

**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
BEVASİZUMAB VE DEKSAMETAZONUN ETKİNLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÜMİT DOĞAN

BOLU

2009

**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
BEVASİZUMAB VE DEKSAMETAZONUN ETKİNLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÜMİT DOĞAN

DANIŞMAN

PROF. DR. SERDAL ÇELEBİ

BOLU

2009

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması, yürütülmesi ve sunuma hazırlanması aşamalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanlığımı yürüten değerli hocam Prof. Dr. Serdal Çelebi'ye,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. A. Şahap Kükner, Doç. Dr. Gürsoy Alagöz ve Doç. Dr. Didem Serin'e,

Tezin her safhasında yardımlarını esirgemeyen, Prof. Dr. Aysel Kükner'e, histopatolojik incelemelerde özveri ile çalışan değerli arkadaşım Dr. E. Hakan Terzi'ye,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarım; Dr. Ahmet Yalçın, Dr. Erkan Tırak, Dr. Sedat Özmen, Dr. Y. Yücel Bucak ve Dr. Fatih Çelik'e,

Tezin birçok aşamasında yardımlarını eksik etmeyen Dr. Berna Kılıç'a,
Kıymetli eşim Nevin Doğan'a,
Teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Ümit Doğan
2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv-v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kornea	2
2.1.1 Korneanın Embriyolojisi	2
2.1.2 Korneanın Makroskopik Anatomisi	2
2.1.3 Korneanın Mikroskopik Anatomi ve Fizyolojisi	3
2.1.4 Korneanın Optik Özellikleri	3
2.1.5 Korneanın Duyusal İnnervasyonu	3
2.1.6 Korneanın Oksijen ve Besin Desteği	4
2.1.7 Gözyaşı Filmi	4
2.1.8 Epitel Tabakası	4
2.1.9 Bowman Tabakası	5
2.1.10 Stroma Tabakası	5
2.1.11 Descemet Membranı	6
2.1.12 Endotel Tabakası	6
2.2 Korneal Yara İyileşmesi ve Vaskülarizasyon	6
2.2.1 Korneal Fibrozis ve Vaskülarizasyon	6
2.2.2 Subepitelyal Fibrozis ve Vaskülarizasyon	7
2.2.3 Stromal Vaskülarizasyon	7
2.3 Anjiogenezis	9
2.3.1 Anjiogenezisi Etkileyen Faktörler	9
2.3.2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	10
2.3.3 VEGF Sentezi	11

2.3.4 VEGF Reseptörleri	11
2.4. Apoptozis	12
2.5 Korneal Neovaskülarizasyonda Tedavi	13
2.5.1 Deksametazon	14
2.5.2 Bevasizumab	14
3. MATERYAL VE METOD	16
4. BULGULAR	18
4.1 Makroskopik Bulgular	18
4.2 Işık Mikroskopik Bulgular	20
4.2.1 Hematoksilen Eozin Boyama	20
4.2.2 Masson Trikrom Boyama	25
4.2.3 Anjiogenezis Değerlendirilmesi	27
4.2.4 Apoptozis Değerlendirilmesi	30
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
7. KAYNAKLAR	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

µm: Mikrometre

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

PlGF: Plasental büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

TNF: Tümör nekroz faktörü

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

G-CSF: Granülosit koloni uyaran faktör

IL: İnterlökin

PRK: Fotorefraktif keratektomi

HE: Hematoksilen eozin

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling

SD: Standart sapma

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 4.1: Grup 1'e ait makroskopik fotoğraf	18
Şekil 4.2: Grup 2'ye ait makroskopik fotoğraf	19
Şekil 4.3: Grup 3'e ait makroskopik fotoğraf	19
Şekil 4.4: Grup 4'e ait makroskopik fotoğraf	20
Şekil 4.5: Grup 1'e ait HE boyama genel doku değerlendirme fotoğrafı	21
Şekil 4.6: Grup 1'e ait HE boyama genel doku değerlendirme fotoğrafı	22
Şekil 4.7: Grup 2'ye ait HE boyama genel doku değerlendirme fotoğrafı	22
Şekil 4.8: Grup 3'e ait HE boyama genel doku değerlendirme fotoğrafı	23
Şekil 4.9: Grup 3'e ait HE boyama genel doku değerlendirme fotoğrafı	24
Şekil 4.10: Grup 4'e ait HE boyama genel doku değerlendirme fotoğrafı	24
Şekil 4.11: Grup 4'e ait HE boyama anjiogenezis değerlendirme fotoğrafı	25
Şekil 4.12: Grup 1'e ait Masson Trikrom boyama fotoğrafı	26
Şekil 4.13: Grup 4'e ait Masson Trikrom boyama fotoğrafı	26
Şekil 4.14: Grup 1'e ait HE boyama anjiogenezis değerlendirme fotoğrafı	28
Şekil 4.15: Grup 2'ye ait HE boyama anjiogenezis değerlendirme fotoğrafı	28
Şekil 4.16: Grup 3'e ait HE boyama anjiogenezis değerlendirme fotoğrafı	29
Şekil 4.17: Grup 4'e ait HE boyama anjiogenezis değerlendirme fotoğrafı	29
Şekil 4.18: Grup 1'e ait TUNEL boyama fotoğrafı	31
Şekil 4.19: Grup 2'ye ait TUNEL boyama fotoğrafı	31
Şekil 4.20: Grup 3'e ait TUNEL boyama fotoğrafı	32
Şekil 4.21: Grup 4'e ait TUNEL boyama fotoğrafı	32

TABLÖLAR**Sayfa**

Tablo 2.1: Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler	9
Tablo 4.1: Grupların ortalama damar sayıları	27
Tablo 4.2: Grupların ortalama TUNEL (+) apoptotik hücre sayıları	30

ÖZET

Ümit Doğan, Deneysel Kornea Neovaskülerizasyonunda Bevacuzimab ve Deksametazonun Etkinliği. Uzmanlık Tezi, Bolu, 2009. Korneal neovaskülerizasyon, herhangi bir nedenle korneada yeni damarların oluşmasıdır. Enflamasyon, enfeksiyon, dejeneratif hastalık, travma ve hipoksi gibi nedenler, şeffaf ve damarsız korneada neovaskülerizasyona neden olabilir. Tedavide başlıca kortikosteroidler, nonsteroid antienflamatuarlar ve VEGF inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan tavşan kornea neovaskülerizasyonunda topikal deksametazon, subkonjonktival bevasizumab ve topikal bevasizumabın etkilerini araştırmayı ve karşılaştırmayı amaçladık.

Çalışmada toplan 24 tane Yeni Zelanda cinsi erişkin erkek tavşan kullanıldı. Kontrol (Grup 1), topikal deksametazon (Grup 2), subkonjonktival bevasizumab (Grup3) ve topikal bevasizumab (Grup 4) grupları olmak üzere toplam dört grup oluşturulup, bütün deneklerin sol göz kornealarında gümüş nitrat-potasyum nitrat ile kimyasal yanık oluşturulduktan sonra, on gün boyunca her gruba ilgili ilaç uygulandı. Onuncu günde denekler sakrifiye edilip, hematoksilin eozin, Masson Trikrom ve immunohistokimyasal boyamalar yapıldıktan sonra, histopatolojik olarak korneal neovaskülerizasyon ve apoptozis değerlendirildi ve gruplar karşılaştırıldı.

Subkonjonktival ve topikal bevasizumab gruplarında korneal neovaskülerizasyonda belirgin azalma olduğu, topikal deksametazon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az neovaskülerizasyon olmakla birlikte ($p=0.01$), deksametazon grubunda korneal neovaskülerizasyondaki gerilemenin bevasizumab gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu saptandı (Sırasıyla; $p=0.004$, $p=0.004$). TUNEL metodu ile yapılan apoptozis değerlendirilmesinde ise bevasizumab gruplarındaki apoptotik hücre sayısının, kontrol ve topikal deksametazon gruplarındaki apoptotik hücre sayısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu saptandı (Sırasıyla; $p=0.004$, $p=0.004$, $p=0.004$, $p=0.004$). Apoptotik hücre sayısı bakımından, kontrol ve topikal deksametazon grupları arasında istatistiki bir fark tespit edilmedi ($p=0.065$).

Sonuç olarak, topikal deksametazon, topikal bevasizumab ve subkonjonktival bevasizumabın, deneysel tavşan kornea neovaskülerizasyonunun kontrolünde etkili

yöntemler olduğunu, topikal ve subkonjonktival bevasizumabın, topikal deksametazondan daha etkili olduğunu gözledik.

Anahtar kelimeler: Korneal neovaskülarizasyon, Bevasizumab, Deksametazon, Apoptozis.

ABSTRACT

Effectiveness of Bevacizumab and Dexamethasone on Experimental Corneal Neovascularization. Medical Speciality Thesis, Bolu, 2009. Corneal neovascularization is defined as formation of new vascular structures on cornea for any reason. Inflammation, infection, degenerative diseases, trauma, and hypoxia can cause formation of new vascular structures on transparent and avascular cornea. Mainly, corticosteroids, nonsteroid antiinflammatory drugs, and VEGF inhibitors are being used for treatment. In this study, our goal is to evaluate and compare the effects of topical dexamethasone, subconjunctival bevacizumab, and topical bevacizumab in experimentally created corneal neovascularization in rabbits.

Twenty four male New Zealand rabbits were used in our study. Four groups were designed as control (group 1), topical dexamethasone (group 2), subconjunctival bevacizumab (group 3), and topical bevacizumab (group 4) groups. Chemical burn was created with silver nitrate – potassium nitrate on the left eye of each subject and related drugs were used for the following ten days for each group. On the tenth day, subjects were sacrificed and corneal neovascularization and apoptosis were evaluated and the groups were compared histopathologically, after hematoxylin eosin, Masson Trichrome, and immunohistochemical staining.

Statistically significant decrease was observed in corneal neovascularization in subconjunctival and topical bevacizumab groups. In the dexamethasone group, statistically significant decrease was observed with regard to the control group ($p=0,01$), but in this group decrease in corneal neovascularization was statistically less significant than bevacizumab groups ($p=0,004$, $p=0,004$, respectively). For apoptosis evaluation with TUNEL method, the number of apoptotic cells in bevacizumab groups was significantly less than that in the control and dexamethasone groups ($p=0,004$, $p=0,004$, $p=0,004$, respectively).. There was no statistically significant difference between dexamethasone and control groups for the number of apoptotic cells ($p=0,065$).

As a result, we observed that topical dexamethasone, topical bevacizumab and subconjunctival bevacizumab are effective methods in controlling experimental corneal neovascularization in rabbits, and topical and subconjunctival bevacizumab are more efficient than topical dexamethasone.

Keywords: Corneal neovascularization, Bevacizumab, Dexamethasone, Apoptosis.

1. GİRİŞ

Kornea, normalde damarsız ve şeffaf bir dokudur. Birçok enflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif hastalık, travma ve hipoksi, şeffaf ve damarsız korneada neovaskülarizasyon gelişmesine neden olabilir (1). Yeni oluşan bu damarlar korneal iyileşme ve enfeksiyonlara karşı savaşta oldukça faydalı olmakla birlikte, korneanın iyileşme süreci tamamlandıktan sonra ise istenmeyen bir durumdur. Bu yeni damarlar sızıntı, enflamasyon ve skarlaşmaya yol açarak kornea şeffaflığını bozmakta ve görme keskinliğinde azalmaya neden olmaktadır (2,3).

Korneada anjiogenik faktörler (vasküler endotelial büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü vb.) ve anti anjiogenik faktörler (angiostatin, endostatin vb.) arasında bir denge söz konusudur. Bu dengeyi anjiogenezis lehine değiştiren travma, enflamasyon, enfeksiyon ve dejeneratif hastalıklar korneal neovaskülarizasyondan sorumludur (4).

Korneal neovaskülarizasyona neden olan hastalığın patogenezinine göre tedavi stratejisi değişmekle birlikte, korneal neovaskülarizasyon için halen değişik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kortikosteroidler, nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar, siklosporin A, somatostatin analogları, askorbik asit, talidomid, rapamisin, metotreksat ve bevasizumabın etkili olduğu bildirilmiştir (3,5-13). Ayrıca laser fotokoagülasyon, diatermi ve fotodinamik tedavi gibi yöntemler de korneal neovaskülarizasyonu azaltmada kullanılmaktadır (14-16).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KORNEA

Kornea, göz küresinin en öndeki 1/6'lık kısmını oluşturan saydam ve damarsız bir dokudur. Korneanın ön yüzü gözyaşı film tabakası ile arka yüzü ise aköz hümörle temas halindedir. Bitişiginde opak sklera ve onu örten yarı saydam konjonktiva vardır. Korneanın şekli, büyüklüğü ve optik özellikleri, yaşla birlikte küçük değişimlere uğrar (17,18).

2.1.1 Korneanın Embriyolojisi

Yüzeyel ektoderm, lens vezikülünden ayrılınca iki katlı epitele dönüşür. Bazal laminanın kalıntısı olan bu yapı primitif korneadır. Altıncı haftanın sonunda bu yapıdaki hücreler arasında bağlantı kompleksleri oluşur. Yedinci haftada nöral krestten oluşan mezenkimal hücreler, lens vezikülü çevresinden öne doğru üç dalga halinde hareket ederler. Yüzeyel ektoderm ile lens arasından göç eden birinci dalga hücreler, kornea ve trabeküler endoteli yaparlar (19). Kornea epiteli ile endoteli arasından göç eden ikinci dalga hücreler, kornea stromasını yaparlar (20).

Kornea endoteli, iki tabakalı küboidal hücrelerden oluşmuştur. Sekizinci haftada bu hücreler “Descemet membranını” oluştururlar (21,22). Üçüncü ayda fibroblast ve kollajen lifler ortaya çıkar. Fibroblastlar glikozaminoglikan sentezine başlar. Dördüncü ayda ilk kez Bowman tabakası belirginleşir. Bowman tabakasını epitelin bazal laminasından uzanan flamanlar oluşturur. Bu haftalarda, endotel hücre apeksleri arasında sıkı bağlantılar oluşur. Daha sonra korneanın genişlemesi ve saydam bir yapı oluşturmaları için stromada dehidratasyon başlar (23).

2.1.2 Korneanın Makroskopik Anatomisi

Erişkin korneasının yatay çapı 11,7 mm (11-12,5 mm), dikey çapı ise 10,5 mm'dir (10-11,5 mm). Yatay ve dikey çap farklarından dolayı kornea görünüm

olarak elipse benzer. Kornea kalınlığı, merkezde yaklaşık 520 mikrometre (μm), periferde ise yaklaşık 700 μm 'dir (17,18).

2.1.3 Korneanın Mikroskopik Anatomi ve Fizyolojisi

Kornea beş tabakadan oluşur. Bunlar; epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endoteldir. Kornea, önde gözyaşı filmi ile arkada ise aköz hümörle temas halindedir. Gözyaşı film tabakası ve aköz hümör, damarsız korneanın fizyolojik düzenini sürdürmesi, patolojik durumlardaki tepkisini ve immünolojisini büyük oranda belirler (18).

2.1.4 Korneanın Optik Özellikleri

Korneanın optik özelliklerini, saydamlığı, yüzey düzgünlüğü, eğimi ve refraktif indeksi belirler. Korneanın santral 4 mm'lik kısmı gözün optik merkezidir ve pupillayı kaplar. Bu kısımda kornea sferiktir ve kırıcılığı en fazladır. Perifere gidildikçe kırıcılık azalır. Korneanın geneli ise optik olarak asferik yapıdadır. Korneanın toplam optik gücü yaklaşık olarak 42 diyoptridir, bu ise insan gözünün toplam kırıcılığının yaklaşık 2/3'üdür. Kornea merkezinin periferinden ince olmasından dolayı, yapısal olarak ıraksak, fakat fonksiyonel olarak ise yakınsak mercek gibidir (17,18).

2.1.5 Korneanın Duyusal İnnervasyonu

Vücudun duyusal innervasyonu en yoğun dokularından birisi olan kornea, ciltten 300–400 kat daha yoğun sinir yoğunluğuna sahiptir (24). Duyusal innervasyonu, trigeminal sinirin oftalmik dalından alır (24). Limbus çevresinde sinir halkası oluşturan uzun siliyer sinir, periferik stromaya derinden ve radyal olarak girip kısa bir mesafe sonra miyelinsiz hale gelir ve öne doğru yer değiştirerek Bowman tabakasını geçer. Daha sonra kornea epiteli kanat hücreleri seviyesinde plexus oluşturarak sonlanır (18,24).

2.1.6 Korneanın Oksijen ve Besin Desteği

Korneanın epitel ve endotel hücreleri, metabolik olarak son derece aktif olup, saydamlığının ve dehidratasyonunun sürdürülebilmesi bu aktivite ile sağlanmaktadır. Enerji kaynağı olarak glukoz kullanılmaktadır. Oksijenli glikolizde glukozun kaynağı aköz hümör, oksijenin kaynağı ise ağırlıklı olarak gözyaşıdır. Göz kapakları kapalı olduğunda ise yüzeysel limbal-konjonktival damarlardan gaz geçişı ile korneanın oksijen ihtiyacı karşılanır. Kornea, karbonhidrat, vitamin, aminoasit gibi besin gereksinimlerini limbustaki damarlardan ve endotelden aktif transport veya difüzyon aracılığı ile aköz hümörden karşılar. Karbondioksit ve diğere metabolik ürünler de benzer yollarla gözyaşı filmine, limbal damarlara ve aköz hümöre geçer (17,18,24).

2.1.7 Gözyaşı Filmi

Prekorneal gözyaşı filmi, normal gözyaşı üretiminde yaklaşık 7 µm kalınlıktadır. Gözyaşı filmi üç tabakadan ibaret olup, en üstte yağ tabakası, ortada aköz tabaka ve en altta ise epitellem temas halindeki müsin tabakadan oluşur. Gözyaşımda elektrolit, metabolit, protein, enzim ve yağlar bulunur. Gözyaşı, kornea üzerinde kaygan bir tabaka oluşturarak korneanın kurumasını engeller, hava ile kornea arasında düzgün bir optik ara yüzey oluşmasını sağlar. Gözyaşı film tabakası ayrıca epitelin sağlığını sürdürmesi ve onarımı için gerekli biyolojik aktif maddelere de kaynaklık eder (18,24,25). Gözyaşı filmi, kornea yüzeyini mikroorganizmaların girişine, kimyasal, toksik veya yabancı cisim hasarına karşı da korur. Bu sebeple oküler yüzey ve gözyaşı tabakası anatomik ve fizyolojik olarak ortak bir ilişki içindedir.

2.1.8 Epitel Tabakası

Kornea epiteli, keratinize olmayan, 5–6 katlı, 40–50 µm kalınlıkta, çok katlı epitel hücrelerinden oluşmaktadır (26). Limbal kök hücrelerden mitozla çoğalan hücreler, kornea merkezine doğru ilerleyerek epitelin bazal hücrelerini oluştururlar. Bu bazal hücrelerden farklılaşan hücreler, kornea epitel tabakasını meydana

getirirler. Kornea epitel tabakası, üç farklı hücrenin oluşturduğu 5–6 kattan oluşur. Epitel tabakası, en üstte 2–3 katlı yüzeyel hücreler, ortada 2–3 katlı kanat hücreler, en altta ise tek katlı kolumnar bazal hücrelerden meydana gelir.

Kornea epitel hücreleri düzenli olarak apoptozise uğrar ve 7–14 gün içinde yerine yeni hücreler gelir. Daha derinde yerleşen hücreler, düzenli olarak üste ilerleyerek dökülen hücrelerin yerini alırlar (18,24,26).

Yüzeyel hücreler, yassı ve poligonal hücreler olup, yüzeylerindeki mikrovillus ve mikropikalar vasıtasıyla gözyaşı ve hava ile temas alanını artırarak besin ve oksijen teminini kolaylaştırırlar. Bu hücreler, göz yüzeyini hidrofilik hale getirip, müsin ile yüzey gerilimini azaltırlar. Aralarındaki sıkı bileşkeler, en önemli epitelyal bariyerleri oluştururlar (18,24).

Epitel tabakasında çoğalabilme yeteneği sadece bazal hücrelerde mevcuttur. Mitoz yeteneği ile uyumlu olarak, çok zengin hücre içi organel yapısına sahiptirler. Bazal hücrelerin yanlarında “gap junction” ve “zonula adherensler” ile karakterize hücreler arası bağlantıları vardır. Bazal hücreler, altlarındaki bazal membrana yaygın bir hemidesmozom sistemi ile bağlıdır.

Bazal hücrelerden doğan hücreler, önce kanat hücreleri, ardından yüzeyel hücrelere değişim gösterirler. Bazal hücrelerden yüzeyel hücrelere değişim sürecinin döngü süresi 7–14 gündür. Ultraviyole, hipoksi ve mekanik stres, apoptozisi tetikleyerek programlı epitel hücresi ölümüne neden olur (18).

2.1.9 Bowman Tabakası

Epitel bazal membranı ile stroma arasında yer alan, yaklaşık 12 µm kalınlığında tip I ve tip III kollajen fibrillerden oluşan bir tabakadır. Kollajen fibriller, stromal keratositler tarafından sentezlenir. Korneal hasar sonrasında rejenere olmayıp, fibrozis ile iyileşirler (24).

2.1.10 Stroma Tabakası

Kornea kalınlığının %90’ını oluşturan bu tabaka, kollajen fibriller, ekstraselüler matriks, keratositler ve sinir liflerinden oluşur. Stromanın %78’i sudan

oluşurken, kuru ağırlığının %70'ini kollajen fibriller meydana getirir. Kollajen fibrillerin büyük bölümü tip I, kalan kısmı ise tip III, V, VI fibrillerdir. Çapları 22,5–35 nanometre olan bu lifler, son derece düzenli bir diziliş gösterir. Fibriller arasında ise glikozaminoglikanlar yer alır. Glikozaminoglikanlar, büyük çoğunluğu keratan sülfat olmak üzere, kondroitin sülfat ve dermatan sülfattan oluşur (24).

2.1.11 Descemet Membranı

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen Descemet membranı, endotel hücrelerinin bazal membranı olarak kabul edilir. Kalınlığı, doğumda 3 µm iken, erişkinde ise 8–10 µm'dir. Ağırlıklı olarak tip IV kollajen ve lamininden oluşan bu tabakada fibronektin de bulunmaktadır. Bu tabaka, matriks metalloproteinazlara dayanıklı olduğundan, bakteriyel keratitler gibi stromal lizisin geliştiği durumlarda sağlam kalır (24).

2.1.12 Endotel Tabakası

Descemet membranının arka yüzeyini döşeyen tek sıra hekzagonal hücrelerden oluşan, yaklaşık 5 µm kalınlıkta, 20 µm genişlikte olan bu hücreler, genç erişkin korneasında milimetrekarede ortalama 3500 tane bulunur. Metabolik ve sekretuar açıdan oldukça aktif olan bu hücreler, çok sayıda stoplazmik organel içerir. Endotel hücreleri, insanlarda çoğalma yeteneğine sahip olmayıp, yaş ile birlikte sayısında azalma gözlenir. Endotel hücrelerinin yapısında bulunan Na–K ATPaz pompası ile stromadan aköz hümöre doğru aktif su geçişi olur ve stromal su oranının %78'de tutulması sağlanır (18,24).

2.2 KORNEAL YARA İYİLEŞMESİ ve VASKÜLARİZASYON

2.2.1 Korneal Fibrozis ve Vaskülerizasyon

Vaskülerizasyon ve fibrozis bağ dokusu tamirinin normal bir parçası olup, genellikle enflamasyonu takiben gelişir (ör. nekrotizan keratit ve stromal ülser). Bu

tür yara iyileşmesi, birçok doku için gerekli olmakla birlikte, korneal fibrozis ve vaskülarizasyon ise optik fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Korneanın fibrozis ile tamiri sırasında, stromal kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks elemanları, normal düzenini kaybeder. Bu durum ise kornea opasitesine ve ışık saçılmasına neden olur (27,28).

2.2.2 Subepitelyal Fibrozis ve Vaskülarizasyon

Kornea epiteli bağ dokusu içermediğinden, geniş ve derin korneal epitelyal yaralanmalardaki fibrozis ve vaskülarizasyonun kaynağı, subepitelyal ön stroma ve komşu konjonktivadan farklılaşan hücrelerdir (27,29). Hasarlı dokunun tamiri sırasında, subepitelyal vaskülarizasyon ve fibrozis gelişir. Bu süreçte lökositler, proliferen olan vasküler endotelyal hücreler ve aktif fibroblastlar yeni ekstrasellüler matriksi sentezlemektedirler. Kontakt lens kullanımı gibi korneanın kısmen hipoksik kaldığı durumlarda ise limbustan ince fibrovasküler doku göç eder. Korneanın ağır şekilde tahribatı ile sonuçlanan alkali yanık gibi durumlarda ise fibrovasküler doku oldukça kalın olup tüm korneayı kaplayabilir (27).

2.2.3 Stromal Vaskülarizasyon

Stromal vaskülarizasyon, nonspesifik bir patolojik cevaptır. Damarların sayısı ve lokalizasyonu, enflamatuvar cevabın şiddetine ve yerine bağlı olarak değişmektedir. Korneal vaskülarizasyon, patolojiye bağlı olarak stromanın üç ayrı bölgesinde gelişmektedir:

1. Subepitelyal ve ön stromal damarlar; kronik blefarit, fliktenüler konjonktivit, kontakt lens kullanımı, tekrarlayıcı epitelyal defekt gibi yüzeysel korneal hastalıklarda görülebilmektedir.
2. Orta stromal damar oluşumu; nekrotizan herpes simpleks keratiti, bakteriyel veya fungal abseler, kimyasal yanıklar gibi kronik enflamasyonlarda görülebilmektedir.
3. Derin stromal ve ön Descemet membranında damar oluşumu; keratoüveitlerde görülebilir.

Stromaya yayılan kan damarları; yüzeysel konjonktival damarlardan, derin skleral damarlardan veya irisin kornea ile temas ettiği ya da irisin korneal bir yaranın içine inkarsere olduğu durumlarda ise iris damarlarından kaynaklanır. Fibrotik komponentin olmadığı hallerde, korneal damarlar, Bowman tabakası ve stromal kollajen lameller arasında yer alırken, fibrozisin eşlik ettiği hallerde ise hem ön hem de arka stromaya doğru ilerleyebilmektedir.

Damar endotelinden köken alan yeni damarların büyük bir kısmı venüllerden oluşurken, az bir kısmı ise arteriollerden oluşur. Bu damarlar, stromaya doğru progresif olarak ilerleyerek, arteriol, venül ve kapillerleri oluşturmak üzere matürasyona uğrarlar (27,30). Vaskülarizasyon süreci limbustan başlar, eğer kornea ile iris arasında temas varsa, iris damarları korneaya penetre olur ve korneal skar boyunca yayılır. Sonuçta, genellikle korneanın bir tabaka veya bölgesinde sınırlandırılmış, skatrisyel dokunun içinde anastomozların görüldüğü yaygın vasküler bir ağ oluşur (27).

Enflamatuvar durumlarda damarların oluşumu, sıklıkla lökosit infiltrasyonunu takip eder ve üçgen şeklindeki damar kümeleri enflamasyon odağına doğru büyürler. Penetran keratoplastide, konak-greft bileşke yerinde ve limbal vernal keratokonjonktivitdeki vaskülarizasyon halkası ise korneayı dairesel bir şekilde çevreler. Trahomdaki süperior limbal pannus ve süperior limbal keratokonjonktivit hariç olmak üzere, genellikle belirli bir hastalık tek bir vaskülarizasyon paterni ile karakterize değildir. Aktif enflamasyon sırasında, stromal damarlar genişleyip içi kan ile dolarken, enflamasyon baskılanınca ise içi boş hayalet damarlara dönüşürler. Enflamasyonun tekrarladığı veya iskeminin geliştiği durumlarda ise damarların içi tekrar kan ile dolar (27).

Korneal vaskülarizasyon; inhibe edici faktörlerin azalması ya da özellikle lökositler tarafından üretilen anjiogenetik faktörlerin artması sonucunda oluşur (27,31-33). Anjiogenezin çeşitli evreleri vardır bunlar:

1. Anjiogenik stimulus (ör. alkali yanık, herpes simpleks enfeksiyonu ve hipoksi).
2. Latent periyot.
3. Limbal damarların dilatasyonu.
4. Venül ve kapillerlerin bazal membranlarının enzimatik yıkımı.

5. Endotel hücre proliferasyonu ve uyarı alanına göçü.
6. Endotel hücrelerinde, tomurcuk oluşturacak şekilde uzama ve lümen oluşumu.
7. Damar tomurcuklarının birleşerek, kan akımını sağlayan vasküler tüp oluşturması.
8. Periendothelial hücrelerin, endotelial tüpleri desteklemek için toplanması.
9. Oluşan damarların matürasyonu.

2.3 ANJIOGENEZİS

2.3.1 Anjiogenezi Etkileyen Faktörler

İnsanlarda anjiogenezis, anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dağılımına bağlı olarak gelişir (34-36). Tablo 1’de anjiogenik ve antianjiogenik faktörler yer almaktadır.

Tablo 2.1: Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler

Anjiogenik Faktörler	Antianjiogenik Faktörler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü)	Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü
PIGF (Plasental büyüme faktörü)	Endostatin
FGF (Fibroblast büyüme faktörü)	Vazostatin
TGF (Transforme edici büyüme faktörü)	Anjiostatin, insan makrofaj metalloelastaz
EGF (Epidermal büyüme faktörü)	Trombospondin- 1 ve 2
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	Trombosit faktör-4 fragmanı
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)	İnterferon- α - β , Platelet Faktör -4 fragmanı
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Restin, Angiopoietin-2
IL-6, IL- 8	Antitrombin-3 fragmanı

2.3.2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (37,38). Endotel hücresinin proliferasyon, migrasyon ve diferensiasyonuna neden olur (39). Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da gerekli olup, ayrıca yara iyileşmesi, oküler neovasküler hastalıklar ve kronik enflamatuvar hastalıklar gibi birçok fizyolojik ve fizyopatolojik olayda görev almaktadır (38).

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bunların trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin (PDGF) önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. VEGF ailesi şunlardan oluşmaktadır; VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F (svVEGF) ve PlGF (plasenta büyüme faktörü) (40-43).

VEGF A, aynı zamanda İnsan-VEGF'si olarak bilinmekte olup, VEGF-A bazı yayınlarda sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır (40). VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı tane izoformu tanımlanmıştır. Bunlar VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olarak isimlendirilmiş ve beraberindeki sayılar içerdikleri aminoasit sayısını göstermektedir (44-46). Bunlardan göz patolojileri ile en yakın ilişkide olanın ise VEGF₁₆₅₍₁₆₄₎ olduğu bildirilmektedir (47). VEGF-A, VEGF-R1 ve VEGF-R2 reseptörlerine bağlanarak anjiogeneizde önemli bir mediatör olarak görev alır. VEGF sayesinde, endotel hücreleri proliferer olup, göç edip, dizilerek, yeni damarlar için öncü olan tüp formasyonu oluşmasını sağlayarak anjiogenezisi uyarmaktadır (48).

VEGF-B; vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmasında rol alır (49).

VEGF-C; lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelyal hücrelerde mitojenik etki yapar (41, 49).

VEGF-D; VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar (42, 49).

VEGF-E; güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktörü olup, VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir (49).

VEGF-F (svVEGF); ilk kez yılan zehirinde tespit edilmiş olup, VEGF'nin moleküler yapısına çok benzeyen bir moleküldür. Anjiogenezi ve damar permeabilitesini artırır (43).

PlGF; VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesi olup, VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir (49).

2.3.3 VEGF Sentezi

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), fibroblast büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör- α (TNF- α), transforming büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve interleukin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Bu maddelerin etkisi ile VEGF salgılanmakta ve anjiogenezi oluşmaktadır (50).

Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını uyarak anjiogenezi başlatan en önemli etkenlerden biridir. Buna örnek olarak, hızla büyüyen tümörlerin merkezlerinde hipoksik alanlar oluşur, bu durumu ortadan kaldırmak için tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artar ve yeni damar oluşumu uyarılır. Hipoksi dışında pH düşüklüğü ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (39,51).

2.3.4 VEGF Reseptörleri

VEGF, damar endotel hücrelerine reseptörler aracılığı ile bağlanır. Bu reseptörler VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1 ve sVEGFR-2'dir (48).

İlk bulunan reseptörler VEGF reseptör-1 (VEGFR-1, flt-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk-1, KDR)'dir. VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin farklı sinyal özellikleri olduğu gösterilmiştir (52). VEGFR-1 reseptörü, VEGF-A, VEGF-B, svVEGF ve PlGF'nin etkilerine aracılık etmekte olup, anjiogeneziste sinyalizasyonu baskılayarak negatif yönde bir etki göstermektedir (37).

VEGFR-2 ise VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve svVEGF'nin etkilerine aracılık eder. Farelerde yapılan bazı çalışmalarda, VEGFR-2'nin eksik veya bozuk ekspresyonu durumunda, hematopoetik prekürsörlerin, farklılaşmış endotel hücrelerinin ve organize kan damarlarının gelişmediği görülmüştür. Bu da

VEGFR-2'nin hem endotelial hem de hematopoetik öncül hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğunu göstermektedir. VEGFR-1'in yapımındaki aksaklıklarda ise uygun endotel hücreleri oluşabilmekle birlikte, bu damarların aşırı genişlediği ve yapısal bazı bozukluklara sahip olduğu bildirilmiştir. Bu olay da VEGFR-1'in hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimleri ile doku mimarisinin belirlenmesinde rolü olduğunu göstermektedir (52).

VEGFR-1, VEGF-A ve PlGF'ye yüksek affinite ile bağlanır ama iyi bir proliferasyon ve kemotaktik yanıt elde edilemez. Ancak, PlGF'ye bağlanmayan ama VEGF'ye sıkıca bağlanan VEGFR-2 ile iyi cevap alınır (50). Yapılan bir çalışmada, bu reseptörlerden yoksun domuz aortik endotel hücrelerine sadece VEGFR-2 kodlayan bir plazmid verildiğinde, bu hücrelerin mitoz geçirdikleri ve kemotaksiste yer aldıkları gösterilmiştir (53). Bu da bize VEGFR-2'nin mitoz ve kemotaksisten sorumlu olduğunu göstermektedir. İnsan göbek kordonu veninden elde edilen endotel hücre kültüründe VEGFR-2 aktive edildiğinde, anti-apoptotik etkilerin gerçekleştiği gösterilmiştir (41).

VEGFR-3 (flt-4); özellikle lenfatik damarların gelişiminde rol alan VEGF-C ve VEGF-D'nin bağlandığı reseptördür ve lenfanjiogeneze rol alır (52).

sVEGFR-1; bu form VEGFR-1'in kompetitif inhibitörü olarak görev yapmaktadır (54).

sVEGFR-2; VEGFR-2'nin plazmada serbest olarak dolaşan çözünebilir bir formu olup, anjiogenezi engelleyici rol oynadığı düşünülmektedir (48,55).

2.4 APOPTOZİS

Apoptozis, programlı hücre ölümü olup, fizyolojik ve patolojik şartlar altında ortaya çıkmaktadır. Apoptozis sırasında hücrede DNA düzgün bir şekilde kırılır ve kondanse olur, organel, hücre zarı bütünlüğü korunur, apoptotik hücreler çevre hücreler tarafından fagosite edilir (56). Apoptozis; retina dejenerasyonları, retina iskemisi, retina dekolmanı, keratokonus, kuru göz, glokom ve travma sonrası korneal yara iyileşmesi gibi pek çok durumda rol oynamaktadır (57-60). Keratosit apoptozisinin, kornea doku organizasyonunda, travmaya karşı yanıtta ve bazı

hastalıkların patogeneğinde rol aldığı düşünülmektedir (61). Keratosit apoptozisi, epitel hasarını takiben meydana gelen ilk değişiklik olup yara iyileşme sürecinin başlangıcını oluşturduğu düşünülmektedir. Keratosit apoptozisinin başlamasından sonra derin ve periferik yerleşimli keratositler proliferasyon olarak, ölen keratositlerin yerini alıp miyofibroblastlara dönüşerek, kollajen ve glikozaminoglikan salgırlar. Daha sonra ise epitelyal hiperplazi ve remodeling ile süreç tamamlanır (62). Fotorefraktif keratektomi (PRK) sonrasında, tavşanlarda oluşan aşırı korneal yara iyileşmesinin vitamin E ile önlenbildiğı bildirilmiştir (63). Topikal askorbik asidin, excimer laser keratektomi sonrası meydana gelen serbest oksijen radikallerinin neden olduğu, doku hasarı ve akut enflamatuar reaksiyonu azalttığı gösterilmiştir (64).

2.5 KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYONDA TEDAVİ

Korneal neovaskülarizasyona neden olan hastalığın patogeneğine göre tedavi stratejisi değişmekle birlikte, korneal neovaskülarizasyon için halen değişik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Korneal neovaskülarizasyonun nedenine bağılı olarak, tedavi seçeneğı ve tedaviye olan yanıt da değişebilmektedir. Tedavide medikal ve cerrahi seçenekler mevcuttur (5,6,65-76).

Korneal neovaskülarizasyonu azaltmak için klinik ve deneysel çalışmalarda kortikosteroidler, nonsteroid antienflamatuarlar, heparin, siklosporin A, rapamisin, FK 506, somatostatin analogu (octreotid asetat), izoflovanoidler, doksisisiklin, heparan sülfat, genistein, suramin, metotreksat, talidomid, spironolakton, topikal IL-1 reseptör antagonistleri, bevasizumab gibi medikal tedavi yöntemleri mevcuttur. Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde çok fazla ajan denenmiş olmakla birlikte, topikal kortikosteroidler hala en sık kullanılan ilaçlardır (5,6,65-76).

Anjiogenezis tedavisinde, argon laser fotokoagülasyon, vertoporfin ile fotodinamik tedavi ve damarların direkt koterizasyonu gibi tedavi yöntemleri de kullanılabilir. Bunlara ilave olarak, kornea neovaskülarizasyonunda limbal kök hücre ve amnion zarı transplantasyonu, uygun olgularda yararlı olabilmektedir (77,78).

Bu tedavi seçeneklerinin etkinliğı ve güvenilirliğini saptamak amacıyla halen araştırmalar devam etmektedir.

2.5.1 Deksametazon

Deksametazon, sentetik kortikosteroid analogu, güçlü bir antiinflamatuvar ilaçtır. Gözde birçok enflamatuvar ve immün hastalıkta kullanılmaktadır. Anjiostatik steroidler olarak adlandırılan ve deksametazonu da içeren bir kısım steroidlerin antianjiogenik fonksiyonları olduğu bildirilmiştir (79). Çeşitli hayvan modellerinde deksametazonun antianjiogenik etkisi gösterilmiştir (80). Ayrıca deksametazonun korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (81). Klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, deksametazon ve diğer steroidlerin antianjiogenik etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (10,82). Bununla birlikte, kortikosteroidlerin, membran fosfolipidlerinden araziidonik asit oluşumunu inhibe ederek, prostaglandin ve lökotrienler gibi enflamatuvar mediatörlerin azalması yoluyla anjiogenezisi inhibe ettiği öne sürülmektedir (9).

2.5.2 Bevasizumab

Bevasizumab, insan VEGF-A izoformuna spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal IgG1 antikordur. Bevasizumab, VEGF-A'nın bütün izoformlarına bağlanır (83). Bevasizumab, VEGF'nin damar endotelial hücrelerinin yüzeyindeki VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanmasını inhibe ederek damar oluşumunu baskılar (83-85). Bu etkisinden dolayı ilk olarak metastatik kolorektal kanserlerde antianjiogenik ajan olarak intravenöz yolla kullanılmaya başlanmıştır (86). Bu kullanımda, yeni damar oluşumunu baskılamada etkili olduğunun gösterilmesi üzerine, meme ve böbrek kanseri gibi diğer bazı kanserlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda bevasizumab, yaşa bağlı eksudatif maküla dejenerasyonu, santral retinal ven tıkanıklığına bağlı maküler ödem, diabetik retinopati, neovaskülarizasyonla seyreden retina ve koroid hastalıkları, üveite bağlı gelişen maküla ödeminde yoğun olarak kullanılmakta ve etkili olduğu bildirilmektedir (87-92). Neovasküler glokomda intrakameral olarak kullanılan bevasizumab ile oldukça başarılı sonuçlar bildirilmektedir (93). Bevasizumabın korneal neovaskülarizasyondaki etkinliği ise

son üç yıldır araştırılmakta olup, bu amaçla yapılan klinik çalışma ve hayvan modellerinde subkonjonktival ve topikal kullanım ile korneal neovaskülarizasyonun inhibe edildiği gösterilmiştir (83,94).

Bu tez çalışmasındaki amacımız; tavşanlarda gümüş nitrat-potasyum nitrat ile oluşturulan deneysel kornea neovaskülarizasyonunda, topikal deksametazon, subkonjonktival bevasizumab ve topikal bevasizumabın korneal neovaskülarizasyon üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma, deney hayvanları etik kurulunun 2007/300–13 sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda toplam 24 adet Yeni Zelanda cinsi (2500–3500 gr) erişkin erkek tavşan kullanıldı. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (22°C) tutuldular. Tüm denekler standart palet tavşan yemi ile beslendi, şebeke suyu kullandı ve düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. Deneyde toplam 4 grup oluşturuldu ve deneklerin sadece sol gözleri çalışmaya alındı. Bütün gruplara korneada kimyasal yanık oluşturma öncesinde ketamin (Ketalar[®], Pfizer, Kırklareli, Türkiye) 10 mg/kg dozunda kas içine (im), ksilazin (Basilazin[®], Bavet, Börsensel, Almanya) 5 mg/kg dozunda im verilerek genel anestezi yapıldı. Kimyasal yanık öncesinde % 0.5 proparakain hidroklorür göz damlası (Alcaine[®], Alcon, Puurs, Belçika) deneklerin sol gözlerine bir kez damlatıldı. Kimyasal yanık oluşturmak için % 75 gümüş nitrat, % 25 potasyum nitrat bileşiminden oluşan aplikatör (HemoStop[®], Hizmet Medikal, İstanbul, Türkiye) saat 12 hizasında, limbustan 3 mm uzaktaki parasantral korneaya 10 saniye süreyle uygulanarak, ortalama 2-2.5 mm çapında yanık oluşturuldu. Kimyasal yanık sonrası, kornea ve konjonktiva % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkandı. Deney süresi tüm gruplar için yanık sonrası 10 gün olarak planlandı.

Grup 1 (n=6): Korneada kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra başlamak üzere, topikal %0.9'luk NaCl çözeltisi, günde iki kez, on gün boyunca damlatıldı.

Grup 2 (n=6): Korneada kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra başlamak üzere, topikal %0.1 deksametazon (Onadron Simple[®], İ.E. Ulagay, İstanbul, Türkiye), günde iki kez, on gün boyunca damlatıldı.

Grup 3 (n=6): Korneada kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra, 0.1 ml, 2.5 mg bevacuzimab (Altuzan[®], Roche, Sanfransisko, ABD), limbusun 2 mm gerisine üst konjonktiva altına bir kez yapıldı.

Grup 4 (n=6): Korneada kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra başlamak üzere, topikal 25 mg/ml'lik (%2.5) bevacuzimab (Altuzan[®], Roche, Sanfransisko, ABD), günde iki kez, on gün boyunca damlatıldı.

Deney bitiminde, tavşanların sol göz fotoğrafları alındıktan sonra, tüm deneklere, ketamin 10 mg/kg im ve ksilazin 5 mg/kg im verilerek genel anestezi sağlandı ve takiben denekler sakrifiye edilerek sol göz korneaları limbusun 1 mm gerisinden bistüri ve makas yardımıyla çıkarıldı. Doku örnekleri, ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit çözeltisinde 24 saat süreyle tespit edildikten sonra, rutin doku takip işlemlerinden geçirilen kornealar parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan, 4-5 µm kalınlığında, limbus bölgesinden başlayarak, yanık bölgesine ulaşıncaya kadar seri kesitler alındı. Farklı bölgelerden alınan kesitlerin bir kısmı hematoksilin eozin (HE) ile boyandı. Bu alanlarda anjiogenezis, ödem ve enflamasyon değerlendirildi. Anjiogenezis, limbusa yakın olan alanlarda X40 objektif büyütmesi ile her deneğe ait kesitte altı farklı alanda damar sayımı yapılarak değerlendirildi. Korneal stromadaki kollajen liflerin düzeninin incelenmesi için, Masson Trikom (Bioptica[®], Milano, İtalya) boyaması yapıldı. Apoptotik hücrelerin tanımlanması ve sayılması için, polilizinli lam üzerine 3-4 µm kalınlığında kesitler alınıp, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) metodu uygulanarak, immünohistokimyasal boyama (In Situ Death Detection Kit, POD[®], Roche, Mannheim, Almanya) yapıldı. Apoptozis değerlendirmesi, her deneğe ait kornea kesitlerinde X40 objektif büyütme ile farklı 5 alandaki pozitif boyanan apoptotik hücreler sayılarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde ifade edildi. Gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırmada, Kruskal-

Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopik Bulgular

Deneklerin makroskopik fotoğrafları Şekil 4.1-4.4’de görülmektedir. Topikal %0.9 NaCl verilen kontrol grubunda (Grup 1), belirgin korneal vaskülarizasyon görülmekte iken (Şekil 1), topikal deksametazon verilen grupta (Grup 2) ise korneal vaskülarizasyonun kontrol grubuna göre daha az olduğu görülmektedir (Şekil 2). Subkonjonktival (Grup 3) ve topikal bevasizumab (Grup 4) gruplarında ise vaskülarizasyonun belirgin olarak daha az olduğu görülmektedir (Şekil 3,4).



Şekil 4.1: Topikal %0.9 NaCl kontrol grubu (Grup 1).



Şekil 4.2: Topikal deksametazon grubu (Grup 2).



Şekil 4.3: Subkonjonktival bevasizumab grubu (Grup 3).



Şekil 4.4: Topikal bevasizumab grubu (Grup 4).

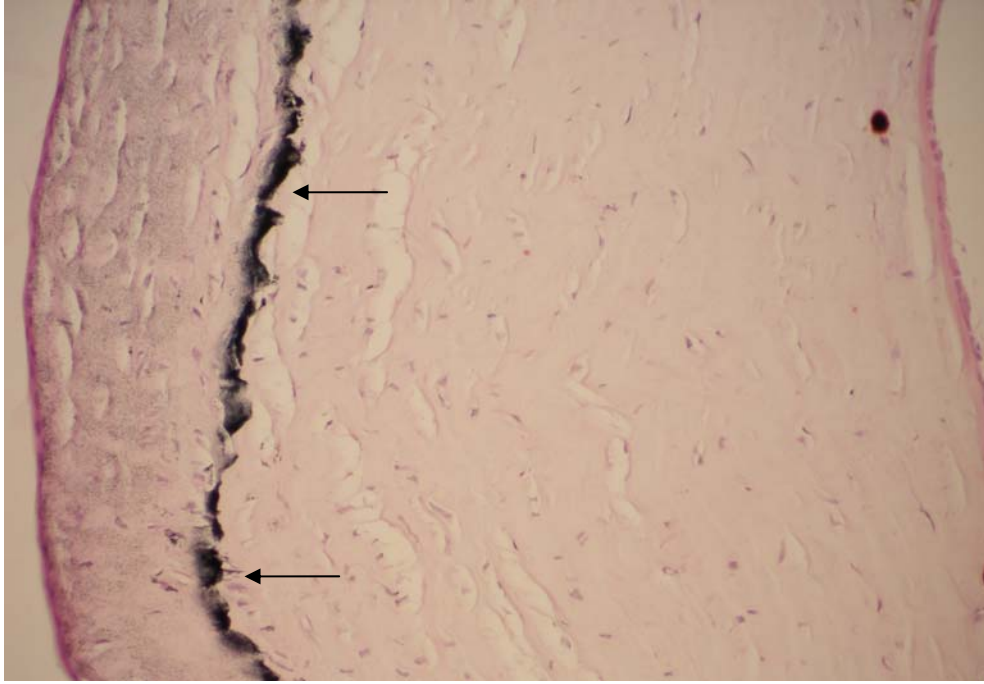
4.2 Işık Mikroskopik Bulgular

Deney süresi olan onuncu günün sonunda, tüm gruplarda yanık alanlarındaki epitelin kendini yenilediği ve yara iyileşmesinin gerçekleşmiş olduğu gözlenmiştir. Kendini yenileyen epitel birkaç sıradan meydana gelmiştir. Yanık bölgesinde, rejenere epitel tabakasının altında ve stroma tabakasında gri – siyah granüller halinde biriken gümüş nitrat-potasyum nitrat kalıntıları dikkati çekmektedir. Oluşturulan yanık çok derin olmadığı için yanık alanlarında anjiogenezis, enflamatuvar hücre artışı şiddetli olarak gözlenmemiştir. Anjiogenezis limbusa yakın olan yanık periferinde değerlendirilmiştir.

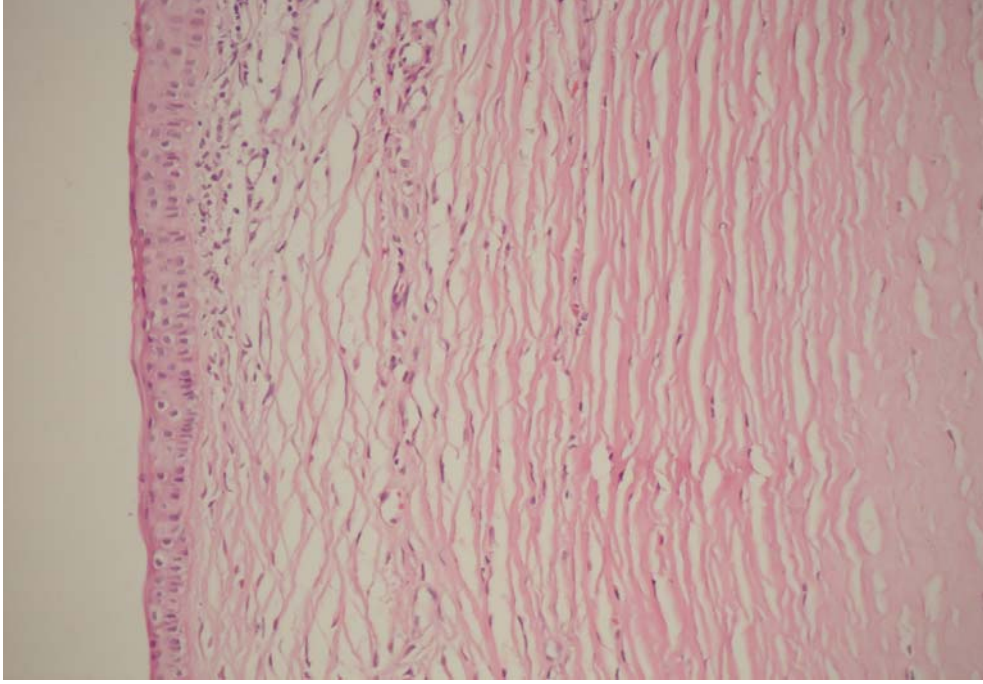
4.2.1 Hematoksilen Eozin Boyama

Korneal yanık oluşturulup % 0,9 NaCl çözeltisi damlatılan kontrol grubunda (Grup 1), yanık alanında epitel hücre katı 1-2 sıradan oluşmaktaydı. Stroma tabakasındaki kollajen liflerin düzeni oldukça bozulmuş olup, yoğun ödemden dolayı

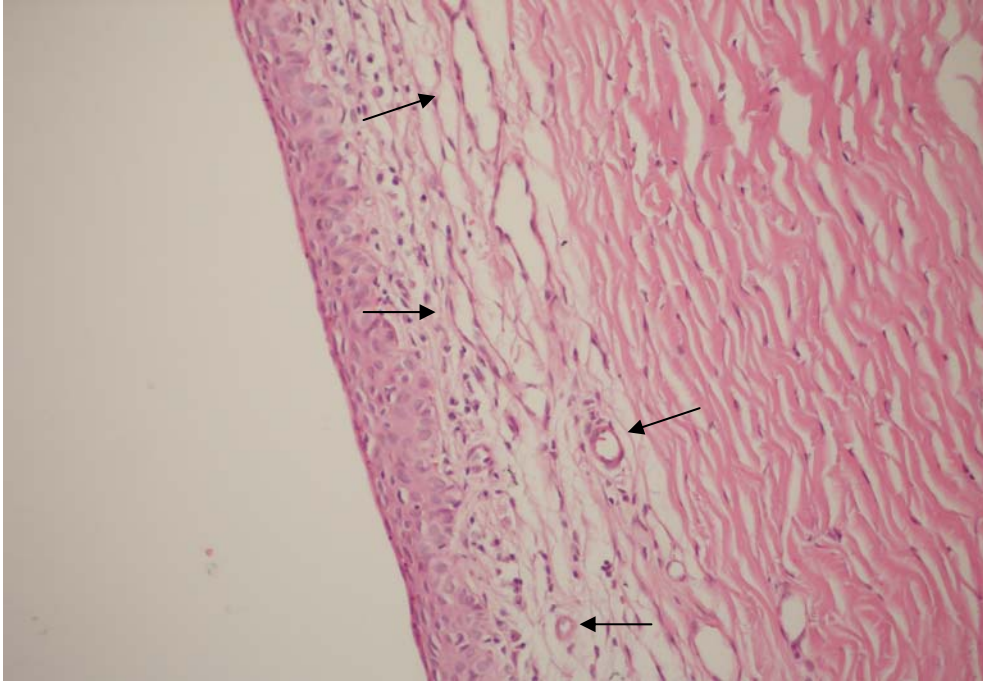
araları açılmış olarak görüldü. Periferde anjiogenezin görüldüğü alanlarda, fibroblast ve enflamatuar hücre artışı dikkati çekti (Şekil 4.5, 4.6). Topikal dexametazon ile tedavi edilen grupta (Grup 2) kornea epiteli ve stroması kontrol grubuna benzer şekilde ödem ve enflamatuar hücre içermekle birlikte, bu bulguların şiddeti kontrol grubuna göre daha hafif olarak saptandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.5: Grup 1’de kornea epiteli incelmış ve stromada belirgin ödem izlenmektedir. Ayrıca stromada siyah granüller halinde gümüş nitrat kalıntıları (→) görülmektedir (HE, X20).



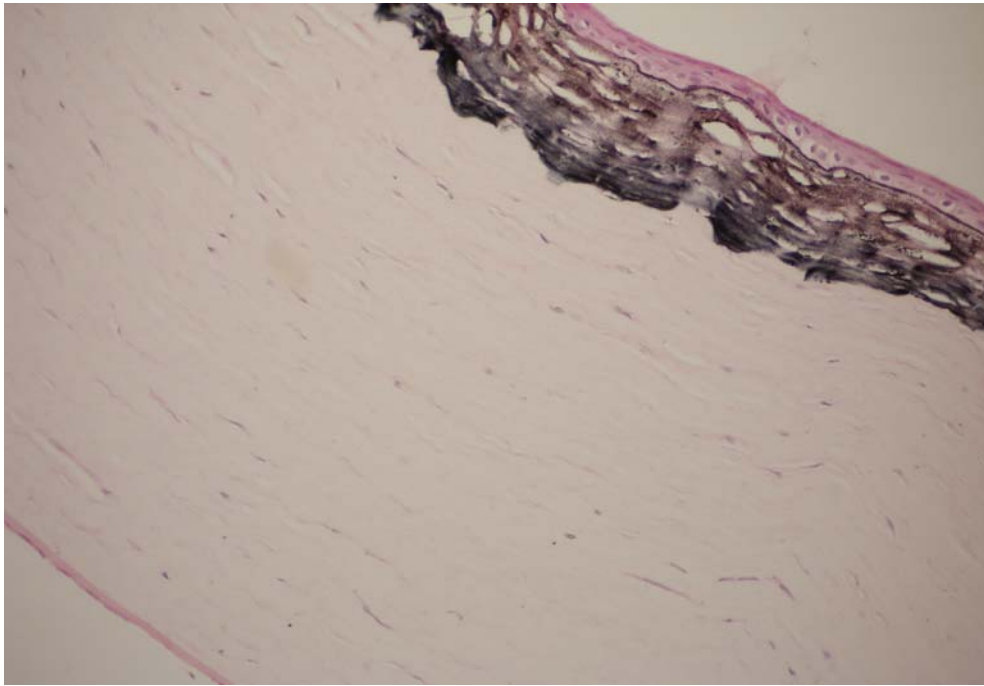
Şekil 4.6: Grup 1’de stromada ödem, kollajen liflerde ayrılma ve düzensizleşme olup, enflamatuvar hücrelerde artış ve anjiogenezis gözlenmektedir (HE, X20).



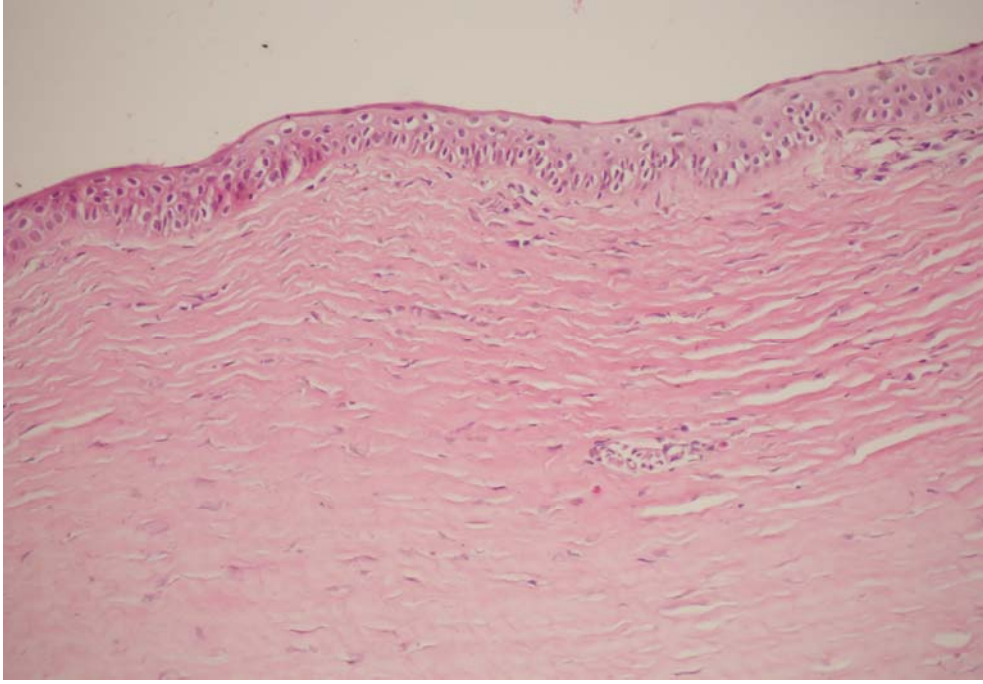
Şekil 4.7: Grup 2’de, kontrol grubuna benzer şekilde stromal ödem, enflamatuvar hücre artışı ve anjiogenezis (→) belirgin olarak izlenmektedir (HE, X40).

Subkonjonktival bevasizumab enjeksiyonu yapılan grupta (Grup 3), yanık alanındaki epitelin 2-3 sıralı olduğu izlendi. Stromadaki kollajen liflerin daha düzenli olduğu, ödemin azlığına bağlı olarak lifler arasındaki açılmanın azaldığı ve yanık periferinde enflamatuvar hücrelerin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.8, 4.9).

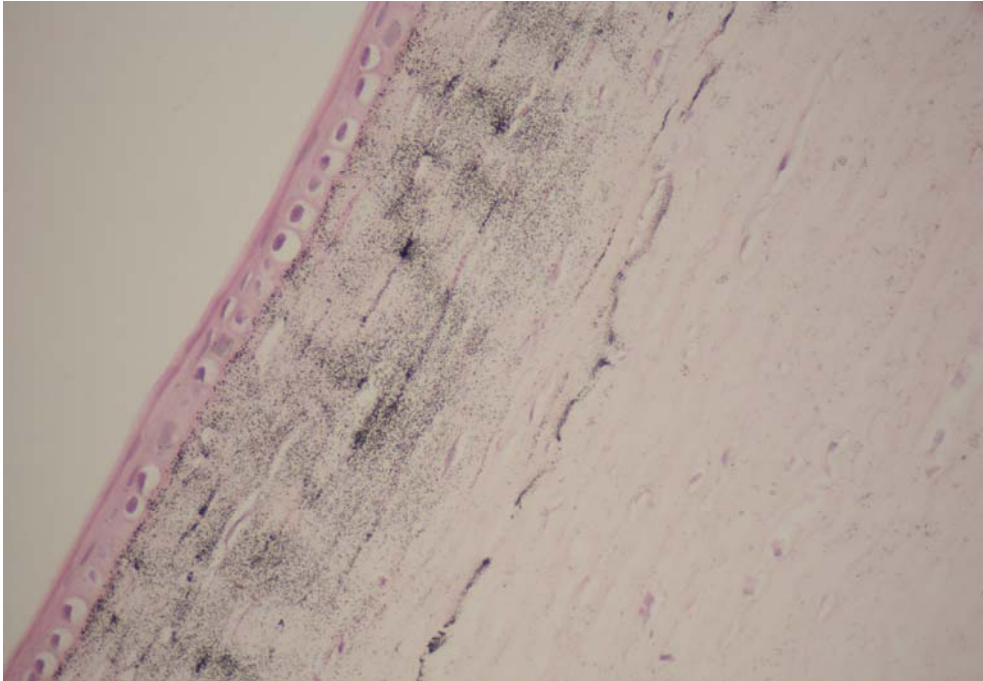
Topikal bevasizumab uygulanan grupta (Grup 4) ise subkonjonktival bevasizumab uygulanan gruba benzer şekilde yanık periferinde epitel çok katlı olarak izlenirken, stromal kollajen lifler daha düzenli olup, bu alanlarda ödem gözlenmedi (Şekil 4.10, 4.11).



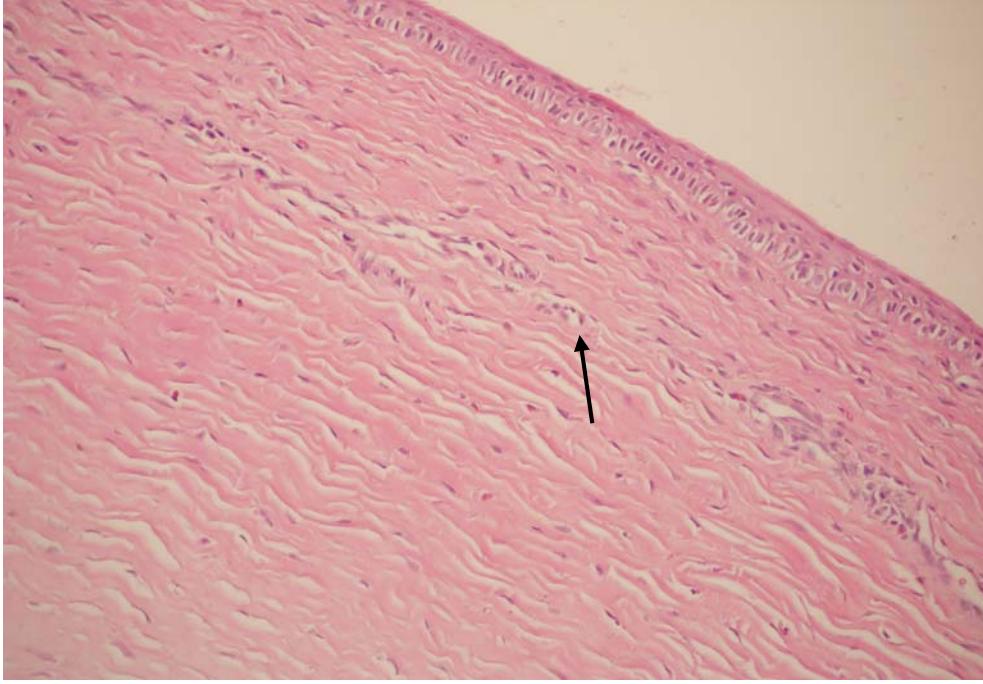
Şekil 4.8: Grup 3'te yanık alanındaki epitel ince ve düzgün görülürken, stromal kollajen lifler düzenli olup, ödem izlenmemektedir (HE, X20).



Şekil 4.9: Yanık periferinde subkonjonktival bevasizumab grubundaki mikroskopik bulgular, topikal bevasizumab grubuna benzemektedir (HE, X40).



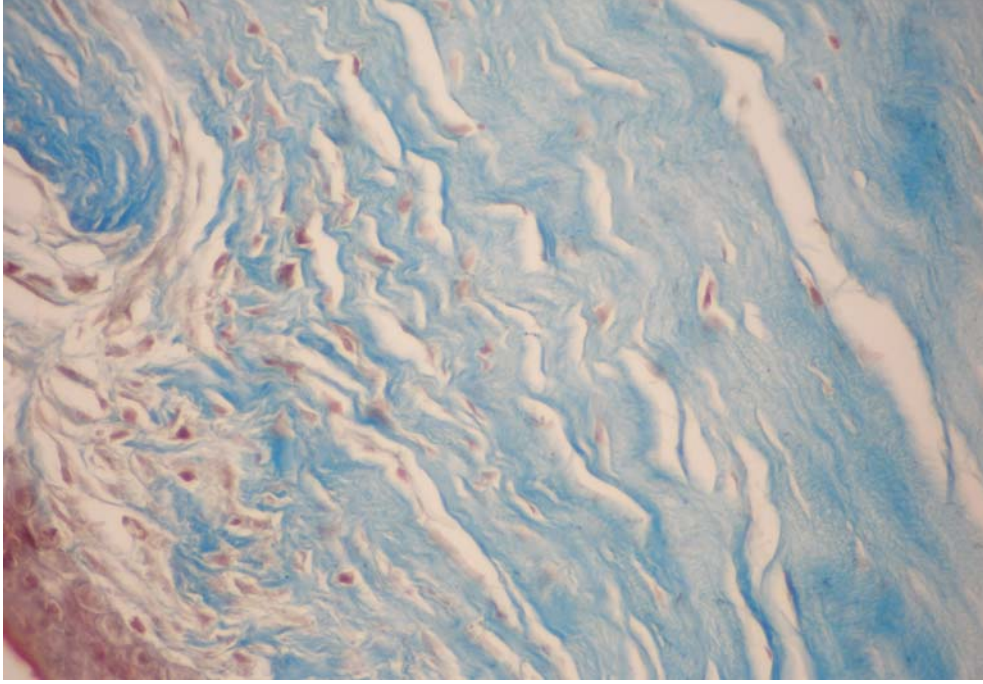
Şekil 4.10: Topikal bevasizumab uygulanan grupta yanık bölgesinde epitel düzenli olup, stromada ödem gözlenmemektedir (HE, X40).



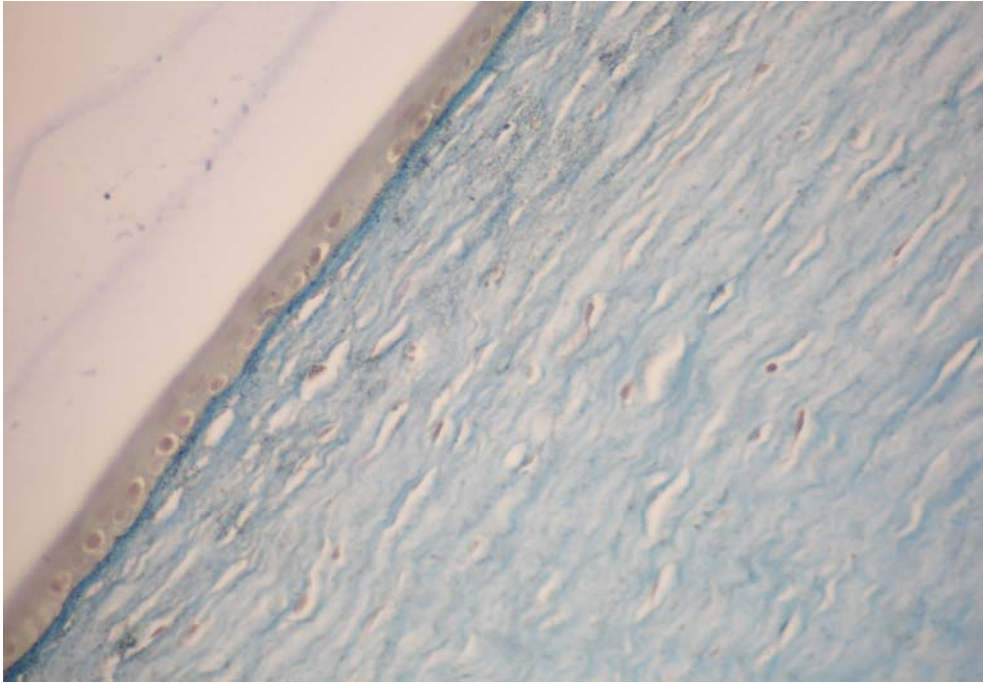
Şekil 4.11: Topikal bevasizumab uygulanan grupta damarlar (→) daha az sayıda, epitel ve kollajen lifler düzenli olup, ödem gözlenmemektedir (HE, X40).

4.2.2 Masson Trikrom Boyama

Kontrol ve topikal deksametazon grubunda, epitel altındaki bölgede, HE boyama ile uyumlu olarak, kollajen liflerin düzeninin bozulduğu ve bu alanlarda şiddetli ödem olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Topikal ve subkonjonktival bevasizumab gruplarında ise kollajen lifler daha düzenli olup, bu alanlarda belirgin bir ödem gözlenmedi (Şekil 4.13).



Şekil 4.12: Kontrol grubunda, yanık sınırında stromada kollajen liflerin düzeni bozulmuş olup, yoğun ödem izlenmektedir (Masson Trikrom, X40).



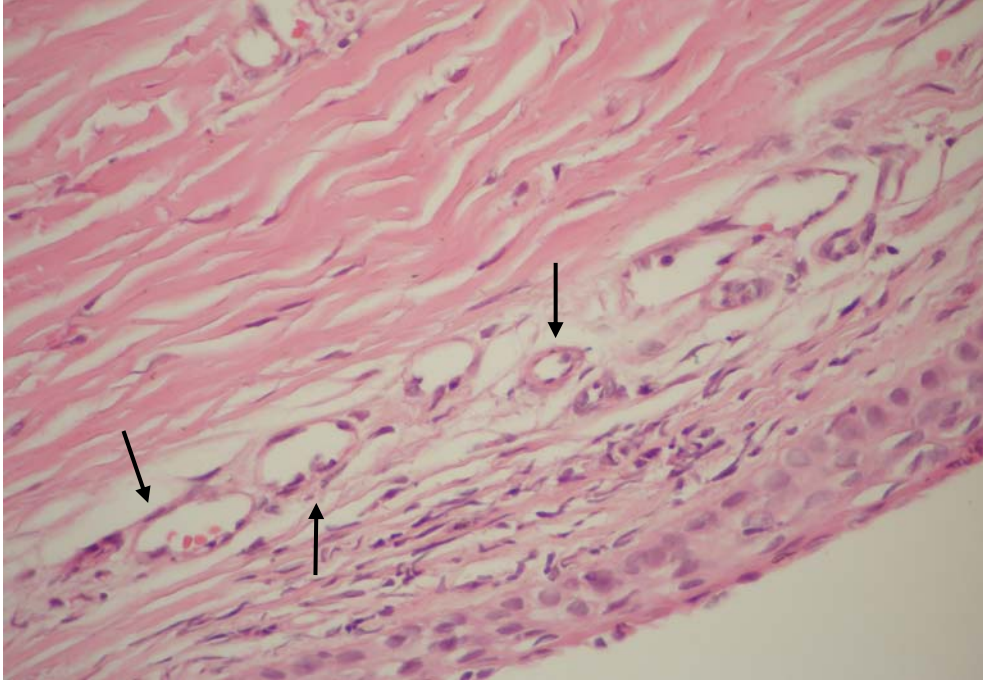
Şekil 4.13: Topikal bevasizumab grubunda, epitel ince, kollajen lifler düzenli olarak görülmektedir (Masson Trikrom, X20).

4.2.3 Anjiogenezis Değerlendirilmesi

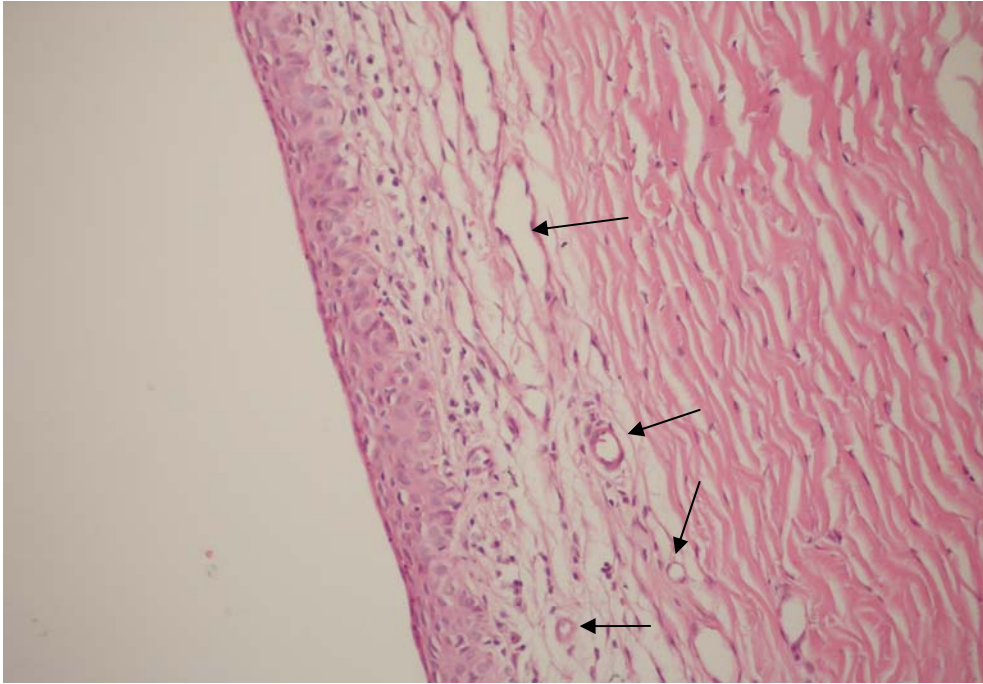
Tablo 4.1’de gruplardaki ortalama damar sayıları gösterilmektedir. Kontrol grubunda özellikle yanık periferinde limbusa yakın olan alanlarda neovaskülarizasyonun belirgin olarak arttığı gözlenmektedir (Şekil 4.14). Topikal deksametazon uygulanan grupta ise bu alanlarda neovaskülarizasyon izlenmekle birlikte, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olarak gözlemlendi [(p=0.01), (Şekil 15)]. Topikal ve subkonjonktival bevasizumab gruplarında neovaskülarizasyonun oldukça azalmış olduğu, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (p=0.32). Topikal ve subkonjonktival bevasizumab grupları, kontrol grubu ve topikal deksametazon grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık mevcuttu [(Sırasıyla; p=0.004, p=0.004, p=0.004, p=0.004), (Şekil 4.16, 4.17)].

Tablo 4.1: Grupların ortalama damar sayıları

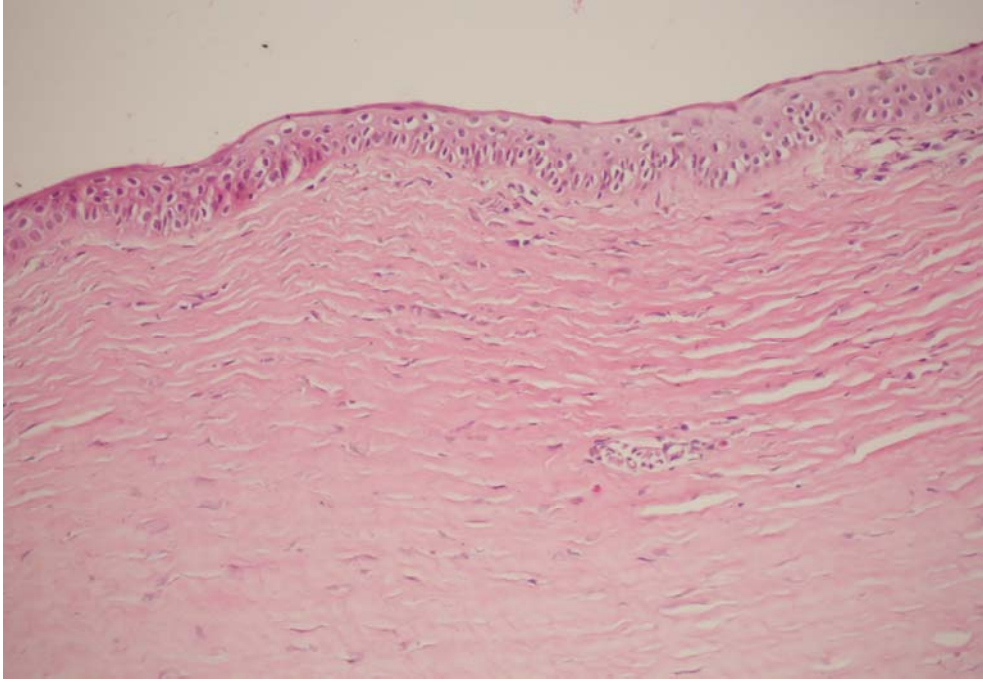
Gruplar	Damar sayıları $\pm$ SD
Grup 1	6.76 $\pm$ 1.03
Grup 2	5.03 $\pm$ 0.42
Grup 3	3.36 $\pm$ 0.15
Grup 4	3.46 $\pm$ 0.24



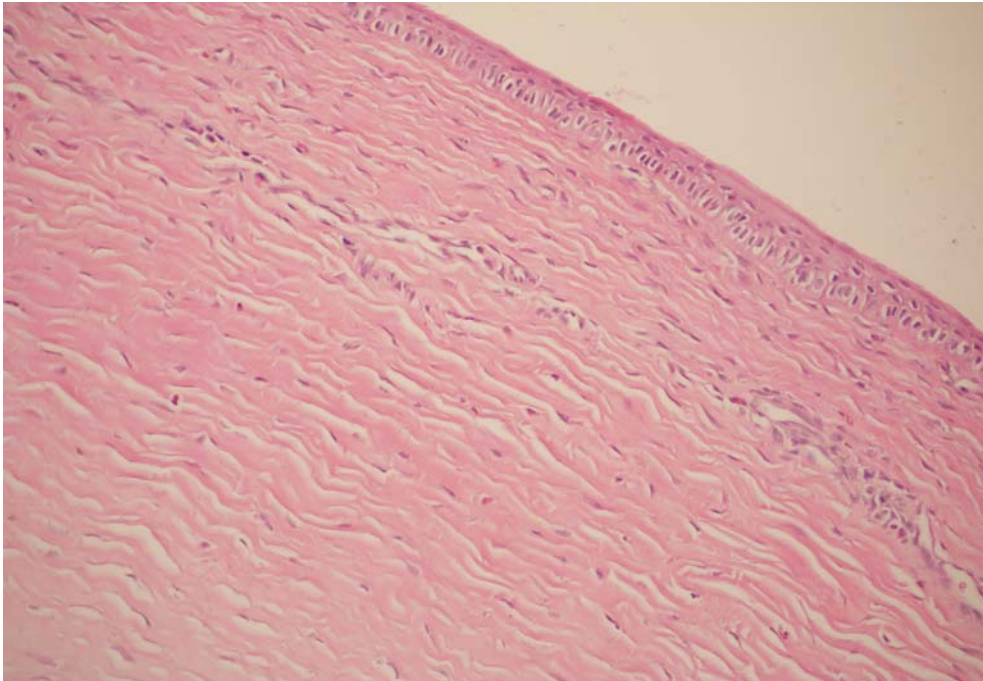
Şekil 4.14: Kontrol grubunda yeni damar oluşumları (→) izlenmektedir (HE, X40).



Şekil 4.15: Topikal deksametazon uygulanan grupta, kontrol grubuna benzer şekilde ödem, enflamatuvar hücreler ve neovaskülarizasyon belirgin olarak izlenmektedir (HE, X40).



Şekil 4.16: Subkonjonktival bevasizumab grubunda neovaskülarizasyon daha az olarak izlenmektedir (HE, X40).



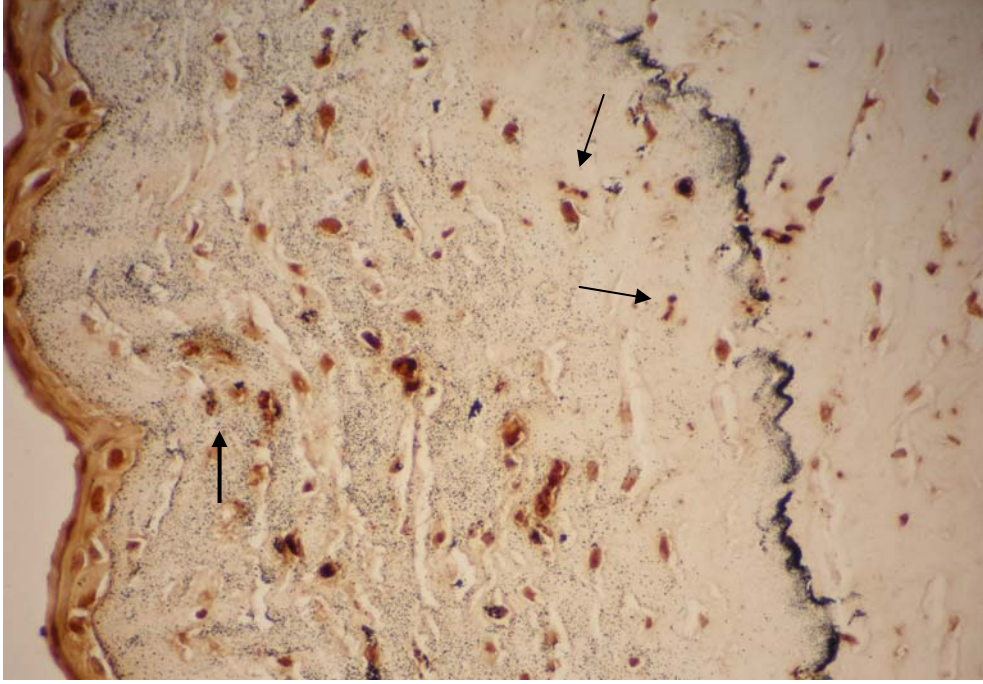
Şekil 4.17: Topikal bevasizumab grubunda neovaskülarizasyon daha az olarak izlenmektedir (HE, X40).

4.2.4 Apoptozis Değerlendirilmesi

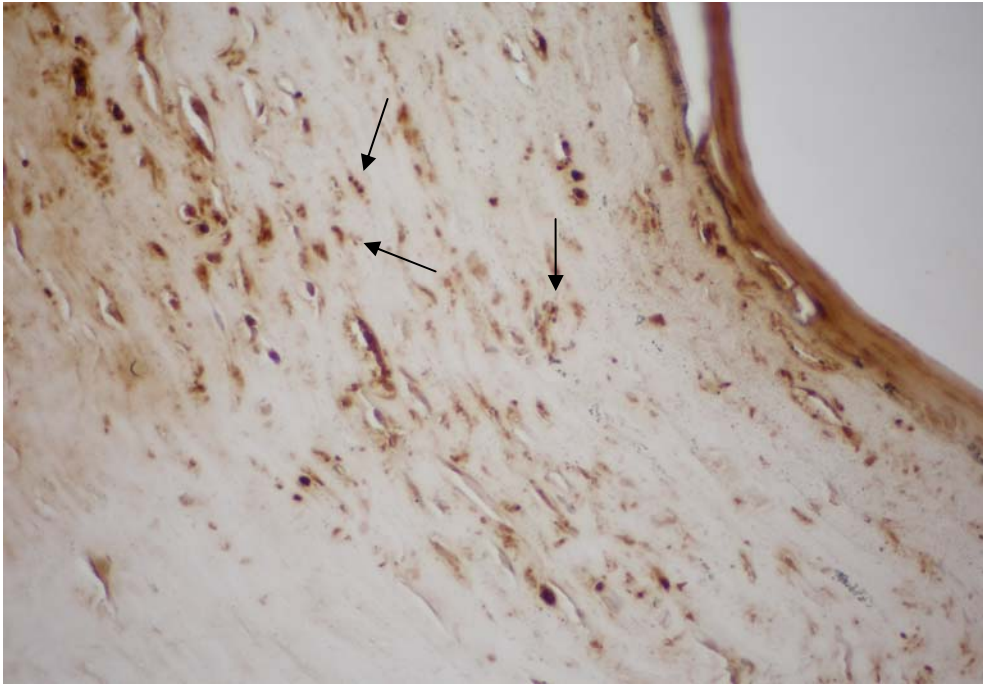
Tablo 4.2’de, gruplardaki apoptotik hücre değerlendirmesi gösterilmiştir. Buna göre; kontrol grubunda TUNEL boyama ile ortalama 6.36 ± 2.49 , topikal deksametazon grubunda ise ortalama 3.68 ± 0.38 apoptotik hücre varken, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı [(p=0.065), (Şekil 4.18, 4.19)]. Subkonjonktival ve topikal bevasizumab gruplarında ise kornea stromasında TUNEL (+) hücreler azalmış olarak tespit edilirken, subkonjonktival bevasizumab grubunda kornea epitelinde az sayıda TUNEL (+) hücre gözlemlendi (Şekil 4.20, 4.21). Subkonjonktival bevasizumab grubunda ortalama 1.10 ± 0.37 , topikal bevasizumab grubunda ise 1.30 ± 0.20 apoptotik hücre tespit edilirken, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0.032). Bu iki grup, kontrol grubu ve topikal deksametazon grubu ile karşılaştırıldığında, apoptotik hücre sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi [(Sırasıyla; p=0.004, p=0.004, p=0.004, p=0.004)].

Tablo 4.2: Grupların ortalama TUNEL (+) apoptotik hücre sayıları.

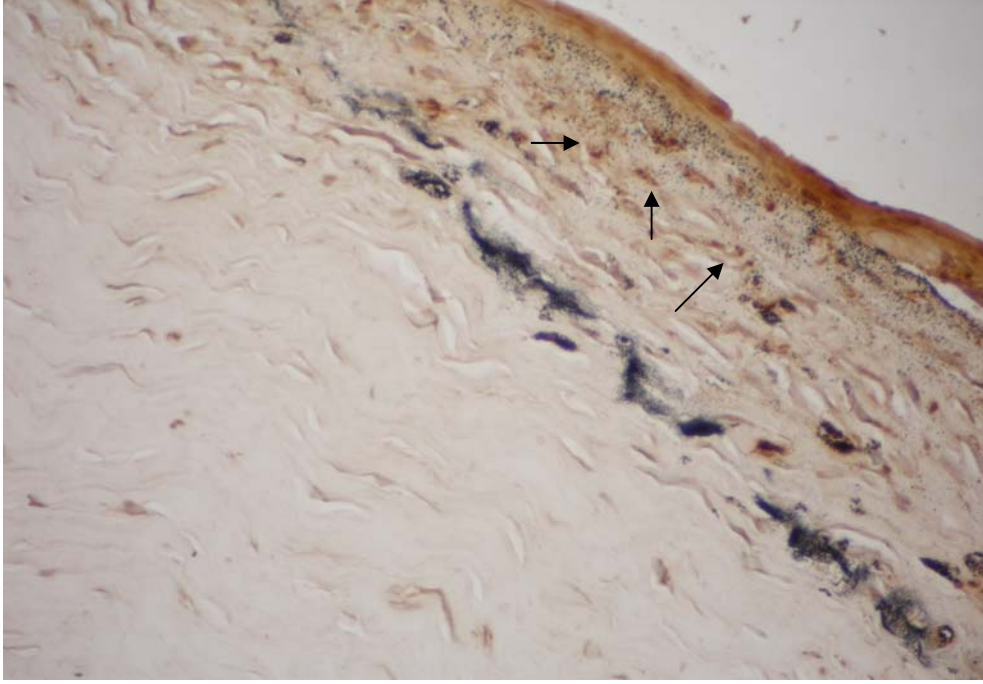
Gruplar	TUNEL (+) hücre sayısı $\pm$ SD
Grup 1	6.36 ± 2.49
Grup 2	3.68 ± 0.38
Grup 3	1.10 ± 0.37
Grup 4	1.30 ± 0.20



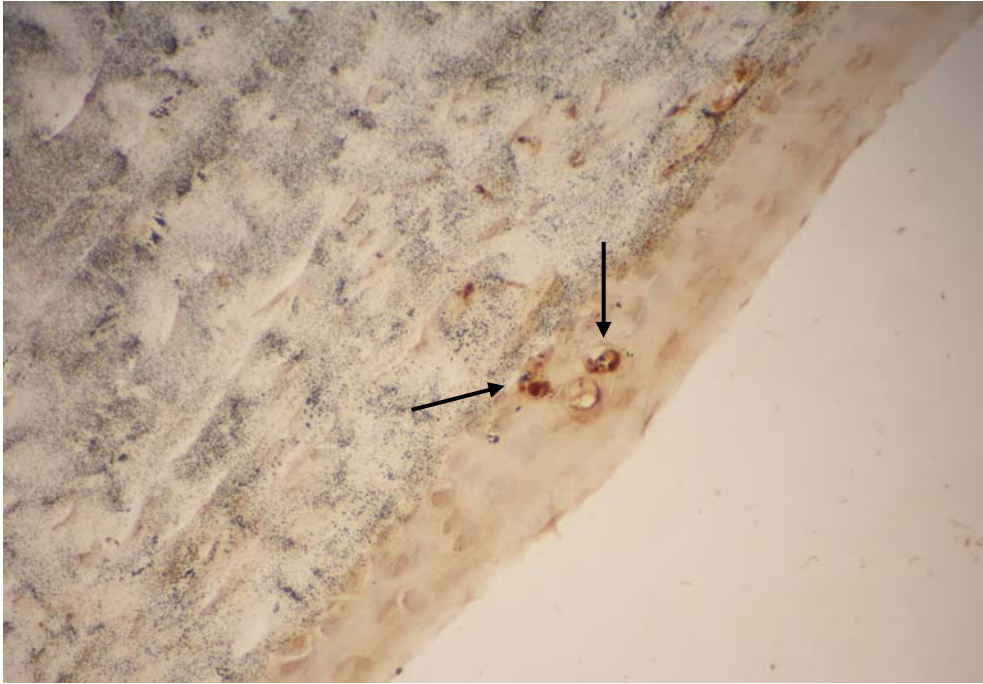
Şekil 4.18: Kontrol grubunda apoptotik cisimcikler (→) artmış olarak görülmektedir (TUNEL, X40).



Şekil 4.19: Topikal deksametazon grubunda stromada apoptotik cisimcikler (→) görülmektedir (TUNEL, X40).



Şekil 4.20: Topikal bevasizumab grubunda, yanık bölgesinde ön stromada az sayıda TUNEL (+) apoptotik cisimcikler(→) izlenmekte iken, derin stromada ise apoptotik hücre izlenmemektedir (TUNEL, X40).



Şekil 4.21: Subkonjonktival bevasizumab grubunda stromada apoptotik cisimler gözlenmezken, epitel tabakasında apoptotik cisimcikler gözlenmektedir (TUNEL, X40).

5. TARTIŞMA

Korneal neovaskülarizasyon, herhangi bir nedenle kornea içine doğru yeni damarların ilerlemesidir (95). Birçok enflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif hastalık, travma ve hipoksi, şeffaf ve damarsız olan korneada neovaskülarizasyon gelişmesine neden olabilir (1). Korneada oluşan bu yeni damarlar, korneal iyileşme ve enfeksiyonlara karşı savaşta oldukça faydalı olmakla birlikte, korneal iyileşme tamamlandıktan sonra ise istenmeyen bir durumdur. Oluşan bu yeni damarlar sızıntı, enflamasyon ve skarlaşmaya yol açarak, korneanın şeffaflığını bozarak, görme keskinliğinde azalmaya neden olabilmektedir (2,3). Bu durumda, görme kaybına neden olan neovaskülarizasyonu önleyecek, durduracak veya geriletecek tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda, korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kortikosteroidler, nonsteroid antienflamatuvarlar, siklosporin A, somatostatin analogları, askorbik asit, talidomid, rapamisin ve metotreksatin kullanıldığı bildirilmektedir (3,5-12). Ayrıca laser fotokoagülasyon, diatermi ve fotodinamik tedavi gibi yöntemler de korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kullanılmaktadır (14-16).

Medikal tedavi yöntemleri arasında şimdiye kadar en çok tercih edilen kortikosteroidler, gözde etkinliği ve yan etkileri en iyi bilinen ilaçlardır. Kortikosteroidlerin, membran fosfolipidlerinden araşidonik asit oluşumunu baskılayarak, prostaglandin ve lökotrien gibi enflamatuvar mediatörlerin oluşumunu azaltmak suretiyle kapiller geçirgenliği ve lökosit göçünü engelleyerek, anjiogenezi inhibe ettiği öne sürülmektedir (9). Kortikosteroidler, korneal neovaskülarizasyonun önlenmesinde topikal, subkonjonktival ve sistemik olarak kullanılmaktadır.

Haynes ve ark., ratlarda gümüş nitrat-potasyum nitrat koterizasyonu ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyonu azaltmada, topikal uygulanan kortikosteroidler (deksametazon sodyum fosfat, prednizolon asetat), siklooksijenaz inhibitörleri (flurbiprofen, indometazin, ketorolak), lipooksijenaz inhibitörleri (REV 5901, esculetin, quercetin), hem siklooksijenaz hem de lipooksijenaz dual inhibitörlerinin (BW 755C, BW A540C) etkinliklerini karşılaştırmışlar, korneal neovaskülarizasyonu azaltmada kortikosteroidlerin siklooksijenaz inhibitörlerine

göre daha etkin olduğunu bildirmişlerdir (9). Benzer şekilde, Mahoney ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, ratlarda gümüş nitrat koterizasyonu ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyonun azaltılmasında, topikal deksametazon, prednizolon, tikabetazon propiyonat, ketorolak ve fenidonun etkinlikleri karşılaştırılmış, deksametazonun, diğer ilaçlardan daha etkili olduğu bildirilmiştir (96).

Dan ve ark., sodyum hidroksit ile rat korneasında neovaskülarizasyon oluşturup, 14 gün boyunca sistemik doksisisiklin, sistemik deksametazon ve topikal deksametazon uygulayarak, neovaskülarizasyonu azaltmadaki etkinliklerini araştırılmışlardır. Çalışmanın 14. gününde yapılan histopatolojik ve fotoğrafik inceleme sonucunda korneal neovaskülarizasyon oluşumunu azaltma oranı; doksisisiklin grubunda %37.4, sistemik deksametazon grubunda %67.4, topikal deksametazon grubunda ise %70.7 olarak bulunmuştur (69). Bu çalışma sonucunda topikal ve sistemik deksametazonun, korneal neovaskülarizasyonu geriletmede etkili olduğu ve iki uygulama arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise günde iki kez, 10 gün süreyle uygulanan topikal deksametazonun, korneal neovaskülarizasyonu geriletmede etkili olduğu görülmüştür ($p=0,01$).

Kornea neovaskülarizasyonunda büyüme faktörleri önemli rol oynamaktadır. Bunlardan VEGF, doğrudan damar endoteli üzerinde etki göstermektedir. Neovaskülarizasyon süresince, anjiogenik faktörlerin arttığı, anti anjiogenik faktörlerin ise azaldığı gözlenmektedir (97). VEGF, başta hipoksi olmak üzere, çeşitli çevresel faktörlerin uyarısı ile başlıca makrofajlar, T hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, düz kas hücreleri ve tümör hücrelerinden salgılanır (98). Neovaskülarize insan kornealarında, hem VEGF, hem de VEGF reseptörleri normalden daha fazla bulunmuştur (99). Kontakt lens kullanılması, hipoksi, kimyasal travmalar ve keratitler gibi gözle ilgili birçok klinik durumda VEGF salınımı artarak korneal neovaskülarizasyona neden olabilir (100). VEGF₁₆₅, gözdeki neovaskülarizasyonla en çok ilişkili olan VEGF-A'nın bilinen altı izoformundan birisidir (47). Bevasizumab, insan VEGF-A'sına spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal IgG1 antikordur. Bevasizumab, VEGF-A'nın bütün izoformlarına bağlanarak neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir (83).

Korneada, anjiogenik uyarı ile damar oluşumunun başlangıcı arasındaki latent dönemde VEGF seviyesi yükselmektedir (101). Kornea hasarı oluşturan nedene bağlı olarak, bu latent dönem oldukça değişkendir. VEGF seviyesinin henüz yeteri kadar yükselmediği bu latent dönemin, anjiogenezis tedavisi için bir fırsat olduğu düşünülmektedir (101). Excimer laser kullanılarak korneada hasar oluşturulan bir çalışmada, uygulamayı takip eden üçüncü günde (epitelin olmadığı dönem), VEGF seviyesinin en fazla olduğu, epitelin tamamen iyileştiği ve stromal iyileşmenin devam ettiği yedinci günde ise VEGF seviyesinin düştüğü bildirilmektedir (102).

Bevasizumab, korneal neovaskülarizasyonda topikal, subkonjonktival ve sistemik olarak değişik konsantrasyon ve sürelerde kullanılmıştır (3,83,94,103-109). Manzano ve ark. tarafından ratlarda yapılan ve yedi gün süren bir çalışmada, gümüş nitrat-potasyum nitrat kullanılarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda, günde iki kez topikal uygulanan % 4'lük bevasizumabın etkinliği, günde iki kez topikal uygulanan %0.9'luk NaCl çözeltisi ile karşılaştırılmış, yedinci gün fotoğrafik olarak yapılan değerlendirme sonucunda topikal bevasizumab grubunda vaskülarize alan ortalama 38.2 ± 15.5 , kontrol grubunda ise 63.5 ± 5.0 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, bevasizumabın korneal neovaskülarizasyonu geriletmediği, ancak tamamen baskılayamadığı bildirilmiştir (103).

Yueruek ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, tavşanlarda alkali yanık ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde topikal bevasizumabın etkinliği araştırılmış, birinci gruba korneal yanık oluşturulması ile eş zamanlı topikal bevasizumab, ikinci gruba yanık oluşturulduktan yedi gün sonra topikal bevasizumab, üçüncü gruba ise yanık ile eş zamanlı topikal %0.9 NaCl uygulanıp, biyomikroskopik muayene ile korneal opasite, neovaskülarizasyon, damarların boyutu ve ödem değerlendirilmiştir. Yine, 16. günün sonunda, kornealar alınarak histopatolojik olarak damar yoğunluğu incelenmiştir. Çalışma sonucunda, topikal bevasizumab grubunda vaskülarizasyonun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu görülmüş, erken tedavi verilen grupta korneal neovaskülarizasyondaki gerileme, geç tedavi grubuna göre daha belirgin olarak azalmakla birlikte, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Erken tedavi ile aktif olarak büyümekte olan damarların belirgin olarak gerilediği, geç tedavi grubunda ise damarlardaki gerilemenin daha az olduğu gösterilmiştir (13).

Bizim çalışmamızda da daha önceki çalışmalarla benzer olarak, topikal bevasizumab ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, korneal neovaskülarizasyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerilediğini gözledik ($p=0,004$). Ayrıca, topikal bevasizumab grubundaki korneal neovaskülarizasyon, topikal deksametazon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az idi ($p=0,004$).

Hurmeric ve ark. tarafından kobaylarda gümüş nitrat-potasyum nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda, subkonjoktival bevacuzimabın etkinliği araştırılmıştır. Erken ve geç olarak iki tedavi grubu, bir de kontrol grubu olmak üzere üç grup oluşturulmuş, birinci gruba koterizasyondan hemen sonra ve üç gün sonra subkonjoktival bevacuzimab, ikinci gruba koterizasyondan sonraki üçüncü ve beşinci günlerde subkonjoktival bevacuzimab yapılmış, kontrol grubuna ise üçüncü ve beşinci günlerde subkonjoktival %0.9 NaCl yapılmış, deneklerin onuncu günde fotoğrafları alınıp vaskülarize alanlar ölçülmüştür. Yapılan değerlendirmeler sonucunda neovaskülarizasyon skoru birinci grupta 1 ± 0.3 , ikinci grupta 2.46 ± 1.3 ve kontrol grubunda ise 3.5 ± 0.5 bulunmuştur. Korneal neovaskülarizasyon, birinci ve ikinci grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az bulunmuştur. Erken tedavi grubunda, geç tedavi grubuna göre daha az korneal neovaskülarizasyon saptanmıştır (3). Ancak, Baros ve ark., subkonjoktival bevasizumabın tedaviye başlama süresinden bağımsız olarak korneal neovaskülarizasyonu geriletmediğini bildirmişlerdir (108).

Bahar ve ark. tarafından yapılan klinik bir çalışmada, kornea neovaskülarizasyonu olup, subkonjoktival bevacuzimab uygulanan on hasta geriye dönük olarak taranmış ve sonuçları bildirilmiştir. Yedi hastada korneal neovaskülarizasyonda kısmi gerileme gözlenirken, üç hastada ise yanıt alınamadığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, subkonjoktival bevacuzimabın insan korneal neovaskülarizasyonunu %29 oranında azalttığı gösterilmiştir (109). Erdurmuş ve Totan, filamenter keratit ve kornea nakli sonrası neovaskülarizasyonu olan iki olguda, tek doz subkonjoktival bevasizumab uyguladıktan bir hafta sonra ilk olguda damarların tamamının, ikinci olguda ise küçük damarların kayıp olduğunu, ancak ana damarların değişmediğini göstermiş, üç aylık takip sonucunda her iki olguda da neovaskülarizasyonun tekrarlamadığını bildirmişlerdir (106).

Biz de çalışmamızda, subkonjonktival bevasizumabın korneal neovaskülarizasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerilettiğini gözledik. Subkonjonktival bevasizumab ile topikal deksametazon grupları karşılaştırıldığında ise korneal neovaskülarizasyonun subkonjonktival bevasizumab grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğunu gözledik. Topikal ve subkonjonktival bevasizumab grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktu.

Korneada epitel hasarı oluşturan herhangi bir neden, epitel altındaki keratositlerde apoptozise neden olmaktadır. Hasarlanma sonrası dördüncü saatte, apoptozis yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Keratosit apoptozisinin başlamasından sonra, derinde ve periferde yerleşen keratositler proliferasyon olarak, ölen hücrelerin yerini almaktadır (62). He ve ark., korneada sodyum hidroksitle kimyasal yanık oluşturulması sonrasında, LAU0901 ile tedavi edilen grupta, korneal ülserasyonda ve stromada apoptotik hücre sayısında azalma saptamışlardır (110). Biz de çalışmamızda, subkonjonktival ve topikal bevasizumab uygulanan gruplardaki apoptotik hücre sayısının, deksametazon ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğunu tespit ettik. Bu durum bevasizumab gruplarında korneal iyileşmenin daha çabuk gerçekleştiğini, deksametazon ve kontrol gruplarında ise korneal iyileşmenin henüz tamamlanmadığını düşündürmektedir.

Bevasizumab, ilk kez kolorektal karsinomlu hastalarda sistemik olarak kullanılmaya başlanmış ve yan etki sıklığının az olduğu belirtilmiştir. Bu yan etkiler; diyare, gastrointestinal sistem kanamaları, arteriyel tromboemboli, hipertansiyon, burun kanaması, proteinüri ve lökosit sayısında azalmadır (111,112). İntraoküler uygulamalarda, ilaç sistemik dolaşıma geçerek, nadiren hipertansiyon ve tromboemboli gibi yan etkiler oluşturabilmektedir (112). İntravitreal bevasizumab enjeksiyonlarında, oküler enflamasyon, kemozis, retina pigment epitel yırtığı, akut görme kaybı gibi yan etkiler bildirilmiştir (112).

Park ve ark., tavşan ön kamarasına 1,25 mg ve 2,5 mg bevasizumab vererek, kornea endotel hücreleri üzerine etkisini araştırmış, normal altıgen endotelial şeklin korunduğu, bununla birlikte birkaç dev endotelial dev hücrenin mevcut olduğunu, bu dozlardaki bevasizumabın tavşan kornea endotel hücre morfolojisi ve canlılığı üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (85). Bock ve ark., farelerde 3.5 ay

boyunca günde iki kez verilen topikal bevasizumabın, korneada yüzey toksisitesi ve epitel defekti yapmadığını bildirmişlerdir (94). Yoeruek ve ark. bevasizumabın güvenilirliğini araştırmak için yaptıkları deneysel bir çalışmada, insan kornea keratosit, fibroblast ve endotel hücre kültürlerini 0.25-5.0 mg/ml konsantrasyonda bevasizumaba maruz bırakarak, birinci ve dördüncü günlerde hücre canlılığını ölçmüşler, 5 mg/ml konsantrasyonda, bevasizumabın korneal keratosit, fibroblast ve endotel hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği ve güvenli olduğunu bildirmişlerdir (113).

Bevasizumab, 2005 yılından beri gözde çeşitli neovasküler hastalıklarda kullanılmaktadır (104,114,115). Peters ve ark., insan koroid endotel hücre kültüründe bevasizumabın doza bağlı olarak permeabiliteyi azalttığını göstermişlerdir (116). Yapılan çeşitli çalışmalarda bevasizumabın damar permeabilitesini azaltarak, diyabetik retinopati, santral retinal ven tıkanıklığı, psödo-fakik kistoid maküler ödem, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu ve üveite bağlı maküla ödemi azalttığı gösterilmiştir (116-121). Korneal neovaskülarizasyonda, permeabilite artışı ile enflamatuvar hücreler, anjiyogenik stimulus alanına göç etmekte ve böylelikle yeni damar oluşumu başlamakta olup, bevasizumab uygulanması ile damar permeabilitesi ve ödem azalarak korneal saydamlığa katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, topikal deksametazon, topikal bevasizumab ve subkonjonktival bevasizumabın, deneysel tavşan kornea neovaskülarizasyonunun kontrolünde etkili yöntemler olduğunu, topikal ve subkonjonktival bevasizumabın, topikal deksametazondan daha etkili olduğunu gözledik. Bu yöntemler kolay bir şekilde uygulanabilir ve minimal yan etki riski içermektedir. Korneal neovaskülarizasyonların tedavisinde bevasizumabın etkinliği belirlemek, potansiyel komplikasyonlarını ortaya çıkarmak için, uzun süreli ve prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tavşanlarda, gümüş nitrat-potasyum nitrat ile oluşturulan deneysel kornea neovaskülarizasyonunda, topikal deksametazon, subkonjonktival bevasizumab ve topikal bevasizumabın korneal neovaskülarizasyon üzerindeki etkileri histopatolojik olarak değerlendirildi. Korneal neovaskülarizasyonun baskılanmasında, topikal ve subkonjonktival bevasizumabın etkili olduğu ve iki uygulama şekli arasında belirgin bir farkın olmadığı saptandı. Topikal deksametazon da korneal neovaskülarizasyonu azaltmada etkili olmakla birlikte, etkisinin topikal ve subkonjonktival bevasizumabtan daha az olduğu gözlemlendi. Topikal ve subkonjonktival bevasizumab gruplarında, apoptotik hücre sayısı, kontrol ve topikal deksametazon gruplarından daha az olarak tespit edilirken, topikal deksametazon ve kontrol gruplarındaki apoptotik hücre sayısının benzer olduğu saptandı. Bu durum ise bevasizumab gruplarında korneal iyileşmenin daha çabuk gerçekleştiğini, deksametazon ve kontrol gruplarında ise korneal iyileşmenin henüz tamamlanmadığını düşündürmektedir. Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde, topikal ve subkonjonktival olarak uygulanan bevasizumabın, yaygın olarak kullanılmakta olan kortikosteroidlerden daha etkili ve iyi bir seçenek olduğunu düşünmekteyiz. Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde, bevasizumabın etkinliği ve uzun dönemdeki yan etkilerini ortaya çıkarmak için prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26(1): 1-37.
2. Hill JC. The relative importance of risk factors used to define high-risk keratoplasty. *Ger J Ophthalmol* 1996; 5(1): 36-41.
3. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, ve ark. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea* 2008; 27(3): 357-62.
4. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1(1): 27-31.
5. 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* 1999; 237(12): 952-61.
6. Reinhard T, Reis A, Bohringer D, ve ark. 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* 2001; 239(5): 367-72.
7. Peyman GA, Kivilcim M, Morales AM, DellaCroce JT, Conway MD. Inhibition of corneal angiogenesis by ascorbic acid in the rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(10): 1461-7.
8. Wu PC, Liu CC, Chen CH, ve ark. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241(1): 63-9.
9. 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(7): 1588-93.
10. Nakao S, Hata Y, Miura M, ve ark. Dexamethasone inhibits interleukin-1 β -induced corneal neovascularization: role of nuclear factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol* 2007; 171(3): 1058-65.
11. Jousseaume AM, Kruse FE, Volcker HE, Kirchhof B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237(11): 920-7.
12. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. *Exp Mol Med* 2006; 38(2): 173-9.
13. Yoo E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, ve ark. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008; 86(3): 322-8.
14. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1986; 93(10): 1304-9.
15. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(8): 2148-53.

16. Gohto Y, Obana A, Kaneda K, Miki T. Photodynamic effect of a new photosensitizer ATX-S10 on corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67(3): 313-22.
17. Watsky MA, Olsen TW, Edelhauser HF. Cornea and sclera. Philadelphia. Duane's Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Lippincot Williams & Wilkins, 2005.
18. Eğrilmez S. Korneanın Anatomi, Fizyoloji ve Doku İyileşmesi. Akademik Eğitim Programı 27. Ulusal Oftalmoloji Kurs Kitabı. Ankara, 2007: 201-213.
19. 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* 1986; 224(5): 452-6.
20. Ozanics V, Rayborn M, Sagun D. Observations on the morphology of the developing primate cornea: epithelium, its innervation and anterior stroma. *J Morphol* 1977; 153(2): 263-97.
21. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25(12): 1402-15.
22. Wulle K. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest Ophthalmol* 1972; 11(11): 897-904.
23. Azar NF. Gözün embriyolojisi. In: Yanoff M DJ, ed. *Ophthalmology*, 2. Basım ed: Mosby, 2004; 22-27.
24. Nishida T: Cornea. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, :3-26. 2005.
25. Smolek MK Klyce S. Cornea. Duane's Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Lippincot Williams & Wilkins, 2005.
26. Farjo AA. Kornea Epiteli. Yanoff M, Duker JS. *Ophtalmolgy*, 2. basım. Mosby, 2004; 413-421.
27. Fredo TF Waring GO. Pathologic responses in the cornea. Leibowitz HM. *Corneal Disorders Clinical Diagnosis and Management*, 2 ed. WB Saunders, 1998; 154-200.
28. Waring GO, 3rd, Rodrigues MM: Patterns of pathologic response in the cornea. *Surv Ophthalmol* 1987; 31(4): 262-6.
29. Tseng SC, Hirst LW, Farazdaghi M, Green WR. Goblet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25(10): 1168-76.
30. Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK. Corneal neovascularization as studied by scanning electron microscopy of vascular casts. *Lab Invest* 1983; 48(2): 169-80.
31. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. II. Studies on the effect of leukocytic elimination on corneal vascularization. *Am J Pathol* 1975; 81(3): 531-44.
32. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. *Am J Pathol* 1975; 79(3): 537-54.
33. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. III. Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Am J Pathol* 1976; 82(1): 157-70.

34. Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2000; 111(1): 43-51.
35. Ishihara K, Hayash I, Yamashina S, Majima M. A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. *Jpn J Pharmacol* 2001; 87(4): 318-26.
36. Reimer CL, Agata N, Tammam JG, ve ark. Antineoplastic effects of chemotherapeutic agents are potentiated by NM-3, an inhibitor of angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62(3): 789-95.
37. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, ve ark. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801): 242-8.
38. Yazır Y GS, Filiz S, Dalcık H. Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 26(4): 181-184.
39. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1017-21.
40. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87(2): 95-104.
41. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.
42. Ortega N, L'Faqihi FE, Plouet J. Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell* 1998; 90(5): 381-90.
43. 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* 2004; 279(44): 46304-14.
44. Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(11): 1169-74.
45. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol* 2004; 187(2): 246-53.
46. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 4-25.
47. Usui T, Ishida S, Yamashiro K, ve ark. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(2): 368-74.
48. Yazır Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF):Reseptörleri ve Fonksiyonları. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 29(3): 128-136.
49. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(5): 561-9.
50. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271(2): 603-6.
51. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359(6398): 843-5.
52. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626): 671-4.

53. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, ve ark. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5(4): 519-24.
54. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226(2): 324-8.
55. Ebos JM, Bocci G, Man S, ve ark. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2004; 2(6): 315-26.
56. Abbasoglu ÖM, Hosal B. Apoptozis: Göz hastalıklarındaki yeri. *T Klin Oftalmoloji* 2001; 10: 115-20.
57. Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(3): 974-8.
58. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(5): 1471-8.
59. Chang CJ, Lai WW, Edward DP, Tso MO. Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans. *Arch Ophthalmol* 1995; 113(7): 880-6.
60. Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, Ghosn CR, Stern ME. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy. *Cornea* 1998; 17(6): 654-63.
61. Wilson SE, Kim WJ. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(2): 220-6.
62. Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000; 19(3 Suppl): S7-12.
63. Bilgihan K, Ozdek S, Ozogul C, Gurelik G, Bilgihan A, Hasanreisoglu B. Topical vitamin E and hydrocortisone acetate treatment after photorefractive keratectomy. *Eye* 2000; 14 (Pt 2): 231-7.
64. Kasetsuwan N, Wu FM, Hsieh F, Sanchez D, McDonnell PJ. Effect of topical ascorbic acid on free radical tissue damage and inflammatory cell influx in the cornea after excimer laser corneal surgery. *Arch Ophthalmol* 1999; 117(5): 649-52.
65. Birnbaum F, Reis A, Reinhard T. Topical immunosuppressives after penetrating keratoplasty. *Ophthalmologie* 2007; 104(5): 381-7.
66. Birnbaum F, Bohringer D, Sokolovska Y, Sundmacher R, Reinhard T. Immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil after penetrating high-risk keratoplasty: a retrospective study. *Transplantation* 2005; 79(8): 964-8.
67. Gerten G. Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularization in corneal transplant surgery. *Cornea* 2008; 27(10): 1195-9.
68. Yoon KC, You IC, Kang IS, ve ark. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2007; 144(3): 390-395.
69. Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, ve ark. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 2008; 33(8): 653-60.

70. 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* 2008; 27(4): 446-53.
71. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12(4): 242-9.
72. 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* 1996; 12(4): 425-31.
73. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B, D'Amato RJ. New activity of spironolactone. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation* 1996; 94(10): 2566-71.
74. 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* 1999; 21(7): 491-7.
75. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4(6): 376-83.
76. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(2): 454-60.
77. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19(3): 348-52.
78. 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* 1999; 40(8): 1822-8.
79. Folkman J, Ingber DE. Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Ann Surg* 1987; 206(3): 374-83.
80. 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* 1985; 103(5): 708-11.
81. Proia AD, Hirakata 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* 1993; 57(6): 693-8.
82. Longenecker JP, Kilty LA, Johnson LK. Glucocorticoid influence on growth of vascular wall cells in culture. *J Cell Physiol* 1982; 113(2): 197-202.
83. Papathanassiou M, Theodosiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol* 2008; 145(3): 424-431.
84. Chiang CC, Chen WL, Lin JM, Tsai YY. Effect of bevacizumab on human corneal endothelial cells: a six-month follow-up study. *Am J Ophthalmol* 2008; 146(5): 688-91.
85. Park HY, Kim SJ, Lee HB, Kim ES, Tchah H. Effect of intracameral bevacizumab injection on corneal endothelium in rabbits. *Cornea* 2008; 27(10): 1151-5.

86. 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): 2335-42.
87. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36(4): 331-5.
88. 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(4): 336-9.
89. Laud K, Spaide RF, Freund KB, Slakter J, Klancnik JM. Treatment of choroidal neovascularization in pathologic myopia with intravitreal bevacizumab. *Retina* 2006; 26(8): 960-3.
90. Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, ve ark. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina* 2006; 26(3): 279-84.
91. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006; 26(3): 275-8.
92. Ferrara DC, Koizumi H, Spaide RF. Early bevacizumab treatment of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 2007; 144(6): 864-71.
93. Grisanti S, Biester S, Peters S, Tatar O, Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU. Intracameral bevacizumab for iris rubeosis. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(1): 158-60.
94. Bock F, Onderka J, Dietrich T, ve ark. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(6): 2545-52.
95. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17(6): 611-3.
96. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985; 4(5): 531-5.
97. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea* 1987; 6(4): 250-7.
98. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65(3): 671-80.
99. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43(3): 245-69.
100. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3(7): 643-51.
101. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277(5322): 48-50.
102. 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* 1998; 39(1): 18-22.
103. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, ve ark. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; 91(6): 804-7.

- 104.** Kim TI, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008; 27(3): 349-52.
- 105.** Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology* 2008; 115(6): e33-8.
- 106.** Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(10): 1577-9.
- 107.** Doctor PP, Bhat PV, Foster CS. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Cornea* 2008; 27(9): 992-5.
- 108.** Barros LF, Belfort R. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79(3): 389-94.
- 109.** Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea* 2008; 27(2): 142-7.
- 110.** He J, Bazan NG, Bazan HE. Alkali-induced corneal stromal melting prevention by a novel platelet-activating factor receptor antagonist. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(1): 70-8.
- 111.** Fernando NH, Hurwitz HI. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 1: 11-8.
- 112.** Shima C, Sakaguchi H, Gomi F, ve ark. Complications in patients after intravitreal injection of bevacizumab. *Acta Ophthalmol* 2008; 86(4): 372-6.
- 113.** Yoeuruck E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007; 26(8): 977-82.
- 114.** Moshfeghi AA, Rosenfeld 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. *Ophthalmology* 2006; 113(11): 2002 e1-12.
- 115.** Iliev ME, Domig D, Wolf-Schnurrbusch U, Wolf S, Sarra GM. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of neovascular glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(6): 1054-6.
- 116.** Peters S, Julien S, Heiduschka P, ve ark. Antipermeability and antiproliferative effects of standard and frozen bevacizumab on choroidal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(6): 827-31.
- 117.** Beutel J, Ziemssen F, Luke M, ve ark. Intravitreal bevacizumab treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: one-year results. *Int Ophthalmol* 2008.
- 118.** Prager F, Michels S, Kriechbaum K, ve ark. Intravitreal bevacizumab (Avastin(R)) for macular edema secondary to retinal vein occlusion - twelve-month results of a prospective clinical trial. *Br J Ophthalmol* 2008.
- 119.** Weiss K, Steinbrugger I, Weger M, ve ark. Intravitreal VEGF levels in uveitis patients and treatment of uveitic macular oedema with intravitreal bevacizumab. *Eye* 2009.
- 120.** Barone A, Russo V, Prascina F, Delle Noci N. Short-term safety and efficacy of intravitreal bevacizumab for pseudophakic cystoid macular edema. *Retina* 2009; 29(1): 33-7.

- 121.** Arias L, Caminal JM, Casas L, ve ark. A study comparing two protocols of treatment with intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(12): 1636-41.