

# Deneyisel Korneal Neovaskularizasyon Modelinde Topikal Bevasizumab, Etanercept ve Her İki İlacın Kombinasyonunun Etkinliğinin Karşılaştırılması

## The Comparison of Efficacy of Topical Bevacizumab, Etanercept and the Combination of Both Drugs on Experimental Corneal Neovascularization

Özdemir ÖZDEMİR,<sup>a</sup>  
Özgül ALTINTAŞ,<sup>b</sup>  
Levent ALTINTAŞ,<sup>c</sup>  
Demir Kürşat YILDIZ,<sup>d</sup>  
Ender ŞENER,<sup>e</sup>  
Nurşen YÜKSEL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Göz Hastalıkları Polikliniği,  
Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve  
Araştırma Hastanesi,  
Ankara

<sup>b</sup>Göz Hastalıkları AD,

<sup>c</sup>Tıbbi Patoloji AD,

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,

<sup>d</sup>İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü,

Kocaeli Üniversitesi

İzmit Meslek Yüksekokulu,

Kocaeli

<sup>e</sup>Göz Hastalıkları Polikliniği,

Tokat Devlet Hastanesi, Tokat

Geliş Tarihi/Received: 10.05.2012

Kabul Tarihi/Accepted: 20.08.2012

Yazışma Adresi/Correspondence:

Özdemir ÖZDEMİR

Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve

Araştırma Hastanesi,

Göz Hastalıkları Polikliniği, Ankara,

TÜRKİYE/TURKEY

ozdemirozdemir@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Ratlarda oluşturulan deneysel korneal neovaskularizasyon modelinde topikal uygulanan bevasizumab, etanercept ve her iki ilacın kombinasyonunun etkinliğinin karşılaştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** Yirmi sekiz Wistar-Albino erkek rat çalışmaya alındı. Ratların sol korneaları gümüş nitrat çubuk ile koterize edildi. Her grupta yedi denek olacak şekilde denekler rastgele dört gruba ayrıldı. Koterizasyondan hemen sonra Grup 1'e serum fizyolojik damla, Grup 2'ye 10 mg/mL bevasizumab damla, Grup 3'e 10 mg/mL etanercept damla, Grup 4'e 10 mg/mL bevasizumab ve 10 mg/mL etanercept damla bir hafta boyunca günde iki kez damlatıldı. Ratlar sekizinci günde sakrifiye edildi. Gözlerin enükleasyonundan önce dijital fotoğraflar çekildi. Korneal neovaskularizasyon alanı fotoğraflar üzerinden hesaplandı. Korneal kesitler histopatolojik olarak incelendi. **Bulgular:** Yanık skoru tüm gözlerde +1 veya daha yüksek bulundu. Tedavi gruplarının neovaskularizasyon skorları kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük saptandı ( $p<0.05$ ). Ortalama korneal neovaskularizasyon alanı Grup 1'de  $77,4\pm 6,8$  ( $\pm$ SD), Grup 2'de  $47,7\pm 9,5$  ( $\pm$ SD), Grup 3'te  $58,0\pm 12,9$  ( $\pm$ SD) ve Grup 4'te  $30,1\pm 11,6$  ( $\pm$ SD) bulundu. Topikal bevasizumab, topikal etanercept ve topikal kombinasyon tedavisinin etkili olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Histopatolojik incelemelerde en az neovaskularizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu ve fibroblast aktivitesi Grup 4'te tespit edildi ( $p<0,05$ ). **Sonuç:** Etanercept, bevasizumab gibi korneal neovaskularizasyonun tedavisinde etkilidir. Bevasizumab ve etanercept kombinasyonu, korneal neovaskularizasyonu monoterapilere göre daha fazla engellemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bevasizumab; tümör nekroze edici faktörler; damar endoteli büyüme faktörleri; korneal yenidamarlanma; TNFR-Fc füzyon proteini

**ABSTRACT Objective:** To compare the effect of topically applied bevacizumab, etanercept and the combination of both drugs on experimental corneal neovascularization in rats. **Material and Methods:** Twenty-eight Wistar-Albino male rats were used. The left corneas of rats was cauterized with silver nitrate sticks. Seven subjects in each group were randomly selected and divided into four groups. Immediately after the cauterization Group 1 received saline drops, Group 2 received 10 mg/mL bevacizumab drops, Group 3 received 10 mg/mL etanercept drops, Group 4 received combination of 10 mg/mL bevacizumab and 10 mg/ml etanercept drops. The rats were euthanized on the eighth day and digital photographs were obtained before the eyes enucleated. The area of corneal neovascularization was calculated from digital photographs. Corneal sections were analyzed by histopathologically. **Results:** The burn stimulus score was +1 or higher in all eyes. Neovascularization scores in treatment groups were lower than the control group ( $p<0.05$ ). The area of corneal neovascularization was  $77.4\pm 6.8\%$  ( $\pm$ SD) in Group 1,  $47.7\pm 9.5\%$  ( $\pm$ SD) in Group 2,  $58.0\pm 12.9\%$  ( $\pm$ SD) in Group 3 and  $30.1\pm 11.6\%$  ( $\pm$ SD) in Group 4. Bevacizumab drops, etanercept drops and combination of bevacizumab and etanercept drops inhibited corneal neovascularization ( $p<0.05$ ). In histopathological examination, Group 4 had less neovascularization, inflammation and fibroblast activity than the others groups ( $p<0.05$ ). **Conclusion:** This study has shown that etanercept is effective in the treatment of corneal neovascularization such as bevacizumab. The combination of bevacizumab and etanercept inhibits corneal neovascularization more than the monotherapies.

**Key Words:** Bevacizumab; tumor necrosis factors; vascular endothelial growth factors; corneal neovascularization; TNFR-Fc fusion protein

Dış dünyadan aldığımız bilgilerin %80'inden fazlası gözümüz yoluyla elde edilir. Görsel bilgilerin göze giriş yeri ve insanın görmesini sağlayan gözün optik penceresi korneadır.<sup>1,2</sup> Kornea gözün avasküler dokusudur ve ışığı uygun şekilde kırması için saydam kalması gerekmektedir.<sup>3</sup>

Gözün kimyasal yaralanmaları epitel yüzeyinde, korneada ve ön segmentte ciddi hasar oluşturarak tek ya da çift taraflı kalıcı görme kaybıyla sonuçlanabilir.<sup>4</sup> Kimyasal yanıklar (alkali yanıklar gibi) kornea stromasının en ciddi yaralanmalarından biridir. Kimyasal yanıklar persistan ülserasyona, opasifikasyona, skar oluşumuna ve neovaskülarizasyona neden olarak kalıcı görme kaybıyla sonuçlanabilir. Korneada alkali yanıklara bağlı komplikasyonların patogenezinde rol oynayan hücre popülasyonunun ana bileşenleri mezenkimal hücreler (aktive keratositler, miyofibroblastlar), makrofajlar ve neovaskülarizasyon faktörleridir.<sup>5-7</sup>

Anjiyogenezis, var olan damarlardan yeni damarsal yapıların gelişmesi olarak tanımlanmıştır. Korneal neovaskülarizasyon, anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin bozulup anjiyogenik tarafa kaymasıyla ortaya çıkar.<sup>8</sup> Enfeksiyöz, inflamatuvar, dejeneratif ya da travmatik hastalıklar korneal neovaskülarizasyon oluşturabilir.<sup>9</sup> Korneal neovaskülarizasyon skar oluşumuna, lipid depolanmasına, korneal greft reddine yol açtığından ciddi görme kaybına neden olur.<sup>10</sup> Vasküler büyüme genelde inflamatuvar hücreler, miyofibroblastlar ve arka segmentte glial ya da aktif pigment epitel hücrelerini de içeren yara iyileşmesi yanıtının bir parçasıdır. İnsan ve hayvan modellerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin korneal neovaskülarizasyonda etkili olduğu bulunmuştur.<sup>11-13</sup> Son yıllarda yapılan çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda bevasizumabın topikal ve subkonjonktival kullanımının korneal neovaskülarizasyonun gelişimini engellediği, diğer anti-VEGF ajanlarla karşılaştırıldığında bevasizumabın korneal neovaskülarizasyon inhibisyonunda daha etkili olduğu gösterilmiştir.<sup>14-18</sup>

Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) inflamatuvar, ödematöz, neovasküler ve nörodejeneratif oküler ve ekstraoküler hastalıkların patogenezinde

aktif rol oynamaktadır.<sup>19</sup> Alkali yanıklı kornealarda artan sitokinlerden biri de majör proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ 'dır.<sup>20</sup> Bazı hayvanlarda TNF blokajının korneal allogreft yaşam süresini artırdığından korneal allogreft rejeksiyonu tedavisinde dikkate alınması gerektiği rapor edilmiştir.<sup>21</sup> İnterlökin-4 (IL-4) ya da IL-13 ile TNF- $\alpha$ 'nın birlikte insan korneal fibroblastlarını stimülasyonu hücre yüzeyinde vasküler hücresel adezyon molekülü-1 (VCAM-1) salınımı ile sonuçlanmıştır.<sup>22</sup> Anti-TNF monoklonal antikorlardan infliksimab veya etanercept uygulanarak yapılan antiinflamatuvar tedavinin koroidal neovaskülarizasyonu geriletmediği ve yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) hastalarında görme keskinliği artışı sağladığı bildirilmiştir.<sup>23-26</sup> Etanerceptin çeşitli üveit tiplerinin tedavisinde inflamasyonu baskılamada etkili olduğu gösterilmiştir.<sup>27-30</sup>

Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyon modelinde topikal uygulanan bevasizumab, etanercept ve her iki ilacın kombinasyonunun etkinliğini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun "HADYEK 1/4-2010" karar numaralı izniyle ve "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensipleri doğrultusunda hayvan hakları korunarak yapıldı. Ağırlıkları 250-350 g arasında değişen toplam 28 Wistar-Albino cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Tüm ratlar ayrı gruplar halinde, ayrı kafesler içerisinde, optimum nem ve sıcaklıkta, uygun şartlarda ve standart koşullar altında tutuldu.

Ratlar her bir grupta yedi denek olacak şekilde randomize dört gruba (kontrol, topikal bevasizumab, topikal etanercept, topikal bevasizumab+ etanercept) ayrıldı. Anestezi ve analjezi uygulandıktan sonra tüm ratların gözleri muayene edilerek her iki gözü de sağlam ve sağlıklı olan ratların sol gözlerinin kornea santraline %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış çubukla (HemoStop; Hizmet Medikal, İstanbul) Mahoney ve Waterbury

tarafından tanımlandığı gibi 8 saniye süresince koter yapılarak yaklaşık 2 mm genişlikte kimyasal yanık oluşturuldu (Resim 1 a,b).<sup>31</sup> Koterizasyondan sonra geride kalabilecek kimyasal partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması için kornea ve forniksler 10 mL %0,9 sodyum klorür izotonik ile yıkanarak temizlendi.

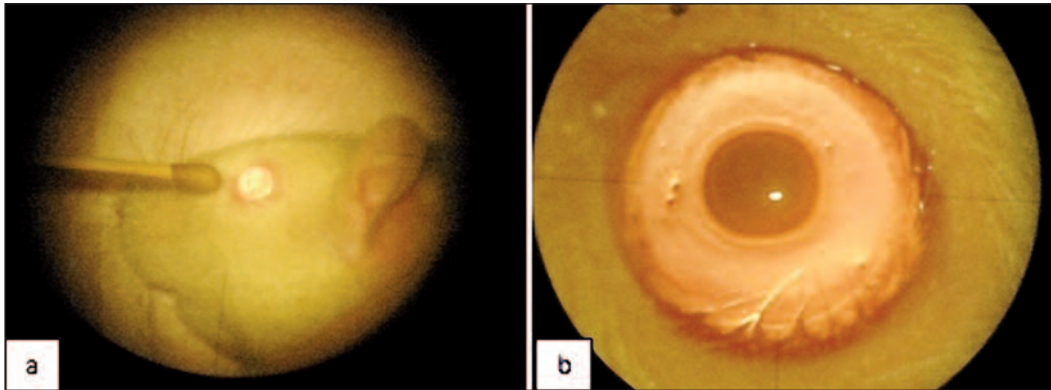
Kontrol grubundaki ratlara (Grup 1) %0,9 sodyum klorür izotonik damla günde iki kez damlatıldı. Topikal bevasizumab grubundaki ratlara (Grup 2) %0,9 sodyum klorür izotonik ile seyreltilerek 10 mg/mL dozunda hazırlanan bevasizumab damla (Altuzan® Flakon 400 mg/16 mL konsantrasyon çözeltisi, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, İsviçre lisansı ile Genentech Inc., Güney San Fransisko, ABD) günde iki kez damlatıldı. Topikal etanercept grubundaki ratlara (Grup 3) enjeksiyonluk su ile sulandırılarak 10 mg/ml dozunda hazırlanan etanercept damla (25 mg, Enbrel® Flakon, Wyeth Laboratories, New Lane, Havant, İngiltere) günde iki kez damlatıldı. Topikal bevasizumab+etanercept grubundaki ratlara ise (Grup 4) 10 mg/mL bevasizumab ve 10 mg/mL etanercept ile hazırlanan damlalar 10'ar dakika ara ile günde iki kez damlatıldı. Damlalar deneklerin kornealarında kimyasal yanık oluşturulduktan hemen sonra damlatılmaya başlandı ve bir hafta boyunca damlatıldı. Hazırlanan damlalar buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kimyasal yanık oluşturulması ve damla damlatılması işlemleri aynı araştırmacı tarafından yapıldı.

## ANESTEZİ TEKNİĞİ

Anestezi ve analjezi uygulamasında intraperitoneal 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun®, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına %0,5'lik proparakain hidroklorid damla (Alcaine® %0,5 Steril Oftalmik Solüsyon, Alcon-Couvreur n.v., Belçika) damlatıldı. Deney süresi tamamlanan ratlara önce izofluran ile inhalasyon anestezisi uygulandı, genel anestezi sonrası intrakardiyak yüksek doz ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorür verilerek sakrifiye edildi ve ratların sol gözlerine enükleasyon uygulandı.

## YANIK VE NEOVASKÜLARİZASYON ALANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ratlar sekizinci günde sakrifiye edildikten sonra korneadaki kimyasal yanık alanları ve neovaskülarizasyon alanları, ameliyat mikroskobu altında, Mahoney ve Waterbury tarafından tanımlandığı şekilde derecelendirildi.<sup>31</sup> Mahoney ve Waterbury, yanık skorlarını oluşturan 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; neovaskülarizasyon skorlarını ise oluşan neovaskülarizasyonun kornea yanık alanına uzaklığına göre: 0 (Kornea yüzeyinde neovaskülarizasyon yok), +1,5 (1/4 uzaklıkta), +2 (1/3 uzaklıkta), +3 (1/2 uzaklıkta), +4 (2/3 uzaklıkta), +4,5 (3/4 uzaklıkta), +6 (Yanık alanına ulaşmış) şeklinde tanımlamışlardır.<sup>31</sup>

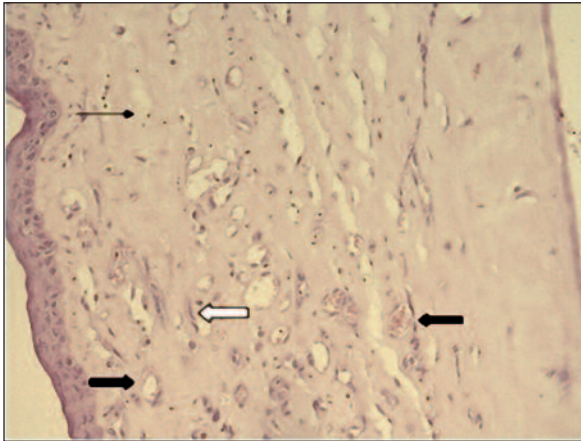


**RESİM 1: a)** Gümüş nitrat çubuklarıyla kimyasal koterizasyon, **b)** Kimyasal koterizasyondan hemen sonra oluşan yanığın görünümü. (Renkli hali için Bkz. <http://oftalmoloji.turkiyeklinikleri.com>)

Korneal neovaskülarizasyon alanı ise ameliyat mikroskobunun okülerinden aynı büyütmeye fotoğraf makinesiyle (Canon Digital Ixus 70®, Japonya) korneaların fotoğrafları çekilerek belirlendi. Fotoğraflar üzerinde neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Elektronik Bilgisayar Eğitimi Bölümü'nün katkılarıyla MATLAB R2007b version 7,5. (MathWorks, Natick, Massachusetts, ABD) programı kullanılarak hesaplandı.

## HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Sakrifikasyon sonrası enükleasyon uygulanan gözler %10'luk formaldehitte dolu kaplara kondu. Fiksasyon sonrasında limbustan limbusa uzanan, kornea santralinden geçen en az üç kesit alındı. Dokular yıkandı ve sırasıyla alkol, ksilen, parafin aşamalarından geçirildi. Daha sonra parafin bloklara gömülerek 5 µ kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler Hematoksilin-Eosin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu ile çalışma gruplarını bilmeyen bir patolog tarafından incelendi. Örnekler neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından değerlendirildi. Örnekler +1'den +3'e kadar değerler verilerek bir derecelendirilme oluşturuldu (Resim 2).



**RESİM 2:** Bu örnekte neovaskülarizasyonun derin stromaya kadar indiği, yoğun ve yaygın damarlanma olduğu görüldü. Vaskülarizasyon yoğunluğu +4, inflamasyon yoğunluğu +3 ve fibroblast aktivitesi +2 olarak değerlendirildi. Siyah kalın oklar damar yapılarının kesitini ve içerisindeki boyanmış eritrositleri, beyaz kalın ok stromadaki fibroblastları, siyah ince ok diğer inflammatuar hücreleri göstermektedir (ışık mikroskobu, HE, x 400).

(Renkli hali için Bkz. <http://oftalmoloji.turkiyeklinikleri.com>)

**Neovaskülarizasyon Yoğunluğu:** +1: Minimal ya da negatife yakın damarlanma. +2: Subepitelyal, ön stromal alanda sınırlı veya fokal damarlanma. +3: +2 ile +4 arasında kalan durumlar. +4: Yoğun ve yaygın damarlanma.

**İnflamasyon Yoğunluğu:** +1: Minimal ya da negatife yakın inflamasyon. +2: Fokal, az sayıda mikst tip inflammatuar hücre (lenfosit, nötrofil lökosit, eozinofil lökosit). +3: +2 ile +4 arasında kalan durumlar. +4: Diffüz, yoğun mikst tip inflammatuar hücre.

**Fibroblast Aktivitesi:** +1: Minimal ya da negatife yakın fibroblast aktivitesi. +2: Fokal fibroblast aktivitesi. +3: +2 ile +4 arasında kalan durumlar. +4: Yoğun ve yaygın fibroblast aktivitesi.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmanın istatistiksel analizi, Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 16 (SPSS, Windows versiyon 16) paket programı ile yapıldı. Korneal neovaskülarizasyon alanının hesaplanmasıyla elde edilen sayısal veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak; yanık skoru, neovaskülarizasyon skoru ve histopatolojik inceleme sonuçlarıysa ortanca±aralık olarak verildi. Gruplar arası çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanıldı. İstatistiksel açıdan anlamlı fark görüldüğünde farklılığın hangi grupla ilişkili olduğunu belirlemek için gruplar arası ikili karşılaştırma Mann-Whitney U testi ile yapıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Yanık skorları tüm rat gözlerinde +1 ve üzerinde idi. Grup 1'de  $2,0 \pm 1,0$ , Grup 2'de  $2,0 \pm 0$ , Grup 3'te  $2,0 \pm 1,0$  ve Grup 4'te  $2,0 \pm 1,0$  idi. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ( $p = 0,154$ ).

Her bir ratın neovaskülarizasyon skoru ve grupların ortanca ( $\pm$  aralık) değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Neovaskülarizasyon skorları incelendiğinde gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıydı ( $p = 0,001$ ). Tedavi gruplarının neovaskülarizasyon skorları kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük saptandı ( $p < 0,05$ ). Tedavi edilen

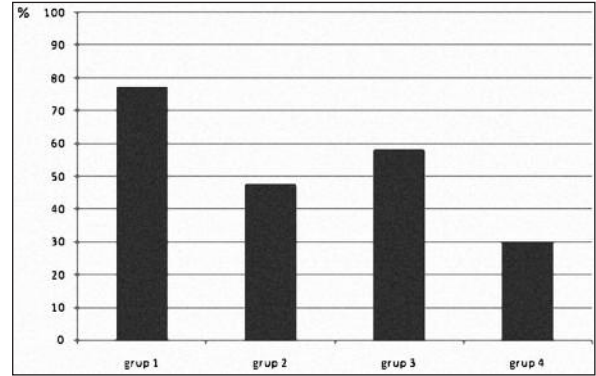
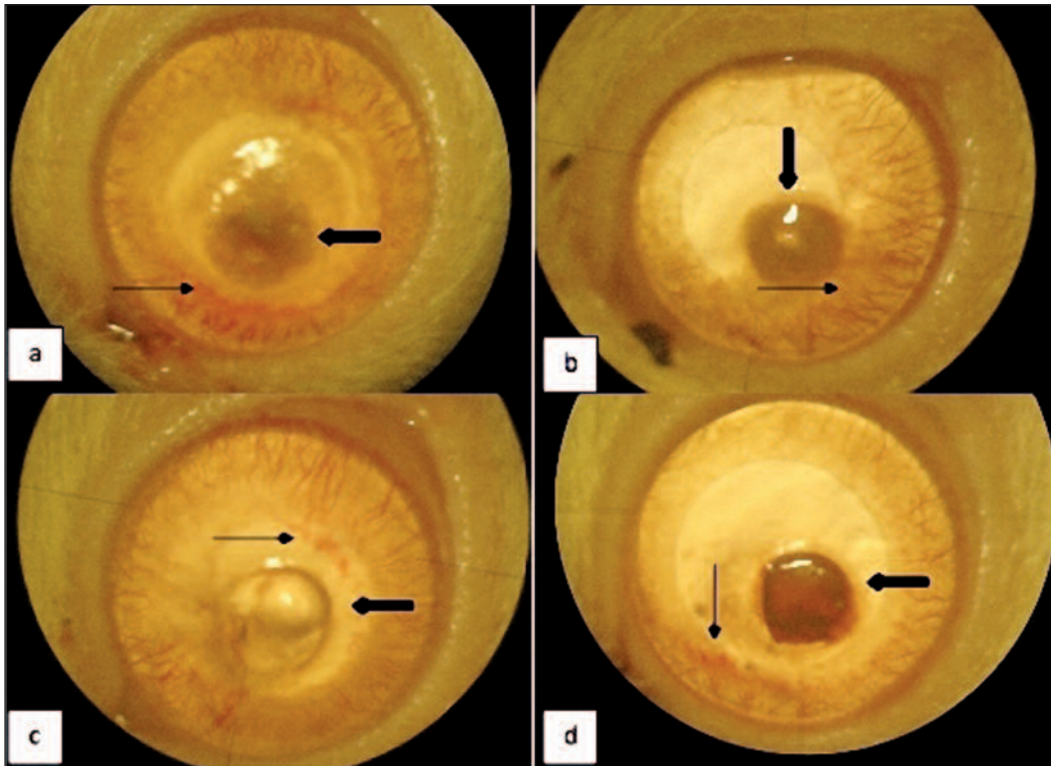
**TABLO 1:** Her bir ratın neovaskülarizasyon skoru ve grupların ortanca ( $\pm$  aralık) değerleri.

Rat no	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
1	6,0	6,0	4,5	1,5
2	6,0	3,0	2,0	1,5
3	6,0	3,0	6,0	2,0
4	6,0	3,0	6,0	3,0
5	4,5	2,0	3,0	1,5
6	6,0	6,0	3,0	1,5
7	6,0	4,5	3,0	1,5
Ortanca	6,0 $\pm$ 1,5	3,0 $\pm$ 4,0	3,0 $\pm$ 4,0	1,5 $\pm$ 1,5

gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, Grup 2 ile Grup 3'e uygulanan tedavi benzer ( $p=1,000$ ), Grup 4'e uygulanan tedavi ise daha etkili bulundu ( $p<0,05$ ).

Ortalama korneal neovaskülarizasyon alanı Grup 1'de %77,4 $\pm$ 6,8, Grup 2'de %47,7 $\pm$ 9,5, Grup 3'te %58,0 $\pm$ 12,9 ve Grup 4'te %30,1 $\pm$ 11,6 idi (Şekil 1). Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

idi ( $p=0,000$ ). Gruplar arası çoklu karşılaştırmada, tedavi gruplarının ortalama korneal neovaskülarizasyon alanı kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p<0,05$ ). En az neovaskülarizasyon alanı Grup 4'te tespit edildi. Grup 4 ile Grup 2 arasındaki fark ( $p=0,021$ ) ve Grup 4 ile Grup 3 arasındaki fark ( $p=0,006$ ) istatistiksel olarak anlamlı idi. Grup 2 ile Grup 3 arasındaki farksa istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,142$ ) (Resim 3 a,b,c).

**ŞEKİL 1:** Grupların korneal neovaskülarizasyon alanı ortalamaları.**RESİM 3:** Sekizinci günde rat kornealarında neovaskülarizasyonları gösteren fotoğraflar. a) Grup 1, b) Grup 2, c) Grup 3, d) Grup 4. Kalın ok kimyasal koterizasyon sonrası skar oluşumunu gösteriyor. İnce ok limbustan başlayıp yanık alanına doğru ilerleyen neovaskülarizasyonları gösteriyor.

(Renkli hali için Bkz. <http://oftalmoloji.turkiyeklinikleri.com>)

Histopatolojik preparatların incelenmesinde neovaskülarizasyon yoğunluğu, inflamasyon yoğunluğu, fibroblast aktivitesi açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0,05$ ) (Tablo 2).

**Neovaskülarizasyon Yoğunluğu:** Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'ün neovaskülarizasyon yoğunluğu Grup 1'e göre daha az bulundu, istatistiksel açıdan fark anlamlı idi ( $p<0,05$ ). Tedavi edilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında topikal kombinasyon tedavisinin diğerlerinden üstün olduğu ( $p<0,05$ ), topikal bevasizumab ve topikal etanercept tedavisinin arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ( $p=0,430$ ).

**İnflamasyon Yoğunluğu:** Tedavi grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bulunan fark istatistiksel açıdan anlamlı idi ( $p<0,05$ ). Gruplar arası karşılaştırmada en az inflamasyon yoğunluğu Grup 4'te görüldü ( $p<0,05$ ). Grup 2 ile Grup 3 arasında fark yoktu ( $p=1,0$ ).

**Fibroblast Aktivitesi:** Diğer histopatolojik incelemelerden farklı olarak Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p>0,05$ ). Grup 4'te görülen fibroblast aktivitesi ise diğer gruplardan daha azdı ( $p<0,05$ ).

## TARTIŞMA

Sağlıklı insan korneasında herhangi bir damar yapısı bulunmamaktadır. Ancak çeşitli patolojiler sonucunda korneada derin ya da yüzeysel vaskülarizasyonlar oluşabilmektedir. Bu damarlar görme seviyesini olumsuz yönde etkilemekte, inflamasyon oluşturmakta ve kornea nakli gibi ameliyatların prognozu üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Korneal neovaskülarizasyonu tedavi etmek için medikal veya cerrahi yöntemler uygulanmaktadır. Topikal kortikosterooidler proliferen olan korneal damarların baskılanmasında temel tedavidir.<sup>31-34</sup> Stre-

oidlerin yanı sıra non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, rapamisin, siklosporin-A ve metotreksat da klinikte kullanılmaktadır.<sup>35,36</sup> Cerrahi tedaviler damarları tıkamayı hedefleyen argon lazer, elektro-koagülasyon, fotodinamik tedavi ile oküler yüzeyi onaran konjonktival, limbal ve amniyon zar transplantasyonunu içerir.<sup>9</sup>

Son yıllarda VEGF inhibitörleri retina, koroid, iris ve kornea neovaskülarizasyonlarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. VEGF, ilk olarak 1983 yılında yoğun damarlı tümörlerde tanımlanmış 46 kilodalton (kDa) ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir ve anjiyogenezin proliferasyon, migrasyon, proteolitik aktivite ve kapiller tüp oluşumu gibi birçok basamağını ilerleten, hem patolojik hem de normal anjiyogenezde rol alan potent bir anjiyogenik stimülatördür.<sup>37,38</sup> İnsan VEGF'sine spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden, rekombinant hümanize monoklonal antikor olan bevasizumab korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde öne çıkmaktadır.<sup>18</sup> Bevasizumab, gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Chinese Hamsterinin over memeli hücresi ekspresyon sisteminde rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur ve spesifik viral inaktivasyon ve çıkarılma aşamalarından oluşan bir süreç ile saflaştırılır. Bevasizumab 214 aminoasitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 149 kDa'dır. Bevasizumab, 5-florourasil/folinik asit veya 5-florourasil/folinik asit/irinotekan ile kombine olarak metastatik kolon ve metastatik rektum kanserinin birinci basamak tedavisinde kullanılır.<sup>39</sup> Bevasizumab ülkemizde ve diğer ülkelerde göz hastalıklarında endikasyon dışı kullanılmaktadır.

Manzano ve ark. ratlarla yaptıkları çalışmada, günde iki kez 4 mg/mL topikal bevasizumab damla uygulamasının kimyasal yanık sonrası oluşturulan

**TABLO 2:** Histopatolojik inceleme sonuçlarında elde edilen grupların ortanca ( $\pm$  aralık) değerleri.

Gruplar	Neovaskülarizasyon yoğunluğu	İnflamasyon yoğunluğu	Fibroblast aktivitesi
Grup 1	4,0 $\pm$ 0	4,0 $\pm$ 0	4,0 $\pm$ 1,0
Grup 2	3,0 $\pm$ 3,0	3,0 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 1,0
Grup 3	3,0 $\pm$ 2,0	3,0 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 2,0
Grup 4	2,0 $\pm$ 2,0	2,0 $\pm$ 2,0	2,0 $\pm$ 2,0

korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir.<sup>14</sup> Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler Manzano'nun çalışmasındaki verilerle karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Koenig ve ark. çeşitli oküler hastalıklara sekonder gelişen korneal neovaskülarizasyon tedavisinde 5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan bevasizumab göz damlasını günde beş kez uygulamış ve neovaskülarizasyonun inhibisyonunda ve damar çapının azalmasında topikal bevasizumab uygulamasının etkili olduğu ve iyi tolere edildiği sonucuna ulaşmışlardır.<sup>15</sup> DeStafeno ve Kim, iki hastaya altı ay boyunca günde dört kez uyguladıkları 10 mg/mL konsantrasyonundaki topikal bevasizumab tedavisinin korneal neovaskülarizasyonu geriletmede başarılı olduğunu ve herhangi oküler yan etkiye rastlanmadığını bildirmişlerdir.<sup>40</sup> Topikal bevasizumab 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 bevasizumab kullanılmıştır. Çalışmamızda 10 mg/mL dozunda hazırlanıp, günde iki kez damlatılan topikal bevasizumab tedavisi etkili ve yeterli bulunmuştur. Elde ettiğimiz bulgular, topikal bevasizumab tedavisinin korneal neovaskülarizasyon gelişimini azaltmada etkin bir tedavi olduğunu desteklemektedir.

İnflamatuar bir stokin olan TNF, inflamasyon oluşumu ve apoptozis dışında, anjiyogenik süreçlerde de önemli bir rol oynamaktadır. TNF- $\alpha$ , anjiyogenik faktörler olan VEGF, basic fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve IL-8 ekspresyonunu artırmaktadır.<sup>41,42</sup> Kumagai ve ark., insan korneal fibroblastlarının, IL-4 ya da IL-13 ile TNF- $\alpha$ 'nın birlikte stimülasyonu hücre yüzeyinde VCAM-1 ekspresyonuna neden olduğunu göstermişlerdir.<sup>22</sup> TNF- $\alpha$  inhibitörleri, TNF- $\alpha$  ya da reseptörlerini engellemekte, VEGF miktarını düşürmekte ve immünomodülatör ajanlarla sinerjistik çalışmaktadır.<sup>43</sup> Koroidal neovasküler membrandan elde edilen makrofajların TNF- $\alpha$  sentezleyerek ve retina pigment epitelinden VEGF üretimini tetikleyerek koroidal neovaskülarizasyon oluşumunda katkıda bulunduğu bildirilmiştir.<sup>44</sup> Korneal allogreft reddi tedavisinde anti-TNF kullanılması

kornea yara iyileşmesi ve inflamasyon süreçlerini etkileyerek greft yaşam süresini artırdığına dair yayınlar mevcuttur.<sup>21,45</sup> Lichtlen ve ark. çalışmalarında, maymunlarda oluşturulan deneysel koroid neovaskülarizasyonu tedavisinde anti-VEGF ajanlar ve TNF- $\alpha$  inhibitörlerini karşılaştırmışlar, gruplardan birine bevasizumab, diğer ikisine TNF- $\alpha$  inhibitörleri olan adalimumab ve ESBA-105 intravitreal yolla uygulamış ve tüm tedavilerin etkili olduğu göstermişlerdir.<sup>46</sup> Shi ve ark., deneysel oluşturulan YBMD modelinde, etanerceptin neovaskülarizasyon boyutunda ve lezyonda oluşan kaçakta azalma sağladığını bildirmişlerdir.<sup>25</sup> Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde etanerceptin etkisinin araştırılması için sistemik, subkonjonktival ve topikal uygulanmaları üzerine yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Son yıllarda korneal neovaskülarizasyonun, bevasizumab ile deksametazon, triamsonolon asetonid, verteporfinin gibi çeşitli ilaçların kombine edilerek tedavi edilmesine dair çalışmalar yayımlanmıştır. Veritti ve ark., yayımladıkları olgu sunumunda korneal greft yetmezliğine bağlı gelişen korneal neovaskülarizasyon bulunan bir hastaya subkonjonktival bevasizumab, subkonjonktival triamsonolon asetonid ve verteporfin kullanarak fotodinamik terapi uygulamış ve bu üçlü tedavinin korneal neovaskülarizasyon tedavisinde ümit verici olduğunu belirtmişlerdir.<sup>47</sup> Kang ve Chung, tavşanlarda oluşturdukları korneal neovaskülarizasyon modelinde birinci gruba bevasizumab, ikinci gruba triamsonolon asetonid ve üçüncü gruba ise bu iki ilacı birlikte subkonjonktival enjekte ederek grupları karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, kombinasyon tedavisinin korneal neovaskülarizasyonda dikkat çekici bir gerileme sağladığını bildirmişlerdir.<sup>48</sup> Hofart ve ark., rat kornealarında kimyasal yanıkla indüklenen neovaskülarizasyonu salin, bevasizumabın farklı dozları ve bevasizumab-deksametazon kombinasyonu ile tedavi etmiş, sonuç olarak kombinasyon terapisinin monoterapi yaklaşımlarından avantajlı olduğunu göstermişlerdir.<sup>49</sup>

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde anti-anjiyogenik bir ajan ile antiinflamatuvar bir ajanın birlikte kullanılması monoterapilere göre daha etkili olabilir. Bevasizumab sadece VEGF'yi inhibe

etmekte, korneal neovaskularizasyon patogene- zinde yer alan diğer faktör ve sitokinlere ise etki etmemektedir. Etanercept ise inflamasyonu, löko- sit göçünü, sitokinlerin indüklediği interselüler adezyon molekülü-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi vasküler adezyon moleküllerini azaltmaktadır.<sup>47,50</sup>

## SONUÇ

Aktif olarak büyüyen ya da yerleşmiş korneal neo- vaskularizasyonda henüz ideal antianjiyogenik

tedavi bulunamamıştır ve araştırmalar devam et- mektedir. Anti-TNF ajanlardan etanercept korneal neovaskularizasyon tedavisinde kullanılmaya aday bir ilaçtır. Çeşitli inflamatuvar, enfeksiyöz, travma- tik ve korneal greft reddi ile ilişkili korneal neo- vaskularizasyon tedavisinde streoidler gibi konvan- siyonel ajanların yetersiz kaldığı durumlarda anti- VEGF ajanlar ya da kombine tedaviler kullanılabi- lir. Anti-VEGF ajanlar ile anti-TNF ajanların kombinasyonu dirençli korneal neovaskularizasyo- nun tedavisinde etkili bir yöntem olabilir.

## KAYNAKLAR

1. Nishida T. Basic science: cornea, sclera, and ocular adnexa anatomy, biochemistry, physi- ology, and biomechanics. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. Cornea: Funda- mentals, Diagnosis and Management. 2<sup>nd</sup>ed. China: Elsevier Mosby; 2005. p.3-26.
2. Lang GK. [Cornea]. Sezen F, çeviri editörü. Göz Hastalıkları El Kitabı 1. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. p.117-30.
3. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, So- tozono C, Kinoshita S. Growth factors: impor- tance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000;19(1):113-29.
4. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and ther- apy. *Surv Ophthalmol* 1997;41(4):275-313.
5. Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, Lough- nan M, Sullivan L, Daniell M, et al. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review. *Ophthalmology* 2000;107(10):1829-35.
6. Saika S, Kobata S, Hashizume N, Okada Y, Yamanaka O. Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. *Immunohisto- chemical study. Cornea* 1993;12(5):383-90.
7. Ishizaki M, Zhu G, Haseba T, Shafer SS, Kao WW. Expression of collagen I, smooth muscle a-actin, and vimentin during the healing of al- kali-burned and lacerated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(12):3320-8.
8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1(1):27-31.
9. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Oph- thalmol* 2001;12(4):242-9.
10. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization: pathogene- sis and inhibition. *Cornea* 1987;6(4):250-7.
11. 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(9):2514-22.
12. Senger DR. Molecular framework for angio- genesis. A complex web of interactions be- tween extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angio- genic cytokines. *Am J Pathol* 1996;149(1):1-7.
13. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular en- dothelial growth factor (rhVEGF165) stimu- lates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1994;8(6):961-5.
14. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvou- nis PE, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (avastin). *Br J Ophthalmol* 2007;91(6):804-7.
15. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C. Short-and long-term safety pro- file and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops against corneal neo- vascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthal- mol* 2009;247(10):1375-82.
16. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan AH. Effect of subcon- junctival bevacizumab (avastin) on experi- mental corneal neovascularization in Guinea pigs. *Cornea* 2008;27(3):357-62.
17. Erdurman M, Totan Y. Subconjunctival be- vacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(10):1577-9.
18. Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, Yilmaz B, Ozdemir O, Caglar Y, et al. The impact of sub- conjunctivally injected EGF and VEGF inhibi- tors on experimental corneal neovascularization in rat model. *Curr Eye Res* 2011;36(11):1005-13.
19. Rodrigues EB, Farah ME, Maia M, Penha FM, Regatieri C, Melo GB, et al. Therapeutic mo- noclonal antibodies in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res* 2009;28(2):117-44.
20. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea* 2007;26(9 Suppl 1):70-4.
21. Rayner SA, King WJ, Comer RM, Isaacs JD, Hale G, George AJ, et al. Local bioactive tu- mour necrosis factor (TNF) in corneal allo- transplantation. *Clin Exp Immunol* 2000; 122(1):109-16.
22. Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T. Synergistic effect of TNF- $\alpha$  and either IL-4 or IL-13 on VCAM-1 expression by cultured human corneal fibroblasts. *Cornea* 2003; 22(6):557-61.
23. Markomichelakis NN, Theodossiadis PG, Sfikakis PP. Regression of neovascular age- related macular degeneration following inflix- imab therapy. *Am J Ophthalmol* 2005; 139(3):537-40.
24. Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfikakis PP, Vergados IA, Theodossiadis GP. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2009;147(5):825-30.
25. Shi X, Semkova I, Muther SB, Dell S, Kociok N, Jousen AM. Inhibition of TNF- $\alpha$  reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2006;83(8):1325-34.
26. Olson JL, Courtney RJ, Mandava N. Intravit- real infliximab and choroidal neovasculariza- tion in an animal model. *Arch Ophthalmol* 2007;125(9):1221-4.
27. Taban M, Dupps WJ, Mandell B, Perez VL. Etanercept (enbrel)-associated inflammatory eye disease: case report and review of the li- terature. *Ocular Immunol Inflam* 2006; 14(3):145-50.
28. Avunduk MC, Avunduk AM, Oztekin E, Baltaci AK, Ozyazgan Y, Mogolkoc R. Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp Eye Res* 2004;79(3):357-65.



29. Reiff A, Takei S, Sadeghi S, Stout A, Shaham B, Bernstein B, et al. Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthritis Rheum* 2001;44(6):1411-5.
30. Smith JR, Levinson RD, Holland GN, Jabs DA, Robinson MR, Whitcup SM, et al. Differential efficacy of tumor necrosis factor inhibition in the management of inflammatory eye disease and associated rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001;45(3):252-7.
31. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985;4(5):531-5.
32. Nikolic L, Friend J, Taylor S, Thoft RA. Inhibition of vascularization in rabbit corneas by heparin: cortisone pellets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27(4):449-56.
33. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983;101(4):640-3.
34. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(10):1954-62.
35. Kwon YS, Kim JC. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. *Exp Mol Med* 2006;38(2):173-9.
36. Yüksel H, Tunç M, Yıldırım Ü, Önder İ, Kılıç Ç. [Role of subconjunctival cyclosporin-a in treatment of experimental corneal neovascularization]. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2010;19(4):226-33.
37. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219(4587):983-5.
38. Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res* 1997;29(5):354-62.
39. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333(2):328-35.
40. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophth* 2007;125(6):834-6.
41. Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273(34):22128-35.
42. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17(7):4015-23.
43. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):364-71.
44. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, et al. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):1891-8.
45. Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical soluble tumor necrosis factor receptor type 1 suppresses ocular chemokine gene expression and rejection of allogeneic corneal transplants. *Arch Ophthalmol* 2000;118(12):1666-71.
46. Lichtlen PD, Lam T, Nork M, Streit T, Urech DM. Relative contribution of VEGF and TNF-alpha in the cynomolgus laser-induced CNV model: comparing efficacy of bevacizumab, adalimumab and ESBA105. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(9):4738-45.
47. Veritti D, Vergallo S, Lanzetta P. Triple therapy for corneal neovascularization: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2012;22 Suppl 7: S126-8.
48. Kang S, Chung SK. The effect of subconjunctival combined treatment of bevacizumab and triamcinolone acetonide on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea* 2010;29(2):192-6.
49. Hoffart L, Matonti F, Conrath J, Daniel L, Ridings B, Masson GS, et al. Inhibition of corneal neovascularization after alkali burn: comparison of different doses of bevacizumab in monotherapy or associated with dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38(4):346-52.
50. Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1993;151(11):6602-7.