

Deneysel Kornea Neovaskülarizasyonunda Subkonjonktival Siklosporin-A'nın Tedavideki Rolü

Role of Subconjunctival Cyclosporin-A in Treatment of Experimental Corneal Neovascularization

Dr. Harun YÜKSEL,^a
Dr. Murat TUNÇ,^b
Dr. Ümran YILDIRIM,^c
Dr. İbrahim ÖNDER,^d
Dr. Çağrı KILIÇ^a

^aGöz Hastalıkları Kliniği,
Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Diyarbakır

^bGöz Hastalıkları AD,
^cPatoloji AD,
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Düzce
^dGöz Kliniği,
Şarkışla Devlet Hastanesi, Sivas

Geliş Tarihi/Received: 05.05.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 25.10.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:

Dr. Harun YÜKSEL
Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Göz Hastalıkları Kliniği, Diyarbakır,
TÜRKİYE/TURKEY
harunyuksell@gmail.com

ÖZET Amaç: Kornea neovaskülarizasyonu, korneanın şeffaflığının azalmasına ve görme kayıplarına neden olabilen ciddi bir halk sağlığı problemidir. Çalışmamızda termal koterizasyon ile deneysel kornea neovaskülarizasyonu oluşturulmuş ve siklosporin-A'nın subkonjonktival enjeksiyon ile uygulanmasının kornea neovaskülarizasyonu gelişimine etkisi araştırılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya 24 adet Wistar ratın sağ gözleri alındı. Ratlar uygulanan tedaviye göre 4 gruba ayrıldı. 22 rat ile deneyler tamamlandı: Grup 1: 0.5 mg/0.01 cc subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyon grubu (n= 6); grup 2: 0.25 mg/0.01 cc subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyon grubu (n= 5); grup 3: 0.125 mg/0.01 cc subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyon grubu (n= 6); grup 4 (kontrol grubu): Tedavisiz bırakılan grup (n= 5). Korneaya limbusun 1 mm uzaklıkta saat 3, 6, 9 ve 12 hisasında termal koterizasyon tamamlandıktan sonra temporal bulber konjonktiva altına grup 1, 2 ve 3'te belirtilen dozlarda siklosporin-A 0,01 cc volüm içinde enjekte edildi. Altı hafta sonra ameliyat mikroskobu ile kornealar muayene edildi. Neovasküler alanın oranı ve ana damar sayısı tespit edildi. Muayeneden sonra ratlara enükleasyon yapıldı. Parafin blok ve Hematoksil-eozin boyama ile histopatolojik inceleme yapılarak kornea kesitlerinde damar sayımı yapıldı. **Bulgular:** Çalışmamızda subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonlarının her 3 grupta da, oluşan yeni damar sayısını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı hem histopatolojik incelemede, hem de kornea muayenelerinde gösterildi. Ayrıca grup 1'de neovasküler alan yüzdesi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Farklı siklosporin-A doz uygulamaları arasında anlamlı fark saptanmadı. **Sonuç:** Subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu, deneysel kornea neovaskülarizasyonunda yeni damar sayısını anlamlı düzeyde azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Korneal yenidoamarlanma; siklosporin; koter

ABSTRACT Objective: Corneal neovascularization is a serious public health problem which causes the loss of transparency of cornea and finally vision loss. In this study we generated experimental corneal neovascularization by using thermal cauterization and investigated the effect of subconjunctival Cyclosporine-A to new vessel generation. **Material and Methods:** Right eyes of 24 wistar rats were included to study. They divided into 4 groups according to treatment regime. 22 rats completed the experiments. Group 1: 0.5 mg/0.01 cc subconjunctival cyclosporine-A injection group (n= 6); group 2: 0.25 mg/0.01 cc subconjunctival Cyclosporine-A injection group (n= 5); group 3: 0.125 mg/0.01 cc subconjunctival cyclosporine-A injection group (n= 6); group 4 (control group): the group without treatment (n= 5). Thermal cauterizations were applied to corneas 1 mm away from limbus at hour 3, 6, 9, 12. Subconjunctival Cyclosporine-A injections were applied to temporal bulber conjunctivas according to the treatment regime in group 1, 2 and 3. Six weeks later we examined the rat corneas with operation microscope. Ratio of the neovascular region, number of major blood vessels were determined. After the examination, enucleation was performed. Histopathologic examinations were made with paraffin block and Hematoxylin-Eosin staining. Blood vessels were counted in the histopathologic cornea sections. **Results:** In our study, we showed that subconjunctival cyclosporine-A injections reduce the number of blood vessels in corneal examinations and hystopatological sections, according to control group in experimental corneal neovascularization. We did not found any difference among the different cyclosporine-A doses. Also we showed that 0.5 mg subconjunctival cyclosporine-A injections (Group 1) reduces the neovascular region ratio according to control group. **Conclusion:** Subconjunctival cyclosporine-A injection, decreased the number of new blood vessels significantly in experimental corneal neovascularization.

Key Words: Corneal neovascularization; cyclosporine; cautery

Türkiye Klinikleri J Ophthalmol 2010;19(4):226-33

Kornea neovaskularizasyonu, korneanın şeffaflığının azalmasına ve körlüğe kadar gidebilen, görme kayıplarına neden olan ciddi bir halk sağlığı problemidir. Amerika'da yapılan bir çalışmada, toplumun %4'ünde kornea neovaskularizasyonu bulunduğu, bir yıl içinde 1.4 milyon hastada kornea neovaskularizasyonu geliştiği ve kornea nakli için elde edilen kornea örneklerinin %20'sinin histopatolojik olarak vaskularizasyon gösterdiği bildirilmiştir.¹

Kornea neovaskularizasyonu, anjiyogenik ve antianjiyogenik moleküller arasındaki dengenin anjiyogenik moleküller lehine değişmesi ile oluşur.²

Çalışmamızda, termal koterizasyon ile oluşturulan deneysel kornea neovaskularizasyonunda subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonunun yeni damar sayısına etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Düzce Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulundan etik kurul onayı alınarak, hayvan haklarının korunmasına özen gösterilerek, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya ağırlıkları 200-250 g arasında olan 6 aylık 24 adet Wistar rat alındı. İstatistiksel olarak çalışma öncesi belirlenen denek sayısının yeterli olarak saptanması ve etik komitemizin gereğinden fazla hayvan kullanılmasına izin vermemesi nedeniyle hayvan sayısı kısıtlı tutulmuştur. Çalışma süresinde hayvanlar uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Her ratın sağ gözü kullanıldı. Ratlara genel anestezi 25 mg/kg dozda ketamin hidrokloridin (Ketalar Eczacıbaşı, Lüleburgaz Türkiye) intraperitoneal enjeksiyonu ile yapıldı. Ayrıca topikal anestezi için %0.5'lik proparakain hidroklorid (HCl) (Alcaine, Alcon, ABD) damla uygulandı.

GRUPLAR

Ratlar uygulanan tedaviye göre 4 gruba ayrıldı. Yirmi dört ratın 22'sinde deneyler tamamlandı:

- Grup 1: 0.5 mg/0.01 cc subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu yapılan grup (n= 6).

- Grup 2: 0.25 mg/0.01 cc subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu yapılan grup (n= 5).

- Grup 3: 0.125 mg/0.01 cc subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu yapılan grup (n= 6).

- Grup 4 (kontrol grubu): Tedavisiz bırakılan grup (n= 5).

Deneye her grupta 6 rat ile başlandı. Grup 2 ve grup 4'ten birer rat deneyin 3. haftasında kafesinde ölü bulunması nedeniyle çalışma dışında bırakıldı.

SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI

Siklosporin-A dozları, 50 mg/mL Sandimmun intravenöz (iv) ampul (Novartis Pharma AG Stein-İsviçre) kullanılarak hazırlandı. İlacın bu ticari formunda prospektüs bilgisi olarak serum fizyolojik veya %5 glikoz solüsyonu ile dilüsyonla iv infüzyon şeklinde kullanımı önerilmekteydi, bu nedenle grup 2 ve grup 3'te ilaç dozları hazırlanırken dilüsyon için serum fizyolojik kullanıldı.

Siklosporin-A dozlarının hazırlanması;

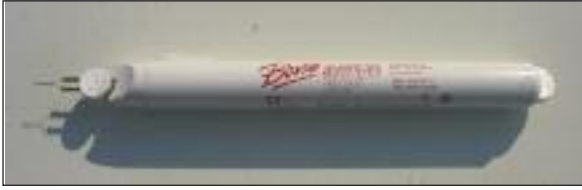
- Grup 1: 50 mg/mL'lik Sandimmun ampulden 0.01 cc alınarak 0.5 mg/0.01 cc'lik siklosporin-A elde edildi.

- Grup 2: 50 mg/mL'lik 1 mL Sandimmun ampul 1 mL serum fizyolojik ile karıştırıldı ve çalkalanmış taze emülsiyondan 0.01 cc alınarak 0.25 mg/0.01 cc'lik siklosporin-A elde edildi.

- Grup 3: 50 mg/mL'lik 1 mL Sandimmun ampul 3 mL serum fizyolojik ile karıştırıldı ve çalkalanmış taze emülsiyondan 0.01 cc alınarak 0.125 mg/0.01 cc'lik siklosporin-A elde edildi.

KORNEAYA TERMAL KOTERİZASYON YAPILMASI VE SUBKONJONKTİVAL SIKLOSPORİN-A ENJEKSİYONU

David ve ark. çalışmalarında göstermişlerdir ki korneada limbusa 4 mm'den daha yakın termal koterizasyon kornea neovaskularizasyonu ile sonuçlanmaktadır.³ Biz de çalışmamızda elde edilmiş pilli bir termal elektrokoter ile korneaya koterizasyon yaptık. Termal koterizasyon için kullanılan cihaz; 'Bovie Change A-Tip' (AARON MEDICAL Florida ABD) Resim 1'de gösterilmiştir. Ratların sağ gözle-



RESİM 1: Bovie Change A-Tip Koter (AARON MEDICAL Florida ABD).



RESİM 2: Termal koterizasyon. Periferik korneada, limbusa 1 mm uzaklıkta termal koterizasyon yapılması.

rinin kornealarına sırasıyla saat 12-3-6-9 hizasında periferik korneada, limbusa 1 mm uzaklıkta elektrokoter dokundurulduktan sonra koterin düğmesine basılıp 5 saniye süreyle koterizasyon yapıldı (Resim 2). Ardışık iki koterizasyon arasında koter ucunun soğuması için 10 saniye beklenildi.

Dört noktada koterizasyon tamamlandıktan sonra temporal bulber konjonktiva altına grup 1, 2 ve 3'te yukarıda belirtilen dozlarda siklosporin-A 0.01 cc volüm içinde enjekte edildi (Resim 3). İşlem sonunda kornea yüzeyi 10 mL izotonik solüsyonla yıkandı ve topikal ofloksasin (Okacin; Novartis Ophthalmics, AG Hettlingen İsviçre) damla damlatıldı.

MUAYENE VE ENÜKLEASYON

Altı haftalık takip süresinden sonra ratlara aynı şekilde anestezi yapılarak ameliyat mikroskobu altında kornea muayenesi yapıldı (Resim 4). Vaskülarizasyonun korneanın ne kadarını tuttuğu (360 derece üzerinden derece olarak) ve damar sayısı tespit edildi. Muayene ardından ratlara enükleasyon yapıldı ve göz küreleri %10'luk formaldehit solüsyonu içine konuldu. Ratlarda enükleasyonun ardından intraperitoneal 1cc ksila-

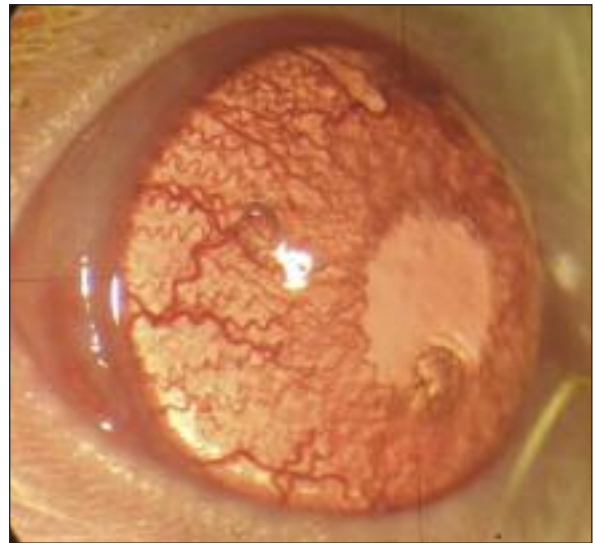
zin %2, (Rompun Bayer, Almanya) ile solunum arresti sağlandı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

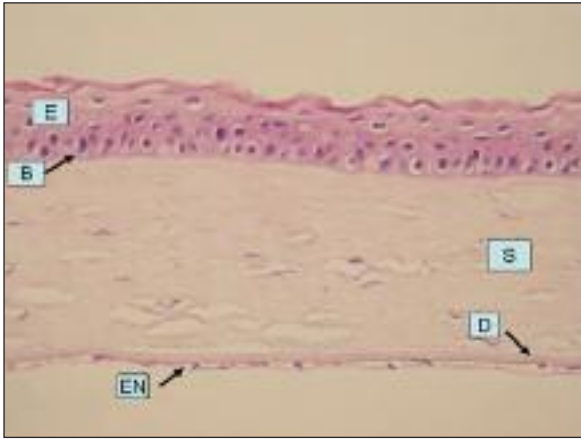
Göz küreleri fiksasyon için 1 gün %10'luk formaldehit içinde bekletildi. Daha sonra artan alkol derecelerinden geçirilerek dehidrate edildi. Kornealar limbustan 1 mm uzakta sklera dahil edilecek şekilde eksize edildi. Her kornea, merkezinden geçen ve limbustan limbusa uzanan bir kesi ile ikiye bölünerek bu kesit yüzeyleri altta kalacak şekilde yan dik olarak parafin bloklar haline getirildi. Her kornea yarımından birbirine eşit uzaklıklarla üç kesit alınarak her bir kornea toplam 6 kesit yüzeyinde Hematoksilen-Eozin boyama ile incelendi. Her kesit yüzeyinde 40 x 10'luk büyütme ile damar sayısı yapıldı (Resim 5).



RESİM 3: Temporal bulber konjonktiva altına siklosporin-A enjeksiyonu.



RESİM 4: Ameliyat mikroskobu altında korneaların muayenesi.



RESİM 5: Histopatolojik incelemede normal kornea kesiti. Grup 1'e ait bir raktan korneasından skar ve damarlanmanın olmadığı bir bölgeden geçen, normal kornea tabakalarını göstermek için alınan bir kesittir. Epitel (E), Bowman membranı (B), Stroma (S), Descemet Membranı (D), Endotel (EN) ile gösterilmiştir. Hematoksilen-Eozin boyama 40x10 büyütme.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için Kruskal-Wallis testi ile varyans analizi yapıp gruplar arasında fark olup olmadığına bakıldı. İkili grup karşılaştırmaları için Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi olarak $p < 0.05$ kullanıldı. Bütün istatistiksel analizleri SPSS istatistiksel analiz programı (SPSS 13 for Windows) üzerinde yapıldı.

BULGULAR

Varyans analizinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p = 0.001$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 1, grup 2 ve grup 3'ün kontrol grubuyla karşılaştırmalarında anlamlı farklar saptandı. Grup 1, grup 2 ve grup 3'ün ikili karşılaştırmalarında fark saptanmadı. Bu sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Grup 1'deki korneal muayenede vaskülarizasyonlardaki ana damar sayısı, damarlanmış alan yüzdesi ve histopatolojik incelemede toplam damar sayısı grup 4 yani kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Grup 1 ve grup 4'e ait histopatoloji kesitlerinden birer örnek sırasıyla Resim 6 ve Resim 7'de gösterilmiştir.

Grup 2'deki korneanın muayenesinde damarlanmalardaki ana damar sayısı ve histopatolojik incelemede toplam damar sayısı kontrol grubuna (Grup 4) göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur. Fakat damarlanmış alan yüzdesi karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmamıştır.

Grup 3'teki korneanın muayenesinde damarlanmalardaki ana damar sayısı ve histopatolojik incelemede toplam damar sayısı kontrol grubuna (Grup 4) göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur. Fakat damarlanmış alan yüzdesi karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmamıştır.

TARTIŞMA

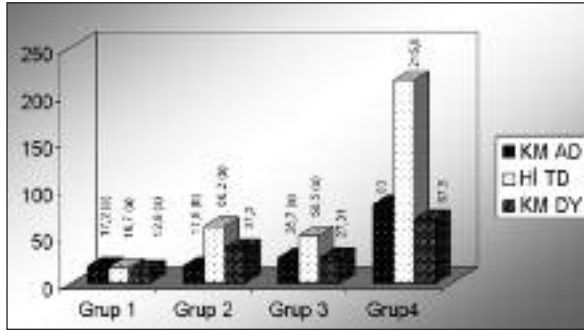
Biz çalışmamızda bütün gruplarda subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonlarının, deneysel kornea neovaskülarizasyonu gelişiminde yeni damar sayısını hem histopatolojik incelemede hem de ameliyat mikroskobu ile sayımında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalttığını tespit ettik. Ayrıca, 0.5 mg siklosporin-A enjeksiyonu yapılan grupta (Grup 1) neovasküler alan yüzdesinin de kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü. Farklı dozlardaki uygulamalar arasında fark saptanmadı.

TABLO 1: Gruplarda bulguların ortalamalarının tablo halinde gösterimi.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
	Ortalama ± Standart sapma (Ortanca)			
Korneanın muayenesinde damarlanmalardaki ana damar sayısı	17.2 ± 13.2 (12.0) ^a	17.8 ± 8.0 (20) ^b	26.7 ± 12.6 (27.5) ^a	83.00 ± 17.9 (80.0)
Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı	16.7 ± 18.4 (8.0) ^a	60.2 ± 27 (73) ^b	50.50 ± 21.6 (51.5) ^a	215.6 ± 115.5 (145.0)
Korneanın muayenesinde damarlanmış alan yüzdesi	13.9 ± 9.8 (8.3) ^a	37.22 ± 19.70 (41.7)	27.3 ± 11.2 (27.8) ^a	67.8 ± 26.5 (69.4)

^a Grup 4 ile karşılaştırıldığında $p = 0.004$.

^b Grup 4 ile karşılaştırıldığında $p = 0.008$.

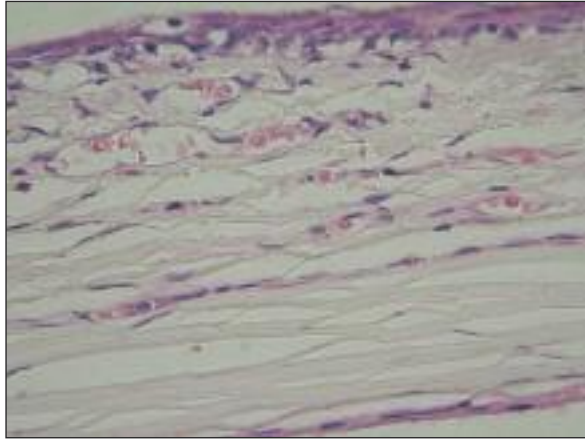


ŞEKİL 1: Gruplarda bulguların ortalamalarının grafik halinde gösterimi.

KM AD: Korneanın muayenesinde damarlanmalardaki ana damar sayısı ortalaması, HI TD: Histopatolojik incelemede toplam damar sayısı ortalaması, KM DY: Korneanın muayenesinde damarlanmış alan yüzdesi ortalaması.

(a) Grup 4 ile karşılaştırıldığında $p=0.004$.

(b) Grup 4 ile karşılaştırıldığında $p=0.008$.



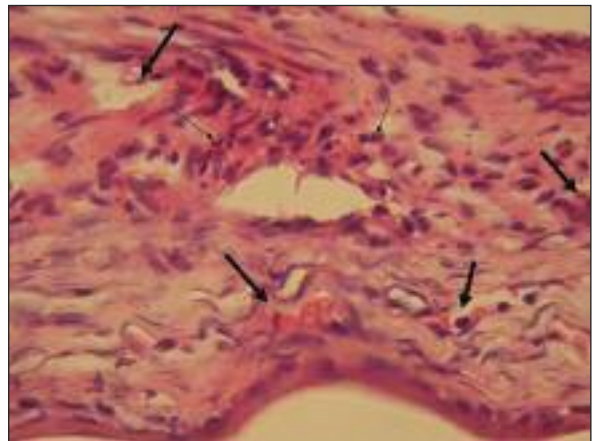
RESİM 6: Grup 1'e ait bir kornea kesiti. İçinde eritrositlerin izlendiği damarsal yapılar görülmektedir. Hematoksilen-Eozin boyama 40x10 büyütme.

0.25 mg ve 0.125 mg subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu yapılan gruplarda damar sayılarının kontrol grubuna göre azalması fakat neovasküler alan yüzdesinin değişmemesi göstermektedir ki bu gruplarda damarlanma yoğunluğu azalmıştır.

Kornea neovaskülerizasyonunda mevcut damarların ortadan kaldırılması için en yaygın kullanılan tedavi yöntemi topikal steroidlerdir. Topikal steroid tedavisi etkin olmakla birlikte, glokom, katarakt ve enfeksiyon riski gibi birçok ciddi yan etkisi nedeniyle uzun süreli kullanımını mümkün olmamaktadır. Ayrıca steroidler, anjiyogenezi direkt olarak inhibe etmezler.⁴ İnflamasyon tarafından tetiklenmeyen neovasküla-

rizasyonda örnek olarak tümörlerde ve civciv embriyosunda koryoallantoik membran gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda anjiyogeneze etkilerinin olmadığı veya çok az etkisi bulunduğu gösterilmiştir.^{5,6} İnflamasyon ve neovaskülerizasyon birbiriyle ilişkili fakat ayrı süreçlerdir. Korneal inflamasyon her zaman neovaskülerizasyonla birlikte değildir, örneğin; akantomoeba keratinitinin en şiddetli formunda bile kornea vaskülerizasyonu görülmez.⁷ Ayrıca oküler yüzey tümörleri gibi korneal inflamasyonun olmadığı fakat neovaskülerizasyonun görüldüğü klinik durumlar vardır.

Kornea neovaskülerizasyonu tedavisinde kullanımı denenen bir diğer ilaç grubu vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antikoru'dur. Bevasizumab, yaşa bağlı makula dejenerasyonunda koroidal neovaskülerizasyonların ve proliferatif diyabetik retinopatide retinal neovaskülerizasyonların tedavisinde intravitreal enjeksiyon yoluyla uygulanan bir VEGF antikoru'dur.⁸ Manzano ve ark. çalışmalarında kimyasal yanıkla oluşturulan deneysel kornea neovaskülerizasyonda 4 mg/mL topikal bevasizumab ile tedavi ettikleri grupta kontrol grubuna göre vaskülerizasyonda %40 azalma bildirmişlerdir.⁹ Bock ve ark. aşırı kornea neovaskülerizasyonu bulunan ve konvansiyonel tedavilerden fayda görmeyen 5 hastayı günde 2 kez 4 mg/mL topikal bevasizumab ile tedavi etmiş 3,6 ay



RESİM 7: Grup 4'e ait bir ratın kornea kesiti. Çalışma gruplarıyla karşılaştırıldığında damarlanmada (kalın ok) belirgin artış ve inflamasyon göstergesi olan polimorf nüveli lökositler (ince ok) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin boyama 40x10 büyütme.

sonunda ortalama %48 damarlanma alanında azalma saptamışlardır.¹⁰

Siklosporin-A'nın lokal uygulamasında ciddi komplikasyonlara rastlanmamaktadır. Siklosporin-A keratokonjunktivitis sikka ve korneal greft reddi için kullanılan ticari damla formu mevcut olmakla birlikte perioküler enjeksiyon için herhangi bir ticari formu bulunmamaktadır.

Siklosporin-A tedavisinin neovaskülerizasyonu azalttığına yönelik literatürde birçok çalışma mevcuttur. Yang ve ark., çalışmalarında siklosporin-A'nın, periferik kandan izole edilen endotelial progenitor hücre (EPC) kültürlerinde EPC'lerin proliferasyonunu doza bağımlı olarak azalttığını ve apoptozisini arttırdığı göstermişlerdir.¹¹ Ayrıca bu çalışmada EPC'lerde nitrik oksit (NO) sentetaz enziminin ve NO üretimini siklosporin-A tarafından azaltıldığı da gösterilmiştir. NO sentetaz ve NO anjiyogenik maddelerdir.^{12,13}

Hernandez ve ark. çalışmalarında siklosporin-A'nın, umbilikal venden elde edilen endotelial hücrelerin in vitro ortamda VEGF aracılıklı endotelial hücre migrasyonu ve anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir.¹⁴ Ayrıca Hernandez ve ark. nın çalışmalarında vurgulanması gereken bir diğer önemli bulgu da; farelerde siklosporin-A'nın VEGF ile uyarılan deneysel kornea neovaskülerizasyonu inhibe ettiği fakat fibroblast büyüme faktörü ile uyarılan deneysel kornea neovaskülerizasyonu inhibe etmediğidir. Bu bulgu siklosporin-A'nın anti-anjiyogenik özelliğinin VEGF ile tetiklenen mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu düşündürmektedir. Bu görüşü destekleyen başka çalışmalar da mevcuttur. Cho ve ark. sinovyal sıvı fibroblastlarında siklosporin-A'nın VEGF üretimini azalttığını göstermişlerdir.¹⁵

Siklosporin-A'nın neovaskülerizasyonunu önlemede etkili olduğunu gösteren ve mekanizmasını araştıran yukarıda sözü edilen in vitro çalışmaların yanında, bizim çalışmamız gibi pek çok deneysel ve klinik çalışmada siklosporin-A'nın kornea neovaskülerizasyonu tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Rehany ve Waisman yaptıkları çalışmada alkali yanık sonucu yaygın kornea neovaskülerizasyon

oluşturdukları tavşan kornealarında penetran keratoplasti sonrası korneal greft ömrünün sistemik siklosporin-A kullanımı ile uzadığını göstermişlerdir.¹⁶ Zhao ve Jin'nin yaptığı çalışmada konvansiyonel tedaviye yanıt alınamayan 16 korneal allogreft rejeksiyonu hastasını topikal %0.5'lik sikloporin-A damlası ile tedavi etmişler ve 9 hastada tam kür, 6 hastada ise belirgin düzelme saptamışlardır.¹⁷ Tunç ve Erbilin'nin bildirdiği konjonktival ve korneal skuamöz hücreli karsinomlu iki olguda cerrahi eksizyon sonrasında korneal sınırda tümör pozitif bulunmuş ve bu olguların %0.05'lik siklosporin-A ve %0.01'lik mitomisin-C damlalarının kombine kullanımı ile 18 aylık takipte rekürrens önlenmiş ve yaygın limbal vaskülerizasyonun kaybolduğu gösterilmiştir.¹⁸ Xie ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada yüksek riskli korneal greft rejeksiyonunda allograft ömrünün ön kamaraya yerleştirilen bir siklosporin-A polimeri ile uzatıldığını göstermişlerdir.¹⁹ Hill'in çalışmasında yüksek riskli keratoplasti hastalarında (en az üç kadranda en az 16 adet stromal vaskülerizasyon bulunan alıcılar) sistemik siklosporin-A kullanan hastalarda rejeksiyon oranının kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuşlardır.²⁰ Bu çalışmada kontrol grubunda %62 rejeksiyon olurken sistemik siklosporin-A'nın 6 ay kullanımı ile bu oran %31'e, 1 yıl kullanım ile de %7 oranına inmektedir. Sistemik siklosporin-A kullanımının korneal greft reddinin önlenmesinde etkili olduğunu gösteren bu çalışmaların yanında ilginç olarak siklosporin-A'nın topikal olarak kullanımı ile korneal greft reddinin önlenmesi konusunda son zamanlarda yapılan pek çok klinik çalışmada, standart tedavi olan steroid tedavisine topikal siklosporin-A eklenmesinin ilave bir katkı sağlamadığı gösterilmiştir. Örneğin; Ünal ve Yücel'in 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında yüksek riskli korneal greftlerin ömründe, deksametazonun tek başına kullanımıyla topikal %0.05'lik siklosporin-A ile kombine edilmeleri arasında fark tespit edilmemiştir.²¹ Poon ve ark. prednizolon asetatin topikal %0.05'lik siklosporin-A ile kombine edilmesi ile tek başına kullanımını karşılaştırmışlar ve korneal greft reddinin önlenmesinde topikal siklosporin-A'nın ilave bir katkı sağlamadığını bil-

dirmişlerdir.²² Bu iki çalışmada da siklosporin-A'nın mevcut topikal damla formu yani %0.05'lik siklosporin-A kullanılmış ve daha yüksek dozlar denenmemiştir. Siklosporin-A'nın sistemik olarak etkili olup topikal olarak etkili olmama nedenlerinden birisi damla formu ile korneal vaskülarizasyon veya greft reddini önleyecek yeterli doza ulaşamama olabilir. Bizim çalışmamızda grup 1'de subkonjonktival enjeksiyon yapılan doz, ticari damla dozunun 100 katıdır (50 mg/mL= %5). Bu yüzden damla formundan daha yüksek dozlara ulaşmak hem de sistemik yan etkilerden kaçınmak için, Gökçe ve Sandri'nin gösterdiği siklosporin-A yüklü soid nano partiküllerin kullanımı ya da Lee ve ark. çalışmasında uygulanan episkleral siklosporin-A implantları gibi yöntemlere alternatif olarak, çalışmamızda etkinliği gösterilen subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonları da alternatif bir uygulama yöntemi olabilir.^{23,24}

Çalışmamızda siklosporin-A enjeksiyonlarının tekrarlanmamasına karşın kornea vaskülarizasyonlarında belirgin gerileme olmuştur. Siklosporin-A enjeksiyonlarının tekrarlanması ile kornea vaskülarizasyonlarında daha belirgin bir gerileme saptanabilir. Bu konuda çalışmamızın kısıtlılığına karşın, inanıyoruz ki gelecekteki çalışmalar bize yol gösterici olacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda oluşturulan deneysel kornea neovaskülarizasyonlarında yeni damar sayısının subkonjonktival siklosporin-A enjeksiyonu ile kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir.

Teşekkür

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasında yardımlarından dolayı Düzce Üniversitesi Turizm Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Biyoistatistik Uzmanı İbrahim Kılıç'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Lee P, Wang CC. Ocular neovascularization; an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998;48(3):245-69.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995;1(1):27-31.
- Schanzlin DJ, Cyr RJ, Friedlaender MH. Histopathology of corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983;101(3):472-4.
- Crum R, Szabo S, Folkman J A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985;230(4732):1375-8.
- Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983;221(4612):719-25.
- Li WW, Casey R, Gonzalez EM, Folkman J. Angiostatic steroids potentiated by sulfated cyclodextrins inhibit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(11):2898-905.
- Kremer I, Cohen EJ, Eagle RC Jr, Udell I, Laibson PR. Histopathologic evaluation of stromal inflammation in Acanthamoeba keratitis. *CLAO J* 1994;20(1):45-8.
- Sönmez K, Atmaca LS. [The latest in current management of age-related macular degeneration]. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006; 2(41):38-47.
- Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; 91(6):804-7.
- Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(2):281-4.
- Yang L, Yang XC, Yang JK, Guo YH, Yi FF, Fan Q, et al. Cyclosporin A suppresses proliferation of endothelial progenitor cells: involvement of nitric oxide synthase inhibition. *Intern Med* 2008;47(16):1457-64.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2004;10(9):1370-6.
- Ma FX, Zhou B, Chen Z, Ren Q, Lu SH, Sawamura T, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res* 2006;47(6):1227-37.
- Hernández GL, Volpert OV, Iñiguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 2001;193(5):607-20.
- Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, et al. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002;46(5):1202-9.
- Rehany U, Waisman M. Suppression of corneal allograft rejection by systemic cyclosporine-A in heavily vascularized rabbit corneas following alkali burns. *Cornea* 1994;13(5):447-53.
- Zhao JC, Jin XY. Local therapy of corneal allograft rejection with cyclosporine. *Am J Ophthalmol* 1995;119(2):189-94.
- Tunc M, Erbilin E. Topical cyclosporine-a combined with mitomycin C for conjunctival and corneal squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol* 2006;142(4):673-5.
- Xie L, Shi W, Wang Z, Bei J, Wang S. Prolongation of corneal allograft survival using cyclosporine in a polylactide-co-glycolide polymer *Cornea* 2001;20(7):748-52.

20. Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty. Short- versus long-term therapy. *Ophthalmology* 1994;101(1):128-33.
21. Unal M, Yücel I. Evaluation of topical cyclosporin 0.05% for prevention of rejection in high-risk corneal grafts. *Br J Ophthalmol* 2008;92(10):1411-4.
22. Poon A, Constantinou M, Lamoureux E, Taylor HR. Topical Cyclosporin A in the treatment of acute graft rejection: a randomized controlled trial. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008;36(5):415-21.
23. Gökçe EH, Sandri G, Eğrilmez S, Bonferoni MC, Güneri T, Caramella C. Cyclosporine a-loaded solid lipid nanoparticles: ocular tolerance and in vivo drug release in rabbit eyes. *Curr Eye Res* 2009;34(11):996-1003.
24. Lee SS, Kim H, Wang NS, Bungay PM, Gilger BC, Yuan P, et al. A pharmacokinetic and safety evaluation of an episcleral cyclosporine implant for potential use in high-risk keratoplasty rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(5):2023-9.