

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

**DENEYSEL KORNEA DAMARLANMASI MODELİNDE
SİKLOSPORİN A’NIN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. YASİN YÜCEL BUCAK

BOLU

2012

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

**DENEYSEL KORNEA DAMARLANMASI MODELİNDE
SİKLOSPORİN A’NIN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. YASİN YÜCEL BUCAK

DANIŞMAN

DOÇ. DR. MESUT ERDURMUŞ

BOLU

2012

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Mesut Erdurmuş'a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve tecrübelerinden faydalandığım anabilim dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Serdal Çelebi ve diğer saygıdeğer hocalarım Yrd. Doç. Dr. Fatih Ulaş ve Yrd. Doç. Dr. Ümit Doğan'a, ayrıca üzerimde büyük emekleri olan hocalarım Prof. Dr. Şahap Kükner, Doç. Dr. Didem Serin ve Doç. Dr. Gürsoy Alagöz'e teşekkür ederim.

Çalışmanın histopatolojik incelemelerini özveri ile yapan değerli hocalarım Prof. Dr. Aysel Kükner ve Yrd. Doç. Dr. E. Hakan Terzi'ye teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım değerli çalışma arkadaşlarıma ve yardımcı sağlık personeline, bu zorlu yolcuğu gülümseyerek anmamı sağlayacak hatıralarla süsledikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma verilerinin analizleri aşamasında yardımlarını esirgemeyen biyoistatistik uzmanı sayın Salih Ergöçen'e şükranlarımı sunarım.

Hayatın getirdiklerini metanetle karşılayabilme gücü veren, bugünler için benimle birlikte emek sarf eden anneme, babama ve sevgili eşim Özlem Bucak'a destekleri için minnettarım.

Dr. Yasin Yücel Bucak

2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv-v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1 Kornea	1
2.1.1 Kornea Epiteli	1
2.1.2 Bazal Membran	2
2.1.3 Bowman Tabakası	2
2.1.4 Stroma	3
2.1.5 Descemet Membranı	3
2.1.6 Endotel Tabakası	3
2.1.7 Limbus	4
2.1.8 Korneanın İnervasyonu	4
2.1.9 Gözyaşı Film Tabakası	4
2.1.10 Kornea Embriyolojisi	5
2.2. Kornea Yara İyileşmesi	5
2.2.1 Epitel Yara İyileşmesi	5
2.2.2 Stroma Yara İyileşmesi	6
2.2.3 Endotel Yara İyileşmesi	7
2.3 Kornea Neovaskülarizasyonu	8
2.3.1 Epidemiyoloji	7
2.3.2 Kornea Neovaskülarizasyonu İçin Risk Faktörleri	9
2.4 Anjiyogenezi Etkileyen Faktörler	10
2.4.1 Anjiyogenik Faktörler	10
2.4.1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	10

2.4.1.2 VEGF Sentezi	10
2.4.1.3 VEGF Reseptörü	12
2.4.1.4 Fibroblast Büyüme Faktörü	13
2.4.1.5 Matriks Metalloproteinazlar	13
2.4.1.6 Anjiyopoietin	13
2.4.1.7 İnterlökin-8	14
2.4.1.8 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü	14
2.4.1.9 Transforme Edici Büyüme Faktörü	14
2.4.1.10 Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü	14
2.4.1.11 İntegrin	15
2.4.2 Antianjiyogenik Faktörler	15
2.4.2.1 Anjiyostatin	15
2.4.2.2 Endostatin	15
2.4.2.3 Pigment Epitel Kökenli Faktör	16
2.4.2.4 Trombospondin-1	16
2.5 Kornea İmmünolojisi	16
2.5.1 Kornea Neovaskülarizasyonunda Sitokinlerin Rolü	17
2.5.2 Arthus Reaksiyonu	17
2.6 Tedavi	18
2.6.1 Deksametazon	19
2.6.2 Bevacizumab	19
2.6.3 Siklosporin A	20
3. MATERYAL VE METOT	21
4. BULGULAR	24
4.1 Makroskopik Bulgular	24
4.2 Işık Mikroskopi Bulguları	24
4.3 Apoptoz Değerlendirilmesi	29
4.4 CD31 ve VEGF İmmünohistokimyasal Boyama	31
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR	38
8. EKLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

Ang: Anjiyopoetin

CD: Hücre yüzey reseptörleri

COX: Siklooksijenaz

EGF: Epidermal büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

GCSF: Granülosit koloni uyaran faktör

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

HE: Hematoksilen eozin

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IL: İnterlökin

kD: Kilo Dalton

mm: Milimetre

mm²: Milimetrekare

MMP: Matriks Metalloproteinaz

nm: Nanometre

NFAT: Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PEDF: Pigment epitel kökenli faktör

PIGF: Plasental büyüme faktörü

SD: Standart sapma

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

TNF: Tümör nekroz faktörü

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling

TSP: Trombospondin

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

VEGFR: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü

µm: Mikrometre

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 1: Siklosporin A'nın etki mekanizması	20
Şekil 2: Makroskopik kornea neovaskülarizasyon fotoğrafları	25
Şekil 3: Kornea neovaskülarizasyon alanlarının gruplara göre dağılımı	26
Şekil 4: Topikal % 0,05 siklosporin A grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri	26
Şekil 5: Topikal % 0,1 deksametazon grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri	27
Şekil 6: Topikal % 0,5 bevacizumab grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri	27
Şekil 7: Kontrol grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri	28
Şekil 8: TUNEL (+) boyanan apoptotik hücrelere ait histolojik kesitler	30
Şekil 9: CD31 immünohistokimyasal boyamasına ait histolojik kesitler	31
Şekil 10: VEGF immünohistokimyasal boyamasına ait histolojik kesitler	32

TABLolar	Sayfa
Tablo 1. Kornea neovaskularizasyonuna neden olan hastalıklar	11
Tablo 2. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler	12
Tablo 3. Kornea neovaskularizasyonun tedavi yöntemleri	18
Tablo 4. Gruplara ait ortalama kornea neovaskularizasyonu alanı yüzdeleri	25
Tablo 5. Gruplara göre inflamasyon skorları	29
Tablo 6. Gruplara göre ortalama TUNEL (+) apoptotik hücre yoğunluğu	30

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada; topikal % 0,05 siklosporin A'nın immün aracılı deneysel kornea neovaskülarizasyonu üzerine olan inhibitör etkilerini saptamak ve siklosporin A ile topikal % 0,1 deksametazon ve topikal % 0,5 bevacizumabın etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

METOD: Sığır serum albümini kullanılarak 36 tavşanda immün aracılı kornea neovaskülarizasyonu oluşturuldu. Daha sonra, tavşanlar topikal tedaviye göre randomize olarak dört gruba ayrıldı. Grup I; % 0,05 siklosporin A, Grup II; 0,1 deksametazon, Grup III; % 0,5 bevacizumab ve Grup IV; izotonik tuz çözeltisi tedavilerini 14 gün boyunca aldı. Vaskülarizasyonla kaplanmış kornea yüzeyinin total kornea alanına oranı fotoğraflar üzerinden ölçüldü. Tavşanlar sakrifiye edildikten sonra korneaları eksize edildi. Parafine gömülen kesitler, hematoxilen-eozin ve terminal deoksinükleotid transferaz aracılı dUTP-biotin uç etiketleme yöntemi (TUNEL) ile boyandı. Kornea dokusunda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve CD31 immunohistokimyasal boyamalarının yoğunluğu semikantitatif bir yöntemle hesaplandı. İnflamatuar yanıt, inflamatuvar hücre infiltrasyon miktarına göre; yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak sınıflandırıldı.

SONUÇ: Grup I, II, III ve IV'te ortalama kornea neovaskülarizasyonu alanı yüzdeleri sırasıyla % 24,4, % 5,9, % 37,1 ve % 44,1 idi. Topikal % 0,05 siklosporin A'nın inhibitör etkileri, topikal % 0,5 bevacizumab ve kontrol grubuna göre daha üstün bulundu (sırasıyla, $p=0,03$ and $p=0,02$). Topikal % 0,05 siklosporin A'nın kornea neovaskülarizasyonunu inhibe edici etkisi, topikal % 0,1 deksametazona göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$). Apoptotik hücre yoğunluğu grup III (22,7 hücre/mm²) ve grup IV'de (21,7 hücre/mm²), grup I (10,6 hücre/mm²) ve grup II'ye (11 hücre/mm²) göre daha yüksek bulundu. Apoptotik hücre yoğunluğu açısından grup I ve grup II arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,7$). İnflamasyon skoru, grup I ve grup III arasında anlamlı fark göstermemekteydi ($p=0,13$). En düşük inflamasyon skoru grup II'de idi.

TARTIŞMA: Bu tavşan modelinde, topikal % 0,05 siklosporin A'nın immün aracılı kornea neovaskülarizasyonu üzerine inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir. Topikal % 0,05 siklosporin A ile apoptoz inhibisyonu, topikal % 0,1 deksametazon ile karşılaştırılabilir düzeyde bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Arthus reaksiyonu, kornea neovaskülarizasyonu, siklosporin A.

ABSTRACT

PURPOSE: We aimed to study the inhibitory effects of topical 0.05 % cyclosporine A on immune-mediated experimental corneal neovascularization and to compare its efficacy with those of topical 0.1 % dexamethasone and 0.5 % bevacizumab.

METHODS: Immune-mediated corneal neovascularization was created by bovine serum albumin in 36 rabbits. The rabbits were then randomized into four groups according to topical treatment. Group I received 0.05 % cyclosporine A, Group II received 0.1 % dexamethasone, Group III received 0.5 % bevacizumab and Group IV received isotonic saline for 14 days. The corneal surface covered with neovascular vessels was measured on the photographs as the percentage of the total area of the cornea. The rabbits were then sacrificed and the corneas excised. Paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL). The intensity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD31 immunostainings in corneal tissue was performed in a semiquantitative fashion. Inflammatory response was classified as none (0), mild (1), moderate (2) or severe (3) according to the amount of inflammatory cell infiltration.

RESULTS: The means of percent area of corneal neovascularization in Group I, II, III and IV were 24.4 %, 5.9 %, 37.1 %, and 44.1 %, respectively. The inhibitory effects of 0.05 % cyclosporine A was found to be better than 0.5 % bevacizumab and control groups ($p=0.03$ and $p=0.02$, respectively). Topical 0.05% cyclosporine A was found to be significantly lesser inhibitory effects on corneal neovascularization than the topical 0.1 % dexamethasone ($p<0.001$). Apoptotic cell density was higher in group III (22.7 cells/mm²) and group IV (21.7 cells/mm²) than group I (10.6 cells/mm²) and group II (11 cells/mm²). There was no difference between the group I and group II in terms of apoptotic cell density ($p=0.7$). Inflammation score was not significantly different between the group I and the group III ($p=0.13$). The lowest inflammation score was in the group II.

CONCLUSION: Topical % 0,05 cyclosporine A was shown to have an inhibitory effects on immune-mediated corneal neovascularization in this rabbit model. Inhibition of apoptosis with topical 0.05 % cyclosporine A was comparable to that of topical 0.1 % dexamethasone.

KEYWORDS: Arthus reaction, corneal neovascularization, cyclosporine A.

1. GİRİŞ

Kornea, göz küresinin ön kısmında yer alan avasküler ve saydam bir dokudur. Göze gelen ışık ışınlarının kırılması, iletilmesi ve gözün dış etkenlerden korunması gibi fonksiyonları olan özelleşmiş bir dokudur. Kornea neovaskülarizasyonu, kornea saydamlığının bozulmasına yol açabilen istenmeyen yeni damar oluşumlarıdır ve ciddi görme kayıplarına neden olabilmektedir. Normal şartlarda korneada anjiyogenik faktörler (fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotel büyüme faktörü vb.) ve antianjiyogenik faktörler (anjiyostatin, endostatin, pigment epitel kaynaklı faktör vb.) arasında bir denge söz konusudur. Bu dengeyi anjiyogenez lehine değiştiren pekçok inflamatuvar, enfeksiyöz ve dejeneratif hastalık, saydam ve avasküler korneada neovaskülarizasyon gelişimine neden olabilmektedir [1].

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kornea

2.1.1 Kornea Epiteli

Oküler yüzeyde konjonktiva epiteli kornea epiteli ile devamlılık gösterir. Kornea epiteli, keratinize olmayan çok katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Epitel tabakasının kalınlığı yaklaşık 50 mikrometre (μm) olup, korneanın toplam kalınlığının %10'unu oluşturur. Limbus pluripotent kök hücrelerinden köken alan ve kornea merkezine doğru ilerleyen hücreler, bazal epitel katını oluştururlar. Bu bazal hücrelerin farklılaşması sonucu kornea epiteli;

- yüzeyel yassı hücre,
- poligonal kanatsız hücre ve
- bazal hücre

olmak üzere 3 farklı hücre türüne ayrılır. Kornea epitel hücrelerinin hayat siklusu 7-10 gün içerisinde tamamlanmaktadır [2]. En üstte yer alan yassı şekilli yüzey hücreleri, 40-50 μm çapında ve 2-6 μm kalınlığındadır [3, 4]. Yassı yüzey hücreleri, apikal mikrovillus ve mikropalikalar sayesinde gözyaşı ile temas alanını artırırlar.

Hücreler arasında yer alan lateral sıkı bağ kompleksleri (zonula okludens) ile gözyaşının hücreler arası alana geçişi engellenir. Bu bariyer fonksiyonu, dış hücre membranı ve paraselüler sıkı bağlantı komplekslerinin yüksek elektrik direncinden kaynaklanmaktadır [5].

Yüzey epitel hücrelerinin altında kanat hücreleri yer alır. Bu kat, yüzey hücrelerine göre daha az yassı olan 2-3 sıra hücreden oluşur. Kanat hücrelerinin altında, kornea epitelinin en alt hücre tabakası olan bazal hücreler yer alır. Bazal hücre tabakası, tek sıralı 20 µm yüksekliğinde silindirik şekilli hücrelerden oluşur. Mitoz yeteneği yalnızca bazal hücrelerde vardır [6]. Bazal membran, bazal hücreler tarafından salgılanan ekstraselüler bir matriksten oluşur. Bazal hücreler bazal membrana, hemidesmozom ve sıkıca tutunmayı sağlayan tip VII kollajen fibrillerle bağlıdır. Bu kollajen fibriller, bazal membranı geçerek stromaya da penetre olur ve stromanın tip I kollajeni ile plaklar oluşturarak epitelin stromayla olan bağlantısını güçlendirirler [7].

2.1.2 Bazal Membran

Bazal membran, bazal epitel hücreleri tarafından salgılanır. Gevşek ve şeffaf olan *lamina lucida* ve sıkı olan *lamina densa* adlı iki tabakadan oluşan bazal membran yaklaşık 30 nanometre (nm) kalınlığındadır [3]. Bazal membranın yapıtaşlarından tip IV kollajen *lamina densa*da, fibronektin ise her iki tabakada bulunur. Epitel hücre göçü, zemin olarak bazal membrana ihtiyaç gösterir. Ancak, epitel debridmanı sonrası yeni membran gelişimi 1 haftadan uzun zaman aldığından geçici matriks olarak fibronektin hücre göçüne zemin olur.

2.1.3 Bowman Tabakası

Epitel bazal membranı ile stroma arasında yer almaktadır. Rastgele dizilmiş kollajen fibrillerden oluşan bu tabaka 12 µm kalınlığındadır ve aselülerdir [8]. Tip I ve tip III kollajen liflerinin arasını dolduran tip IV kollajen ve proteoglikanlardan oluşur. Kollajen fibrilleri, stroma keratositleri tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bowman membranı, hasarlandığında rejenere olamaz ve skar dokusu ile iyileşir.

2.1.4 Stroma

Kornea kalınlığının % 90'ını oluşturur. Stroma kollajen liflerinin tek tip dizilimi, yavaş ancak sürekli yıkım ve üretim halinde oluşu kornea saydamlığını sağlayan etmenlerdendir. Hücresel komponenti tüm yapının % 2-3'ünü oluşturur. Stromanın yaş ağırlığının % 78'ini su ve kuru ağırlığının % 70'ini kollajen lifler oluşturur. Stromada tip I kollajenin yanı sıra tip III, V ve VI kollajen bulunmaktadır. Stromada yaklaşık 300 kollajen fibril lameli düzgün bir şekilde sıralanmıştır. Lifler arasındaki mesafe son derece düzenli olup 41,4 nm kadardır. Tüm stroma glikozaminoglikanlarının yarısından fazlasını keratan sülfat, geri kalanını ise kondritin sülfat ve dermatan sülfat oluşturur [3].

2.1.5 Descemet Membranı

Kornea endotel hücrelerinin üzerine yerleşmiş olduğu bir bazal membrandır. Doğumda 3-4 μm kalınlığında olan bu membran, erişkinde yaklaşık 10-12 μm kalınlığa ulaşır. Ağırlıklı olarak tip IV kollajen, laminin ve fibronektinden oluşur. Fibrinonektinin endotel hücrelerini descemet tabakasına bağladığı düşünülmektedir. Descemet membranı proteolitik enzimlere karşı direnci oldukça yüksek bir yapıdır ve stromanın hızla degrade olduğu ağır nekrotizan keratitlerde bile sağlam kalabilir.

2.1.6 Endotel Tabakası

Embriyogenезin erken döneminde korneanın arkası nöral krista kökenli, düzenli yerleşimli ve küp şeklinde hücrelerden oluşur [9]. Yaklaşık 5 μm kalınlıkta, 20 μm genişlikte olan bu hücreler genelde hekzagonal biçimlidir. Genç erişkinde kornea endotelinde milimetrekare'de (mm^2) ortalama 3500 hücre bulunur. Hayat boyunca endotel hücre yoğunluğu ve morfolojisi değişir. İkinci dekatta 3000-4000 hücre/ mm^2 olan endotel hücre yoğunluğu, sekizinci dekatta 2600 hücre/ mm^2 'ye düşmektedir. Benzer şekilde, altıncı hücrelerin oranı % 75'den % 60'a düşer [10]. İnsan kornea endotel hücreleri çoğalma yeteneğine sahip değildir. Normal şartlarda

kornea merkezinde yılda ortalama % 0,6 endotel hücre kaybı olur [11]. Endotel hücre membranında bulunan Na–K ATPaz pompası sayesinde kornea stromasının su içeriği % 78 seviyesinde tutulur [12].

2.1.7 Limbus

Limbus, periferik kornea ve ön sklera arasındaki geçiş bölgesidir. Limbus içerisindeki anatomik yapılar konjonktiva ve limbal palisadlar, tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dışı akım elemanlarıdır [13]. Opak skleradan saydam korneaya geçiş aşamalı olarak 1-1,5 mm alanı kapsar. Limbusta epitel 10-12 katlıdır. Kornea epitelinin devamlılığını sağlayan kök hücreler, limbusta bulunurlar. Limbus hasarı durumunda kornea epitelinin yerini hızla konjonktiva ve kan damarları alır [14].

2.1.8 Korneanın İnervasyonu

Kornea, duyuşal inervasyonunu trigeminal sinirin oftalmik dalından gelen uzun siliyer sinirlerden alır [3]. İnsan vücudunda duyuşal inervasyonu yoğun olan dokulardandır. Limbusta bir halka oluşturan siliyer sinirler miyelin kılıfını kaybederek korneaya girerler. Stromanın ön ve orta lamelleri arasında radyal biçimde yayılırlar. Korneanın endotel tabakasında sinir inervasyonu yoktur [15]. Korneanın sempatik otonom sistem inervasyonu olduğu da bilinmektedir.

2.1.9 Gözyaşı Film Tabakası

Kornea yüzeyi, üç tabakadan oluşan gözyaşı film tabakası ile kaplıdır. Gözyaşı filmi; önden arkaya doğru lipit, aköz ve müsin tabakalarından oluşur.

Lipit tabakası, meibomian ve Zeiss bezlerinden salgılanır [16]. Sadece 0,1 µm kalınlığındadır. Lipid tabakası, buharlaşmayı geciktirerek ve yüzey gerilimini artırarak gözyaşı filmini stabilize eder.

Aköz tabakası, ana lakrimal bez ve yardımcı lakrimal bezlerden (Krause ve Wolfring bezleri) salgılanır. Aköz tabakasının kalınlığı 7 µm'dir. Aköz gözyaşı

tabakasının % 98'ini su oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra elektrolitler (Na, K ve Cl), büyüme faktörleri, immunglobulinler, laktoferin, sitokin ve lizozim de aköz gözyaşı içeriğine katkı sağlar [17, 18].

Müsin tabakası, goblet hücrelerinden salgılanır ve kalınlığı 0.02-0.05 μm 'dir. Hidrofobik olan epitel hücre yüzeyi, müsin tabakası sayesinde hidrofilik hale dönüşür.

2.1.10 Kornea Embriyolojisi

Kornea ve ön kamara 6. hafta sonunda gelişmeye başlar. Altıncı haftaya kadar yüzey epiteli ile lens ön yüzü arasındaki boşluk iyi organize olmamış mezenkim dokusu ile doludur. Yüzeyel ektoderm lens vezikülünden ayrılınca iki katlı epitele dönüşür. Bazal laminanın kalıntısı olan bu yapı primitif korneadır. Yedinci haftada nöral krista kaynaklı mezenkimal hücreler, lens vezikülü çevresinden öne doğru üç dalga halinde hareket ederler. Yüzey ektodermi ile lens arasından göç eden birinci dalga hücreler kornea ve trabekulum endotelini oluşturur [19]. Kornea epiteli ile endoteli arasından göç eden ikinci dalga hücreler stromayı yaparlar [20]. Kornea endoteli ile lens arasında göç eden üçüncü dalga hücreler, iris stromasını meydana getirirler. Sekizinci haftada endotel hücreleri Descemet membranını yaparlar [21]. Dördüncü ayda Bowman tabakası belirginleşir.

2.2 Kornea Yara İyileşmesi

Mekanizma ve bileşenlerin farklılığı nedeniyle kornea yara iyileşmesini epitel, stroma ve endotel yara iyileşmesi olmak üzere 3 ayrı başlıkta ele almak gerekir.

2.2.1 Epitel Yara İyileşmesi

Epitel yara iyileşmesinde birçok hücresel yapının ve sinyal moleküllerinin karşılıklı etkileşimi söz konusudur. Epitel yara iyileşmesinde komşu hücrelerin

iskelet yapısı ve hücreler arası bileşkelerinde değişimlerin meydana geldiği bir latent dönem yaşanır [22].

Latent dönem, yaralanmanın ardından hücre migrasyonuna kadar olan ilk birkaç saatlik evredir. Daha geniş hasarlarda 4-5 saate kadar uzayabilen latent dönem görülebilir. Bu evrede, hücreler iyi diferansiye hallerinden daha az diferansiye hale dönüşürler. Bu değişim hücresel reorganizasyon ve protein sentezi ile ilişkilidir. Hücre zarında, fokal yapışma plakları için gerekli olan proteinler; vinkulin, aktin, talin ve integrin ile hücre yüzey reseptörleri (CD44) gibi proteinler sentezlenir [23]. İntrasitoplazmik aktin lifleri hücre zarına vinkulin ile bağlanırken, talin bazal membrana yapışmayı sağlayan integrin ile bağlanır. Glikoprotein yapısında olan fibronektin, hasarlı kornea yüzeyinde komşu epitel hücre göçü için gerekli ekstraselüler matriks görevini yapar ve büyüme faktörü olarak da işlev görür [24].

Latent dönemden sonra yüzey epitelinin tamiri için hasarlı bölgeye komşu hücreler göçe başlar. Hücreler saatte 60-80 µm hızla göç ederler [25]. Bütün hasarlı alan tek katlı epitel tarafından örtüldükten sonra proliferasyon dönemi başlar.

Geçici dış faktörler hücre göçü sırasında yönlendirilmiş hücre hareketinde yer alırlar. Bunlar arasında kontakt inhibisyon, kemotaksis ve haptotaksis sayılabilir. Hasarlanmadan 3 saat sonra rejenere olan epitelin uç bölgelerinde polimorfonükleer lökositler görülmeye başlar ve 36 saat kadar ortamda kalırlar. Polimorfonükleer lökositler, bazı enzimlerin salınmasına ve kemotaksise neden olurlar.

Hücrelerin göçünden sonra hücre proliferasyonu gerçekleşir. Hücre katlarının normal sayıya ulaşması ve epitel tabaka kalınlığının normale dönmesi süreci başlar. Orta boyutta epitel yaralanmalarında 24-30 saat sonra hücrelerde mitoz görülür. Geniş yaralanmalarda ise bu süre 96 saate kadar çıkmaktadır. Sadece bazal hücreler, geçici çoğalan hücreler ve limbus kök hücreleri bu yeniden yapılandırıcı mitoz katılır [6]. Epitel tabakası normal kalınlığına ulaştıktan sonra, diferansiyasyonun ileri safhaları başlar.

2.2.2 Stroma Yara İyileşmesi

Epitel tabakasına göre çok daha az hücre bulunmakla birlikte; stroma hasarı alanındaki keratositlerin ölümü yara yanıtının ilk basamağıdır. Hasar gören epitel

tabakasının alt tarafında bulunan stroma keratositlerinde apoptoz gözlenir. Keratosit ölümü ne kadar az ise keratosit yanıtı da o kadar az olur [3]. Bir stroma yaralanmasını izleyen saatler içinde önce polimorfonükleer lökositler, sonra mononükleer hücreler yara yerine gelir ve fagositoza yardım ederler. Apoptoza uğrayan keratositleri, komşu alandaki stroma keratositlerinin aktive olması takip eder. Stroma keratositlerinin hasar bölgesine göçü ve çoğalmasının düzenlenmesinde epidermal büyüme faktörü, bazik fibroblast büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi araçların rolü vardır. Ayrıca, keratosit büyüme faktörü ve hepatosit büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri de keratositlerden salınmaktadır [26]. Hasar alanındaki yıkım ürünleri temizlendikten sonra, keratositler kollajen sentezine başlar. Normal stroma tip I kollajenden oluşurken, kornea skar dokusu büyük oranda tip III kollajenden oluşur. Skar dokusunun yeniden düzenlenmesi sonrasında tip III kollajen, stromanın normal yapısında olan tip I kollajen ile yer değiştirir. Stroma keratositleri yara iyileşmesinde ikinci kez şekil değiştirirler. Sitoplazmalarının içinde α -düz kas aktini gelişir ve aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşürler [8]. Bu hücreler kontraksiyon yetenekleri ile yaranın kontraksiyonuna ve düzensiz astigmatizmaya neden olurlar. Stroma iyileşmesinin tam olarak gerçekleşmesi haftalar alabilir [27]. Yara iyileşmesi sonrası ulaşılabilen maksimum doku dayanıklılığının, normal dokununun % 70'i kadar olduğu tahmin edilmektedir.

2.2.3 Endotelial Yara İyileşmesi

Nöral krista kökenli bu tek hücreli tabaka, iyon pompası yardımıyla sürdürdüğü stroma dehidratasyonu açısından önemlidir. Kornea endotel hasarı sonrasında, sıvı alışveriş mekanizması bozularak kornea ödemi oluşmaktadır [28]. Hasarlı endotel bölgesindeki geçici matriks olan fibronektin üzerine, komşu bölgedeki sağlıklı endotel hücreleri göç eder. Yayılan bu hücreler daha ince bir tabaka oluşturur ve tabakanın bütünlüğü sağlandıktan sonra yeni Descemet membranı sentezlenmeye başlar. Yara yerine komşu hücreler, hasarın merkezine doğru uzar ve 80-100 μ m gün hızla yara yerini kapatmak üzere ilerlerler. Bu hücre göçü sırasında hücreler birbirleriyle temaslarını sürdürmektedirler [29]. Bir kez hasar bölgesi kapatıldıktan sonra, normal hekzagonal paternin oluşturulması için hücreler

yeniden düzenlenmeye başlar. İnsan endotel hücreleri, in vitro ortamda uygun koşullarda mitoz yapabilmektedir. Endotel hücrelerinde endotel büyüme faktörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, endotel hücrelerinde DNA sentezini artırırken, endotel yara kapanma süresini kısaltmaktadır [30].

2.3 Kornea Neovaskülarizasyonu

Neovaskülarizasyon, normal şartlarda avasküler olan alanlarda yeni vasküler yapıların oluşmasıdır. Neovaskülarizasyon süreci muhtemel iki mekanizma içermektedir [31];

- Vaskülogenez: Embriyogenez sırasında kemik iliği kaynaklı anjiyoblastlardan yeni kan damarı oluşumu
- Anjiyogenez: Önceden mevcut olan vasküler yapılardan yeni kan damarı oluşumudur.

Vaskülogenez gelişimin sonunda durur ve endotel hücre proliferasyonu hemen daima yetişkinlerde sonlanmıştır [32]. Korneada anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasında denge bulunmaktadır. Anjiyogenez, bu dengenin değişik nedenlerle anjiyogenik faktörler lehine doğru bozulması nedeniyle oluşmaktadır [33, 34].

Anjiyogenezin fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki türü vardır. Fizyolojik anjiyogenez gelişmekte olan fetüste başlar ve doğum sonrasında, erişkin dokulardaki normal kan damarlarını oluşturacak biçimde devam eder. Normal kan damarları, düzenli ve birbirinden yakın boşluklarla ayrılmış bir biçimde dağılım gösterirler. Elastik ve musküler arterler, arterioller, kapillerler, postkapiller venüller ve venler şeklinde hiyerarşik bir düzenlenmeye sahiptirler. Patolojik anjiyogeneizde ise indüklenen yeni kan damarlarının yapısı ve fonksiyonları anormaldir [35]. Patolojik anjiyogenez tarafından indüklenen damarlar, dağınık bir biçimde yayılırlar, düzensiz dallanırlar, arteriovenöz şantlar oluştururlar ve hiyerarşik bir paterne uymazlar. Ayrıca yapısal ve fonksiyonel açıdan heterojendirler. Değişken ve farklı biçimde fenestrasyon gösterirler. Plazma proteinlerine karşı genellikle geçirgendirler. Yüzeylerinde pek çok büyüme faktörü reseptörleri taşırlar.

Oftalmik arterin dalı olan uzun siliyer arterler, limbus bölgesinde perikornea pleksusunu oluşturarak sonlanır. Kornea neovaskülarizasyonu, perikornea pleksusunun venüllerinden ve kapillerlerinden kaynaklanan yeni damar oluşumlarıdır [36, 37]. Kornea neovaskülarizasyonu, stroma neovaskülarizasyonu ve vasküler pannus olmak üzere iki klinik antite olarak görülebilir [38]. Son çalışmalar, kornea vaskülarizasyonunun stromanın üst ve orta üçte birini tuttuğunu göstermektedir [39].

Kornea neovaskülarizasyonunun gelişimi sırasıyla şu evreleri içermektedir;

- Anjiyogenik uyarı (alkali kornea yanığı ve kornea hipoksisi vb.)
- Latent dönem
- Limbus damarlarının dilatasyonu
- Venül ve kapillerlerin bazal membranlarının enzimatik yıkımı
- Endotel hücre proliferasyonu ve uyarı alanına göçü
- Endotel hücrelerinde tomurcuk ve lümen oluşumu
- Vasküler tüp oluşumu
- Periendotelial hücrelerin vasküler tüpleri desteklemek için toplanması
- Oluşan damarların matürasyonu.

2.3.1 Epidemiyoloji

Kornea ve gözün diğer bölümlerinin neovasküler ve enfeksiyöz hastalıkları önemli bir halk sağlığı problemidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl ortalama 1,4 milyon hastada kornea neovaskülarizasyonu geliştiği tahmin edilmektedir. ABD nüfusunun % 4'ünün kornea neovaskülarizasyonu bulunmakta ve kornea nakli sırasında elde edilen kornea örneklerinin % 20'sinde histopatolojik olarak kornea neovaskülarizasyonu görülmektedir [40].

2.3.2 Kornea Neovaskülarizasyonu İçin Risk Faktörleri

Kornea neovaskülarizasyonuna inflamatuvar, enfeksiyöz, dejeneratif ve travmatik bozukluklar neden olabilir. Tablo 1'de kornea neovaskülarizasyonuna neden olan hastalıklar yer almaktadır [41].

2.4 Anjiyogenezi Etkileyen Faktörler

Tablo 2’de anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler yer almaktadır.

2.4.1 Anjiyogenik Faktörler

2.4.1.1. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

Genel olarak, VEGF ailesine mensup olan proteinlerin damar gelişimi üzerinde en önemli ajanlar olduğuna inanılmaktadır. Vaskülogenezde, fizyolojik ve patolojik anjiyogeneze ve lenfanjiyogeneze önemli rol oynarlar [42]. VEGF ailesi, endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan çok fonksiyonlu bir büyüme faktörü grubudur [43].

VEGF ailesinin içinde VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F ve plasental büyüme faktörü (PIGF) yer almaktadır. VEGF-A’nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu tanımlanmıştır. Bunlar VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olarak isimlendirilmektedir ve beraberindeki sayılar içerdikleri aminoasit sayısını göstermektedir [44, 45]. VEGF izoformları, alternatif mRNA birleşimleri yoluyla 6 ve 7 nolu ekzonlar tarafından kodlanan sekansların varlığına ya da yokluğuna göre birbirlerinden ayrılmaktadır. VEGF₁₂₁ ekson 6 ve 7 tarafından kodlanan aminoasitlerden yoksun olup zayıf asidik bir proteindir ve heparini zayıf bağlamaktadır. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ ek olarak, 6 ve 7 nolu ekzon tarafından kodlanan ve heparini güçlü bir şekilde bağlayan bir sekans daha içerirler. Özellikle VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ izoformları vasküler endotel hücreleri için mitojeniktir.

2.4.1.2 VEGF Sentezi

VEGF üretimi birçok faktör tarafından düzenlenir. Bunlar; siklik AMP (cAMP), steroid hormonlar, protein kinaz C agonistleri, polipeptit büyüme faktörleri, sitokinler, oksijen, serbest radikaller, glikoz, kobalt ve demirdir [46]. Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını uyararak anjiyogenezi başlatan en önemli etkenlerden

biridir. Bu durum özellikle, tümörlerin nekrotik alanları etrafında daha belirgin bir şekilde görülmektedir.

Tablo 1. Kornea neovaskülarizasyonuna neden olan hastalıklar	
<i>İnflamatuvar hastalıklar</i> Oküler skatrisyel pemfigoid Atopik keratokonjonktivit Oküler rozasea Graft rejeksiyonu Lyell's sendromu Stevens-Johnson sendromu Graft versus host hastalığı <i>Enfeksiyöz keratitler</i> Viral Herpes simpleks Herpes zoster Bakteriyel Psödomonas Klamidya trakomatis Sifiliz Fungal Kandida Fusarium Asperjillus Parazitik Onkoserkiazis	<i>Dejeneratif-konjenital bozukluklar</i> Pterjium Terrien marjinal dejenerasyon Aniridi <i>Travma</i> <i>Diğer</i> Kontakt lens Alkali yanığı Ülser İatrojenik Kök hücre yetmezliği

Tablo 2. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler	
<i>Anjiyogenik Faktörler</i>	<i>Antianjiyogenik Faktörler</i>
Vasküler endotel büyüme faktörü	Trombospondin-1
Plasental büyüme faktörü	Trombospondin-2
Fibroblast büyüme faktörü	Anjiyostatin
Fibroblast büyüme faktörü-3	Metalloelastaz
Fibroblast büyüme faktörü-4	Endostatin
Transforme edici büyüme faktörü- α	Vazostatin
Transforme edici büyüme faktörü- β	Trombosit faktör-4 fragmanı (anjiyostatin)
Epidermal büyüme faktörü	Prolaktin derivesi (anjiyostatin)
Hepatosit büyüme faktörü	Restin
Tümör nekroz faktör- α	Anjiyopoetin-2
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	İnterlökin-12
Granülosit koloni uyaran faktör	İnterferon- α , β
İnterlökin-8	Platelet faktör-4 fragmanı
Anjiyogenin	Antitrombin-3 fragmanı
Doku faktörü	İnterferon ile indüklenebilen protein-10
İnterlökin-6	Vazostatin
Anjiyopoetin-1	Antitrombin III fragmanı

2.4.1.3 VEGF Reseptörü (VEGFR)

VEGF, endotel hücrelerine reseptörler aracılığı ile bağlanır. Tirozin kinaz ailesine ait üç çeşit VEGF reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3'dür [47]. VEGF, biyolojik aktivitesini temel olarak endotel hücreleri üzerinde tirozin kinaz yapılı VEGFR-1 ile VEGFR-2 ve lenf damarları üzerinde VEGFR-3 ile gerçekleştirir. VEGFR-1 ve VEGFR-2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salınır ve anjiyogeneze ile damar geçirgenliğinde görev alır.

VEGFR-3'ün lenfanjiyogenezin moleküler regülasyonundan sorumlu olduğu sanılmaktadır [47].

2.4.1.4 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Anjiyogenik başka bir faktör olan bazik FGF, kornea anjiyogenez modellerinde kullanılmıştır. FGF ailesi, ortalama 18 kiloDalton (kD) ağırlığında ve 23 ayrı heparin bağlı peptitlerden oluşur. FGF; hücre differansiasyonu, anjiyogenez, mitogenez ve yara iyileşmesi sırasında vücudun her dokusunda eksprese olabilir. FGF, kendi reseptörlerine bağlanarak (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4) etki yapar. FGF de VEGF gibi tirozin kinazı aktive ederek etki gösterir. FGFR-1 normal kornea epitelinde bulunurken, FGFR-2 ise travma sonrasında artmaktadır [48]. Vaskülarizasyonda, FGF-1, FGF-2 ve FGF-4 artışıyla birlikte endotel hücrelerinden lokalize ürokinaz plazminojen aktivatörü ve matriks metaloproteinaz salgılanmaktadır [49].

2.4.1.5 Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinaz (MMP) enzim ailesi, neovasküler süreçlerde ekstraselüler matriksin yeniden şekillendirilmesi ile ilişkilidir. MMP'lar çinko bağlayan proteolitik enzim grubudur. Yaklaşık 25 değişik MMP tipi bulunmaktadır. MMP'lerden birkaçının anjiyogenezde önemli olduğuna düşünülmektedir. Bunlar MMP-2 ve MMP-9'dur (sırasıyla jelatinaz A ve B) [50, 51]. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonuna bağlı koroid neovasküler membranlarında, yara iyileşmesinde ve solid tümörlerde MMP-2 eksprese edilmektedir [52]. Kvant ve ark. inflamasyon ile ilişkili deneysel kornea neovaskülarizasyonu modelinde MMP-2 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir [53].

2.4.1.6 Anjiyopoetin (Ang)

Ang ailesine ait moleküller, endotel hücreleri için hemen hemen özel bir spesifisiteye sahiptir. Ang1, periendotel destek hücrelerinin endotel hücreleri

etrafına toplanmalarını sağlar. Ayrıca, endotel hücrelerinin ekstraselüler matriks ve mezenkimle ilişki kurmasını indükleyerek vasküler bütünlüğü artırır. Vasküler gelişimde vazgeçilmez bir role sahiptir ve yokluğu embriyonik dönemde ölümcül olarak sonuçlanmaktadır [54]. Ang1'in normal insan damarlarında eksprese edilmesi, bu faktörün erişkin damarlarının devamlılığında da önemli bir rolü olduğu anlamına gelmektedir.

2.4.1.7 İnterlökin-8 (IL-8)

IL-8, anjiyogenik ve lökosit kemotaksis aktivasyonuna sahip çok fonksiyonlu bir sitokindir. IL-8 direkt olarak vasküler endotel hücrelerinin kemotaksis ve proliferasyonunu indükleyerek neovaskülarizasyonu tetikler.

2.4.1.8 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

IGF-1'in hayvan modellerinde korneada anjiyogenik etkilerde bulunduğu bildirilmiştir [55].

2.4.1.9 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF)

TGF- α , epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi gözyaşında bulunur. TGF- α , EGF ile yapısal benzerliğe sahip olmakla birlikte anjiyogenezi uyarma potansiyeli EGF'nden daha güçlüdür. TGF- β aktivasyonu; ekstraselüler matriks üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur [56].

2.4.1.10 Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF, trombositlerden izole edilen bir faktördür. Reseptöre bağlanması mitojenik etkileri indükler [57]. PDGF reseptörleri kornea fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde bulunur.

2.4.1.11 İntegrin

İntegrinler, ekstraselüler matrikse ya da bazı durumlarda komşu hücrelere adezyona aracılık eden hücre yüzeyi reseptörleridir [58]. Şu ana kadar toplam olarak 18 α ve 8 β alt birim tespit edilmiştir. İntegrinler, ekstraselüler ligandlar ile hücre iskeleti arasındaki iletiyi sağlamaktadır [59].

2.4.2 Antianjiyogenik Faktörler

2.4.2.1 Anjiyostatin

Anjiyostatin, 38 kD ağırlığında, plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olup güçlü bir antianjiyogenik faktördür [60]. Anjiyostatin; endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve tübül oluşumunu engeller [61, 62]. Hayvan çalışmalarında, spesifik antikorlar kullanılarak kornea içi anjiyostatin moleküllerinin tüketilmesinin neovaskülarizasyon riskini artırdığı gösterilmiştir [63]. Anjiyostatin uygulanması, korneada bazik FGF ve anjiyogeninin uyardığı neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir.

2.4.2.2 Endostatin

Endostatin 20 kD ağırlığında, kollajen XVIII'in proteolitik parçalanma ürünüdür. Endostatin, ilk kez Dr. Folkman'ın laboratuvarında endotelyoma hücrelerinde keşfedilmiştir [64]. Endostatinin antianjiyogenik etkisi farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Bunlar; endostatinin jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) ve MMP-13 aktivitesini [65] ve VEGF molekülünün reseptörlere bağlanmasını inhibe etmesi, hücre siklusunun G1 aşamasında endotel hücresine bağlanan endostatinin siklusu durdurması [66], endostatinin caspase 3'ü aktif hale getirerek endotel hücrelerinde apoptozu indüklemesi [67] ve endotel hücre tübül oluşumunu engellemesi [68] şeklindedir. Hayvan çalışmalarında endostatinin, kornealarda bazik FGF'nin uyardığı neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [69].

2.4.2.3 Pigment Epiteli Kökenli Faktör (PEDF)

Elli kD ağırlığında olan PEDF, güçlü bir antianjiyogenik ve nörotrofik faktördür [70]. PEDF, retina pigment epiteli, iris ve korneada tesbit edilmiştir [71]. Hipoksi durumunda VEGF indüklenmekte ve PEDF baskılanmaktadır [72]. Spesifik antikörler uygulanarak PEDF'ün nötralize edilmesiyle neovaskülarizasyon gelişmektedir [71, 72].

2.4.2.4 Trombospondin-1

Trombospondin (TSP) çok fonksiyonlu protein gibi davranan glikoprotein yapısındadır. TSP-1 ve 2 güçlü antianjiyogenik özellikler göstermektedir. TSP-1; anjiyogenez için kritik olan endotel hücre proliferasyonu, hayatta kalımı ve migrasyonunu inhibe etmektedir [73]. TSP-1 endotel hücre yüzeyindeki CD36'ya bağlanarak apoptozu indükler [74]. Ayrıca yapılan çalışmalarda TSP-1'in VEGF salınımını inhibe ettiği ve MMP düzenlenmesini sağladığı gösterilmiştir [75]. TSP-1, normal korneada Bowman katmanında, endotel hücrelerinde ve Descemet membranında bulunmaktadır. TSP-1 gözde kornea haricinde iris, sklera ve retinada da üretilmektedir [76].

2.5 Kornea İmmünolojisi

Oküler yüzey sürekli olarak travmaya, patojen mikroorganizmalara ve çevresel antijenlere maruz kalmaktadır. Savunma hattında ilk bariyeri oluşturan kornea epiteli yabancı antijen ile karşılaştığında aktive olmakta ve çeşitli sitokinleri salgılamaktadırlar. Sitokinler; hücrel aktivasyon, farklılaşma, inflamasyon, yara iyileşmesi ve apoptoz gibi birçok fonksiyonu olan proteinlerdir. Bu sitokinler arasında IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve interferon- γ sayılabilir [77]. İnflamasyonlu korneada, makrofaj infiltrasyonunun anjiyogenezden sorumlu olduğu düşünülmektedir [78]. Avasküler korneada normalde immünglobulin üreten plazma hücreleri yoktur. Normal korneada antijen sunan *Langerhans hücreleri* sıklıkla limbus ve periferik korneada yerleşim göstermektedir [79].

2.5.1 Kornea Neovaskülarizasyonunda Sitokinlerin Rolü

İnflamasyon, hemen hemen her zaman kornea neovaskülarizasyonuna eşlik eder. İn vitro koşullarda kornea epitel hücresi IL-1; kornea epitel, stroma ve endotel hücreleri IL-6 ve kornea epitel ve stroma hücreleri IL-8 üretir. Kornea epitel hücreleri tarafından üretilen IL-1'in ana inflamatuvar sitokin olduğu bildirilmiştir. IL-1, fibroblastlar için kemotaktiktir ve inflamatuvar hücre ve fibroblast proliferasyonu uyarır. Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi, 19 çok fonksiyonlu sitokinden oluşan ve inflamasyon ve apoptozda önemli rol oynayan bir gen ailesidir [80]. TNF- α , esas olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından sentezlenen bir proteindir. TNF aktivitesini iki reseptör (TNF α -R1 and TNF- α R2) üzerinden gösterir. Birçok anjiyogenik molekül endotel hücresindeki TNF- α reseptörünü artırır [81]. TNF- α kornea neovaskülarizasyonunda önemli proinflamatuvar bir sitokindir. İnflamasyon durumunda sentezlenen TNF- α nedeniyle; IL-8, VEGF ve bazik FGF üretimi indüklenmektedir [82]. TNF- α bu etkilerinin yanı sıra apoptozun uyarılması, B hücrelerinin proliferasyonu ve matürasyonunun uyarılması, pirogeniz, septik şok, kemik rezorpsiyonu ve katabolizmanın artırılması gibi etkilere de sahiptir. İnflamasyon durumunda kornea hücreleri de TNF- α salgılayabilmektedir [83]. Kornea epiteline olan travma sonrasında epiteldeki IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin seviyesi artar [84].

2.5.2 Arthus Reaksiyonu

Arthus reaksiyonu, lokal tip III hipersensitivite reaksiyonudur. Tip III hipersensitivite reaksiyonları, immün kompleks aracılıdır ve antijen/antikor kompleksinin vasküler duvar, seroza (plevra ve perikard vb.) ve glomerül gibi dokularda birikimini içerir. İlk kez Nicolas Maurice Arthus tarafından 1903 yılında [85] tanımlanmıştır. Arthus, at serumunu tekrarlayan subkutan enjeksiyonlar şeklinde tavşanlara enjekte ettiğinde ödem ve gangren oluşumunu gözlemiştir.

Arthus reaksiyonunda, pasif immünitede olduğu gibi bir antijenin intradermal enjeksiyonu sonrası in situ antijen/antikor kompleksleri oluşumu gözlenir. Eğer hayvan/hasta daha önce sensitize olmuş. Bu yolla kompleman aktivasyonu

çözülebilir anafilatoksin C5a ve C3a'nın parçalanması, polimorfonükleer lökosit kemotaksisi ve mast hücre degranülasyonu ile sonuçlanır. İmmün komplekslerin daha fazla birikimi lokal fibrinoid nekroz ile iskeminin indüklediği tromboza neden olabilir.

2.6 Tedavi

Kornea neovaskülarizasyonun tedavisinde kullanılan medikal ve cerrahi yöntemler Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. Kornea neovaskülarizasyonunda tedavi yöntemleri	
<i>Medikal tedavi yöntemleri</i>	<i>Cerrahi tedavi yöntemleri</i>
Steroidler Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar Siklosporin A Anti VEGF (bevacizumab) Diğer Genistein Somatostatin Octreotide Methotrexate Rapamycin Suramin Tacrolimus Suleparoide Vethalidomide Timokinon	Lazer fotokoagülasyon Fotodinamik tedavi Elektrokoagülasyon Limbus ototransplantasyonu Amniyon zarı transplantasyonu Konjonktiva transplantasyonu

2.6.1 Deksametazon

Kortikosteroidler, inflamasyon ve anjiyogenezi inhibe eden ilaçlardır. Kortikosteroidler, korneada inflamasyon ve neovaskularizasyon tedavisinde standart ilaç olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar, kortikosteroidlerin antiinflamatur özelliği yanında antianjiyogenik etkisini de göstermektedir [86, 87]. Bu durum, anjiyogenez ve inflamasyonun çeşitli sinyal yollarının ortak olmasıyla açıklanmaktadır. Hasarlı korneada inflamatur hücre infiltrasyonunun ana kaynağı, VEGF gibi anjiyogenik moleküllerdir. Buna ilave olarak, bu hücreler güçlü anjiyogenik molekül olan IL-1 ve TNF- α gibi birçok sitokin üretmektedir [88]. Steroidler, prostaglandin sentezini inhibe ederek antianjiyogenik ajanlar gibi davranmaktadır [89]. Steroidler ayrıca birçok inflamatur ve anjiyogenik sitokin (IL-1, IL-3, IL-6 ve IL-8) transkripsiyonunu da inhibe etmektedir [90]. Kortikosteroidler anjiyogenezde endotel hücre proliferasyonu ve tübül formasyonunu engellemektedir [91]. Nauck ve ark., kortikosteroidlerin VEGF ekspresyonunu azaltarak antianjiyogenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [92]. Deksametazon, bir sentetik kortikosteroid analogudur ve güçlü bir antiinflamatur ilaçtır. İnflamatur, immünolojik ve travma kökenli pekçok oküler hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır.

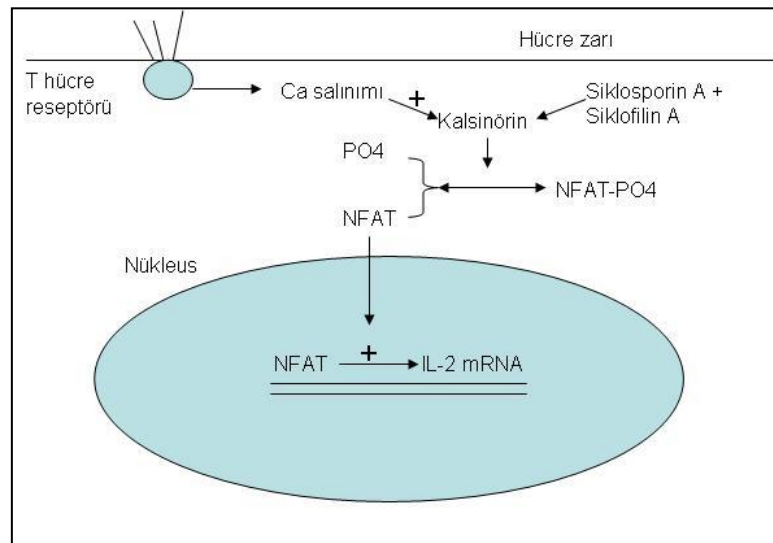
2.6.2 Bevacizumab

Bevacizumab, bir rekombinant insan monoklonal antikordur. VEGF molekülüne bağlanarak onun biyolojik aktivitesini nötralize eder [93]. Bevacizumab 214 aminoasitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 140 kDa'dır. Bevacizumab, VEGF-A'nın bütün izoformlarına bağlanır [94]. Metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılmak üzere Amerikan İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır [95]. Bevacizumab, VEGF'nin damar endotel hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasını inhibe ederek yeni damar oluşumunu engeller. Göz içi uygulama için geliştirilmiş bir ajan olmamasına karşın değişik nedenlerle oluşan koroid neovasküler membranlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Alkali kornea yanığı oluşturulan deneysel modelde tek doz subkonjoktival bevacizumab

uygulamasının kornea neovaskülarizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [96]. Erdurmuş ve Totan'ın kornea neovaskülarizasyonlu iki olguya uyguladıkları subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonu, bevacizumabın bu alanda kullanımının başlangıcı olmuştur [97].

2.6.3 Siklosporin A

Tolypocladium inflatum adlı mantardan elde edilen 11 aminoasitlik bir polipeptiddir [98]. Siklosporin A'nın etkisini gösterebilmesi için sitoplazmik reseptörü olan siklofilin A ve D'ye bağlanması gerekir. Siklofilin A'ya bağlanan siklosporin A, T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder [99, 100]. Siklosporin-siklofilin A kompleksi kalsinörine bağlanarak kalsinörünün serin/treonin fosfataz aktivitesini bloke eder [99, 101]. T hücre reseptörü antijen ile uyarılınca hücre içi sinyal iletimi olur ve hücre içinde kalsiyum miktarı artar. Artan kalsiyum kalsinörünü uyarır ve aktive eder. Kalsinörin bir fosfataz enzimi olup *aktif T hücrelerinin nükleer faktörü* (NFAT) adlı ve inaktif durumda sitoplazmada bulunan faktörden fosfat gruplarını kopararak aktif hale getirir. NFAT, çekirdekte IL-2 geninin düzenleyici bölgesindeki bağlanma yerine bağlanarak gen transkripsiyonunu ve böylece IL-2 üretimini artırır. Bu şekilde T hücre aktivasyonu sağlanır [100]. Şekil 1'de siklosporin A'nın etki mekanizması şematize edilmiştir.



Şekil 1: Siklosporin-A'nın etki mekanizması

Siklosporin A, IL-2 aracılığı ile T lenfositlerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu önler. Siklosporin A, CD4 tipi T hücrelerinin hücre siklusunun istirahat döneminde kalmasına neden olur. IL-2 ise; IL-2 reseptörü, IL-3, IL-4, TNF- α ve interferon- γ gibi immün sistemin birçok düzenleyici proteininin yapımını azaltır.

Siklosporin-siklofilin D kompleksi de programlı hücre ölümü olan apoptozu engeller [102]. Bu kompleks hücresel stres ve hasar anında mitokondri geçirgenlik porlarının açılmasını engeller. Bu porlar açıldığı zaman membranlar arası aralıktan apoptozda görev yapan proteazlar ve nükleazlar aktive olur.

Siklosporin-A'nın immünosupresif etkisinin üç önemli özelliği vardır:

- supressör T lenfositlerin (CD8+) fonksiyonunu bozamaz,
- benzer diğer immünosupresiflerin aksine miyelosüpresyon yapmaz ve
- doğal öldürücü lenfositleri (natural killer) inhibe etmez.

Son yıllarda penetran keratoplasti ve kimyasal yanık sonrası oluşan kornea neovaskülarizasyonunun tedavisinde siklosporin A kullanımının artış gösterdiği bilinmektedir [103,104]. İmmün kökenli bir deneysel kornea damarlanması modelinde ise siklosporin A denenmemiştir. Buna ilaveten, siklosporin A'nın % 0,05 konsantrasyondaki preparatının kornea neovaskülarizasyonunda kullanımına ilişkin bilgiler çok sınırlıdır. Bu nedenlerle bu çalışmada immün mekanizma ile oluşturulan deneysel kornea damarlanması modelinde % 0,05 siklosporin A'nın etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2010/28 sayılı onayı alındı. Ağırlığı 2000–2500 gr arasında değişen 6 aylık 36 adet albino erkek tavşan çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Deneklerin sadece sağ gözleri çalışmaya alındı. Tüm deneklere bir hafta arayla 2 kez 5 mg/ml olacak şekilde subkutan sıgır serum albumini (Albumin from bovine serum, A7030, Sigma-Aldrich, St Louis) uygulandı. İlk subkutan enjeksiyondan 14 gün sonra tavşanlara ketamin (Ketalar[®], Pfizer, Kırklareli, Türkiye) 10 mg/kg dozunda ve

ksilazin (Basilazin[®], Bavet, Börsensel, Almanya) 5 mg/kg dozunda kas içi enjeksiyonu ile derin anestezi sağlandı. Daha sonra bütün tavşanların sağ gözlerine topikal anestezi olarak % 0,5 proparakain hidroklorür (Alcaine[®], Alcon, Puurs, Belçika) damlatıldı. Derin anestezi altındaki tavşanların sağ gözlerinin kornea santraline mikroskop altında (Olympus SZ61, Tokyo, Japan) 30 gauge iğne yardımıyla intrastromal 1 mg/ml dozunda sığır serum albumini 50 µl olacak şekilde enjekte edildi.

İntrastromal sığır serum albumini enjeksiyonundan sonra denekler randomize olarak 4 eşit gruba ayrıldı. Birinci gruba (Grup 1, n=9) topikal % 0,05 siklosporin A (Restasis[®]; Allergan Inc., Irvine, CA, ABD), ikinci gruba (Grup 2, n=9) topikal % 0,1 deksametazon (Dexa-sine SE[®], Alcon, Friburg, Almanya), üçüncü gruba (Grup 3, n=9) topikal 0,5 % bevacizumab (Altuzan[®], Roche, Sanfransisko, ABD) ve kontrol grubuna (Grup 4, n=9) topikal % 0,9 NaCl çözeltisi tedavisi uygulandı. Bütün ilaçlar günde iki kez bir damla şeklinde 15 gün boyunca damlatıldı.

Tavşan gözlerinde kornea neovaskülarizasyonunun maksimum düzeye ulaştığı 15. günde deneklerin sağ göz fotoğrafları Nikon D90 dijital fotoğraf makinası ile alındı. Daha sonra bütün deneklere ketamin 10 mg/kg ve ksilazin 5 mg/kg intramusküler olarak verilerek genel anestezi sağlandı. Histopatolojik incelemeler için kurban edilen tavşanların sağ göz korneaları limbusun 1 mm gerisinden bistüri ve makas yardımıyla eksize edildi.

Dijital fotoğraflar üzerinden kornea neovaskülarizasyonu alanı yüzdesi hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı [106].

$$\% \text{ kornea neovaskülarizasyonu} = C/12 \times \pi \times [r^2 - (r-L)^2]$$

Bu formülde C; saat kadranı olarak kornea neovaskülarizasyonunu, r; tavşan korneası yarıçapını ve L; limbustan başlayarak kornea santraline doğru uzanan en uzun damar ya da en uzun damar grubunun uzunluğunu ifade etmektedir.

Eksize edilen kornealar % 10'luk formaldehit solüsyonuna konuldu. Doku örnekleri, ışık mikroskobu incelemesi için % 10'luk formaldehit çözeltisinde 24 saat süreyle tespit edildikten sonra, rutin doku takip işlemlerinden geçirilen kornealar parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan limbus bölgesinden başlayarak 5

μm kalınlığında seri kesitler alındı. Farklı bölgelerden alınan kesitlerin bir kısmı hematoksin-eozin (HE) ile boyandı. Bu alanlarda anjiyogenez ve inflamasyon değerlendirildi.

Apoptotik hücrelerin tanımlanması ve sayılması için polilizinli lam üzerine 4-5 μm kalınlığında kesitler alınıp terminal deoksiniükleotid transferaz aracılı dUTP-biotin uç etikleme (TUNEL) yöntemi uygulanarak immünohistokimyasal boyama (In Situ Death Detection Kit, POD[®], Roche, Mannheim, Almanya) yapıldı. Apoptoz değerlendirmesi her deneğe ait kornea kesitlerinde X40 objektif büyütme ile farklı 5 alandaki pozitif boyanan apoptotik hücreler sayılarak yapıldı.

Damar endotelinin boyanması için VEGF ve CD31 immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. BH2 Olympus fotomikroskobunda (Olympus Optical Company, Japonya) incelenerek fotoğraflandırıldı. İnflamasyon değerlendirmesi için 0 ile 3 arasında değişen skala kullanıldı (0: İnflamasyon yok, 1: Minimal inflamasyon, 2: Orta inflamasyon, 3: Şiddetli inflamasyon) [107]. İnflamasyon değerlendirilmesi her deneğe ait kornea kesitlerinden X40 objektif büyütme ile farklı 5 alan taranarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi *SPSS for Windows 11.5* paket programıyla yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ve sıralanabilir değişkenler için ortanca (minimum – maksimum) olarak gösterildi. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testiyle araştırıldı. Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı bulunması halinde Conover'in parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durumlar belirlendi. İstatistiksel anlamlılık p değerinin 0,05'in altında olması olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopik Bulgular

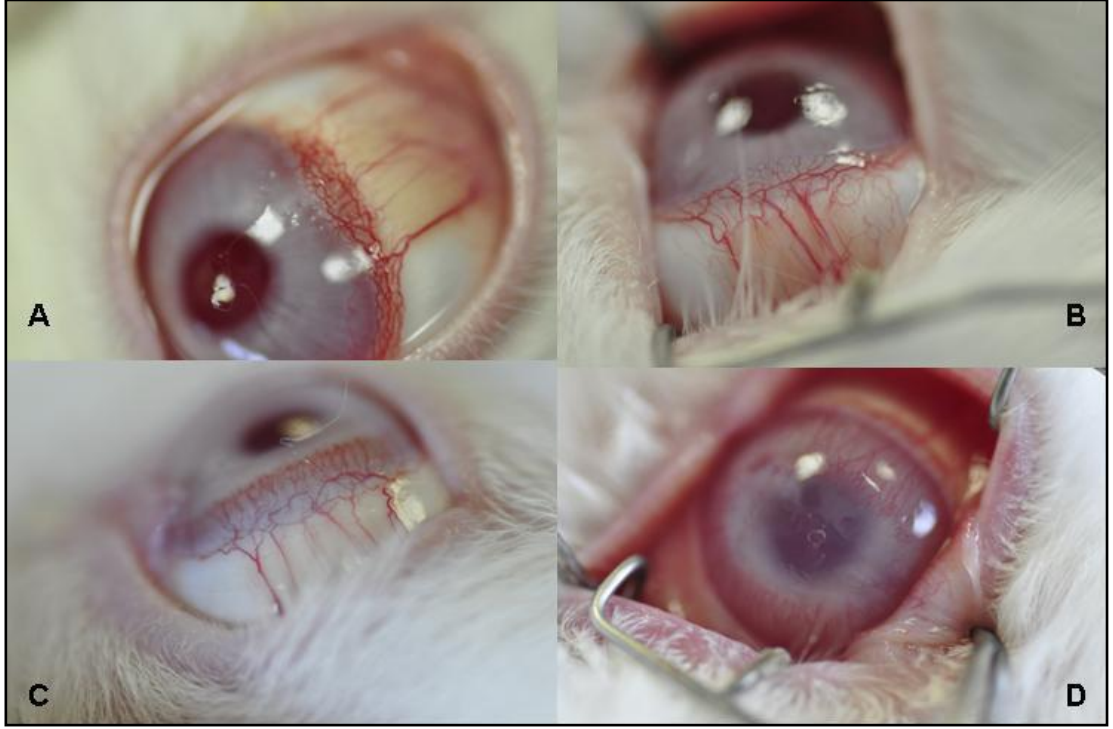
Deneklerin makroskopik fotoğrafları Şekil 2’de görülmektedir. Topikal % 0,05 siklosporin A ve topikal % 0,1 deksametazon gruplarında kornea neovaskülarizasyonunun belirgin olarak daha az olduğu görülmektedir. Topikal % 0,5 bevacizumab ve topikal % 0,9 NaCl gruplarında belirgin kornea neovaskülarizasyonu izlenmektedir.

Kornea neovaskülarizasyonu alanı yüzdesi hesaplamalarına ait sonuçlar Tablo 4’de gösterilmiştir. Topikal % 0,05 siklosporin A tedavisi, % 0,9 NaCl ve % 0,5 bevacizumab tedavisine göre kornea neovaskülarizasyonunu daha fazla inhibe etmiştir ($p=0,02$ ve $p=0,03$). Topikal % 0,1 deksametazon tedavisi, topikal % 0,05 siklosporin A tedavisine göre kornea neovaskülarizasyonunu daha fazla azaltmıştır ($p<0.001$). Şekil 3, kornea neovaskülarizasyonu alanı yüzdelerinin gruplara göre dağılımını göstermektedir.

4.2 Işık Mikroskopi Bulguları

Hematoksilen Eozin Boyama

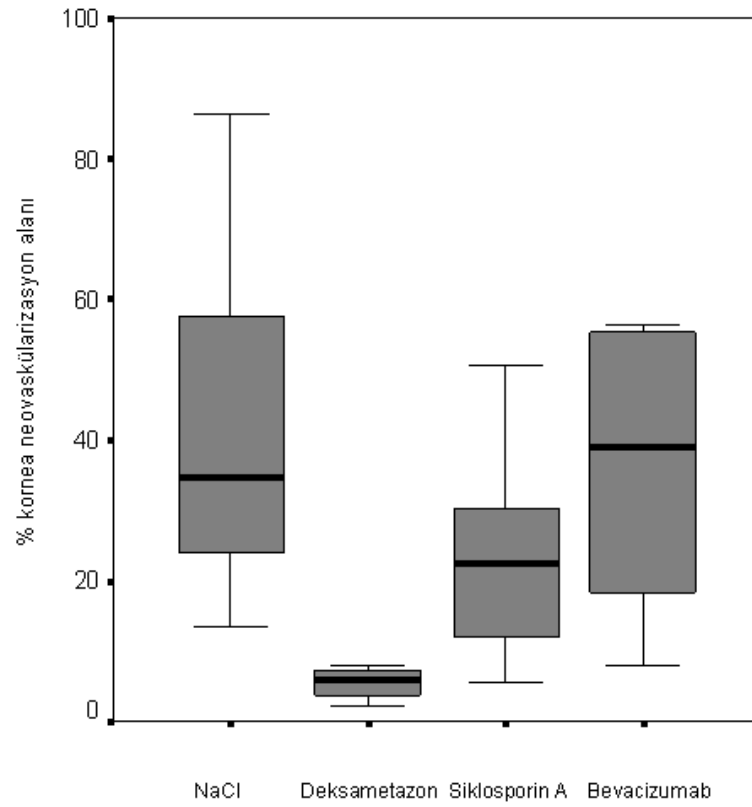
Topikal % 0,05 siklosporin A grubunda, topikal % 0,5 bevacizumab grubuna göre daha az anjiyogenez, fibroblast ve inflamatuvar hücre artışı görülmektedir. Ancak topikal % 0,1 deksametazon grubuna göre, topikal % 0,05 siklosporin A grubunda kornea stromasında anjiyogenez ve inflamatuvar hücreler daha fazla izlenmektedir (Şekil 4). Topikal % 0,1 deksametazon grubunda kornea stromasında anjiyogenez ve inflamatuvar hücreler izlenmemekte idi. Limbus bölgesinde hücrel infiltrasyon görülmemekte idi (Şekil 5). Topikal % 0,5 bevacizumab grubunda kontrol grubuna göre kornea stromasında daha az anjiyogenez, fibroblast ve inflamatuvar hücre artışı görülmektedir. Limbus bölgesinde anjiyogenezin görüldüğü alanlarda fibroblast ve inflamatuvar hücre artışı dikkati çekmekte idi (Şekil 6).



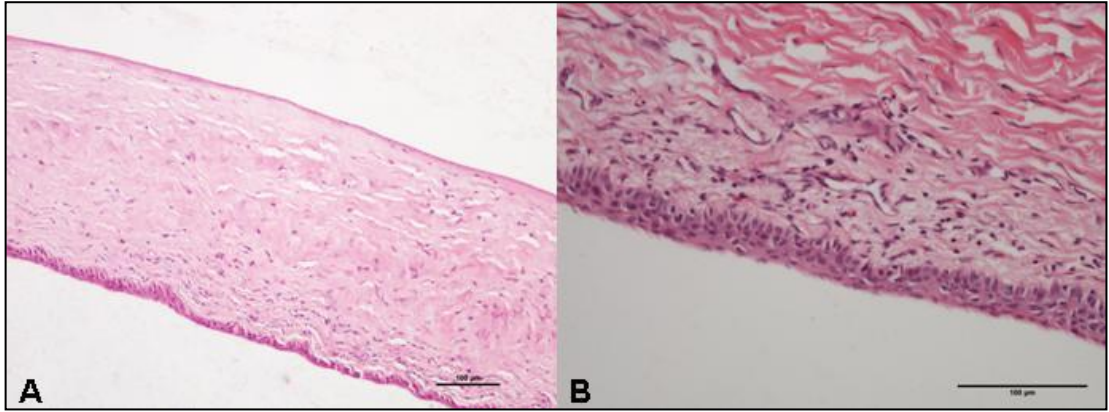
Şekil 2: Makroskopik kornea neovaskülarizasyon fotoğrafları. **(A)** Topikal % 0,05 siklosporin A grubu, **(B)** Topikal % 0,1 deksametazon grubu, **(C)** Topikal % 0,5 bevacizumab grubu ve **(D)** Topikal % 0,9 NaCl grubu.

Tablo 4. Gruplara ait ortalama kornea neovaskülarizasyonu alanı yüzdeleri

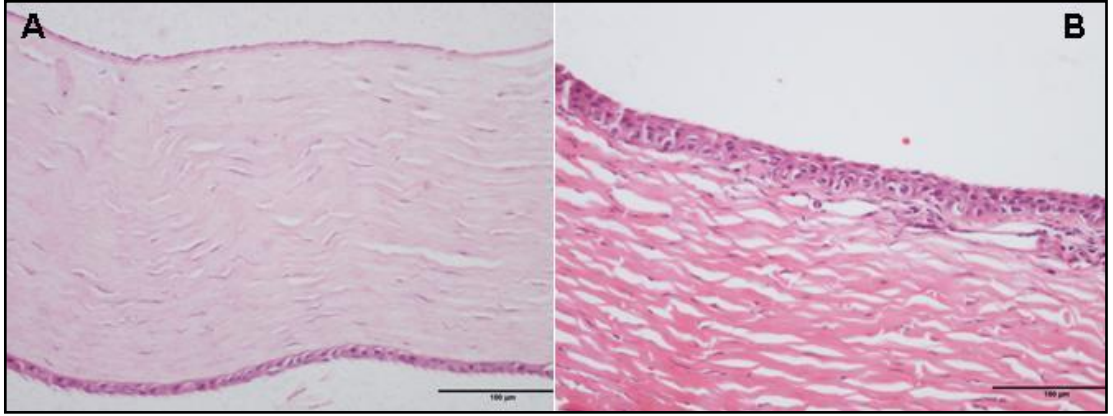
Gruplar	% neovaskülarize alan ± standart sapma	Ortanca (minumum-maksimum)
Grup 1 (Siklosporin A)	24,4 ± 15,4	22,4 (5,7 - 50,5)
Grup 2 (Deksametazon)	6 ± 3,5	5,9 (2,1 - 13,6)
Grup 3 (Bevacizumab)	37,1 ± 20,4	33,8 (8,0 - 56,4)
Grup 4 (NaCl)	44,1 ± 25,8	34,9 (13,7 - 86,3)



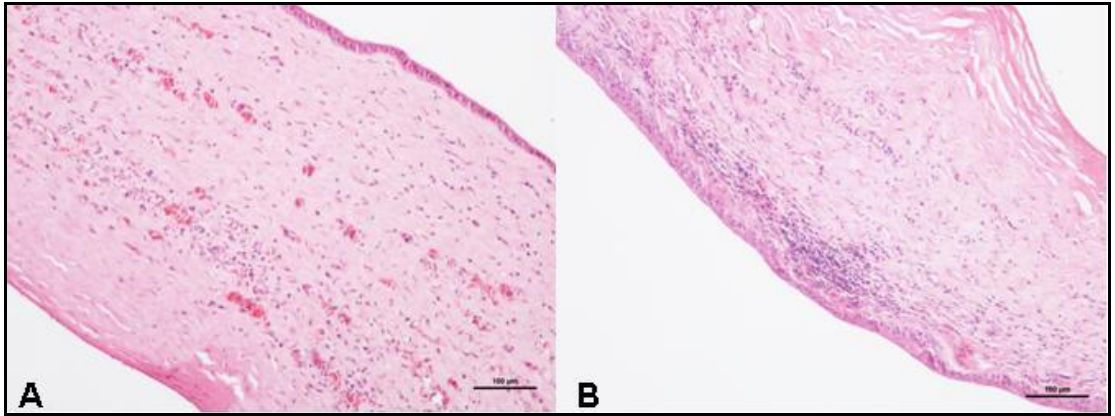
Şekil 3: Kornea neovaskularizasyon alanlarının gruplara göre dağılımı



Şekil 4: Topikal % 0,05 siklosporin A grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri. **(A)** Kornea stromasında kan damarı ve hücre sayısı bevacizumab uygulanan gruba göre daha az olduğu dikkati çekmektedir. **(B)** Limbus bölgesinden geçen kesitte hücresel infiltrasyon izlenmemektedir. (bar = 100 µm)

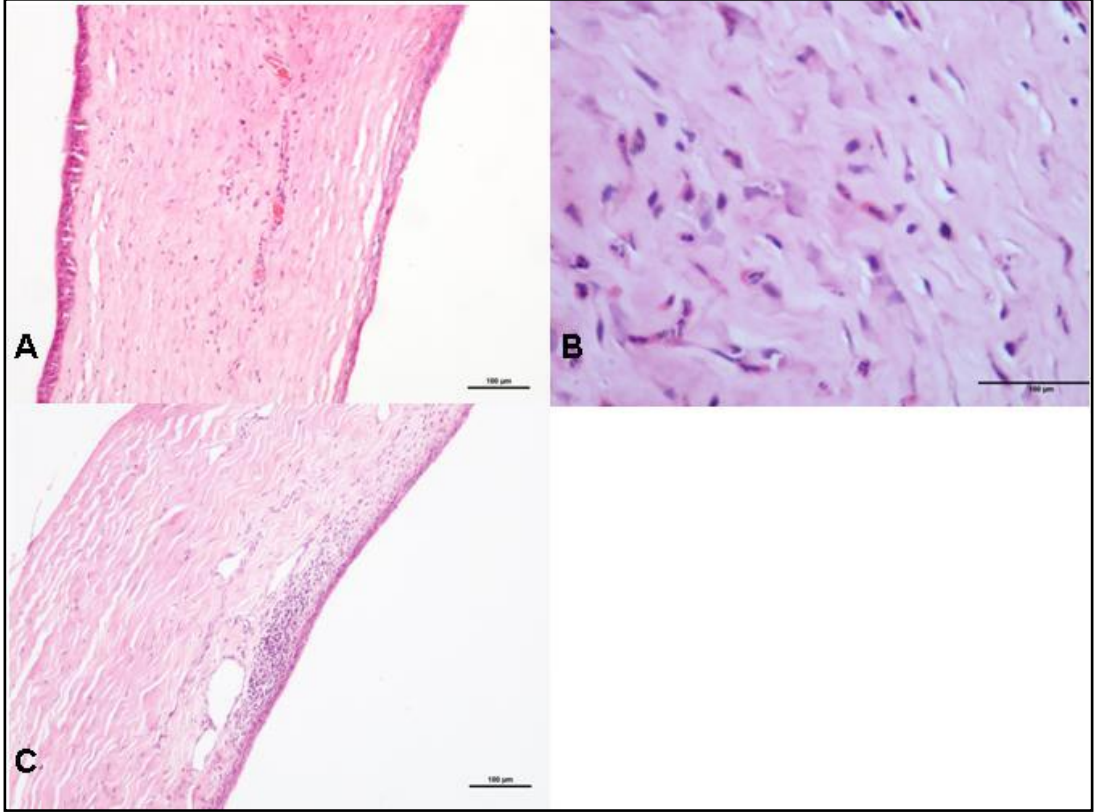


Şekil 5: Topikal % 0,1 deksametazon grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri. **(A)** Kornea stromasında neovaskülarizasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmemektedir. **(B)** Limbus bölgesinden geçen kesitte hücresel infiltrasyon görülmemektedir. (bar = 100 µm)



Şekil 6: Topikal % 0,5 bevacizumab grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri. **(A)** Kornea stromasında çok sayıda yeni damar oluşumu ve hücresel infiltrasyon görülmektedir. **(B)** Limbus bölgesinde kan damarları ve hücresel infiltrasyon kontrol grubuna benzemektedir. (bar = 100 µm)

Topikal % 0,9 NaCl çözeltisi damlatılan kontrol grubuna ait kornea histolojik kesitinde stromada anjiyogenez ve inflamatuvar hücre artışı görülmektedir (Şekil 7 A, B). Limbus bölgesinde anjiyogenezin görüldüğü alanlarda fibroblast ve inflamatuvar hücre artışı dikkati çekmektedir (Şekil 7 C).



Şekil 7. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopi görüntüleri. **(A, B)** Stromada kan damarları ve hücresel infiltrasyon artışı görülmektedir. **(C)** Limbus bölgesinden geçen kesitte yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve neovaskülarizasyon görülmektedir. (bar = 100 µm)

İnflamasyon skoru açısından topikal % 0,05 siklosporin A grubu ve topikal % 0,5 bevacizumab grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,13$). İnflamasyon skoru topikal % 0,1 dexametazon grubunda en düşük olarak saptandı. Tablo 5’de gruplara ait ortalama ve ortanca inflamasyon skorları gösterilmektedir.

Tablo 5. Gruplara göre inflamasyon skorları

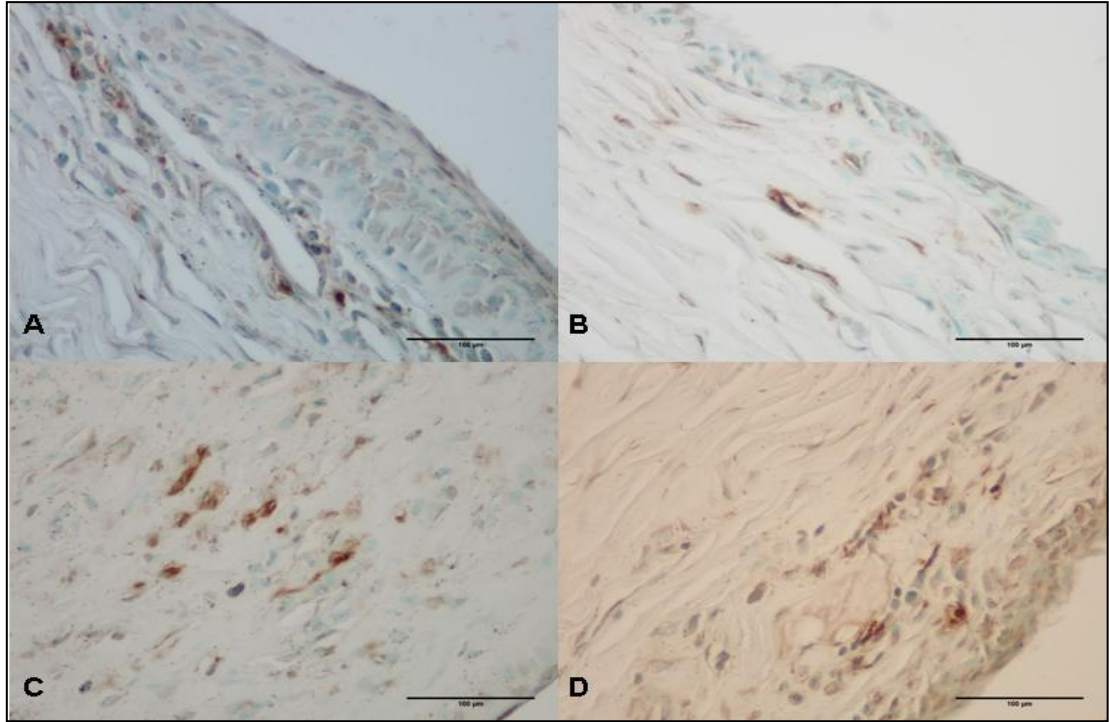
Gruplar	Ortalama inflamasyon ± standart sapma	Ortanca (minumum – maksimum)
Grup 1 (Siklosporin A)	1,8 ± 0,4	2 (1 - 2)
Grup 2 (Deksametazon)	0,2 ± 0,4	0 (0 - 1)
Grup 3 (Bevacizumab)	2,2 ± 0,4	2 (2 - 3)
Grup 4 (NaCl)	2,8 ± 0,4	3 (2 - 3)

4.3 Apoptoz Değerlendirilmesi

Tablo 6’da gruplara ait apoptotik hücre sayıları gösterilmiştir. Apoptotik hücre yoğunluğu açısından topikal % 0,05 siklosporin A grubu ile topikal % 0,1 deksametazon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,7$). Apoptotik hücre yoğunluğu açısından topikal % 0,5 bevacizumab grubu ile kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,7$). Apoptotik hücre yoğunluğu; topikal % 0,05 siklosporin A ve topikal % 0,1 deksametazon gruplarında, topikal % 0,5 bevacizumab ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az idi ($p>0,05$). Şekil 8’de gruplara ait TUNEL (+) apoptotik hücrelere ait histolojik kesitler görülmektedir.

Tablo 6. Gruplara göre ortalama TUNEL (+) apoptotik hücre yoğunluğu (hücre/mm²)

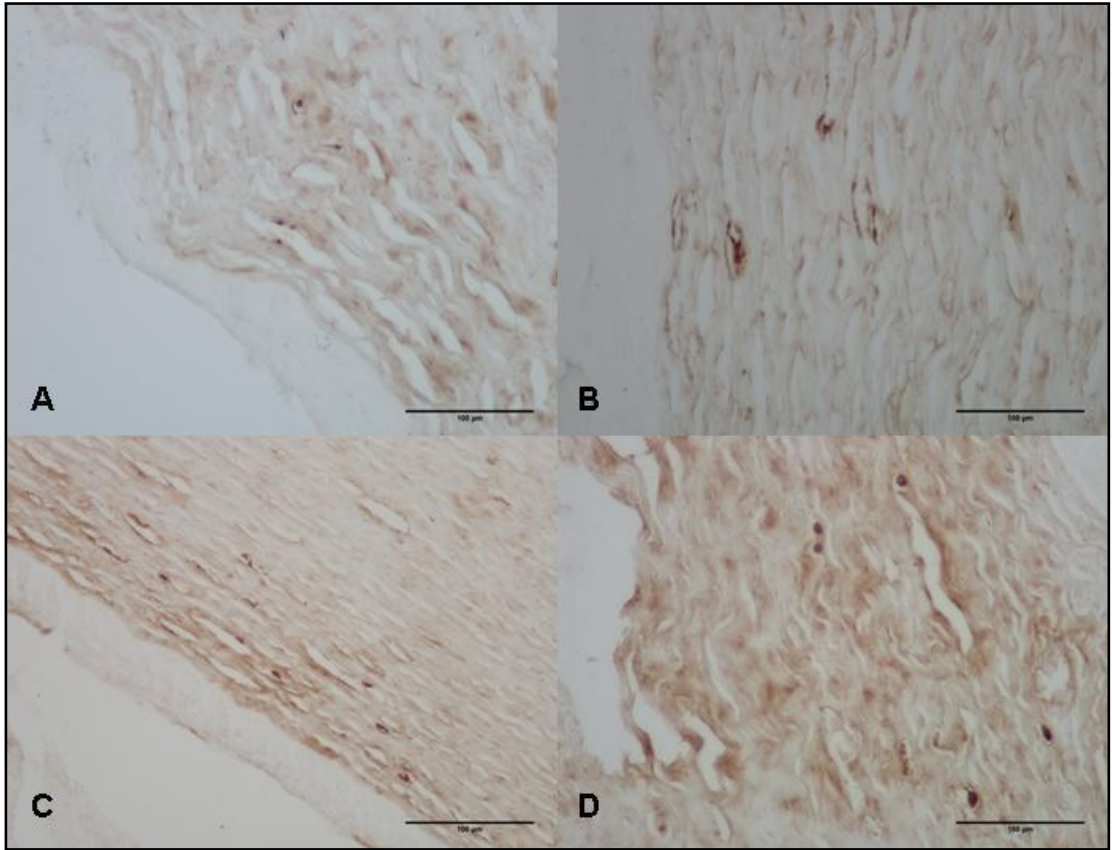
Gruplar	TUNEL (+) hücre sayısı ± standart sapma	Ortanca (minumum – maksimum)
Grup 1 (Siklosporin A)	10,7 ± 1,7	10 (9 - 14)
Grup 2 (Deksametazon)	11 ± 3,6	11 (6 - 18)
Grup 3 (Bevacizumab)	22,7 ± 6,5	23 (13 - 33)
Grup 4 (NaCl)	21,7 ± 4,6	20 (17 - 30)



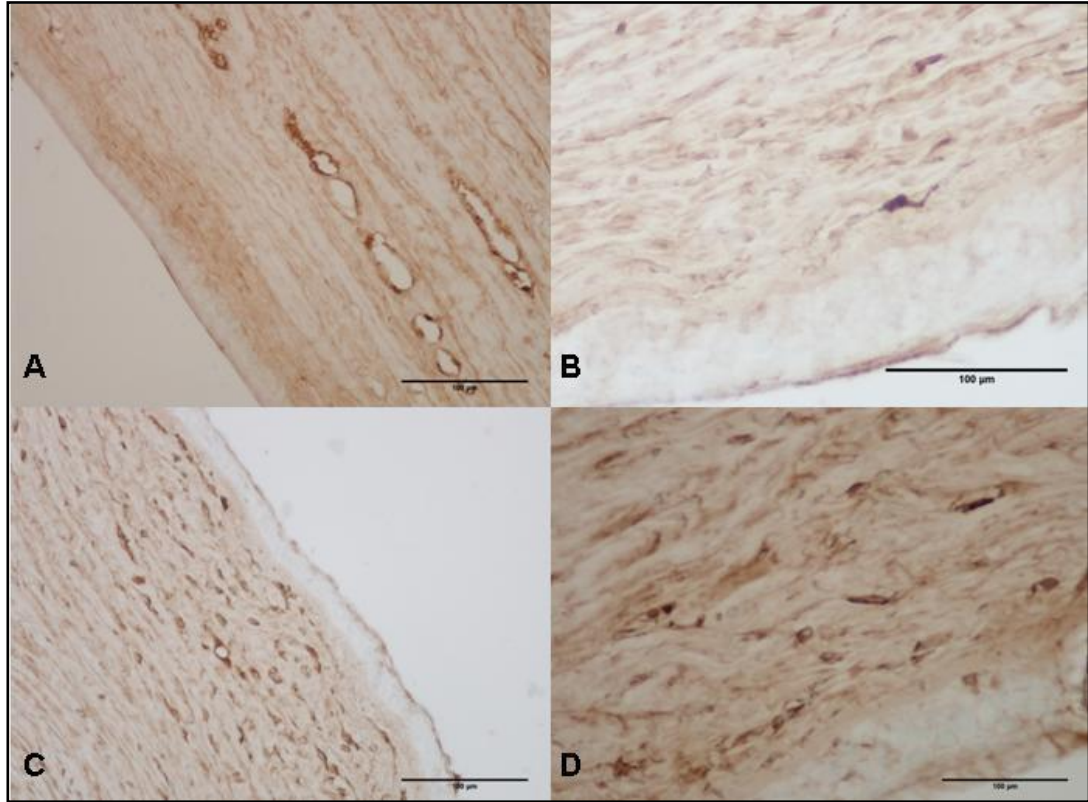
Şekil 8: TUNEL (+) boyanan apoptotik hücrelere ait histolojik kesitler. **(A)** Topikal % 0,05 siklosporin A grubu, **(B)** Topikal % 0,1 deksametazon grubu, **(C)** Topikal % 0,5 bevacizumab grubu ve **(D)** kontrol grubu. Topikal % 0,05 siklosporin A ve Topikal % 0,1 deksametazon gruplarında apoptotik hücrelerin diğer gruplara göre belirgin olarak az olduğu dikkati çekmektedir. (bar = 100 µm)

4.4 CD31 ve VEGF İmmünohistokimya Boyama

Tüm gruplarda CD31 pozitif boyanan endotel hücreleri saptandı (Şekil 9). Anjiyogenezin fazla olduğu kontrol ve topikal % 0,5 bevacizumab gruplarında CD31 ile boyanan endotel hücrelerinin daha fazla olduğu, topikal % 0,1 doksametazon ve topikal % 0,05 siklosporin A uygulanan gruplarda ise daha az CD31 boyanan endotel hücresi olduğu görüldü. VEGF immünohistokimyasal boyamasının CD31 boyamasına benzer sonuçlar verdiği gözlemlendi (Şekil 10) .



Şekil 9: CD31 immünohistokimyasal boyamasına ait histolojik kesitler. **(A)** Topikal % 0,05 siklosporin A grubu, **(B)** Topikal % 0,1 doksametazon grubu, **(C)** Topikal % 0,5 bevacizumab grubu ve **(D)** Kontrol grubu. A ve B’de görülen kesitlerde C ve D’deki kesitlere göre daha az CD31 ile boyanan endotel hücreleri görülmektedir. (bar = 100 µm)



Şekil 10: VEGF immünohistokimyasal boyamasına ait histolojik kesitler. **(A)** Topikal % 0,05 siklosporin A grubu, **(B)** Topikal % 0,1 deksametazon grubu, **(C)** Topikal % 0,5 bevacizumab grubu ve **(D)** Kontrol grubu. A ve B’de görülen kesitlerde C ve D’deki kesitlere göre daha az VEGF ile boyanan endotel hücreleri görülmektedir. (bar = 100 µm)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Arthus reaksiyonu mekanizması ile oluşturulan deneysel kornea neovaskülarizasyonu modelinde topikal % 0,05 siklosporin A'nın kornea damarlanmasını azalttığı gösterilmiştir. Bu etki topikal % 0,1 deksametazondan daha az idi. Bununla birlikte, topikal % 0,05 siklosporin A'nın kornea neovaskülarizasyonunu azaltıcı etkisi topikal % 0,5 bevacizumabdan daha üstün bulunmuştur. TUNEL metoduyla saptanan apoptotik hücre sayısı yoğunluğu topikal % 0,05 siklosporin A ve topikal % 0,1 deksametazon gruplarında belirgin olarak azalmıştı. Benzer şekilde CD31 ve VEGF ile boyanan endotel hücre sayıları da topikal % 0,05 siklosporin A ve topikal % 0,1 deksametazon gruplarında diğer gruplara göre daha az saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada topikal % 0,05 siklosporin A'nın immünolojik kornea neovaskülarizasyonunu tedavi etmede makroskopik ve histolojik olarak etkili olduğu görülmüştür.

Kornea neovaskülarizasyonu; insanlarda inflamatuvar, infeksiyöz, immünolojik, dejeneratif veya travmatik bozukluklar sonucu ortaya çıkan ve görme keskinliğini azaltarak ciddi morbiditeye neden olan bir klinik durumdur [71, 108, 109]. Bu nedenle, kornea neovaskülarizasyonunu azaltmaya yönelik deneysel ve klinik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Araşidonik asit metabolitlerinin kornea neovaskülarizasyonu patogeneğinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. Prostaglandinler, siklooksijenaz yolunun ürünleridir ve E serisi neovasküler yanıtın güçlü uyarıcılarıdır. Lipooksijenaz yolunun ürünü olan lökotrienler de lökositlerin kemotaksisine neden olarak kornea neovaskülarizasyonu oluşumunda görev alırlar. Araşidonik asit metabolizmasının inhibitörleri olan kortikosteroidler ve nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların, kornea neovaskülarizasyonunu ve inflamasyonu azaltmada etkili olduğu iyi bilinmektedir. Literatürde; heparin, selektif siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü, plasminojen kringle, triamsinolon, doksisiklin, timokinon ve vertoporfin ile fotodinamik tedavinin kornea neovaskülarizasyonunu inhibe etme kapasitesi olduğu gösterilmiştir [110]. Son yıllarda ise VEGF inhibitörlerinin kullanımı popülerite kazanmıştır.

Kornea neovaskülarizasyonun supresyonunda topikal steroidler önemli bir yer tutmaktadır. Topikal kortikosteroidlerin antianjiyogenik etkisi ilk defa 1950'de rapor

edilmiştir [111]. Bugüne kadar kortizon, deksametazon, hidroksikortizon, metilprednizolon, prednizolon, triamsinolon ve tikabezone propiyonat gibi steroidlerin kornea neovaskülarizasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Kortikosteroidlerin kornea neovaskülarizasyonundaki etki mekanizmaları; kemotaksisin inhibisyonu, proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 ve IL-6) ve plazminojen aktivatörün inhibisyonu, membran fosfolipidlerinden araşidonik asit salınımının baskılanarak prostaglandin ve lökotrien gibi inflamatuvar mediatörlerin oluşumunun azaltılması gibi değişik yollarla olmaktadır. Topikal steroidlerin kornea neovaskülarizasyonundaki etkinliği ile birlikte uzamış kullanımları; mikrobiyal keratitler, stromal incelme ve duyarlı bireylerde açık açılı glokom ve katarakt oluşumuna neden olabilmektedir [112]. Florometolon gibi zayıf etkili steroidlerin bu yan etkileri daha az olmaktadır. Dursun ve ark., alkali yanık ile oluşturulan kornea neovaskülarizasyonu modelinde topikal ve subkonjonktival bevacizumab ile topikal florometolonu karşılaştırmışlardır [113]. Bu çalışmada topikal ve subkonjonktival bevacizumab, topikal florometolondan daha etkili bir şekilde damarlanmayı azaltmıştır. Diğer bir alkali yanık modelinde ise topikal ve sistemik deksametazonun, kornea neovaskülarizasyonunu geriletmede doksisisiklinden daha etkili olduğu gösterilmiştir [114]. Çalışmamızda ise topikal % 0,1 deksametazon, topikal % 0,5 bevacizumaba göre kornea neovaskülarizasyonunu azaltmada daha etkili bulunmuştur. Bu durumun iki farklı hipotezle açıklanması mümkündür. Birincisi, topikal % 0,1 deksametazon, florometolondan daha potent bir kortikosteroid olduğu için kornea damarlanmasını daha fazla azaltmış olabilir. İkincisi ve daha önemli ise; çalışmamızda kullanılan deneysel modelin immün tabanlı bir mekanizmaya dayanıyor olması nedeniyle VEGF'den başka ara mediatörlerin etkin olması, bevacizumabın daha az etki göstermesine neden olmuş olabilir.

Kortikosteroidlerin birçok inflamatuvar ve neovasküler hastalığın tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmalarına rağmen yan etkilerinin fazla olması nedeniyle kullanımlarını azaltacak alternatif tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Siklosporin A, topikal kullanımda yan etki profilinin güvenli olması nedeniyle kortikosteroidlere alternatif bir ajan olmuştur. Topikal siklosporin A; keratokonjunktivitis sikka, korneal greft reddi, vernal keratokonjunktivit ve adenoviral keratokonjunktivite bağlı subepitelyal infiltrasyonları tedavi etmede kullanılmaktadır. Siklosporin A, etkisini

özellikle T lenfosit aktivasyonunu inhibe ederek gösteren bir immünomodülatör ajandır. Siklosporin-siklofilin D kompleksi de programlı hücre ölümü olan apoptozu engeller [102].

Deneyisel kornea damarlanma modelleri değişik mekanizmalarla oluşturulabilmektedir. Bunlar arasında en çok bilinenleri alkali yanık, bazik FGF ve VEGF pelletler, kornea sutureasyonu ve Arthus reaksiyonudur. Lipman ve ark., interleukin-2 ile uyarılmış deneyisel kornea neovaskularizasyonu modelinde siklosporin A'nın etkisini değerlendirmişlerdir [115]. Bu çalışmada zeytinyağı içinde 25 mg/kg siklosporin A'nın kornea damarlanmasını kontrol grubuna göre belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir. Siklosporin A'nın anjiyogenezi inhibe edici etkisi; IL-2 ve reseptörünün ekspresyonunun azaltılması ile ilişkili olabileceği gibi TNF- α gibi kornea neovaskularizasyonunda görevli proinflamatuvar sitokinleri azaltarak da gösterebilir. Siklosporin A'nın romatoid artritli hastalarda antianjiyojenik etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, siklosporin A'nın aktivatör protein-1 aracılı VEGF ekspresyonunu inhibe ederek etki gösterdiği saptanmıştır [116]. Çalışmamızda topikal % 0,05 siklosporin A'nın kornea neovaskularizasyonunu inhibe etmede topikal % 0,5 bevacizumabdan daha etkin olduğu görülmüştür. Bu bulgular göz önüne alındığında, siklosporin A'nın kornea neovaskularizasyonunu inhibe etmede VEGF ekspresyonunun azaltılmasının bir rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak muhtemelen siklosporin A, VEGF inhibisyonundan farklı bir takım mekanizmalarla da anjiyogenezi azaltmaktadır.

Yüksel ve ark., termal koterizasyon ile oluşturdukları deneyisel kornea neovaskularizasyonu modelinde subkonjonktival siklosporin A'nın etkinliğini değerlendirmişler ve siklosporin A'nın inhibitör etkisinin 0,5 mg/0,01 ml dozunda en belirgin olduğunu göstermişlerdir [117]. Çalışmamızda, topikal % 0,05 siklosporin A dozunun 2x1 pozolojide uygulanmasının da kornea damarlanmasını azalttığını gözlemledik. Ancak her iki çalışmada kullanılan neovaskularizasyon modeli farklı olduğundan dozların birebir karşılaştırması yanıltıcı olabilir.

Literatürde 4 ile 25 mg/ml arasındaki dozlarda topikal bevacizumabın kornea neovaskularizasyonunu azalttığı gösterilmiş [118, 119, 120]. Habot-Wilner ve ark., topikal bevacizumabı farklı dozlarda uygulayarak kornea neovaskularizasyonu azaltmadaki etkinliklerini incelemişlerdir [121]. Bu çalışmada, 4 mg/ml altındaki

konsantrasyonlarda bevacizumabın neovaskülarizasyonu geriletmede etkinliğinin az olduğu gösterilmiştir. Manzano ve ark.'nın deneysel çalışmalarında ise, topikal 4 mg/ml bevacizumabın günde iki kez uygulamasının kontrol grubuna göre % 40 oranında kornea damarlanmasını azalttığı gösterilmiştir [118].

Peebo ve ark., 10/0 naylon suture ile oluşturdıkları inflamatuvar kornea neovaskülarizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumabın triamsinolondan daha az etkin olduğunu saptamışlardır [122]. Yazarlar inflamatuvar kornea neovaskülarizasyonu modelinde bevacizumabın etkinliğinin düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Başka bir deneysel çalışmada ise FGF ile indüklenen kornea neovaskülarizasyonunda bevacizumabın etkin olmadığı bildirilmiştir [123]. Dastjerdi ve ark., topikal ve subkonjonktival bevacizumab uygulaması ile yaptıkları bir penetrasyon çalışmasında, epitel bütünlüğünün korunduğu korneada subkonjonktival uygulamanın daha yüksek ilaç konsantrasyonu sağladığını göstermişlerdir [124]. Çalışmamızda iki hafta boyunca günde 2 kez 5 mg/ml bevacizumab damla uygulandı. Bu dozda topikal bevacizumab uygulamasının kornea neovaskülarizasyonunu azaltmada kontrol grubundan üstün olduğunu saptadık. Ancak topikal % 0,5 bevacizumabın etkinliği, topikal % 0,05 siklosporin A ve topikal % 0,1 dexametazonun etkinliklerinden anlamlı olarak düşük olarak saptandı. Çalışmamızda topikal bevacizumabın etkinliğinin düşük bulunması; sağlam kornea epitelinden ilacın penetrasyonunun az olmasına, uygulanan bevacizumab konsantrasyonunun düşük olmasına veya immünolojik kökenli kornea damarlanması modelinde VEGF'den başka sitokinlerin rol oynamasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda immünojenik mekanizmayla oluşturulan kornea neovaskülarizasyonu modelinde topikal % 0,05 siklosporin A'nın kornea neovaskülarizasyonu üzerine olan inhibe edici etkisi topikal % 0,5 bevacizumabdan daha üstün bulunmuştur. Ancak topikal % 0,05 siklosporin A, kornea damarlanmasını topikal % 0,1 deksametazondan daha az azaltmıştır. Topikal % 0,05 siklosporin A'nın insanlarda kornea neovaskülarizasyonunu inhibe edici etkinliğinin gösterilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Yan etki profilinin az olması siklosporin A'yı kortikosteroidlere iyi bir alternatif yapabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Zhang SX, Ma JX: Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(1):1-37.
2. Hanna C., Bicknell D.S., O'Brien J.E.: Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol.* 1961;65(5):695-698.
3. Nishida T: Cornea. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* China: Elsevier Mosby, 2005:3-26.
4. Cameron JG. Corneal reaction to injury. In Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. eds. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* China: Elsevier Mosby, 2005:115-131.
5. Klyce SD, Crosson CE: Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review. *Curr Eye Res.* 1985;4(4):323-331.
6. Wiley L, SunderRaj N, Sun TT, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(3):594-602.
7. Kuo IC. Corneal wound healing. *Curr opin Ophthalmol.* 2004;15(4): 311-315.
8. Akyol N. Korneanın Anatomi ve Fizyoloji . 25. Ulusal Oftalmoloji Kursu. Kornea ve Kontakt Lens. Ankara-Türkiye; 2005:7-25.
9. Beebe DC, Coats JM. The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev Biol.* 2000;220(2):424-431.
10. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edlehauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985;4(6):671-677.
11. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(3): 779-782.
12. Riley M. Transport of ions and metabolites across the corneal endothelium. In: McDevitt D. eds. *Cell biology of the eye.* New York: Academic Press; 1982:53-95.
13. Başkan CA. Göz Anatomisi. In: Q'dwyer PA. Eds. *Oftalmolojinin Esas ve İlkeleri.* Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2009:51-52.
14. Remington LA. Clinical anatomy and physiology of the visual system. 3. baskı. St. Louis: Elsevier Butterworth Heinemann; 2009:28.
15. Muller LJ. Pels L. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(4):476-488.
16. Driver PJ, Lemp MA. Meibomian gland dysfunction. *Surv Ophthalmol.* 1996;40(5):343-367.
17. Barton K, Nava A, Monroy DC, Pflugfelder SC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:461-469.
18. Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and

- conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2283-2292.
19. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology.* 1982;89(6):531-90.
 20. Ozanics V, Rayborn M, Sagun D. Observations on the morphology of the developing primate cornea: epithelium, its innervation and anterior stroma. *J Morphol.* 1977;153(2):263-297.
 21. Murphy C, Alvarado J, Juster R: Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984; 25(12):1402-1415.
 22. Ahmadi AJ, Jakoiec FA. Corneal wound healing. Cytokines and extracellular matrix proteins. *Int Ophthalmol Clin.* 2002;42(2):13-22.
 23. Zeiske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(1):1-7.
 24. Soong HK. Penetrating keratoplasty for ocular surface disease. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. eds. *Cornea.* 3 baskı. St. Louis: Mosby Yearbook; 1996:1781-1788.
 25. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26(6): 897-900.
 26. Hogan MJ, Alvarado JA, Wedell JE. *The Cornea. Histology of the human eye.* Hogan MJ, Alvarado JA, Wedell JE. Eds. Philadelphia: WB Saunders; 1997: 55-111.
 27. Wong TTL, Sethi C, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Survey of Ophthalmology.* 2002; 47(3):239-256.
 28. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22(1): 69-94.
 29. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels SP, Neufeld AH, Kenyon KR. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985;26(4):443-449.
 30. Iguchi I, Kamiyama K, Wang X, Kita M, Imanishi J, Yamaguchi N, Sotozono C, Kinoshita S. Enhancing effect of platelet-derived growth factor on migration of corneal endothelial cells. *Cornea* 1995;14(4): 365-371.
 31. Isner JM, Asara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999; 103(9): 1231-1236
 32. Denekamp J. Vasculature as a target for tumor therapy. In: Hammerson F, Hudlicka O. eds. *Progress in Applied Microcirculation.* Basel: Karger, 1984;28.
 33. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. II. Studies on the effect of leukocytic elimination on corneal vascularization. *Am J Pathol.* 1975; 81(3):531-544.
 34. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. III.

- Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Am J Pathol.* 1976;82(1):157-170.
35. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653–660.
 36. Burger PC, Chandler DB, Klinworth GK. Experimental corneal neovascularization; biomicroscopic, angiographic and morphologic correlation. *Cornea.* 1985;4(1):35-41.
 37. Yaylali V, Ohta T, Kaufman SC, Maitchouk DY, Beuerman RW. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea.* 1998;17(1):646-653.
 38. Cogan DG. Corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1962;1:253-261.
 39. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea.* 1998;17(6):611-613.
 40. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol.* 1998;43(3):245-69.
 41. Kaya M. Deneysel kornea yanığında topikal infliksimab ve triamsinolon asetonidin korneadaki MIF düzeylerine etkileri. Uzmanlık, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ, 2005.
 42. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002;29:10–14.
 43. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000; 407(6801):242-8.
 44. Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(11):1169-1174.
 45. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
 46. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem.* 1996;271(7):3877-3883.
 47. Yazır Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF):Reseptörleri Ve Fonksiyonları. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi. 2007;29(3):128-136.
 48. Hayashi N, Nakayasu K, Okisaka S. Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factor through corneal neovascularization. In vivo and in vitro. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 1996;100(8):587-591.
 49. Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv. Cancer Res.* 2000;78:103–157.
 50. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-839.

51. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(7):1104-1117.
52. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein.* 1996;49(1-3):117-137.
53. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2000;70(4):419-428.
54. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin- 1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87(7): 1171–1180.
55. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia.* 1993;36(4):282-291.
56. 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(3):391-396
57. Jones, SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene.* 2000;19(49): 5558-5567.
58. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11–25.
59. Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, PuzonMcLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIb beta3. *Curr. Biol.* 2006;16(18):1796-1806.
60. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994;79(2):315-328.
61. 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(2):212-217.
62. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: Angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2006;10:264-302.
63. Gabison E, Chang JH, Hernandez-Quintela E, Javier J, Lu PC, Ye H, Kure T, Kato T, Azar DT. Antiangiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):579-558.
64. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88(2):277-285.

65. Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, Luostarinen J, Heljasvaara R, Stenman UH, Pihlajaniemi T, Salo T. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22404-22411.
66. Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16464-16469.
67. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274(17):11721-11726.
68. Urbich C, Reissner A, Chavakis E, Dernbach E, Haendeler J, Fleming I, Zeiher AM, Kaszkin M, Dimmeler S. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the antiangiogenic effects of endostatin. *FASEB J.* 2002;16(7):706-708.
69. Lai LJ, Xiao X, Wu JH. Inhibition of corneal neovascularization with endostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector in a mouse corneal injury model. *J Biomed Sci.* 2007;14(3):313-322.
70. Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(8):1700-1707.
71. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001; 12(4):242-249.
72. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 1999;285(5425):245-248.
73. Cursiefen C, Masli S, Ng TF, 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(4):1117-1124.
74. Nor JE, Mitra RS, Sutorik M, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res.* 2000;37(3):209-218.
75. Zak S, Treven J, Nash N, Gutierrez LS. Lack of thrombospondin-1 increases angiogenesis in a model of chronic inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(3):297-304.
76. 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):1-18.
77. Hong JW, Liu JJ, Lee JS, Mohan RR, Mohan RR, Woods DJ, He YG, Wilson SE. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(12):2795-2803.
78. Sonoda K-H, Nakao S, Nakamura T, Oshima T, Qiao H, Hisatomi T, Kinoshita S, Ishibashi T. Cellular events in the normal and inflamed cornea. *Cornea.* 2005;24(8):50-54.

79. Seto SK, Gillette TE, Chandler JW. HLA-DR+/T6- Langerhans' cells off the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(10):1719-1722
80. McDermott, MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol.* 2001;47(4):619–635
81. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. 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):4015-4023.
82. Henricson BE, Benjamin WR, Vogel SN. Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A that result in equivalent early endotoxin tolerance. *Infect Immun.* 1990; 58(8):2429-2437.
83. Staats HF, Lausch RN. Cytokine expression in vivo during murine herpetic stromal keratitis. Effect of protective antibody therapy. *J Immunol.* 1993;151(1):277-283.
84. 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(5):625-637.
85. Injections répétées de serum du cheval chez le lapin, *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales, Paris*;55(1903), 817–820.
86. 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):1954-1962.
87. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol.* 1983;101(4):640-643.
88. Planck SR, Rich LF, Ansel JC, Huang XN, Rosenbaum JT. Trauma and alkali burns induce distinct patterns of cytokine gene expression in the rat cornea. *Ocul Immunol Inflamm.* 1997;5(2):95-100.
89. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(7):1588-1593.
90. Pleyer U, Dannowski H, Volk HD, Ritter T. Corneal allograft rejection: Current understanding. I. Immunobiology and basic mechanisms. *Ophthalmologica.* 2001;215(4):254-262.
91. Clark AF. Mechanism of action of the angiostatic cortisene anecortave acetate. *Surv Ophthalmol* 2007; 52(1): 26-34.
92. Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, Papakonstantinou E, Roth M. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1998; 341(2-3):309-315.
93. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001;26(1):25-35.

94. 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(3):424-431.
95. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(3):2335-2342.
96. Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, Yazdchi T, Sedaghat A, Noori F. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 35(8):745-748.
97. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245(10):1577-1579.
98. Tatlıpınar S, Akpek EK. Topical ciclosporin in the treatment of ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2005; 89(10):1363-1367.
99. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(9):3686-3690
100. Halloran PF, Kung L, Noujaim J. Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc.* 1998;30(5):2167-2170
101. Martinez-Martinez S, Redondo JM. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem.* 2004;11(8):997-1007
102. Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tintelen-Blomley M, Lemasters JJ. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem.* 2003; 10(16):1485-1506,
103. Sonmez B, Beden U, Erkan D. Regression of severe corneal stromal neovascularization with topical cyclosporine 0.05% after penetrating keratoplasty for fungal corneal ulcer. *Int Ophthalmol.* 2009;29(2):123-125
104. Benelli U, Ross JR, Nardi M, Klintworth GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery: inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(2): 274-282
105. 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.
106. Saita N, Fujiwara N, Yano I, Soejima K, Kobayashi K. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect Immun.* 2000; 68(10):5991-5997.
107. Peebo BB, Fagerholm P, Traneus-Röckert C, Lagali N. Cellular level characterization of capillary regression in inflammatory angiogenesis using an in vivo corneal model. *Angiogenesis.* 2011;14(3):393-405.
108. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization: pathogenesis and inhibition. *Cornea.* 1987;6(4): 250-257.

109. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol*. 1998;43(3):245–269.
110. Erdurmus M, Yagci R, Yilmaz B, Hepseren IF, Turkmen C, Aydin B, Karadag R. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization. *Cornea*. 2007;26(6):715-719.
111. Jones IS, Meyer K. Inhibition of vascularization of the rabbit cornea by local application of cortisone. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1950;74(1):102-104
112. Baratz KH, Hattenhauer MG. Indiscriminate use of corticosteroid-containing eyedrops. *Mayo Clin Proc*. 1999;74(4):362-366.
113. Dursun A., Arıcı MK, AÖzeç AV, Dursun F, Toker Mİ, Topaklara A. Alkali Yanığına Bağlı Gelişen Korneal Anjiyogenez Modelinde Topikal, Subkonjonktival Bevacizumab ve Florometolon Asetatın Topikal Uygulanması. *Turk J Ophthalmol*. 2010;40(6):318-322.
114. Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, Yong-ping L, Hong-jie M, Ying Z, Xiang-gui W. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res*. 2008;33(8):653-660.
115. Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. 1992;110(3):405-407.
116. Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Youn J, Hwang SY, Park SH, Kim HY. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2002;46(5):1202-9.
117. Yüksel H, Tunç M, Yıldırım Ü, Önder İ, Kılıç Ç. Deneyisel Kornea Neovaskülarizasyonunda Subkonjonktival Siklosporin-A'nın Tedavideki Rolü. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol*. 2010;19(4):226-233.
118. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chevez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol*. 2007; 91(6): 804–807.
119. DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2007;125(6): 834–836.
120. Uy HS, Chan PS, Ang RE. Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with Stevens–Johnson syndrome. *Cornea*. 2008;27(1):70–73.
121. Habot-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, Moisseiev J, Rosner M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol*. 2010;88(8):862-867.
122. Peebo BB, Fagerholm P, Traneus-Röckert C, Lagali N. Cellular level characterization of capillary regression in inflammatory angiogenesis using an in vivo corneal model. *Angiogenesis*. 2011;14(3):393-405.
123. Gaudric A, N'guyen T, Moenner M, Glacet-Bernard A, Barritault D. Quantification of angiogenesis due to basic fibroblast growth factor in a modified rabbit corneal model. *Ophthalmic Res* 1992; 24(3): 181-188.

- 124.** Dastjerdi MH, Sadrai Z, Saban DR, Zhang Q, Dana R. Corneal penetration of topical and subconjunctival bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8718-8723.