Faktör
PGF	: Plasental Büyüme Faktörü
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
SS	: Standart sapma
TGF	: Transforme Büyüme Faktörü
TIMPs	: Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-R	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
µm	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Histopatolojik incelemede normal kornea kesiti.....	5
Şekil 3.1. Deney hayvanının sağ gözünde kimyasal koterizasyon uygulanımı	12
Şekil 3.2. Deney hayvanına subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu uygulanımı.....	13
Şekil 4.1. Dokuzuncu gündeki biyomikroskopik muayenede kornea ödemi skorlaması	16
Şekil 4.2. Kornea opasitesi skorlaması.....	17
Şekil 4.3. Korneada neovaskülarizasyon görülen alanların oranları	18
Şekil 4.4. Grup 1’de (kontrol grubu) dokuzuncu gün çekilen fotoğrafta korneadaki neovaskülarizasyon	19
Şekil 4.5. Grup 2’de (1,25 mg/0,05cc subkonjonktival bevasizumab uygulanan grup) dokuzuncu günde çekilen fotoğrafta korneadaki neovaskülarizasyon	19
Şekil 4.6. Grup 3’te (4 doz 1,25mg/2cc subkonjonktival bevasizumab uygulanan grup) dokuzuncu günde çekilen fotoğrafta korneadaki neovaskülarizasyon	20
Şekil 4.7. Damar sayıları	21
Şekil 4.8. Grup 1 (Kontrol grubu) 10. günde kornea kesiti histopatolojik görüntüsü (Hematoksilen Eozin x200)	21
Şekil 4.9. Grup 2 (Tek doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea kesitinin histopatolojik görüntüsü (Hematoksilen Eozin x200).....	22
Şekil 4.10. Grup 3 (Çoklu doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea kesitinin histopatolojik görüntüsü (Hematoksilen Eozin x200)	22
Şekil 4.11. Grup 1’de (Kontrol grubu) 10. günde kornea histopatolojik kesitinde kollajen düzeni değerlendirilmesi (Masson Trikrom x200).	23
Şekil 4.12. Grup 2’de (Tek doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea histopatolojik kesitinde kollajen düzeni değerlendirilmesi (Masson Trikrom x200).....	24
Şekil 4.13. Grup 3’te (Çoklu doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea histopatolojik kesitinde kollajen düzeni değerlendirilmesi (Masson Trikrom x200).....	24
Şekil 4.14. Enflamasyon ve ödem değerlendirmesi	25

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Kornea neovaskularizasyonu ile ilişkili hastalıklar.....	7
Tablo 2.2. Anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler.....	8
Tablo 2.3. Kornea neovaskularizasyonunda medikal ve cerrahi tedavi seçenekleri	9

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sağlıklı insan korneası şeffaflık ve optimal vizyon sağlanması için, lenfatik ve kan damarlarından yoksun avasküler bir yapıya sahiptir (1). Retina üzerine keskin bir hayalin oluşması için saydam ve kırıcılık gücü uygun olan bir kornea varlığı gereklidir (1,2). Kornea hastalıkları, kataraktan sonra görme kaybının en önemli nedenlerindedir (3). Kimyasal ve termal hasar, Stevens- Johnson sendromu, kontakt lens kullanımı, keratitler, multipl endokrin bozukluk gibi inflamatuvar, enfeksiyöz ve travmatik patolojiler korneada neovaskülarizasyona ve skara neden olabilmektedir (4). Korneanın neovaskülarizasyonu ise kornea şeffaflığının kaybolmasına ve görme azlığına yol açmaktadır (5).

Kornea neovaskülarizasyonunun oluşumunda anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasında bir denge mevcuttur ve neovaskülarizasyon oluşum sürecinde bu denge anjiyojenik faktörler tarafına kaymaktadır (6). Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) kornea yapısında, kornea neovaskülarizasyonu ile sıkı ilişkili olduğu gösterilen anjiyojenik faktörler içerisinde (7). VEGF proteolitik aktivite, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi anjiyojeniz basamaklarında görev almaktadır (8). VEGF inhibitörlerinin kornea neovaskülarizasyonu oluşum sürecinde damarlanmayı yavaşlattığı ve inhibe ettiği izlenmiştir (9). Korneada patolojik sürece bağlı neovaskülarizasyon gelişimini inhibe etmek amacı ile fotodinamik tedavi, argon laser fotokoagülasyon kullanılsa da bu tekniklerin etkinliğinin kısıtlı olduğu bilinmektedir (10). Kornea neovaskülarizasyonu oluşum sürecinde etkili mediatörler arasında VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), angiogenin, prostaglandin, interlökin 8 (IL-8) ve interlökin 2 (IL-2) sayılabilir (11). Bu nedenle kornea neovaskülarizasyonunun inhibisyonu amacıyla steroidler, indometazin, siklosporin, metotreksat, rafamisin, talidomid gibi çok sayıda ajan kullanılmıştır (12–16). Son yıllarda ise farmakoklinik çalışmalarda VEGF inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalar yoğunlaşmıştır (17).

Bevasizumab tüm insan VEGF-A izoformlarına bağlanarak biyolojik aktivitesini inhibe eden monoklonal bir antikordur (18). Korneada neovaskülarizasyon oluşum sürecinde bevasizumabın inhibisyon aşamasında etkili olduğu gösterilmiştir (19).

Bu deneysel çalışmamızda, oluşturduğumuz kornea neovaskülarizasyonu modelinde subkonjonktival bevasizumabın inhibitör etkisini araştırmayı ve bu ajanın farklı dozlarında etkinliklerini karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea

2.1.1. Kornea Embriyolojisi

Göz küresi embriyolojik olarak nöroektoderm, yüzeyel ektoderm ve mezenşim olmak üzere üç dokudan oluşur (20). Kornea epitel katını yüzeyel ektoderm, kornea stromasını mezenşim doku oluşturur (20). Kornea endoteli ise nöroektoderm kökenli optik çanağın kristasından gelen fibroblastlardan oluşur (20,21).

Lens vezikülü yüzeyel ektodermden 6'ncı haftada ayrılır, kornea epiteli oluşur. Sekizinci haftada kornea endoteli ve Descemet membranı oluşur (20,22). Beşinci ayda kornea epitelinin altında bulunan stroma yüzeyinin yoğunlaşmasıyla Bowman tabakası meydana gelir, üçüncü ayda korneaya gelen sinir lifleri beşinci ayda epitel katına ulaşmış olur (20,23).

2.1.2. Kornea Anatomisi

Kornea skleraya devam niteliğinde globun ön kısmında bulunmakta olan saydam ve optik özelliği olan bölümdür. Kornea kırma gücü 40-45 dioptri olan konveks yüzeye sahip bir doku olmakla birlikte dış ortama karşı koruyuculuk görevi de üstlenmiştir. Normal kalınlığı merkezde yaklaşık 540 mikrometre, periferde yaklaşık 650 mikrometredir (μm). Erişkinde horizontal çapı 12.6 milimetre (mm), vertikal çapı 11.7 mm, ön eğrilik yarıçapı 7.8 mm, arka eğrilik yarıçapı 6.8 mm'dir. Yenidoğan döneminde vertikal kornea çapı 10 mm'dir. Kırıcılık gücü yaklaşık +51 dioptridir. Bir yaşında erişkin seviyesine ulaşır. Kornea ön yüzeyinin kırma gücü +48.8 dioptri, arka yüzeyinin kırma gücü -5.8 dioptri olup toplam kırma gücü +43 dioptridir. Kornea gözün toplam kırma gücünün %70'ini oluşturur. Refraktif indeksi 1.376'dır. Kornea gelişimi 6 yaşına kadar devam etmektedir (24,25).

Gözyaşı film tabakası sağlıklı bir kornea epiteli için gerekli bir yapıdır. Yaklaşık 7 μm 'dir ve göz kırıldığında kalınlaşır, ikinci kırılmaya kadar incilir. Son yapılan araştırmalarda gözyaşının temel ünit bir form olduğu düşünülse de klasik olarak bilinen 3 katmandan oluşmaktadır. En dışta lipit tabakası bulunmaktadır, 0,5 μm kalınlığındadır. Temel amacı göz yaşının hemen buharlaşmasını önlemektedir. Lipit tabakasını Zeis, Moll ve Meibomian bezleri salgıları oluşturur. Ortadaki ve en kalın olan tabaka aköz tabakadır. Lakrimal bez, Krause ve Wolfring bezlerinde salgılanır. Aköz tabaka içerisinde sodyum klorür, glukoz, değişik enzim ve proteinler, immunoglobulin, albumin ve çeşitli

komplemanlar bulunur ve bu tabaka çok fonksiyonludur. En içteki tabaka musin tabaka olup en ince tabakadır, yaklaşık kalınlığı 0,2- 0,5 μm 'dir. Goblet hücrelerinden salınır ve kornea epitel ve gözyaşı filmi tabakası arasında ilişki ve yüzey gerilimini düzenler. Bu 3 tabaka arasında keskin sınırlar yoktur. Daha çok gradyan görünümde bir orantısal yoğunluğa bağlı dizilim mevcuttur. Gözyaşı film tabakasının altında kornea kendi içinde düzenli katmanlardan oluşmaktadır (24,25).

Kornea klasik olarak 5 tabakadan oluşur. En dıştan başlayarak sıralaması aşağıda belirtilmiştir.

1. Epitel tabakası
2. Bowman tabakası
3. Stroma tabakası
4. Descemet membranı
5. Endotel tabakası

2.1.2.1. Kornea Epitel Tabakası

Korneanın en dışındaki katman olup, yaklaşık kalınlığı 50 μm 'dir. Yaklaşık 5-6 sıra hücre içerir ve 3 hücre tipi mevcuttur.

1. Yüzeyel hücre
2. Poligonal kanatsız hücre
3. Kolumnar hücre

Yüzeyel hücrelerde çok sayıda mikrovillus ve plica mevcuttur. Üzerleri mikrokaliks ile örtülmüş olup gözyaşı film tabakası ile stabilizasyonu sağlar. Hücreler arası sıkı bağlantılar mevcut olup bariyer fonksiyonu da sağlarlar. Kolumnar hücreler mitotik aktivitesi olan tek sıra halinde bazal membrana dizilmiş hücre tipleridir. Çoğalıp ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar. Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar mevcuttur. Hücre göçü sırasında aktin filamanlar hareketi sağlama, tonofilamanlar ise hücre iskeleti oluşturma görevinde bulunurlar. Hemidesmosomlar sayesinde kolumnar hücreler bazal membrana tutunurlar ve 'gap junction' ismi verilen bağlantılar ile birbiri ile kısıtlı da olsa madde alışverişini sağlarlar. Kornea epitel aköz hümör, gözyaşı ve limbal kapillerden beslenirler. Yenilenme kabiliyeti çok yüksektir glukoz ihtiyacını aköz hümörden sağlarlar (24-27).

2.1.2.2. Bowman Tabakası

Bowman tabakası epitel bazal membranı ve stroma arasında yer alır. Yaklaşık 8- 14 µm kalınlığında olup tip I ve tip III kollajen fibrillerden oluşur. Yenilenme yeteneği yoktur, travma sonrası ince tabaka olarak iyileşebilir ancak eski haline dönmez, mikroorganizmalara karşı direnç gösteren bariyer görevi üstlenen tabakadır (24–27).

2.1.2.3. Stroma Tabakası

Fibroblastlara benzeyen keratositler, kollajen fibriller ve ekstraselüler matriks tarafından oluşturulur. Ağırlığının yaklaşık %78'i sudur. Kuru ağırlığının %80'ini kollajen, %15'ini glikozaminoglikan (GAG), %5'ini keratositler oluşturur. Yaklaşık 500 µm kalınlığında olup kornea kalınlığının %90'ını oluşturur. Keratositler yassı ve uzun olup korneada kollajen ve mukoprotein sentezinden sorumludurlar. Yaralanmalarda fibrositlere dönüşürler. Sitoplazmalarındaki glikojen granülleri kornea enerji deposunu oluşturur. Stromayı oluşturan kollajen lifleri çoğunluğu tip 1 olmak üzere, tip 3,5 ve 6'dır. Kollajen lifler fibriler stroma boyunca lameller tarzda uzanır. Bu lameller birbirlerine gevşek bağlarla bağlanmış olup eşit uzunluk ve kalınlıktadır ve düzenli yerleşimlidir. Bu düzenli yapılanma kornea saydamlığı için çok önemlidir. Fibriller arasını glikozaminoglikanlardan oluşan matriks doldurur. Stromada bulunan glikozaminoglikanlar keratan sülfat, kondroitin sülfat ve dematan sülfat'tır. Glikozaminoglikanlar katyon ve su bağlanmasını sağlarlar, stroma ödeminde rol oynarlar ve kornea kalınlaşmasında etkilidir (24–27).

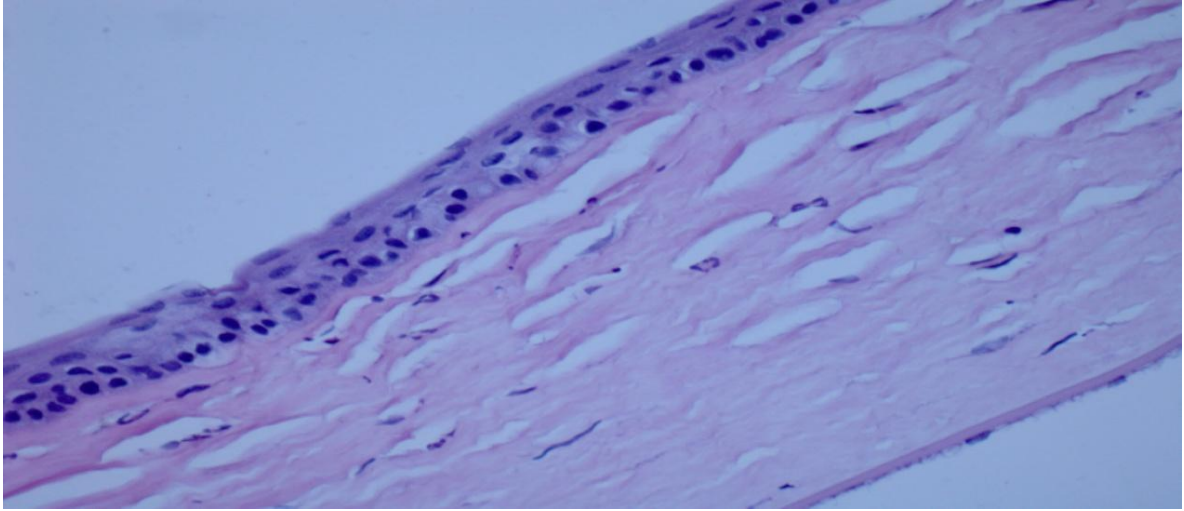
2.1.2.4. Descemet Membranı

İç kısımdaki endotel tabakasının bazal membranıdır. Stroma ile endotel arasında bulunmaktadır. Tip 4 kollajen ve fibronektinden oluşmaktadır. Bantlı ve bantsız olmak üzere iki tabakadan meydana gelir. Yaklaşık 10 µm kalınlığındadır. Kalınlığı yaşla artmaktadır. Korneanın endotel hastalıklarından etkilenir. Açığa 2 mm uzaklıkta sonlanarak Schwalbe çizgisini oluşturur (24–27).

2.1.2.5. Endotel Tabakası

Poligonal hücrelerden oluşan, yaklaşık 4-5 µm kalınlığındaki aköz humör ile bağlantılı tabakadır. Doğumda yaklaşık 10 µm kalınlığındadır. Endotel hücreleri kornea en iç tabakasında arı kovanı dizilimi (mozaik patern) ile kornea beslenmesini üstlenmiştir. Doğumda yaklaşık 3500-4000 hücre/mm³ iken erişkinde 2500-3000 hücre/mm³ tür. Yaşlandıkça hücre sayısı ve yoğunluğu azalmaktadır, bu da streslerde kornea ödeminde

neden olabilmektedir. Endotelde aktif Na-K ATPaz pompa mekanizması vardır ve regulasyonu pompa ile sağlarlar. Descemet membranına bakan kısımlarda ise hemidesmosomlar bulunur. Endotel tabakası korneaya sıvı geçişine karşı mekanik bariyer oluşturur ve stromada birikmiş sıvının dışarı pompalanmasını sağlar. Bu pompa ve regulasyon mekanizması bozulursa korneada kronik ödem gelişir (24–27) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Histopatolojik incelemede normal kornea kesiti

Normal kornea tabakalarını göstermek için, çalışmamızdaki bir ratın korneasında neovaskülarizasyon olmayan alandan alınan kesittir (Hematoksilen Eozin, x400).

2.1.3. Korneanın Duyusal İnervasyonu

Kornea oldukça yoğun ve hassas bir duyuşsal inervasyona sahiptir. Duyarlılığı deriden 300-600 kat fazladır. 0,1 mm²'sinde yaklaşık 100 adet sinir sonlanması mevcuttur. Beşinci kraniyal sinir olan Nervus Trigemunus'un oftalmik dalından gelen arka siliyer sinirler, ön ve arka dala ayrılarak korneaya gelirler. Korneadaki sinir lifleri myelinden yoksundur. Sinirler epitel bazal membranı ve bazal hücrelerde bulunurlar. Endotelde ve Descemet membranında sinir lifi bulunmamaktadır. Santral korneada duyarlılık ve hassasiyet periferden daha fazladır (24–27).

2.1.4. Kornea Vasküler Sistemi

Kornea damarsız bir dokudur ve lenfatik drenajı yoktur. Limbusta epitel altında yüzeyel marjinal pleksus mevcuttur. Yüzeyel marjinal pleksus ön siliyer damarların episkleral dallarından gelen damarlar tarafından oluşturulur. Limbus epiteli altında lenfatik ağ bulunur (24–27).

2.1.5. Kornea Fizyolojisi ve Metabolizması

Korneanın %80'i sudur ve bu oran kornea saydamlığını sağlamasında önemlidir. Kornea saydamlığı ve dehidratasyonun idamesi için enerjiye ihtiyacı vardır. Kornea glukozu aköz humörden sağlamaktadır. Gözyaşı ve limbal kapiller yolu ile glukoz temini daha azdır. Korneada glukoz Krebs siklusu ile enerjiye çevrilmektedir ve bu biyokimyasal olay için oksijen gereksinimi mevcuttur. Kornea endoteli gerekli oksijeni aköz humörden, epitel ve stroma tabakası ise gözyaşı ve limbal kapillerden elde etmektedir. Epitel düzeyinde glukoz glikojen olarak depolanabilmektedir. Epitel stromaya kıyasla daha çok adenozin trifosfat (ATP), enzim ve glikojen ihtiva etmektedir. Kornea Krebs siklusu yanında pentoz fosfat yolunu da kullanabilmektedir, bu yolla kornea epiteli lipid sentezi de yapabilmektedir. Kornea yapısında bol miktarda kollajen lifler, mukopolisakkaritler, laktik asit, askorbik asit, glutatyon, albumin, globulin ihtiva etmektedir (24–27).

2.1.6. Kornea İşlevleri

Kornea yapısı itibariyle birçok önemli işlevi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kırıcılığı ve saydamlığıdır. Korneanın saydamlığı kollajen fibrillerin biribilerine paralel ve düzgün dizilmeleri ile sağlanmaktadır. Fibrillerin birbirlerine uzaklığı aynıdır, eğer bunda bir değişiklik olursa kırıcılıkta farklılıklar gözlenir ve korneada bulanıklığa sebep olur. Korneanın şeffaflığına katkıda bulunan diğer faktörler ise korneada kan damarı bulunmaması, korneada hücreler arası materyalin aynı kırıcılığa sahip olması ve korneanın su içeriği sayılabilir. Kornea geçirgenliği de işlevleri arasındadır. Hem oksijen ve glukoz geçirgenliği hem de ilaç geçirgenliği korneanın katlarına bağlıdır. Kornea epitelini liyofilik yapıda olup ilaç için önemli bir bariyer vazifesi de görmektedir. Maddenin kimyasal yapısı (hidrofilik-lipofilik ve diğer), maddenin molekül ağırlığı, konsantrasyonu, ph düzeyi, osmolaritesi, yüzey gerilimi ve ıslanma açısı da kornea geçirgenliğini etkileyen mekanizmalardandır (24–27).

2.2. Kornea Neovaskülarizasyonu

Neovaskülarizasyon önceden damarsız olan bir bölgede yeni damar yapılarının oluşmasıdır (28). Vaskülojeniz ve anjiyojenizden oluşan iki mekanizmayı içermektedir. Vaskülojeniz embriyojeniz sırasında kemik iliği anjiyoblastlarından yeni damarlanma oluşmasıdır. Anjiyojeniz var olan damar yapılarından yeni damarlanma oluşmasıdır. Tümörlerde, kornea ve retina hastalıklarında anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki denge anjiyojenik faktörler tarafına kaydığında yeni damarlanma oluşmaktadır

(29–31). Korneanın neovasküler hastalıkları önemli bir halk sağlığı problemidir (3). Kornea hasarı sonrası yara iyileşmesi genelde neovaskülarizasyon olmadan gerçekleşmektedir fakat çeşitli enflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif ve travmatik hastalıklar kornea neovaskülarizasyonuna sebep olabilmektedir (Tablo 2.1) (5,6,22,28,32).

Tablo 2.1. Kornea neovaskülarizasyonu ile ilişkili hastalıklar

İnflamatuvar hastalıklar	Enfeksiyöz keratitler	Dejeneratif-Konjenital Hastalıklar	Travmatik-İyatrojenik Hastalıklar
Oküler pemfigoid Atopik konjonktivit Korneal doku reddi Lyell sendromu Stevens- Johnson sendromu Graft versus host hastalığı	Viral: Herpes simpleks, herpes zoster Bakteriyel: Psödomonas, klamidy, sifiliz Fungal: Kandida, fuzariyum, aspergillus Parazitik: Onkoserkiyazis	Pterijiyum Terrien'in marjinal dejenerasyonu Aniridi	Kontakt lensler Alkali yanık Kornea ülserasyonu Limbal kök hücre yetmezliği

Önemli bir oküler komplikasyon olan kornea neovaskülarizasyonu korneada ödem, lipid birikimi, skar ve enflamasyona sebep olabilmekte ve görme keskinliği azaltmaktadır (22). Neovaskülarizasyon meydana gelen korneada; damarlarda dolaşan kan hücrelerinin meydana getirdiği opasite, damar duvar yapısından dolayı ışık sapmaları olması, damarlar arasındaki kollajen yapının ve stabilitenin bozulması, geçirgen damarlar etrafında sıvı ve lipid birikimi, kornea düzensizliği gibi nedenlerden dolayı görme keskinliği düşmektedir (6,11,33).

Genel populasyon için neovaskülarizasyon ile en sık ilişkili durum kontakt lens kullanımınıdır (34). Etiyolojisinde hipoksi varlığı bilinmektedir (3,34). Korneanın immünolojik hastalıklarında anjiyojenik faktörler salınımı arttığından mütevelliit korneada neovaskülarizasyon oluşmaktadır (5,11,35).

Kornea neovaskülarizasyonu üç şekilde meydana gelmektedir (11). Birincisi yüzeysel neovaskülarizasyon, ikincisi vasküler pannus, üçüncüsü derin neovaskülarizasyon şeklinde oluşmaktadır (6,11,36). Yüzeysel neovaskülarizasyon korneada travma, hafif kimyasal yanık, enflamasyon ve enfeksiyonlarda görülür, damarlar yüzeysel marjinal arkuattan köken alır. Vasküler pannusta limbustan periferik korneaya kollajen ve damarlar uzanmaktadır, kontakt lens kullanımında görülebilmektedir. Ciddi ön segment hastalıklarında derin neovaskülarizasyon görülebilmektedir. Neovaskülarizasyon Bowman tabakasından Descemet zarına kadar herhangi bir seviyede izlenebilmektedir (6,11,33,37,38).

2.3. Kornea Neovaskularizasyonunun Moleküler Temelleri

Korneanın damarsız yapısının sağlanmasında anjiyojenik faktör seviyelerinin düşük, anti-anjiyojenik faktör seviyelerinin yüksek olması temeldir. Bu denge anjiyojenik faktörler tarafına kaydığında neovaskularizasyon meydana gelmektedir (Tablo 2.2) (6,11,22,31,36).

Tablo 2.2. Anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler

Anjiyojenik Faktörler	Anti-anjiyojenik Faktörler
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Endostatin
Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)	Anjiyostatin
Plasental büyüme faktörü (PGF)	Prolaktin
Transforme büyüme faktörü- α (TGF- α)	Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri
Transforme büyüme faktörü- β (TGF- β)	(TIMP)
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)	Trombospondin
Leptin	Arresten
İntegrinler	Kanstatin
Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	Tumstatin
Matriks metalloproteinazlar (MMPs)	Pigment epiteli kaynaklı faktör (PEDF)
Anjiyojenin	İnterlökin-4 (IL-4)
Hepatosit büyüme faktörü (HGSF)	İnterlökin-13 (IL-13)
Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)	
Bağ doku büyüme faktörü (CTGF)	
İnterlökin-8 (IL-8)	
Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)	

VEGF özellikle endotel hücrelere spesifik etkilere sahip olan çok fonksiyonlu bir büyüme faktörü ailesidir (39). Endotel hücresinde proliferasyon, migrasyon ve diferensiasyona neden olmaktadır (40). VEGF ekspresyonu embriyonik, fizyolojik ve patolojik damar oluşumu ile paralellik göstermektedir (41). VEGF ailesinde VEGF-A (Human VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F VE PIGF (Plasental büyüme faktörü) bulunmaktadır (42–44). VEGF-A aynı zamanda insan VEGF'ü olarak bilinmektedir (45). VEGF-A bilinen altı farklı izoformdan oluşan bir peptid ailesidir (VEGF¹²¹, VEGF¹⁴⁵, VEGF¹⁶⁵, VEGF¹⁸³, VEGF¹⁸⁹, VEGF²⁰⁶) (46–49). VEGF-A, Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGF-R) 1 ve 2'ye bağlanarak anjiyojeneziste önemli rol alır (50). VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiyojenez ve anjiyojenez farklı

reseptörlere bağlanarak regule eder (51,52). Enflamasyon ve hipoksi durumlarında VEGF'nün yükseldiği bilinmektedir. VEGF üretimi çoğunlukla makrofajlar, T hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, astrositler ve düz kas hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. VEGF anjiyojenезisin proteolitik aktivitelerinde, orijinal damarların membranlarının eritilmesinde, endotel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunda, kapiller tüp oluşumunda olduğu gibi birçok basamağı aktive etmektedir. VEGF'nün korneada neovaskülarizasyon sürecinde anjiyojenезisi indüklediği bilinmektedir (53,54).

2.4. Kornea Neovaskülarizasyonunda Tedavi

Kornea neovaskülarizasyonu görme keskinliğini ve bağlantılı olarak hastanın hayat kalitesini düşürmektedir. Medikal ve cerrahi tedavi seçenekleri ile tedavi edilmesi gereken klinik bir durumdur. Tablo 2.3'te uygulanan ve çalışılmakta olan tedavi seçenekleri belirtilmiştir (6,13,14,28,55–71).

Tablo 2.3. Kornea neovaskülarizasyonunda medikal ve cerrahi tedavi seçenekleri

Medikal Tedavi	Cerrahi Tedavi
Steroidler	Argon lazer fotokoagülasyon
Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)	Elektrokoagülasyon
1-25(OH) D3	Fotodinamik tedavi
Platelet aktive edici faktör (PAF)	Limbal transplantasyon
Siklosporin A	Amniyotik membran transplantasyonu
FK 506	Konjonktival transplantasyon
Talidomid	
Prolaktin	
Curcumin	
Ras farnesil transferaz inhibitörleri	
Metotreksat	
Anti- VEGF ajanlar	
IL-1 reseptör antagonistleri	

2.4.1. Kornea Neovaskülarizasyonunda Cerrahi Tedavi

Kornea neovaskülarizasyonunun gerilemesinde cerrahi tedavi iki ana gruba ayrılmaktadır. Birincisi korneada damarları tıkamak amacıyla yapılan argon lazer, elektrokoagülasyon ve fotodinamik tedavi gibi seçeneği bulunduran grup, ikincisi

konjonktival limbal greft ve amniyotik membran transplantasyonu, konjonktival transplantasyon gibi oküler yüzeyi düzeltmeyi amaçlayan gruptur. İkinci grupta amaç kök hücre hasarını tedavi ederek kronik anjiyojenik uyarıyı azaltmaktır (10,28,60,68,72–80).

2.4.2. Kornea Neovaskülarizasyonunda Medikal Tedavi

Topikal kortikosteroidler kornea neovaskülarizasyonunda kullanılmakta olan tedavi seçenekleri arasındadır. Steroidlerin anti-anjiyojenik etkilerinin anti-inflamatuvar etkilerinin sonucu olduğu düşünülmektedir. İnflamatuvar hücre kemotaksisi ve proinflamatuvar sitokin sentezi steroidler tarafından baskılanmaktadır. Steroidlerin direk olarak damar endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu da inhibe ettiği bilinmektedir (62,81–84).

Kornea yara iyileşmesi ve anjiyoenez sırasında prostoglandinler aktif olarak üretilmektedir. Bunların sentezini inhibe eden siklooksijenaz ve fosfolipaz A2 inhibitörleri (Non steroid anti inflamatuvarlar veya steroidler) anjiyoenezisi önemli ölçüde azaltmaktadır (62,82,85,86).

IL-1 reseptör antagonisti, oktreotid, siklosporin A, FK 506, plazminojen fragmanları, spirinolakton, talidomid, amilorid, curcumin, PAF antagonisti gibi bir çok molekülün kornea neovaskülarizasyonunda anti anjiyojenik tedavide etkinliği olduğu bilinmektedir. Ancak medikal tedavide genel olarak tedavi aktif anjiyoeneziste etkili olduğu için cerrahi tedavi seçeneği araştırmaları da devam etmektedir. Araştırmalarda amaçlardan biri de penetran keratoplastiye gidişi engellemek değil, aynı zamanda keratoplastinin başarı oranını artırmak ve ömrünü uzatmaktır (35,57,60,63–65,71,78,87–91).

Anti VEGF stratejiler yeni damar oluşumunu yavaşlatmakta ve anjiyoenezisi durdurmakta etkili görünmektedir. Ranibizumab (Lucentis[®], Genentech) ve Pegaptanib sodyum (Macugen[®], Eyetech Pharmaceuticals) göz hastalıkları için onaylanmış ve kullanımda olan anti-VEGF ilaçlardır. Bevasizumab (Altuzan[®], Roche, San Fransisko, ABD) ise ilerlemiş kolorektal kanserlerin tedavisi için intravenöz kullanımı FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış bir anti-anjiyojenik ilaçtır. Ranibizumab yüksek affiniteli bir antikor fragmanıdır. Pegaptanib sodyum VEGF¹⁶⁵'i spesifik olarak inhibe eden bir aptamerdir. Aptamerler spesifik bir şekilde giren, bir antikor gibi davranarak hücre dışı hedeflere yüksek afinite ile bağlanan kimyasal olarak sentezlenmiş oligonükleotidlerdir. Her iki bileşim de güvenli ve iyi tolere edilebilir görünmektedir.

Bevasizumab, insan VEGF-A izoformuna spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal IgG1 antikorudur. Bevasizumab, VEGF-A'nın bütün izoformlarına bağlanır. Bevasizumab, VEGF'nün damar endotel hücrelerinin yüzeyindeki VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanmasını inhibe ederek damar oluşumunu baskılar. Bevasizumabın 'onay dışı' (off label) kullanımlarda ve çalışmalarda, yaşa bağlı eksudatif maküla dejenerasyonu, santral retinal ven tıkanıklığına bağlı maküler ödem, diyabetik retinopati, neovaskülarizasyonla seyreden retina ve koroid hastalıkları, üveite bağlı gelişen maküla ödeminde etkili olduğu bildirilmektedir. Bu üç anti-VEGF ajanın oküler uygulamalarda neovaskülarizasyon gerilemesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bevasizumabın kornea neovaskülarizasyonundaki etkinliği ise son yıllarda araştırılmakta olup, bu amaçla yapılan klinik çalışma ve hayvan modellerinde subkonjonktival ve topikal kullanım ile kornea neovaskülarizasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (92–104).

Çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel kornea neovaskülarizasyonunda farklı dozlarda uygulanan subkonjonktival bevasizumabın inhibisyon etkisini karşılaştırmayı ve değerlendirmeyi amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Deneysel Çalışma Etik Kurulu onayıyla, Deneysel Çalışma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. (Onay no: DA 15/11)

3.1. Hayvan Modeli

Çalışmamızda ağırlıkları 350-450 gram arasında değişen erişkin 30 adet erkek Sprague- Dawley cinsi rat kullanıldı. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (22°C) tutuldular. Tüm denekler standart palet rat yemi ile beslendi, şebeke suyu kullandı ve düzenli olarak deneklerin kafes bakımları yapıldı. İşlemler topikal anestezi olarak %0.5 proparakaine (Alcaine[®], Alcon, Puurs, Belçika) ek olarak 50mg/kg intramusuler ketamin hidroklorid ile sedasyon altında yapıldı. Her hayvanın sağ korneasının santrali korneal neovaskülarizasyon modeli oluşturmak için %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubuk (HemoStop; Hizmet Medikal, İstanbul) ile mikroskop altında 10 saniye kimyasal olarak koterize edildi (Şekil 3.1). Daha sonra konjonktiva ve forniksler 10 ml dengeli tuz solusyonu ile yıkanarak fazla kimyasal koterizasyon materyali uzaklaştırıldı. Bütün işlemler aynı araştırmacı tarafından (BU) uygulandı ve takip edildi.



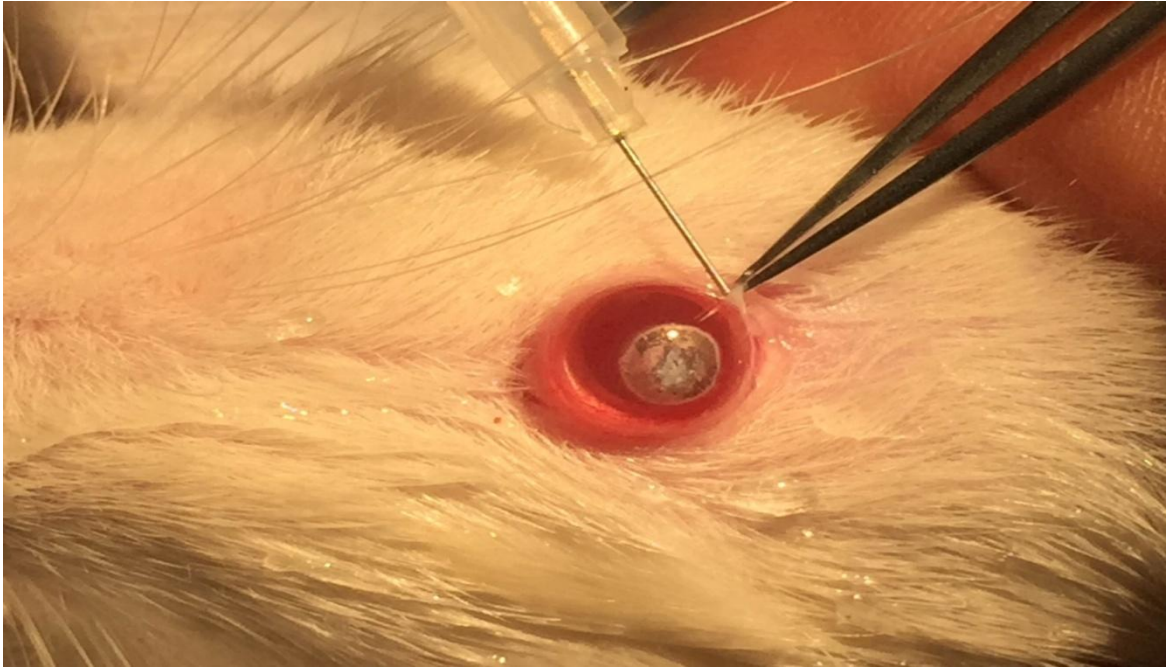
Şekil 3.1. Deney hayvanının sağ gözünde kimyasal koterizasyon uygulanımı

Koterizasyon sonrası ratlar rasgele 3 gruba ayrıldı;

Grup 1 (kontrol grubu) (n=10): 0,05 ml subkonjonktival %0,9 NaCl çözeltisi 1. günde bir doz uygulandı.

Grup 2 (tek doz tedavi grubu) (n=10): 0,05 ml subkonjonktival bevacizumab (1,25 mg) (Altuzan[®], Roche, San Fransisko, ABD) 1. günde bir doz uygulandı.

Grup 3 (çoklu doz tedavi grubu) (n= 10): 0,05 ml subkonjonktival bevacizumab (1,25 mg) (Altuzan[®], Roche, San Fransisko, ABD) 1., 3., 5. ve 7. günde birer doz uygulanacak şekilde toplam dört doz uygulandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deney hayvanına subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu uygulanımı

Uygulamalara bütün gruplarda koterizasyondan hemen sonraki aynı gün (1. gün) başlandı.

3.2. Biyomikroskopik Değerlendirme

Kimyasal koterizasyon sonrası ratların sedasyon altında 3. ve 9. günde biyomikroskopik muayeneleri yapıldı. Dokuzuncu gün muayenesinde ek olarak dijital fotoğraf makinesi ile korneaların fotoğrafları çekildi.

Üçüncü gün kornea yanık evrelemesi şu şekilde değerlendirildi:

Evre 0: Kornea yüzeyinden kabarık bül yok

Evre 1: Yüzeyden hafif kabarık küçük bül mevcut

Evre 2: Yüzeyden orta derece kabarıklık orta büyüklükte bül oluşumu

Evre 3: Büyük bül oluşumu

Biyomikroskopik muayeneler sırasında 9. gün ek olarak korneada opasite ve kornea ödemi sınıflandırması yapıp değerlendirildi.

Kornea opasitesi şu şekilde evrelendi:

Evre 0: Kornea tamamen şeffaf

Evre 1: Az puslu, iris ve pupil kolayca görülebiliyor

Evre 2: Az opak, iris ve pupil değerlendirilebiliyor

Evre 3: Opak, iris ve pupil zorla seçilebiliyor

Evre 4: Tamamiyle opak, pupil seçilemiyor

Kornea ödemi evrelemesi şu şekilde yapıldı:

Evre 0: Ödem yok

Evre 1: Ödem var ama az

Evre 2: Çok ödemli

Onuncu gün çekilen fotoğraflarda damarlarla kaplı kornea alanının tüm korneaya olan oranı hesaplandı. Bu hesaplamalar dijital bilgisayar imaj analizi programı kullanılarak (Topcon Image Net 2000, Itabashiku, Tokyo, Japonya) neovaskularize alanın (piksel²), toplam korneal alana bölünmesiyle elde edildi. Tüm ratlar 10. günde sakrifiye edildi.

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Onuncu gün sonunda 50mg/kg intramuskuler ketamin enjeksiyonu sonrası ratlar sakrifiye edildi, enükleasyon yapıldı. Enükleasyon sonrası fiksasyon yapıcı sıvının tüm globa girebilmesi için limbusun 1 mm gerisinden saat 3 ve 9 yönünde 27 gauge iğne ile globlar perfore edildi. Globlar %10 formaldehid içerisinde 24 saat muhafaza edildi. 24 saat sonra çıkarılarak parçalara ayrıldı. Daha sonra parafin içine gömülerek Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom ile boyanmak üzere her bir korneadan 5 mikronluk 10 kesit alındı. En iyi kesitlerden mikroskop altında 400 kat büyütülmüş şekilde limbustan santrale doğru ardışık 5 kadrana incelendi. Mikroskopik görüntülerin fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraflar vasıtasıyla aynı kornea alanına denk gelen eşit kornea alanındaki içinde eritrosit görülen kan damarı sayısı, inflamasyon karşılaştırması, kollajen düzeni karşılaştırması yapıldı. İnflamasyon yoğunluğunu ve kollajen düzenini değerlendirmek için 0'dan 2'ye kadar skala oluşturuldu.

İnflamasyon Yoğunluğu:

Evre 0: İnflamasyon yok

Evre 1: Hafif-orta şiddette inflamasyon

Evre 2: Şiddetli inflamasyon

Kollajen Düzeni:

Evre 0: Düzenli

Evre 1: Hafif ayrılmalar, minimal bozulma

Evre 2: Şiddetli Bozulma

3.4. İstatistiksel Analiz

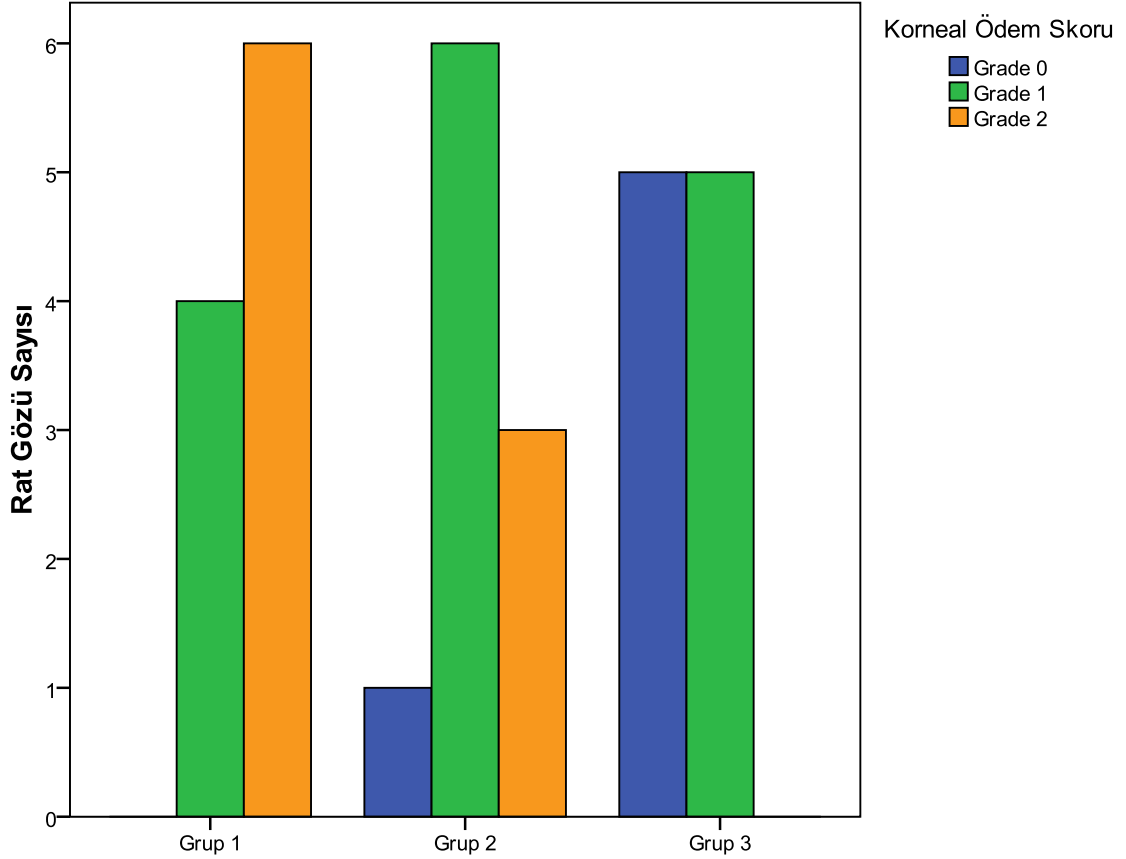
İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS 17.0 for Windows) programı ile yapıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (SS) (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin (Kornea yanık evrelemesi, kornea opasitesi, kornea ödemi, kornea enflamasyonu, kollajen düzeni) karşılaştırılmasında Ki Kare testi ya da Fisher testi kullanıldı. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin (Kornea neovaskülarizasyonu yüzdesi, damar sayısı) karşılaştırılmasında Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel anlam düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Biyomikroskopik Bulgular

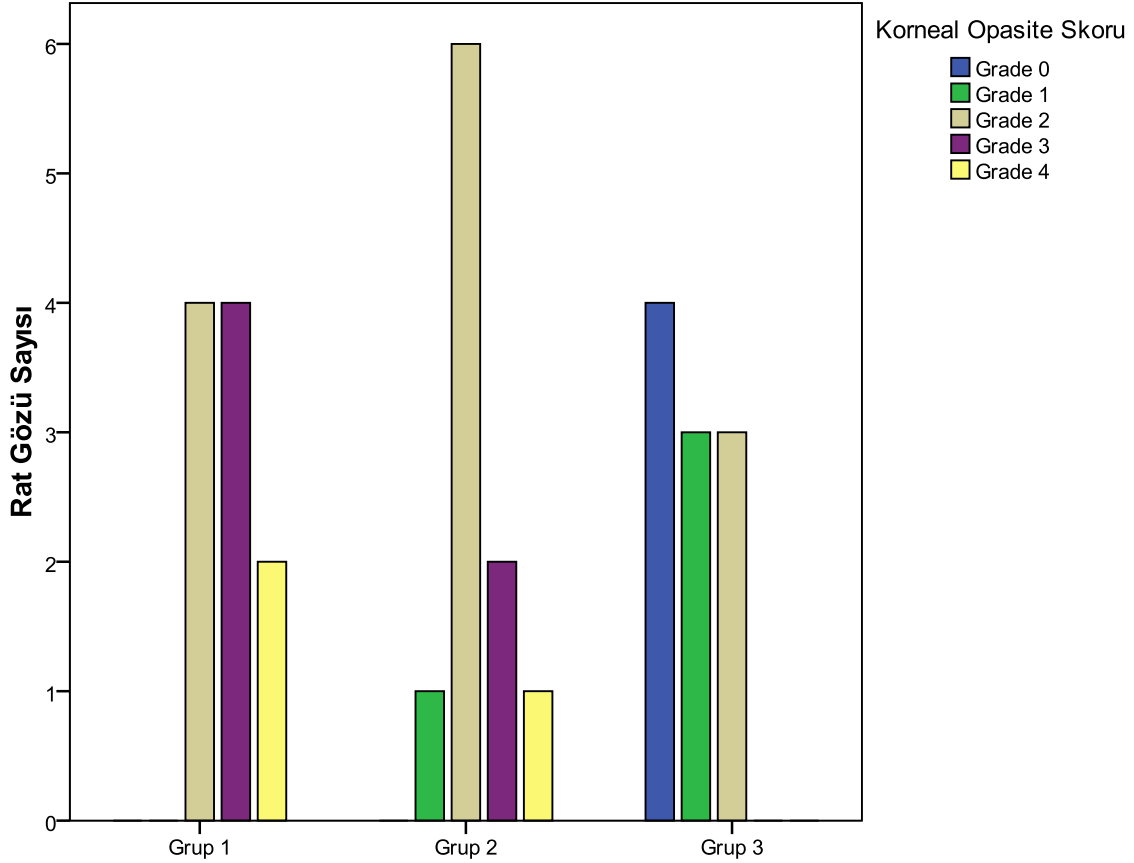
Kornea yanık değerlendirilmesine bakıldığında bütün ratların Evre 3 ve Evre 4 olduğu gözlemlendi ve bütün denekler değerlendirmeye alındı. Gruplar arasında ortalama kornea yanık evre derecesi açısından anlamlı bir fark izlenmedi. ($p>0.05$).

Deneklerin dokuzuncu günde yapılan muayenesinde belirlenen kornea ödemi evrelemeleri şekil 4.1'de gösterilmiştir. Kornea ödemi skoru çoklu doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 3), kontrol grubu (Grup 1) ve tek doz bevasizumab uygulanan gruba (Grup 2) göre anlamlı şekilde düşük saptandı ($p=0,002$, $p=0,035$, sırasıyla grup 1 ve grup 2 ile grup 3'ün karşılaştırılması). Tek doz bevasizumab uygulanan grup (Grup 2) ile kontrol grubu (Grup 1) karşılaştırıldığında kornea ödemi evrelemesi tek doz bevasizumab uygulanan grupta daha düşük izlenmesine rağmen, istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmedi ($p=0,218$).



Şekil 4.1. Dokuzuncu gündeki biyomikroskopik muayenede kornea ödemi skorlaması

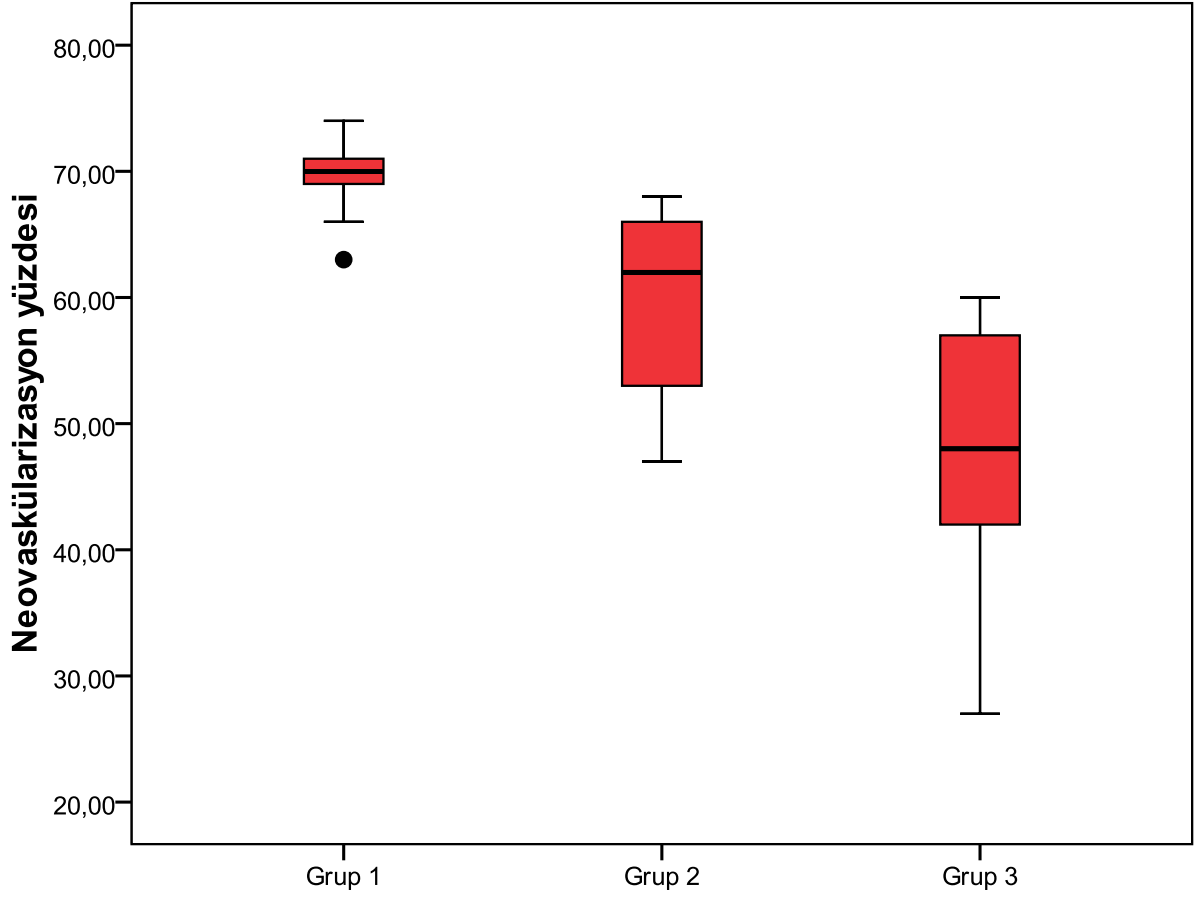
Yapılan kornea opasitesi evrelemesinde değerlendirmeler şekil 4.2’de gösterilmiştir. Çoklu doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 3) kornea opasitesi skor değerlendirmesi, kontrol grubu (Grup 1) ve tek doz bevasizumab uygulanan gruba (Grup 2) göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$). Tek doz bevasizumab uygulanan grupta kornea opasite değerlendirmesinde skorlar kontrol grubuna göre düşük izlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p=0,218$).



Şekil 4.2. Kornea opasitesi skorlaması

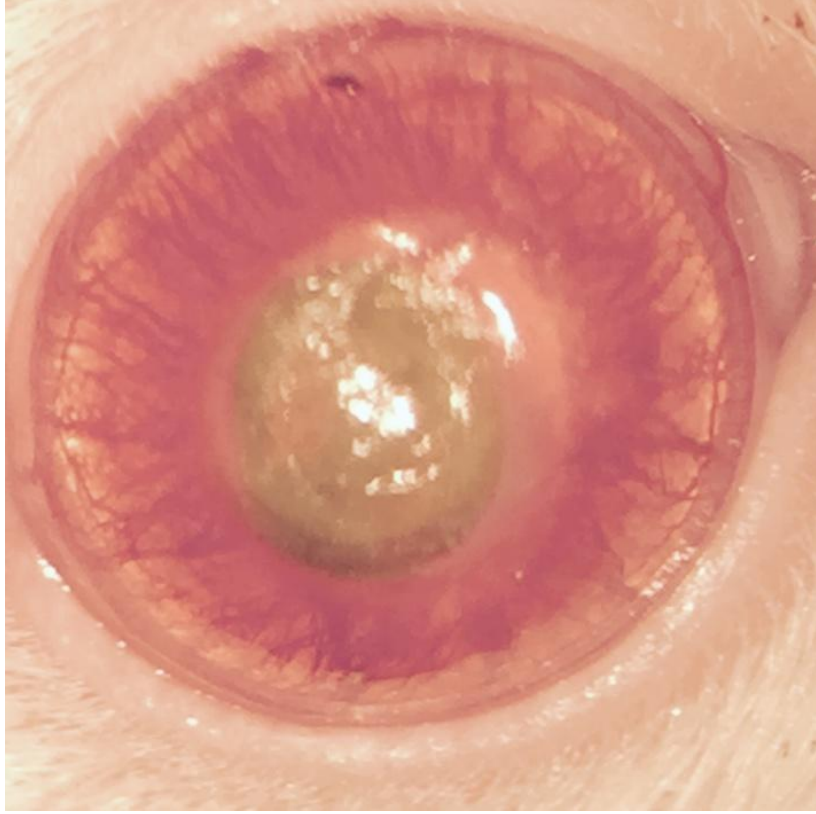
Kornea neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına oranı yüzdeleri şekil 4.3’te gösterilmiştir. Ortalama neovaskülarizasyon gelişen kornea alanı kontrol grubunda (Grup 1) % $68,1\pm5,3$ (Ortalama \pm SS), tek doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 2) % $59,8\pm7,3$, çoklu doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 3) % $47,2\pm10,2$ olarak bulundu. Ortalama kornea neovaskülarizasyon alanı karşılaştırıldığında tek doz ve çoklu doz bevasizumab uygulanan gruplar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı ($p=0,004$, $p=0,0001$, sırasıyla grup 2 ve grup 3’ün grup 1 ile karşılaştırılması). Bevasizumab uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde çoklu doz bevasizumab

uygulanan grupta (Grup 3) korneadaki neovaskülerize alan, tek doz bevasizumab uygulanan gruba (Grup 2) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük izlendi ($p=0,005$).

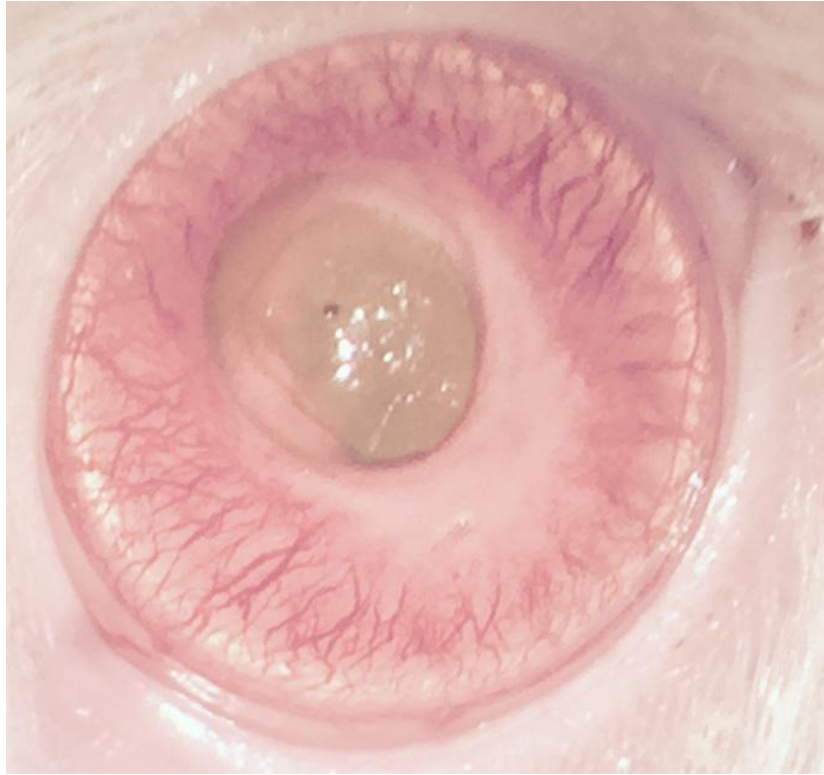


Şekil 4.3. Korneada neovaskülarizasyon görülen alanların oranları

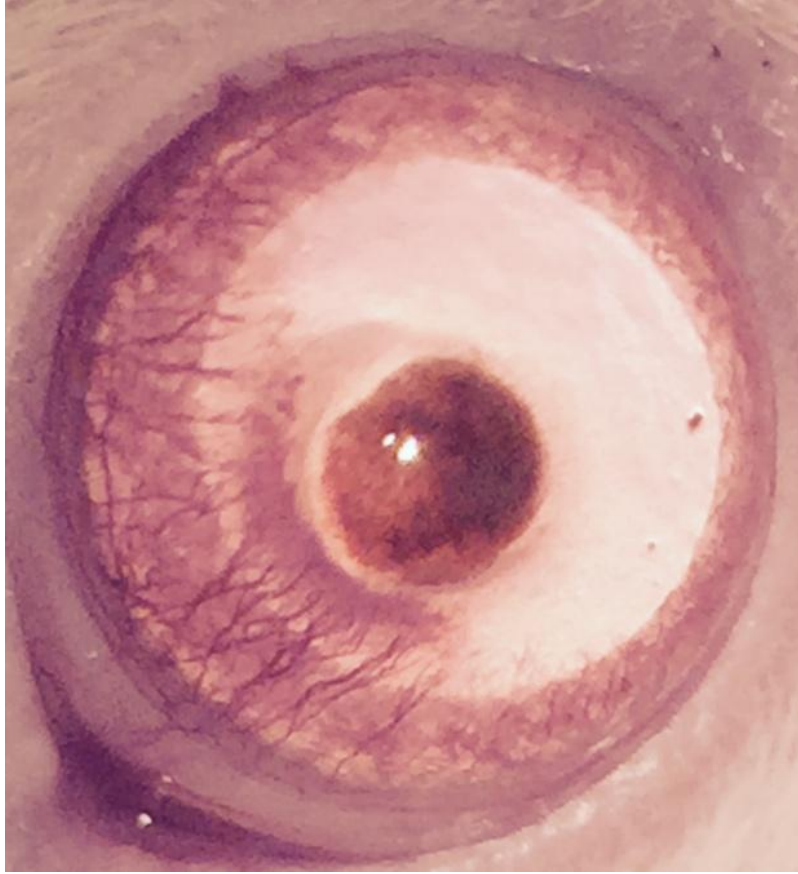
Deneklerin ameliyat mikroskobu altında çekilen fotoğrafları Şekil 4.4-4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.4. Grup 1’de (kontrol grubu) dokuzuncu gün çekilen fotoğrafta korneadaki neovaskülarizasyon



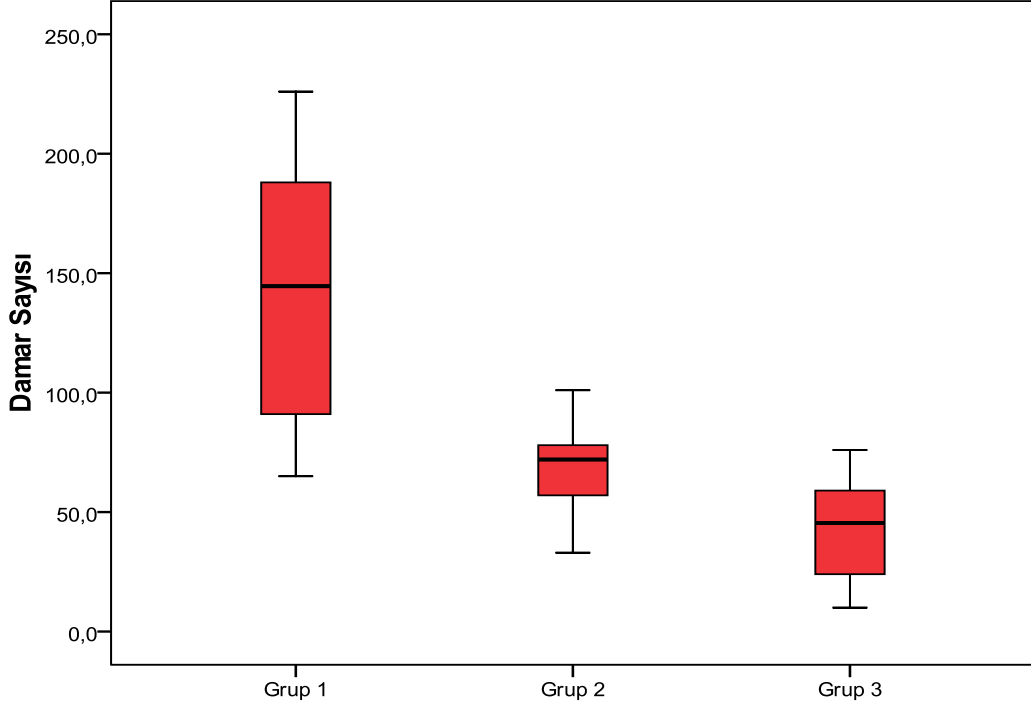
Şekil 4.5. Grup 2’de (1,25 mg/0,05cc subkonjonktival bevasizumab uygulanan grup) dokuzuncu günde çekilen fotoğrafta korneadaki neovaskülarizasyon



Şekil 4.6. Grup 3'te (4 doz 1,25 mg/0,5 cc subkonjonktival bevasizumab uygulanan grupta) dokuzuncu günde çekilen fotoğrafta korneadaki neovaskülarizasyon

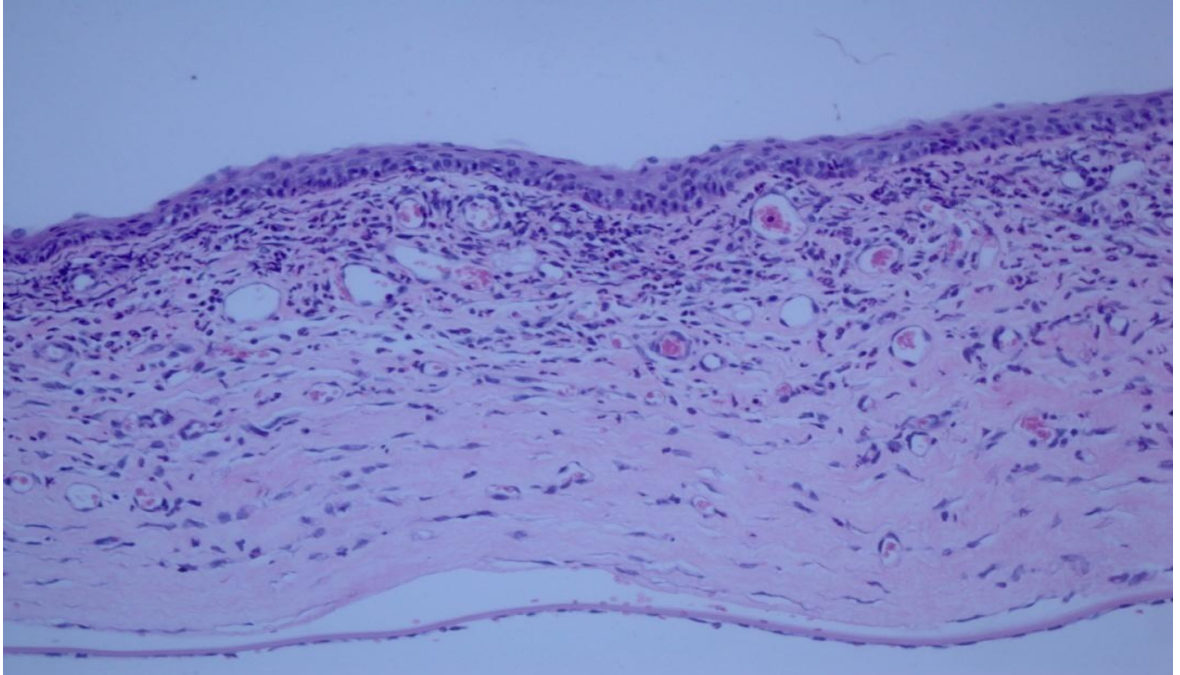
4.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik kesitlerde gruplarda içinde eritrosit görülen damar sayısı değerlendirmesi şekil 4.7'de gösterilmiştir. Yapılan değerlendirmede eritrosit görülen damar sayısı, kontrol grubunda (Grup 1) $145,1 \pm 55,0$ (Ortalama \pm SS), tek doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 2) $69,5 \pm 20,6$, çoklu doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 3) $43,7 \pm 22,6$ olarak saptandı. Kontrol grubuna göre damar sayıları karşılaştırıldığında, tek ve çoklu doz bevasizumab uygulanan gruplarda damar sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0,005$; $p=0,0001$, sırasıyla grup 2 ve 3'ün grup 1 ile karşılaştırılması). Tedavi grupları kendi içinde karşılaştırıldığında çoklu doz bevasizumab uygulanan grupta (Grup 3), tek doz bevasizumab uygulanan gruba (Grup 2) göre damar sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı ($p=0,019$).

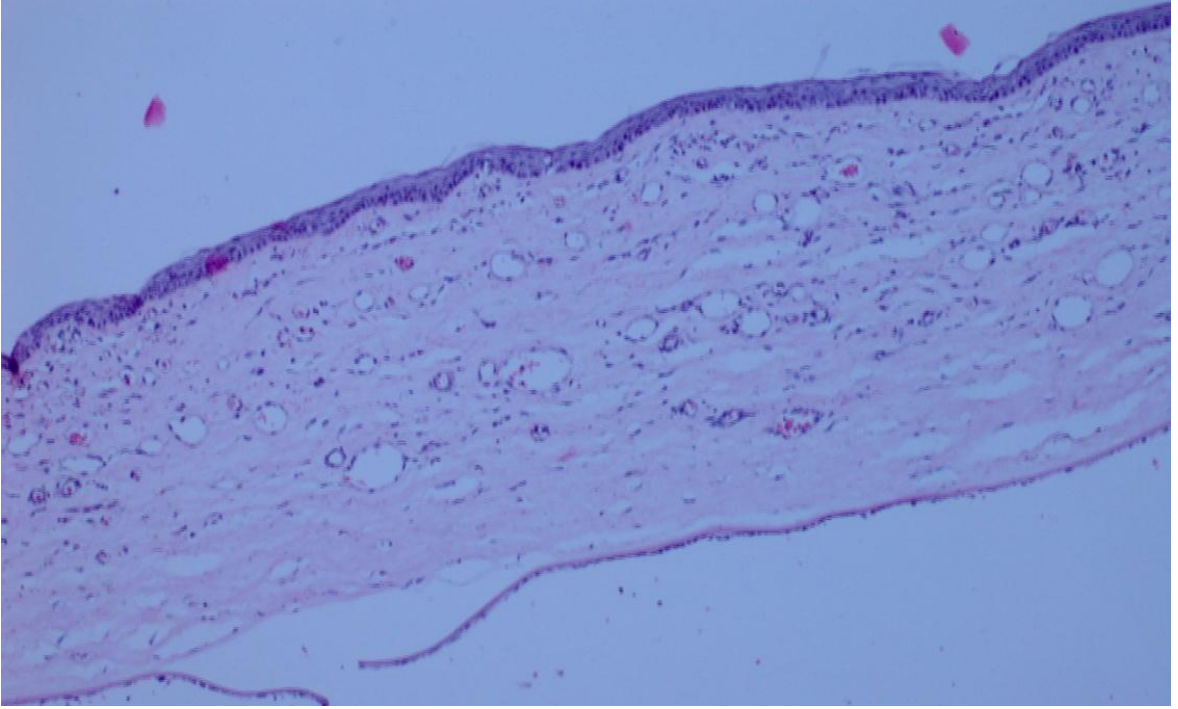


Şekil 4.7. Damar sayıları

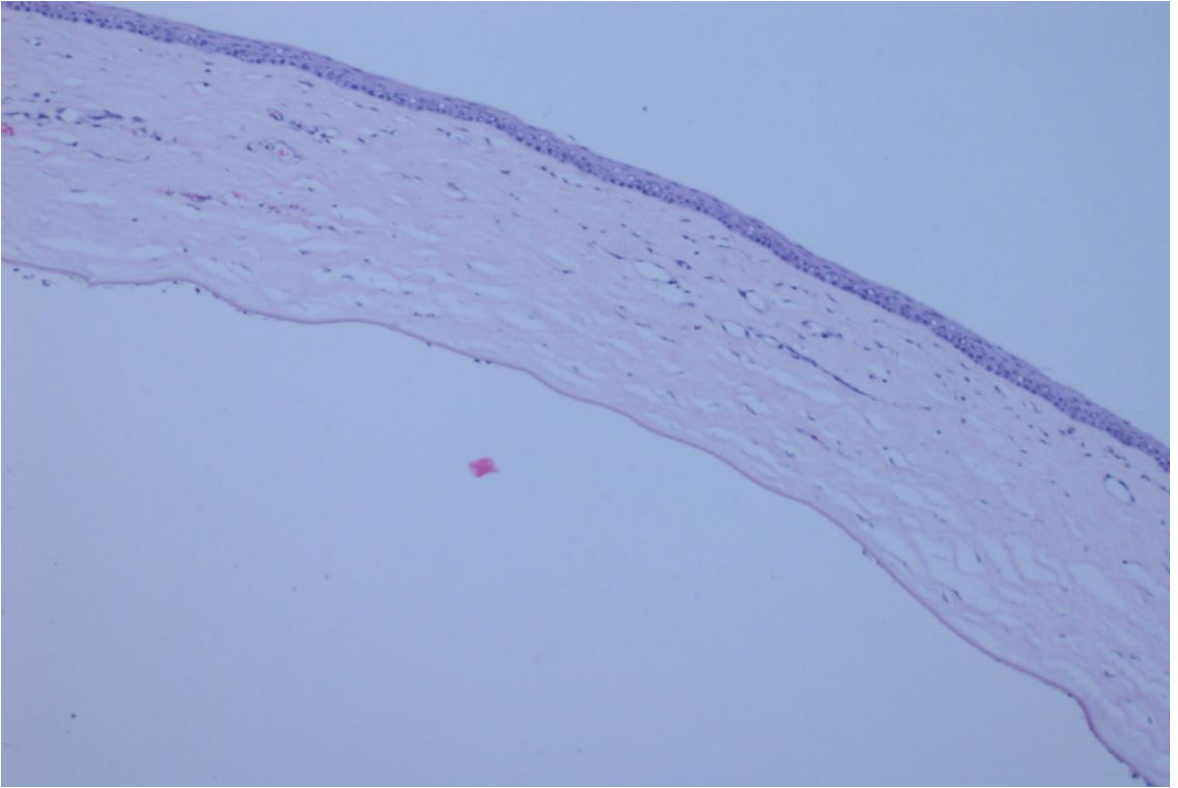
Deney hayvanlarının gözünden 10. günde alınan korneanın limbusla santral korneaya eşit mesafede olan bir alanın Hematoksilen Eozin ile boyanmış kesitinin histopatolojik incelenmesi Şekil 4.8- 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.8. Grup 1 (Kontrol grubu) 10. günde kornea kesiti histopatolojik görüntüsü (Hematoksilen Eozin x200)

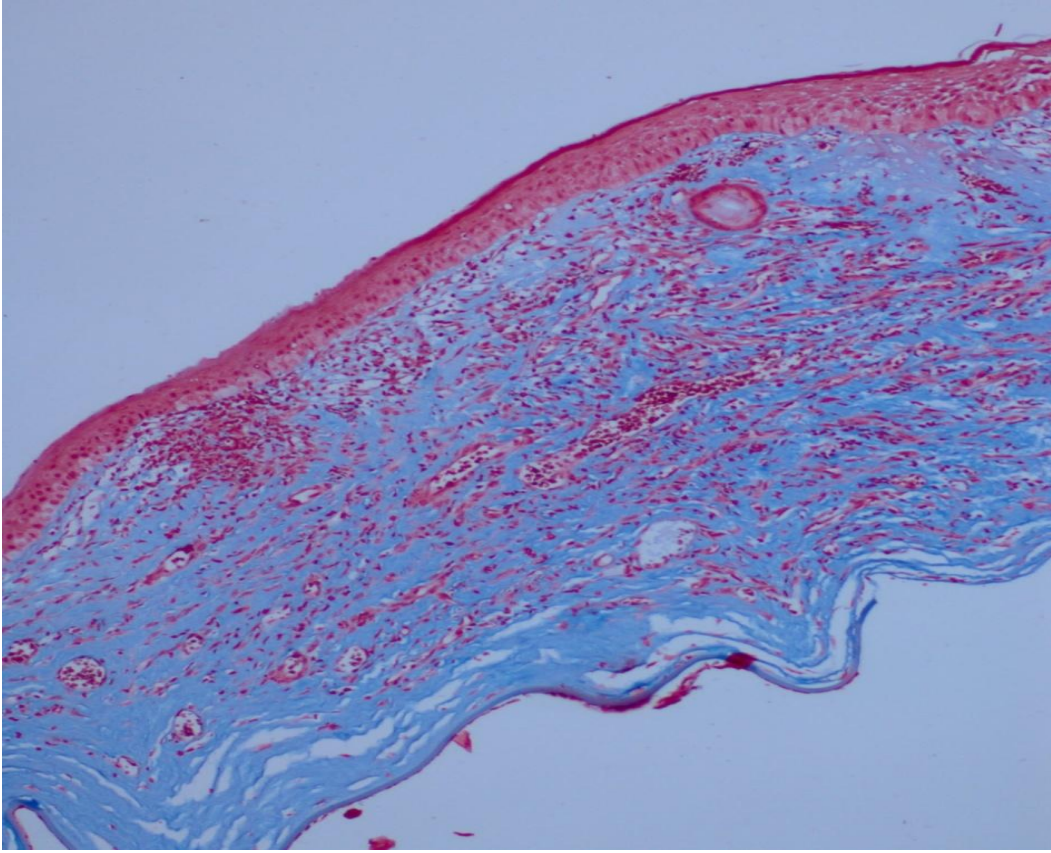


Şekil 4.9. Grup 2 (Tek doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea kesitinin histopatolojik görüntüsü (Hematoksilen Eozin x200)

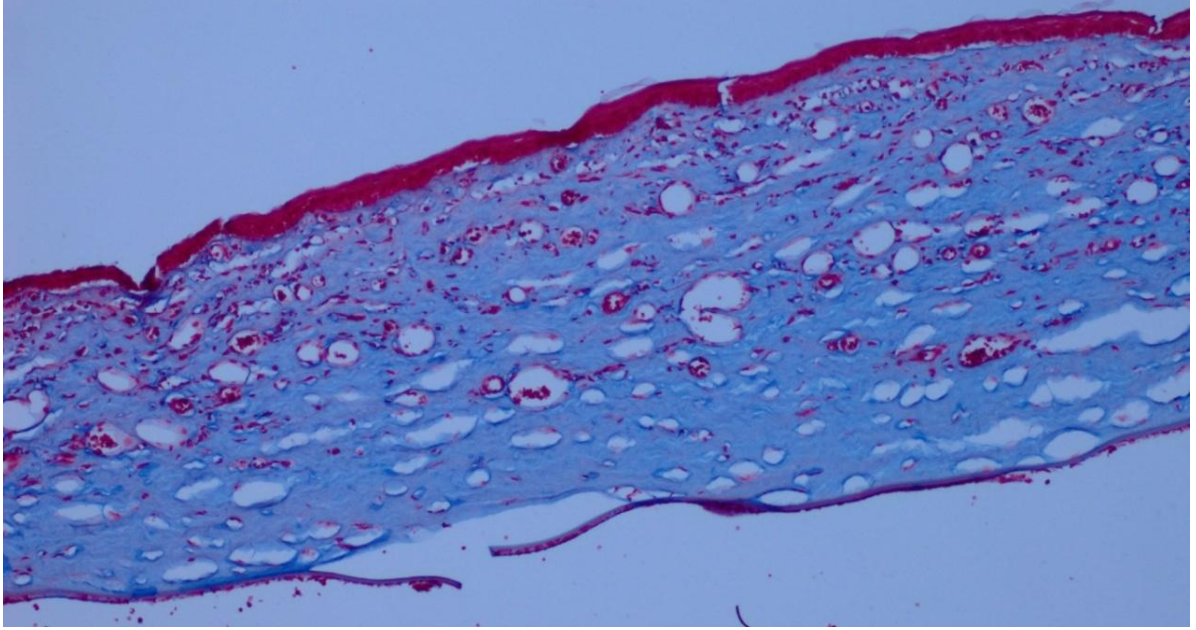


Şekil 4.10. Grup 3 (Çoklu doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea kesitinin histopatolojik görüntüsü (Hematoksilen Eozin x200)

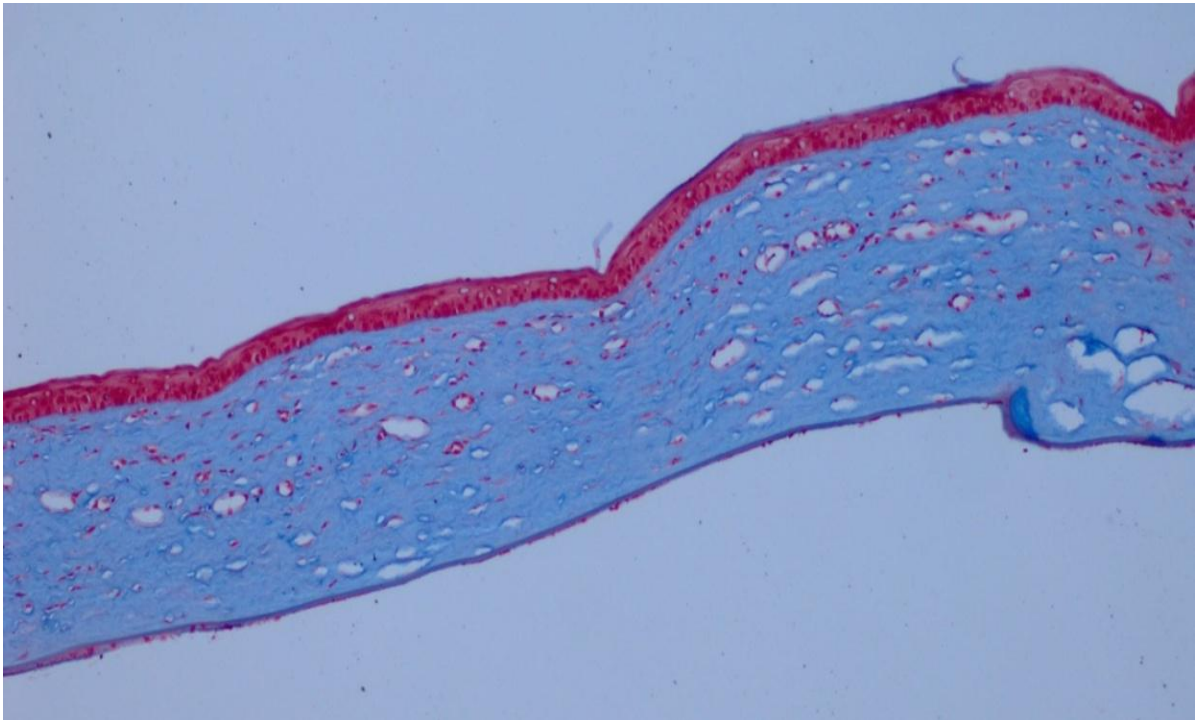
Masson Trikrom ile boyamada yapılan kollajen düzeni değerlendirmesinde kontrol grubunda, epitel altındaki bölgede, hematoksilen eozin boyama ile uyumlu olarak, kollajen liflerin düzeninin bozulduğu ve bu alanlarda ödem olduğu gözlemlendi. Subkonjonktival bevasizumab uygulanan gruplarda ise kollajen liflerin daha düzenli olduğu görüldü, ancak yapılan skorlamada istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$). Deney hayvanlarının kornea kesitlerinin Masson Trikrom ile boyamada yapılan kollajen düzeni değerlendirilmesi şekil 4.11-4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Grup 1'de (Kontrol grubu) 10. günde kornea histopatolojik kesitinde kollajen düzeni değerlendirilmesi (Masson Trikrom x200).



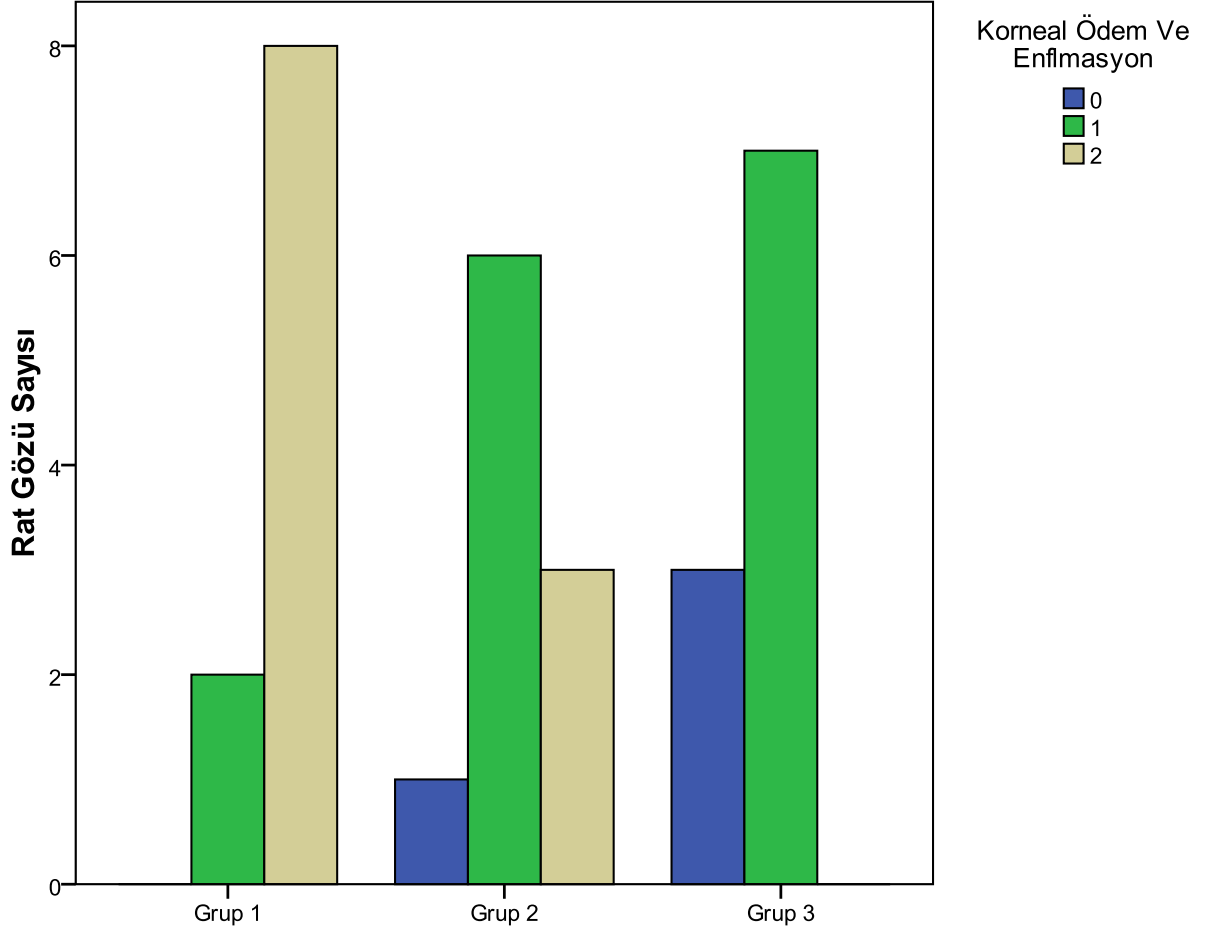
Şekil 4.12. Grup 2’de (Tek doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea histopatolojik kesitinde kollajen düzeni değerlendirilmesi (Masson Trikrom x200).



Şekil 4.13. Grup 3’te (Çoklu doz bevasizumab uygulanan grup) 10. günde kornea histopatolojik kesitinde kollajen düzeni değerlendirilmesi (Masson Trikrom x200).

Histopatolojik çalışmada enflamasyon ve ödem değerlendirmesi şekil 4.14’de gösterilmiştir. Tek doz bevasizumab uygulanan grubun (Grup 2) enflamasyon skoru kontrol grubuna (Grup 1) göre düşük izlenmiş olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak

anlamli bulunmamıştır (p=0,072). Çoklu doz bevasizumab uygulanan grup (Grup 3) kontrol grubuyla (Grup 1) enflamasyon skoru açısından karşılaştırıldığında, çoklu doz bevasizumab uygulanan grupta enflamasyon skorunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu izlenmiştir (p=0,001). Tedavi grupları karşılaştırıldığında çoklu doz tedavi grubunda (Grup 3) enflamasyon skorunun tek doz tedavi grubuna (Grup 2) göre düşük izlendiği, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (p=0,130).



Şekil 4.14. Enflamasyon ve ödem değerlendirme

5. TARTIŞMA

Korneada çeşitli hastalıklar veya travma sebebi ile gelişen enflamasyon, zaman içerisinde ödem, korneada bulanıklık ve skarlaşma beraberinde neovaskülarizasyon gelişimine, şeffaflığın azalmasına ve görmeye azalmaya yol açabilir. Kornea neovaskülarizasyonu sonucunda oluşan görme keskinliğinde azalma önemli bir halk sağlığı problemidir. Kornea neovaskülarizasyonu etiyojisinde birçok enfeksiyöz, enflamatuvar, dejeneratif hastalık, travma ve hipoksi görülebilir, bu gibi sebeplerin sonucunda normalde şeffaf ve damarsız olan korneada neovaskülarizasyon gelişebilir. Oluşan bu yeni damarlar opasiteye neden olarak görme keskinliğinde azalmaya yol açabilirler. Bu durumda görme kaybını azaltmak amacıyla oluşan yeni damarlanmaları önlemek, durdurmak ve geriletmek amacıyla tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır (1,3–6,24,28,38,105).

Günümüzde birçok tedavi yöntemi kornea neovaskülarizasyonunda uygulanmaktadır. Kortikosteroid, non steroid anti-inflamatuvarlar, IL-1 reseptör antagonisti, oktreotid, siklosporin A, FK 506, plazminojen fragmanları, spirinolakton, talidomid, amilorid, curcumin gibi ajanlar medikal tedavide kullanılmaktadır (28,35,55,62–65,71,82,85–89,106). Medikal tedavinin yanında lazer fotokoagulasyon, fotodinamik tedavi, konjonktival limbal transplatasyon, amnion zarı transplantasyonu gibi cerrahi yöntemler de kornea neovaskülarizasyonunda tedavi seçenekleri arasında görülmektedir (10,28,68–70,72,73,78,80). Yoon ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel çalışmada tavşanlarda oluşturulan korneal neovaskülarizasyon modelinde verteporfin kullanılarak yapılan fotodinamik tedavi ile anti-anjiyojenik etkinlik araştırılmıştır. Tavşanlarda sutur ile indüklenen kornea neovaskülarizasyon modelinde tedavi grubuna verteporfin ile fotodinamik tedavi uygulanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda korneadaki neovaskülarizasyon alanında anlamlı derecede azalma izlenmiştir (79). Ancak, bu tedavi pahalı olduğu ve ekipman gerektirdiği için her klinikte uygulanamamaktadır.

Kortikosteroidler de kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde kullanılmakta olup, etkinlik mekanizmasına bakıldığında membran fosfolipidlerinden araşidonik asit oluşumu inhibisyonu ile prostoglandin ve lökotrien gibi enflamatuvar mediatörlerin baskılanmasına yol açmaktadır. Böylece kapiller geçirgenlik ve lökosit göçünü engelleyerek korneadaki neovaskülarizasyonun baskılandığı bilinmektedir. Kortikosteroidler kornea neovaskülarizasyonunda topikal, subkonjonktival ve sistemik olarak kullanılabilir (81–83,107–109). Murata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tavşan kornealarına bFGF

salgılayan granül yerleştirilmiş, tedavi grubu 4 tavşana subkonjonktival 2 mg triamsinolon asetonid uygulanmış, kontrol grubu 4 tavşana da subkononjonktival distile su uygulanmıştır. Yapılan değerlendirmede triamsinolon uygulanan grubun kontrol grubuna göre kornea neovaskülarizasyon alanının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az olduğu izlenmiştir (85). Kortikosteroidler kornea neovaskülarizasyonunda tedavi seçenekleri arasında tercih edilmelerine rağmen neovaskülarizasyon tedavisinde etkinliği ve yan etkileri açısından kullanımları kısıtlı olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda tedavide steroidler yerine bir anti-VEGF ajanı tercih ettik.

Kornea neovaskülarizasyonunda büyüme faktörleri de önemli rol oynamaktadırlar. Neovaskülarizasyon sürecinde anjiyojenik faktörlerin arttığı, anti-anjiyojenik faktörlerin ise azaldığı görülmektedir. VEGF hipoksi gibi çevresel faktörlerin uyarısı ile makrofajlar, T hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, düz kas hücreleri ve tümör hücrelerinden salgılanabilir (8,11,110–112). Kornea neovaskülarizasyonunda hem VEGF düzeyi hem de VEGF reseptör sayıları artmış olarak izlenmiştir (7). Bevasizumab, insan VEGF-A'sına spesifik bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal IgG1 antikordur. Bevasizumab, VEGF-A'nın bütün izoformlarına bağlanarak neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir. Bevasizumab, kornea neovaskülarizasyonunda topikal, subkonjonktival ve sistemik olarak değişik konsantrasyonlarda kullanılmıştır (18,113–116). Manzano ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ratlarda oluşturulan kornea yanık modeli sonrası kornea neovaskülarizasyonu baskılanmasında topikal %4'lük bevasizumabın etkinliğinin topikal %0,9'lük NaCl çözeltisine göre daha baskın olduğu izlenmiştir (117). Hosseini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, tavşanlarda kornea yanığı sonrası çalışma grubuna tek doz 2,5mg/0,1cc bevasizumab uygulanmış, kontrol grubuna ise subkonjonktival distile su uygulanmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında bevasizumab uygulanan grubun neovaskülarizasyon oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük izlenmiştir (118). Barros ve arkadaşlarının ratlarda uyguladıkları kornea neovaskülarizasyon modelinde bevasizumab etkinliği ve tedavi zamanlaması değerlendirilmiştir. Çalışmalarında ratlar kontrol grubu ile birlikte 4 farklı gruba ayrılmış, farklı zamanda aynı dozda (0,02 ml) bevasizumab uygulanmıştır. Birinci gruba yanık oluştuktan hemen sonra, ikinci gruba yanık oluştuktan sonra üçüncü günde, üçüncü gruba yanık oluştuktan sonra beşinci günde subkonjonktival bevasizumab uygulanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde neovaskülarizasyon inhibisyonu açısından üç grubun da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha etkili olduğu ve tedavi gruplarının

etkinliğinin istatistiksel açıdan birbirleri arasında anlamlı farklarının görülmediği gözlemlenmiştir (119). Papathanassiou ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada tavşanlarda korneada yanık oluşturulup neovaskülarizasyon modeli üzerinde çalışılmıştır. Yapılan uygulama ile deney grupları üzerinde bir gruba yanık oluşturulduktan hemen sonra, diğer bir gruba yanık oluşturulduktan 14 gün sonra 3,75 mg subkonjonktival bevasizumab uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre neovaskülarizasyonu baskılamada daha etkin olduğu, özellikle erken tedavi grubunda daha başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür (96). Hürmeriç ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada, kobaylarda deneysel kornea yanık modelinde erken ve geç olarak subkonjonktival tedavinin etkinliği araştırılmıştır. Erken ve geç tedavi grubunda, kontrol grubuna göre kornea neovaskülarizasyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az izlenmiştir. Erken tedavi grubunun korneadaki neovaskülarizasyonu inhibisyon etkinliği, geç tedavi verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha başarılı izlenmiştir (19). Biz de bu nedenle çalışmamızda tüm tedavi gruplarında yanık olduğu anda tedaviye başladık.

Yoeruek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tavşanlarda alkali yanık modeli oluşturularak topikal bevasizumab uygulanmıştır. Gruplardan birisine yanık oluştuktan hemen sonra diğerine 7 gün sonra tedavi başlanmış olup, yanık oluşumunda erken tedavi alan grupta neovaskülarizasyonun daha çok baskılandığı izlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda ödem ve opasite değerlendirmesi yapılmıştır. Kornea opasitesi değerlendirmesinde erken tedavi grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük skoru olduğu bildirilmiştir. Kornea ödemi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark izlenmediği saptanmıştır (120). Dursun ve arkadaşlarının ratlarda kimyasal koterizasyonla oluşturdukları neovaskülarizasyon modelindeki çalışmalarında bevasizumab ile tedavi edilen gruplarda korneada ödem ve opasite skorlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bildirilmiştir (121). Bizim çalışmamızda da subkonjonktival bevasizumab tedavisi uygulanan iki ayrı doz grubunda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kornea ödemi ve opasitesi skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptanmıştır.

Edelman ve arkadaşları ratlarda yaptığı çalışmada kornealarda kimyasal yanık oluşturulduktan 48 saat sonra VEGF mRNA ve proteinlerinin en yüksek seviyelerine ulaşabildiğini, 7. gün azalarak kontrol seviyesine düştüğünü saptamışlardır (122). Kim ve arkadaşlarının subkonjonktival uygulanan bevasizumab yarı ömürleri ile ilgili ratlarda

yaptıkları çalışmada, enjeksiyon sonrası bevasizumabın aköz hümörde ilk tespit edilmeye başlandığı zamanın 12. saat olduğu ve yaklaşık yarı ömrünün 27 saat olduğu izlenmiştir (123). Biz de çalışmamızda çoklu doz bevasizumab uygulanan grubun dozunu tek bir seferde ilk anda vermek yerine dozlarını eşit dozlarda ikişer gün arayla uygulamayı uygun gördük. Bu sayede mükerrer uygulamada anti-VEGF ajanının dokuda kalış süresini arttırmayı amaçladık.

Kim ve arkadaşları tarafından yapılan klinik vaka serisinde 7 hastanın 10 gözü korneada neovaskülarizasyon nedeniyle topikal %1,25'lik topikal bevasizumab tedavisi ile izlenmiştir. Topikal bevasizumab tedavisinde ilk 1 ay etkin olduğu ancak tedavinin devam ettiği 2. ayda 10 gözün 6'sında korneada epitelyopati (epitel defekti, epitel erozyonu) izlenmiş olduğu görülmüş olup, 1 gözde de korneada incelme izlenmiştir (9). Erdurmuş ve arkadaşlarının iki hastanın iki gözünü kornea neovaskülarizasyonu nedeniyle inceledikleri klinik çalışmada 2,5 mg/0,1 cc subkonjonktival bevasizumab uygulanmış, hastalarda tedavi sonrası 1. haftada neovaskülarizasyonda dramatik iyileşme izlenmiş, 3 aylık takipte regresyon ve herhangi bir yan etki saptanmadığı bildirilmiştir (124). Topikal tedavide izlenen bu yan etkiler düşünüldüğünde çalışmamızda topikal tedavi yerine subkonjonktival bevasizumab seçeneği ile tedavinin etkinliğini incelemeyi tercih ettik.

Bahar ve arkadaşları tarafından yapılan klinik bir araştırmada korneada neovaskülarizasyon gelişmiş hastalarda subkonjonktival bevasizumab etkinliği araştırılmıştır. Yapılan geriye dönük çalışmada toplam 10 hasta çalışmaya dahil edilmiş ve 7'sinde iyileşme ve neovaskülarizasyonda gerileme izlenmiştir (125). Biz de çalışmamızda korneada neovaskülarizasyonun baskılanmasında subkonjonktival bevasizumab uygulanan her iki grubun kontrol grubuna göre kornea ödemi, kornea opasitesi, kornea neovaskülarizasyonu alanı, damar sayısı, enflamasyon durumu yönlerinden daha başarılı olduğunu gözlemledik. Subkonjonktival bevasizumab tedavi grupları dozlara göre kıyaslandığında dört doz uygulanan grubun istatistiksel olarak anlamlı şekilde tek doz uygulanan gruba göre kornea neovaskülarizasyonunu baskılamada, kornea ödemi, kornea opasitesi, kornea neovaskülarizasyonu alanı, damar sayısı bakımından daha etkili olduğunu gözlemledik.

Bevasizumab kolorektal kanserlerde tedavi seçeneği olarak kullanılmaya başlanmış olup daha sonra diğer klinik kullanımlara açılmıştır. Kolorektal kanserlerde sistemik olarak kullanılıp yan etki profili sıklığının az olduğu gözlenmiştir. Tariflenen yan etkiler arasında diyare, gastrointestinal sistem kanamaları, arteriyel tromboemboli, burun kanaması,

proteinüri, lökosit sayısında azalma, kardiyak patolojiler ve inme sayılabilir (92,126). Oküler kullanımda ilaç sistemik dolaşıma az geçtiği için nadiren hipertansiyon veya tromboemboli gibi yan etkiler bildirilmiştir (127). Bevasizumab yaklaşık 10 yıldır gözde çeşitli neovasküler hastalıklarda kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, üveite bağlı makula ödemi, psödo fakik makula ödeminde bevasizumabın tedavide etkinliği gözlenmiştir (128–132). Kornea neovaskülarizasyonunda, anjiyogenik uyarılma faktörleri ile yeni damarlanma başlamakta olup, bevasizumab ile damar permeabilitesi, ödem ve anjiyojen baskılanarak kornea şeffaflığının idamesinde rol oynamaktadır (66,96,124). Korneada neovaskülarizasyon oluşurken olduğu etyolojiye bağlı olarak beraberinde inflamasyon izlenmektedir (133). İnflamasyon mikrobik enfeksiyon, travma, kimyasal hasar sonrası dokularda görülen fizyolojik cevaptır. İnflamasyonda proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar moleküller ile birlikte kontrollü bir şekilde hücre kemotaksisi, migrasyonu ve proliferasyonu izlenmektedir (134). İnflamasyon ve anjiyojen bir çok noktada paralel seyretmektedir. Anjiyojen, inflamasyon bölgesindeki hücreler için gerekli olan besin ve oksijen desteğini sağlayarak inflamasyon idamesini sağlar. İnflamasyonun başlangıç basamaklarında üretilen nitrik oksit damar geçirgenliğini ve dilatasyonunu sağlayarak bağışıklık hücrelerinin damar dışına geçişini sağlar. Bağışıklık hücrelerince sentezlenen mediatörler fibroblastları ve damar endotel hücrelerini hedef alarak anjiyogenik faktörleri salgılatır. İnflamatuvar hücrelerin kendileri de VEGF, FGF, HGF, PDGF, TGF beta, TNF alfa gibi anjiyogenik faktörleri salgılatır. Bu nedenle anjiyojenin inflamasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (133,135). Amano ve arkadaşlarının çalışmasında rat kornealarında yaptıkları çalışmada, travmayla birlikte inflamasyonun ve VEGF'ün arttığı, inflamatuvar neovaskülarizasyonun VEGF ile ilişkili olduğu görülmüştür (53). Bock ve arkadaşlarının yaptıkları klinik çalışmada, farelerde sütürle indüksiyonu yapılmış kornea neovaskülarizasyonu modelinde, uygulanan bevasizumab ile inflamasyonla indüklenen anjiyojen ve lenfanjiyojen baskılanma görülmüştür (116). Oh ve arkadaşlarının ratlarda kimyasal yanıkla oluşturdukları kornea neovaskülarizasyon modelinde subkonjonktival bevasizumab uygulanmış, bevasizumabın inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve IL-2, IFN gama ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri azalttığı gösterilmiştir (133). Bizim çalışmamızda da bevasizumabın inflamasyona karşı etkinliği histopatolojik olarak değerlendirildiğinde yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak bevasizumab uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde inflamasyon yoğunluğunda azalma olduğu izlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda deneysel kornea neovaskularizasyonu baskılanmasında ve kontrolünde subkonjonktival bevasizumab uygulamasının etkili olduğunu gözlemledik. Subkonjonktival bevasizumab uygulamasını kolay ve güvenilir olarak değerlendirdik. Sonuçlarımıza bakarak yan etkilerinin de minimal seviyede gözlemlenmesi nedeniyle uygulanabilir bir tedavi şekli olduğu düşüncesindeyiz. Uygulama süresi olarak yanık olduğu andan itibaren uygulanabilecek en kısa sürede uygulanmasıyla ve çoklu doz şeklinde yüksek doz uygulama ile tek seferde düşük doz uygulamaya göre daha başarılı sonuçlar elde edebildiğimizi gözlemledik. İdeal uygulama dozu ve zamanı açısından geniş örneklem grubu ile birlikte ileri ve prospektif çalışmaların ilacın etkinliğinin ve doz ayarlamasının değerlendirilmesinde faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada çeşitli göz hastalıklarında aktif kullanımda olan anti-VEGF'lerinin, deneysel kornea neovaskülarizasyonu modelinde subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu sonrası klinik ve histopatolojik olarak etkinliği değerlendirildi. Korneada neovaskülarizasyonun baskılanmasında subkonjonktival bevasizumab uygulanmasının kontrol grubuna göre daha etkili olduğu gözlemlendi. Bevasizumab uygulama dozları arasında toplamda 5 mg/0,2 ml uygulanan çoklu doz grubunda neovaskülarizasyon baskılanmasının, 1,25 mg/0,05 ml uygulanan tek doz grubuna göre daha etkin olduğu saptandı. Kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde subkonjonktival uygulanan bevasizumabın etkili ve iyi bir seçenek olduğunu düşünmekteyiz. Bevasizumabın uzun yan etki profilini gözlemlemek ve doz etkinliğini değerlendirmek amacıyla prospektif ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 37(3): 588–98, 2011.
2. Agrawal VB, Tsai RJF. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol* 51(1): 5–15, 2003.
3. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 43(3): 245–69, 1994.
4. Zhang SX, Ma J. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 26(1): 1–37, 2007.
5. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea* 6(4): 250–7, 1987.
6. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 12(4): 242–9, 2001.
7. 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(9): 2514–22, 2000.
8. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 8(6): 961–5, 1994
9. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim T. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology* 115(6): 33–8, 2008.
10. Nirankari VS. Laser photocoagulation for corneal stromal vascularization. *Trans Am Ophthalmol Soc* 90: 595–669, 1992.
11. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 104: 264–302, 2006.
12. Jousseaume AM, Kruse FE, Völcker HE, Kirshhof B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237(11): 920–7, 1999.
13. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. *Exp Mol Med* 38(2): 173–9, 2006.
14. 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(2): 274–82, 1997.
15. Harvey PT, Cherry PM. Indomethacin v. dexamethasone in the suppression of corneal neovascularization. *Can J Ophthalmol* 18(6): 293–5, 1983.

16. Lee YK, Chung SK. The inhibitory effect of thalidomide analogue on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea* 32(8): 1142–8, 2013.
17. Kim T-I, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 27(3): 349–52, 2008.
18. Ozdemir O, Altintas O, Altintas L, Ozkan B, Akdag C, Yüksel N. Comparison of the effects of subconjunctival and topical anti-VEGF therapy (bevacizumab) on experimental corneal neovascularization. *Arq Bras Oftalmol* 77(4): 209–13, 2014.
19. 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* 27(3): 357–62, 2008.
20. Naumann GOH, Apple DJ. *Pathology of the Eye*. First Edition, New York: Springer Verlag, 1986.
21. Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, Inomata H. Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224(5): 452–6, 1986.
22. Cursiefen C, Küchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 17(6): 611–3, 1998.
23. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc* 86: 178–207, 1988.
24. Duane TD, Tasman W, Jaeger EA. *Duane's foundations of clinical ophthalmology: Ocular anatomy, embryology and teratology. Physiology of the eye and visual system. Pathology of the eye, Volumes 1-3*. J.B.Lippincott comp., 1991.
25. Chalam KV, Ambati BK, Beaver HA, Grover S, Levine LM. *Fundamentals and Principles of Ophthalmology 2010-2011*. American Academy of Ophthalmology, 2010.
26. Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology*. Third Edition, Elsevier Health Sciences, 2009.
27. Reidy JJ, Bouchard CS, Florakis GJ, Goins KM. *External Disease and Cornea 2010-2011*. American Academy of Ophthalmology, 2010
28. Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA, Salem H, Elkhanany AE, Hussein H, Abd El-Baky N. Clinical correlates of common corneal neovascular diseases: a literature review. *Int J Ophthalmol* 8(1): 182–93, 2015.
29. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103(9): 1231–6, 1999.
30. Beck L, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 11(5): 365–73, 1997.

31. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1(1): 27–31, 1995.
32. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, Goren MB, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea* 14(6): 604–9, 1995.
33. Gabison E, Chang J-H, Hernández-Quintela E, Javier J, Lu PCS, Ye H, Kure T, Kato T, Azar DT. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp Eye Res* 78(3): 579–89, 2004.
34. Papas E. Corneal vascularisation and contact lenses. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 81(6): 309–12, 2006.
35. Bucak YY, Erdurmus M, Terzi EH, Kükner A, Celebi S. Inhibitory effects of topical cyclosporine A 0.05% on immune-mediated corneal neovascularization in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251(11): 2555–61, 2013.
36. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16): 10931–4, 1992.
37. Efron N. Vascular response of the cornea to contact lens wear. *J Am Optom Assoc* 58(10): 836–46, 1987.
38. Henkind P. Ocular neovascularization. The Krill memorial lecture. *Am J Ophthalmol* 85(3): 287–301, 1978.
39. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407(6801): 242–8, 2000.
40. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacol* 68(6): 1017–21, 2004.
41. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106(4): 148–56, 2001.
42. Ortéga N, L’Faqihi FE, Plouët J. Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell* 90(5): 381–90, 1998.
43. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6): 669–76, 2003.
44. Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem* 279(44): 46304–14, 2004.
45. Kleespies A, Guba M, Jauch K-W, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 87(2): 95–104, 2004.

46. Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y. A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor, VEGF 115. *J Biol Chem* 273(5): 3033–8, 1998.
47. Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 30(11): 1169–74, 1998.
48. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue-beyond blood vessels. *Exp Neurol* 187(2): 246–53, 2004.
49. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1): 4–25, 1997.
50. Yazır Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF):Reseptörleri ve Fonksiyonları. *CÜ Tıp Fakültesi Derg* 29(3): 128–136, 2007.
51. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 10(6): 528–35, 1999.
52. Li X, Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 33(4): 421–6, 2001.
53. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(1): 18–22, 1998.
54. Binétruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouët J, Derbin C, Perret G, Mazié JC. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J* 19(7): 1525–33, 2000.
55. Jousseaume AM, Germann T, Kirchhof B. Effect of thalidomide and structurally related compounds on corneal angiogenesis is comparable to their teratological potency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237(12): 952–61, 1999.
56. Reinhard T, Reis A, Böhringer D, Malinowski M, Voiculescu A, Heering P, Godehardt E, Sundmacher R. Systemic mycophenolate mofetil in comparison with systemic cyclosporin A in high-risk keratoplasty patients: 3 years' results of a randomized prospective clinical trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239(5): 367–72, 2001.
57. Birnbaum F, Reis A, Reinhard T. [Topical immunosuppressives after penetrating keratoplasty]. *Ophthalmologie* 104(5): 381–7, 2007.
58. Birnbaum F, Böhringer D, Sokolovska Y, Sundmacher R, Reinhard T. Immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil after penetrating high-risk keratoplasty: a retrospective study. *Transplantation* 79(8): 964–8, 2005.
59. Gerten G. Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularization in corneal transplant surgery. *Cornea* 27(10): 1195–9, 2008.

60. Yoon K-C, You I-C, Kang I-S, Im S-K, Ahn J-K, Park Y-G, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 144(3): 390–395, 2007.
61. Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, Yong-ping L, Hong-jie M, Ying Z, Xiang-gui W. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 33(8): 653–60, 2008.
62. Aydin E, Kivilcim M, Peyman GA, Esfahani MR, Kazi AA, Sanders DR. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetonide with low-molecular-weight heparin and doxycycline. *Cornea* 27(4): 446–53, 2008.
63. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B, D'Amato RJ. New activity of spironolactone. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation* 94(10): 2566–71, 1996.
64. Sood AK, Gupta B, Chugh P. Topical amiloride accelerates healing and delays neovascularization in mechanically produced corneal ulcers in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21(7): 491–7, 1999.
65. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 4(6): 376–83, 1998.
66. Han YS, Lee JE, Jung JW, Lee JS. Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247(4): 541–8, 2009.
67. Ma DH, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK. Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(8): 1822–8, 1999.
68. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19(3): 348–52, 2000.
69. Nirankari VS, Dandona L, Rodrigues MM. Laser photocoagulation of experimental corneal stromal vascularization. Efficacy and histopathology. *Ophthalmology* 100(1): 111–8, 1993.
70. Primbs GB, Casey R, Wamser K, Snyder WJ, Crean DH. Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers* 29(10): 832–8, 1998.
71. Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea* 17(4): 403–9, 1998.
72. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 116(4): 431–41, 1998.

73. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S, Bocaccio F, Rymer S, Fernandes S, Neumann J. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders. *Ophthalmology* 102(7): 1020–5, 1995.
74. Gohto Y, Obana A, Kanai M, Nagata S, Nakajima S, Miki T. Treatment parameters for selective occlusion of experimental corneal neovascularization by photodynamic therapy using a water soluble photosensitizer, ATX-S10(Na). *Exp Eye Res* 72(1): 13–22, 2001.
75. Gohto Y, Obana A, Kaneda K, Miki T. Photodynamic effect of a new photosensitizer ATX-S10 on corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 67(3): 313–22, 1998.
76. Gohto Y, Obana A, Kanai M, Nagata S, Miki T, Nakajima S. Photodynamic therapy for corneal neovascularization using topically administered ATX-S10 (Na). *Ophthalmic Surg Lasers* 31(1): 55–60, 2000
77. Baer JC, Foster CS. Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser. *Ophthalmology* 99(2): 173–9, 1992.
78. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 93(10): 1304–9, 1986.
79. Yoon K-C, Ahn KY, Lee SE, Kim KK, Im S-K, Oh H-J, Jeong I-Y, Park S-W, Park Y-G, Nah H-J, Im W-B. Experimental inhibition of corneal neovascularization by photodynamic therapy with verteporfin. *Curr Eye Res* 31(3): 215–24, 2006.
80. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 9(1): 32–46, 1995.
81. Proia AD, Hiraikata A, McInnes JS, Scroggs MW, Parikh I. The effect of angiostatic steroids and beta-cyclodextrin tetradecasulfate on corneal neovascularization in the rat. *Exp Eye Res* 57(6): 693–8, 1993.
82. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(7): 1588–93, 1989.
83. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(10): 1954–62, 1997.
84. Mirabelli P, Peebo BB, Xeroudaki M, Koulikovska M, Lagali N. Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model. *Exp Eye Res* 125: 118–27, 2014.
85. Murata M, Shimizu S, Horiuchi S, Taira M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244(2): 205–9, 2006.

86. Erdurmus M, Yagci R, Yilmaz B, Hepsen IF, Turkmen C, Aydin B, Karadag R. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization. *Cornea* 26(6): 715–9, 2007.
87. Demir T, Celiker UO, Kükner A, Mogulkoç R, Celebi S, Celiker H. Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 77(4): 386–90, 1999.
88. Benelli U, Lepri A, Del Tacca M, Nardi M. FK-506 delays corneal graft rejection in a model of corneal xenotransplantation. *J Ocul Pharmacol Ther* 12(4): 425–31, 1996.
89. Shin SH, Kim JC, Chang SI, Lee H, Chung SI. Recombinant kringle 1-3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 19(2): 212–7, 2000.
90. Cohen RA, Gebhardt BM, Bazan NG. A platelet-activating factor antagonist reduces corneal allograft inflammation and neovascularization. *Curr Eye Res* 13(2): 139–44, 1994.
91. Lee C-M, Jung W-K, Na G, Lee D-S, Park S-G, Seo S-K, Yang J-W, Yea SS, Lee Y-M, Park WS, Choi I-W. Inhibitory effects of the platelet-activating factor receptor antagonists, CV-3988 and Ginkgolide B, on alkali burn-induced corneal neovascularization. *Cutan Ocul Toxicol* 34(1): 53–60, 2015.
92. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350(23): 2335–42, 2004.
93. 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* 36(4): 336–9, 2005.
94. Ishibashi T. Maintenance therapy with pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: an exploratory study in Japanese patients (LEVEL-J study). *Jpn J Ophthalmol* 57(5): 417–23, 2013.
95. Akar EE, Oner V, Küçükerdönmez C, Aydın Akova Y. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model. *Int J Ophthalmol* 6(2): 136–40, 2013.
96. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol* 145(3): 424–431, 2008.
97. Chiang C-C, Chen W-L, Lin J-M, Tsai Y-Y. Effect of bevacizumab on human corneal endothelial cells: a six-month follow-up study. *Am J Ophthalmol* 146(5): 688–91, 2008.
98. Park HY, Kim SJ, Lee HB, Kim ES, Tchah H. Effect of intracameral bevacizumab injection on corneal endothelium in rabbits. *Cornea* 27(10): 1151–5, 2008.

99. Laud K, Spaide RF, Freund KB, Slakter J, Klancnik JM. Treatment of choroidal neovascularization in pathologic myopia with intravitreal bevacizumab. *Retina* 26(8): 960–3, 2006.
100. Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, Klancnik JM, Yannuzzi LA, Fisher YL, Sorenson J, Slakter JS, Freund KB, Cooney M, Fine HF. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina* 26(3): 279–84, 2006.
101. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 26(3): 275–8, 2006.
102. Ferrara DC, Koizumi H, Spaide RF. Early bevacizumab treatment of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 144(6): 864–71, 2007.
103. Wang L-L, Liu W-J, Liu H-Y, Xu X. Single-site Baseline and Short-term Outcomes of Clinical Characteristics and Life Quality Evaluation of Chinese Wet Age-related Macular Degeneration Patients in Routine Clinical Practice. *Chin Med J (Engl)* 128(9): 1154–1159, 2015.
104. Stuart A, Ford JA, Duckworth S, Jones C, Pereira A. Anti-VEGF therapies in the treatment of choroidal neovascularisation secondary to non-age-related macular degeneration: a systematic review. *BMJ Open* 5(4): e007746, 2015.
105. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 41(4): 275–313, 1997.
106. Riazi-Esfahani M, Peyman GA, Aydin E, Kazi AA, Kivilcim M, Sanders DR. Prevention of corneal neovascularization: evaluation of various commercially available compounds in an experimental rat model. *Cornea* 25(7): 801–5, 2006.
107. Folkman J, Ingber DE. Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Ann Surg* 206(3): 374–83, 1987.
108. Ishibashi T, Miki K, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ. Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovascularization in the subhuman primate. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 103(5): 708–11, 1985.
109. Longenecker JP, Kilty LA, Johnson LK. Glucocorticoid influence on growth of vascular wall cells in culture. *J Cell Physiol* 113(2): 197–202, 1982.
110. 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* 19(4): 526–33, 2000.
111. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand* 82(5): 557–63, 2004.

112. 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(20): 9828–35, 2001.
113. Ahmed A, Berati H, Nalan A, Aylin S. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. *Clin Experiment Ophthalmol* 37(7): 730–6, 2009.
114. Krizova D, Vokrojova M, Liehneova K, Studeny P. Treatment of Corneal Neovascularization Using Anti-VEGF Bevacizumab. *J Ophthalmol* 2014: 178132, 2014.
115. Kim W-J, Jeong H-O, Chung S-K. The effect of bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Korean J Ophthalmol* 24(4): 230–6, 2010.
116. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(6): 2545–52, 2007.
117. Manzano RPA, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chévez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 91(6): 804–7, 2007.
118. Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, Yazdchi T, Sedaghat A, Noori F. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol* 35(8): 745–8, 2007.
119. Barros LFM, Belfort R. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *An Acad Bras Cienc* 79(3): 389–94, 2007.
120. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 86(3): 322–8, 2008.
121. Dursun A, Arici MK, Dursun F, Ozec AV, Toker MI, Erdogan H, Topalkara A. Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int J Ophthalmol* 5(4): 448–51, 2012.
122. Edelman JL, Castro MR, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(6): 1112–23, 1999.
123. Kim MJ, Han ES, Kim J, Kim T-W. Aqueous humor concentration of bevacizumab after subconjunctival injection in rabbit. *J Ocul Pharmacol Ther* 26(1): 49–53, 2010.
124. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245(10): 1577–9, 2007.

125. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea* 27(2): 142–7, 2008.
126. Dai F, Shu L, Bian Y, Wang Z, Yang Z, Chu W, Gao S. Safety of bevacizumab in treating metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of all randomized clinical trials. *Clin Drug Investig* 33(11): 779–88, 2013.
127. Wu B, Wu H, Liu X, Lin H, Li J. Ranibizumab versus bevacizumab for ophthalmic diseases related to neovascularisation: a meta-analysis of randomised controlled trials. *PLoS One* 9(7): e101253, 2014.
128. Kodjikian L, Decullier E, Souied EH, Girmens J-F, Durand EE, Chapuis FR, Huot L. Bevacizumab and ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: an updated meta-analysis of randomised clinical trials. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 252(10): 1529–37, 2014.
129. Ito Y, Saishin Y, Sawada O, Kakinoki M, Miyake T, Sawada T, Kawamura H, Ohji M. Comparison of single injection and three monthly injections of intravitreal bevacizumab for macular edema associated with branch retinal vein occlusion. *Clin Ophthalmol* 9: 175–80, 2015.
130. Ghasemi Falavarjani K, Parvaresh M-M, Modarres M, Hashemi M, Samiy N. Intravitreal bevacizumab for pseudophakic cystoid macular edema; a systematic review. *J Ophthalmic Vis Res* 7(3): 235–9, 2012.
131. Yaseri M, Zeraati H, Mohammad K, Soheilian M, Ramezani A, Eslani M, Peyman GA. Intravitreal bevacizumab injection alone or combined with triamcinolone versus macular photocoagulation in bilateral diabetic macular edema; application of bivariate generalized linear mixed model with asymmetric random effects in a subgroup of a clinical. *J Ophthalmic Vis Res* 9(4): 453–60, 2014
132. Liu X-D, Zhou X-D, Wang Z, Shen H-J. Comparison of intravitreal bevacizumab with macular photocoagulation for treatment of diabetic macular edema: a systemic review and Meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 7(6): 1048–55, 2014.
133. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res* 34(2): 85–91, 2009.
134. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 14(6): 433–9, 2004.
135. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10(3): 149–66, 2007.