

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
TOPIKAL SORAFENİB'İN ETKİSİNİN BEVACİZUMAB İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Hakan YILDIRIM**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Orhan AYDEMİR**

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan AYDEMİR

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Sn. Prof. Dr. Tamer DEMİR, Sn. Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Sn. Doç. Dr. Burak TURGUT ve Sn. Yard. Doç. Dr. Onur Çatak başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalışmama katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Orhan AYDEMİR'e, Sn. Prof. Dr. İbrahim Özercan ve Sn. Prof. Dr. Nevin İLHAN'a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım asistan doktor arkadaşlarıma ve kliniğimiz personeline teşekkür ederim.

Ayrıca sıkıntılı zamanlarımda desteklerini esirgemeyen anneme, babama, eşim Ayşegül ve biricik kızım Feyzama teşekkür ederim.

ÖZET

Neovaskülarizasyon normal büyüme fizyolojisi ve homeostatik mekanizmalar için gerekli olan, ancak saydam korneada görmeyi tehdit eden bir durumdur. Bu çalışmanın amacı deneysel kornea neovaskülarizasyonunda topikal sorafenibin etkinliğinin topikal bevacizumab ile karşılaştırılması ve sorafenibin en etkin olduğu dozun bulunmasıdır.

Her biri yedi Wistar albino rat içeren altı grup oluşturuldu. Ratların sağ kornea santraline gümüş nitrat ile koterizasyon yapılarak yanık oluşturuldu. Grup I'deki (kontrol) kornealara koterizasyon ve tedavi uygulanmadı. Grup II' deki (sham) ratlara topikal salin günde 3 damla, grup III'e (bevacizumab) 5mg/ml günde 3 defa topikal olarak damlatıldı. Grup IV' deki (sorafenib 1) ratlara ise 2,5 µg /ml sorafenib günde 2 defa topikal olarak damlatıldı. Grup V' dekilere (sorafenib 2) ise 5 µg /kg sorafenib topikal olarak günde 2 defa damlatıldı. Grup VI' dekilere (sorafenib 3) 7,5 µg/ml sorafenib günde 2 defa topikal olarak damlatıldı. Tüm ratlar yedi gün tedavi edildi. Sekizinci günde korneal fotoğraflar çekilip, yeni damarlar ile kaplı kornea yüzeyinin tüm kornea alanına yüzdesi ölçüldü ve ratlar dekapite edilerek korneaları 4mm'lik panç yardımıyla alındı. Tüm kornealar eşit 4 parçaya bölündü ve parçalardan birisinde, Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) immün boyanması korneanın epitel ve stroma tabakalarında semikantitatif olarak değerlendirildi. Diğer parçasında ise korneal VEGF düzeyleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Parçalardan birisinde, Platelet derivated growth faktör (PDGF) immün boyanması korneanın epitel ve stroma tabakalarında semikantitatif olarak değerlendirildi. Diğer yarısında ise korneal PDGF düzeyleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Neovaskülarizasyon alanlarının tüm korneaya yüzdesi, tedavi gruplarında, sham grubundan ($p<0.05$) anlamlı olarak daha düşük saptandı. Tüm tedavi gruplarında ortalama VEGF immün boyanma yoğunlukları sham grubundan daha az olmasına karşın kontrol grubu ile arasında anlamlı fark yoktu. Grup III, grup V ve grup VI VEGF ELISA düzeyleri sham grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Gruplar arasında PDGF ELISA düzeyleri arasında ise anlamlı fark yoktur. Grup III, grup V ve grup VI PDGF ELISA düzeyleri sham grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Sonuç olarak, topikal Sorafenib ve Bevacizumab uygulanması korneal neovaskülarizasyonu engellemede etkilidir. Sorafenibin inhibitör etkisi doz bağımlıdır. Sorafenib daha düşük dozlarda kullanımı ve pozolojisinin günde 2 defa olması önemli avantajları arasındadır.

Anahtar Kelimeler: Kornea neovaskülarizasyon, Sorafenib, Bevacizumab

ABSTRACT

COMPARE THE EFFECT OF TOPICAL BEVACIZUMAB AND SORAFENIB IN EXPERIMENTAL CORNEAL NEOVASCULARIZATION

Neovascularization is necessary for physiological ingrowth and homeostatics but it can threat visuality if occur in transparent cornea. The purpose of this study is to compare the inhibitor effect of topical bevacizumab and sorafenib and to find effective doses of sorafenib.

Six group were formed and each group had seven Albino Wistar rats. All right corneas of rats coherized with silver nitrat except control group. Control group did not treated. In sham group three drops of saline were dribbled in a day, in group 3, topical bevacizumab 5 mg/dl was dribbled three times a day, in group 4, topical sorafenib 2.5 mg/dl was dribbled two times a day, in group 5, topical sorafenib 5 mg/dl was dribbled two times a day and in group 6, topical sorafenib 7.5 mg/dl was dribbled two times a day through 1-7 days. Corneal photographers were taken in eighth day and percentage of neovascular area in cornea were calculated. After rats were decapitated, all corneas were taken with 4 mm punch. All corneas were divided four equal parts and in one part level of VEGF corneal immune staining was evaluated semiquantitatively. In other parts VEGF level's were evaluated with ELISA. In one part one part level of immune staining PDGF was evaluated semiquantitatively and in the other part level of PDGF was evaluated with ELISA. The percentage of neovascular corneal area was statistically lower in treatment groups than sham group ($p<0.05$). Despite the density of VEGF immune staining were lower in all treatment groups than sham group, there were no statistically difference with control group. The level of VEGF ELISA in groups 3,5 and 6 statistically were lower than sham group ($p<0.05$). There were no statistically difference in any groups in level of PDGF ELISA. The level of PDGF ELISA in groups 3,5 and 6 statistically were lower than sham group ($p<0.05$).

Topical administration of bevacizumab and sorafenib are effective in inhibit corneal neovascularization. The effect of sorafenib looks like dose-dependent. Using in low doses and applying two times a day posology are the important advantage of sorafenib.

Key Words: Corneal neovascularization, Sorafenib, Bevacizumab

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL SAYFASI	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	3
1.2.1. Kornea Anatomisi	3
1.2.1.1. Makroskopik Anatomi	3
1.1.2.2. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası	3
1.2.1.3. Mikroskopik Anatomi	4
1.2.1.3.1. Epitel ve Bazal Membran	4
1.2.1.3.2. Bowman Tabakası	6
1.2.1.3.3. Stroma Tabakası	6
1.2.1.3.4. Descement Membranı	7
1.2.1.4 Limbus	8
1.2.2. Kornea Embriyolojisi	8
1.2.3. Kornea Fizyolojisi ve Vasküler Sistem	9
1.2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi	9
1.2.3.3. Endotel Fizyolojisi	10
1.2.3.4. Vasküler Sistem	11
1.2.4. Kornea Yara İyileşmesi	11
1.2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi	11
1.2.4.1.1. Lag Fazı	12
1.2.4.1.2. Hücre Göçü	12
1.2.4.1.3. Hücre Çoğalması ve Farklılaşması	12
1.2.4.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi	13

1.2.4.3. Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt	14
1.2.4.4. Stroma Yara İyileşmesi	14
1.2.4.5. Endotel Yara İyileşmesi	14
1.2.5. Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	15
1.2.5.1. Yaş	15
1.2.5.2. Beslenme	15
1.2.5.3. Travma	15
1.2.5.4. Yara Apozisyonu	15
1.2.5.5. Enfeksiyon	15
1.2.5.6. Enflamasyon	16
1.2.5.7. Duyusal İnervasyon	16
1.2.5.8. İntraoküler Basınç	16
1.2.5.9. Gözyaşının Etkisi	16
1.2.5.10. Vaskülarizasyon	17
1.2.5.11. İlaçlar	17
1.2.5.11.1. Antibiyotikler	17
1.2.5.11.2. Kortikosteroidler	17
1.2.5.11.3. Lokal Anestezikler	18
1.2.5.11.4. Benzalkonyum Cl (% 0.01)	18
1.2.5.11.5. Asetilkolin	18
1.2.5.11.6. Epinefrin	18
1.2.5.11.7. Antiviral İlaçlar	18
1.2.5.12. Fibronektin (Fn)	18
1.2.5.13. İnterlökin – 6	19
1.2.5.14. Retinoik Asit	19
1.2.6. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Medyatörler	20
1.2.6.1. Büyüme Faktörleri	20
1.2.6.1.1. Epidermal Growth Faktör	20
1.2.6.1.2. Fibroblast Growth Faktör	21
1.2.6.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta	21
1.2.6.1.4. Keratinosit Growth Faktör	22
1.2.6.1.5. Hepatosit Growth Faktör	23

1.2.6.1.6. Platelet Derived Growth Faktör	23
1.2.6.1.7. Diğer Büyüme Faktörleri	23
1.2.7. Kornea yara iyileşmesinde enflamatuvar sitokinlerin rolü	24
1.3. Kornea Neovaskülarizasyonu	24
1.3.1. Epidemioloji	24
1.3.2.1. Erken Prevasküler Faz	26
1.3.2.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı	27
1.3.2.3. Vasküler Matürasyon Fazı	27
1.3.3. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyaran Faktörler	28
1.3.3.1. Vasküler Endotelyal Growth Faktör	28
1.3.3.2. Tümör Nekrozis Faktör- α	29
1.3.3.3. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör	31
1.3.3.4. Fibroblast Growth Faktör	32
1.3.3.5. İnsülin Like Growth Faktör	32
1.3.3.6. Anjiopoetin	32
1.3.3.7. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	32
1.3.4.Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler	33
1.3.4.1. Anjiostatin	33
1.3.4.2. Endostatin	33
1.3.4.3. Pigment Epiteli Derived Faktör	33
1.3.4.4. Trombospondin-1	34
1.4. Bevacizumab	34
1.5. Sorafenib	36
2.GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Anestezi Tekniği	38
2.2. Cerrahi Teknik	39
2.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi	39
2.4. VEGF ve PDGF İmmünohistokimyasal Boyanması	39
2.5. VEGF ve PDGF ELISA Yöntemi İle Protein Düzeyi Ölçümü	40
2. 6. İstatistiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması	41

3.2. Korneal VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması	43
3.3. Korneal PDGF İmmünohistokimyasal Boyanması	48
3.4. Korneal VEGF ELISA Düzeyleri	52
3.5. Korneal PDGF ELISA Düzeyleri	53
4.TARTIŞMA	54
5. KAYNAKLAR	62
6. ÖZGEÇMİŞ	85

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kornea Neovaskülarizasyonuna Neden Olan Hastalıklar	25
Tablo 2. Anjiogenik Faktörler	26
Tablo 3. Antianjiogenik Faktörler	26
Tablo 4. VEGF ve PDGF ekspresyonunun skorlanması	40
Tablo 5. Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri	41
Tablo 6. Gruplardaki VEGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.	43
Tablo 7. Gruplardaki PDGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.	48
Tablo 8. Gruplardaki korneal VEGF ELISA düzeyleri ve standart sapma değerleri	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Korneanın mikroskopik anatomisi	4
Şekil 2.	Kornea epiteli kesiti)	5
Şekil 3.	Korneanın embriyolojik gelişimi)	9
Şekil 4.	Sorafenib'in etki mekanizması.	37
Şekil 5.	Sham grubundaki ratın kornea neovaskülarizasyonu	42
Şekil 6.	Sham grubundaki neovaskülarizasyonun negatif görüntüsü	42
Şekil 7.	Sham grubundaki neovaskülarizasyon oranının MATLAB R2007b version 7.5. ile hesaplanması	43
Şekil 8.	Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünhistokimyasal boyanması.	44
Şekil 9.	Sham grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünhistokimyasal boyanması.	45
Şekil 10.	Bevacizumab grubundaki bir rat korneasının VEGF immünhistokimyasal boyanması.	45
Şekil 11.	Sorafenib 2,5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının VEGF immünhistokimyasal boyanması.	46
Şekil 12.	Sorafenib 5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının VEGF immünhistokimyasal boyanması.	46
Şekil 13.	Sorafenib 7,5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının VEGF immünhistokimyasal boyanması.	47
Şekil 14.	Kontrol grubundaki rat korneasının PDGF immünhistokimyasal boyanması.	49
Şekil 15.	Sham grubunda yanık yapılan rat korneasının PDGF immünhistokimyasal boyanması.	49
Şekil 16.	Bevacizumab grubundaki bir rat korneasının PDGF immünhistokimyasal boyanması.	50
Şekil 17.	Sorafenib 2,5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının PDGF immünhistokimyasal boyanması.	50
Şekil 18.	Sorafenib 5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının PDGF immünhistokimyasal boyanması.	51
Şekil 19.	Sorafenib 7,5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının PDGF immünhistokimyasal boyanması.	51

KISALTMALAR LİSTESİ

Ang	: Anjiopoetin
AP-1	: Aktivatör protein-1
D	: Diyoptri
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGF	:Epidermal Growth Faktör
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
Fn	: Fibronektin
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
HGF	: Hepatosit growth faktör
HIF	: Hipoksi indüklenebilen faktör
IGF	: İnsulin-like Growth Faktör
IL	: İnterlökin
Kd	: KiloDalton
KGF	: Keratinosit growth faktör
KNV	: Koroid neovasküler membran
MAP	: Mitojen aktive protein
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MEK	: Mitojen ekstrasellüler sinyal regüle eden kinaz
MHC	: Major histokompatibilite kompleks
MIF	: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
Nd	: Neodymium:
NK	: Natürel Killer
NO	: Nitrik oksit

NV	: Neovaskularizasyon
OCT	: Optik Kohorens Tomografi
PAS	: Periyodik Asit Shift
PDGF	: Platelet-Derived Growth Faktör
PDR	: Proliferatif diabetik retinopati
PED	: Persistan epitel defektinde
PEDF	: Pigment epiteli derive faktör
PGE1	: Prostaglandin E1
PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
PMSF	: Fenilmetil sülfonil florit
RIPA	: Radio-Immunoprecipitation Assay
SBF	: Sinir büyüme faktörü
TGF	: Transforming Growth Faktör
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
Tsp	: Trombospondin
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VEGF-R	: VEGF reseptör
YAG	: Yttrium Aliminium Garnet

1. GİRİŞ

Kornea; göz küresinin santral ön kısmında yer alan 5 tabaka, 2 membran ve 3 tip hücreden oluşan şeffaf, elastik ve kubbe şeklinde bir dokudur. Gözün en önemli refraktif kısmını oluşturan korneanın, göze gelen ışığın retinaya iletimi için saydam olması gereklidir. Korneanın saydamlığını, kollajen lamellerinin düzenli dizilimi, kısmi dehidratasyon ve damarsız yapısı sayesinde korumaktadır (1).

Yeni damarlar, anjiyogenez veya vaskülogenez olmak üzere farklı iki yolla meydana gelir. Yeni damarların de novo olarak erken embriyogenezde vasküler endotelial öncül hücreler tarafından oluşturulması vaskülogenez olarak isimlendirilirken, mevcut damarlardan yenilerinin gelişimi anjiyogenez olarak isimlendirilir (2). Fizyolojik anjiyogenez doku gelişimi, menstrüel siklus ve yara iyileşmesi gibi olaylarda önemli rol oynar. Gözde anjiyogenez, görmeyi tehdit eden patolojik bir süreç olarak, diabetik retinopati, eksudatif yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, prematüre retinopatisi, neovasküler glokom ve çeşitli kornea hastalıklarında karşımıza çıkabilmektedir (3).

Kimyasal yanık, enfeksiyon, travma, kontakt lens kullanımı, immünolojik ve dejeneratif hastalıklar nedeniyle korneada yeni damarlanma olabilmektedir. Kornea neovaskülarizasyonunda rol oynayan birçok faktör bulunmuştur. Korneada anjiogenik büyüme faktörlerinin salınması; inflamatuvar sitokinlerin ortaya çıkması ve hipoksi ile indüklenir. Bu faktörlerin bir kısmı kornea epitel, stroma ve endoteli tarafından üretilir (4, 5). Gözyaşı ve aköz hümör de anjiogenik faktörler için kaynak olabilmektedir. Bazı faktörler ise lokal ve sistemik dolaşımdan korneaya gelerek neovaskülarizasyona neden olmaktadır (6).

Vasküler endotelial growth faktör proteolitik aktivite, migrasyon, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi anjiyogenezin birçok basamağında görev alır (7-9). VEGF korneada epitel hücrelerden, keratositlerden, korneal ve vasküler endotel hücreleri tarafından salınmaktadır. VEGF'in VEGF1 ve VEGF2 olmak üzere iki adet tirozin kinaz reseptörü mevcuttur (7). Kornea neovaskülarizasyonunda VEGF'in önemli rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (10-13). Son zamanlarda enflame ve vaskülarize insan ve hayvan kornealarında VEGF'in artmış olduğu da gösterilmiştir (7, 14, 15).

Kornea neovaskularizasyonunun tedavisi için birçok tedavi şekli denenmiştir. Argon ve Nd:YAG lazer kullanılarak yeni oluşan damarlarda oklüzyon ile vaskularizasyonu geriletme hedeflenmiştir (16,17). Diğer bir lazer uygulaması da pahalı ekipmanlar gerektirdiği için her klinikte uygulanamayan, verteporfin ile fotodinamik tedavidir. Uygulanan diod lazer enerjisi ile sitotoksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Bu radikaller endotel hücrelerinde hasara ve trombus oluşumu ile damar oklüzyonuna sebep olmaktadır (18).

Medikal tedavi yöntemlerinin başında kortikosteroidler gelmekte, ancak kortikosteroidlerin etkinliklerinin yetersiz olması ve yan etkilerinin çokluğu kullanımlarını sınırlamaktadır. Uzamış topikal ve sistemik steroid kullanımı mikrobiyal keratitlere, duyarlı bireylerde açık açılı glokoma ve katarakt oluşumuna da neden olabilmektedir (19). Bu yüzden neovaskularizasyonun geriletilmesi için siklosporin-A, somatostatin, somatostatin analogu oktreotid, anti-tümör nekroz faktör- α , anti-interselüler adezyon molekülü, suleparoid (heparan sulfat), talidomid, suramin, genistein, rapamisin, anjiostatin, metotreksat, bevacizumab gibi doğal ve sentetik birçok madde denenmiştir (20-31). Ancak bütün bu çabalara rağmen kornea neovaskularizasyonunun önlenmesi halen önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Sorafenib, invitro multikinaz inhibitörüdür. Renal hücreli kanser, hepatosellüler karsinom ve tiroid kanser tedavisinde etkili 2. jenerasyon bir VEGF reseptör inhibitörüdür. Deneysel koroid neovaskularizasyonunda 30mg/kg/gün dozunda oral Sorafenib ile tedavi sonrası lezyonda %59 oranında gerileme gözlenmiştir (32). Sorafenib ile ilgili invitro yapılan çalışmada (0.1 ile 100 $\mu\text{g/mL}$) 7,5 $\mu\text{g/mL}$ ye kadar endotele toksik etki gözlenmemiştir (33).

Bevacizumab insanlarda kullanılabilir hale getirilmiş VEGF molekülüne karşı sentezlenen uzun etkili bir fare antikorudur. Topikal veya subkonjonktival Bevacizumab uygulamasının kornea neovaskularizasyonunu gerilettiğini gösteren bir çok çalışma mevcuttur (34, 35).

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan kornea neovaskularizasyonunda topikal sorafenibin etkinliği topikal Bevacizumab ile karşılaştırılması ve sorafenibin en etkin olduğu dozun bulunması amaçlandı. Sorafenib'in etkinliğinin daha ayrıntılı değerlendirilebilmesi için deney gruplarının kornea örneklerindeki VEGF ve PDGF

düzeyleri ve neovaskülarizasyon alanları kontrol, sham grubuyla ve topikal bevacizumab grublarıyla karşılaştırıldı.

1.1. Genel Bilgiler

1.2.1. Kornea Anatomisi

1.2.1.1. Makroskopik Anatomi

Kornea saydam ve damarsız yapıda olup periferde kalınlaşarak sklera ile devamlılık gösterir. Sferik yapıda olmakla birlikte, perifer kısmı skleraya gömülü olduğu için öne doğru hafif eliptik özellik gösterir. Kornea, üzerini örten gözyaşı film tabakasıyla birlikte düzgün kırıcı bir ortam oluşturup, gözü enfeksiyon ve yapısal hasara karşı korur. Gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur. Refraktif güç önde +48.8 Dioptri (D), arka yüzde ise -5.8 D olup toplam kırma gücü +43 D'dir. Bu değer gözün toplam refraktif gücünün % 70'ini meydana getirmektedir (36). Kornea, vertikal çapı 10.5 milimetre olup (9-11), horizontal 11.5 milimetre olup (11, 12), santral 4 milimetrelilik alanda hemen hemen sferiktir. Ön-arka yüzler birbirine paraleldir ve kalınlığı 0.52 milimetre kadardır. Periferde ise arka yüzeyin eğrilik artışına paralel olarak 1.0 milimetre kalınlığa ulaşır. Kornea kurvatürü yenidoğanlarda ve çocuklarda erişkine oranla daha büyüktür. Doğum sonrası ilk aylarda düzleşme gerçekleşmektedir. Yaklaşık 6 yaş civarında korneal gelişim tamamlanır. Korneanın ön eğrilik çapı (konveks) 7.8 milimetre, arka eğrilik çapı (konkav) ise 6.2 milimetredir (37).

1.1.2.2. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası

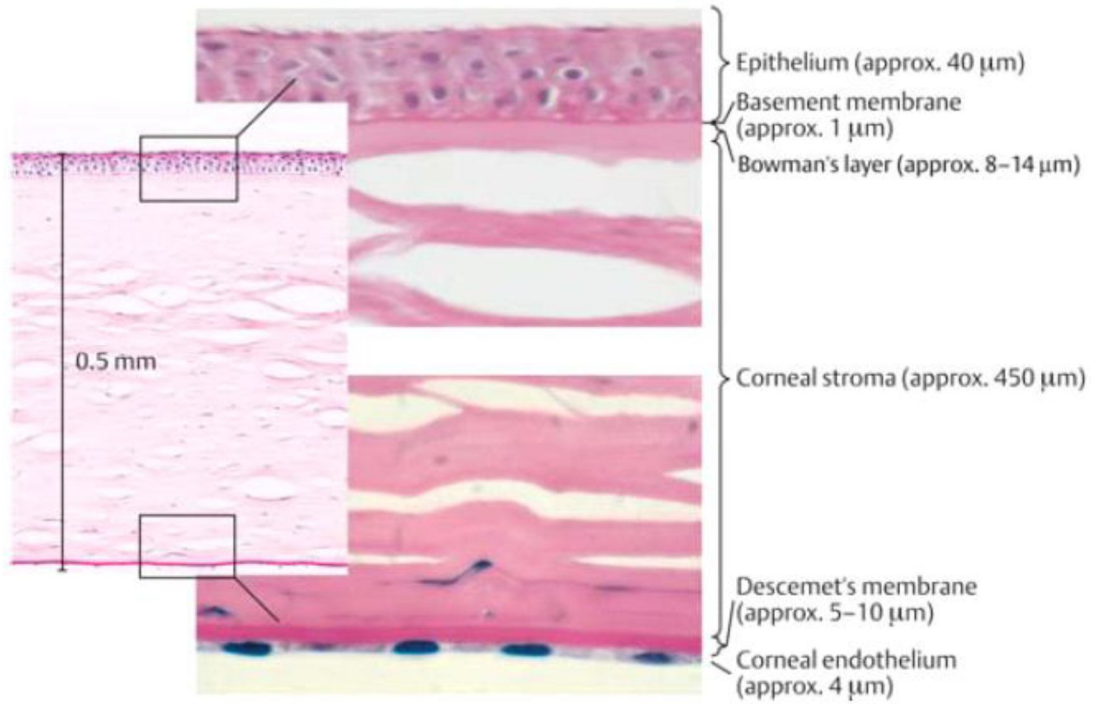
Kornea yüzeyi, üç tabakadan oluşan 7 µm kalınlığında ve hacmi 6,5 mikrolitredir. Optik olarak önemli ön yüzeydeki mikro düzensizlikleri ortadan kaldıran gözyaşı film tabakası ile kaplıdır. Bu tabakalar;

- a. Meibomian, Zeis (sebase yapıda) ve Moll (ter bezi yapısında) bezlerince salgılanan hidrofobik ön lipid tabaka.
- b. Aksesuar lakrimal bezler (Krause, Wolfring ve Manz bezleri) ve ana lakrimal bez tarafından salgılanan hidrofilik aköz tabaka.
- c. Başlıca Goblet hücrelerince ve Manz bezlerince salgılanan müsin tabaka.

Gözyaşı-hava ara yüzeyi alttaki kornea ile birlikte gözün toplam kırıcılığının üçte ikisine sahiptir.

1.2.1.3. Mikroskopik Anatomi

Kornea epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotelden oluşan 5 katlı bir yapıya sahiptir. Normal şartlarda kan ve lenf damarları içermez (37) (Şekil 1).



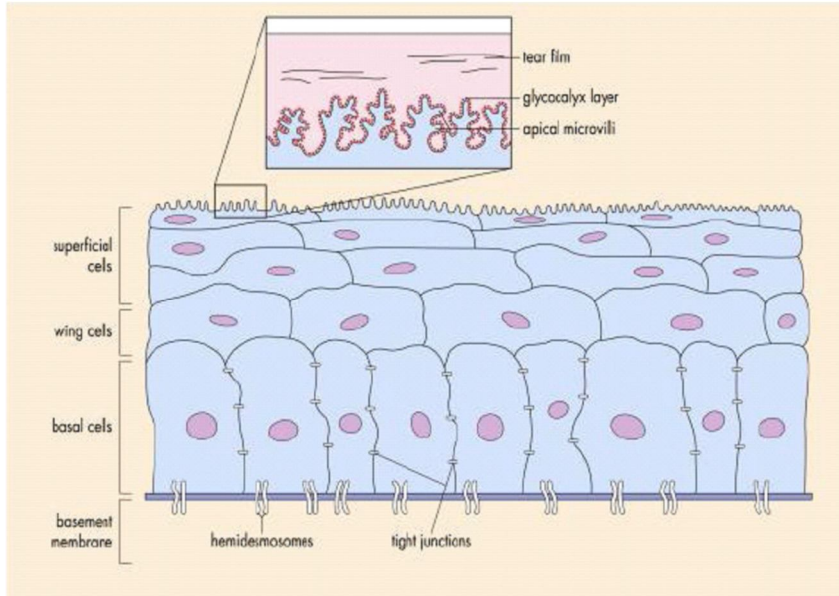
Şekil 1. Korneanın mikroskopik anatomisi

(Lang. Ophthalmology. Stuttgart - New York: Thieme, 2000: 118)

1.2.1.3.1.Epitel ve Bazal Membran

Kornea epiteli, çok katlı non-keratinize yapıda olup, 123 mm² genişliğiyle tartışmasız en özelleşmiş vücut yüzeyidir. Kalınlığı ortalama 50-80 mikrometre olup üç tabakadan meydana gelmektedir. Bunlar tek katlı bazal epitelyal, iki-üç katlı kanat ve iki katlı yüzeyel yassı hücre şeklinde sıralanmışlardır (37). Santralde 5-6 kat hücre varken hücre sayısı periferde doğru 8-10 kata kadar artar. Bazalde tek katlı silindirik hücre tabakası altındaki bazal membrana hemidesmozomlarla tutunmuştur. Bazal membran gerçek bir membran yapısındadır ve Peryodik Asit Shift (PAS) (+) boyanır. Yapısında tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve fibrin bulunur. Lamina lucida

denen gevşek ön ve Lamina densa olarak adlandırılan daha sıkı arka iki zondan oluşmuştur. Rejenerasyon yeteneği olmayan bazal membran epitel için yapısal destek görevi görür ve epitel hücrelerini stromadan ayırır. Bazal membran yokluğunda epitel hücreleri stromaya invaze olur. Normalde korneanın yüzeyel epitel hücreleri devamlı dökülmekte ve dökülen bu hücrelerin yerine bazal epitel hücrelerinden mitozisle çoğalan hücreler gelmektedir. Göç aynı zamanda periferden kornea merkezine doğru olmaktadır. Bazal hücreler basit dizilişli olup oval nükleusludurlar ve mitotik aktiviteleri vardır. Mitoz gösteren bazal hücreler yüzeye doğru ilerlerken yavaş yavaş farklılaşır, çekirdekleri küçülür, organellerini yitirir ve nihayet dejenere olup kornea yüzeyinden dökülürler. Bu süreç 7 günde tüm epitelin yenilenmesiyle sonuçlanır (38). Bazal kolumnar epitelden sonra 2-3 kat poligonal hücrelere rastlanır. Yanlara doğru kanatsız uzantıları olan bu hücreler kanat hücreleri olarak da anılır. Yüzeye yaklaştıkça hücreler inceliyor yassılaşıyor uzantılarını kaybeder ve yüzeyel yassı hücrelere dönüşür. Gözyaşıyla temasta olan bu hücrelerin apikal yüzleri, mikrovilli ve mikropikalar ile girintili çıkıntılı bir yüzey oluşturur. Bu çıkıntılara gözyaşı münin tabakasının glikokaliksleri tutunur. Bunun sonucunda düzgün dengeli bir optik yüzey ve bakteriyel olaylara karşı bir bariyer oluşur. Yüzey epitel hücreleri arasında zonula okludens, yüzey epitel hücreleri ile kanat hücreleri arasında makula okludens, bazal epitel hücreler ile bazal membran arasında ise hemidesmozom bağlantıları bulunmaktadır (38) (Şekil 2).



Şekil 2. Kornea epiteli kesiti (39)

Zonula okludenslerin yüzey hücrelerinin etrafını tamamen çevrelemesi sayesinde kornea yüzeyi suya ve elektrolitlere geçirgenliği çok az olan yarı geçirgen bir membran gibi davranır (38). Epitel tabakasının periferik kısımlarında histiyositler, makrofajlar, lenfositler, melanositler ve immünolojik özelliği olan Langerhans hücreleri bulunabilmektedir. Epitelde bulunan miyelinsiz sinir lifi ağı genelde bazal hücreler arasında yer alabilmekle beraber kanat hücreleri arasında seyrek olarak bulunur (37).

1.2.1.3.2. Bowman Tabakası

Işık mikroskobu ile fark edilebilen bu hücresiz tabaka, epitel bazal membranı ile stroma arasında yer almakta olup, yalnızca insanlar ve bazı memelilerde bulunur. Temel olarak tip I ve tip III kollajenden oluşan fibrillerin çapları stromadakinden incedir (40-42). Kollajen fibriller stromal keratositler tarafından sentezlenir ve salgılanır. Korneal hasar sonrasında rejenerasyon olmayıp, fibrozis ile iyileşirler. Tümör ve enfeksiyonun derin katlara yayılımı açısından bariyer görevi yaptığı düşünülmektedir.

1.2.1.3.3. Stroma Tabakası

Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur ve yaklaşık 500µm kalınlığa sahiptir. Büyük oranda kollajen fibriller, stromal hücreler ve matriks yapısından oluşur. Stroma yaklaşık %76 oranında su içermektedir. Kuru ağırlığının %80'i kollajen fibrillerden, %15'i matriksten, %5'i hücresel elementlerden oluşmaktadır (43).

Kollajen lifler büyük oranda Tip I ve az miktarda Tip III, IV, V kollajenden oluşur. Kollajen lifler uniform yapıda olup 300 angström çapındadır ve lameller oluşturmuş halde stromanın her tarafında bulunur. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde %60 oranda keratan-sülfat ve %40 oranda kondroitin-sülfattan oluşmuştur. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını sağlar. Korneanın fonksiyonel bütünlüğü, kalınlığı, şeffaflığı stromal elemanların yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasına bağlıdır. Ekstrasellüler matriks (ECM) yıkımı temel olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) ile olur. Endotelin disfonksiyonu nedeniyle stromaya su geçmesi durumunda glikozaminoglikanların su çekip şişmesi ile kornea kalınlığı artar ve kollajen fibrillerinin dizilimi düzensiz hal

olarak stromal opaklaşma ortaya çıkar (43). Embriyonik olarak nöral krestten köken alan stroma hücreleri keratositlerdir. Keratositler kollajen lameller arasında yerleşmişlerdir. Sitoplazmalarında mikroorganeler, mikrotübüller, lizozomlar, lipid partikülleri ve değişik inklüzyon cisimcikleri bulunur. Normal koşullarda yavaş ama sürekli bir sentetik aktivite ile ECM'nin idamesini sağlayan bu hücreler, akut ödem veya yaralanma sonrasında fibroblast haline gelebilirler. Stromada ayrıca az sayıda polimorfonükleer lökositler (PMNL), plazma hücreleri ve makrofajlar da bulunmaktadır.

1.2.1.3.4. Descement Membranı

Endotel bazal membranı gerçek membran yapısındadır. Doğumda 3-4 mikrometre kalınlıktadır ve erişkinde 10-12 mikrometre kalınlığa ulaşır.

İntrauterin gelişen anterior çizgili zon ve yaşam boyu endotel tarafından desteklenen posterior çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Çizgisiz zon başlıca bazal membran bileşenleri olan tip IV kollajen, laminin, fibronektinden oluşmuştur ve periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Descement membranı proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençlidir ve ağır keratitlerde bile sağlam kalabilir. Ancak stromaya gevşek olarak tutunduğu ve göz içi basıncının yardımıyla stromaya yapışık kaldığı gösterilmiştir. Travma nedeniyle bu membran stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve zedelenme durumunda endotel tarafından salgılanarak onarılmaktadır (43).

1.2.1.3.5. Endotel tabakası

Descement membranın arka yüzünü döşeyen, yaklaşık 5 mikron kalınlıkta, 20 mikron genişlikte olan hekzagonal hücrelerden oluşan tek katlı bir tabakadır. Descement membrana dayalı yüzü düz, humör aköze bakan yüzü epitel hücreleri gibi mikrovillüslüdür. Tipik olarak daha genç hücrelerde büyük bir nükleusa ve çok sayıda mitokondriye rastlanır. Bu organeller aktif transportta ve stromanın su oranında önemli rol oynarlar. Endotel hücre sayısı yaşla birlikte azalır, mitoz nadiren rastlanır, ölen hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur (44).

Fonksiyonlarını yitirmeleri durumunda, stromadan humör aköze doğru sürdürülen aktif su pompalanması işlevini azaltır ve stroma ödemlenerek saydamlığını yitirir.

Doğumda 5000 hücre/ mm² iken erişkinde bu sayı 2500 hücre/mm² civarında olup, 500 hücre/mm² altına indiğinde korneal fonksiyonlar bozulmaya baslar. Endotel hücrelerinin arasında desmozom dışındaki uç bağlantı kompleksine (zonula okludens, makula okludens, makula adherens) sahiptir.

1.2.1.4 Limbus

Limbus kornea ile sklera arasındaki geçiş zonudur. Limbustaki yapılar konjonktiva, tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dışı akım aparatı olarak sayılabilir. Anatomik olarak Bowman ve Descement tabakalarının sonlandığı yerlerden geçen düzlem ile arkada Schlemm kanalı ile sınırlanan 1-1.5 milimetrelik alanı kapsar ve korneoskleral bileşke olarak adlandırılır. Limbusta epitel 10-12 katlıdır ve burada melanosit, Langerhans hücreleri, kan damarları bulunur. Bazal epitel hücreleri kök hücrelerinin çok yavaş bölünmesiyle oluşur.

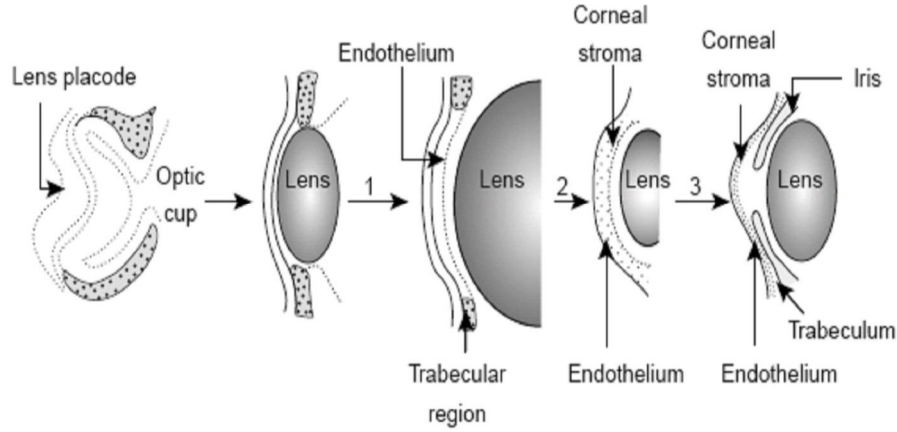
Kornea epiteli kök hücrelerinin, limbal epitel hücrelerin bazal tabakasında bulunduğu bildirilmektedir. Bunların büyük nükleusları, çok sayıda desmozom ve hemidesmozomları vardır. Tüm bu bulgular, kök hücrelerinin aktif metabolizmalarının olduğunu düşündürmektedir. Konjunktivanın aksine goblet hücresine rastlanmaz. Limbal kök hücreler önemli miktarda hasarlanırsa kornea epitelinin yerini hızla konjonktiva ve kan damarları alır (45).

1.2.2. Kornea Embriyolojisi

İntrauterin dönemin beşinci haftasında; epitel ve endotel hücreleri nöral krest orjinli olup yüzey ektoderminden gelişirken, 13. haftasında; Descement membranı yassılaştırmış endotel hücrelerinden gelişir. Mezodermden gelişen stroma, intrauterin altıncı haftanın sonunda oluşmaya başlar ve dördüncü ayda epitel altında yoğunlaşarak Bowman tabakasını oluşturur (46).

Kornea ve ön kamara 6. hafta sonunda (embriyo yaklaşık 17-18 mm iken) gelişmeye başlar. 6. haftaya kadar yüzey epiteli ile lens ön yüzü arasındaki boşluk iyi organize olmamış mezenkimal doku ile doludur. 6. hafta sonunda mezoderm içinde dar bir şerit halinde beliren boşluk genişlemeye başlar ve mezodermi, korneal stromayı oluşturacak olan ön tabaka ve iris stromasını oluşturacak olan arka tabaka olmak üzere ikiye ayırır. Aradaki boşluk ise ön kamarayı oluşturur. Descement membranı, ön kamara belirdikten hemen sonra şekillenmeye başlar. Korneoskleral

açından itibaren iç yüzey boyunca gelişen nöroektodermal kökenli hücreler, arka yüzeyi örten yassı endotel hücrelerine dönüşürler ve endotel ön yüzüne hyalen membran salgılarlar (46) (Şekil 3).



Şekil 3. Korneanın embriyolojik gelişimi (Easty DL, Sparrow JM. Oxford Textbook of Ophthalmology. Oxford: Oxford University Press, 1999.)

1.2.3.Kornea Fizyolojisi ve Vasküler Sistem

1.2.3.1.Gözyaşı Fizyolojisi

Gözyaşı korneal fonksiyonlar için yaşamsal önem taşır. Normal salınım 0.9-2.2 µl /dak kadardır. Lipid tabaka; hidrofobik yapısıyla buharlaşmayı önler, lubrikan özellik taşır, gözyaşı menisküsünün kapak dışına taşımını önler. Aköz orta tabakanın %98 'ini su oluşturur, %2'si ise solid kısımdır. İçerdiği Na^+ ve HCO_3^- miktarı serum ile aynı, K^+ ve Cl^- ise daha yüksektir. Salgısal IgA, IgG ve IgE ile beraber içeriğindeki muramidaz etkisi gösteren lizozimler ile lizis etkisi yaratan laktoferrin (Fe^{++} bağlar) sayesinde Fe^{++} bağımlı mikroorganizmalar için bakteriyostatik etki gösterir. Aköz tabaka avasküler korneanın oksijen ve besin gereksiniminden sorumludur. Müsinöz tabaka ise yüzey gerilimini düşürerek aköz tabakanın kornea ve konjonktiva üzerinde üniform yayılımını sağlar (47).

1.2.3.2.Epitel Fizyolojisi

Kornea epitel hücreleri lipid geçirgen özelliktedir. Epitel ve endotel hücreleri gerek mekanik bariyer, gerekse sıvı ve iyon dengesinin sağlanmasıyla korneanın korunmasında önemli görevlere sahiptirler. Korneada keratosit, endotel ve epitel

hücreleri metabolik olarak aktif olup canlılıklarını devam ettirmek için enerjiye ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Epitel tabakasına oksijen gözyaşı yoluyla diffüzyonla sağlanırken göz kapalı durumda iken limbal ve tarsal konjonktiva damarları aracılığı ile sağlanır (48). Aminoasit ve vitamin desteği aköz hümörden sağlanır. Epitel hücrelerinde glikoz ve glikojen başlıca enerji kaynağını oluştururlar. Glikoz çoğunlukla aköz hümörden elde edilmekle beraber % 10 veya daha azı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilir (49).

1.2.3.3.Endotel Fizyolojisi

Endotel hücrelerinin ana enerji kaynağı hümör aköz den sağlanan glikozdur. Aktiviteleri için anerobik, daha az olarak da aerobik yolları kullanırlar. Endotel hücrelerinin en önemli görevi korneanın şeffaf ve saydam kalmasını sağlamaktır. Bunu yaparken hem aktif bir pompa gibi çalışır hem de mekanik bir bariyer teşkil ederler. Endotel hücreleri normal pompa fonksiyonu için gerekli oksijeni aköz hümörden sağlarlar. Kornea endoteli dehidratasyon görevini yaptığı sürece stromanın su içeriği % 78 ve kalınlığı 550 μm civarında kalarak normal fonksiyonlarını sürdürür. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bariyer görevi görürler. Endotel tabakası metabolik aktivitesini stromadan aköz hümöre su pompalamak üzere gerçekleştirir. Aköz hümör (-) yüklüdür. Korneal pompanın dört ana komponenti vardır:

1. Aköz yüzeyde Na^+ / K^+ iyon pompası
2. Karbonik anhidraz sisteminin ürettiği H^+ ve HCO_3^-
3. K^+, Cl^- ve HCO_3^- in aköz hümöre pasif difüzyonu
4. Lateral yüzlerde Na^+ / H^+ iyon pompası

Net su akımı için Na^+ , K^+ veya H^+ konsantrasyon gradientinin gerçekleşmesi gereklidir. Bu pompalarla gerekli gradient sağlanır. Endotel hücrelerin dış kenarlarına lokalize olan sodyum-potasyum-adenozintrifosfataz pompa sistemi ile su ve elektrolitler dengelenerek aynı seviyede tutulur. Bu pompa enerji harcayarak sodyumun hücre dışına çıkmasını sağlar bunu suyun hücreyi terk etmesi izler.

Böylece kornea stromasından ön kamaraya doğru devamlı sıvı geçişi olurken, korneanın şeffaflığı korunur. Korneadan ön kamaraya geçen sıvının geri dönmesi endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile önlenmektedir. Hekzagonal yapıda

olan endotel hücreleri sıvı regülasyonu için ideal dizilimi oluşturmaktadır. Bu geometrik düzen maksimum sayıda hücre ve maksimum sayıda pompa yoğunluğunu temin etmektedir. Korneanın şeffaflığının korunması endotel hücrelerinin etkin fonksiyonlarının yanı sıra, korneada damarsal yapıların bulunmamasına, sinir liflerinin miyelinsiz olmasına ve stroma tabakasındaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine de bağlıdır (50).

1.2.3.4.Vasküler Sistem

Kornea avasküler yapıda olup periferinde, internal karotid arterin ilk dalı olan oftalmik arterden gelen ön siliyer arterlerin oluşturduğu limbal damar arkı bulunmaktadır. Bu damar arkı eksternal karotid arterin fasiyal dallarıyla anastomoz yapar. Böylece kornea periferi internal ve eksternal karotid arter tarafından beslenmektedir (51).

1.2.4.Kornea Yara İyileşmesi

Kornea gözün en önemli refraktif kısmı olduğu için mekanik, kimyasal ve enflamatuar cevap korneanın optik performansını etkileyecektir. Bu nedenle herhangi bir travma sonrası stabil görmeye ulaşmak amacıyla kornea yara iyileşmesinde bir takım mekanizmalar söz konusudur. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve ECM proteinleri etkileşim içerisindedirler. Korneada farklı tabakalarda farklı mekanizmalarla yara iyileşmesi gerçekleşir.

1.2.4.1.Epitel Yara İyileşmesi

Epitel yara iyileşmesinde birçok hücresel yapının ve sinyal moleküllerinin karşılıklı etkileşimi söz konusudur. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi kornea epitel yapısının devamında önemli rol oynar. Kornea epitel yara iyileşmesi birbirinin üzerine binen üç faza bölünebilir (52). Birinci fazda hemidesmozomlar kaybolur ve “fokal temas” denen geçici yapışkanlık kompleksi gerçekleştirilir. Bu faz süresince epitel hücreleri düzleşir ve yara kenarını koruyan bir kalkan halini alır. Bu faz proliferasyondan bağımsızdır. İkinci fazda proliferasyon ve farklılaşma söz konusudur. Üçüncü fazda hemidesmozomlar oluşturulur ve ECM sentezi ve yeniden yapılanması gerçekleştirilir. Bu basamakları epitel hücrelerinin metabolizmalarını arttırdıkları lag fazını takip eder.

1.2.4.1.1.Lag Fazı

Yaralanmanın ardından hücre göçünün başlamasına kadar geçen süre lag fazı olarak adlandırılır. Bu faz büyük ölçüde hücreyel organizasyon ve protein sentezi ile ilişkilidir. Vinkulin, aktin, talin ve integrin gibi sitoskeletal proteinler ile hyaluronan, reseptör CD44 gibi diğer hücre yüzey proteinleri sentez edilir (53). Bu proteinler yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra başlayan hemidesmozomların yeniden sentezine kadar epitelin bazal membrana tutunmasını sağlar. Bunların yanında hücre yüzey glikoproteinleri ve glikolipitleri de sentezlenir.

1.2.4.1.2.Hücre Göçü

Lag fazı tamamlandığında oküler yüzey epitelini yeniden tesis etmek için yaraya komşu hücreler göçe başlar. Normalde limbal kök hücrelerden köken alan bazal hücrelerin santrale doğru göç hızı haftada 120 mikrometre kadardır. Ancak yaralanmadan yaklaşık 5 saat sonra hücreler çeşitli yönlerden yara merkezinde buluşmak üzere saatte 60-80 mikrometre hızla göç eder.

Hücrelerin göçü intrastoplazmik aktin-miyozin kontraksiyonu ile oluşan ameboid hareketlerle gerçekleşir. Defekt tek hücre katıyla örtüldükten sonra mitozla normal epitel kalınlığı sağlanır. Zedelenmeden 3 saat sonra rejenere olan epitel uçlarında ve bazal laminada PMNL'ler belirir ve 36 saat kadar kaldıktan sonra giderek azalır ve kaybolurlar. Büyük defektlerde onarıma konjonktiva epiteli de katılabilir. Kornea epiteli, abrazyonu 1-4 gün içinde örterken, konjonktiva epiteliyle iyileşme 1-2 hafta veya daha uzun zaman gerektirir (54).

1.2.4.1.3.Hücre Çoğalması ve Farklılaşması

Hücrelerin göçünden sonra hücre çoğalması gerçekleşir. Santral epitel defekti sırasında periferik limbal hücreler santrale doğru göç ederek kornea epitelinin devamlılığını sağlar. Bunlar en yüksek mitoz hızına sahip hücrelerdir. Epitel iyileşmesi sırasında bazal hücrelerle limbal kök hücreler arasında bir denge bulunmaktadır. Bu görüş Thoft'un "X,Y,Z" hipotezi ile ortaya konmuştur. X; bazal epitel hücre çoğalmasını, Y; limbal hücre çoğalmasını ve santrale göçünü, Z; yüzeyden epitel hücre kaybını yansıtmak üzere denge konumunda $X+Y=Z$ olmalıdır.

Kornea epitel debridmanı hücre çoğalmasını limbal hücrelerde 4.5 kat, korneanın periferik hücrelerinde ise 3.2 kat arttırır (55).

1.2.4.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi

Debridman sonrası açığa çıkan bazal membrana enflamatuvar hücreler (PMNL'ler) bağlanır. Bu durum bazal membranı sindirebilen proteazların salınmasına neden olur. Kornea yaralanmasından sonra gözyaşında proteaz içerdiği için bazal membranın sindirilmesinde rolü vardır. Ek olarak kornea epitel hücreleri de bazal membranı sindirme yeteneğine sahip metalloproteinazlar salgılamaktadır (56). Bazal membranın proteaz sindirimi sonrasında yapısı ve fonksiyonu değişir. Bazal membranın parçalanması, yeniden epitelizasyonu birkaç biçimde etkiler:

a- Göç eden epitel hücrelerinin intraselüler sinyallerini düzenler.

Yaralanmadan sonra sitokinler bazal membrana bağlanmak suretiyle matrikse tutunurlar. Böylece bazal membranın kısmi bozulması hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve/veya apoptozunu düzenler.

b- Stromal ECM ile epitel hücrelerinin etkileşime girebilmesi. Bu durum göç eden endotel hücrelerinde yeni integrin ifadesi ve aktivasyonunu indükler (57).

Bazal membran epitel morfolojisi, farklılaşması ve devamında dinamik bir role sahiptir. Bu nedenle kornea epitelinin iyileşmesinde önemli yer tutar.

Fotoablasyondan 24 saat sonra göç eden epitel hücreleri, etraflarına laminin-1 sentez eder ve depolar (58). Laminin-1 bazal membranın esas bileşenlerindendir ve adezyon, proliferasyon, farklılaşma gibi birçok hücresel olayları ve hücre göçünü düzenler. Laminin ile eş zamanlı olarak konneksin, desmoglein-1 ve desmoglein-2 üretimi de artar. Bu proteinler yardımıyla bazal hücrelerle bazal membran arasında geçici adezyonlar oluşur. Bu proteinler yara iyileşmesinin tamamlanmasından sonra başlayacak olan hemidesmozomların yeniden sentezine kadar epitelin bazal membrana tutunmasını sağlar. Yeni hemidesmozomlar bazal membranda daha önce var olan çapa fibrillerinin karşısına gelecek şekilde sentezlenir ve adezyon kompleksleri kısa sürede bütünlüklerine kavuşur. Eğer yaralanma bazal membranı da içeriyorsa, epitelin önce bazal membran sentezlemesi gerekir ki bu durumda adezyon komplekslerinin sentezinin tamamlanması yaklaşık bir yıl sürer (54).

1.2.4.3.Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt

Epitel iyileşmesi ile süre açısından farklılık gösterir ve daha uzundur (en az 6 hafta). Stroma yara iyileşmesi için ideal değildir ve stroma rejenere olmayacağından defektin yerini kollajenöz skar dokusu alabilir veya defekt hiperplastik bir epitle doldurulabilir (60).

1.2.4.4.Stroma Yara İyileşmesi

Yeni kollajen sentezi, bu kollajenlerin birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından oluşur. Hasar gören epitel tabakasının altındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. İyileşme kaskadı hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla başlamaktadır. Epitel yaralanmasının altındaki keratositler dejenere olur ve çevreden yeni keratositler yerleşir. Stromal iyileşme sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedir. Kontraktil özellikte olan bu hücreler kollajenleri ve diğer matriks proteinlerini üretmektedir. Normal stroma tip I kollajenden oluşurken korneal skar dokusunda ise tip III kollajen bulunur. Skar dokusunun yeniden düzenlenmesi sonrasında tip III kollajen ile tip I kollajen yer değiştirir. Stromal iyileşmenin tam olarak gerçekleşmesi haftalar almaktadır (60).

1.2.4.5.Endotel Yara İyileşmesi

Kornea endotel hasarı sonrasında, sıvı transport mekanizmasında bozulma ile ödem oluşmaktadır. Endotel hücreleri mitotik aktiviteye sahip olmadıklarından ölü endotel hücrelerin yerlerini doldurmak için, komşu endotel hücreleri genişlemekte ve hasar yerine göç etmektedirler. İyileşme fazında, yara yerine en yakın olan hücreler 100 µm/gün hızla hareket ederken, kalınlıkları azalıp genişleyerek hekzagonal şekil almaktadırlar. Hücreler göçleri sırasında birbirleriyle temaslarını sürdürmektedirler (61). Son zamanlarda insan hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda, periferik korneadaki endotel hücrelerde hızı çok düşük olan mitotik aktivitenin ve kısmi olarak kendini yenileyebilme yeteneğinin varlığı in vivo olarak gösterilmiştir (62).

Kornea endotel iyileşmesinde birçok faktör görev almaktadır. Endotel hücrelerinde Epidermal Growth Faktör (EGF) ve Platelet-Derived Growth Faktör

(PDGF) reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (36, 49, 63). İnsan hücre kültüründe, EGF'nin otokrin etkilerle, endotel hücrelerin dansite artışında ve migrasyonunda etkili olduğu görülmüştür. Kornea yaralanmasında lakrimal bezden elde edilen EGF'nin topikal uygulanmasının endotel yara iyileşmesini hızlandığı bildirilmiştir. PDGF endotel hücre dansitesini ve DNA sentezini artırırken, endotel yara kapanma süresini kısaltmaktadır.

1.2.5. Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

1.2.5.1. Yaş

Genç popülasyonda iyileşme daha hızlı olup birkaç gün-hafta sürebilirken yaşlı popülasyonda aynı tipteki bir yaranın iyileşmesi aylarca sürebilmektedir (55).

1.2.5.2. Beslenme

Malnutrisyon iyileşmeyi belirgin şekilde geriletir. Protein, vitamin A ve vitamin C yara iyileşmesi için gereklidir. Şiddetli vitamin A eksikliğinde korneal ülserasyon görülmektedir (55).

1.2.5.3. Travma

1.2.5.4. Yara Apozisyonu

Kötü apozisyon yara iyileşmesini geciktirir. Ön ve/veya arka yara dudağında basamaklanmaya yol açabilir. Enfeksiyon, inkarasyon veya yabancı doku adhezyonu olasılığını artırır. Retrokorneal membran ile sonuçlanabilen epitelyal ve stromal ingrowth gelişimine zemin hazırlar (55).

1.2.5.5. Enfeksiyon

Mikroorganizmalar indirekt olarak inflamatuvar yanıtı artırarak aşırı kollajen yıkımı ve hücre ölümüyle ve direkt olarak salgıladıkları enzimlerle glikozaminoglikan ve/veya kollajen yıkımını artırmak yoluyla yara iyileşmesini geciktirir veya engellerler (55).

1.2.5.6. Enflamasyon

Değişik travma tipleri değişik inflamatuvar yanıt doğurur. Örnek olarak, yabancı cismin yerinde kaldığı laserasyonlar dev hücre reaksiyonu ve aşırı skar dokusu ile sonuçlanır. Topikal steroidle baskılanan erken inflamatuvar yanıt belirgin biçimde iyileşmeyi geriletir. Yaralanma sonrası korneaya inflamatuvar hücre akımı dokuyu onarıma hazırlar ancak iyileşmeyi bozabilecek etkiye de sahiptir. Dokudan serbestleşen lokal faktörler (lökotrienler, C5a, C3a) PMNL aktivitesi için tetikleme görevi görürler. Fazla sayıda PMNL birikimi kalıcı epitel defekti, hatta ülser oluşumuna yol açar. PMNL'ler epitel migrasyonunu inhibe ederek iyileşmeyi geciktirirler. Steroidler PMNL'ler için çağırıcı rol oynayan mediatör salınımını lizozomal veya diğer membranların stabilizasyonunu sağlayarak önlerler. Bu durum inflamatuvar yanıtı azaltır. Fakat steroidler fagositozu, superoksit radikal oluşumunu etkilemez. Uzun süre steroid kullanımında ise epitel migrasyonunu inhibe eder. PMNL'lerin kollajenaz aktivasyonu etkisini potansiyalize ederek ülserasyon riskini artırır. Bu yüzden steroidlerin kullanımı dikkatli şekilde izlenmelidir. PMNL inhibisyonu için topikal sitrat kullanımı gündemdedir. Na sitrat PMNL birikimini, fagositozunu, degradasyona yol açan enzim salınımını ve serbest O₂ radikal oluşumunu önler. Bu etkilerini PMNL aktivasyonu için gerekli olan Ca⁺⁺ iyonuna şelasyon yaparak gerçekleştirir (64).

1.2.5.7. Duyusal İnnervasyon

Normal epitel iyileşmesinde sinirsel uyarımın da gerekli olduğu ve duyusal innervasyon yokluğunda hücre göçü ve adhezyonu bilinmeyen bir mekanizmayla büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (65).

1.2.5.8. İntraoküler Basınç

Yükselmesi durumunda stromal yara iyileşmesinde skar dokusunun kontraksiyonunu önler (65).

1.2.5.9. Gözyaşının Etkisi

Gözyaşının niceliği epitelin sağlıklı oluşu ve bütünlüğü için kritik önem taşır. Orta aköz tabaka göz açıkta kaldığında buharlaşma ve nazolakrimal drenaj nedeniyle

incelir ve yüzeyel lipid tabaka müsin tabakaya ulaşır. Gözkapığı hareketiyle aköz komponent yenilenmezse müsin tabakanın lipidle kontaminasyonu lokalize hidrofobik epitelyal alanlar yaratır. Aköz tabaka eksikliğinde yüzeyel kuruluk, punktat epitelyal boyanma, mukus plak, iyileşmeyen epitel defektleri gözlenir. Lipid tabaka eksikliğinde ise oküler yüzey keratinizasyonu, yüzey mikropika kaybı, epitel defekti, korneal ülserasyon, keratomalazi gözlenir. Gözkapakları gözyaşının devamlı ve yeterli miktarda dağılmasını sağlar. Kapak skatrizasyonu, malpozisyonu veya nörojenik fonksiyon bozukluğunda hidrofobik epitelyal yüzeyler oluşur (47).

1.2.5.10. Vaskülarizasyon

Korneal vaskülarizasyon gelişiminde çok sayıda faktörün rol oynadığı görülür. Bu faktörler;

- a. Prostaglandin E1 (PGE1), akut enflamasyonu ve vaskülarizasyonu deneysel olarak oluşturabilme yeteneğindedirler.
- b. Korneal nekroz, zayıf yara apozisyonu, yaraya iris adezyonu vaskülarizasyona predispozisyon oluşturur.
- c. Limbusa yakın travmalar sıklıkla vaskülarizasyona yol açar (66).

1.2.5.11. İlaçlar

1.2.5.11.1. Antibiyotikler

Düşük dozda genta sulfatın (3 mg/ml), basitrasinin (500u/ml), neomisinin (3.5 mg/ml) ve kloramfenikolün (4 mg/ml) korneal epitelizasyona etkileri yoktur. Ancak artmış doza bağımlı olarak kloramfenikol dışında basitrasin (10.000 u/ml), genta-sulfat (10 mg /ml) ve neomisin (8 mg/ml) epitelizasyonu belirgin biçimde inhibe ederler (67).

1.2.5.11.2. Kortikosteroidler

Korneal epitel, stroma ve endotel yara iyileşmesini inhibe ederler. Araşidonik asit metabolitlerinin korneal neovaskülarizasyon (NV) patojenezinde önemli rolü vardır (68). Prostaglandinler, özellikle E serisi neovasküler cevabın potent uyarıcısıdır (69). Lökotrienler, lökosit göçünü stimüle ederek korneal NV'a neden olurlar (70). Deneysel olarak oluşturulan lineer perforan insizyonda gerginliğe

karşı yara direncinin medroksiprogesteron ile % 20, prednizolon ile % 11 oranında azaldığı gösterilmiştir. Skar dokusunda kollajen formasyonunu prednizolon % 43 azaltırken, medroksiprogesteron ise % 39 azaltmaktadır. Yine aynı çalışmada termal yanıkta ülserasyon gelişimini azalttıkları gösterilmiştir (71).

1.2.5.11.3. Lokal Anestezikler

Epitel iyileşmesi için temel olan aktin etkileşimini bozarlar. Kronik topikal tedavi persistan epitel defektine neden olabilir (72).

1.2.5.11.4. Benzalkonyum Cl (% 0.01)

Koruyucu olarak bu kimyasal maddeyi içeren topikal ilaçların kullanımında rejenere epitel üzerinde adheransta zayıflama, membran aktivite kaybı, oluşan epitel tabakanın yerinden ayrılması gibi etkiler gözlenmiştir. Koruyucular içerisinde en toksik olanıdır (72).

1.2.5.11.5.Asetilkolin

Endotel hücre hasarını arttırdığı saptanmıştır (72).

1.2.5.11.6.Epinefrin

1/1000'lik konsantrasyonda irreversible kornea ödeme yol açabileceği bilinmektedir. Kornea stromasında pH düşürdükleri için ödeme neden olmaktadır. 1/5000'lik konsantrasyonunun kullanılması önerilmektedir (72).

1.2.5.11.7. Antiviral İlaçlar

Epitel iyileşmesini inhibe ederler.DNA sentezini inhibe ettikleri için epitel iyileşmesi geciktirir (72).

1.2.5.12. Fibronektin (Fn)

Fibronektin (Fn), hücre adhezyonu ve migrasyonunda rol oynadığı düşünülen multifonksiyonel bir ekstraselüler matriks proteini'dir. Korneal Fn iyileşen epitel yara yüzeyinde gözlenir ve epitelizasyon tamamlanınca ortadan kaybolur (73). Organ kültüründe tavşan korneası üzerinde epitel migrasyonunun araştırıldığı Nishida ve ark. (74)'nın bir çalışmasında epitel hücrelerinin gösterdiği migrasyon aktivitesinin

ortama eklenen Fn ile belirgin olarak arttığı, etkinin eklenen Fn miktarı ile doğru orantılı olduğu, ortama anti-Ig G tavşan plazma Fn antikoru eklendiğinde ise anlamlı migrasyon inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada korneanın değişik lezyonlarında (insizyon, deneysel büllöz keratopati, termal yanık...) yapılan immunohistokimyasal analizlerle Fn'in stromal keratositlerce sentezlenebildiği, sadece gözyaşı kaynaklı olmadığı, eksojen Fn'in stromal kollajenlere bağlanarak kemotaktik aktivite yaratabildiği de bildirilmiştir (74). Yaralanmadan 8-36 saat sonra yüzeyel epitel defektlerinde gözlenen Fn, gözyaşından veya limbal vasküler yapılardan köken almaktadır. Stromal yaralarda ise Fn, keratositlerce üretilir. Fn'in yüzeyel defektlerde saptanan en olası kaynağının gözyaşı olduğunu doğrular niteliktedir (75). Nishida ve arkadaşları blok halinde kültür ortamına konulan tavşan kornealarında EGF ve Fn'in epitel migrasyonuna etkisini de araştırmışlardır. Sonuçlar Fn'in aksine epitel hücrelerinin bir kez uyarı sinyali aldıktan sonra EGF'nin varlığına gereksinim duymadığını, EGF stimülasyonunun Fn bağımlı bir yanıt ve Fn in EGF den bağımsız olduğunu, EGF'nin epitel migrasyonuna etkisinin Fn tarafından düzenlendiğini ortaya koymaktadır (76).

1.2.5.13.İnterlökin – 6

Tavşan korneasında integrin reseptörlerini uyararak epitel hücre migrasyonunu stimule ettiği gösterilmiştir. Persistan epitel defektinde (PED) topikal kullanımı deneysel aşamadır (77).

1.2.5.14. Retinoik Asit

Tavşanlarda kornea epitel defektlerinde topikal retinoidlerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada % 0.1'lik all-trans-retinoik asit 3x1 günlük doz kullanımı ile iyileşme hızında % 21, 5x1/gün dozunda ise % 35 oranında iyileşme hızında artış olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar all-trans- retinoik asitin cerrahi sonrasında ve PED de iyileşmeyi hızlandırıcı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (78).

1.2.6. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Medyatörler

1.2.6.1.Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri birçok hücre tarafından salgılanan, hücre çoğalmasını, göçünü ve hayatının devamını uyarın, bazı durumlarda ise bunları engelleyen peptidlerdir. Hareketlerini otokrin, jukstakrin veya en yaygın biçimde parakrin mekanizmalarla gerçekleştirirler. Karşılıklarına gelen hücre yüzey reseptörleri tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri deoksi ribonükleik asit (DNA) sentezinin sentez fazını uyarır ve ardından hücre çoğalması gerçekleşir (79). Göz birçok growth faktör için hedef doku konumundadır. Bu faktörlerden önemli olanları şunlardır: Epidermal Growth Faktör (EGF), Fibroblast Growth Faktör (FGF), Transforming Growth Faktör (TGF) - α ve - β , Platelet-Derived Growth Faktör (PDGF), İnsulin-like Growth Faktör (IGF) (80).

1.2.6.1.1. Epidermal Growth Faktör

Epidermal growth faktör 6 kilodalton ağırlığında kompakt bir polipeptittir. Epitel hücreleri için potent bir mitojendir. Epidermal growth faktör reseptörü 175.000 dalton ağırlığında bir membran glikoproteinidir ve bu reseptör konjonktiva epitelinde, kornea epitel ve endotelinde, irisin pigment tabakasında, lens epitelinde mevcuttur. Reseptörde EGF'nin yüksek ve düşük afinite ile bağlandığı bölgeler vardır. Epidermal growth faktörün reseptörüne bağlanması tirozin kinazı aktive eder ve böylece fibronektin, hyaluronik asit gibi ECM moleküllerinin salgılanmasına ve kontakt inhibisyonunun olmadığı hücrelerin çoğalmasına neden olan DNA sentezini uyarır. Reseptör fosforilasyonu, hücre göçüne yardımcı olan hücre iskeletindeki aktinin yeniden düzenlenmesini de sağlar (81). Hem yüksek hem de düşük afiniteli EGF reseptörleri özellikle limbal bölgede olmak üzere kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Düşük afiniteli reseptörler daha az miktarda stroma keratositlerinde yer almaktadır (82). Lakrimal bezdeki ve gözyaşındaki EGF'nin de kornea epiteline etkileri olmaktadır (83). Bu bulgular EGF'nin, otokrin, parakrin ve jukstakrin mekanizmalarla kornea hücrelerini etkilediğini düşündürmektedir. Epidermal growth faktör korneal vaskülarizasyonu ile de ilişkili bulunmuştur (84). Topikal EGF epitel iyileşmesini uyarmakta, özellikle limbal ve periferik kornea

epitel rejenerasyonunda maksimum etki göstermektedir (85). Epidermal growth faktör normal kornea epitel kalınlığının devam ettirilmesinde de önemlidir. Ayrıca stromada timidin alınmasını artırır, fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive eder ve aktive fibroblastların insizyon yerinde çoğalmasını sağlayacak kemotaksisten sorumludur. Epitel ve stromal iyileşmeye olan etkileri ile gerginliğe karşı yara direncini artırır (82, 86).

1.2.6.1.2. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör ailesi ortalama 18 kiloDalton (kD) ağırlığında olan, 20 kadar heparin bağlayan, birçok dokuda farklılaşma, göç, çoğalma, ECM depolanması ve anjiyogenez gibi olayları düzenleyen protein grubudur. Parçalanmadan korunmak için düşük afiniteli heparan sülfat proteoglikanlarına tutunurlar ve hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar. Asidik FGF, Bowman tabakası ve Descement membranlarında, endotel hücrelerinde ve daha az oranda ise epitelde tespit edilmiştir. Lakrimal bez tarafından da salınan bu faktörün epitel hücrelerinde hem parakrin hem de otokrin etkileri vardır.

Asidik ve bazik FGF epitel, stroma ve endotel hücrelerinde mitojeniktir (87). Bazik FGF, kornea fibroblastlarında DNA sentezini, yara gerginliğine direncini ve endotel hücrelerinde mitotik hızı artırır (88).

1.2.6.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta

Fare embriyosunda TGF- α sentezi engellenerek yapılan deneylerde göz kapağı ve ön segment disgenezisi, korneal enflamasyon ve skar oluşumu, göz kapağı gelişim bozukluğu, mikroftalmi, yüzeyel opasiteler, lense ve retina ait defektler gözlenmiştir. Transforming growth faktör- α , EGF gibi gözyaşında bulunur ve olası kaynak yine lakrimal bezlerdir. Ek olarak kornea epitel hücreleri TGF- α , TGF α mRNA'sı ve proteinini içerirler. Bu durum EGF ve TGF- α üreten epitel hücrelerinin otokrin mekanizmayla normal epitel sikluslarını devam ettirdiklerini düşündürmektedir. Endotel hasarında aköz hümörde TGF- α konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir (89, 90).

Transforming growth faktör- β ailesi TGF- β 1, TGF β 2 ve TGF- β 3'den meydana gelir. 25 kiloDalton ağırlığında ve birçok doku tarafından üretilen

polipeptidlerdir. TGF- β dimerik, inaktif biçimde salgılanır ve latent growth faktör havuzu oluşturmak üzere ECM'ye bağlanır ve ekstraselüler veya membrana bağlı enzimlerle aktif hale getirilir (91). Transforming growth faktör- β aktivasyonu ECM üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur (89). Transforming growth faktör- β 'nın genel olarak epitel, endotel hücreleri ve lökositlerin büyümesini engellediği ve fibroblast üretimini uyardığı kabul edilmektedir (90). Transforming growth faktörün epitelten stromaya salgılanması ve gözyaşında üretimi stromal hücrelerde çoğalma ve göçe neden olur. TGF- β 'nın enflamasyon odağına fibroblast, monosit ve makrofajları çekme özelliği de vardır (92). Tavşanlarda korneal insizyonlarda gerilmeye karşı yara direncini artırıcı etki gösterir. Bu etkisini insizyon yerinde kemotaksis ile fibroblast sayısını arttırarak gerçekleştirir (80).

1.2.6.1.4. Keratinosit Growth Faktör

Keratinosit growth faktör (KGF) , FGF ailesinin üyelerinden biridir. Yaklaşık 28 kiloDalton ağırlığında tek zincirli bir polipeptiddir ve keratinositler epitel hücreleri için mitojeniktir. Keratinosit growth faktörün TGF- α , EGF, FGF ile aynı sinyal yolağını paylaştığı düşünülmektedir. Keratinosit growth faktörün hedef hücrelere salınma ve depolanmanın yapıldığı stromada biriktirmek için heparine bağlanabileceği düşünülmektedir (88).

Keratinosit growth faktör reseptörü mRNA'sının in vitro olarak kornea epitel hücrelerinde anlamlı miktarda bulunduğu ama stroma keratositlerinde çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir (91). Aksine KGF'nin kültüre keratositlerde üretildiği, ancak epitel hücrelerinde üretilmediği tespit edilmiştir. Bu durum KGF'nin stromada üretilip, epitel hücrelerinde parakrin bir mekanizma ile etkili olduğunu göstermektedir (93). Keratinosit growth faktör reseptörünün limbal fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde, santral korneaya göre daha fazla bulunduğu görülmüştür. Bu durum KGF'nin tercihen kök hücrelerin fonksiyonunu düzenlediğini düşündürmektedir (87). Keratinosit growth faktörün sürekli olarak düşük miktarda salınmasının sağlıklı korneal epitel bütünlüğünün sağlanmasında rolünün olduğu düşünülmektedir (94). Son yapılan çalışmalarda $\text{IL-}\alpha$ ve $\text{IL-}\beta$ gibi sitokinlerin keratositlerden KGF salgılanmasında rol aldığı kabul edilmektedir (95).

1.2.6.1.5.Hepatosit Growth Faktör

Hepatosit growth faktör (HGF) yaklaşık olarak 90 kilodalton ağırlığında bir glikoproteindir. Mezenşimal orjinli hücrelerden salgılanır. Travma, enflamatuvar uyarılar ve koagülasyon kaskadındaki proteazlarla aktif hale gelir. Keratinosit growth faktör gibi HGF de çeşitli ECM bileşenlerine bağlanabilir. Hepatosit growth faktör reseptörü tirozin kinaz özelliği taşır. Korneada HGF reseptörü en yoğun olarak epitel hücrelerinde bulunur, ancak HGF klasik parakrin etki ile fibroblastlardan üretilerek epitel hücrelerine etki eder (96). Keratinosit growth faktörün tersine, HGF üretimi ve reseptörü kornea santralinde daha yoğundur. Hepatosit growth faktör hücre göçünü uyarır, stroma fibroblastlarına etkisi minimaldir (87). Hepatosit growth faktör gözyaşında da bulunur ve kornea epitel katının bütünlüğünün sürdürülmesinde katkısının olduğu düşünülmektedir (97).

Aköz hümörde bulunan HGF'nin endotel hücrelerine bağlanarak, bu hücrelerin bütünlüklerinin devamında otokrin mekanizma ile rol oynadığı sanılmaktadır (98).

1.2.6.1.6. Platelet Derived Growth Faktör

Plateletlerden izole edilen bir faktördür. Korneada esas hedef hücresi miyofibroblastlardır (99). PDGF sistein bağlı, A ve B zincirlerinden oluşmuş dimer yapısındadır. PDGF'un reseptörüne bağlanması mitojenik etkileri indükler (79).

PDGF reseptörleri kornea fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde bulunur. PDGF-BB proteini epitel hücrelerinde üretilir ve en yüksek miktarda bazal membrana bağlanır (92). Endotel hücrelerinin ve fibroblastların göçü PDGF-BB ile uyarılır. Fn varlığında PDGF-AA ve -BB epitel hücrelerinin kemotaksisini uyarmaktadır (100).

1.2.6.1.7. Diğer Büyüme Faktörleri

Sinir büyüme faktörü (SBF), nörotropin-3 ve 4, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör gibi nörotrofik faktörler ile reseptörlerinin korneada bulunduğunu ve bunların epitel hücre çoğalmasını uyardığını göstermektedir (101). Kornea epitel bütünlüğünde kornea sinirlerin önemli rolünün olduğu düşünülmekte ve salınan nörotrofik faktörlerin doku homeostazında rolü bulunmaktadır (102).

1.2.7. Kornea yara iyileşmesinde enflamatuvar sitokinlerin rolü

Kornea epiteline olan travma sonrasında epiteldeki çeşitli sitokinlerin seviyesi artar. Bunların en önemlileri IL-1, IL-6 ve TNF- α 'dır (92). İnterlökin-6 integrinleri düzenleyerek kornea epitelinde göçü uyarır (103). İnterlökin-1, EGF ile sinerjik biçimde in vitro epitel yara kapanmasını artırır. İnterlökin-1 ve TNF- α kollajenin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar. Ancak bu sitokinlerin etkileri her zaman yararlı değildir. IL-1, IL-6 ve IL-8 kornea stromasında erimeyi uyandırabilir (104).

1.3. Kornea Neovaskülarizasyonu

Damarlar iki mekanizma ile gelişir: vaskülogenez ve anjiyogenez. Anjiyogenezde kapillerler önceden varolan damarlardan gelişirken vaskülogenezde kan damarları diferansiye endotel hücrelerinden de novo olarak gelişir (105).

Yetişkinlerde sadece anjiyogenez görülür ve yara iyileşmesi, ovulasyon ve plasental maturasyon gibi fizyolojik fonksiyonlardan sorumludur. Endotel hücreleri anormal bölünerek tümör gelişmesi ve anjiyogenez yoluyla bazı oküler hastalıklar gibi patolojik durumlar ortaya çıkar (106).

Korneanın besleyici damarı ön siliyer arterlerden gelir. Oftalmik arterden çıkan siliyer arterler limbus bölgesinde perikorneal pleksuste sonlanır. Kornea neovaskülarizasyonu da perikorneal pleksuste var olan kapiller ve venüllerden çıkmaktadır (106). Kornea neovaskülarizasyonunun iki klinik varyantı vardır: stromal neovaskülarizasyon (genellikle stromal keratitlerden kaynaklanmaktadır) ve vasküler pannus (oküler yüzey hastalıklardan kaynaklanan periferik yüzeysel korneada bağ dokusu proliferasyonudur) (107).

1.3.1. Epidemioloji

Amerika Birleşik Devleti'nde bir yıl içinde 1.4 milyon hasta kornea neovaskülarizasyonu geliştirmektedir. Yapılan çalışmalarda toplumun %4'ünde kornea neovaskülarizasyonu bulunmakta ve kornea nakli sırasında elde edilen kornea örneklerin %20'si histopatolojik olarak neovaskülarizasyon göstermektedir (108)

(Tablo 1). Türkiye’de henüz bu konuda yapılmış bir çalışma yoktur.

Tablo 1. Kornea Neovaskülarizasyonuna Neden Olan Hastalıklar

Enfeksiyöz keratitler
Bakteriyel
Psödomonas
Klamidya trakomatis
Sifiliz
Viral
Herpes simpleks
Herpes zoster
Fungal
Kandida
Fusarium
Asperjillus
Parazitik
Onkoserkiazis
Enflamatuar hastalıklar
Greft rejeksiyonu
Oküler pemfigoid
Atopik keratokonjonktivit
Rozasea Lyell’s sendromu
Stevens-Johnson sendromu
Graft versus host hastalığı
Dejeneratif-konjenital bozukluklar
Pterijyum
Aniridi
Terrien’in marjinal dejenerasyonu
Travmatik-iatrojenik bozukluklar ve diğerleri
Korneal ülser
Kontakt lens
Alkali yanığı
Kök hücre yetmezliği

Neovaskülarizasyon ortamda var olan damarlardan bir takım faktörlerin aktivasyonu ile yeni damar oluşumudur. Organizmada bu durum anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörlerin dengesi sağlanarak sıkı bir şekilde kontrol edilir (Tablo 2 ve Tablo 3). Neovaskülarizasyon için sadece anjiogenik faktörlerin yükselmesi değil aynı zamanda anti-anjiogenik faktörlerin azalması da gerekmektedir (109).

Tablo 2. Anjiogenik Faktörler

Tümör nekrozis faktör- α
Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
Vasküler endotelyal growth faktör
Asidik and basik fibroblast growth faktör
Plasenta growth faktör
Platelet-derived epidermal growth faktör
Platelet-activating faktör
Platelet-derived growth faktör
Anjiogenin
Anjiyopoetin-1
Granulosit-makrofaj koloni-stimulan faktör
Granulosit koloni-stimulan faktör
Transforming growth faktör
Epidermal growth faktör
Hepatosit growth faktör
İnsulin-like growth faktör
İnterlökin-1,2,6,8
Prostaglandin E1, E2
Vascular integrin $\alpha v \beta$
Matriks metalloproteinazlar
Histamin

Tablo 3. Antianjiogenik Faktörler

İnterferon- α, β, γ
İnterlökin-12
Anjiostatin
Matriks metalloproteinaz inhibitörleri
Platelet faktör 4
Trombospondin
Fibronektin
Endostatin
Retinoik asit

Kornea neovaskülarizasyonunda üç faz vardır:

1.3.2.1. Erken Prevasküler Faz

Enflamasyonla seyreden proteolizis dönemidir. Enflamasyona bağlı hasar ile damarlarda dilatasyon, geçirgenlik artışı ve ödem olur. Kısa süre içerisinde hücre elemanlarının konfigürasyonunda değişiklikler başlar. Kan akımı yavaşlaması ile eritrositler merkezde kümeleşirken PMNL'ler damar duvarına yerleşirler. 2-3 saat sonra PMNL'ler damar dışına çıkarak kornea stromasına göç ederler. 24-48 saat

sonra da PMNL infiltrasyonu pik yapar. Polimorfonükleer lökositler kemotaksisi başlatarak bazı sitokinlerin salınımına neden olur. Lökositlerden salınan proteolitik enzimler ile damarların bazal membranı parçalanır. Monosit ve makrofaj göçü ise 24 saat sonra başlar. Damar geçirgenliğinde artış ve ödem normalde sıkı bir dizilim gösteren kollajen fibrillerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Ödemle beraber ekstravasküler dokuya geçen fibrinojen pıhtılaşarak vaskülarizasyonda önemli rol oynar (110, 111).

1.3.2.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı

Yeni damar oluşumunda endotel hücre göçünün rolü kesin olarak belirlenmiştir. Bazal membran devamlılığının bozulmasından sonra endotel hücreleri psödopodları ile hasarlı bölgeye göç ederler. Endoteldeki morfolojik değişimleri bazal membrandaki parçalanmanın izlediği bilinmektedir. Daha sonra endotel hücrelerinde mitoz ve yeni damar tomurcuğu oluşumu gözlenir. Matriks metalloproteinazlar ECM bileşenlerini bozarak, göç eden endotel hücreleri için gerekli olan yolu açar. Anjiyogeneizde gerekli olan MMP'ler enflamatuar hücrelerden ve endotel hücrelerinin kendilerinden kaynaklanabilir. Anjiyogenik faktörler endotel hücrelerinde MMP'lerin salınmasını ve fonksiyonlarını arttırabilir (112). Göç olayı tek başına neovaskülarizasyon için yeterli olmakta, hücresel proliferasyon olmasa bile endotel hücrelerinin yayılımı, göçü ve yenisidandağıılımı ile yeni damar oluşumu gerçekleşebilmektedir (113). Bu nedenle endotelhücre göçünün vaskülarizasyondaki en önemli basamak olduğu söylenebilir.

Normal koşullarda olgun kan damarlarında hücre bölünmesi sıklığı %0,1'den azdır. Neovaskülarizasyon gelişimi sırasında bu oran % 8'e kadar yükselmektedir. Vasküler endotel hücrelerinin normal yaşam döngüsü iki ay iken enflamasyon döneminde 36 saat içinde mitotik aktivite gözlenebilmektedir. Bu fazda henüz vasküler lümen oluşmamıştır (107).

1.3.2.3. Vasküler Matürasyon Fazı

Kapiller tomurcuklar, distal ucunda göç, proksimal ucunda ise proliferasyon gösteren endotel hücrelerinin bulunduğu solid oluşumlardır. Ortamda çoğalan endotel hücreleri zamanla lümen oluşturacak şekilde yan yana gelir ve primitif damar şeklini alır. Bu sırada endotel hücrelerinden anjiyogenik uyarı ile ECM proteinleri

ortaya çıkar. Ekstrasellüler matriks proteinleri perivasküler boşluğa ulaşarak, hücre proliferasyonunu gerçekleştirdiği gibi, damar çeperinin düzenli olmasını da sağlar. İntegrin bağlayan ECM proteinleri, endotel hücrelerinin sıkı bir şekilde yapışmalarına yardımcı olur. Zamanla yeni oluşan damarların bazal membranları devamlı hal alır ve perisitlerin endotel hücrelerini çevrelemesi ile ana damar oluşumu izlenir. Postkapiller venüllerden oluşan primitif damarlar zamanla birbirleriyle ilişkiye geçer ve kan akımı başlar. Anjiogenik uyarının yetersiz kaldığı durumlarda ise vasküler yapılarda daha fazla uzama gerçekleşmez ve regresyon gözlenir (110).

1.3.3. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyaran Faktörler

1.3.3.1 Vasküler Endotelyal Growth Faktör

Homodimerik yapıda, 46 kilodalton ağırlığında olan Vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) ilk defa 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından yüksek düzeyde vaskülarize bir tümörde tanımlandı (114).

Vasküler endotelyal growth faktör spesifik bir gen tarafından kodlanır ve yapılarındaki aminoasit sayısına göre belirlenmiş altı farklı izoformu vardır: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206. İnsanlarda en fazla VEGF165 izoformu bulunur ve büyük oranda heparine bağlanarak salınmaktadır (115).

Vasküler endotelyal growth faktör biyolojik aktivitesini temel olarak endotel hücreleri üzerindeki tirozin kinaz yapılı, VEGF reseptör (VEGF-R1) ve VEGF-R2 ile lenf damarları üzerindeki VEGF-R3 adlı üç reseptörü ile gerçekleştirir. Vasküler endotelyal growth faktör -R1 ve -R2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salınır ve anjiogenez ile damar geçirgenliğinde görev alır.

Vasküler endotelyal growth faktör R-3'ün lenfanjiogenezin moleküler regülasyonundan sorumlu olduğu sanılmaktadır. Vasküler endotelyal growth faktörün ayrıca tümör metastazı ve lenfödem gibi patolojik olaylarda da rol aldığı bildirilmiştir (116). Vasküler Endotelyal Growth Faktör reseptörlerinin aktivasyonu fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz, guanozin trifosfataz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile eder ve DNA transkripsiyonu başlatılır (117).

Vasküler endotelial growth faktör düzeyi başta Ras ve human epidermal growth faktör reseptör-2 onkogenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, İL-1, İL-6, İL-10, İL-13, FGF, PDGF, TGF- β , İGF-1, TNF- α ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (118). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF)-1 de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (118). Vasküler endotelial growth faktörün salınımında en önemli iki faktör hipoksi ve enflamasyondur. Vasküler endotelial growth faktöre maruz kalan damarlarda endotel hücrelerinde fenestrasyon, veziküler organel ve transselüler gap oluşumuyla permeabilite artmaktadır. Vasküler endotelial growth faktörün neden olduğu vasküler permeabilite artışı kemotaksisin ve enflamasyonun devamında da önemlidir (119).

Vasküler endotelial growth faktör endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanında hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan MMP'ler, ürokinaz, doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını uyarak invazyon ve metastazı kolaylaştırır (120).

Vasküler endotelial growth faktör, damar endoteli, düz kas hücreleri, arteriollerdeki fibroblastlar, böbrek glomerülleri, bronşlar, overler, adrenal bezler, dalak ve tonsillerde bulunmaktadır (121). Aort düz kas hücrelerinde üretilerek salınan VEGF büyük damarların intimal hasarı sonrasında intimal onarımı ve büyümeyi kolaylaştırırken, hasarın uzamasını sınırlayıcı etkiye sahiptir (122). İnsan koroner arterlerinde, aterosklerotik plak bölgesiyle aterosklerotik olmayan bölge karşılaştırıldığında aterosklerotik bölgede VEGF salınımında artış olduğu gösterilmiştir. Vasküler endotelial growth faktörün, aterom plaklarının oluşumunda etkili olduğu düşünülmekte ancak iskemik kalp hastalığında kollateral oluşumunu arttırdığı da bilinmektedir. Bu etkisi dikkate alınarak VEGF'in kardiyovasküler hastalıklarda terapötik etkisi üzerinde durulmaktadır (123). Vasküler endotelial growth faktör tümör büyümesini kolaylaştırmakta ve bu dokulardan fazla miktarda salınmaktadır (121).

1.3.3.2.Tümör Nekrozis Faktör- α

TNF- α mononükleer fagositlerden kaynağını alır. T hücreleri, aktive Natürel Killer (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri bu proteini salgırlar. İki çeşit TNF

vardır. Bunlar genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (kaşektin de denir) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (lenfotoksin)'dir. TNF, düşük yoğunluklarda lokosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir.

Sağlıklı bireylerde plazma TNF düzeyleri 0-35 pg/ml arasında değişmektedir. TNF- α ; IL-1, IL-6, kemokinleri ve TNF'nin kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir (108).

TNF- α ; adezyon molekülleri ekspresyonunun up-regülasyonu, nötrofil aktivasyonu, kemokin sekresyonunun indüksiyonu ve Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B) sinyal iletim yolunun aktivasyonu gibi birçok proinflamatuvar ve immün modulator fonksiyonların medyatörüdür (108).

TNF'nin başlıca biyolojik etkileri; anjiogenez, ateş yapıcı etkinlik, hepatositleri etkileyerek akut faz reaktanlarının sentezini uyarmak, nötrofil adezyonunun artması, fibroblast ve mezenşimal hücre proliferasyonu, nöronların çoğalması ve fonksiyonlarının regülasyonu, T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunun indüksiyonudur. Deney hayvanlarına uzun süre verildiğinde kaşektik metabolik değişikliklere neden olur. Kaşeksi, TNF ile uyarılan iştah azalması sonucu oluşur. Damar düz kasını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. Bu etkiyi prostasiklin ve NO gibi damar genişleticileri uyararak indirekt yoldan yapar. İntravasküler koagülasyona neden olarak doku perfüzyonunu azaltır (113). TNF- α , NO sentezinde rol alarak anjiogenezin erken dönemlerinde vazodilatasyona yol açar (124).

Alkali kimyasal yanık, korneal stromada ciddi hasar sonucu persistan ülserasyon, opasifikasyon ve neovaskülarizasyon oluşturarak kalıcı görme kaybı nedeni olabilir. Alkali yanık oluşturulan korneada açığa çıkan faktörlerden biri proinflamatuvar pleotropik sitokin olan TNF- α 'dır (125).

İnflamasyon ve fibroziste hücresel cevabın düzenlenmesinde TNF- α 'nın rolü tam olarak açıklanamamıştır. TNF- α iyileşmekte olan kornea epiteli ve inflamatuvar hücrelerde tesbit edilmiştir (125). TNF- α ayrıca MIF salınımını regüle ederken aynı zamanda VEGF, FGF ve TGF üretimini arttırarak neovaskülarizasyonu arttırır (126).

Korneada inflamatuvar uyaran ile çok miktarda TNF- α sentezlenir. TNF- α aktivitesi iki reseptör tarafından düzenlenir. Her iki reseptörde ekstraselüler bölgelerde bol miktarda bulunurken, intraselüler miktarları farklı hücresel cevaplara

yol açacak şekilde değişkendir. TNF- α 'nın çoğu proinflamatuar etkilerini TNFR-I üzerinden gösterdiğine inanılır (127).

1.3.3.3. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), Guinea piglerde makrofajların kapillerlerin dışına migrasyonunu önlediği keşfedilen ilk lenfokindir. MIF cDNA'sı ilk defa insan T lenfositlerinden klonlanmış ve MIF proteininin 114 amino asit'den oluştuğu anlaşılmıştır. Rekombinan MIF (rMIF) kullanılarak yapılan sonraki çalışmalarda MIF'in gecikmiş hipersensitivite ve letal endotoksemide önemli rolü olduğu gösterilmiştir (128).

MIF, T lenfosit ve makrofajlardan salınan ve inflamasyonda anahtar rolü olan potent pro-inflamatuar sitokindir (129). MIF, sistemik inflamatuvar stimulusa cevap olarak ön hipofizden hormon olarak salgılanır. Böylece MIF'in hem proinflamatuar sitokin hem de nöroendokrin hormon gibi biyolojik davranışları olduğu görülmüştür.

İnsanlarda MIF protein ve mRNA'sının korneal bazal epitelyal ve endotelyal hücrelerde, iris ve silyer cisim epitelinde, retinal astrosit, Müller ve RPE hücrelerinde varlığı gösterilmiştir (130).

MIF'in α ve β yapıları vardır. Her MIF monomerinin iki antiparalel α -heliks ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$) ve altı β ($\beta 1$ - $\beta 6$) kolu vardır. Bu yapısı major histokompatibilite kompleks (MHC) molekülünün protein bağlanma bölgesine benzer. Henüz MIF membran reseptörü tanımlanmamış olmasına rağmen bazı çalışmalarda reseptör aracılı yolak olduğu iddia edilmiştir. MIF fonksiyonları için muhtemel bir diğer mekanizma ise katalitik aktivitesidir. MIF tatomeraz, izomeraz ve tiol protein oksidoredüktaz aktiviteleri gösterir. Enzimatik aktivite için protein substratının olduğu gösterilmiştir. MIF ilişkili uyarıda mitojen aktive protein (MAP) kinaz ve aktivatör protein-1 (AP-1)'in ekstraselüler uyarı düzenlenmesinde (ERK 1/2) önemli rolü olduğuna dair yayınlar da mevcuttur (131).

Yeni bir çalışmada MIF'in direkt olarak hücre surveyini PI3K/Akt yolağı ile arttırarak tümör hücresi surveyi için kritik öneme haiz olduğu gösterilmiştir. Ayrıca MIF için ko-aktivatör c-jun aktivasyon bölgesi bağlanma protein-1 (JAB-1) denen intraselüler reseptör proteini tanımlanmıştır (131).

Üveitli hastaların intraoküler sıvılarında anlamlı derecede yüksek MIF olduğu tesbit edilmiştir. Vitreustaki MIF seviyeleri vitreus inflamasyon aktivitesi ile ilişkilidir. MIF oküler inflamasyonun patofizyolojisinde önemli role sahiptir (132). Fare korneasında MIF mRNA'sının hasar veya enfeksiyon sonrası erken dönemde artmış olduğu bulunmuştur (133). Ratlarda korneal yara iyileşmesi esnasında MIF, korneal epitelyal hücrelerden ilk 3 saatte salgılanmaya başlayarak 48 saat boyunca artmaya devam eder (130). MIF neovaskülarize korneadan bol miktarda eksprese edilir. İnflamatuvar korneal neovaskülarizasyonda anjiojenik rolü vardır (134).

MIF; fagositoz, intraselüler sindirim ve H₂O₂ yapımı gibi makrofaj fonksiyonlarını artırır (135). Makrofajlarda TNF sentezini uyararak ve IFN- γ ile sinerjik etki göstererek NO yapımını artırır (136). MIF, proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, COX-2, PLA2 ve MMP seviyelerini indükler (137).

1.3.3.4. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda vasküler bazal membrana bağlanmaktadır. Yeni damarların maturasyon derecelerine göre değişik yoğunlukta bağlanma söz konusudur (138).

1.3.3.5. İnsülin Like Growth Faktör

İnsülin like growth faktör-1'in hayvan modellerinde korneada anjiogenik etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (139).

1.3.3.6. Anjiopoetin

Bir çalışmada anjiopoetin (Ang)-1 ve -2'nin sistemik Tie-2 ile inhibisyonu kornea neovaskülarizasyonunda gerilemeye neden olmuştur. Bu geriletmenin VEGF' den bağımsız olduğu düşünülmektedir (140). Ayrıca ratlarda Ang-2'nin inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği bildirilmiştir (141).

1.3.3.7. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

MMP'lar çinko bağlayan proteolitik enzim grubudur. ECM yeniden şekillenmesi ve anjiogeneizde rol oynamaktadır. 24 değişik MMP tipi bulunmuş, 7 tanesinin korneada varlığı gösterilebilmiştir. Bunlar; kollajenaz I ve III (MMP-1 ve 13), jelatinaz A ve B (MMP-2 ve 9), stromelisin (MMP-3), matrilisin (MMP-7), ve

membran tipi MMP (MMP-14) (56, 142-145). Bu faktörlerin kornea anjiogenezinde arttığı gösterilmişse de (146,147) anjiogenez regülasyonunda rolü tam olarak bilinmemektedir çünkü aynı molekül hem anjiogenik hem de antianjiogenik faktör olarak davranmaktadır.

MMP'lerin bu iki yönlü etkisi şöyle açıklanmaya çalışılmaktadır; ECM'i parçalayarak endotel hücre invazyonunu kolaylaştırarak anjiogenik etki gösterirler öte yandan anjiogenik özellikleri bulunmayan prekürsörleri parçalayarak antianjiogenik fragmanlar oluşturup antianjiogenik madde üretirler (148-152).

1.3.4.Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler

1.3.4.1.Anjiostatin

Anjiostatin 38 kiloDalton ağırlığında, plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olup güçlü bir antianjiogenik faktördür (153). Anjiostatin ve benzeri fragmanların implantasyonu korneada FGF ve anjiogeninin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (154).

1.3.4.2. Endostatin

Endostatin 20 kiloDalton ağırlığında, kollajen XVIII'in proteolitik parçalanma ürünüdür ve esas olarak damar endoti bazal membranında bulunur. Kollajen XVIII gözde esas olarak retina, lens kapsülü ve korneada bulunur (155).

Endostatin, implante edildiği kornealarda bFGF'nin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (156).

1.3.4.3. Pigment Epiteli Derived Faktör

Pigment epiteli derive faktör (PEDF) güçlü bir antianjiogenik ve nörotrofik faktördür. Gözde retina, iris ve korneada bulunmuştur (157). Pigment epiteli derived faktörü bloke eden antikorlar kornea stromasına yerleştirildiğinde vaskülarizasyonun uyarıldığı tespit edilmiştir (158).

1.3.4.4. Trombospondin-1

Trombospondin (Tsp)-1 gözde kornea, iris, sklera ve retinada üretilir (159).

Korneada Tsp-1 esas olarak kornea epitelinin bazal tabakasında üretilmektedir (160).

Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklediği anjiogenezin oluştuğu gözlenmiştir (161).

1.4. Bevacizumab

Bevacizumab humanize edilmiş total uzunlukta murin monoklonal antikordur. 214 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı 149 Kda'dur. VEGF için iki bağlanma bölgesi içerir. VEGF'in endotel hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmalarını önleyerek tüm VEGF-A izoformlarını ve onların aktif degradasyon ürünlerini inhibe eder (162).

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almış ilk antianjiogenik ilaçtır. Metastatik kolorektal kanserlerde terminal döneme kadar kullanılmaktadır. Meme, akciğer, böbrek kanserleri için bevacizumab faz III klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir (163). Uygulamalar sırasında en sık bildirilen yan etki hipertansiyondur. Tümör dokusunda oksijenizasyon ve besin yoksunluğuna yol açarak ve anormal damarlanma üzerinde geçici bir düzelme sağlayarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Bu nedenle neovaskülarizasyon ve ödeme giden oküler hastalıklarda da etkili olabileceği düşünülmüştür.

Bevacizumabın henüz oküler hastalıkların tedavisinde kullanım ruhsatı olmamasına rağmen VEGF'un anjiogenezdeki merkezi rolü, onu çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda; yaşa bağlı makula dejenerasyonu , anjioid streak, yüksek miyopiye sekonder gelişen koroidal neovasküler membran, retinal ven oklüzyonu, diabetik retinopati, korneal neovaskülarizasyon, neovasküler glokom ve prematür retinopatide olası bir tedavi seçeneği olarak hedef ajan haline getirmiştir (164).

Proliferatif diabetik retinopatili (PDR) hastalarda bevacizumabın vitrektomi öncesi intraoküler enjeksiyonu fibrovasküler proliferasyonu azaltır ayrıca intraoperatif hemoraji riskini azaltarak cerrahiyi kolaylaştırır (165). PDR'li hastalarda intravitreal bevacizumab enjeksiyonu diabetik vitreus hemorajisinin rezorpsiyonunu artırabilir (166). Santral retinal ven oklüzyonu veya retinal ven dal

oklüzyonuna sekonder maküler ödemli hastalarda intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun görme keskinliğini iyileştirdiği, maküler ödemi azalttığı ve toksisite işareti görülmediği rapor edilmiştir (167). Bevacizumabın neovasküler YBMD hastalarında ilk olarak intravenöz kullanımı gündeme gelmiştir. 2004 yılında başlatılan SANA (Systemic Avastin for Neovascular AMD) çalışmasının sonuçlarına göre 24 hafta sonunda bevacizumabın sistemik kullanımı hem görme keskinliği hem de anjiografi ve Optik Kohorens Tomografi (OCT) bulgularına göre etkili gibi gözükmektedir (168). Çoğunluğu retrospektif olan klinik çalışmalarda intravitreal bevacizumab enjeksiyon tedavisinin hem önceki tedavilere rağmen progresyon gösteren, hem de yeni tanı almış koroid neovasküler membranlarda (KNV) etkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda ucuz ve diğer anti-VEGF ajanlara göre daha uzun yarı ömürlü olması en büyük avantajıdır.

Küçük vaka serilerinde patolojik miyopi, anjioid streak veya korioretinal enflamasyona sekonder gelişen subfoveal koroidal neovasküler membranlı gözlerde intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun etkili ve güvenli olduğu rapor edilmiştir (169-171). Prematüre retinopatisi ve neovasküler glokomda yeni damar oluşumunda VEGF'in etkisi nedeniyle bevacizumab bu hastalıkların tedavisinde bir seçenek olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada prematüre retinopatisinde intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun neovaskülerizasyonu gerilettiği saptanmıştır (172).

Ehlers ve ark. (173) neovasküler glokomda panretinal fotokoagülasyonla intravitreal bevacizumab enjeksiyon kombinasyonunun, tek başına panretinal fotokoagülasyon yapılan gruba göre göz içi basıncını daha etkin ve daha hızlı düşürdüğünü göstermiştir. Yazdani ve ark. (174) neovasküler glokomu olan 2 hastada intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun kısa sürede göz içi basıncını önemli derecede düşürdüğünü ve neovaskülerizasyonu gerilettiğini belirtmiştir. Iliev ve ark. (175). intravitreal bevacizumabın neovasküler glokomda iris ve açıda neovaskülerizasyonu hızla gerilettiğini gözlemlemişlerdir.

Korneal neovaskülerizasyonda VEGF'in merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Korneal neovaskülerizasyonun inhibisyonunda bevacizumab kullanımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda subkonjonktival veya topikal bevacizumab uygulamalarının korneal neovaskülerizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (176-182).

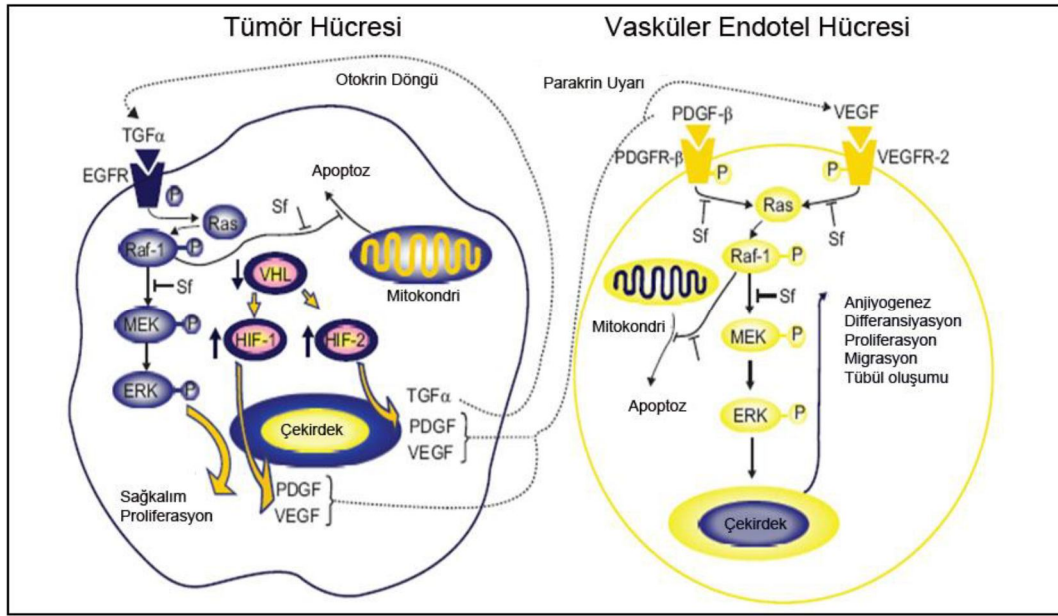
1.5. Sorafenib

Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) bir oral multikinase inhibitörüdür. Raf-1 ve B-Raf Serin-Treonin kinazları, Vasküler Endotelyal Growth Faktörü (VEGF) reseptörleri 1, 2 ve 3'ün ve Platelet-Derived Growth Faktör (PDGF) reseptörünü, KIT, RET ve FLT-3 (FMS-like tirozin kinaz) aktivitesini inhibe eder (183). Sadece bir tirozin kinazın inhibe edilmesi dahi, antineoplastik etkiye sahipken, birden çok tirozin kinaz inhibisyonuna sahip olan bir ilaç daha etkili olabilir.

Sorafenib, RAF-MEK-ERK yolağı ve VEGF sinyal yolağını hedefleyerek, tümör hücre proliferasyonunu ve tümör anjiyogenezini engeller. Ayrıca çok sayıda tümör modelinde apoptoz hızını arttırdığı (184). Bunun yanında ileri evre hepatosellüler kanser ile metastatik renal hücreli kanserde sağkalım süresini arttırdığı gösterilmiştir (185, 186).

Tümör gelişmesinde hücre çoğalması, apoptozun baskılanması ile tümör yayılımı ve metastazı gibi süreçler aktive olmuş tirozin kinaz reseptörünün tetiklediği sinyal yolları tarafından yönetilir. Bir protoonkogen olan Ras, tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılmasına yardımcı olur. Bu nedenle önceden de belirtildiği gibi Ras sinyal yolağının aktivasyonu, insanda kanser gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Ras'ın Raf/Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) Mitojen ekstrasellüler sinyal regüle eden kinaz (MEK)/ekstrasellüler sinyal tarafından regüle edilen kinaz (ERK) gibi sinerjistik etki gösteren çeşitli yolları idare ederek hücre dönüşümünde etkili olduğu bilinmektedir (183, 187, 188) . Raf kinazlar, GSK-3 β gibi serin/treonin kinaz ailesindendir ve Ras moleküllerinin aktive olmasını sağlarlar (189). Raf kinaz ailesinin 3 üyesi bulunmaktadır; A-Raf, B-Raf, Raf-1. Tümör hücreleri aşırı miktarda VEGF ve PDGF- β gibi bazı büyüme faktörleri ve sitokinler salgılar. Bunların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanması, Raf/MEK/ERK yollarını aktive eder, bunun sonucunda da anjiyogenez ve lenfanjiyogenez görülür (190). Raf kinazlar, VEGF ve PDGF- β tümör gelişmesinin ve anjiogenezin engellenmesinde potansiyel moleküler tedavi hedefleridir (191) . Sorafenib; Raf-1 ve B-Raf Serin-Treonin kinazları, Vasküler Endotelyal Growth Faktörü (VEGF) reseptörü 1, 2 ve 3'ün tirozin kinaz aktivitesini ve Platelet-Derived Growth Faktör (PDGF) reseptörünü, KIT, RET ve FLT-3 aktivitesini inhibe ederek (183) antitümör ve antianjiyogenik etki gösterir (Şekil 4).

Sorafenib'in özellikle ileri evre karaciğer kanseri ve böbrek kanseri başta olmak üzere farklı kanserlerdeki etkisini araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. FDA (United States Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi) Aralık 2005'de Sorafenib'in böbrek ve karaciğer kanserinde kullanılması için kısa sürede onay vermiştir. Ayrıca tiroid kanserinde etkili olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (192). Günümüzde de diğer bazı kanserler üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmaktadır (192,193). Fakat sorafenib'in kornea neovaskülarizasyonuna yönelik in vitro çalışma mevcut iken in vivo çalışma yapılmamıştır.



Şekil 4. Sorafenib'in etki mekanizması.

Sorafenib ikili etki göstererek tümörde ve tümör damarlarında Raf-1 dahil Raf kinazları ve vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 2 ve 3 (VEGFR 2,3) Platelet-Derived Growth Faktör reseptörü (PDGFR) gibi tirozin kinaz reseptörlerini inhibe eder (Sf: Sorafenib).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile Göz Hastalıkları, Biyokimya Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları ortalama 250-300 gram olan 42 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Ratlar her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize altı gruba ayrıldı. Ratların beslenmelerini sürdürebilmeleri için sadece sağ kornealarında kimyasal yanık oluşturuldu. Topikal tedaviye yanık işleminden 60 dakika sonra başlandı ve 7 gün devam edildi.

Gruplar:

- 1. Grup (Kontrol):** Yanık yapılmayan ve herhangi bir tedavi verilmeyen grup
- 2. Grup (Sham):** Yanık yapılan deneklere serum fizyolojiktan hergün 3x1 damla damlatıldı ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.
- 3. Grup (Bevacizumab 5 mg/ml):** Yanık yapılan deneklere 5 mg/ml bevacizumab (Altuzan 100mg/ml ampul, Bristol Myers Squibb Co, Princeton, NJ, ABD) solüsyonundan her gün 3x1 damla damlatıldı ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.
- 4. Grup (Sorafenib 2,5 µg/ml):** Yanık yapılan deneklere 2,5 µg/ml sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) solüsyonundan her gün 2x1 damla damlatıldı ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.
- 5. Grup (Sorafenib 5 µg/ml):** Yanık yapılan deneklere 5µg/ml sorafenib solüsyonundan her gün 2x1 damla damlatıldı ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.
- 6. Grup (Sorafenib 7,5 µg/ml):** Yanık yapılan deneklere 7,5 µg/ml sorafenib solüsyonundan her gün 2x1 damla damlatıldı ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı.

2.1. Anestezi Tekniği

Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 50 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi

deneklerin kornealarına % 0.5'lik proparakain hidroklorid (Alcaine, Alcon, Fort Worth, Texas, ABD) damlatıldı.

2.2. Cerrahi Teknik

Korneal yanık ve neovaskülarizasyon oluşturmak için Mahoney ve Waterbury tarafından tarif edilen gümüş nitrat ile koterizasyon tekniği uygulandı. Anestezi ve analjezi uygulanan kontrol grubunun dışındaki deneklerin sağ kornea santraline % 75 gümüş nitrat ve % 25 potasyum nitrat içeren (Nitrate D'argent; Botafarma, Ankara, Türkiye) kalemle 10 saniye süresince koter yapılarak 2 milimetre genişlikte kimyasal yanık oluşturuldu. Yanık sonrası denek kornea ve forniksleri 5 cc SF ile yıkanarak artık kimyasallar uzaklaştırıldı.

Yanık skorları; oluşan yanığın kabarıklığına göre 0 (kornea yüzeyinde kabarma yok), +1 (kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık), +2 (kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık), +3 (kornea yüzeyinde büyük kabarıklık) şeklinde derecelendirildi. +2 ve üstü yanık skoru oluşan ratlar deneye dahil edildi. Deney süresi tamamlanan ratlara anestezi altında dekapitasyon ve enükleasyon uygulandı.

2.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi

Rat korneaları X40 büyütmede yarıklı lamba mikroskopuna monte edilmiş Sony dijital kamera (CCD-IRIS model DXC 107 AP) kullanılarak fotoğraflandı. Fotoğraf üzerinde neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektrik Elektronik Bölümü'nün katkılarıyla MATLAB R2007b version 7.5. (MathWorks, Natick, Massachusetts, ABD) programı kullanılarak hesaplandı.

2.4. VEGF ve PDGF İmmünohistokimyasal Boyanması

İmmünohistokimyasal boyama için kornea santralinden geçen, limbustan limbusa uzanan, yanık alanını içeren, beş mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler VEGF ve PDGF (Rat VEGF ve PDGF, Santa Cruz, Texas USA) kullanılarak otomatik immunohistokimyasal boyama cihazı (Ventana, Benchmark XT) yardımıyla boyandı.

Preparatlar Olympus marka ışık mikroskobu ile randomize olarak incelendi. Aynı mikroskobun fotoğraf ataçmanı ile dokuların ve x400 büyütmede dijital fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal boyamada VEGF ve PDGF antikoru ile boyanan korneal boyanma yaygınlık ve şiddetleri semikantitatif olarak tablodaki gibi değerlendirildi (Tablo 4).

Tablo 4. VEGF ve PDGF ekspresyonunun skorlanması

VEGF/PDGF EKSPRESYONU	KORNEAL BOYANMA
+	Zayıf boyanma
++	Zayıf-orta şiddetli boyanma
+++	Kuvvetli boyanma

2.5. VEGF ve PDGF ELISA Yöntemi İle Protein Düzeyi Ölçümü

Donmuş kornea doku örnekleri tartıldı ve proteaz ve fosfataz inhibitör içeren Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) lizis buffer içinde çözündürüldü. Dokuların gramı başına 3 ml RIPA lizis buffer kullanıldı. Proteaz ve fosfataz inhibitörü olarak dokunun gramı başına 10 mg/ml fenilmetil sülfonil florit (PMSF) stokundan 10 µl, sodyum ortovanadattan 10 µl, proteaz inhibitör kokteylinden 10 µl olacak şekilde eklendi. Tüm prosedürler +40C’de sürdürüldü ve ardından üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde Bullet Blender doku Homojenizatörü (Next Advanced Inc, Averill Park, NY) kullanılarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenize örnekler +40C’de 10000xg’de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatantı alındı ve tekrar santrifüj edilerek temiz bir lizat oluşturuldu. Elde edilen lizattan VEGF ve PDGF düzey ölçümleri eLabscience marka kit ile kit prosedürüne uygun olarak ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi

2. 6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları alındı. Çalışmanın istatistiksel analizi, Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 17 (SPSS for Windows versiyon 17) paket programı ile yapıldı. Gruplararası ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0.05’den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması

Gruplar arasında neovaskülarizasyon alanlarının yüzdeleri karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.01$)

Tablo 5. Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelерinin ortalama ve standart sapma değeri

Grup	Neovaskülarizasyon Alanı (%) (Ort.± SD)
Grup 1	0,00±0,00
Grup 2	66,5500±7,12 ^{a*}
Grup 3	17,7143±2,04 ^{a*b*d*}
Grup 4	27,0900±3,54 ^{a*b*}
Grup 5	15,2871±2,99 ^{a*b*d*}
Grup 6	15,7443±2,07 ^{a* b*d*}

a Kontrol grubuna göre,

b Sham grubuna göre,

c Bevacizumab grubuna göre,

d Sorafenib 2,5 µg/ml grubuna göre,

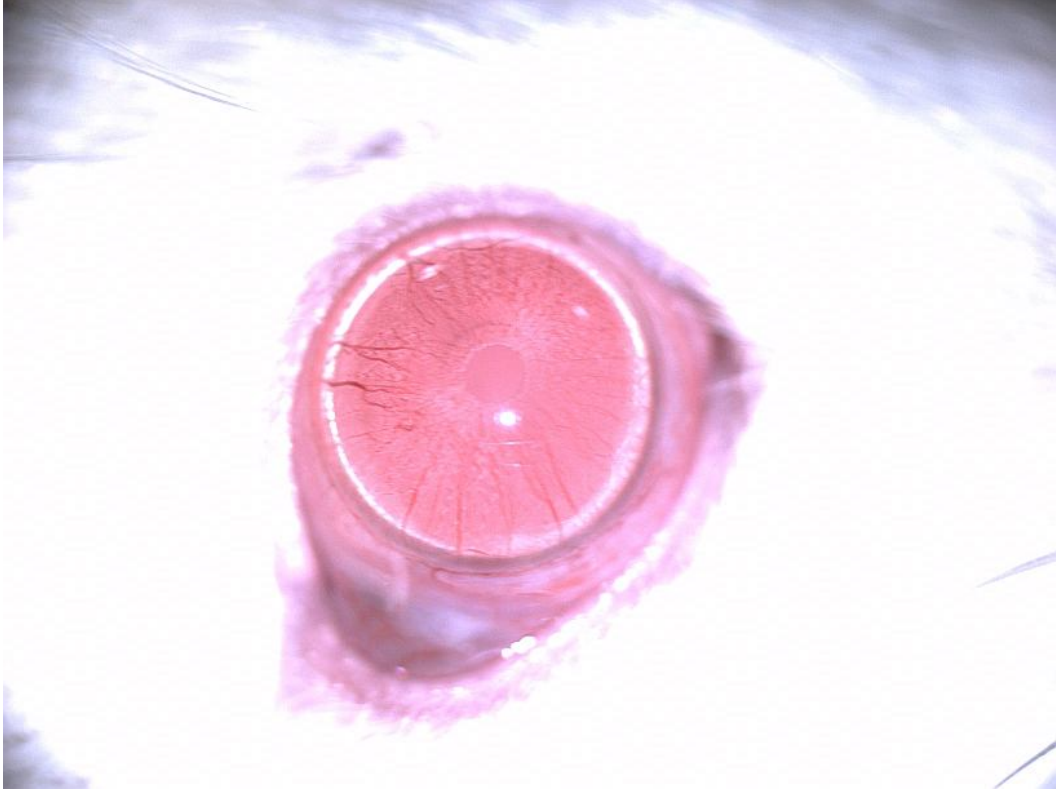
e Sorafenib 5 µg/ml grubuna göre,

f Sorafenib 7,5 µg/ml grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

(* = $p<0.05$)

Gruplardaki neovaskülarizasyon hesaplanması aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 5,6,7).

Kontrol grubundaki neovaskülarizasyon alanının, sham ve tedavi gruplarına göre anlamlı düşük olduğu görülürken ($p<0.01$), tedavi gruplarının tümünde sham grubundan anlamlı ölçüde düşük olduğu tesbit edildi ($p<0.05$).Tedavi grupları arasında grup 4'ün neovaskülarizasyon alanlarını diğer tedavi alan gruplara göre daha az neovaskülarizasyonu geriletği gözlemlenmiştir ($p<0.05$).Grup 3,grup 5 ve grup 6 arasında neovaskülarizasyon alanları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

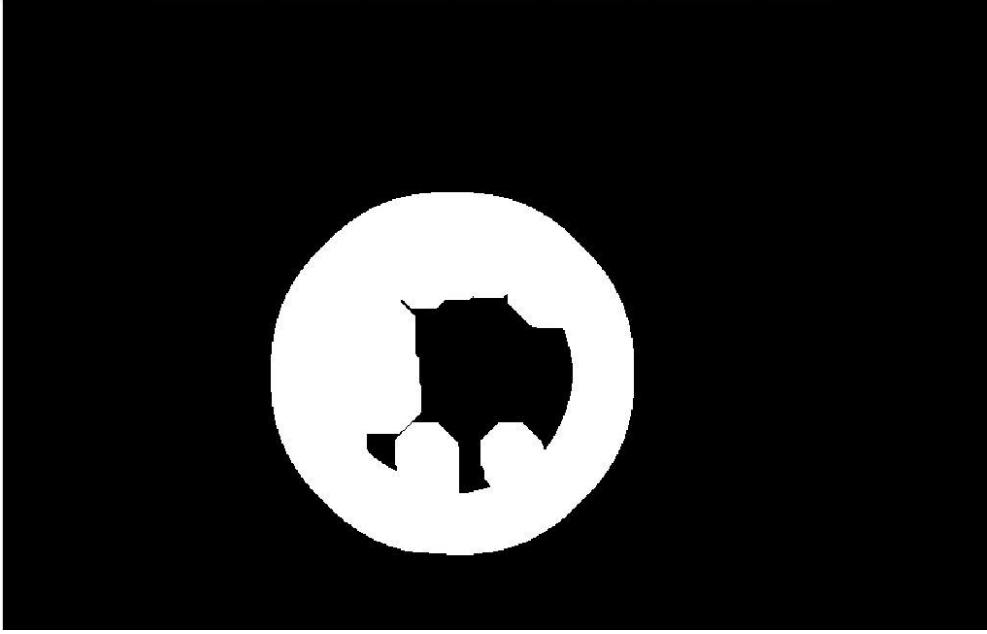


Şekil 5. Sham grubundaki ratın kornea neovaskülarizasyonu



Şekil 6. Sham grubundaki neovaskülarizasyonun negatif görüntüsü

TOPLAM NEOVASKULARIZASYON ALANI / TOTAL KORNEA ALANI=%81.1



Şekil 7. Sham grubundaki neovaskülerizasyon oranının MATLAB R2007b version 7.5. ile hesaplanması

3.2. Korneal VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması

Vasküler endotelial growth faktör immünohistokimyasal boyanması özellikle neovaskülerizasyon alanında vasküler endotel tabakasındaki boyanmaya göre skorlama yapıldı (Tablo 6).

Tablo 6. Gruplardaki VEGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.

Grup	VEGF Boyanma Skoru (Ort.± SD)
Grup 1	1,00
Grup 2	3,00 ^{a*}
Grup 3	1,14±0,38 ^{b*d*}
Grup 4	2,14±0,38 ^{a*b*}
Grup 5	1,14±0,38 ^{b*d*}
Grup 6	1,00 ^{b*d*}

a Kontrol grubuna göre,

b Sham grubuna göre,

c Bevacizumab grubuna göre,

d Sorafenib 2,5 µg/ml grubuna göre,

e Sorafenib 5 µg/ml grubuna göre,

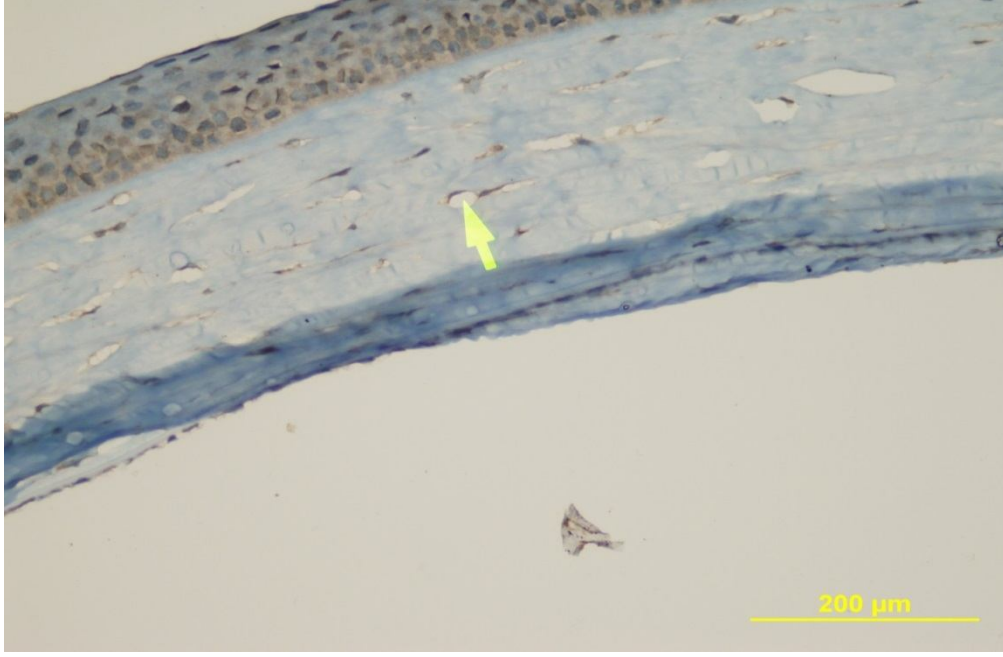
f Sorafenib 7,5 µg/ml grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (* = p<0.05)

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların VEGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p=0.01$). Grup 3'teki VEGF boyanma düzeyi, Grup 2'den anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p<0.01$), grup I ile farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup 4'te sham grubundan anlamlı ölçüde düşük VEGF boyanma düzeyi tespit edildi ($p<0.05$). Yine grup 5 ve grup 6'da sham grubundan anlamlı ölçüde düşük VEGF boyanma düzeyi tespit edildi ($p<0.05$). Ancak grup 3, grup 5 ve grup 6 arasında anlamlı bir fark yoktu ($p<0.05$) ve kontrol grubuyla aralarında anlamlı bir fark yoktu ($p<0.05$).

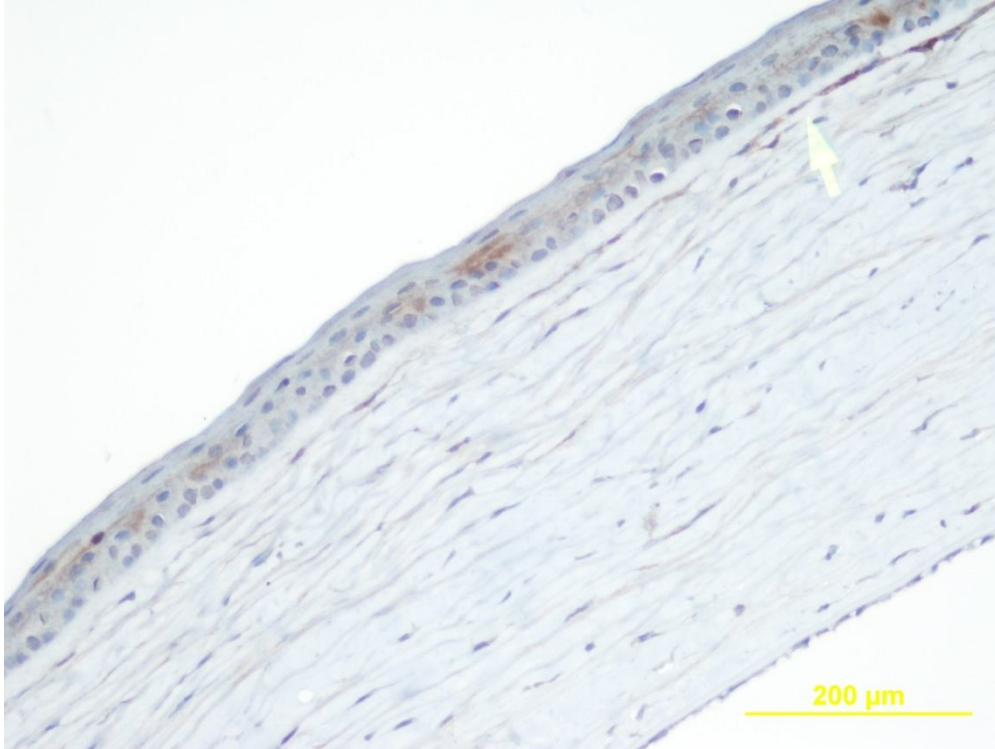
Gruplardaki kornea vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyanması aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 8,9,10,11,12,13)



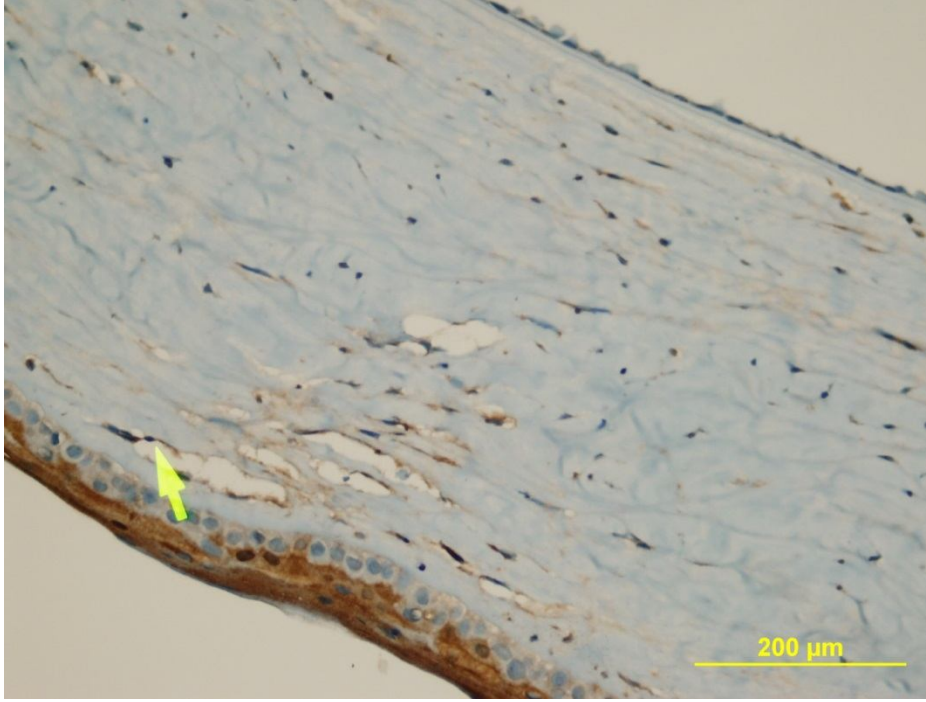
Şekil 8. Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Neovasküler alanın olmayışı ve VEGF ile boyanma olmadığı görülmüştür.



Şekil 9. Sham grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



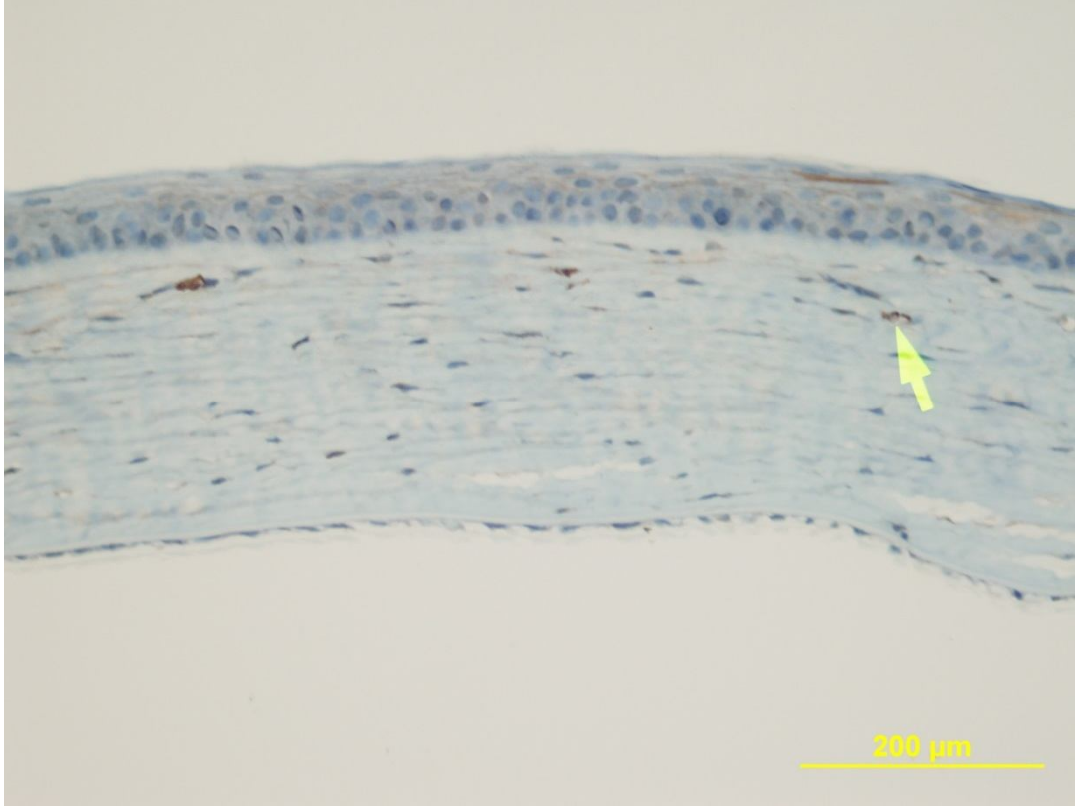
Şekil 10. Bevacizumab grubundaki bir rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



Şekil 11. Sorafenib 2,5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



Şekil 12. Sorafenib 5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



Şekil 13. Sorafenib 7,5 µg/ml grubundaki bir rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)

3.3. Korneal PDGF İmmünohistokimyasal Boyanması

Platelet-derived growth faktör immünohistokimyasal boyanması özellikle neovaskularizasyon alanında vasküler endotel tabakasındaki boyanmaya göre skorlama yapıldı (Tablo 7).

Tablo 7. Gruplardaki PDGF immünohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.

Grup	PDGF Boyanma Skoru (Ort. $\pm$ SD)
Grup 1	1,00
Grup 2	2,85 $\pm$ 0,38 a*
Grup 3	1,14 $\pm$ 0,38 b*
Grup 4	1,57 $\pm$ 0,53 b*
Grup 5	1,00 b*
Grup 6	1,00 b*

a Kontrol grubuna göre,

b Sham grubuna göre,

c Bevacizumab grubuna göre,

d Sorafenib 2,5 μ g/ml grubuna göre,

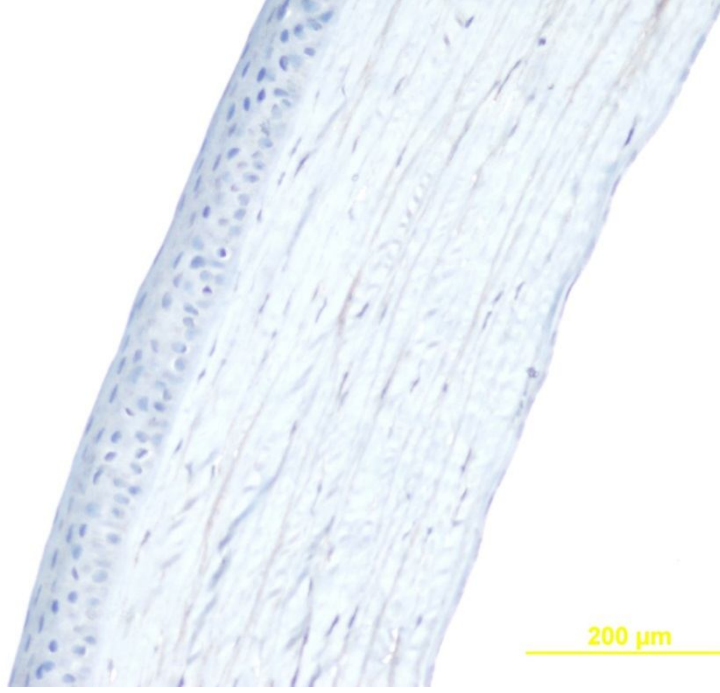
e Sorafenib 5 μ g/ml grubuna göre,

f Sorafenib 7,5 μ g/ml grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

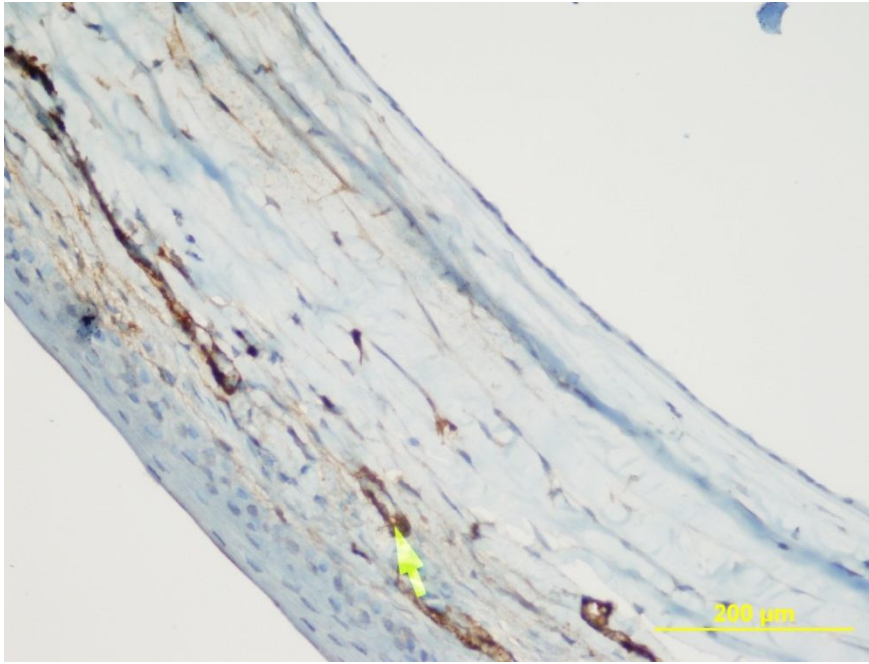
(* = $p < 0.05$)

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların PDGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p=0.01$). Grup 3'teki PDGF boyanma düzeyi, Grup 2'den anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p < 0.05$), grup I ile farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). Grup 4'te sham grubundan anlamlı ölçüde düşük PDGF boyanma düzeyi tespit edildi ($p < 0.05$). Yine grup 5 ve grup 6'da sham grubundan anlamlı ölçüde düşük PDGF boyanma düzeyi tespit edildi ($p < 0.05$). Ancak grup 3, grup 5 ve grup 6 arasında anlamlı bir fark yoktu ($p < 0.05$) ve kontrol grubuyla aralarında anlamlı bir fark yoktu ($p < 0.05$). Yine grup 4'ün grup 3, grup 5 ve grup 6 arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$).

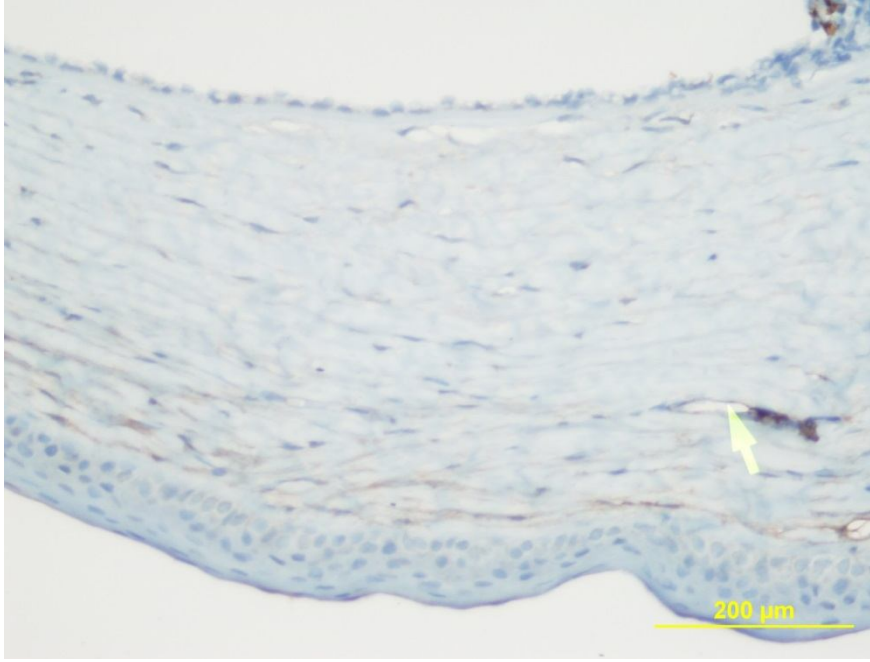
Gruplardaki kornea vasküler endotelin PDGF immünohistokimyasal boya ile boyanması aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. (Şekil 14,15,16,17,18,19)



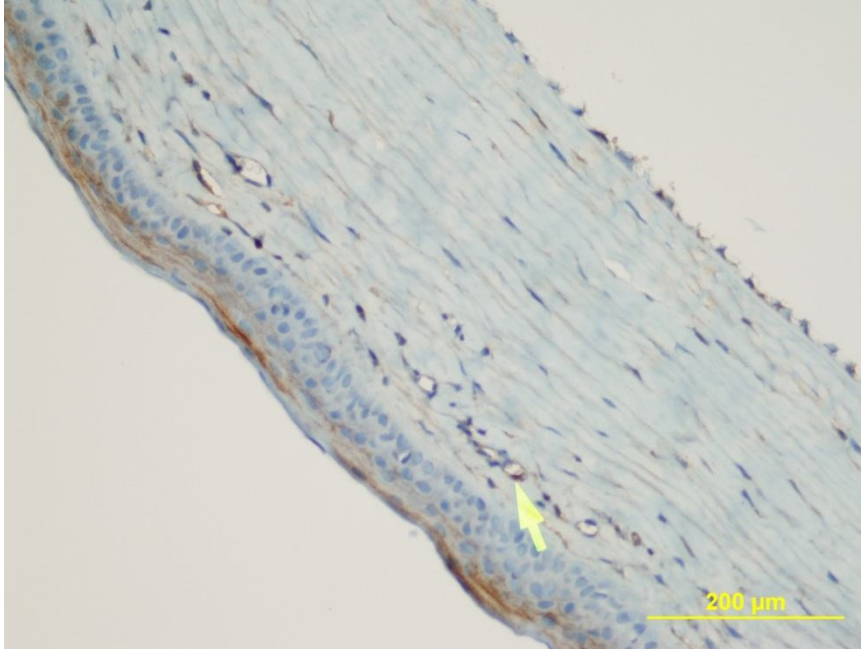
Şekil 14. Kontrol grubundaki rat korneasının PDGF immünohistokimyasal boyanması. Neovasküler alanın olmayışı ve PDGF ile boyanma olmadığı görülmüştür.



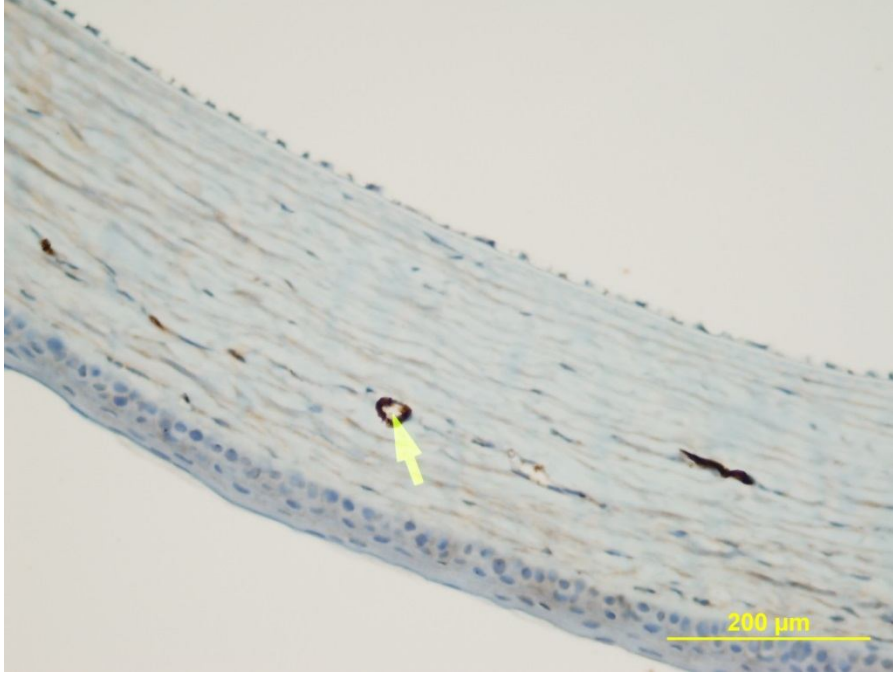
Şekil 15. Sham grubunda yanık yapılan rat korneasının PDGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin PDGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



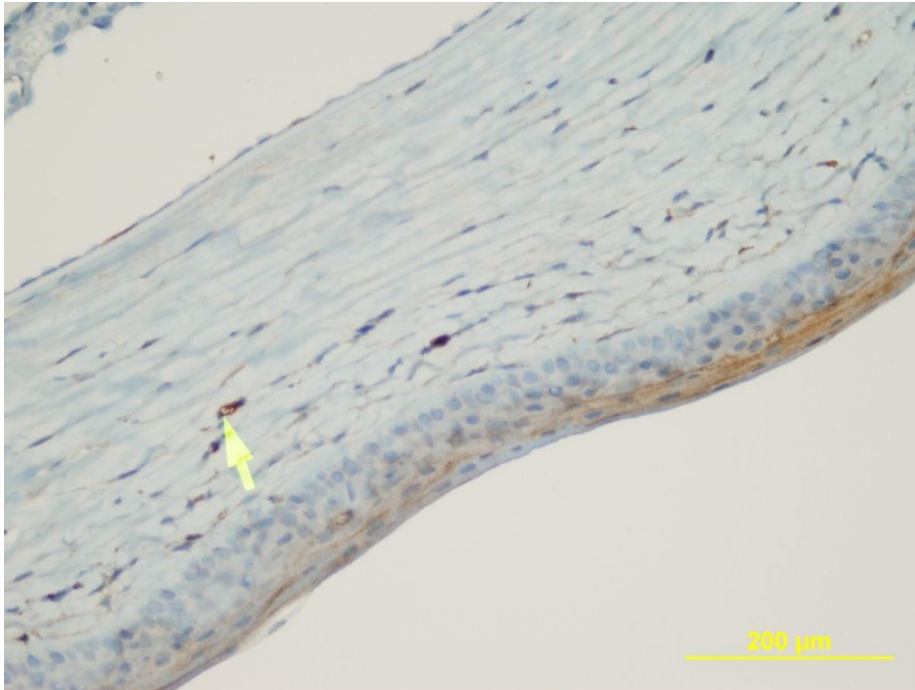
Şekil 16. Bevacizumab grubundaki bir rat korneasının PDGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin PDGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



Şekil 17. Sorafenib 2,5 $\mu\text{g/ml}$ grubundaki bir rat korneasının PDGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin PDGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



Şekil 18. Sorafenib 5 $\mu\text{g/ml}$ grubundaki bir rat korneasının PDGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin PDGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)



Şekil 19. Sorafenib 7,5 $\mu\text{g/ml}$ grubundaki bir rat korneasının PDGF immünohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin PDGF immünohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir. (Okla işaretli alan)

3.4. Korneal VEGF ELISA Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda ELISA yöntemi ile ölçülen VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 8).

Tablo 8. Gruplardaki korneal VEGF ELISA düzeyleri ve standart sapma değerleri

Grup	VEGF ELISA DüzeyleriPg/Protein(Ort.± SD)
Grup 1	39,1±6,97
Grup 2	70,29±25,18 a*
Grup 3	37,81±13,70 b*
Grup 4	48,49±15,68
Grup 5	35,18±10,72 b*
Grup 6	42,35±14,35 b*

a Kontrol grubuna göre,

b Sham grubuna göre,

c Bevacizumab grubuna göre,

d Sorafenib 2,5 µg/ml grubuna göre,

e Sorafenib 5 µg/ml grubuna göre,

f Sorafenib 7,5 µg/ml grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

(* = p<0.05)

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında grup 1'deki korneaların VEGF ELISA düzeyleri grup II'den anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü(p<0.05). Grup 3'teki VEGF ELISA düzeyleri, sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken (p<0.05), grup 4'te ise sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.05).Yine Grup 5'teki VEGF ELISA düzeyleri, sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken (p<0.05),grup1, grup 3 ve grup 4 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.05).Grup 6'daki VEGF ELISA düzeyleri, sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken (p<0.05), grup1, grup 3, grup 4 ve grup 5 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p>0.05).

3.5. Korneal PDGF ELISA Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda ELISA yöntemi ile ölçülen PDGF düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$)(tablo 9)

Tablo 9 . Gruplardaki korneal PDGF ELISA düzeyleri ve standart sapma değerleri

Grup	PDGF ELISA Düzeyleri Pg/Protein (Ort.± SD)
Grup 1	64,5493±26,18390
Grup 2	128,907±75,50284
Grup 3	57,4672±36,71713
Grup 4	84,7211±21,05057
Grup 5	63,0203±30,02218
Grup 6	84,8311±61,32616

(* = $p<0.05$)

4. TARTIŞMA

Korneada yeni ve kontrolsüz damar gelişimi birçok korneal hastalığın patogeneğinde çok önemlidir. Ayrıca bu hastalıkların tedavi yönetimleri problemlidir ve sonuçta körlüğe kadar gidebilen sonuçlara neden olabilmektedirler. Travma, kimyasal yanık, kontakt lens kullanımı ile oluşan hipoksi, enfeksiyon ve dejeneratif hastalıklar gibi nedenler avasküler yapıdaki korneada vaskülarizasyona yol açabilirler. Korneadaki yeni damar oluşumunu önleyecek, durduracak veya geciktirecek tedavi modalitelerine ihtiyaç vardır.

Yapılan çalışmalarda, korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kortikosteroidler, nonsteroid antienflamatuarlar, siklosporin A, somatostatin analogları, askorbik asit, talidomid, rapamisin ve metotreksatin kullanıldığı bildirilmektedir (20, 30, 181, 194-199). Ayrıca laser fotokoagülasyon, diatermi ve fotodinamik tedavi gibi yöntemler de korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kullanılmaktadır (200-202).

Hipoksik ortamda, endotel hücrelerinden oldukça fazla düzeyde salgılanan VEGF, sadece pro-anjiogenik faktör olarak değil aynı zamanda güçlü bir trofik faktör, yani damar endotel ve bazal membranlarını uyararak hasarlı ve/veya sağlıklı konumdaki normal hücre fonksiyonlarının yenilenmesini de sağlar (203). Bazı araştırmacılar (204), alkali yanıklarında humor aközde VEGF düzeylerinde artış bulmuşlardır. Alkali yanıklarında görülen ve altta yatan endotelial harabiyetin asıl nedeninin, iskemiden kaynaklanan büyüme faktörünün enflamatuvar sitokinleri aşırı arttırarak NO düzeyini değiştirip damarsal enflamasyona yol açması olarak ifade edilmiştir. Keza, neovaskülarizasyon esnasında anjiogenik faktörlerde artış anti anjiogenik faktörlerde ise azalış görülür (205). Bizde çalışmamızda korneal yanığı gümüş nitrat ile koterizasyon tekniğini kullanarak uyguladık.

Vasküler endotelial growth faktörün salınımında en güçlü uyaranlar enflamasyon ve hipoksidir. VEGF, tavşanlarda kornea neovaskülarizasyonunu tetikleyen önemli bir etken olarak tespit edilmiştir (12). Deneysel hayvan çalışmalarında VEGF antagonistlerinin hem kornea neovaskülarizasyonunda azalmaya hem de kornea greft ömründe azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (207, 208).

Büyüme faktörleri korneal yeni damar oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bunlardan VEGF, doğrudan damar endoteli üzerinde etkili olduğu için büyük öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda neovaskülarizasyon süresince, anjiogenik faktörlerin arttığı, anti anjiogenik faktörlerin ise azaldığı gösterilmiştir (209). VEGF, makrofajlar, T

hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, düz kas hücreleri ve tümör hücrelerinden başta hipoksi olmak üzere, çeşitli çevresel faktörlerin uyarısı ile salgılanır (210). Korneanın enflamatuvar hastalıkları, kontakt lens kullanımı, hipoksi, kimyasal travmalar ve keratitler gibi gözle ilgili birçok klinik durumda VEGF salınımının arttığı gösterilmiştir (211). İnsan kornealarında neovaskülarizasyon gelişimi durumunda, hem VEGF, hem de VEGF reseptör düzeylerinin normalden daha fazla olduğu bulunmuştur (212). VEGF₁₆₅, gözdeki neovaskülarizasyonla en çok ilişkili olan VEGF-A'nın bilinen altı izoformundan birisidir (213).

Bevacizumab, insan VEGF-A'sına spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal IgG1 antikorudur. Bevacizumab, VEGF-A'nın bütün izoformlarına bağlanarak neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir (214). Bevacizumab, korneal neovaskülarizasyonda topikal, subkonjonktival ve sistemik olarak değişik konsantrasyon ve sürelerde kullanılmıştır.

Hosseini ve ark tarafından tavşanlarda NaOH ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyon modelinde subkonjonktival bevacuzimabın etkinliğini değerlendirmek için iki grup oluşturulmuş; birinci gruba alkali yanığı takiben hemen 2,5 mg tek doz subkonjonktival bevacuzimab, ikinci gruba ise 2,5 mg tek doz subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu uygulanmıştır. Üç haftalık deney süresinin sonunda tedavi grubunda kontrol grubuna göre korneal neovaskülarizasyonun %32 daha az olduğu saptanmıştır. Papathanassiou ve ark tarafından tavşanlarda NaOH ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda, subkonjonktival bevacuzimabın etkinliği araştırılmıştır. Erken ve geç olarak iki tedavi grubu, bir de kontrol grubu olmak üzere üç grup oluşturulmuş, birinci gruba koterizasyondan hemen sonra (3,75 mg) tek doz subkonjonktival bevacuzimab, ikinci gruba koterizasyondan sonraki ondördüncü gün (3,75mg) tek doz subkonjonktival bevacuzimab, kontrol grubuna ise ondördüncü gün subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu yapılmıştır. Deney sonunda korneal neovaskülarizasyon, birinci ve ikinci grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az bulunmuştur. Erken tedavi grubunda, geç tedavi grubuna göre daha az korneal neovaskülarizasyon saptanmıştır.

Manzano ve ark. (217) tarafından ratlarda yapılan ve yedi gün süren bir çalışmada, gümüş nitrat-potasyum nitrat kullanılarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyonda, günde iki kez topikal uygulanan 4mg/ml'lik bevacizumabın etkinliği, günde iki kez topikal uygulanan %0.9'luk NaCl çözeltisi ile karşılaştırılmış, yedinci gün fotoğrafik olarak yapılan değerlendirme sonucunda topikal bevacizumab

grubunda vaskülarize alan ortalama 38.2 ± 15.5 , kontrol grubunda ise 63.5 ± 5.0 olarak daha düşük bulunmuştur. Wilner ve ark yaptıkları korneal neovaskülarizasyon modelinde, kimyasal hasarı takiben gruplara sırasıyla 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml bevacizumab ve kontrol grubuna ise %0.9'luk NaCl çözeltisi damlatmışlardır (günde iki kez). Sekiz günlük deney sonunda grup bir ve ikide kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda korneal neovaskülarizasyonda azalma saptanmışken histopatolojik değerlendirmede ise sadece birinci grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmıştır.

Topikal bevacizumab tedavisinin pozolojisi konusunda farklı görüşler mevcuttur. Çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 12.5 mg/ml ve 25 mg/ml gibi farklı konsantrasyonlarda topikal bevacizumab kullanılmıştır (34, 194, 217—220).

Habot-Wilner kimyasal yanıkla korneal neovaskülarizasyon oluşturulan ratlarda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml) ve günde iki kez uygulanan topikal bevacizumab tedavilerini karşılaştırmıştır. Sonuç olarak 4 mg/ml konsantrasyonunun yeterli olduğunu diğer konsantrasyonların etkisiz kaldığını bildirmiştir (34). DeStafeno iki hastaya 6 ay boyunca günde 4 kez uyguladıkları 10 mg/ml konsantrasyonundaki topikal bevacizumab tedavisinin korneal neovaskülarizasyonu geriletmede başarılı olduğunu ve herhangi oküler yan etkiye rastlanmadığını bildirmiştir (221).

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde bevacizumabın diğer bir uygulama şekli de topikal yolla uygulamadır. Koenig çeşitli oküler hastalıklara sekonder gelişen korneal neovaskülarizasyon tedavisinde 5mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bevacizumab göz damlasını günde beş kez uygulamış ve korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda ve damar çapının azalmasında topikal bevacizumab uygulamasının etkili olduğu ve iyi tolere edildiği sonucuna ulaşmıştır (222). Bizde çalışmamızda bevacizumabı topikal olarak 5 mg/ml dozunda günde üç kez uyguladık.

Kim ve arkadaşlarının tavşanlarda yaptığı korneal neovaskülarizasyonda bevacizumabın etkinliği çalışmasında topikal ve subkonjonktival bevacizumab etkinliği kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve korneadaki VEGF düzeyleri ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre hem subkonjonktival hem de topikal bevacizumab uygulanan gruplarda VEGF düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı

bir şekilde düştüğü tespit edilmiştir. Ancak topikal ve subkonjonktival bevacizumab uygulamaları arasında VEGF düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (223)

Kim ve arkadaşları (224) toplam 20 adet tavşan üzerinde, Schmidt ve ark. (225) kullandığı yöntemi modifiye ederek, korneal dikiş yöntemini kullanıp elde ettikleri anjiyogenez modelinde deneylerin hemen ardından ve bir hafta sonra uyguladıkları iki doz 5mg/ 0.2ml bevacizumabın korneal anjiyogenezin inhibisyonundaki rolünü incelemişler.

Çalışmada immunohistokimyasal olarak korneal dokunun VEGF ekspresyonunu ve CD31 immünpozitif vasküler endotel hücrelerini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu ile bevacizumab grubunun karşılaştırılmasında, bevacizumab uygulanan grubun anjiyogenezi inhibe ettiği, ayrıca VEGF ekspresyon düzeyinin düştüğü kaydedilmiştir.

Abdulgani Ahmed ve ark. (226) yapmış olduğu bir çalışmada, alkali yanık modeli Ormerod ve Abelson (227)'un modifikasyonu ile elde edilmiş olan tavşan anjiyogenez modelinde bevacuzimabın subkonjonktival etkisini araştırmışlardır. Koterizasyonun ardından, tavşanlar 4 eşit gruba ayrılmıştır. Korneal anjiyogenezin değerlendirilmesi için, iki günde bir olmak üzere korneal görüntüler değerlendirilmiştir. Deneyin 14. gününde sakrifiye edilen tavşanların korneaları rutin doku takibinden sonra kesitler alınıp incelenmiştir. İmmunhistokimyasal olarak CD31 ile boyanan kesitlerde damar sayımı yapılmıştır. Alkali yanık modeli oluşturulduktan sonra 3.günde korneal neovaskularizasyon klinik muayenede saptanmış olup, 9.günün sonunda birinci grupta anjiyogenez indeksi, kontrol grubuna göre düşük bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlılık 14. günde izlenmiştir. İkinci ve üçüncü grupta, anjiyogenez indeksi hem 9. hem de 14.günlerde kontrol grubuna nazaran daha düşük bulunmuştur. Birinci gruptaki anjiyogenez indeksi 9. ve 14. günlerde 2. gruptaki anjiyogenez indeksinden daha düşük çıkmıştır. Benzer şekilde üçüncü gruptaki anjiyogenez indeksi 9. Ve 14. günlerde birinci gruptan daha düşük bulunmuştur. İkinci ve üçüncü grup arasındaki anjiyogenez indeksindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Birinci, ikinci ve üçüncü gruplardan elde edilmiş olan kesitlerin histopatolojik incelenmesinde, damar sayısı açısından kontrol grubu ile kıyaslandığında daha düşük ve anlamlı bulunmuştur.

Son zamanlarda bevacizumabın korneal neovaskularizasyonda kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar da yayınlanmaya başlamıştır. Erdurmuş ve Totan, filamenter keratit ve keratopasti sonrası neovaskularizasyonu olan iki olguda, tek doz subkonjonktival bevacizumab uyguladıktan bir hafta sonra ilk olguda damarların tamamının, ikinci olguda ise küçük damarların kaybolduğunu, ancak ana damarların değişmediğini göstermiş, üç aylık takip sonucunda ise her iki olguda da neovaskularizasyonun tekrarlamadığını bildirmişlerdir (109).

Bock ve ark konvansiyonel tedaviye rağmen devam eden progresif korneal neovaskularizasyona sahip 5 hastaya 5mg/ml konsantrasyonunda topikal bevacizumab ortalama 3,6 ay süreyle kullanmışlardır. Sonuçta bu hastalarda bevacizumab herhangi bir korneal yan etkiye yol açmadan neovaskularizasyonda azalmaya sebep olmuştur (218).

Anti-VEGF tedavilerde VEGF inhibisyonu olmasına rağmen dokular kaçış mekanizması üreterek diğer yollarla PDGF, FGF gibi faktörlerle anjiogenezis devam ettiği görülebilmektedir (229-233).

Bizim çalışmamızda da kornea neovaskularizasyonuna uyguladığımız topikal bevacizumab alan gruptaki korneada VEGF düzeyi sham grubuna göre istatistiksel olarak düşmekle beraber PDGF düzeyinde ki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak yine çalışmamızda ki immunohistokimyasal incelemede topikal bevacizumab uygulanan grup sham grubuna göre VEGF ve PDGF ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik vardı.

Sorafenib bir oral multikinase inhibitörüdür. Raf-1 ve B-Raf Serin-Treonin kinazları, VEGF reseptörleri 1, 2 ve 3'ün ve PDGF reseptörünü, KIT, RET ve FLT-3 aktivitesini inhibe eder. Chung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada deneysel koroid neovaskularizasyonunda 30mg/kg/gün dozunda oral Sorafenib ile tedavi sonrası lezyonda %59 oranında gerileme gözlenmiştir (32).

Jeong Won Seo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada deneysel kornea neovaskularizasyonunda 30mg/kg/gün ve 60mg/kg/gün dozlarında oral Sorafenib ile tedavi sonrası korneal neovaskularizasyon alanlarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %44 ve %66 oranında gerileme izlenmiştir.(235). Bizde çalışmamızda daha önce göz hastalıklarında sorafenibin kullanılmadığı topikal yolla tedavi uyguladık.

Thiele ve arkadaşlarının yaptığı invitro çalışmada sorafenibin 7,5 µg/mL'ye kadar endotele toksik etki gözlenmemiştir (33). Bu nedenle bizde çalışmamızda 3

tedavi grubu oluşturarak 2,5 µg/mL, 5 µg/mL ve 7,5 µg/mL dozlarını gruplara uyguladık.

Platelet-Derived Growth Faktör 1970’li yılların son dönemlerinde plateletlerden, mezenşimal kök hücrelerini uyaran bir faktör olarak saflaştırılmıştır. Bundan sonraki 10-15 yıl içerisinde yapılan çalışmalarda PDGF’nin 2 tane (A ve B) geni olduğu, bu iki gen kombinasyonu ile üç tip (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB) PDGF varlığı öne sürülmüştür (236).

İki bin yılında üç ayrı çalışma tarafından bu ailenin bir üyesinin (PDGF-C) daha varlığı ortaya konulmuş olup (237), izleyen yıl içinde yapılan bir çalışmada da PDGF-D beşinci üye olarak ailedeki son yerini almıştır (238).

Platelet-Derived Growth Faktör -C’nin pek çok organ ve dokuda anjiyogenik etkisi izlenmektedir. Buna ilaveten PDGF-C’nin anjiyogenik etkisi aortik çember, koryoallantoik membran ve korneal anjiyogenez modellerinde VEGF ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu büyüme faktörünün anjiyogenik etkisinin özellikle endotel prekürsor hücreleri, kemik iliği hücreleri ve olgun vasküler hücrelerin üzerinde proliferatif, migratif ve differensiyatif düzeyde olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda, koroid, retina, ve korneal anjiyogenezde çeşitli hücreler üzerine etki ederek oldukça kritik roller üstlenir (239).

Bizim çalışmamızda da kornea neovaskülarizasyonuna uyguladığımız topikal bevacizumab alan gruptaki korneada VEGF düzeyi sham grubuna göre istatistiksel olarak düşmekle beraber PDGF düzeyindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak yine çalışmamızdaki immunohistokimyasal incelemede topikal bevacizumab uygulanan grup sham grubuna göre VEGF ve PDGF ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik vardı. Yine hem VEGF hem de PDGF inhibitörü olan sorafenib gruplarında da grup 4 hariç hepsinde VEGF düzeyi sham grubuna göre istatistiksel olarak düşmekle beraber PDGF düzeyinde ki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum sorafenibin reseptör düzeyinde etkili olup PDGF’nin üretimini etkilemediğinden ELISA ile ölçülen PDGF düzeylerini etkilememiş olabilir. Ancak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp hücre içi PDGF’yi etkileyerek immunohistokimyasal boyamada istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmuş olabilir.

Birçok patolojik süreç neticesinde meydana gelebilen korneal neovaskülarizasyon körlük potansiyeli olan korneal yüzey hastalığıdır. Korneal neovaskülarizasyonunun inhibisyonunu amaçladığımız çalışmamızda daha önceki çalışmalarda korneal neovaskülarizasyon inhibitör etkisi gösterilmiş olan topikal bevacizumabı literatürde topikal korneal neovaskülarizasyon etkisi çalışılmamış olan sorafenibin 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ve 7,5 µg/ml dozlarıyla korneal neovasküler inhibitör etkisini amaçladık.

Çalışmamızda Kontrol grubundaki neovaskülarizasyon alanının, sham ve tedavi gruplarına göre anlamlı ölçüde düşük olduğu görülürken, tedavi gruplarının tümünde sham grubundan anlamlı ölçüde düşük olduğu tesbit edildi. Tedavi grupları arasında sorafenib 2,5 µg/ml dozunun neovaskülarizasyon alanlarını diğer tedavi alan gruplara göre daha az gerilettiği gözlemlenmiştir. Bevacizumab, sorafenib 5 µg/ml ve sorafenib 7,5 µg/ml grupları arasında neovaskülarizasyon alanları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların VEGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü. Yine tedavi alan grupların hepsinde immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü. Ancak grup 4'ün korneaların VEGF immünohistokimyasal boyanmasının diğer tedavi gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Buda çalışmamızda sorafenib 2,5 µg/ml dozunun etkisinin diğer dozlara göre daha az olduğunu göstermiştir.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların PDGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü. Tedavi alan gruplarda ise PDGF immünohistokimyasal boyanmasının sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü. Tedavi alan gruplar arasında ise anlamlı bir farkın olmadığı görüldü.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların VEGF ELISA düzeyleri sham grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü. Tedavi alan gruplarda sorafenib 2,5 µg/ml dışındaki bütün grupların VEGF ELISA düzeylerinin sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü görülmüştür. Ancak bevacizumab, sorafenib 5 µg/ml ve sorafenib 7,5 µg/ml

arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Buda bize sorafenib 2,5 µg/ml dozunun diğer dozlara göre etkisiz olabileceğini göstermiştir.

Tüm bu parametreler sorafenibin 5 µg/ml ve 7,5 µg/ml dozlarının kornea neovaskülarizasyonunu inhibe etmede bevacizumab 5 mg/ml ile benzer şekilde etkili olduğunu göstermektedir. Bu etkisini PDGF'den ziyade VEGF üzerinden etki ederek gösterdiğini düşünmekteyiz. Sorafenibin 2,5 µg/ml kornea neovaskülarizasyonunu inhibe etmekte yeterince etkili olmadığını göstermektedir. Bu durum sorafenibin korneal neovaskülarizasyonu inhibe edici etkisinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Sorafenibin korneal neovaskülarizasyonunun etkisinin tam olarak ortaya konulabilmesi için ileri çalışmalara gerek vardır.

5. KAYNAKLAR

1. Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26: 1-37.
2. Reinhard T, D.F.P. Larkin. *Cornea and External Eye Disease* 2006; 7: 83-84.
3. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; 41: 275-313.
4. Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004; 79: 677-688.
5. Wilson SE, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1999; 40: 2185-2190.
6. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001; 45: 203-210.
7. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2514-2522.
8. Yin-Shan Ng, Krilleke D, David T. Shima. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research* 2006; 312: 527 – 537.
9. Quoc TH, Calvin JK. Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 1349-1357.
10. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 133–158.
11. Shiro A, Richard R, Masatoshi K, Michael T, Anthony PA. Requirement for Vascular Endothelial Growth Factor in Wound- and Inflammation-Related Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 18-22.

12. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82: 557-563.
13. Scholl S, Kirchhof J, Augustin AJ. Antivascular endothelial factors in anterior segment diseases. *Dev. Ophthalmol* 2010; 46: 133-139.
14. Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001; 75: 9828-9835.
15. Jousen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Stechschulte SE, Kirchhof B, Dartt DA, et al. VEGF dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 117-123.
16. Mendelson AD, Lo GG, Stock EL. Laser photocoagulation of feeder vessels in lipid keratopathy. *Ophthalmic Surg* 1986; 17: 502-508.
17. Goto S. Q-switched Nd: YAG laser treatment for corneal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 1992; 36: 291-300.
18. Yoon KC, You IC, Kang IS, Im SK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 390-395.
19. Benezra D, Griffin BW, Maftazir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1954-1962.
20. Wu PC, Liu CC, Chen C, Kou HK, Shen SC, Lu CY, et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241: 63-69.
21. Demir T, Celiker UÖ, Kükner A, Mogulkoc R, Celebi S, Celiker H. Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 1999; 77: 386-390.

22. Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical soluble tumor necrosis factor receptor type I suppresses ocular chemokine gene expression and rejection of allogeneic corneal transplants. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 1666-1671.
23. Becker MD, Kruse FE, Azzam L, Nobiling R, Reichling J, Völcker HE. In vivo significance of ICAM-1 dependent leukocyte adhesion in early corneal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 612-618.
24. Benelli U, Bocci G, Danesi R, Lepri A, Bernardini N, Bianchi F, et al. The heparan sulfate sulfoepoxide inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67: 133-142.
25. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4082-4085.
26. Bocci G, Danesi R, Benelli U, Innocenti F, Di Paolo A, Fogli S, Del Tacca M. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 205-212.
27. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2690-2694.
28. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46: 454-460.
29. Ambati BK, Jousen AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, et al. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 1063-1068.
30. Jousen AM, Kruse FE: Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 920-927.
31. Bahar I, Kaiserman I. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008; 27: 142-147.

32. Chung EJ, Yoo S, Lim HJ, Byeon SH, Lee JH, Koh HJ. Inhibition of choroidal neovascularisation in mice by systemic administration of the multikinase inhibitor, sorafenib. *Br J Ophthalmol* 2009; 93: 958-963.
33. Thiele S, Liegl RG, König S, Siedlecki J, Langer J, Eibl K, et al. Multikinase inhibitors as a new approach in neovascular age-related macular degeneration (AMD) treatment: in vitro safety evaluations of axitinib, pazopanib and sorafenib for intraocular use. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2013; 230: 247-254
34. Habet-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol*. 2010; 88: 862–867.
35. Hashemian MN, Z-Mehrjardi H, Moghimi S. Prevention of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with its topical form in experimental rats. *Ophthalmic Res* 2011; 46: 50–54.
36. Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 785-789.
37. Arfa RC. Grayson's Disease of the Cornea. St. Louise: Mosby Year Book 1991; 2: 25-32.
38. Özçetin H. Klinik Göz Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri 2003; 4: 62-63
39. Yanoff & Duker. *Ophthalmology*. 3. Baskı, Elsevier, 2008.
40. Nishida T. Cornea. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors, *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005: 3-26.
41. Cameron JG. Corneal reaction to injury. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors, *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005:115-131.
42. Tuli SS, Goldstein M, Schultz GS, Modulation of corneal wound healing. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors, *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. China: Elsevier Mosby, 2005:133-150.

43. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Regard G. Corneal collogens. *Pathol Biol* 2001; 49: 353- 363.
44. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edlerhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4: 671-677.
45. Agarwal S. *Textbook of Ophthalmology*. Vol II. Jaypee Company 2002; 3: 942-943.
46. Sevel D, Isaacs R. Are-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998;86: 178-207.
47. İrkeç MK. Gözyaşı tabakasının yapısı, biyokimyası, immünolojisi ve kontakt lensler. *Oftalmoloji* 1994; 1: 18-20.
48. Efron N, Carney LG. Oxygen levels beneath the closed eyelid. *Invesy Ophthalmol Vis Sci* 1979; 18: 93-100.
49. Newell FW. Anatomy of the cornea. *Ophthalmology, Principles and Concepts* 1992; 13: 8-13.
50. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endotehelium. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 69-94.
51. Nishida T, Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. Chine: Elsevier Mosby 2005: 3-26.
52. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol* 2003; 51: 5-15.
53. Zeiske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 1-7.
54. Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. *Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları* 2005; 2: 7-25.
55. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 401-408.
56. Lu PC, Ye H, Maede M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 20-27.

57. Dowd CJ, Cooney CL, Nugent MA. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *J Biol Chem* 1999; 74: 5236-5244.
58. Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2495-2500.
59. Jester JV, Petrol WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retina Eye Res* 1999; 18: 311-356.
60. Hassell JR, Birk DR. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010; 91: 326-335.
61. Matsuda M. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 443 -449.
62. Bednara J, Rodokanaki SA. Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 24: 149-153.
63. Iguchi I, Kamiyama K. Enhancing effect of platelet-derived growth factor on migration of corneal endothelial cells. *Cornea* 1995; 14: 365-371.
64. Philipp W, Göttinger W. Leukocyte adhesion molecules in diseased corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2449-2459.
65. Kaufman HE, Barron AB, McDonald MB, Waltman SR. Corneal trauma. *The Cornea* 1991; 22: 599-642.
66. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacol Ther* 1994; 63: 265-280.
67. Petroustos G, Guimaraes R, Giraud J, Poliques Y. Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1775-1778.
68. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1588-1593.

69. Rochels R. Animal experiment studies on the role of inflammation mediators in corneal neovascularization. *Doc Ophthalmol* 1984; 57: 215–262.
70. Sala A, Zarini S, Bolla M. Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63: 84–92.
71. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose, Miller D, Kublin C, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 640-643.
72. Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF. Wound healing. *Principles and practice of ophthalmology* 1980; 381-386.
73. Watanabe K, Frangieh G, Reddy CV, Kenyon KR. Effect of fibronectin on corneal epithelial wound healing in the vitamin A-deficient rat. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2159- 2162.
74. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 1983; 97: 1653-1657.
75. Frangieh G, Hayashi K, Teekhasaene C, Wolf G, Colvin RB, Gibson HK, Kenyon KR. Fibronectin and corneal epithelial wound healing in the vitamin-A deficient rat. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 567-571.
76. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Differential modes of action of fibronectin and EGF on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 1990; 145: 549-554.
77. Nishida T, Nakamura M, Mishima M, Otori T, Hikida M. Interleukin-6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch. Ophthalmol* 1992; 110: 1292-1294.
78. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol* 1983; 95: 353-358.
79. Jones, SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 2000; 19: 5558-5567.

80. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MaCauley S, Van Setten G, Chegini N. Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994; 8: 184-187.
81. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; 284: 31- 53.
82. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. *Exp Eye Res* 2001; 72: 511-517.
83. Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, et al. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1879-1882.
84. Chung JH, Fagerholm P. Treatment of rabbit corneal alkali wounds with human epidermal growth factor. *Cornea* 1989; 8: 122-128.
85. Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, Manabe R. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human EGF. *Invest Ophthalmol Vis. Sci* 1990; 31: 1773-1778.
86. Singh G, Foster CS. Epidermal growth factor in alkali-burned corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987; 103: 802-807.
87. Li D, Tseng SC. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997; 172: 361-372.
88. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 802-806.
89. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 1997; 65: 391-396.

90. Song QH, Klepeis V, Nugent MA, Trinkaus-Randall. TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Mol Pathol* 2002; 55: 164-176.
91. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994; 59: 63-72.
92. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong JW, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 625-637.
93. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J. Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res* 1994; 59: 385-392.
94. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor Messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res* 1999; 68: 377-397.
95. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retina Eye Res* 1999; 18: 293-309.
96. Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 779-802.
97. Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, Wilson SE. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res* 1997; 64: 501-504.
98. Welge-Lüssen U, May CA, Neubauer AS, Priglinger S. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 94-99.
99. Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6367-6372.

100. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 113-129.
101. You L, Kruse FE, Vilcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 692-702.
102. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1988; 338: 1174-1180.
103. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992; 153: 1-5.
104. Sotozono C. Second injury in the corneal. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 2000; 19: 155-159.
105. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGF beta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 2002; 75: 645-657.
106. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
107. Burger PC, Chandler DB. Experimental corneal neovascularization; biomicroscopic, angiographic and morphologic correlation. *Cornea* 1985; 4: 35-41.
108. Cogan DG. Corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; 1: 253-261.
109. Erdurmus M, Yagci R, Yilmaz B, Hepser IF, Turkmen C, Aydin B, Karadag R. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization. *Cornea* 2007; 26: 715-719.
110. Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81: 439-452.
111. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-686.
112. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-285.

113. Zengin N, Okudan S, Gündüz K. Oküler neovaskularizasyonunda büyüme faktörlerinin rolü. *Oftalmoloji* 1993; 3: 385-389.
114. Sarah X, Jian-xing M. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* 2007; 26: 1-37.
115. Drixler TA, Voest EE, von Vroonhoven TM, Borel Rinkes IH. Angiogenesis and surgery: from mice to man. *Eur J Surg* 2000; 166: 435-446.
116. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-270.
117. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Antiangiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.
118. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
119. Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak H, Brown LF. Correlation of vascular permeability factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1210-1217.
120. Korpelainen EI, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 159-164.
121. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1999; 13: 18-32.
122. Reidy MA. Endothelial regeneration. Interaction of smooth muscle cells with endothelial regrowth. *Lab Invest* 1988; 59: 36-43.
123. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1512-1520.
124. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 237-268.

125. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF- α . *Cornea* 2007; 26: 70-74.
126. Hayahi T, Matsuoko K, Saitoh M, Takeda S, Kimura M. Influence of α -tumor necrosis factor and β -interleukin-1 on production of angiogenic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J. Obstet. Gynaecol Res* 2006; 32: 15–22.
127. Gündüz A, Er H. Sitokinler ve oftalmolojideki yerleri. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2000; 9: 53-58.
128. Dana R. Comparison of topical interleukin-1 vs tumor necrosis factor- α blockade with corticosteroid therapy on murine corneal inflammation, neovascularization, and transplant survival. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2007; 105: 330-343.
129. Matsumoto K, Maruyama N, Maruyama T, Ohnishi Y, Nonaka S, Inoshita A et al. Elevated macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in the urine of patients with focal glomerular sclerosis. 2004 British Society for Immunology. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 338-347.
130. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1555-62.
131. Javeed A, Zhao Y, Zhao Y. Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. *Inflamm Res* 2008; 57: 45-50.
132. Taguchi C, Sugita S, Tagawa Y, Nishihira J, Mochizuki M. Macrophage migration inhibitory factor in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1367-1371.
133. Thakur A, Xue ML, Wang W, Lloyd A, Wakefield D, Willcox MD. Expression of macrophage migration inhibitory factor during *Pseudomonas* keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29: 179-182.
134. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seiich Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 3545-3550.

135. Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Takagi M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* 1997; 92: 131–137.
136. Cunha FQ, Weiser WY, David JR, Moss DW, Moncada S, Liew FY. Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages. *J Immunol* 1993; 50: 1908-12.
137. Leilani L. Santos and Eric F. Morand. The role of macrophage migration inhibitory factor in the inflammatory immune response and rheumatoid arthritis. *Wien Med Wochenschr* 2006; 156: 11–18.
138. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990, 31: 323-333.
139. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J. Insulin-like growthfactor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 1993; 36: 282-291.
140. Singh N, Macnamara E, Rashid S, Ambati J, Kontos CD, Higgins E, Ambati BK. Systemic soluble Tie-2 expression inhibits and regresses corneal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332: 194-199.
141. White RR, Shan S, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, Sullenger A. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5028-5033.
142. Azar DT, Hahn TW, Jain S, Yeh YC, Stetler-Stevensen WG. Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea* 1996; 15: 18-24.
143. Maeda M, Vanlandingham BD, Ye H, Lu PC, Azar DT. Immunoconfocal localization of gelatinase B expressed by migrating intrastromal epithelial cells after deep annular excimer keratectomy. *Curr Eye Res* 1998; 17: 836-843.
144. Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 913-921.

145. Ye HQ, Maeda M, Yu FS, Azar DT. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2894–2899.
146. Yaylali V, Ohta T, Kaufman SC, Maitchouk DY, Beuerman RW. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea* 1998; 17; 646-653.
147. Chang Jh, Azar DT. Characterization of angiostatin in the Mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 832
148. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, Fukai N, Azar DT. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2517-2524.
149. Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R. Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct antitumor properties. *J Biol Chem* 2000; 275: 23745-23750.
150. Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S, Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 2001; 276:15240-15248.
151. Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbanda S, et al. Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 31959-31968.
152. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 346-355.
153. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
154. Shin SH, Kim JC, Chang SI, Lee H, Chung SI. Recombinant kringle 1-3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 2000; 19: 212-217.
155. Ohlmann AV, Ohlmann A, Welge-Lussen U, May CA. Localization of collagen XVIII and endostatin in the human eye. *Curr Eye Res* 2005; 30: 27-34.

156. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2517-2524.
157. Ortego J, Escribano J, Becerra SP, Coca-Prados M. Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2759-2767.
158. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285: 245-248.
159. Hiscott P, Paraoan L, Choudhary A, Ordonez JL, Al-Khaier A, Armstrong DJ. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25: 1-18.
160. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1352-1358.
161. Cursiefen C, Masli S, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1117-1124.
162. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 270-271.
163. Hampton T. Monoclonal antibody therapies shine in breast cancer clinical trials. *JAMA* 2005; 293: 2985-2989.
164. Campochiaro PA. Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 462-474.
165. Friedlander SM, Welch RM. Vanishing disc neovascularization following intravitreal bevacizumab (avastin) injection. *Arch Ophthalmol* 2006; 124: 1365.

166. Ruiz-Moreno JM, Montero JA, Lugo F, Amat P, Staicu C. Intravitreal bevacizumab in recurrent diabetic vitreous haemorrhage after vitrectomy. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 231-232.
167. Beyon SH, Kwon YA, Oh HS, Kim M, Kwon OW. Short-term results of intravitreal bevacizumab for macular edema with retinal vein obstruction and diabetic macular edema. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007; 23: 387-394.
168. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Michels S, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age related macular degeneration: twenty-four-week results of an 65 uncontrolled openlabel clinical study. *Ophthalmology* 2006; 113: 1-12.
169. Adan A, Mateo C, Navarro R, Bitrian E, Casaroli-Marano RP. Intravitreal bevacizumab (avastin) injection as primary treatment of inflammatory choroidal neovascularization. *Retina*. 2007; 27: 1180-1186.
170. Hernandez-Rojas ML, Quiroz-Mercado H, Dalma-Weiszhausz J, Aiello LP. Short-term effects of intravitreal bevacizumab for subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia. *Retina* 2007; 27: 707-712.
171. Mandal S, Garg S, Venkatesh P, Mithal C, Vohra R, Mehretra A. Intravitreal bevacizumab for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125: 1487-1492.
172. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernandez-Rojas ML, Salazar N, Chan RV. Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina* 2008; 28: 19-25.
173. Ehlers JP, Spirn MJ, Lam A, Sivalingam A, Samuel MA, Tasman W. Combination intravitreal bevacizumab/panretinal photocoagulation versus panretinal photocoagulation alone in the treatment of neovascular glaucoma. *Retina* 2008; 28: 696-702.
174. Yazdani S, Hendi K, Pakravan M. Intravitreal bevacizumab (Avastin) injection for neovascular glaucoma. *J Glaucoma*. 2007; 16: 437-439.
175. Iliev ME, Doming D. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in the Treatment of Neovascular Glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 1054-1056.

176. Luiz FM, Rubens Belfort. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; 79: 389-394
177. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245:1577–1579.
178. Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 246:281–284.
179. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Vasilios S, Rouvas A, Bourboulis EJ, Vergados DIA. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal Model. *Am J Ophthalmol* 2008; 145: 424–431.
180. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Franzco MB, Rootman D and Slomovic A. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008; 27: 142–147.
181. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan HA. Effect of Subconjunctival Bevacizumab (Avastin) on Experimental Corneal Neovascularization in Guinea Pigs. *Cornea* 2008; 27: 357–362.
182. Han YS, Lee JE, Jung JW, Lee JS. Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247: 541-548.
183. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109.
184. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5, *Cancer Res* 2006; 66: 11851-11858.

185. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL, et al. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma, *J Clin Oncol* 2006; 24: 2505-2512.
186. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma, *N Engl J Med* 2007; 356: 125-34.
187. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways, *Curr Opin Cell Biol* Apr 1999; 11: 184-189.
188. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy, *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-250.
189. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF. Sharp Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, *N Engl J Med* Jul 2008; 24: 378-390.
190. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheres DA. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature, *Science* 2002; 296: 2404-2407.
191. Furuse J. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma, *Biologics* Dec 2008; 2: 779-788.
192. Hong DS, Sehti SM, Newman RA, Blaskovich MA, Ye L, Gagel RF, et al. Phase I trial of a combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in advanced malignancies, *Clin Cancer Res* Nov 2009; 15: 7061-7068.
193. Hasskarl J. Sorafenib. *Recent Results Cancer Res* 2010; 184: 61-70.
194. Yoeuruck E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, et al: Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 322–328.
195. Joussen AM, Germann T, Kirchhof B. Effect of thalidomide and structurally related compounds on corneal angiogenesis is comparable to their teratological potency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 952-961.

196. Reinhard T, Reis A, Bohringer D. Systemic mycophenolate mofetil in comparison with systemic cyclosporin A in high-risk keratoplasty patients: 3 years' results of a randomized prospective clinical trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239: 367-372.
197. Peyman GA, Kivilcim M, Morales AM, DellaCroce JT, Conway MD. Inhibition of corneal angiogenesis by ascorbic acid in the rat model. *Graefes Arch Clin Exp ophthalmol* 2007; 245: 1461-1467.
198. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1588-1593.
199. Nakao S, Hata Y, Miura M. Dexamethasone inhibits interleukin-1 β -induced corneal neovascularization: role of nuclear factor- κ B-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol* 2007; 171: 1058-1065.
200. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. *Exp Mol Med* 2006; 38: 173-179.
201. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1986; 93: 1304-1309.
202. Pillai CT, Dua HS, Hossain P: Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2148-2153.
203. Tripathi RC, Li J, Tripathi BJ, Chalam KV, Adamis AP. Increased level of VEGF in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 1998; 105: 232- 237.
204. Bashkaran K, Zunaina E, Bakiah S, Sulaiman SA, Sirajudeen K, Naik V. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: Experimental animal study *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2011; 11: 90.
205. Chang JH, Gabison EE. Corneal neovascularization, pathogenesis and inhibition. *Cornea* 1987; 6: 250-257.

206. Gan L, Fagerhom P. Vascular endothelial growth factor and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82: 557-563.
207. Cursiefen C, Cao J, Chen L. Inhibition of lymphangiogenesis and hemangiogenesis after normal risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2666-2673.
208. Kim B, Tang Q, Biswas PS. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes. *Am J Pathol* 2004; 165: 2177-2122.
209. Gohto Y, Obana A, Kaneda K, Miki T. Photodynamic effect of a new photosensitizer ATX-S10 on corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67: 313-22.
210. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea* 1987; 6: 250-257.
211. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65: 671-678.
212. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-651.
213. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43: 245-269.
214. Usui T, Ishida S, Yamashiro K. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 368-37.
215. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2148-2153.
216. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol* 2008; 145: 424-431.

217. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 804–807
218. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2545–2552
219. Bock F, Koenig Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 281–284.
220. Uy HS, Chan PS, Ang RE. Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with Stevens–Johnson syndrome. *Cornea* 2008; 27: 70–73
221. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Opth* 2007; 125.
222. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247:1375–1382
223. Wung-Jae Kim, Hee-Ok Jeong, Sung-Kun Chung *Korean J Ophthalmol* 2010; 24: 230-236.
224. Tae-im Kim, Sang Woo Kim, Sunwoong K. Inhibition of Experimental Corneal Neovascularization by Using Subconjunctival Injection of Bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008; 27: 349–352.
225. Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Schomacker K. In vivo uptake of liposomal benzoporphyrin derivative and photothrombosis in experimental corneal neovascularization. *Lasers Surg Med* 1995; 17: 178-188.
226. Abdulgani A, Hasanreisoglu B, Akyurek N, Sepici A. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009; 37: 730–736.

227. Ormerod LD, Abelson MB. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter disc. *Invest OphthalmolVis Sci* 1989; 30: 2148–2153.
228. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245: 1577-1579.
229. Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, Batchelor TT, Sorensen AG: Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2009, 6: 327–338.
230. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from antiangiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2006, 6: 626–635.
231. Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2010; 13: 16–28.
232. Jahangiri A, Aghi MK. Biomarkers predicting tumor response and evasion to anti-angiogenic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1825: 86–100.
233. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D: Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Canc Cell* 2005; 8: 299–309.
234. Chung EJ, Yoo S, Lim HJ, Byeon SH, Lee JH, Koh HJ. Inhibition of choroidal neovascularisation in mice by systemic administration of the multikinase inhibitor, sorafenib. *Br J Ophthalmol.* 2009; 93: 958-963.
235. Jeong Won Seo, So-Hyang Chung, Jun-Sub Choi, Choun-Ki Joo, PhD Inhibition of Corneal Neovascularization in Rats by Systemic Administration of Sorafenib *Cornea* 2012; 31: 907–912.
236. Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1985; 39: 169–187.
237. Tsai YJ, Lee RK, Lin SP, Chen YH. Identification of a novel platelet-derived growth factor-like gene, fallotein, in the human reproductive tract. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1492: 196–202.

238. Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R. Peptide growth factors and their receptors; Handbook of experimental Pharmacology 1990; 95: 173-262.
239. Cao R, Brakenhielm E, Li X. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF7 family, involves activation of PDGFR- $\alpha\alpha$ and - $\alpha\beta$ receptors. *Faseb J* 2002; 6: 1575–1583.

6. ÖZGEÇMİŞ

05.02.1986 yılında Hatay'ın Altınözü ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi Adana Recep Birsin Özen İlköğretim Okulu'nda ve orta öğrenimimi Malatya Anadolu Lisesi'nde, lise öğrenimimi ise Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2004 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitime başlayıp 2010 yılında bu fakülteden mezun oldum. Altı ay sonra Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.