

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SÜT VEREN KOYUNLARDA İNTRAVİTREAL TEK DOZ  
RANİBİZUMAB VE BEVACİZUMAB ENJEKSİYONU SONRASI  
İLACIN SÜT VE KANDAKİ DÜZEYLERİ İLE EMEN KUZUYA  
GEÇİŞİ**

**Dr. Tuğba ÇAKMAK ARGUN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Özlem YALÇIN TÖK**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim  
Birimi tarafından 3667-TU2-13 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA –2014**

## ÖNSÖZ

Bu çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi ve tecrübesi ile çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmemi sağlayan, çalışmamın yöneticisi Sayın hocam Doç. Dr. Özlem YALÇIN TÖK'e,

Uzmanlık eğitimi boyunca ilminden ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarım Yrd. Doç. Dr. Levent TÖK ve Yrd. Doç. Dr. Alime GÜNEŞ'e,

Tez çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen hocalarım Doç. Dr. Gülsen YILMAZ ve Doç. Dr. Fatma MERİÇ YILMAZ'a,

Eğitimim boyunca beraber pek çok sey paylaştığımız, beraberce uzmanlık eğitimi yapmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma,

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine,

Tüm eğitim ve öğrenim hayatımda desteklerini yanımda hissettiğim aileme ve meslektaşım eşime sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ÖNSÖZ</b> .....                                   | <b>ii</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                             | <b>iii</b>  |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....                 | <b>v</b>    |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b> .....                         | <b>vi</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....                         | <b>vii</b>  |
| <b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....                         | <b>viii</b> |
| <b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....                        | <b>ix</b>   |
| <b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....                         | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                       | <b>2</b>    |
| 2.1. Anatomi .....                                   | 2           |
| 2.1.1. Retina Anatomisi .....                        | 2           |
| 2.1.2. Maküla Anatomisi .....                        | 4           |
| 2.2. Vasküler Endotelyal Growth Faktör.....          | 5           |
| 2.2.1. VEGF Reseptörleri .....                       | 6           |
| 2.2.2. VEGF Gen Ailesi.....                          | 6           |
| 2.2.2.1. VEGF-A İzofomları.....                      | 7           |
| 2.2.3. VEGF Salgılanması .....                       | 8           |
| 2.2.4. VEGF-A Fonksiyonları .....                    | 8           |
| 2.3. Vaskülogenez ve Anjiogenez .....                | 9           |
| 2.4. VEGF ve Neovasküler Oküler Hastalıklar .....    | 10          |
| 2.5. Anti VEGF Ajanlar .....                         | 11          |
| 2.5.1. Pegaptanib.....                               | 11          |
| 2.5.2. Bevacizumab.....                              | 12          |
| 2.5.3. Ranibizumab .....                             | 12          |
| 2.5.4. Aflibercept .....                             | 13          |
| 2.6. Anti VEGF İlaçların Farmakokinetiği.....        | 13          |
| 2.7. Anti VEGF İlaçların Farmakodinamiği.....        | 15          |
| 2.8. Gebelik ve Göz.....                             | 16          |
| 2.8.1. Gebelikte Gözdeki Fizyolojik Değişimler ..... | 16          |
| 2.8.1.1. Göz Kapağı ve Konjonktiva.....              | 16          |
| 2.8.1.2. Kornea ve Refraksiyon.....                  | 17          |
| 2.8.1.3. Göz İçi Basınç (GİB) .....                  | 17          |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.8.1.4. Görme Alanı.....                                  | 17        |
| 2.8.2. Gebeliğe Bağlı Gözde Meydana Gelen Hastalıklar..... | 18        |
| 2.8.2.1. Santral Seröz Koryoretinopati (SSR).....          | 18        |
| 2.8.2.2. Hipertansiyon ve Gebelik.....                     | 18        |
| 2.8.2.3. Dissemine İnvasküler Koagülasyon (DİK).....       | 19        |
| 2.8.2.4. Retinal Ven Oklüzyonu.....                        | 19        |
| 2.8.2.5. Retinal Arter Oklüzyonu.....                      | 19        |
| 2.8.2.6. Yüksek Miyopi.....                                | 19        |
| 2.8.2.7. Koroidal Neovaskülarizasyon.....                  | 20        |
| 2.8.3. Gebelikte Modifiye Olan Hastalıklar.....            | 20        |
| 2.8.3.1. Gebelik ve Diyabetik Retinopati.....              | 20        |
| 2.8.3.2. Maküler Ödem.....                                 | 21        |
| <b>3. MATERYAL ve METOD.....</b>                           | <b>23</b> |
| 3.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....                 | 23        |
| 3.2. Hayvanlar ve Deneyin Planı.....                       | 23        |
| 3.3. Ölçümler ve Değerlendirme.....                        | 26        |
| 3.4. Farmakokinetik Metod.....                             | 27        |
| <b>4. SONUÇLAR.....</b>                                    | <b>28</b> |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                    | <b>43</b> |
| <b>ÖZET.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                       | <b>53</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                      | <b>54</b> |

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>RPE</b>                     | : Retina Pigment Epiteli                       |
| <b>FAZ</b>                     | : Foveal Avasküler Zon                         |
| <b>VEGF</b>                    | : Vasküler Endotelyal Growth Faktör            |
| <b>VEGFR 1</b>                 | : Vasküler Endotelyal Growth Faktör Reseptör 1 |
| <b>VEGFR 2</b>                 | : Vasküler Endotelyal Growth Faktör Reseptör 2 |
| <b>VEGFR 3</b>                 | : Vasküler Endotelyal Growth Faktör Reseptör 3 |
| <b>HIF</b>                     | : Hipoksiyi İndükleyen Faktör                  |
| <b>EGF</b>                     | : Epidermal Growth Faktör                      |
| <b>TGF</b>                     | : Transforme Edici Growth Faktör               |
| <b>KGF</b>                     | : Keratinosit Growth Faktör                    |
| <b>IGF</b>                     | : İnsülin Benzeri Growth Faktör                |
| <b>PDGF</b>                    | : Platelet Kaynaklı Growth Faktör              |
| <b>FGF</b>                     | : Fibroblast Growth Faktör                     |
| <b>VPF</b>                     | : Vasküler Permeabilite Faktörü                |
| <b>YBMD</b>                    | : Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu              |
| <b>Mab</b>                     | : Monoklonal Antikor                           |
| <b>SSR</b>                     | : Santral Seröz Koryoretinopati                |
| <b>OCT</b>                     | : Optik Koherens Tomografi                     |
| <b>DIK</b>                     | : Dissemine İntravasküler Koagülasyon          |
| <b>KNV</b>                     | : Koroidal Neovaskülarizasyon                  |
| <b>HbA1c</b>                   | : Hemoglobin A1c                               |
| <b>PDR</b>                     | : Proliferatif Diyabetik Retinopati            |
| <b>DR</b>                      | : Diyabetik Retinopati                         |
| <b>KNVM</b>                    | : Koroidal Neovasküler Membran                 |
| <b>FcRn</b>                    | : Neonatal Fc Reseptörü                        |
| <b>RES</b>                     | : Retiküloendotelyal Sistem                    |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : Tümör Nekroz Faktör $\alpha$                 |
| <b>HUVEC</b>                   | : İnsan Umbilikal Vasküler Endotel Hücresi     |
| <b>DARPin MP0112</b>           | : Designed Ankyrin Repeat Protein              |
| <b>MMP</b>                     | : Matrix Metalloproteinaz                      |

**TABLolar DİZİNİ**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kanlarındaki ilaç konsantrasyonları .....                                    | 37 |
| <b>Tablo 2.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların sütlerindeki ilaç konsantrasyonları .....                                    | 38 |
| <b>Tablo 3.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kuzularının kanlarındaki ilaç konsantrasyonları .....                        | 39 |
| <b>Tablo 4.</b> 1,25mg/0,05ml bevacizumabın koyunlara intravitreal enjeksiyonundan sonra koyunların kanındaki bevacizumab dağılımı.....              | 39 |
| <b>Tablo 5.</b> 1,25mg/0,05ml bevacizumabın koyunlara intravitreal enjeksiyonundan sonra koyunların kuzularının kanındaki bevacizumab dağılımı ..... | 40 |
| <b>Tablo 6.</b> 1,25mg/0,05ml bevacizumabın koyunlara intravitreal enjeksiyonundan sonra koyunların sütündeki bevacizumab dağılımı.....              | 40 |
| <b>Tablo 7.</b> İntravitreal ranibizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kanlarındaki ilaç konsantrasyonu.....  | 41 |
| <b>Tablo 8.</b> İntravitreal ranibizumab enjeksiyonu yapılan koyunların sütlerindeki ilaç konsantrasyonu.....  | 41 |
| <b>Tablo 9.</b> İntravitreal ranibizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kuzularının kanlarındaki ilaç konsantrasyonu.....                            | 42 |

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 1.</b> Retinanın histolojik kesiti.....  | 3  |
| <b>Şekil 2.</b> Maküla Anatomisi. foveola (a), fovea (b), parafovea (c) ve perifovea (d). ... | 4  |
| <b>Şekil 3.</b> Foveanın histolojik yapısı.....   | 5  |
| <b>Şekil 4.</b> Anti VEGF ajanlar.....  | 13 |

**RESİMLER DİZİNİ**

|   |    |
|---|----|
| <b>Resim 1.</b> Koyunlardan kan alınması.....   | 24 |
| <b>Resim 2.</b> Göz çevresi antisepsisi sağlanmış blefarosta takılmış koyun gözü.....               | 25 |
| <b>Resim 3.</b> Koyun gözüne intravitreal enjeksiyon yapılması .....                                | 25 |
| <b>Resim 4.</b> Koyun gözüne intravitreal enjeksiyondan sonra pamuk aplikatörle bası yapılması..... | 26 |

## GRAFİKLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Grafik 1.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunlarda kandaki ilaç konsantrasyonları (ng/ml). .....                | 29 |
| <b>Grafik 2.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 1. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).....                     | 29 |
| <b>Grafik 3.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 2. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).....                     | 30 |
| <b>Grafik 4.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 3. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).....                     | 30 |
| <b>Grafik 5.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 4. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).....                     | 31 |
| <b>Grafik 6.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 5. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).....                     | 31 |
| <b>Grafik 7.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 6. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).....                     | 32 |
| <b>Grafik 8.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunlarda sütteki ilaç konsantrasyonları (ng/ml). .....                | 32 |
| <b>Grafik 9.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 1. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml). .....           | 33 |
| <b>Grafik 10.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 2. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml). .....          | 33 |
| <b>Grafik 11.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 3. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml). .....          | 34 |
| <b>Grafik 12.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 4. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml). .....          | 34 |
| <b>Grafik 13.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 5. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml). .....          | 35 |
| <b>Grafik 14.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 6. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml). .....          | 35 |
| <b>Grafik 15.</b> İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kuzularının kanlarındaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml). ..... | 36 |

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

İntravitreal ranibizumab uygulaması senil maküla dejenerasyonu, diabetik maküla ödemi ve retinal ven tıkanıklıklarında ruhsatlı olarak uygulanmaktadır. İntravitreal bevacizumab ise literatürde senil maküla dejenerasyonu, diabetik maküla ödemi, retinal ven tıkanıklıkları, santral seröz koryoretinopati, retinitis pigmentosa, dejeneratif miyopiye sekonder gelişen koroid neovasküler membranlar, postoperatif ve intraoküler inflamasyonlara sekonder gelişen maküla ödemleri, idiopatik koroid neovasküler membranlar ve oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır. Ranibizumab ve bevacizumab bir anti-vasküler endotelial growth faktör (VEGF) olup vaskülogenezisi baskılamaktadır.

Bu ilaçların vitreus ve kan seviyeleri ve bu sıvılardaki yarılanma ömürleri iyi bilinmekle birlikte süte geçişi ve süt veren hastalarda kullanımı ve bu annelerin bebeklerinde nasıl önlemler alınması gerektiği konusunda literatürde geniş çaplı çalışmalar ve hayvan çalışmaları mevcut değildir.

Özellikle gebelik ve laktasyon döneminde artan VEGF ve plasental growth faktör (PIGF) etkisiyle de kötüleşen diabetik retinopati, santral seröz koryoretinopati, idiopatik koroidal neovasküler membran gibi görmeyi tehdit eden hastalıklarda kullanımının güvenilir olup olmadığına dair yeterli literatür bilgisi mevcut değildir. Ayrıca yenidoğanda organların gelişim aşamasında dokularda yüksek konsantrasyonda vasküler endotelial growth faktör bulunmaktadır. Yenidoğanda; kanda küçük dozlarda dahi anti-VEGF bulunmasının organogenezis üzerinde olumsuz etkilerinin olacağı aşikardır. Bizim amacımız görmeyi tehdit eden bu grup hastalıklarda ilacın süte geçip geçmediğini, geçiyorsa eğer emen bebeğin kanına geçip geçmediğini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

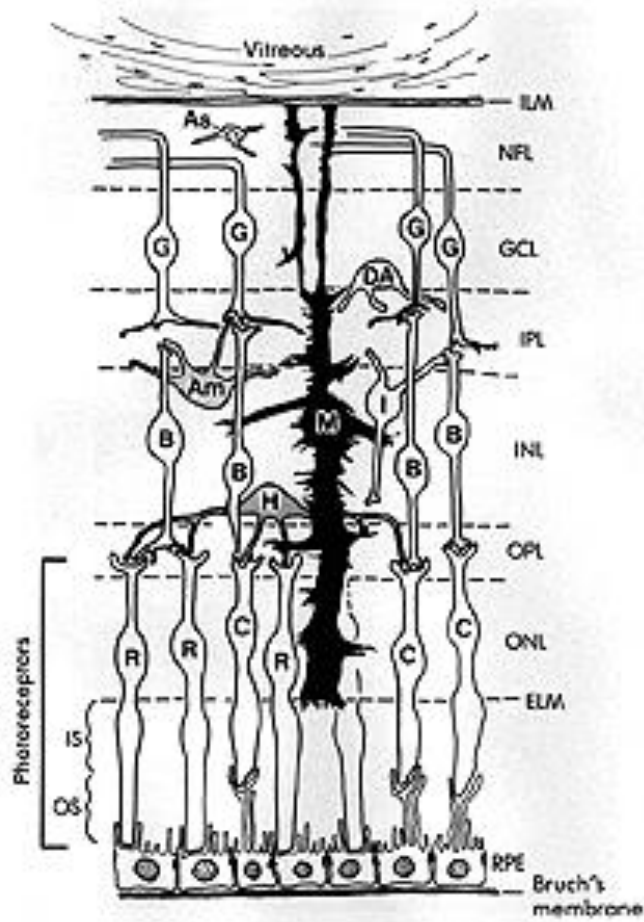
### 2.1. Anatomi

#### 2.1.1. Retina Anatomisi

Retina gözün en iç tabakasıdır ve nöroektodermden gelişir. İki katmanı vardır, dış retina pigment epiteli (RPE) ve iç nöral (duyusal) retina. Bunların arasında ise potansiyel bir boşluk bulunur. Duyusal tabaka ile RPE arasındaki bu potansiyel fizyolojik boşluğa, "subretinal alan" denir.

Retina histolojik olarak incelendiğinde 10 tabakadan oluştuğu görülür (Resim 1). İçten dışa doğru bu tabakalar şu şekildedir:

1. İç limitan membran
2. Sinir lifleri tabakası
3. Ganglion hücreleri tabakası
4. İç pleksiform tabaka
5. İç nükleer tabaka
6. Dış pleksiform tabaka
7. Dış nükleer tabaka
8. Dış limitan membran
9. Koni ve basiller
10. Retina pigment epiteli

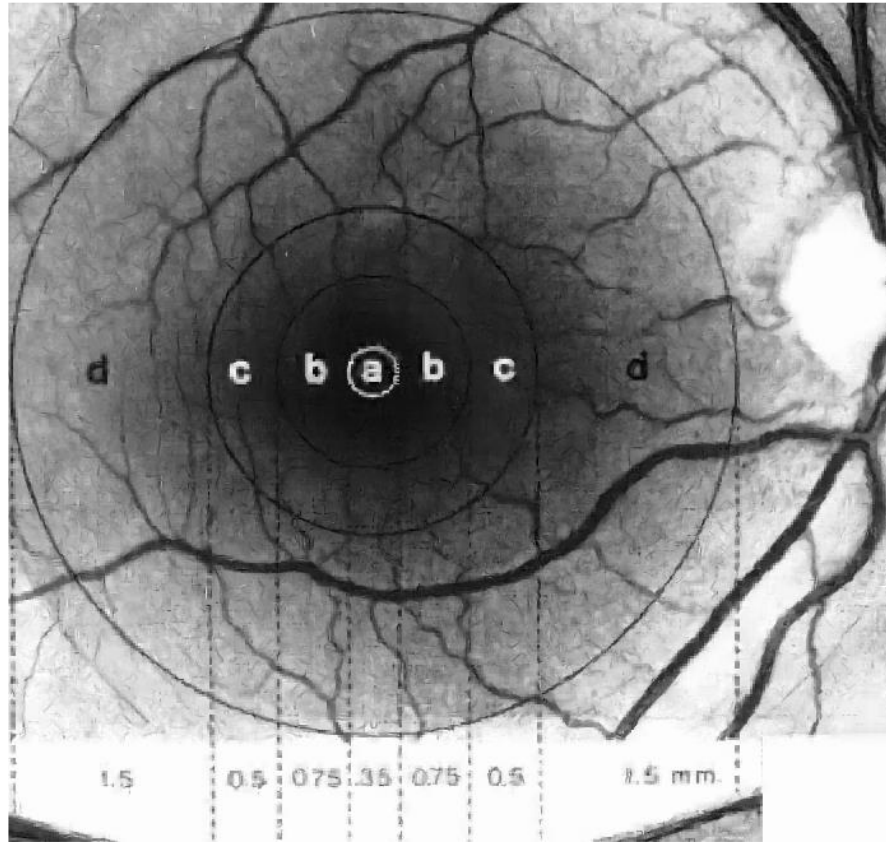


**Şekil 1.** Retinanın histolojik kesiti.(Retina pigment epiteli (RPE), Koniler (C), Basiller (R), Dış limitan membran (ELM), Dış nükleer tabaka (ONL), Dış pleksiform tabaka (OPL), iç nükleer tabaka (INL), iç pleksiform tabaka (IPL), Ganglion hücre tabakası (GCL), Sinir lifleri tabakası (NFL), iç limitan membran (ILM)).

Duyusal retina 3 adet nükleer ve 3 adet fibriler tabakadan oluşmaktadır. Nükleer tabakalar; fotoreseptörlerin nükleuslarını içeren dış nükleer tabaka, bipolar, horizontal, amakrin ve müller hücrelerinin nükleuslarını içeren iç nükleer tabaka, ganglion hücrelerinin nükleuslarını içeren ganglion hücreleri tabakasıdır. Fibriler tabakalar; kon ve rodların, bipolar ve horizontal hücrelerle sinaps yaptığı dış pleksiform tabaka, bipolar, amakrin ve ganglion hücrelerinin sinaps yaptığı iç pleksiform tabaka, ganglion hücrelerinin aksonlarının oluşturduğu sinir lifleri tabakasıdır. İç limitan membran, müller hücrelerinin ayakları çıkıntılarınınca (foot plate) oluşturulan, müller hücresi bazal membranıdır. Dış limitan membran, koni ve basillerin dış ve iç segmentlerinin arasından geçer. Gerçek bir zar değildir. Fotoreseptör tabakayı dış nükleer tabakadan ayırır. Fotoreseptörlerin iç segmentleriyle müller hücrelerinin dış uzantılarının aralarındaki bağdan oluşmuştur.

### 2.1.2. Maküla Anatomisi

Santral retina ya da maküla bölgesi, histolojik olarak gangliyon hücre tabakasında en az iki nükleus tabakası içeren bölge şeklinde tanımlanır. Topografik olarak maküla 4 kısımdan oluşur (Resim 2).



**Şekil 2.** Maküla Anatomisi. foveola (a), fovea (b), parafovea (c) ve perifovea (d).

(Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. Histology of the Human Eye. Philadelphia: WB Saunders, 1971)

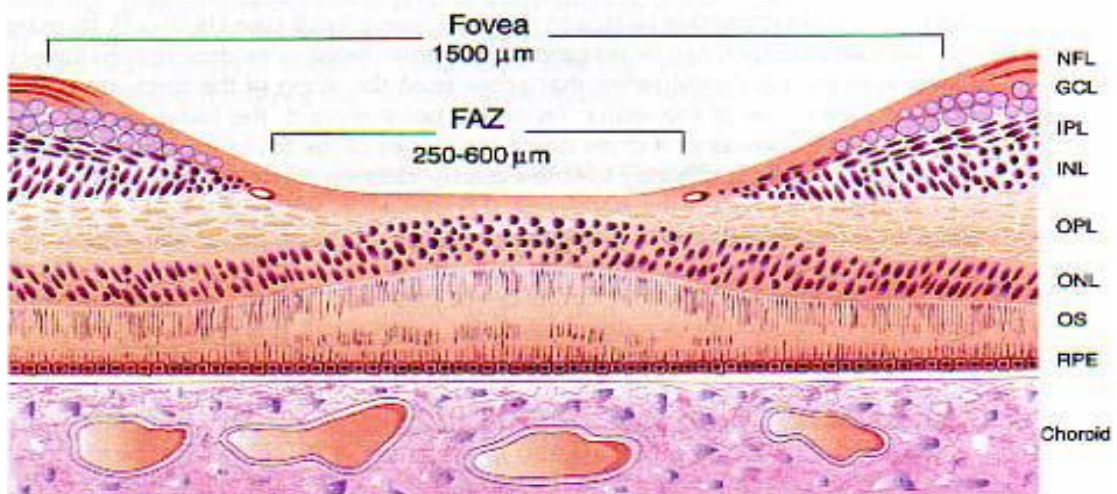
Temporal damar yaylarıyla sınırlanan, foveayı çevreleyen ve horizontal çapı 5,5 mm olan santral retina alanı maküla olarak tanımlanmıştır (1). Histolojik açıdan periferik retinadan farklı olarak bu gölgede gangliyon hücrelerinin birden fazla nükleus katmanı bulunmaktadır.

Makülanın merkezindeki fovea, göz küresinin optik ekseninde, optik sinir başı merkezinden 4,0 mm temporal ve 0,8 mm aşağıda yer alan 1,5 mm çapındaki bölgedir. Foveada 2. ve 3. nöronların yana itilmesine bağlı olarak 22 derecelik bir girinti oluşur (clivus). Bu bölgede retina kalınlığı 0,25 mm kadardır.

Foveada sinir lifleri, ganglion hücreleri ve iç pleksiform tabakaları yoktur. Foveal çukurluğun merkezindeki fotoreseptör katmanında sadece koniler bulunmaktadır.

Foveanın merkezine foveola (foveal pit) denir. Foveolada retina kalınlığı 150  $\mu\text{m}$ 'ye kadar inmiştir. Yaklaşık olarak 0,35 mm çapındadır. Kırmızı-yeşil konilerin dış segmentleri hariç hüresizdir. Mavi koniler ve kapillerler bulunmaz (2,3). Umbo fovea merkezinde oftalmoskopik olarak görülebilen foveola reflesidir. Avasküler foveola kapillerlerin oluşturduğu bir halka ile çevrelenir. Bu damarlar iç nükleer tabaka düzeyindedir ve 250-600  $\mu\text{m}$  genişliğindeki foveal avasküler zonu (FAZ) oluştururlar.

Parafovea, foveayı çevreleyen yaklaşık 0,5 mm genişliğindeki alandır. Bu bölgede iç nükleer, ganglion hücre ve sinir lifi tabakası kalınlaşmıştır. Perifovea, parafoveadan makülanın dış sınırına uzanan 1,5 mm genişliğindeki alandır. Çok sayıda ganglion hücre tabakası ve 6 tabaka bipolar hücre tabakası içerir.



**Şekil 3.** Foveanın histolojik yapısı

## 2.2. Vasküler Endotelial Growth Faktör

VEGF damar endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer alır ve 45 kD büyüklüğündedir (4). Senger ve ark, 1983 yılında deride damar geçirgenliğini arttıran tümör vasküler permeabilite faktörünü (VPF) tanımlamışlardır (5). Ferrara ve Henzel, 1989'da endotel hücre mitojeni olarak tanımladıkları faktörü

VEGF olarak isimlendirmişlerdir (6). Daha sonra yapılan DNA çalışmaları ile aslında bu iki faktörün aynı olduğu gösterilmiştir (7).

### 2.2.1. VEGF Reseptörleri

VEGF reseptörleri ilk olarak endotel hücrelerinde saptanmıştır (8). VEGF hücre dışına salgılanarak 3 tirozinkinaz, 2 nörofilin reseptörüne bağlanır (8-10). VEGF reseptör 1'in (VEGFR1, Flt-1) pozitif ve negatif anjiogenik etkisi vardır (11). Endotel hücreleri dışında monositler, osteoblastlar, makrofajlar, perisitler, hemopoetik kök hücreleri, damar düz kas hücreleri ve kolorektal tümör hücrelerinde bulunur (8). VEGF reseptör 2 (VEGFR2, Flk-1/KDR) VEGF-A'nın mitojenik, anjiogenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve tübül oluşumunu düzenler (11). Endotel hücrelerine ek olarak hemopoetik kök hücrelerde, megakaryositlerde, retina öncü hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde ve bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, nöroblastoma, meme ve mide kanserleri) bulunur (8). VEGF reseptör 3 (VEGFR3), lenfatik damarlarda anjiogenik etkiden sorumludur (7).

Nörofilin-1, VEGF<sub>165</sub>'in VEGFR2'ye ilgisini ve bu faktöre bağlı kemotaksisi artırır (10). Endotel, nöron ve tümör hücrelerinde bulunur (8, 12). Nörofilin-2, VEGF<sub>165</sub> ile birlikte nörofilin-1'den farklı olarak VEGF<sub>145</sub>'i ve plasental büyüme faktörünü de bağlar (8).

### 2.2.2. VEGF Gen Ailesi

VEGF gen ailesi içinde 7 VEGF bulunur. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F plasental büyüme faktörü (8).

VEGF-A, vasküler endotel hücreleri için özel bir heparin bağlayıcı büyüme faktörü olan bir homodimerik glikoproteindir (13). Anjiogenezi, damar geçirgenliği ve lenfanjiogenezi uyarır ve düzenler (13, 14). VEGF-A, aynı zamanda apoptozisi önleyerek endotel hücreleri için bir sağkalım faktörü olarak hareket edebilir (15). Bir transkripsiyon faktörü olan hipoksiyi indükleyen faktör (HIF) rolü ile hipoksi ile uyarılabilen tek VEGF'tir (16). VEGF-A anjiogeneziyle en çok ilişkili olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür (17). Anti VEGF tedavi çalışmaları da bu

faktör üzerinde yoğunlaşmıştır. Kısaca VEGF diye ifade edilen faktörle anlatılmak istenen aslında VEGF-A'dır. VEGFR1 veya VEGFR2 yoluyla etki eder.

VEGF-B, VEGFR1'e bağlanarak etki eder, hücre dışı matriks degradasyonu, hücre adezyonu ve göçünde rol oynar. Kalp, iskelet kası ve pankreasta fazla miktarda bulunur, endotel hücre fonksiyonunu düzenler (18).

VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR1 ve VEGFR2'e bağlanarak lenfanjiogenezi düzenler (17).

Plasental büyüme faktörü, VEGFR1'e bağlanır ve endotel hücrelerinde en çok bulunan VEGF üyesidir. VEGF-A'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını indüklerken kendi başına zayıf mitojenik etkilidir (7, 17).

### **2.2.2.1. VEGF-A İzofomları**

VEGF-A 36-46 kD ağırlığında bir glikoproteindir ve fizyolojik olarak menstrüel siklusta, embriyo gelişiminde ve yara iyileşmesinde etkilidir. Böbrek glomerülleri, gastrointestinal mukozası ve saç folikülleri gibi dokularda salındığı tespit edilmiştir. Gözde ise primer olarak gangliyon hücreleri, müller hücreleri ve retina pigment epitel hücrelerince üretilip salınır (19).

İnsanlarda 9 tane VEGF-A izoformu tanımlanmıştır. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> (20, 21). En çok bilinen izoformlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>'dır.

VEGF-A izoformlarının içerdikleri aminoasit sayıları ve heparine bağlanma özellikleri farklıdır ve izoformlar içerdikleri aminoasit sayıları ile numaralandırılırlar (22).

VEGF<sub>165</sub> ve daha büyük izoformlar reseptör bağlayıcı bölge ve heparin bağlayıcı bölge içerirken daha küçük diffüze olabilen izoformlar, heparine bağlanmazlar sadece reseptör bağlayıcı bölge içerirler. Büyük izoformlar (örn; VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) heparin bağlayıcı bölge ile hücre dışı matrikse bağlanırlar ve depo izoform olarak adlandırılırlar (7). VEGF<sub>165</sub> ise ara bölgededir, hem diffüze olabilir, hem de kısmen hücre dışı matrikse bağlanabilir. Çalışmalar, en çok bulunan ve anjiogeneziste ana rolü oynayan izoformun VEGF<sub>165</sub> olduğunu göstermektedir.

Son çalışmalar, matriks metalloproteinaz (MMP) 3'ün non-heparin bağlayıcı biyolojik ajan olarak aktif fragmanlarını üretmek için VEGF<sub>165</sub>'i bölebileceğini göstermektedir (23).

### 2.2.3. VEGF Salgılanması

Retinada, VEGF'in ana kaynağı RPE, müller hücreleri, ganglion hücreleri ve perisitlerdir (22). Hipoksik ya da iskemik durumlar, reaktif oksijen ara ürünleri anjiogenezin başlıca aktivatörleridir (24). VEGF-A geninin ekspresyonunda ana düzenleyici faktör HIF-1'dir (25, 26). Diğer pekçok büyüme faktörü (epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), insülin benzeri büyüme faktörü (ILGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)), hipofiz hormonları, nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler (İnterlökin-1, 6,8) de VEGF ekspresyonunun düzenlenmesinde etkilidir (22, 24, 27). RPE'nin koryokapillaris damar sistemi ile komşu olan taban kısmında VEGF salgısı, fotoreseptörlerle komşu olan üst kısmına göre 2-7 kat daha fazladır. Bu farklılık hipoksik durumlarda daha da belirginleşir (28).

### 2.2.4. VEGF-A Fonksiyonları

Çok sayıda yapılan çalışmalarla VEGF-A'nın birçok fonksiyonu araştırılmış ve gösterilmiştir. Bunlar;

- Vaskülojeniz, anjiogenez ve lenfanjiogenezi düzenler (7, 17).
- Damar geçirgenliğinde artışa neden olur (29).
- Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir (8).
- Endotel hücrelerinde apoptozisi engelleyerek hücre devamlılığını sağlar (9).
- Nöron koruyucu etkileri vardır (30). VEGF'in inaktive edildiği farelerde nörodejeneratif hastalık gelişmiş ve VEGF'in nöron koruyucu etkisinin olduğu düşünülmüştür (31).

- Pro-inflamatuar etkilidir. VEGF lökositlere reseptörleri aracılığıyla bağlanabilir. VEGF reseptörleri inflamatuvar hücrelerde ve trombositlerde gösterilmiştir (32).
- VEGF'in normal retinadaki bütün fonksiyonları tam olarak anlaşılammıştır. Gözde aşırı VEGF inhibisyonunun VEGF'in bilinmeyen fonksiyonlarını engelleyerek (örnek: endotel hücre devamlılığı için fizyolojik düzey) yan etki oluşturup oluşturmadığı konusu tartışmalıdır (33).

### 2.3. Vaskülogenez ve Anjiogenez

Neovaskülarizasyonun iki komponenti vardır: vaskülogenez ve anjiogenez. *Vaskülogenez*; embriyoda yolk sak kaynaklı hemanjioblastların matür endotel hücreleri ve kan hücrelerine dönüşerek vücutta yeni damar ağı oluşturmasıdır. Bu anjioblastlar, içteki hücrelerin hematopoetik prekürsörlere ve dıştaki hücrelerin de endotel hücrelerine geliştiği hücre toplulukları şeklinde bulunurlar. Öncelikle endotelial tüp oluştururlar, daha sonra bu tüpçük gelişerek dolaşım sisteminin parçası olan damarlara dönüşür. VEGF, VEGF reseptörü-2 (VEGFR-2) ve temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) anjioblast diferansiyasyonunu etkileyen faktörlerdir (34, 35).

*Anjiogenez*; önceden mevcut olan kan damarlarının endotel hücrelerinden, yeni damar gelişimini ifade eder. Endotel hücreleri yeni kan damarlarının ana kaynağıdır. Mevcut kan damarlarındaki dilatasyon ve geçirgenlik artışı anjiogenezin ilk basamağıdır. Vasküler geçirgenlik artışı fibrin gibi plazma proteinlerinin, büyüme ve inflamatuvar faktörlerin çevre alana geçişine yol açar. Çevredeki matriksin yıkımı ile birlikte endotel hücreleri göç ederek tüp yapılarını oluştururlar (36). Biriken plazma proteinleri endotel hücre göçü için destek yapı oluşturur. Tomurcuklanan yeni damarların çevredeki diferansiye olmuş periendotel hücrelerinden ve matriksten destek aldığı düşünülmektedir. Takiben matürasyon ve yeniden şekillenme fazı ile birlikte yeni bir damar ağı oluşur. Endotel hücre göçü ve invazyonu ürokinaz tip plazminojen aktivatörü, matriks metalloproteinazları ve muhtemelen sistein proteinaz sistemlerinin ortak aktivitesini gerektirir (37). Proteaz

genlerinin ekspresyonu sitokinler, fibroblast büyüme faktörü ve VEGF-A gibi anjiogenik faktörlerle artarken; proteolizis artışı bir taraftan proproteinazların aktive olmasıyla, diğer taraftan plazminojen aktivatörü inhibitörleri, metalloproteinaz doku inhibitörleri ve sistatinlerin down regülasyonu ile sağlanır.

Aktive olmuş endotel hücreleri matriks içinde yayılır ve daha sonra çoğalmaya başlar. Takiben yeni oluşmuş kapillerlerin endotel hücreleri yeni bazal membran sentezler. Yeni kapillerlerin sağlamlığını perisit ve düz kas hücrelerinin sağladığı düşünülmektedir (38). Bu süreç trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) tarafından düzenlenmektedir (39).

Gebelikte plasental gelişim, kadın menstrüel siklusunda ve yara iyileşmesi gibi durumlarda fizyolojik anjiyogenez gerçekleşirken; koroidal neovaskülarizasyon, proliferatif diyabetik retinopati, romatoid artrit, psöriazis, juvenil hemanjiom, ateroskleroz, myokard iskemisi ve tümör gelişiminde fizyolojik olmayan anjiyogenez mekanizması işler (15, 40).

#### **2.4. VEGF ve Neovasküler Oküler Hastalıklar**

Oftalmopatolojilere eşlik eden oküler neovaskülarizasyon, ciddi görme kayıplarının büyük bir bölümüne yol açmaktadır. Proliferatif diyabetik retinopati (PDR), prematüre retinopatisi, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD), neovasküler glokom bu hastalıklardandır. Neovaskülarizasyonun patogeneğinde yer alan VEGF'in kaynağı olan hücreler değişiklik göstermektedir. Korneada VEGF epitel, stroma ve endotel tarafından eksprese edilirken, retinada Müller hücreleri ve retina pigment epiteli başta olmak üzere ganglion hücrelerinin ve perisitlerin de VEGF düzeyinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Endotel hücreleri VEGF'in primer hedef hücreleridir. VEGF, vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonu, göç ve hayatta kalmasını teşvik eder, vasküler geçirgenliği artırır, kan damarlarını genişletir ve endotel hücre öncülleri ve monositleri bulunduğu bölgeye çeker (41). Proliferatif diyabetik retinopati ve neovasküler glokom gibi neovasküler hastalıklarda hem vitreusta hem de hümör aközde yüksek seviyede VEGF saptanmıştır (42). Neovaskülarizasyonlu diyabetik retinopati ve retinal ven tıkanıklığı olan hastaların oküler sıvılarında yüksek VEGF düzeyi olup,

neovaskularizasyon gelişmeyenlerde VEGF düzeyinin normal olması VEGF ve neovasküler hastalıklar arasında önemli bir bağlantı olduğunu gösterir (43).

## 2.5. Anti VEGF Ajanlar

Oral olarak uygulanan reseptör tirozin kinaz inhibitörleri, 1988 yılından bu yana malignitelerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçların birçoğu VEGF aktivasyonunu önlemeye yöneliktir ancak reseptöre nonspesifik bağlandıkları için PDGF, EGF, FGFde etkilenir. Küçük molekül ağırlığa sahip olması (yaklaşık olarak 0,4kDa) nedeniyle tirozin kinaz reseptörü depo intravitreal enjeksiyonlar için uygunsuz idi ve uzun süre oral alım sistemik yan etkilere sebep oluyordu (41). Yeni ilaçlar çözülmüş VEGF dimerlerini, transmembran reseptörler olan VEGFR1 ve VEGFR2' nin dimerizasyonunu engelleyerek vasküler endotel hücre aktivasyonunu önlerler. İki rekombinant strateji ilk anti-VEGF ilaç geliştiriciler tarafından kullanılmıştır bir VEGF<sub>165</sub> özgü aptamer (pegaptanib) ve bir komple VEGF-A-bağlayıcı antikör (monoklonal antikör [Mab], bevacizumab) ve antikör fragmanı (Fab, ranibizumab) sentezi gerçekleştirilmiştir.

İnsanlarda 5 tip immunglobulin izotipi tanımlanmıştır. Molekül ağırlığı ve antijen bağlama kapasitelerine göre gruplanmışlardır. Ig G, Ig A, Ig M, Ig D, Ig E olarak 5 gruptur. İnsanlarda % 80'ini Ig G grubu oluşturur. Onaylanmış tüm monoklonal antikörler bu gruptandır. Ig G'nin yarı ömrü diğer izotiplerinden daha uzundur (yarı ömrü yaklaşık 20 gün). Hem ranibizumab hem bevacizumab rekombine insan monoklonal Ig G1 (humanize Ig G1) yapısındadır.

### 2.5.1. Pegaptanib

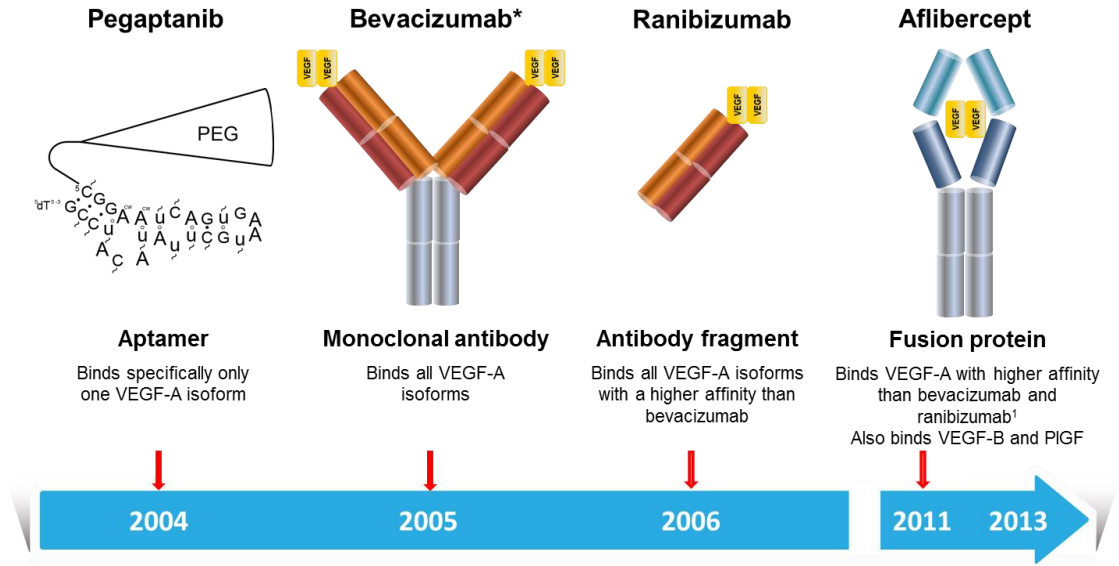
Modifiye edilmiş bir RNA aptameri olan pegaptanib, 28 nükleotid uzunluğunda sentetik bir oligopeptiddir. Aptamerler uygun şekilde katlanmalarla elde edilen üç boyutlu yapıları ile spesifik moleküler hedeflere bağlanabilen oligonükleotidlerdir. 20 şer kDa ağırlığında iki dal, kovalent bağlarla polietilen glikolle (PEG) konjuge edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 50 kDa kadardır. VEGF<sub>165</sub>'in bir adet reseptör bağlayıcı bir adet de heparin bağlayıcı ucu vardır. Pegaptanib heparin bağlayıcı ucuna bağlandığı için spesifik olarak VEGF<sub>165</sub>'i inhibe eder (44). Vücuttan atılımı ise renal yolla yapılır.

### 2.5.2. Bevacizumab

İlk olarak 2004 yılında esas olarak kolorektal kanser tedavisi için FDA onayı almış tüm VEGF-A izoformlarını inhibe eden, bir rekombinant insan monoklonal antikordur. Bevacizumab fare epitoplarnının insanlara uygulanması ile fareden VEGF'e karşı elde edilmiş ve insan bağışıklık sistemine uygun hale getirilmiştir. VEGF'nin endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasına engel olarak endotel hücrelerinin proliferasyonuna sebep olan reseptör dimerizasyonunu ve buna bağlı olarak transfosforilasyon yoluyla aktivasyonunu ve hücre içi aktivasyonu engellemektedir. Üzerinde 2 adet antijen bağlanma bölgesi (Fab ve Fc) bulunur. Molekül ağırlığı 140 kDa'dur (45, 46). Bevacizumab göziçi dozları verilen üretici şişeden sulandırma olmadan çekilir. Bevacizumab onkolojide kullanım için onay almıştır, oküler patolojilerde kullanımı için ruhsatı yoktur, ancak endikasyon dışı olarak tüm dünyada oküler bazı hastalıklarda kullanılmaktadır.

### 2.5.3. Ranibizumab

İnsanlaştırılmış fare anti VEGF antikorunun yalnızca Fab fragmanını içeren parçasıdır. Antijen bağlayıcı fragman olan 'Fab' tam uzunluktaki antikorlara göre daha kısa yarı ömürlüdür ve immün sistemi aktive eden kristalize 'Fc' parçasına sahip değildir (58). Bevacizumabın büyük molekül ağırlığı nedeniyle antikorun antijen bağlayan kısmının pepsin ayırma yöntemiyle ayrılması sonucu oluşan monoklonal antikor parçasıdır. Molekül büyüklüğü tam antikordan daha küçüktür ve bu nedenle retinanın tüm katlarına penetrasyonunun daha iyi olabileceği düşünülmüştür. Yine molekülün hazırlanması sırasında VEGF-A'ya bağlanma özelliğinin artırılması için 'afinite maturasyonu' yöntemi uygulanır. Bu sayede afinitesi 5-20 kat artırılır (47). Ranibizumab (Lucentis; Genentech, South San Francisco, CA, USA) Ocak 2006'da Amerika'da ve Mart 2008'de Türkiye'de onay almıştır.



**Şekil 4.** Anti VEGF ajanlar

[www.eylea.com/en/eylea-insight/kol-presentations/aflibercept-the-molecule/images/slide3.png](http://www.eylea.com/en/eylea-insight/kol-presentations/aflibercept-the-molecule/images/slide3.png) sitesinden alınmıştır.

#### 2.5.4. Aflibercept

Aflibercept farklı rekombinant stratejisi ile oluşturulmuştur. 115 kDa ağırlığındadır. Rekombinant bir füzyon proteindir. VEGF reseptörlerinin 1 ve 2 tipinin taklidi ile insan Ig G'sinin Fc bölümünün birleşimidir. Tüm VEGF<sub>165</sub> izoformlarına çok yüksek afinite göstermektedir. Bununla birlikte VEGF<sub>121</sub>, VEGF-B ve PlGF-1'e de yüksek afinite göstermekle birlikte, VEGF-C ve VEGF-D'ye afinite göstermez (48). Gerçek antikorlar yüksek molekül ağırlıklı agregatlar oluştururken, aflibercept VEGF'e birebir bağlanarak agregatlar oluşturmaz (49).

#### 2.6. Anti VEGF İlaçların Farmakokinetiği

Dört VEGF-bağlayan ilaç da hayvanlarda ve insanlarda test edilmiş, ancak insanlarda farmakokinetik değerler hakkında tam veri elde edilememiştir. Vitreusun sıralanmış kollajen ve glikozaminoglikanlardan oluşan bir jel benzeri kıvama sahip olması ilacın hızlı dağılımına engel teşkil etmektedir (43). Çoğu araştırmacı göz içi ilaç davranışlarını açıklamak için tek kompartman modeli kullanırken bazıları ilacın hızlı başlangıç dağılımını hesaplamak için iki kompartman modelini kullanırlar (43). İlaçlar intravitreal uygulamadan sonra retina ve RPE'yi geçerek koroidal dolaşıma katılırlar, trabeküler ağ yoluyla çıkmadan önce difüzyon ile siliyer cismi ve irisi

geçerek ön kamaraya taşınırlar. Sistemik yarılanma ömürleri (saat- haftaya kadar) büyük ölçüde değişebilir. Glomerüler filtrasyon veya pinositoz yoluyla eliminasyondan sonra ortadan kaldırılır.

Pegaptanibin maymunlarda 3,9 günlük vitreus yarı ömrü vardır (50). İnsan gözünde yarı ömrü tespit edilmemiş olsa da tahmini yarı ömrü 7 gündür. Sistemik dolaşıma girdikten sonra, maksimum serum konsantrasyonuna 1-4 gün içinde ulaşır ve serum yarı ömrü 10 gündür. Pegaptanib endo ve egzonükleazlar ile metabolize edilir ve idrarla dışarı atılır. Böbrek yetmezliğinde doz ayarlamasına gerek yoktur.

Bevacizumab, tavşanlarda intravitreal enjeksiyon sonrasında 2 saat içinde subretinal mesafede (51), ilk gün içerisinde iç retina tabakalarında ve koroidde, ilerleyen günlerde koroidde tespit edilmiş, fakat 4 hafta sonra ilaç bulunamamıştır (52). Retina içinde ilaç pik konsantrasyonu vitreusa verildikten sonraki ikinci gündür. Tavşanlarda bevacizumabın yarı ömrü vitreus, aköz ve serumda sırasıyla 4,3, 4,9 ve 6,8 gün bulunmuştur (53, 54). Bir başka çalışmada ise vitreus, aköz ve serum yarı ömürleri 6,61, 6,51 ve 5,87 gün bulunmuştur. Bevacizumabın insan serumundaki yarılanma ömrü diğer aynı yapıdaki antikörlere benzer olup 17-21 gündür (55). Topikal bevacizumab kullanımının gözyaşından hızlı eliminasyonu ve 5 kD'dan büyük molekül olması nedeni ile intakt epitelden zayıf penetrasyon göstermesi ile terapötik intraoküler konsantrasyona ulaşması beklenemez. Ancak topikal ve subkonjonktival bevacizumab neovaskülarizasyon varlığında korneal stromaya penetre olabilir (56). Bevacizumabın mikron boyutunda protein agregatlara sebep olması aköz dışı akımın obstrüksiyonuna ve göz içi basıncının yükselmesine sebep olabileceği endişelerini getirmiştir. Donmuş ve çözünmüş bevacizumabın biyolojik aktivitesinin etkilendiği gösterilmiştir (57).

Ranibizumab; Sadece 'Fab' parçasına sahip olan molekül 'Fc' bağımlı kompleman aktivasyonunu veya immün hücre tahribini engeller ve sistemik antikor yanıtını kısıtlar (59).

İntravitreal enjeksiyon sonrası ranibizumabın tavşanlardaki vitreus yarı ömrü 2,6-2,88 gündür. Humör aközdeki pik konsantrasyonuna 3 günde ulaşır (60-62). Ranibizumab enjeksiyondan 1 gün sonra tamamen retinaya nüfuz eder. Serumdaki ilaç konsantrasyonları (vitreusun 1/10, 000'i) çok düşüktür veya tespit edilemez (61,

62). Maymunlarda ranibizumabın yarı ömrü 3 gün ve serum konsantrasyonları vitreustakinden 1000 kat daha düşüktür (47, 63). Ranibizumab 6-24 saatte retina içinde hızlı bir şekilde dağılır ve tedavi edici konsantrasyonunu 1 ay boyunca korur (63).

Ranibizumabın intravitreal uygulamadan sonra insanlardaki vitreustaki yarı ömrü matematiksel ve populasyon modellerine göre 4,8-9 gün olarak tahmin edilir. Ranibizumabın serum konsantrasyonlarının intraoküler konsantrasyonlara göre 90000 kat daha az olduğu düşünülür (64).

Afliberceptin tavşanlarda 4,7 günlük bir yarı ömrü vardır (65). İnsanlarda farmakokinetik çalışmalar yapılmamıştır.

## **2.7. Anti VEGF İlaçların Farmakodinamiği**

Onkolojik ve pilot YBMD çalışmalarında VEGF-bağlayan ilaçların sistemik uygulanmasıyla hipertansiyon, proteinüri ve tromboembolik olaylar, özellikle de miyokardiyal enfarktüs ve inme gibi olayların insidansı artmıştır. Ancak, aynı yan etkilerin bu ilaçların intravitreal verilmesiyle ortaya çıkacağı belirsizdir. Elimizdeki büyük verilere rağmen intravitreal tedavinin sistemik yan etkileri tam olarak çözülememiş önemli bir sorun olarak devam etmektedir (41).

Aynı yaş grubu kontrollerle karşılaştırıldığı zaman eksudatif YBMD hastalarının serum VEGF konsantrasyonları kontrol grubuyla benzer bulunmuş. İntravitreal bevacizumab enjeksiyonundan sonra plazma VEGF seviyelerinde % 42 azalma olmuş (66). İntravitreal ranibizumab enjeksiyonundan sonra, humor aköz VEGF seviyeleri 85,57 pg/ml'den fizyolojik seviyelerinin altına kadar azalmıştır (67, 68). Büyük randomize kontrollü çalışmalarda, serum VEGF düzeylerinin intravitreal bevacizumab enjeksiyonu sonrasında azaldığı ancak intravitreal ranibizumab enjeksiyonundan etkilenmediği bildirilmiştir (69,70). İntravitreal bevacizumab insan sütündeki VEGF-A konsantrasyonunu azaltırken, ranibizumabın böyle bir etkisi olmamıştır (71).

İn vitro çalışmalarda bevacizumab, ranibizumab ve pegaptanib VEGFR2 ekspresyonunu ve VEGF sentezini hücre canlılığını etkilemeden azaltmışlardır.

Bununla birlikte bevacizumab ve ranibizumab hücre proliferasyonunu baskılayıp apoptozu arttırırken pegaptanibin böyle bir etkisi görülmemiştir (72).

İn vivo çalışmalarda gelişmekte olan tavşan retinasında bevacizumab enjeksiyonlarının retina ganglion hücrelerine ve sinir liflerine toksik olmadığı, ancak kan damar gelişimini etkilediği gösterilmiştir (73, 74). Tek doz bevacizumab enjeksiyonları domuz retinasında yapısal değişiklikler, gliosis, apoptozise neden olmamıştır; retina (% 60) ve RPE (retina pigment epiteli) hücrelerinde VEGF transkripsiyonunu azaltmıştır (75). Bevacizumab ve ranibizumaba maruz kalan rat retinalarında toksisite gözlenmezken, yüksek doz pegaptanib uygulananlarda mitokondriyal şişme görülmüştür (76).

İki yeni VEGF-bağlayan ilacın DARP (designed ankyrin repeat protein) MP0112 ve ESBA 1008 eksudatif YBMD tedavisinde çalışmaları devam etmektedir.

## **2.8. Gebelik ve Göz**

Hamile bir kadın vücudunun her organ sistemi, gebe olmayan kadına göre değişiklik gösterir. Fizyolojik, hematolojik, hormonal, immünolojik, metabolik değişiklikler meydana gelir; bununla birlikte gözlerde de değişiklikler olur. Diğer değişiklikler ile birlikte maternal endokrin sistemi ve plasental sebeplerle geçici ve nadiren kalıcı oküler anormallikler gelişebilir. Gebelikte daha önceden var olan hastalıklar şiddetlenebilir ya da iyileşebilir.

Gebeliğin göze etkilerini 3'e ayırabiliriz; gebelikte gözdeki fizyolojik değişimler, gebeliğe bağlı gözde meydana gelen hastalıklar, zaten var olan gebelikte modifiye olan hastalıklar (77).

### **2.8.1. Gebelikte Gözdeki Fizyolojik Değişimler**

#### **2.8.1.1. Göz Kapağı ve Konjonktiva**

'Hamilelik maskesi' olarak adlandırılan chloasma (melasma), göz kapaklarının etrafında ve yanaklarda oluşabilen kahverengi renk değişikliğidir. Çoğunlukla postpartum dönemde geriler. Östrojen ve progesteronun artmasına bağlı hormonal değişimler melanogenesis ve melanositoziste artış sonucu olduğu düşünülür.

Pitozis, normal gebelikte ve sonrasında bildirilmiştir ve sıvı tutma ve hormonal değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir (78).

Graves hastalığı gebelik sırasında ilk kez ortaya çıkabilir veya önceden var olan hastalık erken gebelikte ağırlaşmış olabilir. Çeşitli tedavi yöntemleri fetus için risk teşkil edebileceği için dikkatli bir değerlendirme gerektirir (79, 80).

### **2.8.1.2. Kornea ve Refraksiyon**

Korneal duyarlılık giderek gebelikte azalır ve doğumdan 4-6 hafta sonra gebelik öncesi seviyelerine ulaşmaktadır. Bunun kornea ödeminden kaynaklanan kornea kalınlığında bir artış ile ilişkili olduğu düşünülür (81). Bu da kornea refraktif indeksinin değişimine ve refraksiyonda değişime sebep olur. Kontakt lens kullanan hamilelerde kornea ödemeine bağlı artan kornea kalınlığı, değişmiş gözyaşı kompozisyonu ve buna bağlı kontakt lense intolerans olabilir. Gebelik ve erken post-partum dönemde kontakt lenslerden kaçınmak idealdir. Korneal eğrilikte de artış bildirilmiştir. Doğumdan sonra veya emzirme döneminde tamamen normale döner (82).

Gebelik gözyaşı filminin fizyolojisini etkileyerek kuru göz sendromu ile sonuçlanabilir (83). Gebelik ve laktasyonda akomodasyonda geçici kayıp bildirilmiştir (84).

### **2.8.1.3. Göz İçi Basınç (GİB)**

Gebelikte göz içi basınç düşmektedir. Sağlıklı gebe kadınlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki gebe olmayan kadınlara kıyasla gebeliğin her trimesterinde GİB istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (85, 86). Gebelikte GİB'de bu düşüş artmış uveo-skleral çıkış ve vücudun üst kısmındaki azalan venöz basınç sonucu episkleral venöz basınçta bir azalma sonucudur. Hamile bayanlarda gebelik öncesi diurnal varyasyonlarına kıyasla GİB diurnal dalgalanmaları azalmıştır (87).

### **2.8.1.4. Görme Alanı**

Gebelikte hipofiz bezinin boyutunda fizyolojik bir artış olmaktadır, ancak optik kiazma ve hipofiz bezi arasında anormal bir anatomik ilişki yoksa bu artış,

kendini bir görme alanı kusuru olarak göstermez. Görme alanında bitemporal daralma, konstriktör daralma olan vakalar bildirilmiştir (88).

## **2.8.2. Gebeliğe Bağlı Gözde Meydana Gelen Hastalıklar**

### **2.8.2.1. Santral Seröz Koryoretinopati (SSR)**

Seröz retina dekolmanlı sınırlı alan oluşturarak, fundus arka kutupta retina altı sıvı birikimi ile karakterizedir. Gebelikte SSR gelişimi hemodinamik ve hormonal değişiklikler, hiperkoagülasyon, artmış damar geçirgenliği, koloidal ozmotik basınçta azalma ve prostaglandin düzeylerindeki değişiklikler gibi birçok faktöre bağlanmıştır. Santral maküla alanını tutmuşsa gebe tipik metamorfopsi, pozitif skotom ve mikropsi tarifler, lezyon santralde değilse genellikle asemptomatiktir. Dekolman gebelik sonunda ya da kısa bir süre sonra kendiliğinden düzelir (89). Tıbbi tedavilerin ve lazer fotokoagülasyonun hiçbir kanıtlanmış etkisi yoktur, sadece seçilmiş durumlarda tavsiye edilir (90). Gebe hastaların küçük bir yüzdesinde (% 5) SSR'nin geniş retina dekolmanlı ve ciddi görme kaybının olduğu bir formunun geliştiği bildirilmiştir (91). Optik koherens tomografi (OCT) gebe hastalarda SSR teşhis ve takibi için çok değerli bir araçtır (92).

### **2.8.2.2. Hipertansiyon ve Gebelik**

Önceden normal tansiyonlu gebe bayanda hipertansiyon gelişebilir veya önceden mevcut olan hipertansiyon kötüleşebilir (93). *Preeklampsi* genellikle gebeliğin ikinci yarısında ortaya çıkar, hipertansiyon ve proteinüri ile karakterizedir. Anne yaşı, parite, çoğul gebelik ve eşzamanlı diyabetes mellitus varlığı, kronik hipertansiyon ve böbrek hastalığı bağımsız risk faktörleridir. *Eklampsi* preeklampitik bir hastada konvülsiyon da olmasıdır. *Gebeliğin ağırlaştırıcı hipertansiyon* kronik hipertansiyon üzerine binmiş preeklampsi veya eklampsi olmasıdır (77).

Skotom, çift görme, görme azalması ve fotopsi gibi görme bozuklukları, ciddi preeklampsili kadınların % 25'i ve eklampsili kadınların % 50'sinde rapor edilmiştir. En sık rastlanan retina bulguları preeklampitik hastaların yaklaşık % 60'ında izlenen retinal arteriollerde daralmadır (94). Eğer daralma çok şiddetliyse, hipertansif retinopatinin diğer bulguları olan retinal ödem, hemorajiler ve yumuşak eksudalar

gözlenebilir. Optik disk değişiklikleri olarak papil ödem, akut iskemik optik nöropati ve optik atrofi geliştiği gösterilmiştir. Preeklampatik hastaların % 0,1-32,4'ünde eksudatif retina dekolmanı geliştiği bildirilmiştir (95). Dekolman doğum sonrası kısa sürede düzelir.

Işık uyarısının konvulsiyon nöbeti riskini arttırdığının bilinmesine rağmen retinal değişiklikler plasental vasküler değişikliklere ayna tuttuğu için ve inutero sürekli vasküler yetmezlik fetusta kalıcı değişikliklere neden olabileceği için oftalmoskopik muayeneden kaçınılmamalıdır (77).

### **2.8.2.3. Dissemine İnvasküler Koagülasyon (DİK)**

Yaygın damar içi pıhtılaşma (DİK) ablasyo plasenta, amniyotik sıvı embolisi, intrauterin fetal ölüm, komplike kürtaj veya eklampsi gibi obstetrik komplikasyonlardan oluşabilir (96). DİK gözde en çok koroidi etkiler. Koroidal oklüzyon sekonder seröz retina dekolmanına sebep olur. Koroidal hemoraji ve infarkt görülebilir (97). Özellikle ağır hipertansiyon ile birlikteyse retina ve koroid hasarıyla hafif ya da ağır görme kaybıyla sonuçlanabilir.

### **2.8.2.4. Retinal Ven Oklüzyonu**

Gebelikte venöz tromboemboli riski % 0,05-1,8'dir. Sıklıkla 3.trimester ve postpartum dönemde görülür. Herhangi bir koagülasyon problemi olmayan normal gebelikte de retinal ven oklüzyonu ve papilloflebit görüldüğü raporlanmıştır (98).

### **2.8.2.5. Retinal Arter Oklüzyonu**

Preeklampsi ile komplike olmamış gebeliklerde de hemostatik faktörlerin doğuştan ya da sonradan gelişen eksikliği ile veya antifosfolipid antikor sendromu olanlarda arterioler ve arterial tıkanıklık hiperkoagülabilitateye sebep olabilir (99).

### **2.8.2.6. Yüksek Miyopi**

Yüksek miyopi gençlerde koroidal neovaskülarizasyonun (KNV) en sık görülen nedenidir. Bir çalışmada miyopik hastalarda hamilelikle birlikte KNV'de ilerleme görülmüştür. Bu çalışmada postpartum uterin arter kan akışının ani düşmesi

ve sonucunda sirkülasyon volümünde artış damarları rüptüre ve çatlamaya elverişli hale getiriyor olması öne sürülmüştür (100).

### **2.8.2.7. Koroidal Neovaskülarizasyon**

KNV ve gebelik arasındaki ilişki retinal ve koroidal neovaskülarizasyon, uyarabilen VEGF, PIGF, eritropoietin ve nitrik oksit dahil olmak üzere birçok anjiyojenik faktörlerin artan aktivitesinin sonucu olabilir (101). Bir çalışmada PIGF gibi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGFR1-2 nin ileri evre YBMD hastaların insan neovasküler membranlarında arttığını göstermişlerdir (102). Bu çalışmada farelerde yetersiz PIGF ve PIGF reseptörlerinin lazerle indüklenen KNV gelişmesini engellediği gösterilmiştir. Kronik inflamasyon sırasında salınan anjiyojenik büyüme faktörleri ve sitokinler neovasküler damar gelişmesini tetikleyebilir (103). Bununla birlikte, bugüne kadar hiçbir deneysel çalışma KNV ve gebelik arasındaki ilişkiyi göstermemiştir.

### **2.8.3. Gebelikte Modifiye Olan Hastalıklar**

#### **2.8.3.1. Gebelik ve Diyabetik Retinopati**

Gebelik diyabetik retinopatinin ilerlemesi için major bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (104). Önceki çalışmalarda tip 1 diyabetli kadınların % 57-62'sinde, tip 2 diyabetli kadınların % 17-28'inde diyabetik retinopati ilk olarak gebelikte saptandığı gösterilmiştir (105-107).

Diyabetik retinopatinin gebelik başlangıcındaki düzeyi de, hastalığın ilerlemesi yönünde güçlü bir göstergedir. Erken gebelikte diyabet çalışmasına göre, retinopatisi olmayan kadınların % 10,3'ü, sadece mikroanevrizmaları olup diğer retinopati bulguları olmayan kadınların % 21,1'inde gebelik sırasında ve sonrasında hastalık ilerleme göstermektedir (108). Gebelikte retinopatinin ilerlemesi tip 1 diyabet ile daha yakından ilişkili bulunmuştur (105). Gebelikte diyabetik retinopati ilerlemesini etkileyen faktörler; diyabet süresi, gebelik başlangıcındaki retinopati derecesi, metabolik kontrol ve birlikte mevcut hipertansiyon varlığı olarak gösterilmiştir (109). Glisemik kontrolün zayıf olması, ilk trimesterde HbA1c düzeyinde büyük miktarlarda düşüş olması diyabetik retinopati progresyonu için

artmış risk faktörlerindedir (110). Hızlı HbA1c düşüşünün diyabetik retinopatiyi kötüleştirmesinin sebebi hala tam olarak bilinmemektedir (111). Bununla ilgili 2 hipotez ortaya atılmıştır: 1) Maternal serumda IGF-1 seviyelerinin artması, 2) glukozun yüksek seviyeleri ve daha sonra glukoz seviyesinde hızlı azalma retinal kapillerlerde perisit apoptozuna neden olmaktadır (112,113). Kronik hipertansiyon ve/veya gebeliğe bağlı hipertansiyon ve preeklampsi olan diyabetik hastalarda diyabetik retinopati ilerlemesi daha yüksek oranlarda görülür (114, 115).

### 2.8.3.2. Maküler Ödem

Gebelikte % 10 kadında maküler ödem gelişir. Bunların % 3'ünde maküla merkezinde 500 µm içinde önemli değişiklikler yapan, klinik olarak anlamlı maküla ödemi şeklindedir (116). Gebelikte erken bir aşamada maküla ödemi varlığı retinada dönüşümsüz hasar için önemli bir risk teşkil eder (107). Tip 1 diyabeti olan gebelerde maküla ödemi veya proliferatif retinopati nedeni ile lazer gerektiren retinopatide progresyon % 4-6,8 oranında görülür (110, 116). Tip 2 diyabetlilerde gebelik sırasında maküla ödemi gelişim oranı % 3'tür (107). Bazı yazarlar retina ve görmenin geri dönüşümsüz zarar görmesini önlemek için ilk aşamada makülaya lazer uygulamayı tavsiye etmektedirler, ancak proliferatif diyabetik retinopati ek bir sorun oluşturmaktadır (107). Gebe olmayanlarda, panretinal fotokoagülasyonun maküla ödemini ağırlaştırmak gibi bir riski vardır (117). Bu öneriler genelde gebeliğe spesifik öneriler değildir. Gebeliğe bağlı diyabetik makülopati tedavisinden bahseden çok az çalışma vardır. Gebelik sırasında ya da gebelikten 1 ay sonra anlamlı maküla ödeme karşı lazerin etkinliği ile ilgili çalışmalar vardır (107, 116). Ancak tartışılacak kadar çok çalışma mevcut değildir. Maküla ödemi postpartum kendiliğinden de gerileyebilmektedir (107, 117, 118).

Doğumdan sonra ilk 8 hafta içinde proliferatif diyabetik retinopatiye ilerleme riski vardır. Postpartum 1 yılda artmış risk devam eder, daha sonra azalır (119, 120). Postpartum dönem kadınlar gebe olmayanlarla karşılaştırıldığında PDR gelişim insidansı 3 kat fazla bulunmuştur ve bu ilerleme hızı gebelik öncesi seviyelerine 1 yıl sonra döner (121). Bazı çalışmalar ise gebeliğin, uzun vadede diyabetik retinopati ilerlemesinin önlenmesinde koruyucu olabileceğini savunmuştur (122). Bir çalışmada gebelik sonrası 7,3 yıllık ortalama takip döneminde retinal mikrovasküler

komplkasyonların insidansı artmamıştır. Çocuk doğurmuş olanların % 19, hiç doğurmamış olanların % 50'sinde diyabetik retinopatide progresyon görülmüştür (123).

### **3. MATERYAL ve METOD**

Çalışma 15.07.2013- 15.05.2014 tarihleri arasında yapıldı. Bu çalışma 02.07.2013 tarih ve 21\_2 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışma 3667-TU2-13 proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

#### **3.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler**

1. Soğutmalı santrifüj
2. -80° C derin dondurucu
3. Eppendorf tüpleri
4. Pastör pipeti
5. ELISA
6. Rekombine insan VEGF165 (RD Systems, Inc, Minneapolis, MN USA)
7. ELISA kiti (Protein Detektörü ELISA Kit; KPL, Inc, Gaithersburg, Maryland, USA)

#### **3.2. Hayvanlar ve Deneyin Planı**

Bu çalışmaya yaşları 3-4 yıl, ağırlıkları 40-45 kilogram arasında değişen laktasyon dönemindeki ‘pırtı’ cinsi 12 koyun ve bunların emen 3’er aylık birer kuzuları dahil edildi.

Hayvanlar yeşil otlar, yem ve istedikleri zaman içebilecekleri su ile beslendi. Koyunlar yavruların yanında tutuldu, sadece süt ve kan alımı sırasında yaklaşık 1 saat koyunlar ve kuzular ayrıldı. İntravitreal enjeksiyonu öncesinde koyunların ön segment muayeneleri yapıldı.

Koyunlar ve kuzuları ranibizumab ve bevacizumab grubu olmak üzere 6’şarlı iki gruba ayrıldı. Tüm koyunlara intravitreal enjeksiyondan 2 gün önce endoftalmi profilaksisi amacıyla % 3 ofloksasin solüsyon (Exocin, Alcon, Inc, Switzerland) damla günde 4 kez olacak şekilde uygulandı. İkinci günün sonunda intravitreal

enjeksiyon işlemi uygulanmadan önce her bir koyundan ortalama 2 ml kan alındı (Resim 1).



**Resim 1.** Koyunlardan kan alınması

Meme boşalana kadar sütler sağıldı ve bu süttten de ortalama 2ml örnek alındı. Kan numuneleri oda sıcaklığında yarım saat bekletilip santrifüj edilmek üzere laboratuvara götürüldü. 10 dakika 1500 devirde soğuk santrifüjden sonra süpernatantı eppendorf tüpüne konularak -80 derece buzluğa konuldu. Süt numuneleri ise doğrudan -80 derecede buzlukta saklanmak üzere laboratuvara götürüldü.

Aseptik koşullar sağlandıktan sonra hayvanlar immobilize edilip gözlerine %0,5 proparakain HCI (Alcaine, Alcon, Inc, Switzerland) damlatılarak ve fornikslere topikal anestezik emdirilmiş sponçlar yerleştirilerek topikal anestezi yapıldı. %10'lik povidon iyot ile göz çevresi antiseptisi sağlandı. Blefarosta takıldı. Topikal %5'lik povidon iyot fornikslere damlatılıp 3 dakika beklendikten sonra povidon iyot yıkanarak uzaklaştırıldı (Resim 2).



**Resim 2.** Göz çevresi antisepsisi sağlanmış blefarosta takılmış koyun gözü

Üst temporal kadrandan limbusun 3,5 mm gerisinde skleradan 26 G insülin enjektörü ile intravitreal enjeksiyon bir gruba ranibizumab (0,5mg/0,05ml), diğer gruba bevacizumab (1,25mg/0,05ml) olacak şekilde uygulandı. Enjeksiyon sonrası iğne çekilirken pamuk aplikatör ile enjeksiyon yerine bası yapılarak tampon yapıldı (Resim 3,4).



**Resim 3.** Koyun gözüne intravitreal enjeksiyon yapılması. 3,5 mm gösteren ölçekle ölçüldükten sonra üst temporal bölgeden intravitreal enjeksiyonun yapılması izleniyor.



**Resim 4.** Koyun gözüne intravitreal enjeksiyondan sonra pamuk aplikatörle basılması

Antibiyotikli göz pomadı sürülerek işleme son verildi. Topikal antibiyotikli damlaya (Exocin, Alcon, Inc, Switzerland) enjeksiyon yapılan göze 5 gün daha günde 4 kez devam edildi.

Bevacizumab grubu koyunlarda çalışmaya 3 hafta, ranibizumab grubu koyunlarda çalışmaya 1 hafta devam edildi. Kuzularda ise 1 günlük takip yapıldı. İntravitreal enjeksiyondan sonra bevacizumab grubunda 3. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saatler, 2. gün, 3. gün, 5. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 3. hafta da kan ve süt örnekleri alındı. Ranibizumab grubunda ise 3. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saatler, 2. gün, 3. gün, 5. gün, 1. hafta da kan ve süt örnekleri alındı. Her iki gruptaki kuzulardan 6., 12. ve 24. saatlerde kan örnekleri alındı. İntravitreal enjeksiyon öncesinde ve örneklerin toplandığı günlerde koyunların ön segment muayeneleri yapıldı.

Enjeksiyon yapılan 12 gözün 4'ünde enjeksiyon bölgesinde minimal subkonjoktival hemoraji, 1'inde katarakt oluştuğu gözlendi. Gözlerin hiçbirisinde kornea ödemi, ön kamarada bulanıklık, endoftalmi izlenmedi.

### 3.3. Ölçümler ve Değerlendirme

Üreticinin protokolüne uygun olarak ve önceki çalışmalardan küçük modifikasyonlar yapılarak, bevacizumab ve ranibizumabın serum ve süt konsantrasyonları, bir enzim bağlantılı immunosorbent analiz (ELISA) kiti (Protein

Detektörü ELISA Kit; KPL, Inc, Gaithersburg, Maryland, USA) ile ölçüldü. Mikro plakalar (Immuno 96 MicroCell katı levhalar, Nunc, Roskilde, Danimarka), oda sıcaklığında 1.0 µg/ml'lik bir konsantrasyonda rekombine insan VEGF<sub>165</sub> (RD Systems, Inc, Minneapolis, MN USA) ile 1 saat boyunca kaplandı (100 µl/oyuk). Nonspesifik bağlanmayı önlemek için kuyu bloke edildikten sonra, her biri 100 µl olan numuneler ve farklı konsantrasyonlarda standartlar plakalara ilave edildi. Standart eğriler, bevacizumab ve ranibizumabın 1 ng/ml ile 5000 ng/ml arasında değişen oranları ile hazırlandı. Bağlanmış bevacizumab ve ranibizumab ELISA kiti ile hazırlanan 0,1 µg/ml horseradish peroksidaz-keçi anti-insan Ig G (H+L) konjugatları ile görünür hale geldi. Optik yoğunluk 405 nm'de belirlendi. Bevacizumab ve ranibizumab için saptama limiti, sırasıyla 0,9 ng/ml ve 0,62 ng/ml olarak belirlendi. Bu deney ile serbest bevacizumab ve ranibizumab tespit edildi ve tüm ölçümler üreticinin tavsiyesine göre iki kere yapıldı (124).

### **3.4. Farmakokinetik Metod**

Bevacizumab ve ranibizumabın serum ve süt konsantrasyon-zaman eğrileri ve eğri altında kalan alan hesaplamaları Graaf Pro farmakokinetik programı kullanılarak yapıldı.

#### 4. SONUÇLAR

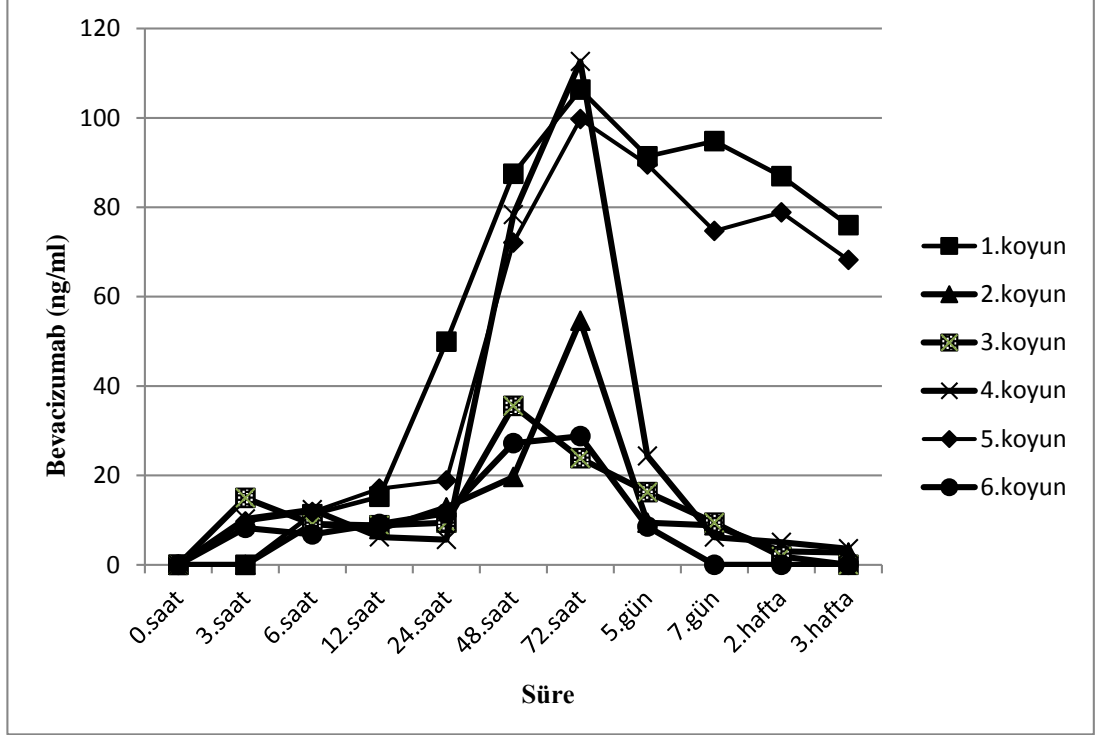
Bevacizumab grubu koyunların kan ve sütteki ilaç konsantrasyonları tablo 1 ve 2’de, zamana göre değişim grafiği grafik 1 -14’te gösterilmiştir.

Koyunların emen kuzularının kanındaki ilaç konsantrasyonu tablo 3’te, zamana göre değişim grafiği grafik 15’te gösterilmiştir.

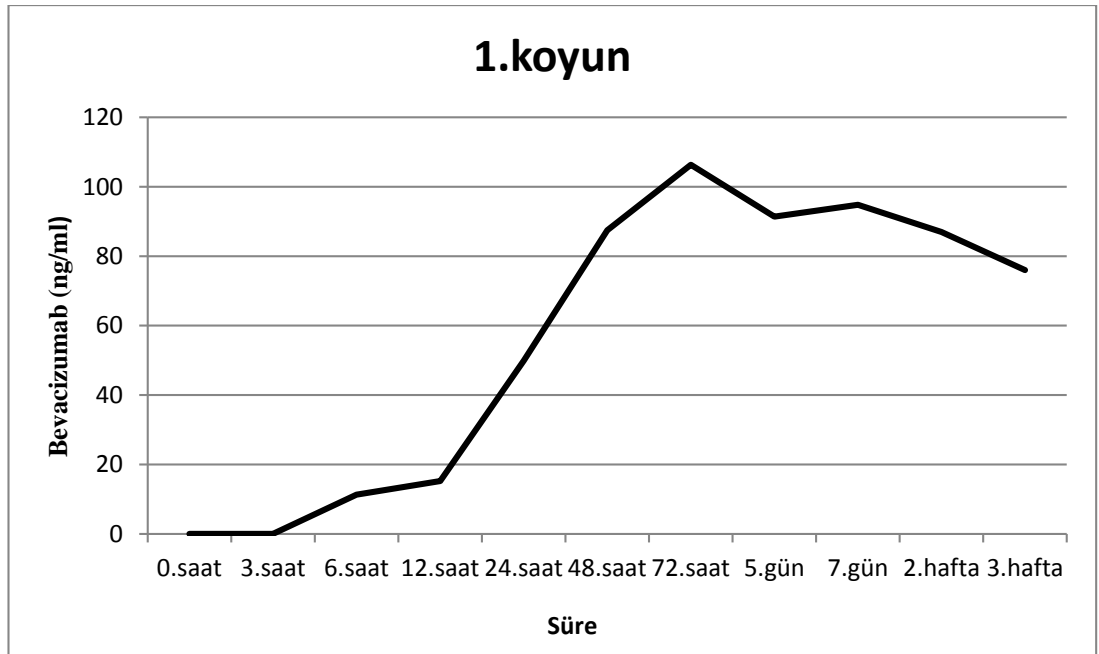
İlacın tek doz ve intravenöz yol dışında bir yolla verilmesi durumunda ilacın serum konsantrasyon–zaman eğrilerinde başlangıçta serum ilaç konsantrasyonu sıfırdır ya da kullanılan nicel analiz yönteminin altında kaldığı için sıfır sayılır. Absorbsiyon ilerledikçe konsantrasyon yükselir ve nihayet bir maksimum değere ulaşır. Bundan sonra konsantrasyon giderek azalmaya başlar. Elde ettiğimiz bu eğrilerin (grafik 1-15) çıkıcı kısmında absorpsiyon hızı>eliminasyon hızı’dır. Doruk noktasında bu iki olayın hızı kısa bir süre birbirine eşit olur. Eğrilerin ikinci kısmında ise eliminasyon hızı > absorpsiyon hızı’dır.

Serum konsantrasyon-zaman eğrilerinin kantitatif olarak değerlendirmelerinde farmakokinetik bakımından önemli olan 3 parametre vardır: a) maksimum (doruk) konsantrasyon değeri (Cmax), b) doruk süresi (absorpsiyon başlamasından itibaren konsantrasyonun doruğa ulaşması için geçen süre, t max) ve c) eğri altında kalan alanın yüzölçümü (EAA)’dür. Doruk süresi (t max) aynı zamanda absorpsiyon hızını yansıtır.

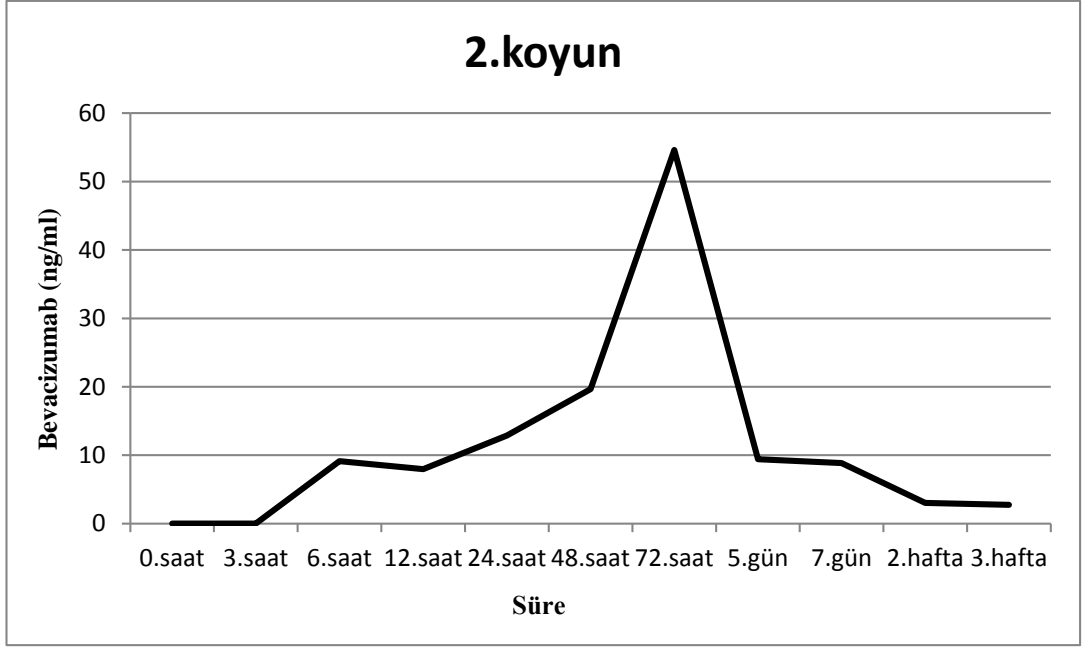
Çalışmamızda intravitreal uygulamadan sonraki 6. saatte tüm koyunların kanında bevacizumab konsantrasyonu ölçülebilir seviyede idi. 3. koyunda maksimum konsantrasyon değerine 48. saatte, diğer tümünde 72. saatte ulaşıldı. Çalışmaya son verilen 3. haftada da koyunların 4’ünde bevacizumab seviyesi yüksek olarak tespit edildi. Sütteki bevacizumab konsantrasyonu ise koyunlar arasında ve aynı koyunda dahi fluktuasyonlar göstermekte idi. Ancak tüm koyunların sütüne ilacın ölçülebilir konsantrasyonlarda geçtiği tespit edildi. Emen kuzuların kanında ise 6. saatten itibaren 24 saat boyunca bevacizumab ölçülebilir seviyelerde idi.



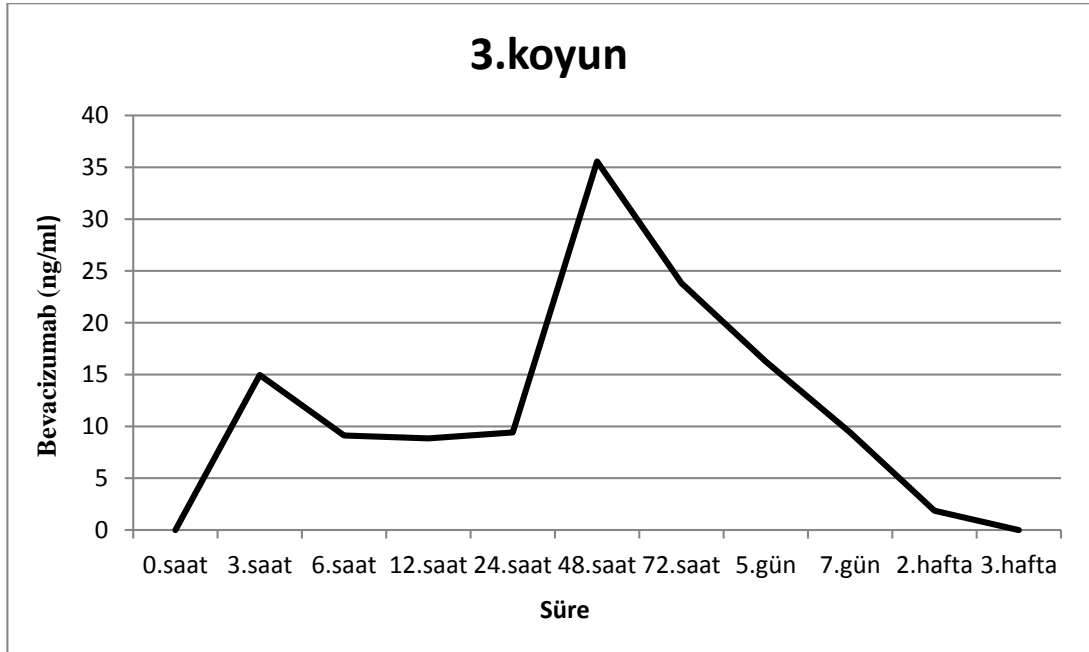
**Grafik 1.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunlarda kandaki ilaç konsantrasyonları (ng/ml).



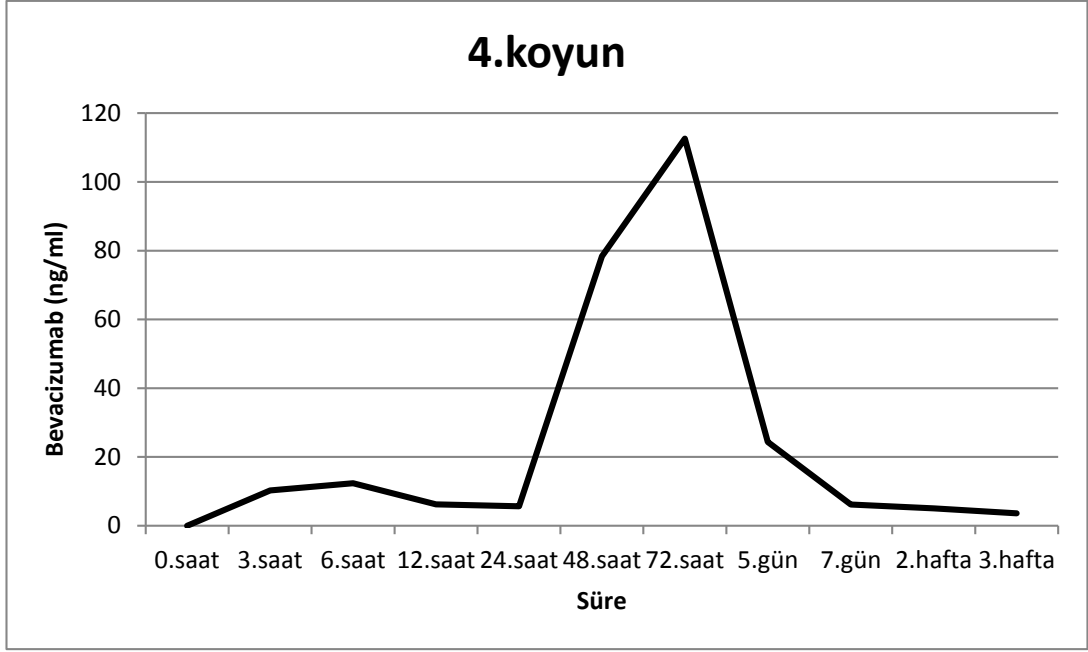
**Grafik 2.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 1. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).



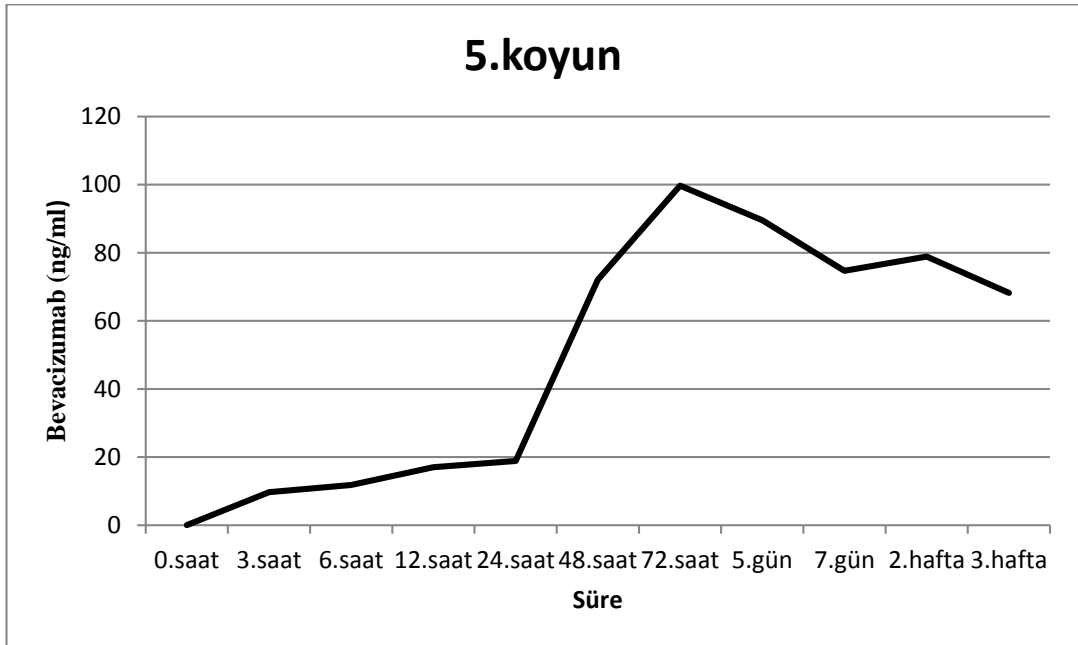
**Grafik 3.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 2. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).



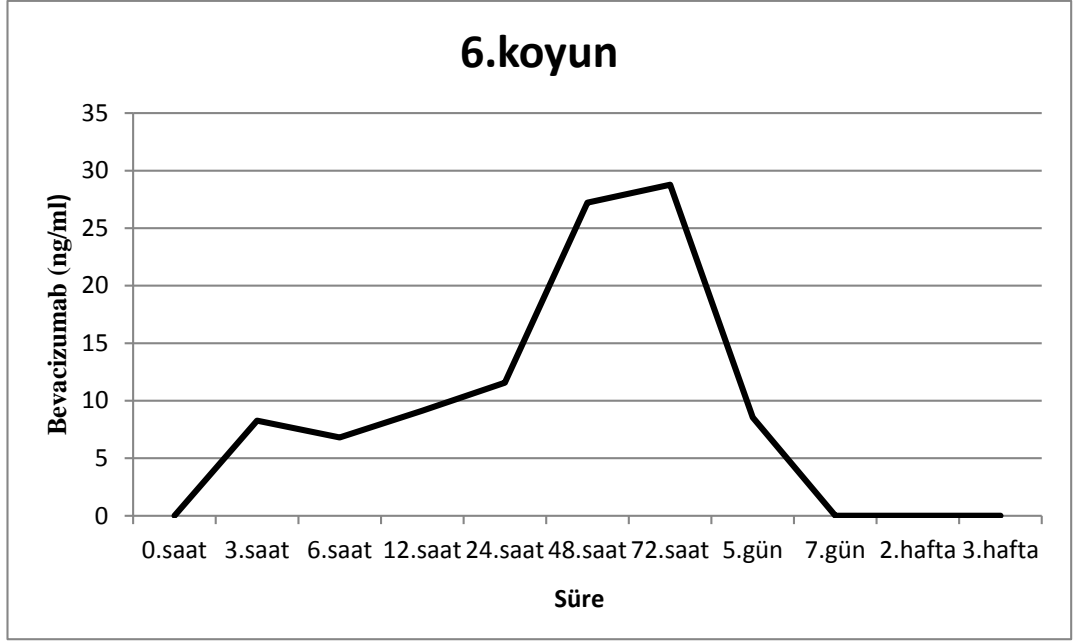
**Grafik 4.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 3. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).



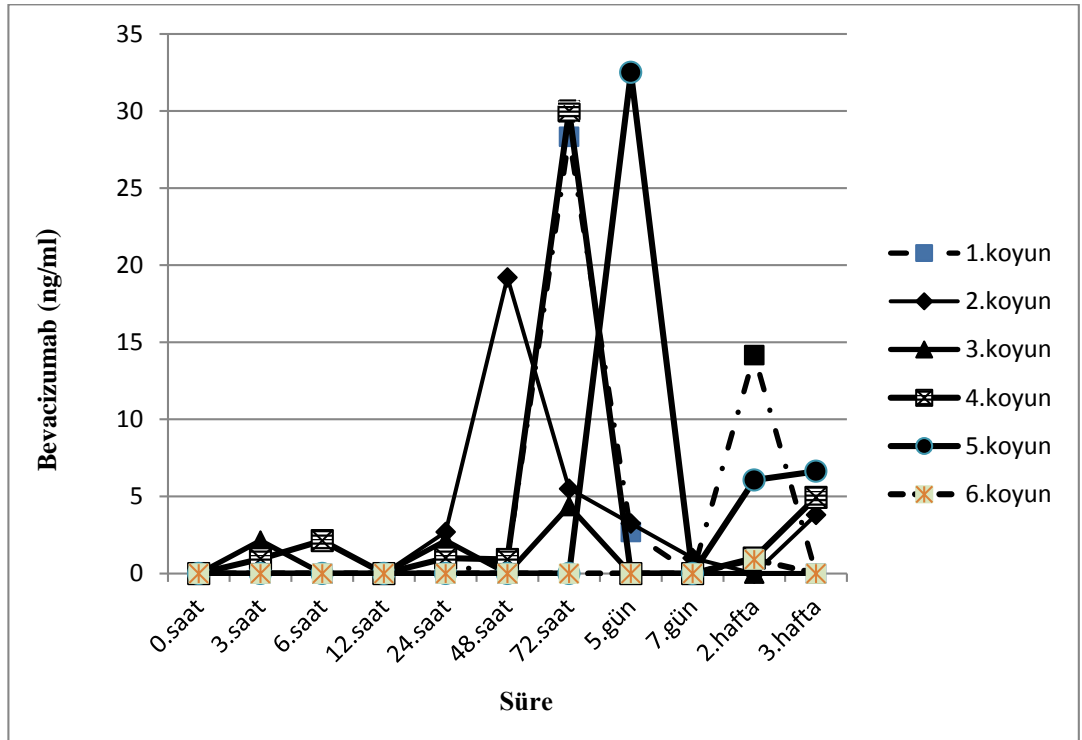
**Grafik 5.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 4. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).



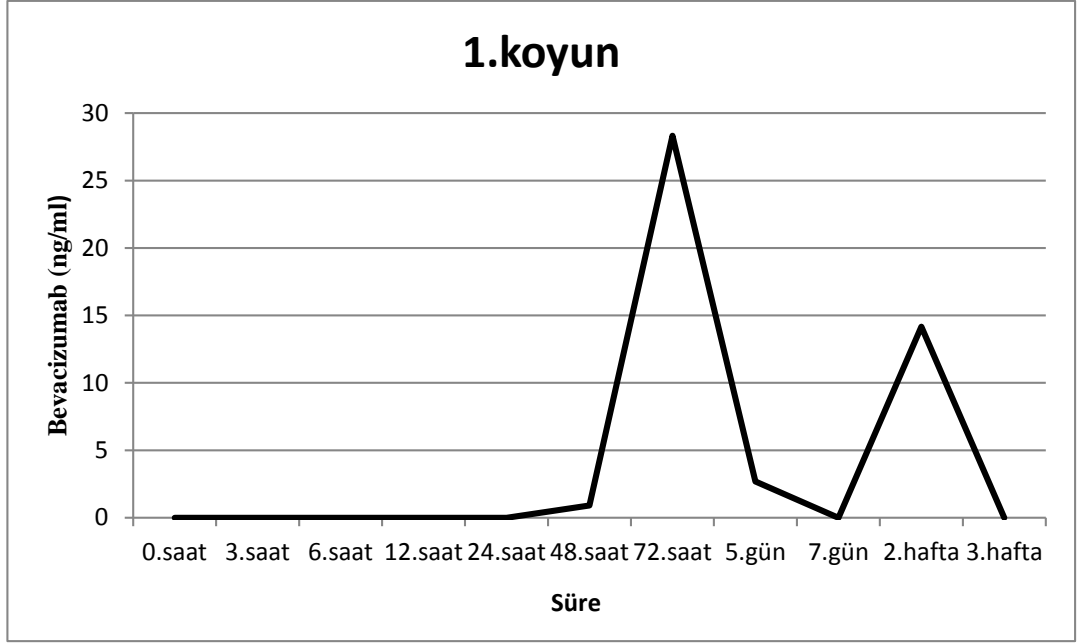
**Grafik 6.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 5. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).



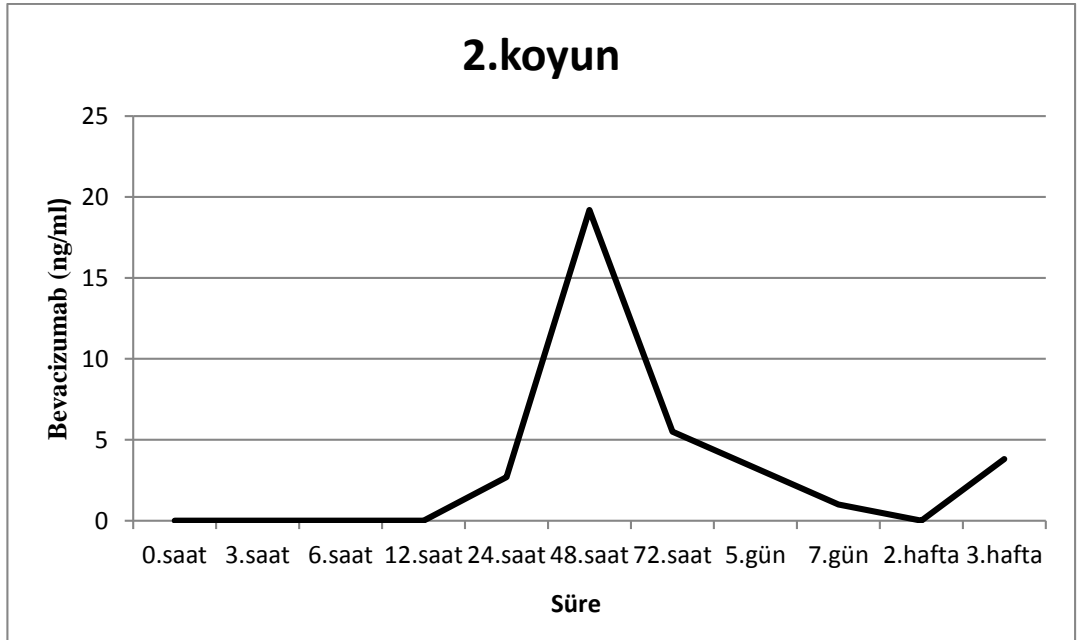
**Grafik 7.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 6. koyunda kandaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).



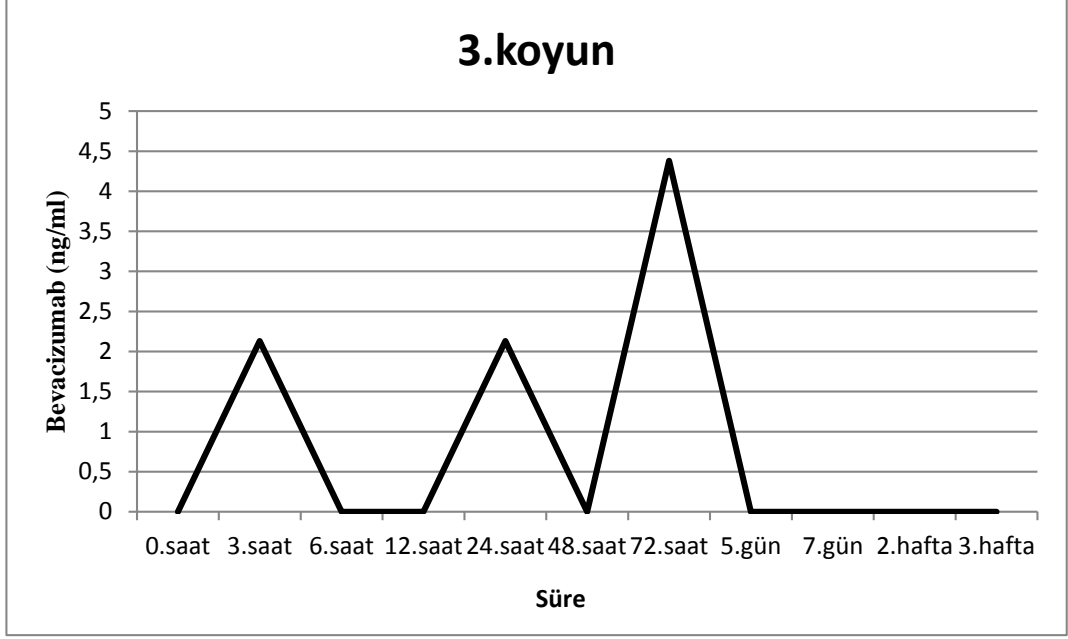
**Grafik 8.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunlarda sütteki ilaç konsantrasyonları (ng/ml).



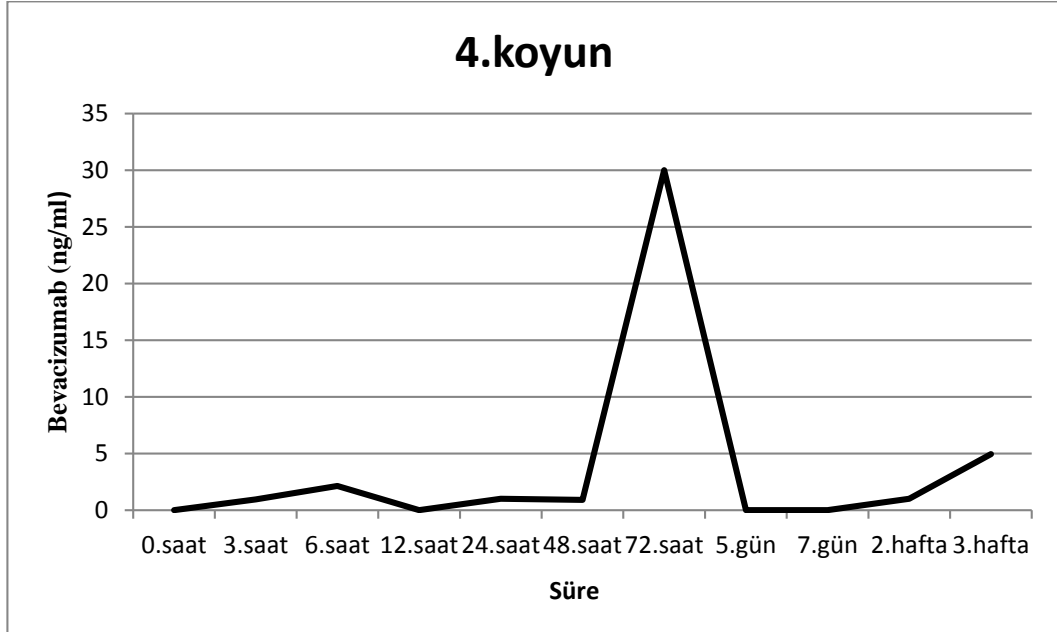
**Grafik 9.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 1. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml).



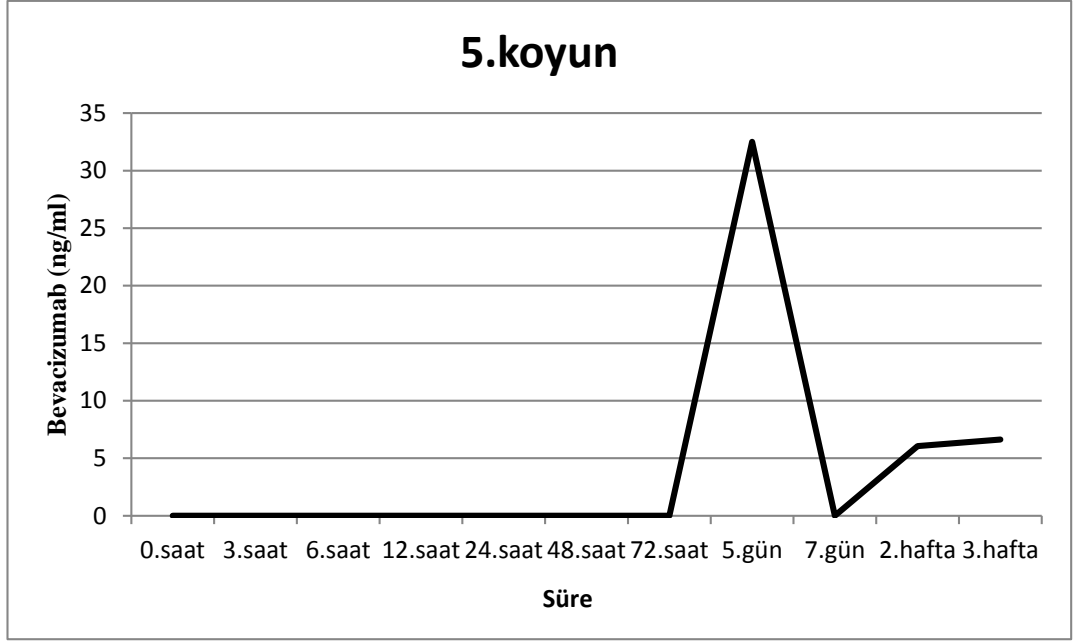
**Grafik 10.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 2. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml).



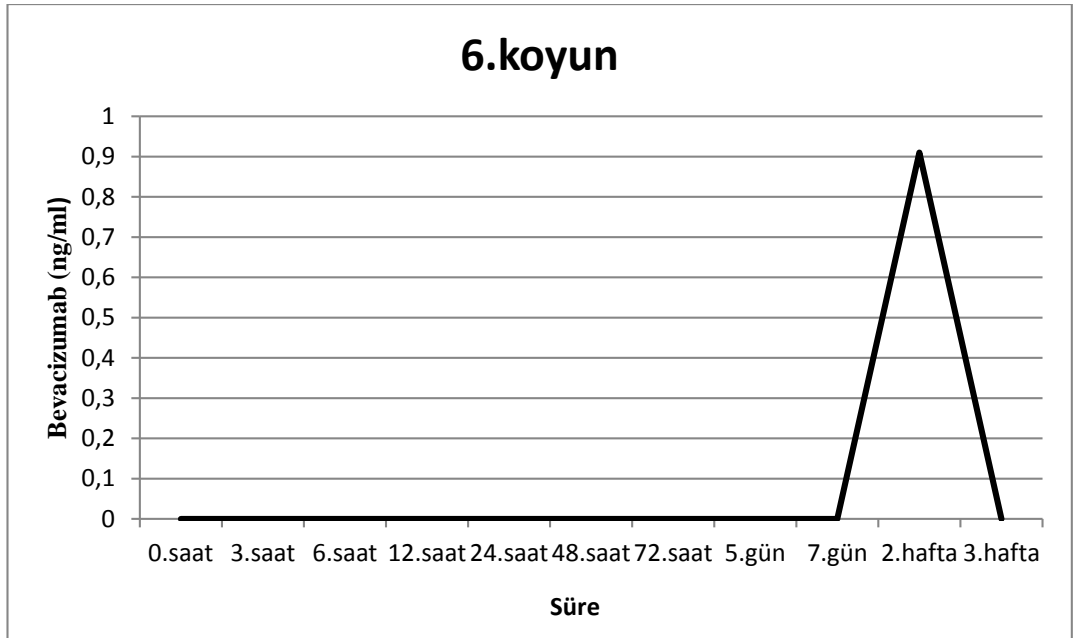
**Grafik 11.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 3. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml).



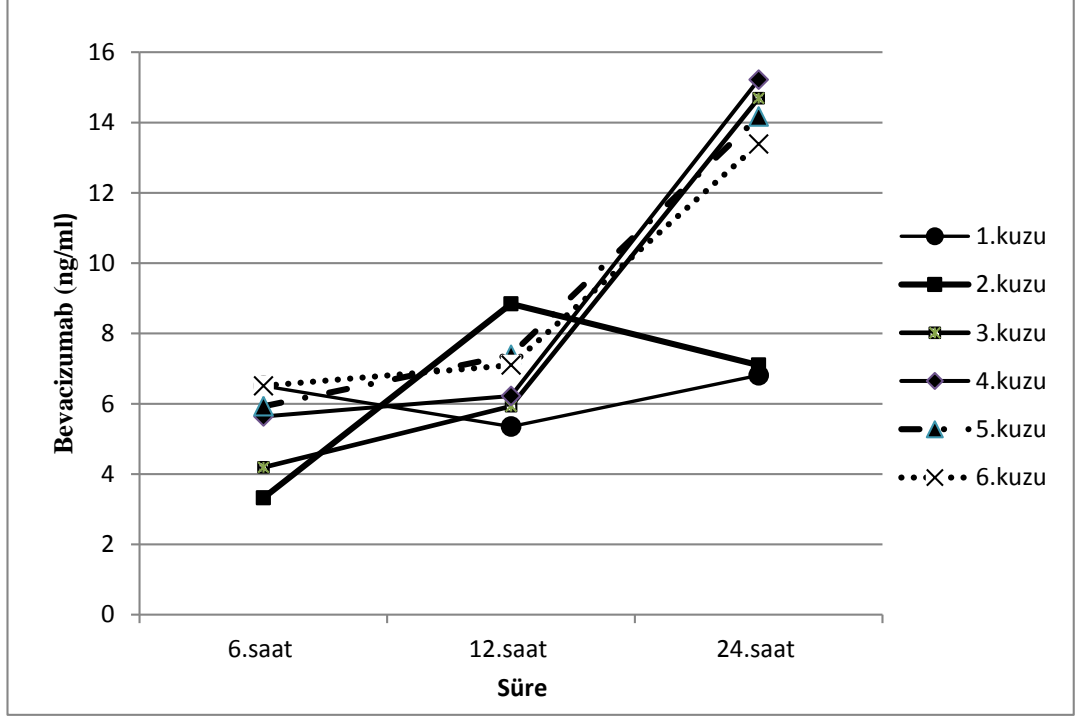
**Grafik 12.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 4. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml).



**Grafik 13.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 5. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml).



**Grafik 14.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan 6. koyunda sütteki ilaç konsantrasyonu grafiği (ng/ml).



**Grafik 15.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kuzularının kanlarındaki ilaç konsantrasyonu (ng/ml).

**Tablo 1.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kanlarındaki ilaç konsantrasyonları

|         | 0.saat<br>(ng/ml) | 3.saat<br>(ng/ml) | 6.saat<br>(ng/ml) | 12.saat<br>(ng/ml) | 24.saat<br>(ng/ml) | 48.saat<br>(ng/ml) | 72.saat<br>(ng/ml) | 5.gün<br>(ng/ml) | 7.gün<br>(ng/ml) | 2.hafta<br>(ng/ml) | 3.hafta<br>(ng/ml) |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 1.koyun | <0,9              | <0,9              | 11,30             | 15,22              | 49,91              | 87,48              | 106,31             | 91,39            | 94,78            | 86,96              | 76,00              |
| 2.koyun | <0,9              | <0,9              | 9,13              | 7,97               | 12,87              | 19,65              | 54,61              | 9,42             | 8,84             | 3,03               | 2,74               |
| 3.koyun | <0,9              | 14,96             | 9,13              | 8,84               | 9,42               | 35,56              | 23,83              | 16,26            | 9,42             | 1,87               | <0,9               |
| 4.koyun | <0,9              | 10,26             | 12,35             | 6,22               | 5,64               | 78,35              | 112,61             | 24,35            | 6,18             | 5,06               | 3,61               |
| 5.koyun | <0,9              | 9,71              | 11,83             | 17,04              | 18,87              | 72,09              | 99,74              | 89,57            | 74,70            | 78,87              | 68,23              |
| 6.koyun | <0,9              | 8,26              | 6,81              | 9,13               | 11,56              | 27,22              | 28,78              | 8,55             | <0,9             | <0,9               | <0,9               |

**Tablo 2.** İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların sütlerindeki ilaç konsantrasyonları

|         | 0.saat<br>(ng/ml) | 3.saat<br>(ng/ml) | 6.saat<br>(ng/ml) | 12.saat<br>(ng/ml) | 24.saat<br>(ng/ml) | 48.saat<br>(ng/ml) | 72.saat<br>(ng/ml) | 5.gün<br>(ng/ml) | 7.gün<br>(ng/ml) | 2.hafta<br>(ng/ml) | 3.hafta<br>(ng/ml) |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 1.koyun | <0,9              | <0,9              | <0,9              | <0,9               | <0,9               | 0,91               | 28,33              | 2,69             | <0,9             | 14,17              | <0,9               |
| 2.koyun | <0,9              | <0,9              | <0,9              | <0,9               | 2,69               | 19,20              | 5,50               | 3,25             | 1,00             | <0,9               | 3,81               |
| 3.koyun | <0,9              | 2,13              | <0,9              | <0,9               | 2,13               | <0,9               | 4,38               | <0,9             | <0,9             | <0,9               | <0,9               |
| 4.koyun | <0,9              | 0,95              | 2,13              | <0,9               | 1,00               | 0,91               | 30,00              | <0,9             | <0,9             | 1,00               | 4,94               |
| 5.koyun | <0,9              | <0,9              | <0,9              | <0,9               | <0,9               | <0,9               | <0,9               | 32,50            | <0,9             | 6,06               | 6,63               |
| 6.koyun | <0,9              | <0,9              | <0,9              | <0,9               | <0,9               | <0,9               | <0,9               | <0,9             | <0,9             | 0,91               | <0,9               |

**Tablo 3.** İnvitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kuzularının kanlarındaki ilaç konsantrasyonları

|         | <b>6.saat (ng/ml)</b> | <b>12.saat (ng/ml)</b> | <b>24.saat (ng/ml)</b> |
|---------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 1. Kuzu | 6,51                  | 5,35                   | 6,81                   |
| 2. Kuzu | 3,32                  | 8,84                   | 7,10                   |
| 3. Kuzu | 4,19                  | 5,93                   | 14,69                  |
| 4. Kuzu | 5,64                  | 6,22                   | 15,22                  |
| 5. Kuzu | 5,93                  | 7,39                   | 14,17                  |
| 6. Kuzu | 6,51                  | 7,10                   | 13,39                  |

Graaf pro farmakokinetik programı ile hesaplanan değerler tablo 4-6'da verilmiştir.

**Tablo 4.** 1,25mg/0,05ml bevacizumabın koyunlara intravitreal enjeksiyonundan sonra koyunların kanındaki bevacizumab dağılımı

| <b>Serum</b> | <b>T max (saat)</b> | <b>Cmax (ng/ml)</b> | <b>EAA<br/>(ng/ml *saat)</b> | <b>Pik sayısı</b> |
|--------------|---------------------|---------------------|------------------------------|-------------------|
| 1. Koyun     | 72                  | 106,3               | 42633                        | 1                 |
| 2. Koyun     | 72                  | 54,61               | 4932                         | 1                 |
| 3. Koyun     | 48                  | 35,56               | 4235                         | 1                 |
| 4. Koyun     | 72                  | 112,6               | 9169                         | 1                 |
| 5. Koyun     | 72                  | 99,74               | 37246                        | 1                 |
| 6. Koyun     | 72                  | 28,78               | 2771                         | 1                 |

EAA: eğri altında kalan alan

**Tablo 5.** 1,25mg/0,05ml bevacizumabın koyunlara intravitreal enjeksiyonundan sonra koyunların kuzularının kanındaki bevacizumab dağılımı

| Serum   | T max (saat) | Cmax (ng/ml) | EAA<br>(ng/ml *saat) | Pik sayısı |
|---------|--------------|--------------|----------------------|------------|
| 1. Kuzu | 24           | 6,810        | 108,5                | 1          |
| 2. Kuzu | 12           | 8,840        | 132,1                | 1          |
| 3. Kuzu | 24           | 14,69        | 154,1                | 1          |
| 4. Kuzu | 24           | 15,22        | 164,2                | 1          |
| 5. Kuzu | 24           | 14,17        | 169,3                | 1          |
| 6. Kuzu | 24           | 13,39        | 163,8                | 1          |

EAA: eğri altında kalan alan

**Tablo 6.** 1,25mg/0,05ml bevacizumabın koyunlara intravitreal enjeksiyonundan sonra koyunların sütündeki bevacizumab dağılımı

| Süt      | T max (saat) | Cmax (ng/ml) | EAA<br>(ng/ml *saat) | Pik sayısı |
|----------|--------------|--------------|----------------------|------------|
| 1. Koyun | 72           | 28,33        | 3757                 | 1          |
| 2. Koyun | 48           | 19,20        | 1459                 | 1          |
| 3. Koyun | 72           | 4,380        | 604,7                | 1          |
| 4. Koyun | 72           | 30,00        | 1865                 | 1          |
| 5. Koyun | 120          | 32,50        | 3319                 | 1          |
| 6. Koyun | 336          | 0,910        | 455,3                | 1          |

Ranibizumab grubunda ise koyunların kanındaki ve sütündeki ilaç konsantrasyonu ile kuzuların kanındaki ilaç konsantrasyonu ELİSA kitinin belirleyebildiği minimum limit olan 0,62 ng/ml'nin altında kalmıştır (Tablo 7-9).



**Tablo 9.** İntravitreal ranibizumab enjeksiyonu yapılan koyunların kuzularının kanlarındaki ilaç konsantrasyonu

|         | <b>6.saat (ng/ml)</b> | <b>12.saat (ng/ml)</b> | <b>24.saat (ng/ml)</b> |
|---------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 1. Kuzu | <0,62                 | <0,62                  | <0,62                  |
| 2. Kuzu | <0,62                 | <0,62                  | <0,62                  |
| 3. Kuzu | <0,62                 | <0,62                  | <0,62                  |
| 4. Kuzu | <0,62                 | <0,62                  | <0,62                  |
| 5. Kuzu | <0,62                 | <0,62                  | <0,62                  |
| 6. Kuzu | <0,62                 | <0,62                  | <0,62                  |

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda laktasyon dönemindeki koyunlara intravitreal bevacizumab ve ranibizumab enjeksiyonu sonrası ilacın kana, süte ve bu koyunları emen kuzularının kanına geçişi olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Ranibizumab için deneyin hassaslığı 0,62 ng/ml'ye ayarlanmıştır ve ranibizumab ~48 kD moleküler ağırlığa sahip olduğu halde koyunun kanına ve sütüne geçen miktarlar dedektörün belirleyebildiği limitin altında kalmıştır. Bevacizumab için deneyin hassaslığı 0,9 ng/ml' ye ayarlandı ve bevacizumab ~140 kD moleküler ağırlığa sahip olduğu halde koyunun kanında ve sütünde 3. haftanın sonunda dahi ölçülebilir seviyenin üzerinde kaldı.

Genentech verilerine göre ranibizumab gebelik kategorisi 'C' dir. Emziren annelerdeki kategori belirlenmemiştir ve anne sütüne ne kadar geçtiği belirtilmemiştir. Bevacizumab ise yeni damar oluşumunu engellemek amacıyla sistemik bir tedavi olarak özellikle kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Birçok göz hastalığının tedavisinde ruhsatlı endikasyon dışı (off label) olarak kullanılmaktadır. Bevacizumab üreticileri birinci trimesterde tekrarlayan intravenöz dozlarının hayvan çalışmalarında fetal hasara neden olduğunu belirtmişlerdir. Embriyotoksik ve fetal iskelet malformasyonlarına neden olduğu gösterilmiştir (125). Tavşanlarda yapılan prelinik çalışmalarda intravenöz bevacizumab verildikten sonra teratojenik etkiler ve düşüklerin sayısında artış görülmüştür (126). İntravenöz uygulanmasının sistemik etkisinin intravitreal uygulamaya göre daha fazla olacağı düşünülür. Literatürde insanlar üzerinde gebelik ya da laktasyon döneminde anti-VEGF ajanların kullanımına dair aydınlatıcı veriler yoktur. Gebe olduğu bilinmeyen kadınlarda birinci ve ikinci trimesterde kullanımına dair tek tük olgu sunumları mevcuttur.

Bir çalışmada proliferatif diyabetik retinopati ve vitreus hemorajisi olan 29 yaşında, gebeliğinden haberi olmayan bir hastaya 1,25 mg intravitreal bevacizumab uygulanmış ve 5 haftalık gebeliği 7 gün sonra düşükle sonuçlanmıştır. Aynı çalışmada 25 yaşında patolojik miyopi ve görme azlığı ile başvuran gebeliğinden haberi olmayan hastada subfoveal koroidal neovaskularizasyon saptanması ile 1,25 mg intravitreal bevacizumab uygulanmış ve yine 4 haftalık gebeliği 10 gün sonra düşükle sonuçlanmıştır (127).

Benzer başka bir çalışmada ise patolojik miyopi ve subfoveal koroidal neovaskularizasyonu olan 7 haftalık gebe hastaya fotodinamik tedavinin uzun dönem sonuçlarının çok faydalı olmaması ve intravenöz yolla verilecek verteporfinin sistemik dolaşımında daha yüksek konsantrasyonda bulunması, uteroplasental dolaşıma daha çok geçmesi, ayrıca ranibizumabın yüksek fiyatı nedeniyle intravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılmış. Diğer çalışmada olduğu gibi gebelik fetüsün kaybı ile sonlanmamış. Bebek fetal ultrasonografi ile aylık takip edilmiş ve normal sağlıklı olarak doğmuş. Bir yaşına kadar takip edilen bebekte herhangi bir soruna rastlanmamış ve gelişim eğrisi de normal sınırlardaymış (128).

Ziahosseini ve arkadaşlarının çalışmalarında gebe olduğu bilinmeyen punktat iç koroidopatiye sekonder koroidal neovaskularizasyonu olan kadına fotodinamik tedavi uygulanmış, tedaviden 12 gün sonra kadının 4 haftalık gebeliği olduğu öğrenilmiş. Fotodinamik tedaviye maruziyeti yaklaşık olarak postkonsepsiyonel 2. haftaya denk geldiği tespit edilmiş. Görme seviyesinde azalma devam etmesi ve koroidal neovasküler membranın kalınlaşması nedeniyle gebeliğin 2. trimestrında intravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılmış. Maküler lezyonda atrofi gelişirken; sağlıklı, konjenital anomalisi olmayan bir bebek dünyaya gelmiş. Postpartum 3 aylık takipte herhangi bir problem gelişmemiş (129).

Anastasilakis ve arkadaşlarının çalışmalarında ise gebeliğinin 8. ayında idiopatik koroidal neovasküler membran gelişen bir annenin doğumdan sonra 2. ay kontrolünde görme keskinliğinde azalma, subretinal hemorajinin foveaya ilerlemesi nedeni ile doğumdan 3 ay sonra intravitreal ranibizumab enjeksiyonu yapılmış. Ranibizumabın süte geçişi ile ilgili veri olmadığından bebek süttten kesilerek tedaviye devam edilmiş (130).

Bevacizumabın ranibizumab'dan daha büyük bir molekül olmasına rağmen serum konsantrasyonunun neden yüksek olduğu, seruma çıkış yolları tam aydınlatılamamış, veriler hipotezlerden öteye gidememiştir. İntravitreal ilaçların farmakokinetik çalışmalarında genellikle tavşan gözleri kullanılmıştır (131-133). Ancak tavşan gözü vitreusu 1,5 ml iken insanlarda 4,5 ml vitreus volümü vardır. Ayrıca tavşan lensi büyüktür ve retinası insanlarınkinden daha az vaskülerdir. Bunlar ilacın dağılımını ve eliminasyonunu etkileyebilir. Çalışmalarda kullanılan deney

hayvanlarının vitreus ve serum volümüne göre ilaçların doz ayarlaması genellikle yapılmamaktadır. İlacın sistemik etkileri hakkındaki tavşan çalışmalarından elde edilen veriler insan total serum volümü daha büyük olduğu için daha az güvenilirdir. Bu faktörler göz önüne alınarak ilaç eliminasyonunun insandakine benzer olabileceği düşünülerek çalışmamız koyun gözleri üzerinde yapılmıştır. Koyun gözünün vertikal uzunluğu 30 mm iken insanlarda ortalama 23 mm' dir (134). Koyun gözünün ana farklılıkları fotoreseptör sayı ve dağılımı, tapetum (Tapetum: Birçok hayvanda karanlıkta gözü görünür hale getirmek için bir yardımcıdır. Koroid tabakasında bulunan metalik parlaklığa sahip bir alandır) varlığı, siliyer cisim ve kas konumu, irisin major arteriyel halkasında bir anterior silier arter eksik olmasıdır (135).

Bir ilacın farmakokinetik sürecinde 4 aşama bulunmaktadır. Bunlar; emilim, dağılım, metabolizma ve atılımdır. Bu süreçler ilacın kan ve sütteki seviyelerini etkilemektedir. İlacın molekül büyüklüğü, yağda çözünmesi, iyonize olması, aktif ya da pasif difüzyona uğraması, plazma proteinlere veya dokuya bağlanması bu süreçte rol alan faktörlerdir. Ranibizumab ve bevacizumabın kan ve sütteki seviyelerinde de bu faktörlerin etkisinin olması muhakkaktır.

Ranibizumab (~48 kD) ve bevacizumabın (~140 kD) fiziksel özellikleri düşünüldüğünde intravitreal uygulamanın ardından bevacizumabın daha büyük moleküllü olduğu için kana geçişinin daha az olması beklenir. Aynı şekilde bevacizumabın büyük molekül ağırlığı nedeniyle plasenta bariyerini geçmediği düşünülebilir. Ancak çalışmalarda tam tersi gözlenmiştir. Ranibizumabın intravitreal uygulama sonrası serum konsantrasyonları ölçülemezken, bevacizumabın 21 güne kadar kan konsantrasyonunu devam ettirdiği gösterilmiştir (136). Keza çalışmamız bunu destekler biçimde bevacizumabın intravitreal uygulama sonrasında hem kan hem süt konsantrasyonu yüksek oranda tespit edilirken ranibizumabın kan ve süt konsantrasyonları ölçülebilir seviyenin altında kalmıştır.

İn vitro bir çalışmada, insan retinası üzerinde serbestçe difüze olabilen en büyük molekül boyutunun yaklaşık 76,5 kDa olduğu gösterilmiştir (137). Ancak in vivo şartlarda moleküllerin aktif taşınması da olaya eşlik ettiği için bu durumun değişebileceği belirtilmiştir.

İntravitreal 1,25 mg bevacizumab, sistemik dolaşımında 100 ng/ml 'lik plazma konsantrasyonlarına ulaşabilir (138). Bizim çalışmamızda da intravitreal bevacizumab uygulanan grupta 72. saat ortalama serum bevacizumab konsantrasyonu  $70,98 \pm 16,41$  (aralık, 23.83-112.61) ng/ml seviyesinde tespit edilmiştir.

İnternal limitan membran gözenekli bir yapıdadır ve gözenek çapı 10-25 nm arasında değişir (139). Ig G gibi tam uzunlukta bir antikorun yarıçapı ise 5,5 nm' dir. Eksternal limitan membran ise zonula adherenslerden oluşmaktadır. Gözeneklerinin çapı 3-3,6 nm arasındadır (140, 141). IgG yapısına benzeyen bevacizumabın, internal limitan membrandan difüze olabilir ancak KNVM (koroidal neovasküler membran) veya laser etkisi yoksa eksternal limitan membranda görülmesi beklenemez.

Yine triamsinolon gibi lipofilik bileşikler dominant olarak retinadan geçerek elimine olurken, büyük hidrofilik bileşikler öncelikle aköz humore diffüze olarak oradan da trabeküler ağ ve Schlemm kanalı ile elimine olmaktadır (142, 143). Bevacizumab da benzer bir mekanizma ile iris vasküler endotelinden ve silier cismin nonpigmente epitelyal tight junctionlarından kan dolaşımına geçiyor veya aköz humor yoluyla atılıyor olabilir.

Bir çalışmada tavşanların sağ gözüne 1,25 mg/ml bevacizumab intravitreal olarak uygulanmış, sol gözleri ise kontrol grubu olarak kullanılmış. 1., 3., 8., 15., 29. günde 4'er tavşan gözü enükle edilerek serum, aköz humor ve vitreustaki bevacizumab konsantrasyonları ölçülmüş. İntravitreal uygulanan gözlerdeki vitreusta ve aközde ilaç pik konsantrasyonuna 1.günde ulaşmış. Serumda ise 8.günde ulaşmıştır. Çalışma intravitreal uygulanan ilacın önce aköze daha sonra seruma geçtiğini savunmuştur (144).

Bakri ve arkadaşlarının çalışmalarında aynı şekilde 1,25 mg/ml bevacizumab intravitreal olarak sağ gözlere uygulanmış, sol gözleri ise kontrol grubu olarak kullanılmış. 1., 3., 8., 15., 29. günde 4'er tavşan gözü enükle edilerek serum, aköz humor ve vitreustaki bevacizumab konsantrasyonları ölçülmüş. İntravitreal uygulanan gözlerdeki vitreusta ve aközde ilaç pik konsantrasyonuna 3. günde ulaşmış. Serumda ise 8. günde ulaşmıştır (53).

Floresein (molekül ağırlığı=376 Da, hidrofilik) ve floresein glukronid (molekül ağırlığı=508 Da, hidrofilik) benzer moleküllerdir. Bu moleküllerin aköz fazındaki difüzyon katsayıları eşittir ( $6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) (145). Ancak vitreustaki farmakokinetikleri birbirlerinden oldukça farklıdır. Floresein retinadan geçerek elimine olurken, floresein glukronid anterior segmentten geçerek elimine olmaktadır. Bu fark fizikokimyasal özellikle açıklanamamaktadır. Biyolojik taşıma mekanizmaları da devreye girmektedir. Floresein glukronid büyük ölçüde pasif difüzyonla elimine olurken, floresein daha çok aktif transportla elimine olmaktadır.

Bevacizumabın kanda daha çok tespit edilmesi ile ilgili olarak kan retina bariyeri Ig G gibi tam uzunlukta antikorlar gibi Ig G yapısındaki ilaçları da taşıma ve temizleme için özel bir mekanizma kullanıyor olabilir (146). Monoklonal antikorlar, sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler, hormonlar, aşılar, antikor fragmanları (örn:fab) gibi biyolojikler, birçok hastalıkta güçlü klinik etki oluştururlar. Bu moleküllerin diğer küçük moleküllerle kıyaslandığında farklı fizikokimyasal özellikleri ve birçok faktöre (FcRn, Fcγ reseptörü, glikozilasyon, agregasyon) bağlı değişen kompleks farmakokinetik karakteristikleri mevcuttur (147). Nitekim bu yönde yapılan çalışmalarda neonatal FcRn reseptörü üzerinde durulmaktadır.

Neonatal FcRn reseptör, insanda FCGRT geni tarafından kodlanan ve molekül ağırlığı 46 kDa olan bir proteindir. Ig G-Fc reseptörü olarak da bilinir. FcRn reseptörü anne çocuk arasında gerçekleşen Ig G döngüsünün gözlenmesinde etkin rol oynayan reseptördür. Ig G antikoruna Fc bölgesinden bağlanmaktadır. Asidik Ph (6,0-6,5) da bağlanma gözlenirken fizyolojik Ph ya da daha yüksek Ph'larda etkinlik gözlenmemektedir (148). Anne sütünün Ph'sı da asidiktir. Ortalama ph 7,08 (6,35-7,65)'dir. Neonatal Fc reseptörü (FcRn) Ig G'nin taşınması ile anneden bebeğe pasif immünizasyonun oluşmasında önemlidir. İntrauterin dönemde plasental, postnatal dönemde de anne sütü ile taşınmaya uygun bir moleküldür.

FcRn, immunglobulinleri resirküle ederek yıkımlarını yavaşlatır. İmmunglobulin yapısındaki antikorların serumdaki uzun ömürleri bu yüzdendir. Örneğin endojen Ig G'nin yarı ömrü 20 gündür. Yarı ömrünün uzun olmasında FcRn'nin rolü büyüktür. FcRn bu proteini lizozomal degradasyondan korur (149).

Bevacizumabın serum yarılanma ömrünün uzun olması FcRn ile yıkımdan korunup resirküle olması ile açıklanabilir.

Son çalışmalar FcRn'nin gastrointestinal sistem, meme glandı, plasenta, akciğer, karaciğer, vasküler endotel ve hematopoetik kompartmanda da bulunduğunu göstermiştir (150). Bu çalışmada bevacizumabın koyunun serumunda, sütünde ve emen kuzuların serumunda tespit edilmesi bu bilgileri destekler niteliktedir. Koyunun serumundan süte geçiş, meme glandındaki FcRn ile süttten emen kuzuya geçişi kuzuların midesindeki FcRn ile oluyor olabilir. Bu bağlamda gebelerde plasental FcRn ile de bebeğe geçiş olacağı aşikardır.

Monoklonal antikorlar moleköl boyutları nedeniyle idrara ekskrete edilmezler. Peptitlere ve aminoasitlere metabolize edilirler. Endojen Ig G'nin metabolizması birçok dokuda ve plazmada gerçekleşir (151). Monoklonal antikorların eliminasyon rotası henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Karaciğerde proteolizis, retiküloendotelyal sistemde proteolizis, nonspesifik endositoz veya monoklonal antikorun vücuttaki hedefi aracılı eliminasyonu gerçekleşebilir. Retiküloendotelyal sistemde (RES) makrofaj ve monosit gibi fagositik hücreler endojen Ig G'nin eliminasyonunda rol alıyor olabilir. Monoklonal antikor için diğer bir rota; hücre yüzeyindeki hücre yüzeyindeki hedef antijeni hedefleyerek Fab kısmındaki değişken bölge ile bu kısma bağlanma sonrası hedef hücre tarafından degradasyona uğramasıdır. Bu eliminasyon rotası RES'teki proteolizisten daha önemlidir (152-154). Nonspesifik pinositoz veya endositozda ise moleköl hücre membranı tarafından yutulur ve hücre içine alınır. Bununla birlikte hücre içinde FcRn mekanizması mevcuttur ve monoklonal antikorun hızlı katabolizmasını önler. Mekanizma şu şekilde çalışır: Ig G'nin endotel hücrelerince alınmasından sonra endozomdaki görece asidik Ph'da Ig G ile FcRn bağlanır. Bu birleşik moleköl, hücre yüzeyine taşınarak ekstrasellüler matrikse salınır. Bağlı olmayan monoklonal antikor lizozomlara taşınır ve lizozomlarda degradasyona uğrar (155, 156).

Monoklonal antikorların Fc parçası içerip içermemelerine göre de eliminasyon hızları değişebilir. Tam antikorlar sebep oldukları immün reaksiyon nedeniyle farklı eliminasyon rotası oluşturabilirler. İmmün reaksiyon oluştuğunda yeni oluşan endojen antiglobulinler antikoru bağlar ve eliminasyon hızı azalabilir ya

da artabilir (157, 158). Bireysel farklılıklar da düşünülduğünde monoklonal antikorun eliminasyonunda oluşan immün yanıtın eliminasyonu ne yönde etkileyeceğini tayin etmek zordur. Fab fragmanları tam monoklonal antikorlardan daha hızlı elimine edilir. Çünkü Fc parçaları yoktur ve FcRn'nin korumasından yoksundurlar (159).

Laser fotokoagulasyon yapılan gözlerde TNF- $\alpha$  düzeyinin artması ve FcRn (neonatal Fc reseptörü) fonksiyonunun artması ile ilaç eliminasyonunun değişebileceği gösterilmiştir (146). KNVM gelişiminde de inflamatuvar moleküller dolayısıyla TNF- $\alpha$  artmaktadır. Bir çalışmada TNF- $\alpha$  düzeyinin artması FcRn reseptör fonksiyonu ve ekspresyonunu arttırdığını ve bu sebeple IgG transportunun epitel üzerinden artabileceği bildirilmiştir (160). Etanercept (çözünmüş TNF- $\alpha$  reseptörü) veya anti-TNF- $\alpha$  antikor (infliximab) enjeksiyonunu efektif TNF- $\alpha$  seviyelerini dolayısıyla da lazerin indüklediği koroidal neovaskülarizasyonun sızıntı ve boyutunu azaltmıştır.

Etanercept veya infliximab enjeksiyonu ile FcRn ekspresyon ve fonksiyonunun azalması, Ig G gibi antikor ve intravitreal ilaçların vitreusta kalış süresinin uzaması ve sistemik dolaşıma geçişlerinin azalması gündeme gelebilir. Buna bağlı olarak retina hastalıkları, inflamatuvar molekülleri ve reseptörleri etkileyerek (FcRn gibi) intravitreal uygulanan ilaçların eliminasyon ömrünü değiştirebilir.

Bunlar dışında başka mekanizmalar üzerinde de durulmuştur. Bevacizumab, içerdiği şeker yapıları nedeniyle RPE hücrelerinin mannoz reseptörleri ve galaktinler aracılığıyla selektif olarak geçiriliyor olabilir (161).

Müller hücrelerinin aktif taşıma mekanizmaları bevacizumabın retina içerisine taşınmasından sorumlu olabilir (162).

Sistemik dolaşımda bulunan anti-VEGF'ler özellikle bevacizumab tam bir antikor yapısında olması nedeniyle Fc parçası immün sistemi aktive edebilir. İnsan retina pigment epiteline (RPE) ve insan umbilikal vasküler endotel hücresine (HUVEC) Fc reseptörleri veya membran bağlı VEGF ile bağlanır ve kompleman kaskadını aktive eder, hücre ölümüne sebep olur (163-166). Ranibizumab Fc fragmanına sahip olmadığı için kompleman kaskadını veya T hücre ve monosit

apoptozisini aktive etmez. Potansiyel olarak bu mekanizmaların neden olduğu toksisite azdır (167). 2009'dan önceki çalışmalarda bevacizumabın kısa dönemde rat nörosensoryel retina tabakası (72), retina ganglion hücreleri (168), insan retina pigment epitel hücresi (72, 169), korneal keratinosit (170), korneal endotel hücrelerine (170, 171) toksik olmadığı ve hücre canlılığını etkilemediği bildirilmekteydi. Son zamanlarda yapılan in vitro bir çalışmada ise yüksek doz bevacizumabın (4 mg/ml) trabeküler ağ hücre kültüründe zararlı olduğu gösterilmiştir. 2 mg/ml bevacizumab ve eşit dozda ranibizumabın hücre proliferasyonunu azaltmada önemli bir etkisi görülmemiştir (172). Yenidoğanda organların gelişim aşamasında dokularda yüksek konsantrasyonda vasküler endotelyal growth faktör bulunmaktadır. Yenidoğanda; kanda küçük dozlarda dahi anti-VEGF bulunmasının organogenezis üzerinde olumsuz etkilerinin olacağı aşikardır.

Yenidoğanlarda alkalemi amniotik sıvı nedeniyle mide pH'sı yüksektir (pH 6-8). Mide pH'sı ve asit düzeyi 6-8 ayda erişkin seviyesine çıkmaktadır. Buradan yola çıkarak intravitreal bevacizumabın emen kuzuların kanına nasıl geçtiği konusunda diğer bir hipotez de protein yapısındaki bu ilaçların, yaşamın erken dönemlerinde mide asidinin yüksek pH'sı nedeniyle peptinin aktive olmamasından dolayı sindirime uğramıyor olmalarıdır. Anne sütünden geçen immünglobülinler ile yenidoğanda ilk 6 ayda birçok bakteri ve virüslere karşı doğal bağışıklık sağlanır. Bunun nedeni belki de mide salgılarının maturasyonu ile ilgili olabilir. Bu da özellikle erken dönemde sütle geçen ilaçların yenidoğandaki kan düzeylerinde belirleyici olacaktır.

Bu çalışmada bevacizumab ve ranibizumab konsantrasyonları ölçülürken VEGF seviyeleri bakılmamıştır. Ayrıca çalışma süresi bevacizumabın ve Ig G yapısındaki antikörlerin yarılanma ömrünün 17-21 gün olması sebebiyle 21 günle sınırlandırılmıştır. Bu sürenin sonunda bazı koyunlarda hala ilacın serum seviyeleri ölçülebilir seviyelerin üzerinde idi. Yine aynı şekilde emen kuzular 1 gün takip edildi ve kuzularda da ilacın serum seviyeleri ölçülebilir seviyelerin üzerinde idi. İlk saatlerdeki değişikliklerin daha sıkı takibi için daha erken, sık kan ve süt numuneleri alınabilirdi. Bunlar bu çalışmanın handikaplarıdır.

Laktasyon dönemindeki koyunlarda yaptığımız, son yıllarda kullanımı geniş alan bulan ranibizumabın ve bevacizumabın kana, süte ve emen kuzuda kana

geçişinin araştırıldığı bu çalışma literatürde tektir. İlaçların farmakokinetik özellikleri, seruma geçiş yolları ile ilgili bilgilerin çoğu hipotezden öteye gidememiştir. Ancak çalışmamızda ranibizumabın laktasyon döneminde bevacizumabdan daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. Ranibizumab intravitreal uygulandıktan sonra ilk kan ve süt numunelerinin alındığı 3. saatten itibaren ölçülebilir seviyelerin altında kalmıştır. Kuzuların kanında da ranibizumaba rastlanmamıştır. Bevacizumab ise koyunların kanında, sütte ve emen kuzuların serumlarında yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Ancak bu konuda daha geniş serilerde deneysel ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bevacizumab ve ranibizumabın farmakokinetiğinin karşılaştırılması için yüksek hassasiyete ayarlanmış ELISA'ya ihtiyaç duyulmaktadır.

## ÖZET

### **Süt Veren Koyunlarda İntravitreal Tek Doz Ranibizumab ve Bevacizumab Enjeksiyonu Sonrası İlacın Süt ve Kandaki Düzeyleri ile Emen Kuzuya Geçişi**

Özellikle gebelik ve laktasyon döneminde artan vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve plasental growth faktör etkisiyle kötüleşen diabetik retinopati, santral seröz koryoretinopati, idiopatik koroidal neovasküler membran gibi görmeyi tehdit eden hastalıklarda kullanımı gündemde olan intravitreal bevacizumab ve ranibizumabın doğum öncesi fetüse etkileri, doğum sonrası anne sütüne ve bebeğin kanına geçişi konusunda literatürde kontrollü çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada süt veren koyunlara uygulanan tek doz intravitreal bevacizumab ve ranibizumabın süte ve emen kuzunun kanına geçip geçmediğini araştırıldı.

Bu çalışmaya yaşları 3-4 yıl, ağırlıkları 40-45 kilogram arasında değişen laktasyon dönemindeki ‘pırıt’ cinsi 12 koyun ve bunların emen 3’er aylık birer kuzuları dahil edildi. Ranibizumab ve bevacizumab grubu olmak üzere koyun ve bunların kuzularından oluşan 6’şarlı iki grup oluşturuldu. İntravitreal enjeksiyon işleminden önce koyunların kan ve süt örnekleri alındı. İşlemden sonra da belirli aralıklarla koyunlardan kan ve süt örnekleri, kuzulardan süt örneği alındı. Önceki çalışmalarda ilaçların kandaki eliminasyon düzeyleri göz önüne alınarak bevacizumab grubu koyunlarda çalışmaya 3 hafta, ranibizumab grubu koyunlarda çalışmaya 1 hafta devam edildi. Kuzularda ise 1 günlük takip yapıldı. Bevacizumab ve ranibizumabın serum ve süt konsantrasyonları, bir enzim bağlantılı immunosorbent analiz (ELISA) kiti ile ölçüldü. Çalışmada ölçülebilir minimum ilaç düzeyi bevacizumab için 0.9 ng/ml, ranibizumab için 0.62 ng/ml olarak belirlendi.

İntravitreal uygulamadan sonraki 6. saatte tüm koyunların kanında bevacizumab konsantrasyonu ölçülebilir minimum seviyenin üzerinde idi. Çalışmaya son verilen 3. haftada da koyunların 4’ünde bevacizumab seviyesi yüksek olarak tespit edildi. Sütteki bevacizumab konsantrasyonu fluktuasyonlar göstermekle birlikte tüm koyunların sütüne ilacın ölçülebilir konsantrasyonlarda geçtiği tespit edildi. Emen kuzularının kanında ise 6. saatten itibaren 24 saat boyunca bevacizumab ölçülebilir seviyelerde idi. Ranibizumab grubunda ise koyunların kanındaki ve sütündeki ilaç konsantrasyonu ile kuzuların kanındaki ilaç konsantrasyonu ELISA kitinin belirleyebildiği minimum limitin altında kaldı.

Sonuç olarak, ranibizumabın laktasyon döneminde koyunun kanına, sütüne ve bu koyunların emen kuzularının kanına geçmediği, bevacizumabın ise yüksek konsantrasyonlarda geçtiği görüldü. Bu bağlamda laktasyon döneminde ranibizumabın intravitreal enjeksiyonu bevacizumabdan daha güvenli gibi gözükmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Bevacizumab, gebelikte intravitreal enjeksiyon, ranibizumab

## ABSTRACT

### **Blood and Milk Drug Concentrations and Transition of Drug to the Sucking Lamb After Injection of Single-Dose of Intravitreal Ranibizumab and Bevacizumab in Dairy Sheep**

No controlled studies exist in the literature about prenatal fetal effects and postpartum transition to breast milk and baby's blood in related with intravitreal bevacizumab and ranibizumab which is on the treatment agenda of vision-threatening diseases such as diabetic retinopathy, central serous chorioretinopathy and idiopathic choroidal neovascular membrane worsening with effect of increased placental growth factor and vascular endothelial growth factor (VEGF) particularly during pregnancy and lactation. In this study, whether or not transition of single-dose of intravitreal bevacizumab and ranibizumab to the milk of sheep and blood of sucking lamb was investigated.

12 'pirit' sheep in lactation period which are 3 to 4 years old with 40 kg to 45 kg and one of their sucking 3 month-aged lambs were included in this study. By composed of bevacizumab and ranibizumab group including sheep and their lambs, two groups consisting of 6 insiders were formed. Blood and breastmilk samples from the sheep were taken before the intravitreal injection, and blood and breastmilk samples from the sheep, blood samples from the lambs were taken at specified intervals. Considering drug elimination of blood in previous studies, the sheep of bevacizumab group were followed for 3 weeks, the sheep of ranibizumab group were followed for 1 week. Lambs were followed for one day. Milk and serum concentrations of bevacizumab and ranibizumab were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Minimum measurable drug level was assessed 0.9 ng/ml and 0.62 ng/ml for bevacizumab and ranibizumab, respectively.

Six hours after intravitreal administration, bevacizumab concentration in the blood of all sheep was above the measurable minimum level. In the 3rd week of study bevacizumab concentration of 4 sheep was noted in high level. Although fluctuations of bevacizumab concentration in the milk, transition of measurable drug concentration to milk was found in all sheep. Beginning from the 6 th hour lasting for 24 hours, bevacizumab concentrations were above measurable levels in the blood of sucking lambs. In the ranibizumab group, milk and blood drug concentration of the sheep and blood drug concentration of the lambs were below the limit that could be determined by ELISA kit.

Consequently, it was shown that there is no transition of ranibizumab to blood and milk of the sheep in the lactation period and no transition to blood of their sucking lambs, but transition of bevacizumab is in high concentrations. In this context, intravitreal injection of ranibizumab seems to be safer than bevacizumab in the lactation period.

**Keywords:** Bevacizumab, intravitreal injection in pregnancy, ranibizumab

## KAYNAKLAR

1. Duker JS. Retina and Vitreous. Yanoff M, Duker JS (eds): Ophthalmology Mosby, 2004:8.
2. Mc Donnell JM. Ocular embryology and anatomy. In Ryan SJ, Retina, The CV Mosby Company, St Louis, Baltimore, Toronto 1989;1:13-16.
3. Ogden TE. Topography of the retina. In Ryan SJ, Retina, the CV Mosby Company, St Louis, Baltimore, Toronto 1989;2:32-36.
4. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
5. Senger DR, Gali SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
6. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
7. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol* 2006;142:660-668.
8. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-794.
9. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
10. Robinson CS, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-865.
11. Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: Molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Exp Eye Res* 2006;83:1005-1016.
12. Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isiform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-745.
13. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
14. Nagy JA, Vasile E, Feng D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;196:1497-1506.
15. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.

16. Safran M, Kaelin WG Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 2003;111:779-783.
17. Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006;90:1542-1547.
18. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11709-11714.
19. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:1-30.
20. Lei J, Jiang A, Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:400-406.
21. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-241.
22. Shams N, Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin N Am* 2006;19:335-344.
23. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, et al. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 2005;169:681-691.
24. Tong JP, Yao YF: Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions. *Clin Biochem* 2006;39:267-276.
25. Arjima O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006;83:473-483.
26. Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:182-189.
27. Lin RC, Rosenfeld PJ: Antiangiogenic therapy in neovascular age related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 2007;47:117-137.
28. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, et al. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner chorio capillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999;155:421-428.
29. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol* 2000;156:1733-1739.
30. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10242-10247.

31. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001;28:131-138.
32. Ng YS, Krilleke D, Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:527-537.
33. Lu M, Adamis AP. Molecular biology of choroidal neovascularization. *Ophthalmol Clin N Am* 2006;19:323-334.
34. Risau W. Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In: Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (eds) *The Development of the Vascular System* 1991. *Issues Biomed*, Karger, Basel vol 14 pp 58–68.
35. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
36. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001;49:507-521.
37. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49:117-137.
38. Crocker DJ, Murad TM, Geer JC. Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp Mol Pathol* 1970;13:51-65.
39. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001;153:543-553.
40. Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:887-893.
41. Stewart MW. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pre-clinical characteristics of ophthalmic drugs that bind VEGF. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014;7:167-180.
42. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-450.
43. Praidou A, Papakonstantinou E, Andrudi S, et al. Vitreous and serum levels of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor and their correlation in patients with non-proliferative diabetic retinopathy and clinically significant macula edema. *Acta Ophthalmol* 2011;89:248-254.
44. Lee JH, Canny MD, De Erkenez A, et al. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18902-18907.
45. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 2012;15:171-185.
46. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997;57:4593-4599.

47. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of <sup>125</sup>I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 1999;27:536-544.
48. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11393-11398.
49. Rudge JS, Holash J, Hylton D, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:18363-18370.
50. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* 2008;22:315-329.
51. Dib E, Maia M, Longo-Maugeri IM, et al. Subretinal bevacizumab detection after intravitreal injection in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1097-1100.
52. Shahar J, Avery RL, Hellwell G, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006;26:262-269.
53. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007;114:855-859.
54. Christofordis JB, Carlton MM, Knopp MV, et al. Pet/CT imaging of I-124-radiolabeled bevacizumab and ranibizumab after intravitreal injection in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5899-5903.
55. Klettner A, Mohle F, Roeder J. Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:819-824.
56. Dastjerdi MH, Sadrai Z, Saban D, et al. Corneal penetration of topical and subconjunctival bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8718-8723.
57. Peters S, Julien S, Heiduschka P, et al. Antipermeability and antiproliferative effects of standard and frozen bevacizumab on choroidal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2007;91:827-831.
58. Meyer CH, Holz FG. Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: ranibizumab and bevacizumab. *Eye* 2011;25:661-672.
59. Ferrara N, Damico L, Shams N, et al. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:859-870.
60. Christofordis JB, Williams MM, Wang J, et al. Anatomic and pharmacokinetic properties of intravitreal bevacizumab and ranibizumab after vitrectomy and lensectomy. *Retina* 2013;33:946-952.
61. Gaudreault J, Fei D, Beyer JC, et al. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. *Retina* 2007;27:1260-1266.
62. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Ophthalmology* 2007;114:2179-2182.

63. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, et al. Preclinical pharmacokinetics of ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:726-733.
64. Gamulescu MA, Helbig H. Lack of therapeutic effect of ranibizumab in fellow eyes after intravitreal administration. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26:213-216.
65. Furfine E, Coppi A, Koehler-Stec E, et al. Pharmacokinetics and ocular tissue penetration of VEGF Trap after intravitreal injections in rabbits. Presented at: Association for Research in Vision and Ophthalmology; Apr 30–May 4, 2006: Fort Lauderdale, FL. Abstract 1430.
66. Carneiro AM, Costa R, Falca~o MS, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of neovascular age-related macular degeneration with bevacizumab or ranibizumab. *Acta Ophthalmol* 2012;90:e25-30.
67. Funk M, Karl D, Georgopoulos M, et al. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology* 2009;116:2393-2399.
68. Sawada O, Miyake T, Kakinoki M, et al. Aqueous vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of pegaptanib or ranibizumab in patients with age-related macular degeneration. *Retina* 2010;30:1034-1038.
69. Martin DF, Maguire MG, Ying G-S. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2011;364:1897-1908.
70. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology* 2012;119:1399-1411.
71. Ehlken C, Martin G, Stahl A, et al. Reduction of vascular endothelial growth factor A in human breast milk after intravitreal injection of bevacizumab but not ranibizumab. *Arch Ophthalmol* 2012;130:1226-1227.
72. Luthra S, Narayanan R, Marques LEA, et al. Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina* 2006;26:512-518.
73. Axer-Seigel R, Kremer I, Snir M, et al. Effect of intravitreal bevacizumab (Avastin) on the growing rabbit eye. *Curr Eye Res* 2009;34:660-665.
74. Zahit-Soudry S, Zemel E, Barak A, et al. Safety of intravitreal bevacizumab in the developing rabbit retina. *Retina* 2011;31:1885-1895.
75. Iandiev I, Francke M, Makarov F, et al. Effects of intravitreal bevacizumab (Avastin) on the porcine retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:1821-1829.
76. Thaler S, Fiedorowicz M, Choragiewicz TJ, et al. Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage. *Acta Ophthalmol* 2010;88:170-176.

77. Chawla S, Chaudhary T, Aggarwal S, et al. Ophthalmic considerations in pregnancy. *Med J Armed Forces India* 2013;69:278-284.
78. Sanke RF. Blepharoptosis as a complication of pregnancy. *Ann Ophthalmol* 1984;16:720-722.
79. Sunness JS, Santos A. Pregnancy and the Mother's eye. In: *Duane's Clinical Ophthalmology on CD-ROM*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
80. Amino N, Tanizawa O, Mori H, et al. Aggravation of thyrotoxicosis in early pregnancy and after delivery in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:108-112.
81. Millodot M. The influence of pregnancy on the sensitivity of the cornea. *Br J Ophthalmol* 1977;61:646-649.
82. Park SB, Lindahl KJ, Temnycky GO, et al. The effect of pregnancy on corneal curvature. *CLAO J* 1992;18:256-259.
83. Schechter JE, Pidgeon M, Chang D, et al. Potential role of disrupted lacrimal acinar cells in dry eye during pregnancy. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:153-157.
84. Pilas-Pomykalska M, Czajkowskii J, Oszukowski P. Ocular changes during pregnancy. *Ginekol Pol* 2005;76:655-660.
85. Akar Y, Yucel I, Akar ME, et al. Effect of pregnancy on intraobserver and intertechnique agreement in intraocular pressure measurements. *Ophthalmologica* 2005;219:36-42.
86. Kump LI, Cervantes-Castañeda RA, Androudi SN, et al. Patterns of exacerbations of chronic non-infectious uveitis in pregnancy and puerperium. *Ocul Immunol Inflamm* 2006;14:99-104.
87. Cantor LB, Harris A, Harris M. Glaucoma medications in pregnancy. *Rev Ophthalmol* 2000:91-99.
88. Brewington TE, Clark CC, Amin N, et al. The effect of pregnancy on the peripheral visual field. *J Natl Med Assoc* 1974;66:330-331.
89. Gass JDM. *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases*. 4th ed. St Louis: Mosby; 1997. p.52-70.
90. Gass JD. Central serous chorioretinopathy and white subretinal exudation during pregnancy. *Arch Ophthalmol* 1991;109:677-681.
91. Quillen DA, Gass DM, Brod RD, et al. Central serous chorioretinopathy in women. *Ophthalmology* 1996;103:72-79.
92. Rezai KA, Elliott D. Optical coherence tomographic findings in pregnancy-associated central serous chorioretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42:1014-1016.
93. Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD, et al. Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol* 2000;24:11-14.

94. Jaffe G, Schatz H. Ocular manifestations of preeclampsia. *Am J Ophthalmol* 1987;15:309-315.
95. Dornan KJ, Mallek DR, Wittmann BK. The sequelae of serous retinal detachment in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1982;60(5): 657-663.
96. Talbert LM, Blatt PM. Disseminated intravascular coagulation in obstetrics. *Clin Obstet Gynecol* 1979;22:889-900.
97. Cogan DG. Ocular involvement in intravascular coagulopathy. *Arch Ophthalmol* 1975;93:1-8.
98. McLoone EM, Best RM. Pregnancy-related papillophlebitis. *Eur J Ophthalmol* 2004;14:65-66.
99. Acheson JF, Gregson RMC, Merry P, et al. Vaso-occlusive retinopathy in the primary antiphospholipid antibody syndrome. *Eye* 1991;5:48-55.
100. Ghaem-Maghami S, Cook H, Bird A, et al. High myopia and pre-eclampsia: a blinding combination. *BJOG* 2006;113:608-609.
101. Bainbridge JW, Mistry AR, Thrasher AJ, et al. Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin Sci* 2003;104:561-575.
102. Rakic JM, Lambert V, Devy L, et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3186-3193.
103. Fong KC, Thomas D, Amin K, et al. Photodynamic therapy combined with systemic corticosteroids for choroidal neovascularization secondary to punctuate inner choroidopathy. *Eye* 2008;22:528-533.
104. Klein BE, Moss SE, Klein R. Effect of pregnancy on progression of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1990;13(1):34-40.
105. Omori Y, Minei S, Testuo T, et al. Current status of pregnancy in diabetic women. A comparison of pregnancy in IDDM and NIDDM mothers. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;273-278.
106. Rahman W, Rahman FZ, Yassin S, et al. Progression of retinopathy during pregnancy in type 1 diabetes mellitus. *Clin Exper Ophthalmol* 2007;35:231-236.
107. Rasmussen KL, Laugesen CS, Ringholm L, et al. Progression of diabetic retinopathy during pregnancy in women with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010;53:1076-1083.
108. Chew EY, Mills JL, Metzger BE, et al. Metabolic control and progression of retinopathy. The Diabetes in Early Pregnancy Study. National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study. *Diabetes Care* 1995;18(5):631-637.
109. Larsen M, Colmorn LB, Bønnelycke M, et al. Retinal artery and vein diameters during pregnancy in diabetic women. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:709-713.

110. Chew EY, Rand L, Mills JL, et al. Metabolic control and progression of retinopathy: the Diabetes in Early Pregnancy Study: National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study. *Diabetes Care* 1993;18:631-637.
111. Gaucher D, Saleh M, Sauer A, et al. Progression de la retinopathie diabetique durant la grossesse. *J Fr Ophtalmol* 2010;33:355-361.
112. Lauszus FF. The clinical significance of IGF-I in maternal serum during pregnancy in type 1 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2007;3:194-197.
113. Li W, Liu X, He Z, et al. Expression of apoptosis regulatory genes by retinal pericytes after rapid glucose reduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1535-1543.
114. Ringholm L, Vestgaard M, Laugesen CS, et al. Pregnancy-induced increase in circulation IGF-I is associated with progression of DR in women with type I diabetes. *Growth Horm IGF Res* 2011;11:25-30.
115. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Early worsening of diabetic retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Arch Ophthalmol* 1998;116:874-886.
116. Vestgaard M, Ringholm L, Laugesen CS, et al. Pregnancy-induced sight-threatening diabetic retinopathy in women with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2010;27:431-435.
117. Agardh E. A case of progression of diabetic retinopathy during pregnancy. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:524-530.
118. Cassar J, Kohner EM, Hamilton AM, et al. Diabetic retinopathy and pregnancy. *Diabetologia* 1978;15:105-111.
119. Chan WC, Lim LT, Quinn MJ, et al. Management and outcome of sight threatening diabetic retinopathy in pregnancy. *Eye* 2004;18:826-832.
120. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2000;23:1084-1091.
121. Hemachandra A, Ellis D, Lloyd CE, et al. The influence of pregnancy on IDDM complications. *Diabetes Care* 1995;18:950-954.
122. Arun CS, Taylor R. Influence of pregnancy on long-term progression of retinopathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008;51:1041-1045.
123. Ve'rier-Mine O, Chaturvedi N, Webb D, et al. Is pregnancy a risk factor for microvascular complications? The EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabet Med* 2005; 22:1503-1509.
124. Zhu Q, Ziemssen F, Henke-Fahle S, et al. Vitreous levels of bevacizumab and vascular endothelial growth factor-A in patients with choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2008;115(10):1750-1755.

125. Genetech, Bevacizumab and Ranibizumab Prescribing Information: [http://www.gene.com/download/pdf/avastin\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf)  
[http://www.gene.com/download/pdf/lucentis\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/lucentis_prescribing.pdf) (accessed 27 November 2013).
126. Final labeling text, highlights of prescribing information. U.S.BL 125085/168 Amendment: Bevacizumab-Genentech, Inc. Updated July 2009. South San Francisco, CA: Genentech, Inc. [www.gene.com/gene/products/information/pdf/avastinprescribing.pdf](http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/avastinprescribing.pdf). Accessed September 10, 2010.
127. Petrou P, Georgalas I, Giavaras G, et al. Early loss of pregnancy after intravitreal bevacizumab injection. *Acta Ophthalmol* 2010 Jun;88(4):e136.
128. Introiini U, Casalino G, Cardani A, et al. Intravitreal bevacizumab for a subfoveal myopic choroidal neovascularization in the first trimester of pregnancy. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012;28:553-555.
129. Ziahosseini K, Sanghvi C, Muzaffar W, et al. Exposure to verteporfin and bevacizumab therapy for choroidal neovascularization secondary to punctate inner choroidopathy during pregnancy. *Eye* 2009 23;1477–1479.
130. Anastasilakis K, Symeonidis C, Kaprinis K, et al. Peripapillary Neovascular Membrane in a Young Pregnant Woman and Prompt Response to Ranibizumab Injections following Uneventful Delivery. *Case Rep Ophthalmol* 2011;22;2(1):129-133.
131. Iyer MN, He F, Wensel TG, et al. Clearance of intravitreal moxifloxacin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:317-319.
132. Fauser S, Kalbacher H, Alteheld N, et al. Pharmacokinetics and safety of intravitreally delivered etanercept. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42:582-586.
133. Scholes GN, O'Brien WJ, Abrams GW, et al. Clearance of triamcinolone from vitreous. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1567-9.
134. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: Gelatt KN (ed.). *Veterinary Ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
135. Olver JM, McCartney ACE. Anterior segment vascular casting. *Eye* 1989;3:302–307.
136. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J* 2005;81:236–242.
137. Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, et al. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2141-2146.
138. Csaky K. (2007) Safety surveillance in the anti-VEGF era: myths and misconceptions. <http://www.osnsupersite.com/view.aspxrid=19510>.
139. Nishihara H. Studies on the ultrastructure of the inner limiting membrane of the retina—distribution of anionic sites in the inner limiting membrane of the retina. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1991;95:951-958.

140. Bunt-Milam AH, Saari JC, Klock IB, et al. Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:1377-1380.
141. Reichenbach A, Schneider H, Leibnitz L, et al. The structure of rabbit retinal Muller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat Embryol (Berl)* 1989;180:71-79.
142. Tojo K, Isowaki A. Pharmacokinetic model for in vivo/in vitro correlation of intravitreal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:17-24.
143. Tojo KJ, Ohtori A. Pharmacokinetic model of intravitreal drug injection. *Math Biosci* 1994;123:59-75.
144. Sinapis CI, Routsias JG, Sinapis AI, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin®) in rabbits. *Clin Ophthalmol* 2011;5:697-704.
145. Friedrich S, Cheng YL, Saville B. Finite element modeling of drug distribution in the vitreous humor of the rabbit eye. *Ann Biomed Eng* 1997;25:303-314.
146. Kim H, Robinson SB, Csaky KG. FcRn receptor-mediated pharmacokinetics of therapeutic IgG in the eye. *Mol Vis* 2009 Dec 16;15:2803-2812.
147. Shi S. Biologics: an update and challenge of their pharmacokinetics. *Curr Drug Metab* 2014;15:271-290.
148. Raghavan M, Bonagura VR, Morrison SL, et al. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry* 1995;34:14649-14657.
149. Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani BM, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2013;52:83-124.
150. Kuo TT, Baker K, Yoshida M, et al. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J Clin Immunol* 2010;30:777-789.
151. Garg A, Balthasar JP. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model to predict IgG tissue kinetics in wild-type and FcRn-knockout mice. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007;34:687-709.
152. Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Bogh HO, et al. Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor; implications for the mechanisms of action. *Cancer Res* 2006;66:7630-7638.
153. Duconge J, Fernández-Sánchez E, Macias A, et al. Monoclonal anti-EGF receptor antibody (ior-R3) pharmacokinetic study in tumor bearing nude mice: role of the receptor-mediated endocytosis on drug clearance. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2002;27:101-105.
154. Coffey GP, Stefanich E, Palmieri S, et al. In vitro internalization. Intracellular transport, and clearance of an anti-CD 1 la antibody (Raptiva) by human T-cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:896-904.
155. Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy* 1969;13:1-110.

156. Comber PG, Gomez F, Rossman MD, et al. Receptors for the Fc portion of immunoglobulin G (Fc gamma R) on human monocytes and macrophages. *Prog Clin Biol Res* 1989;297:273-285.
157. Denardo GL, Bradt BM, Mirick GR, et al. Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:309-316.
158. Rehlaender BN, Cho MJ. Antibodies as carrier proteins. *Pharm Res* 1998;15:1652-1656.
159. Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today* 2006;11:81-88.
160. Liu X, Ye L, Christianson GJ, et al. NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *J Immunol* 2007;179:2999-3011.
161. Klettner AK, Kruse ML, Meyer T, et al. Different properties of VEGF-antagonists: bevacizumab but not ranibizumab accumulates in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:1601-1608.
162. Heiduschka P, Fietz H, Hofmeister S, et al. Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2814-2823.
163. Tezel TH, Zeng Q, Schaal S, et al. Bevacizumab (Avastins) differs from ranibizumab (Lucentis) in its binding affinity to retinal pigment epithelium (RPE) and vascular endothelium cell membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:E-Abstract 4955.
164. Zeng Q, Schaal S, Kaplan HJ, et al. Ability to bind Fc receptors on retinal pigment epithelium (RPE) can explain the higher occurrence of RPE tears with bevacizumab (Avastins) compared with ranibizumab (Lucentis). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:E-Abstract 4954.
165. Chan CK, Meyer CH, Gross JG, et al. Retinal pigment epithelial tears after intravitreal bevacizumab injection for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2007;27:541-551.
166. Kook D, Wolf A, Neubauer AS, et al. Retinal pigment epithelial tears after intravitreal injection of bevacizumab for AMD. Frequency and progress. *Ophthalmologie* 2008;105:158-164.
167. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, et al. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1323-1332.
168. Iriyama A, Chen YN, Tamaki Y, et al. Effect of anti-VEGF antibody on retinal ganglion cells in rats. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1230-1233.
169. Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, et al. Evaluation of differential toxicity of varying doses of bevacizumab on retinal ganglion cells, retinal pigment epithelial cells, and vascular endothelial growth factor-enriched choroidal endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25:507-511.

170. Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, et al. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007;26:977-982.
171. Yoeruek E, Tatar O, Spitzer MS, et al. Effects of bevacizumab on apoptosis, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase and zonula occludens 1 expression on cultured corneal endothelial cells. *Ophthalmic Res* 2010;44:43-49.
172. Kahook MY, Ammar DA. In vitro effects of antivascular endothelial growth factors on cultured human trabecular meshwork cells. *J Glaucoma* 2010;19:437-441.