

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL KORNEAL ANJİOGENEZDE
CETUXİMAB VE BEVACİZUMAB'IN ROLÜ**

Doktora Tezi

**Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı**

Selçuk TÜNK

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Yusuf NERGİZ

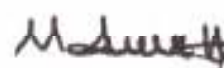
**DİYARBAKIR
2011**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

Deneyisel Korneal Anjiyogenezde Cetuximab ve Bevacizumab'ın Rolü isimli
Doktora Tezi **08.04.2011**, tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı :Prof.Dr.Yusuf NERGİZ
Tezi Teslim Eden :Araş.Gör.Selçuk TUNK

Jüri Üyeleri

Ünvanı	Adı Soyadı	
Başkan	:Prof.Dr. Yusuf NERGİZ	
Üye	:Prof.Dr. Murat AKKUŞ	
Üye	:Prof.Dr. Orhan TACAR	
Üye	:Doç.Dr.Ayşe YILDIRIM	
Üye	:Yrd.Doç.Dr. Özlem BARAN	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

08/04/2011

Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle yetişmemde emekleri olan değerli hocalarım, Fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Tez Danışmanım Prof.Dr.Yusuf NERGİZ başta olmak üzere, Prof.Dr.Murat AKKUŞ'a, Doç.Dr.Engin DEVECİ'ye, Yrd.Doç.Dr.Selen BAHÇECİ, Yrd.Doç.Dr.Özlem BARAN ve Yrd.Doç.Dr.Sevda SÖKER'e

Tezimin deneysel çalışmalarında her zaman desteğini yanımda hissettiğim Uzm. Dr. İskender KAPLANOĞLU ve Dr.Ercan AYAZ'a,

Ayrıca, ilaç dozlarının hazırlanması aşamasında bilimsel desteğini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Hasan AKKOÇ'a, cerrahi desteğiyle Uzm.Dr.Umut DAĞ'a, laboratuarda çalışırken yardımlarını esirgemeyen laboratuvar teknisyenlerimize ve DÜSAM çalışanlarına,

Tezim için yeterli bütçeyi ayırıp, destekleyen DÜBAP'a,

Her an yanımda olan kâdim dostlarıma ve arkadaşlarıma,

Ve her zaman sonsuz sabır örneği gösterip beni destekleyen annem, babam ve kardeşlerime ayrı, ayrı teşekkürlerimi borç bilirim.

Selçuk Tünk
Diyarbakır, 2011

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
TEZ ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kornea Histolojisi	3
2.1.1.Kornea Epiteli	3
2.1.2.Bowman Membranı	3
2.1.3.Kornea Stroması	4
2.1.4.Descemet Membranı	4
2.1.5.Kornea Endoteli	4
2.1.6.Limbus	5
2.2.Korneanın Embriyolojik Gelişimi	6
2.3.Anjiyogenez	6
2.3.1.Tarihçe ve Tanım	6
2.3.2.Anjiyogenez Mekanizmaları	7
2.3.2.1.Anjiyogenezin Hücresel Organizasyonu	7
2.3.2.1.1.Tomurcuklanma Mekanizması	8
2.3.2.1.2.İçe Geçme Mekanizması	8
2.3.2.2.Anjiyogenezin Moleküler Mekanizması	10
2.3.2.2.1.Vasküler Endotelial Growth Faktör(VEGF)	10
2.3.2.2.2.Anjiyopoietinler ve Tie Reseptörleri	13

2.3.3.2.3.İntegrinler	16
2.3.3.2.4.Fibroblast Growth Faktör-2(FGF-2,bFGF)	18
2.3.3.2.5.Platelet Derived Growth Faktör(PDGF)	19
2.3.3.2.6.Epidermal Growth Faktör(EGF)	20
2.3.3.2.7.Matriks Metalloproteinazlar	21
2.4.Korneal Anjiyogenez	23
2.4.1. Giriş	23
2.4.2.Korneal Avaskülerite Mekanizması	23
2.4.3.Korneal Anjiyogenez Mekanizması	24
2.4.4. Korneal Anjiyogenezin Yaygın Nedenleri	25
2.4.5.Korneal Anjiyogenezde Klinik Bulgular	25
2.4.6.Korneal Anjiyogenezde Antianjiyojenik Tedavi	26
2.5.Bevacizumab	26
2.5.1.Genel Özellikleri	26
2.5.2.Etki Mekanizması	27
2.6.Cetuximab	27
2.6.1.Genel Özellikleri	27
2.6.2.Etki Mekanizması	27
3.GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	30
3.2. Alkali Yanık Modelinin Oluşturulması ve Deney Prosedürü	30
3.3.Anjiyogenez Yoğunluğunun ve İnhibisyonun Saptanması	32
3.4.Dokuların Alınması ve Doku Takibi	33
3.5.Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	33
3.6. İmmunohistokimyasal Yöntem	34
3.6.1.Vasküler Endotelyal Growth Faktör(VEGF) İmmun Boyaması	34
3.6.2.Von Willebrand Faktör(VWF) İmmun Boyaması	35
3.7.İstatistiksel Analiz	36
4.BULGULAR	37
4.1.Biomikroskopik Bulgular	37

4.2.Histopatolojik Bulgular	41
4.2.1.Morfometrik Bulgular	41
4.2.2.Mikroskopik Bulgular	43
4.3.İmmunohistokimyasal Değerlendirme, VEGF ve VWF ekspresyonu	50
5.TARTIŞMA	58
6.SONUÇ	67
7.ÖZGEÇMİŞ	68
8.KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No
Şekil.1	Korneanın normal yapısı	5
Şekil.2	Deneyde kullanılan ilaçlar ve gümüş nitrat çubukları	31
Şekil.3	Alkali yanık modelinin oluşturulması	31
Şekil.4	Anjiyogenez inhibisyonunun hesaplanması	32
Şekil.5	Kontrol grubu, biyomikroskopik görüntüleme	37
Şekil.6	Kontrol grubu, biyomikroskopik görüntüleme	38
Şekil.7	Bevacizumab grubu, biyomikroskopik görüntüleme	38
Şekil.8	Bevacizumab grubu, biyomikroskopik görüntüleme	39
Şekil.9	Cetuximab grubu, biyomikroskopik görüntüleme	39
Şekil.10	Cetuximab grubu, biyomikroskopik görüntüleme	40
Şekil.11	Bevacizumab+Cetuximab grubu, biyomikroskopik görüntüleme	40
Şekil.12	Bevacizumab+Cetuximab grubu, biyomikroskopik görüntüleme	41
Şekil.13	Sham grubu,H-E	44
Şekil.14	Sham grubu,H-E	44
Şekil.15	Kontrol grubu,H-E	45
Şekil.16	Kontrol grubu,H-E	45
Şekil.17	Kontrol grubu,H-E	46
Şekil.18	Bevacizumab grubu,-H-E	47
Şekil.19	Bevacizumab grubu,-H-E	47
Şekil.20	Bevacizumab grubu,-H-E	48
Şekil.21	Cetuximab grubu,-H-E	48
Şekil.22	Cetuximab grubu,-H-E	49

Şekil.23	Bevacizumab+Cetuximab grubu,H-E	49
Şekil.24	Bevacizumab+Cetuximab grubu,H-E	50
Şekil.25	Kontrol grubu,VEGF,İmmunoperoksidaz,Negatif Kontrol	52
Şekil.26	Kontrol grubu,VEGF,İmmunoperoksidaz	52
Şekil.27	Kontrol grubu,VWF,İmmunoperoksidaz,Negatif Kontrol	53
Şekil.28	Bevacizumab grubu,VEGF,negatif kontrol,İmmunoperoksidaz	53
Şekil.29	Bevacizumab grubu,VEGF,İmmunoperoksidaz	54
Şekil.30	Bevacizumab grubu,VWF,İmmunoperoksidaz	54
Şekil.31	Cetuximab grubu,VEGF,negatif kontrol,İmmunoperoksidaz	55
Şekil.32	Cetuximab grubu,VEGF,İmmunoperoksidaz	55
Şekil.33	Cetuximab grubu,VWF,İmmunoperoksidaz	56
Şekil.34	Bevacizumab+Cetuximab grubu,VEGF,negatif kontrol,İmmunoperoksidaz	56
Şekil.35	Bevacizumab+Cetuximab grubu,VEGF,İmmunoperoksidaz	57
Şekil.36	Bevacizumab+Cetuximab grubu,VWF,İmmunoperoksidaz	57

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No:
Tablo.1	Anjiyojenik ve antianjiyojenik moleküller. 25
Tablo.2	Çalışmada yer alan deney hayvanlarının gruplandırılması, verilen ilaçların sıklığı ve dozu. 30
Tablo.3	Deneysel korneal anjiyogenez modeli oluşturulduktan sonra, anjiyogenez skorlanması. 32
Tablo.4	İnflamatuar hücre yoğunluğu ve fibroblast aktivitesinin skorlanması. 34
Tablo.5	VEGF ekspresyonunun skorlanması 35
Tablo.6	Gruplararası inflammatuar hücre infiltrasyon oranının karşılaştırılması. 42
Tablo.7	Gruplararası fibroblast aktivitesinin karşılaştırılması. 42
Tablo.8	Grupların kornea epitel kalınlıklarının ortalama değeri. 42
Tablo.9	Kornea epitel kalınlığı açısından gruplar arası karşılaştırılması ve p değerleri. 42
Tablo.10	Grupların total kornea kalınlık ortalama değerleri 43
Tablo.11	Korneanın total kalınlığı açısından gruplar arası karşılaştırma ve p değerleri. 43
Tablo.12	Korneal anjiyogenez yoğunluğunun gruplararası karşılaştırılması ve p değerleri. 50
Tablo.13	VEGF ekspresyonun düzeyi. 51

KISALTMALAR DİZİNİ

ABHS	:Antikor bağımlı hücre sitotoksitesi
Ang1	:Anjiyopietin-1
Ang2	:Anjiyopietin-2
Ang4	:Anjiyopietin-4
AP-1	:Aktivatör Protein-1
BBSHK	:Baş ve Boyun Skuamoz Hücre Karsinomu
bFGF	:bazik Fibroblast Growth Faktör
CAM	:Chorioallantoik Membran
CDK	:Cyclin Dependent Kinaz
ECM	:Ekstrasellüler Matriks
EGF	:Epidermal Growth Faktör
EGFR	:Epidermal Growth Faktör Reseptör
ErB1	:Eukaryotik ribozom biogenesis protein-1
ERK1	:Ekstrasellüler Regulated Kinaz-1
ERK2	:Ekstrasellüler Regulated Kinaz-2
Eph-B	:Ephrin-B
FGFR	:Fibroblast Growth Faktör Reseptör
HER2	:Human Epidermal Growth Faktör Reseptör-2
HGF	:Hepatosit Growth Faktör
HIF-1α	:Hipoksi Inducible Faktör-1 α
HUVEC	:Human Umblikal Ven Endotelyal Cell
ICAM	:Inter Celluler Adhezyon Molekül
IDY	:İntervasküler Doku Yapıları
IL-8	:İnterlökin-8
Jak/Stat	:Janus Kinaz/ Sinyal Transduser ve Transkripsiyon Aktivatör
Lig.	:Ligament
MAPK	:Mitojen Aktive Protein Kinaz
MMP	:Matriks Metalloproteinaz

MT-MMP	:Membran Tip- Matriks Metalloproteinaz
PDGF	:Platelet Derived Growth Faktör
PEDF	:Pigment epitelyum derived büyüme faktörü
PI3K	:Fosfatidilinozitol 3-kinaz
RECK	:Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
TGF-α	:Transforming Growth Faktör- α
Tie-1	:Tirozin kinaz immunoglobulin ve EGF benzeri kısım-1
Tie-2	:Tirozin kinaz immunoglobulin ve EGF benzeri kısım-2
TIMP	:Tissue İnhibitor Matriks Metalloproteinaz
TNF-α	:Tümör Necrosis Faktör- α
VCAM	:Vasküler Cell Adhezyon Molekül
VEGF	:Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VEGFR	:Vasküler Endotelyal Growth Faktör Reseptör
VPF	:Vasküler Permeability Faktör

ÖZET

Deneyisel Korneal Anjiyogenezde Cetuximab ve Bevacizumabın Rolü

Giriş ve Amaç: Anjiyogenez daha önce var olan bir damardan yeni damar oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Anjiyogenezin moleküler yapısını tam olarak ortaya koyabilme adına pek çok çalışma deneyisel anjiyogenez modelleri üzerinde yapılmaktadır. Biz de çalışmamızda rat korneal alkali yanık modelinde, anjiyogenezin inhibisyonunda anti-EGF bir ajan olan cetuximab ve anti-VEGF monoklonal bir antikor olan bevacizumabın rolünü araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada toplam 28 adet Spraque-Dawley erkek rat kullanıldı. Bütün ratların sağ gözleri gümüş nitrat çubukları ile 8 sn süre ile koterize edildi. Alkali yanık korneal anjiyogenez modeli oluşturulduktan sonra ratlar 4 eşit gruba ayrıldı. Bütün ratların sağ gözlerine 1, 4 ve 7.günler olmak üzere subkonjunktival yolla toplam 3 doz enjeksiyon yapıldı. Her dozda kontrol grubuna subkonjunktival olarak 0.15ml serum fizyolojik verilirken bevacizumab grubuna 0.1ml bevacizumab, cetuximab grubuna 0.05ml cetuximab ve son olarak bevacizumab+cetuximab grubunda yer alan ratlara ise 0.15ml (0.1ml bevacizumab +0.05ml cetuximab) verildi. Sekizinci günde, sakrifiye edilmeden hemen önce kornealar biomikroskopik olarak incelenip korneal anjiyogenez değerlendirildikten sonra, korneaların resimleri çekildi. Yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilen ratların enükleasyonu yapıldıktan sonra korneaları dissekte edilip rutin parafin doku takibi işlemine alındı. Bu işlemin ardından histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için kesitler alınıp hazırlandı. Elde edilen korneal kesitler histopatolojik açıdan değerlendirildikten sonra mikrografları çekildi.

Bulgular: Bu çalışmadan elde edilen biomikroskopik,histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre; hem bevacizumab hem de cetuximab grubunda anjiyogenez miktarının belirgin olarak düştüğü izlenmiştir. Bevacizumab ve cetuximab kombinasyonun verildiği grupta az düzeyde bir inhibisyon izlendi.

Sonuç: Sonuç olarak pek çok çalışma da etkinliği ortaya koyulmuş olan bevacizumabın çalışmamızda da anjiyogenezin inhibisyonunda etkin sonuçlar verdiğini, daha önce korneal anjiyogenezin inhibisyonunda kullanılmamış bir ajan olan cetuximabın, bevacizumab kadar etkin olduğu, her iki ilacın kombine olarak subkonjunktival yolla uygulanmasının anjiyogenezin inhibisyonunda etkin olmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Anjiyogenez, kornea, cetuximab, bevacizumab

ABSTRACT

The role of Cetuximab and Bevacizumab in Experimental Corneal Angiogenesis

Introduction and Aim: Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessel derived as extensions from existing vasculature. In order to accurately establish the molecular structure of angiogenesis, many studies are carried out on experimental angiogenesis models. In our study, we also investigated the role of cetuximab, which is an anti-EGF agent, and of bevacizumab, which is an anti-VEGF monoclonal antibody, on the inhibition of rat alkali burn model.

Mateials and Methods: In the study, a total of 28 Spraque-Dawley rats were used. Right eyes of all the rats cauterized by silver nitrate stick for 8 seconds. After the formation of alkali burn corneal angiogenesis model, the rats were divided into four equal groups: In right eyes af all the rats,three doses of injection were given subconjunctivally on days 1,4 and 7. At each dose, while 0.15ml saline was given subconjunctivally to the control group, 0.1ml bevacizumab was given to bevacizumab group, and lastly 0.15ml(0.1ml bevacizumab+0.05ml cetuximab) was administered to bevacizumab+cetuximab group. On day 8, before they were sacrificed, cornea were biomicroscopically examined, and corneal angiogenesis was assessed, and then the photographs of cornea were taken. Following enucleation of rats sacrificed with high dose of anaesthesia, the cornea were dissected and embedded in parafin as a routine follow-up procedure. Then, for histochemical and immunohistochemical analyses, the sections were taken and prepared. After the corneal sections obtained were assessed histopathologically, images were taken.

Results: According to the biomicroscopical, histopathological and immunohistochemical findings obtained from the present study, the amount of angiogenesis was determined to have decreased considerably in both bevacizumab and cetuximab groups. In group bevacizumab+cetuximab, relatively less inhibiton was observed.

Conclusion: As a result, we concluded, in our study, that bevacizumab, the efficiacy of which has been established in many earlier studies, produced effective results on the inhibition of angiogenesis. Cetuximab, which has not been previously used for the inhibition of corneal angiogenesis was also determined to be as effective as bevacizumab. However, we are of the opinion that the combined administration of both drugs subconjunctivally is not effective for the inhibition of angiogenesis.

Key words: Angiogenesis, cornea, cetuximab, bevacizumab

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Daha önce var olan bir damardan yeni bir damar oluşumu olarak tanımlanan anjiyogenez, normal doku gelişimi (fizyolojik anjiyogenez) için olduğu kadar, tümör büyümesi ve gelişimi (tümör anjiyogenezi, patolojik anjiyogenez) için de hayati öneme sahiptir. Anjiyogenez süreci, proliferasyon, migrasyon, yeni lümen oluşumu ve endotel hücrelerinin maturasyonu gibi aşamalardan oluşur(1). Bu aşamalar meydana gelirken pek çok molekül (faktör) görev almaktadır. Bu faktörlerden bazıları anjiyogenezi indüklerken (anjiyojenik faktör), diğer bir kısım ise anjiyogenezin oluşumunu baskılamaktadır (antianjiyojenik faktör). Anjiyogenezin meydana gelmesinde en temel etken, proanjiyojenik faktörlerin upregülasyonu, antianjiyojenik faktörlerin ise downregülasyonu olduğu söylenmektedir. Anjiyogenezin potansiyel biyolojik düzenleyicilerinin en başında Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF) gelmektedir(2).

VEGF, endotel hücreleri üzerinde yer alan kendisine ait reseptöre bağlandıktan sonra, bu hücrelerin proliferasyonuna, migrasyonuna ve yeni damarların filizlenmesine neden olur(2). Human Epidermal Growth Faktör Reseptör-2 (HER2)'nin ise hipoksik durumlarda, Hypoxia Inducible Faktor-1 α (HIF-1 α) aracılığıyla, VEGF'in upregülasyonuna karıştığı bildirilmekte, ancak son zamanlardaki çalışmalarda hipoksik koşul olmadan da bu işlevin gerçekleştiği öne sürülmektedir(3).

Anjiyogenez ile ilgili yapılan çoğu çalışma, anjiyogenez modelleri üzerinde yapılmaktadır. Deneysel anjiyogenez modelleri içerisinde ise in vivo olarak en iyi monitorize edilebilen ve bu sayede en sık kullanılan korneal anjiyogenez hayvan modelleri olarak tavşan, fare ve rat deneysel modelleri karşımıza çıkmaktadır(4).

Korneal anjiyogenez, korneal enfeksiyonlar, hatalı kontakt lens kullanımı, kimyasal yanıklar ve inflamasyon gibi pek çok nedenden dolayı meydana gelebilmekte ve görmeyi olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bununla birlikte, korneal anjiyogenez meydana gelmiş gözlerdeki korneal transplantasyonlar da, korneal greftlerin sağ kalımının belirgin bir şekilde azaldığı bildirilmektedir(5). Şimdiye kadar korneal anjiyogenez için spesifik ve etkin bir tedavi yöntemi henüz bulunamamıştır(6). Korneal anjiyogenezin önlenmesinde ve baskılanmasında anjiyostatik steroidler ile kombine heparin, sülfatlı polisakkaritler, plazminojen fragmanları(7), fumagilin analogları, talidomid, ve siklosporin A(8) kullanılmaktadır. Steroidlerin kullanımı her zaman için etkili olmayıp, uzun süreli kullanımlarda glokomlara neden olduğu kadar, enfeksiyon presipitasyonu ve katarakta da neden olabilmektedir(9). Son yıllarda anjiyogenez konusunda yapılan moleküler düzeydeki

alışmalar neticesinde, bir takım spesifik antianjiyojenik ilaçların onkolojide, retina ve koroidin neovasküler hastalıklarına karşı kullanıldığı rapor edilmiştir(10).

VEGF inhibisyonu ile korneal anjiyogenezin azaldığını gösteren pek çok çalışma vardır(9). Bevacizumab, VEGF'e karşı üretilmiş, humanize monoklonal IgG1 tipte bir antikordur. Spesifik olarak, insan VEGF-A'nın bütün izoformlarını tanıır ve inhibe eder. Metastazik kolorektal kanserde, diyabetik retinopatide, patolojik miyopide oluşan koroidal anjiyogeneizde,eksudatif yaşa bağlı makular dejenerasyonun tedavisinde önerilmektedir(12).

Cetuximab (IMC-C225, Erbitux ImClone Systems Inc, New York) kimerik EGFR'nin ekstrasellüler kısmına bağlanan IgG1 monoklonal bir antikordur(13).

Anjiyojenik büyüme faktörlerindeki azalma, insan tümör ksenograftlarındaki mikrodamar yoğunluğundaki belirgin düşüş ile birlikte apoptotik endotel hücrelerindeki artışı içeren bütün bu bulgular cetuximabın antianjiyojenik etkisini ilk olarak tanımlamaktadır(14).

Bu çalışmanın amacı; bevacizumab ve cetuximabın rat deneysel korneal anjiyogenez modelinde, subkonjunktival olarak, ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının anjiyogenezin önlenmesindeki rolünü karşılaştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kornea Histolojisi

Göz küresi histolojik olarak üç tabakada incelenir. En içte tunika nervosa tabakası olarak adlandırılan retina, ortada koroid, iris ve korpus siliyareyi içeren tunika vaskuloza tabakası, en dışta ise gözün beyaz kısmı olan sklera ve saydam görünümdeki korneanın birlikteliği, tunika fibroza, yer alır. Gözün en dış tabakası olan tunika fibroza iki kısımda incelenir. 5/6'lık kısım sklerayı, konveks dışa doğru bombeleşmiş olan 1/6'lık kısım ise korneayı meydana getirir. Kornea, yaklaşık olarak merkezde 0,5mm periferde ise 1mm kalınlığında olabilmektedir. Hem orijin hem de görünüm açısından farklı olan üç hücresel tabaka içermektedir. Bu hücresel tabakalar iki membranöz tabaka tarafından birbirinden ayrılmaktadır. Bu nedenle, histolojik enine bir kesitte 5 ayrı tabaka izlenir (Şekil.1). Bunlar; dıştan içe doğru kornea epiteli, Bowman membranı, korneal stroma, Descemet membranı ve kornea endoteli olarak sıralanır(15).

2.1.1.Kornea Epiteli

Kornea epiteli 5-6 sıralı çok katlı nonkeratinize yassı epitelden meydana gelmiştir. Ortalama olarak 50µm kalınlığındadır. Komşu sklerayı örten konjunktival epitel ile devam eder(15,16). Organizmanın herhangi bir yerinde yer alan çok katlı epitelde olduğu gibi, en altta kalan bazal hücrelerin mitotik aktiviteleri ile sürekli olarak yüzeydeki hücrelerin yenilenmesi sağlanır(17). Bağlantı komplekslerinden desmozomlar oldukça iyi gelişmiş olup(15), yüzeydeki hücrelerin apikallerinde mikrovilluslara ve zonula okludens tipinde sıkı bağlantılara rastlanır(16). Epitelin yenilenmesi ortalama 7 günde tamamlanır. Kornea ile sklera arasındaki limbus içerisinde yer alan kök hücreler epitel için rezervuar görev alırlar. Korneada meydana gelen minimal düzeydeki korneal hasarlar migrasyonla alttaki hücreler tarafından orta şiddetteki hasarlar ise bu bölgedeki(limbus) kök hücrelerin proliferasyonu ile kapatılır. Kornea epiteli içerisinde çok sayıda serbest sinir sonlanması yer alır(15,16).

2.1.2.Bowman membranı

Bowman membranı, kornea epitelinin hemen altında yer alan homojen görünümdeki yapı olup, yaklaşık olarak 8-10µm kalınlığındadır(15,16). Mukopolisakkarit matriks içerisinde yer alan düzgün sıralanmış 18nm çapında kollajen liflerden meydana gelir(15,17). Tip-I kollajen liflerden meydana gelmiş olan Bowman membranı aslında hem üstündeki epitel hem de altındaki stromadan sentezlendiğine inanılmaktadır. Sensorik sinir lifleri bu tabakayı

delip geçerek epitel içerisinde sonlanır(16). Bu membran sayesinde enfeksiyonun yayılımı gecikir, rejenerasyon yeteneği bulunmayan Bowman membranı, korneoskleral limbus bölgesinde kesintiye uğrar(15).

2.1.3.Kornea Stroması

Substansiya propria olarak da adlandırılır. Kornea stroması, korneanın en kalın tabakası olup, yaklaşık olarak total kornea kalınlığının %90'ına karşılık gelir. Kollajenöz bağ doku yapısında olan stroma, yaklaşık olarak 60 adet ince lamelden meydana gelmiştir. Bu lameller birbirine paralel olarak dizilmiş kollajen liflerden oluşur. Lamellar yapı sistemi içerisinde yer yer fibroblast hücrelerine rastlanmaktadır. Kollajen liflerin ve lamellerin bu şekildeki diziliminin yanı sıra lamellerin ortogonal dizilimi kornea saydamlığının fizyolojik temelini oluşturur. Stromanın ana bileşeni olan Tip-I ve Tip-V kollajen liflerinin kalınlığı 23nm civarında iken uzunluk 1cm dolaylarında olabilmektedir. Korneal proteoglikanlardan keratan sülfat (lumikan) ve kondroitin sülfat proteinine kovalent şekilde bağlanarak, ekstrasellüler matriksin temelini oluşturur(16).

2.1.4.Descemet membranı

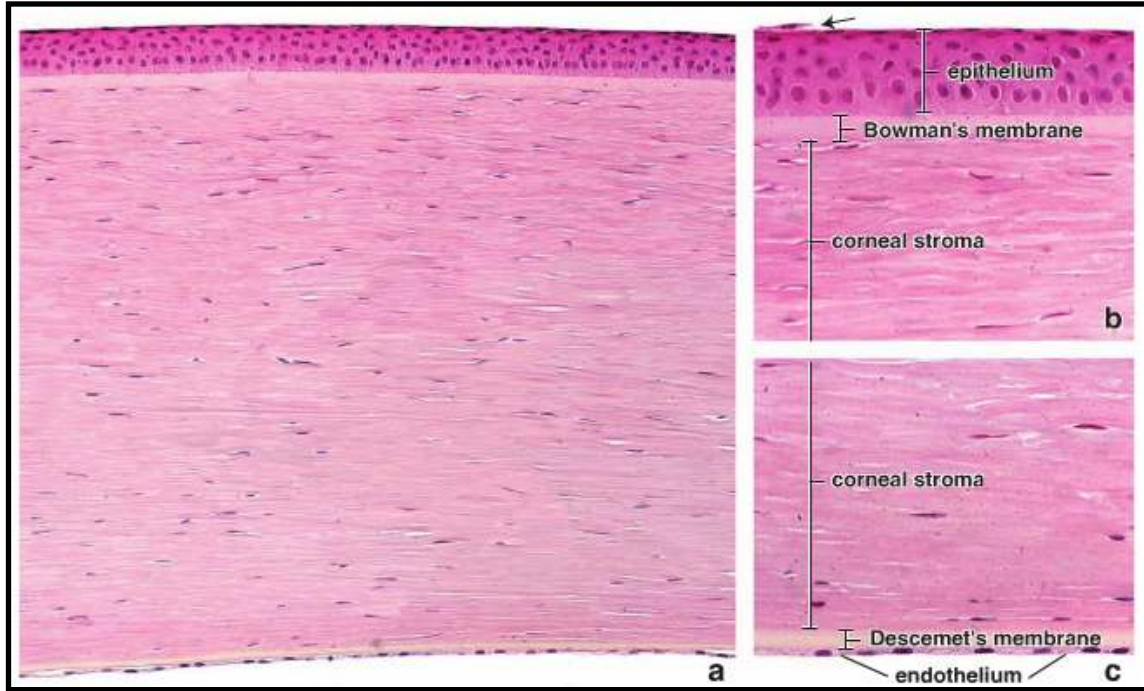
İlk olarak Fransız bilim adamı Jean Descemet tarafından (1732-1810) ortaya konulmuştur(18). Doğumda 5µm(16) olan bu yapı erişkinde 10µm kalınlığında olabilmektedir(15). Bowman membranının aksine rejenerasyon yeteneği bulunmakta ve limbusta kesintiye uğramamaktadır. Sürekli olarak sentezlenir. Korneal endoteli stromadan ayıran bu membran PAS (+) olarak boyanır(15).

2.1.5.Kornea Endoteli:

Tek sıralı yassı epitel hücrelerinden meydana gelmiştir. Endotel, kornea ile humor aquoz arasında metabolik değişimi sağlar. Zonula adherens tipi bağlantılar iyi gelişmiş iken az gelişmiş zonula okludens ve desmozomlara sahiptirler. Buradaki endotel hücreleri mitokondri ve veziküller yönünden oldukça zengindir. Granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi aparatından zengin olması yoğun pinositotik aktivitenin varlığına işaret etmektedir. Bu hücrelerin lateral plazma membranlarının üzerinde Na^+/K^+ aktive ATPaz yer alması aktif taşınımın bu bölgelerden yapıldığını göstermektedir(15).

2.1.6.Limbus

Kornea ile sklera arasında kalan geçiş bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Bu geçiş bölgesinde Bowman membranı kesintiye uğrar. Epitel 5-6 sıradan 10-12 sıraya doğru yükselirken, biri korneal epitelyum hücresi, diğeri konjunktival hücreler olmak üzere iki tip hücre dikkatleri çekmektedir. Diğertaraftan stromada yer alan lameller daha az düzenlidirler ve avasküler yapı, yerini vasküler skleral yapıyla yer değıştirir. Limbusta özellikle de iridokorneal bileşkede aquoz humorun dışa akımını sağlayan aparat yer almaktadır. Stromal tabakada ise endotel ile dşeli olan trabeküler ağ(Fontana aralıkları) yer alır. Trabeküler ağ birleşerek Schlemm kanalını oluşturur. Schlemm kanalı sklerada aquöz venlere açılıp, humör aquözü taşır (15). Kornea epiteli için rezervuar görevi üstlenen kök hücrelerin, bu bölgede yer aldığı bilinmektedir. Büyük çekirdeklere, çok sayıda desmozom ve hemidesmozomal yapılarla sahiptirler. Öte yandan konjunktivanın aksine goblet hücresine rastlanmaz(19).



şekil.1: Normal korneal yapının bütün tabakalarının izlendiği total görünüm(a), kornea epiteli, Bowman membranı, korneal stroma, Descemet membranı ve kornea endotelinin daha büyük büyütmedeki histolojik(b,c) yapısının görünümü(15).

2.2.Korneanın Embriyolojik Gelişimi:

Gelişimin 4.haftasında, gastrulasyondan hemen sonra, nöral plağın öne doğru olan kıvrılması sonucu, nöroepitel içerisinde orta çizginin her iki yanında birer optik çukurcuk belirir. Optik çukurcuklar, zamanla kraniyal nöral tüp kapandıkça, genişleyerek prosensefalon üzerinde optik vezikül halini alırlar. Bu veziküller, laterale, üzerinde yer alan yüzey ektodermine doğru genişler. Optik vezikülün, yüzey ektodermiyle temas kurmasının hemen ardından, nöroepitel invagine olarak iki laminalı optik kesenin oluşumuna yol açar. Optik vezikülün proksimal nöroepitelinden optik keseyi diensefalona bağlayan optik sap gelişir. Optik kesede meydana gelen bu değişikliklerle birlikte, yüzey ektodermi de kalınlaşarak lens plağını yapar. Ardından lens plağı yüzey ektoderminden ayrılarak invagine olur ve primitif lens vezikülünü oluşturur(20,21). Bütün bu olaylar meydana gelirken kornea ve irisin oluşması, nöral krista/mezenşim hücreleri ile optik kese nöroepiteli ile yüzey ektoderm hücreleri arasındaki etkileşimden sonra meydana gelmektedir. Lens vezikülünü örten yüzey ektoderminden kornea epitel tabakası oluşur. Yüzey ektoderminden sentezlenen ekstrasellüler matriks nöral krista/mezenşim hücrelerinin migrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Nöral krista/mezenşim hücreleri kornea endotel hücrelerini ve stromal hücreler olan keratositleri oluşturur. Yedinci haftada gelişen korneanın lensten ayrılmasıyla içi sıvı ile dolu olan ön kamarada oluşmuş olur(21).

2.3.Anjiyogenez

2.3.1.Tarihçe ve Tanım

Anjiyogenez terimi ilk olarak 1787 yılında İngiliz cerrah John Hunter tarafından kullanılmış olsa da, 1935 yılında Hertig tarafından plasentadaki kan damarlarının gelişimini tanımlamak için öne sürülmüştür(22). Kan damarları, vaskulogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki farklı mekanizma aracılığıyla oluşmaktadır. İlk mekanizma (vaskulogenez), immatür mezenşimal hücrelerden kan damarlarının gelişmesine bağlıdır ve embriyonun erken dönemleriyle sınırlı olduğu bilinmektedir. Anjiyogenez ise, daha önce var olan kan damarlarından yeni damarların filizlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu olay kadın üreme siklusu esnasında fizyolojik olarak meydana gelebilirken, tümör gelişimi, diyabetik retinopati ve kronik inflamasyonda patolojik olarak meydana gelmektedir. Anjiyogenez bazen olumlu bazen de olumsuz bir olay olabilmektedir, örneğin yara iyileşmesi esnasında yararlı olabilirken, tümör gelişimi esnasında ise olumsuz etkiye sahiptir(23).

2.3.2.Anjiyogenez Mekanizmaları

Daha önce var olan bir damardan yeni damar oluşumu olarak adlandırılan anjiyogenez, endotel hücrelerinin filizlenmesi ve kapiller damarların içe geçmesi olmak üzere iki ayrı süreçte gerçekleşmektedir. Ektoderm-mezodermden köken alan beyin gibi organların damarsal yapısının oluşumu anjiyogenez aracılığıyla olmaktadır. Anjiyogenez meydana gelirken bir takım hücresel olaylar ile birlikte moleküler organizasyon paralel seyretmektedir(24).

2.3.2.1.Anjiyogenezin Hücresel Organizasyonu

Daha önce var olan vasküler ağdan, anjiyojenik kaskadın başlaması için, farklılaşan kapillerlerden köken alıp, özel yapıya sahip olan endotel hücrelerine gereksinim duyulur. Elbette ki bu sürecin işleyebilmesi, endotel hücresinin yer aldığı damardan ayrılıp kurtulabilmesi, yeni bir damara öncülük edebilmesi ve etrafında yer alan stroma içinde hareket edebilmesi gerekmektedir. Bunun için uygun sinyallere ihtiyaç vardır. İki büyük sinyal yolağı bu aşamada devreye girmektedir. Bunlar, endotel hücrelerinin hangisinin liderlik örneği göstereceğini, yani uç hücre(öncü hücre), hangisinin takipçi (izleyen) hücre olacağını belirleyen, VEGF ve Notch sinyal yolaklarıdır(26,27). Uç hücreleri uzun filopodlara sahiptirler ve kendilerini izleyen hücrelerle (takipçi hücreler) ile bağlantı halindedirler(24).

Endotel hücreleri vasküler sistemin en basit ve daimi bileşenidir. Anjiyojenik yanıtı başlatması ve gelecekte vasküler kapiller pleksusu tesis edecek olması önemli bir diğer özelliğidir. Vasküler sistem, embriyoda oluşan ilk sistemlerden biridir ve sağkalımın devamı için hayati öneme sahiptir. Mezenşimal hücrelerin doğrudan endotel hücrelerine farklılaşmasıyla oluşan primer vasküler pleksus oluşur. Bu pleksusun genişlemesi ve takip eden olaylar anjiyogenez yoluyla olmaktadır. Yani endotel hücreleri bulundukları vasküler yataktan ayrılıp, bundan sonra avasküler stroma içinde ilerlerler(25).

Anjiyogenez temelde iki farklı şekilde meydana gelmektedir. Ya damar endotelinden tomurcuklanma ile ya da içe geçme mekanizması ile yeni damar gelişimi şekillenmektedir.

2.3.2.1.1.Tomurcuklanma Mekanizması

Tomurcuklanma anjiyogenezi, Ausprunk ve Folkman'ın(28) yanı sıra diğer araştırmacılar tarafından tanımlanmış(29), birbirini takip eden birkaç basamaktan oluşmaktadır. Vasküler tomurcuklanmayı başlatan temel etken Vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) ve vasküler endotelyal growth faktör reseptörleri-1 (VEGFR1) olarak özetlenebilir. Bu basamaklar sırasıyla;

- 1.Oluşacak olan yeni kapillerler küçük venüllerden ya da diğer kapillerlerden meydana gelirler. Anjiyojenik kaskadın devamını sağlayan endotel hücresi adı geçen damarlardan ayrılarak şekillenir.
- 2.Anjiyojenik uyarana en yakın olan venül bazal membran bölgesinde yıkımlanma şekillenir. Bu yıkımlanmada kollajenaz, plazminojen aktivatörleri görev alır.
- 3.Anjiyojenik uyarana doğru endotel hücrelerinin göçü başlar. Bu göç esnasında uç hücreleri migrasyonla ilerlerken, takipçi hücreler ise proliferer olurlar(30).
- 4.Prolifere olan endotel hücreleri iki sıra halinde dizilim gösterirler.
- 5.Lümen oluşumu şekillenir(ya hücre içi vakuollerin birleşmesiyle ya da intersellüler olarak. Endotel hücrelerinde mitoz tomurcuklanmanın en uç kısmından devam eder.
- 6.Her bir tomurcuklanma birbirleriyle birleşerek bir ağ yapısı oluşturur.
(Bu tomurcuklanmaların birbirlerini nasıl buldukları henüz aydınlatılamamıştır.)
7. Söz konusu bu ağ yapısı şekillendikten sonra kan akımı başlar.
8. Perisit hücreleri ya da düz kas hücreleri kapiller endotelinin dışında dizilirler(damar duvarı olgunlaşması)
9. Son olarak yeni bazal membran oluşur ve damar oluşumu şekillenmiş olur.

2.3.2.1.2.İçe Geçme Mekanizması

Short ve arkadaşları(31) akciğerlerdeki kapillerlerin, damar lümenini bölen, doku manşetleri olarak tanımladıkları, intersisyal doku sütunlarından meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir. Bu hipotez, Caduff ve arkadaşları (32) tarafından da gelişen rat akciğerinde gösterilmiş ve invaginasyonla gelişen mikrovasküler yapı olarak içe geçme mikrovasküler büyüme olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmaların ışığında pek çok organ ve dokuda bu şekilde gerçekleşen anjiyogenez varlığı gösterilmiştir(33).

Buna ilave olarak, tavuk embriyo koriyoallantoik membran anjiyogenez modelinde yapılan in vivo videomikroskopik incelemelerde bu tip anjiyogeneze katılan bir takım hücresel mekanizmaların varlığı ortaya çıkarılmıştır. Bütün bu mekanizmalar ışık ve elektron mikroskopik(34) incelemelerde seri kesitler alınarak belirlenmiştir. Bu alanda yapılmış şu ana kadar ki bütün çalışmalar, aşağıdaki sırayla izlenen adımları içeren veriler üzerinde hemfikir olmuşlardır (33,34). Bu adımlar;

- 1.Gelişme, çoğunlukla, herhangi bir venöz damardan ve kapiller sirkulasyondan meydana gelir.

2.Endotelyal doku, damar duvarında bulunan intersisyal doku manşeti organize bir birimi civarında arka arkaya(sırasıyla) geri çekilir. Bu da, bu birimin etrafındaki damar lümeninin evaginasyonuna neden olur. En küçük intersisyal doku manşeti, bir demet fibrili örten endotelyal uzantılarla oluşur. Sıklıkla, peri-endotelyal hücrelerin ekstensiyonları, bu endotelyal uzantılarla kollajen fibriller arasında, bulunur. Bu işleme bağlı olarak, damar lümeniyle birlikte intersisyal ya da intervasküler doku yapılarının(IDY) ve doku manşetlerinin içine doğru çıkıntı oluşturan doku katmanları oluşur. Katlanma aynı zamanda damar lümenine doğru da yönelebilir. Her iki şekilde de intra-luminal katmanlar oluşur. Bu işlem, endotelyal tabakanın organize hareketine imkan sağlayacak olan bazal membran veya matriksinin bozulmasına işaret eder.

3.Doku katmanından manşetin ayrılması, bir IDY'nin bölünmesi ya da lateral damar duvarından doğrudan ayrılması, birbirine karşı her iki hücre membranının kaynaşmaya kadar endotel hücrelerinin incilmesi gibi kritik bir adıma bağlıdır. Bu olay hücreler arası bir deliğin oluşmasına neden olur. Endotel hücresinin halka gibi bir yapıya dönüşmesini ve damar lümeninin bu delik arasından yayılmasını sağlar. Bu işlem damar spirallerinin in situ oluşumuyla beraber, serbest intraluminal IDY'lerin ya da doku manşetlerinin oluşumuna yol açar. Hem üstte hem de altta, IDY ya da manşet, damar duvarına bağlı kalır. IDY'ler ve doku manşetleri daha sonra, daha küçük yapılara dönüşmek suretiyle bölünebilirler. Ayrıca doku katmanlarının karşıdaki damar duvarına uzamasıyla damar bölünmesi meydana gelebilir. Bu durumda her iki karşıt endotel hücresindeki hücre membran füzyonu iki hücreler arası delik oluşturur. Bu delikler katman ile karşı damar duvarı arasında sıkı bir bağlantı oluşturmak üzere ekstrasellüler matriks elementleri ile doldurulacaklardır(34).

4. Kollajen liflerin sentezi IDY veya manşeti özünü oluşturmak için ve onu stabilize kılmak için mecburi bir adımdır (33-34). Hangi tip kollajenlerin varlığı henüz bilinmemektedir. Tümörlerde pek çok anjiyojenik damarların etrafında Tip-1 kollajen belirlenmiştir. Ayrıca kollajen oluşumundan hangi hücre tipinin sorumlu olduğunun belirlenmesi gerekir. Koriyoallantoik membranda (CAM) daki endotel benzeri hücreler olarak peri-endotelyal hücreler muhtemel adaylardır.

5.Endotel hücrelerin profilere olması gerekmektedir.

6.Bütün bu olaylar meydana gelirken kan akımının devamı söz konusudur.

7.Genellikle endotel hücrelerle pek çok benzerlik taşıyan peri-endotelyal hücreler embriyoda gelişen damarlar barındırmaktadır. Bunlar IDY ve manşet özlerinin oluşumunda mevcuttur(33).

8.En sonunda, bazal membran oluşur.

İçe geçme ve tomurcuklanma mekanizmalarının arasındaki en önemli fark, lümen genişlemesinden sonra ekstrasellüler matriksin oluşumuna doğru lümen genişlemesini vurgulayan bakış açısıdır. Filizlenme anjiyogenezi esnasında damar lümeninin genişlemesi yeni bir tüp oluşumuna yol açar. Buna karşın içe geçme anjiyogenezi esnasında organize, ekstra sellüler birimler bunları çevreleyen lümenin genişlemesini belirler(35).

2.3.3.2. Anjiyogenezin Moleküler Mekanizması

Genel anlamda, anjiyogenezin moleküler düzenlenimi söz konusu olduğunda, esasında tanımlanmak istenen anjiyogenezin farklı basamaklarının değişik moleküler ajanlar tarafından düzenlenmesi anlaşılmalıdır. Bu nedenle anjiyojenik bir molekül endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşumunu uyarırken, inhibisyona neden olan bir molekül ise bunların ya tam tersini yapar ya da bu olayların meydana gelmesini engeller. Bugüne kadar çok sayıda anjiyojenik büyüme faktörünün etkisi tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri, VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C) ,Fibroblast Growth Faktör-1 (FGF-1), FGF-2, Platelet Derived Growth Faktör (PDGF), Hepatosit Growth Faktör (HGF) Transforming Growth Faktör- α (TGF- α), Epidermal Growth Faktör (EGF), İntegrinler ve İnterlökin-8 (IL-8) olarak sıralanabilir. Ayrıca anjiyogenezin moleküler organizasyonunda Tie/Anjiopietin ve Eph-B/Ephrin-B tirozin kinaz reseptörlerinin ve ligandlarının önemli rollerinin olduğu da bilinmektedir (36).

2.3.3.2.1. Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)

Senger ve arkadaşları 1983 yılında, damar geçirgenlik aktivitesi oldukça yüksek olan bir protein izole edip, bu proteini Vasküler Permeability Faktör (VPF) olarak tanımlamışlardır(37). Bundan birkaç yıl sonra, Ferrara ve Henzel damar endotel hücreleri üzerinde büyüme sağlayıcı aktivitesi olan bir proteini elde edip, bu proteini Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) olarak adlandırmışlardır. Sürpriz bir şekilde her iki proteinin moleküler klonlama yöntemleri sonucu aynı yapıda olduğu ve tek bir gen tarafından tanımlandığı ortaya çıkarılmış, VEGF(veya VEGF-A) olarak adlandırılmıştır(38).

VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF ve svVEGFs. olmak üzere toplam yedi üyesi bulunmaktadır. Bunlardan VEGF-E ve svVEGF dışında kalanlar memeli genomu tarafından kodlanıp, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezde rol almaktadır.

VEGF ailesi üzerinde yapılan daha ileri çalışmalarda, moleküllerin embriyolojik dönemde progenitör hücrelerden kan damarlarının oluşumu olarak bilinen vaskulogenez ve

aynı zamanda anjiyogenezin meydana gelmesinde çok önemli görevler üstlendiği ortaya konulmuştur(2). Ayrıca VEGF-A'nın tümör anjiyogenezinde anahtar role sahip olabileceği bildirilmiş ve anti-human VEGF-A nötralize edici antikoru, kemoterapötikler ile kombinasyonun kolorektal ve non-skvamöz akciğer kanserinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır.

VEGF-B sadece Plakental growth faktör (PlGF) gibi, Vasküler Endotelial Growth Faktör Reseptör-1'e (VEGFR1) bağlanır ve bu reseptörü aktive eder. Pek çok dokuda eksprese olan VEGF-B özellikle kalp ve iskelet kaslarındaki ekspresyonları belirgindir. VEGF-B nakavt farelerin embriyonal dönemlerinde hiçbir anormallite gözlenmediği ancak, doğumdan sonraki dönemde küçük bir kalp yapısına sahip oldukları izlenmiştir(39).

PlGF, VEGF ailesi üyesi olup, plasentada aşırı bir şekilde eksprese olan, sadece VEGFR1'e bağlanarak etkinliğini göstermektedir. VEGFR1'in düşük derecedeki tirozin kinaz aktivitesinden dolayı, PlGF'nin anjiyogenez esnasında endotel hücrelerindeki proliferasyon dışında herhangi bir etkisi bulunmamaktadır(40).

VEGF-C çoğunlukla VEGFR3'e bağlanmakta ve bu sistem ilk olarak lenfanjiyogenezin düzenlenmesinde dikkatleri çekmiştir(41). VEGF-C/ VEGFR3'ün güçlü bir şekilde baskılanmasının ardından, lipid emiliminin zayıf kalması ve lenfödeme neden olan lenfatik sistemin disfonksiyonu ve kaybı şekillenmektedir(2). VEGF-C ya da VEGF-D eksprese eden tümör hücreleri, çoğunlukla lenf nodlarına metastaz yapma potansiyelinde olurlar ve bu mekanizma kanser hastalarında, lenf nodu metastazının önlenmesi açısından araştırmacılar için temel bir hedef haline gelmiştir(41,43).

VEGF ve reseptörleri vertebralılarda, anjiyogenez/lenfanjiyogenez'in temel düzenleyicileri olmalarının yanı sıra aynı zamanda vasküler permeabilite ile yakın ilişkilidirler. Bu biyolojik aktivitelerinden dolayı virüsleri de içeren çeşitli organizmalarda VEGF ile ilişkili gelişen moleküller tespit edilmiş ve bunların çeşitli amaçlarla pratik kullanımı sağlanmıştır. VEGF-E ailesi Orf viral genomu tarafından kodlanmakta(44) ve yapısal olarak VEGF-A'ya benzemektedir. Ancak, VEGF-E sadece VEGFR2'yi aktive etmekte ve virüs ile enfekte deri dokusunda anjiyogenez etkili bir şekilde uyarmaktadır(45). Son 20 yıl boyunca, VEGF, FGF, Anjiyopoietin, HGF (hepatosit growth faktör) ve EGF gibi pek çok anjiyogenik faktör tanımlanmıştır(46). Organizmada oluşan yeni kan damarlarının moleküler temelini anlayabilmek için, özellikle yukarıda saydığımız, moleküllerin tek başına ve anjiyogenezde anahtar bir role sahip olan VEGF molekülü ile ayrı ayrı ilişkisini ortaya koymak oldukça önemlidir.

VEGF-A, embriyonal dönemin erken dönemlerinde endotel prekürsör hücrelerinin farklanması ve damar endotel hücrelerinin büyümesi, yaşamı, tüp oluşumu ve migrasyonu için uyarıcı ve teşvik edici etkilere sahiptir(2). VEGF-A, yüksek spesifik aktiviteyle, güçlü damar geçirgenlik faktörüdür. Endotel hücrelerinden, bu hücreleri kuşatan düz kas veya hepatosit gibi hücrelere doğru olacak şekilde, büyüme faktörlerinin sentezinden de sorumlu tutulmaktadır. Bazı çalışmalarda VEGFR2'nin lenfatik endotel hücrelerinde eksprese olması, VEGF-A'nın lenfanjiyogenezde de rol alabileceğini göstermektedir (41,47).

VEGF-A, özellikle embriyogenez esnasında oluşan yeni kan damarları için hayati öneme sahip olan endotele özgü-teşvik edici bir büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır. İki ayrı araştırma grubu, heterozigotik VEGF-A nakavt farelerde bile, embriyonal ölümlerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan bu farelerdeki anjiyogenezin çok sayıda defekt ile seyrettiğini, aorta-kalp bütünlüğünde ayrılmalar ve zayıf bir dorsal aorta yapısının egemen olduğu da izlenmiştir. Bu bulgular VEGF'in, doku düzeyindeki miktarının normal gelişim için, embriyoda ise vasküler yapıların gelişimi için elzem olduğunu normalin yarısı düzeyinde VEGF-A'nın yetersiz, tamamlanmamış vasküler yapıların meydana gelmesine neden olduğunu göstermektedir. İnsan VEGF-A geni 121'den 206'ya kadar değişen sayıda 9 farklı izoformun kodlanmasından sorumludur. Bu izoformlar içerisinde üç tane majör, izoform 121, 165 ve 189 en iyi şekilde tanımlanmıştır. Bunlar içerisinde en fazla bulunan 165 aminoasit sahip olan formdur ve pek çok vücut dokusunda eksprese olduğu ortaya konulmuştur (48).

VEGF ailesinin, yüksek derecede affinite duyduğu, tirozin kinaz ailesine mensup VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (insanda; KDR ve farede, Flk-1), ve VEGFR3 (Flt-4) olmak üzere 3 tane reseptör bulunmaktadır. Bu reseptörler aynı zamanda Platelet Derived Growth Faktör Reseptörlerine benzer yapıdadırlar. Bu yüzden her ikisi reseptör ailesi aynı reseptör süper ailesi altında yer alırlar(49).

Anjiyogenezde anahtar bir rol üstlenen VEGF-A, hem VEGFR1'e hem de VEGFR2'ye bağlanarak etkinliğini gösterir. VEGFR1'e bağlanma afinitesi VEGFR2'ye bağlanma afinitesinden 10 kat daha fazladır. Embriyonal dönemde, kan damarlarının oluşması için VEGFR1'in kodlanması gerekmekte, özellikle bu gen tarafından mutasyona uğramış farelerde, kan damarlarında organizasyon bozukluğu ve aşırı büyüme sonucu ölümlerin olduğu dikkatlerden kaçmamıştır. VEGFR1 yetişkinlerde sadece endotel hücrelerinden eksprese olmaz, aynı zamanda kanser, romatoid artrit ve aterosklerozis gibi hastalıklarda önemli roller üstlenen monosit-makrofaj seri hücrelerinde de eksprese olur. Diğer taraftan VEGFR1'in suda eriyen formunun aşırı ekspresyonu normal korneada izlenmiş, aniridik

hastaların korneal epitel hücrelerindeki miktarının azalmış olduğu ve korneal avaskularitenin sürdürülmesinin VEGFR1 tarafından olduğu öne sürülmüştür(50).

VEGFR2'nin küçük mutasyonlarında bile vaskulogenezin oluşmaması sonucu embriyonal dönem ölümleri meydana gelmektedir. Bu bulgu ışığında, VEGF-A/VEGFR2'nin hemanjiyoblastlardan, endotel hücrelerinin oluşmasının yanında endotel hücrelerinin proliferasyonunda hayati öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır. VEGFR2, aynı zamanda pek çok patolojik anjiyogenez mekanizmasında görev almakta, bu yüzden kanser tedavisi üzerine yapılan farmakolojik çalışmalarda anti-VEGF-A ajanların yanında, anti-VEGFR2 ajanların da denendiği, özellikle renal karsinomlarında kullanılan bir anti-VEGFR2 inhibitörünün FDA tarafından onaylandığı rapor edilmiştir(51).

Yukarıda da belirtildiği üzere, VEGFR3/VEGFC-VEGF-D sisteminin temelde lenfanjiyogenezde rol aldığı bildirilmektedir(41). Bu sistemde meydana gelen yetersizlik, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezin şekillenmesinde ciddi problemlere ve gebeliğin ortalarında embriyo ölümlerine neden olmaktadır. Öte yandan, fizyolojik erişkin lenfanjiyogenezinde anjiyopoietin-Tie2 sistemiyle koordineli olarak çalışır(52).

Ko-reseptörler olarak tanımlanan Neuropilin-1 ve 2, hem vasküler hem de lenfatik endotel hücreleri tarafından eksprese edilen membran proteinleridir. VEGF ailesi için ko-reseptör olarak görev yaparlar. Özellikle de VEGF-A₁₆₅ neuropilin-1'e bağlanarak VEGF-A'nın VEGFR2'ye bağlanma affinitesini belirgin şekilde artırıp anjiyogenez uyardığı bildirilmektedir. VEGF-A₁₆₅'in NRP-1 ile olan etkileşimi, VEGF-A₁₆₅'in tek başına yokluğu ya da NRP-1'in yokluğunda embriyonal dönem ölümlerinin meydana geldiği, dorsal aortanın zayıf bir şekilde oluştuğunu, aortikopulmoner traktusun yetersiz olduğunu ve vitellus kesesi anjiyogenezin remodellinginin olmaması gibi durumlardan dolayı hayati öneme sahiptir. NRP-2 de VEGF-C/D ile ilişkide olup lenfanjiyogenezin sinyalizasyonun sağlanmasında görev aldığı öne sürülmüştür(53).

2.3.3.2.2.Angiopoietinler ve Tie Reseptörleri

Angiopoietin-1, 2 ve 4, Tie-2 reseptörüne bağlanan, hem Tie-1 hemde Tie-2 aktivasyonuna katılan, angiopoietin büyüme faktörü ailesinin üyeleridirler(54). Bütün angiopoietinlerin; bir terminal N ucu, kıvrılmış bir parçası, bağlayıcı bölgesi ve karboksil ucu bulunmaktadır. Ang1 kıvrılan kısmı sayesinde dimer, trimer ve tetramer bir yapı oluşturur. Daha ileri multimer yapısı için N terminal uçlarını kullanırlar(55). Angiopoietinlerin bu multimerik yapıları, agregasyonlarında ve zayıf suda çözünme yapısı göstermelerine neden olup, izole edilip, rekombinant üretilmelerinde güçlüklerle neden olabilmekte yine de daha iyi

suda eriyen ve modifiye anjiyopietin varyantlarının üretilmelerine engel teşkil etmemektedir. Üretilen bu anjiyopietin rekombinant proteinleri, angiopietinin etkilerini ortaya koymada, çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ang1 fare miyokardiumunun erken dönem gelişiminde eksprese olur ve endokardiuma parakrin olarak etkidiği muhtemeldir.

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde daha yaygın olarak eksprese olan Ang1, gelişen damar endotel hücrelerinin etrafını kuşatan mezenşimal doku içinde en yüksek ekspresyona ulaşır. Ang1 aynı zamanda erişkin vasküler ağında yer alan periendotelial hücrelerden (perisit ve düz kas hücrelerinden) eksprese olur ve buradaki ekspresyonun yapısal anlamda erişkin vasküler ağının devamlılığının sağlanmasında görev aldığına inanılır. Ang1 in parakrin özelliklerinin aksine, Ang2 endotel hücrelerinden otokrin özellikte eksprese olur. Ang2 çoğu erişkin dokusunda az düzeyde eksprese olurken, ovarian folikül maturasyonunda ve tümör anjiyogenezi gibi yeniden damar oluşmasında daha yüksek düzeyde eksprese olur. İn vitro olarak hipoksi, VEGF, bFGF, anjiyotensin-II, Tümör Nekrozing Faktör(TNF- α) gibi pek çok faktörün endotel hücrelerinde, Ang2 mRNA ekspresyonunu upregule ettiği bilinmektedir. Hipoksi aynı zamanda in vivo, Ang2 ekspresyonunun upregülasyonunda da görev alır. Örneğin rat dorsal flap yaşayabilirliğinde, iskemik alanda ve beyinde hipoksik durumlarda upregulasyon ortaya konulmuştur(56). Ang2, endotel hücreleri tarafından sentezlenir ve uygun uyaran karşısında hemen salındığı Weibel-Palade cisimcikleri içerisinde bulunur. Bunun özellikle inflamatuvar yanıtta rol alabileceği, Ang2'nin lökositlerin endotel hücrelerine adhezyonu için sinyal üretebileceği öne sürülmektedir(57). Ang4'ün nasıl eksprese olduğu, net olarak bilinmemesine rağmen akciğerlerde kuvvetli bir şekilde eksprese oldukları bildirilmektedir. Ang4 endotel hücrelerinde hipoksi ve VEGF tarafından upregule edilir(58). Ang2'den ziyade Ang1, bağlayıcı parça ile ekstrasellüler matrikse bağlanırken, Ang3 ise hücre yüzeyine heparan sülfat proteoglikanı ile bağlanır(59). Angiopoietinlerin bu farklı hücrel lokalizasyonları nedeniyle değişik fonksiyonel aktivitelerde etken oldukları öne sürülmektedir.

Tie1 ve Tie2, hemen hemen sadece endotele özgü, transmembran protein tirozin kinaz reseptörleridir. Tie1 gen ekspresyonu, endotelyal hücreleri ile bazı hematopoietik hücre dizilerinde sınırlıdır. Bununla birlikte Tie1 ekspresyonu, yara iyileşmesinde, ovarian foliküllerin maturasyonunda tümör anjiyogenezinde de upregüle olur.

Tie2 daha çok endokardiumda, leptomeninkslerde ve endotel hücrelerinin gelişiminin erken dönemlerinde belirgin olarak eksprese olur. Dikkat çekici bir şekilde, Tie2 Von Willebrand faktörden önce eksprese olur ve bu da olgun endotel hücrelerinin embriyonik öncüllerinin belirlenmesinde bir gösterge olabilir. Buna ek olarak, Tie2 aynı zamanda bazı

hematopoietik hücre dizilerinin alt gruplarında eksprese olmakta ve bu hücrelerin kemik iliği içindeki kaderinin belirlenmesinde de rol oynamaktadır(60).

Tie1 ve Tie2 arasında çok yakın bir benzeşim olmasına karşın, Tie1 belirgin bir şekilde anjiyopoiyetinlere bağlanamaz. Ancak, endotel hücrelerinin anjiyopoiyetinler tarafından uyarılması Tie1 tirozin fosforilasyonunun indüklenmesi sonucu oluşur(61).

Gen hedefli çalışmalarda, damar gelişiminin başlamasından sonraki süreçte, damar yapısının yeniden yapılandırılmasında ve stabilizasyonunda VEGF kadar, Tie1, Tie2, Ang1 ve Ang2 nin de gerekli olduğu gösterilmiştir. Tie2 gen hedefli embriyoların, 9,5.günde öldükleri 12,5.günde ise kardiyak fonksiyonların, damar rupturlarının ve kanama odaklarının şekillendiği zlenmiştir. Bazı embriyolarda kalbin meydana geldiği gözlenirse de, miyokardial trabeküler uzantıların Tie2 eksikliği olan embriyolarda gözlenmediği ve endokardial hücrelerin miyokardiuma zayıf bir şekilde bağlandığı izlenmiştir. Bazı embriyolarda damar ağının oluşumu tamamlanamamakta, embriyo boyunca izlenen kan damarları, anjiyogenezin başlanış aşamasından sonra, normal yapılarını koruyamadıkları ortaya konulmuştur(62).

Çalışmalardan elde edilen veriler, Tie2'nin damar stabilitesinin sağlanmasında ve endotel hücrelerinin sağkalımının artırılmasında önemli bir faktör olduğu anlaşılmaktadır. Tie1 gen defektli farelerde, 13,5.günde ölümlerin izlendiği, ciddi ödem tablosunun, kanamaların ve hasarlı mikrovasküler yapıların olduğu görülmüştür. Tie1 homozigot defektli farelerin, endokardial defektleri olan küçük bir kalbe sahip oldukları, ancak büyük kan damarlarının ise normal yapısını koruduğu izlenmiştir. Hem Tie1, hem de Tie2'den yoksun olan fare embriyo fenotipleri, Tie2'den yoksun embriyolara benzemektedir, ancak anomalite yönünden daha şiddetlidir(63).

Yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu, Tie2 kinaz kısmındaki tek bir aminoasitteki yer değişimi (R849W ve Y897S) bazı kalıtsal mukokutaneöz venöz malformasyonlardan sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Bu mutasyonlar Tie2 bazal aktivitesini artırır ve büyük, ince duvarlı, venöz benzeri anormal kanalların oluşumuna neden olurlar. Etkilenen damarlar, normal venlerle karşılaştırıldığında, düz kas hücrelerinde disorganizasyon odaklarının olduğu izlenmiştir(64).

Ang2 gen hedefli çalışmalarda, farelerin normal bir şekilde doğduğu, ancak lenfatik damarlarda defektlerin olduğu, batında şilöz asit ve ödemin yanı sıra retinal damarların yeniden şekillenmesinde bozukluk olduğu bildirilmiştir. Farelerden büyük bir kısmının da postnatal 14.günde öldüğü kaydedilmiştir. Bununla birlikte intestinal villuslardaki laktealların kaybolduğu, lenfatiklerle ilişkili olan düz kas hücrelerinin kesintiye uğradığı da rapor edilmiştir. Endotel hücrelerindeki Ang2'nin aşırı ekspresyonu fare embriyolarının 9,5-10,5.

günler arasında ölmesine neden olmaktadır. Her ne kadar bu farelerin fenotipik özellikleri Tie2^{-/-} ve Ang1^{-/-} farelere benzese de daha şiddetli bozukluklarının seyrettiği ifade edilmektedir(65).

2.3.3.2.3.İntegrinler

Hücre adhezyon mekanizmaları, ekstrasellüler matriks boyunca endotel hücrelerinin ilermesini sağlar ve bu olay yeni kan damarlarının oluşumu için kritik düzeyde bir öneme sahiptir. Gerçekte, anjiyogenez sürecinde hem endotel hem de stromal hücrelerinin sağkalım, büyüme ve farklılaşma gibi fonksiyonları adhezyon moleküllerini eksprese etmelerine bağlıdır(66).

İntegrinler, ekstrasellüler matriks içerisinde, bir α ve bir β alt biriminden oluşan, glikoprotein yapısında, primer hücre yüzey reseptörleridir(67). Toplam 18 α ve 8 β alt birimleri arasında meydana gelen kovalent bağlantılar sonucunda, en az 24 farklı hücre yüzey reseptörünün olduğu, oluşan bu reseptörlerin her birinin hücre yüzeyi üzerinde ya da ekstrasellüler matriks içinde yer alan ligandlara bağlanabilme kapasitesinde oldukları bilinmektedir.

Tek bir ekstrasellüler matriks ligandı, birden fazla integrine bağlanabilirken (örneğin, laminin, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ 'e bağlanması) tek bir integrin hücreyi birden fazla ekstrasellüler matriks proteinine (örneğin, $\alpha v\beta 3$ 'ün vitronektin, fibrinojen, Von Willebrand Faktör ve laminini bağlaması gibi) bağlayabilmektedir. Ekstrasellüler matriks proteinlerine ilaveten, integrinler, matriks metalloproteinazların(MMP) ve Vasküler Cell Adhezyon Molekülleri(VCAM) ve Intersellüler Cell Adhezyon Molekülleri(ICAM) gibi immunoglobulin tipteki hücre yüzey adhezyon moleküllerinin bağlanmalarını kolaylaştırır.

Hem gelişimsel hem de patolojik anjiyogenez mekanizmasında endotel hücrelerinin integrin aracılı migrasyonu ve invazyonu önemli bir düzenleyici olarak hizmet görmektedir.

Bazal membran ve ekstrasellüler matriks; hücre adhezyonu, proliferasyon, migrasyon- invazyon, gen ekspresyonu, hücre sağ kalımı ve anjiyogenez ve lenfanjiyogenez mekanizmalarında hücre yanıt için gerekli olan büyüme faktörlerinin sinyal iletiminde gereklidir(67).

Tümör, yara ya da inflamatuvar dokudan köken alan bir anjiyojenik büyüme faktörü, özellikle fibronektin, fibrinojen, vitronektin ve osteopontin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanan $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ gibi integrinlerin hücre yüzeyinde upregülasyonu meydana gelir(68). Anjiyojenik süreçte, genetik ablasyonlarla olumsuz etkileri

olan ve $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ gibi integrinleri içeren az 9 farklı integrin tanımlanmıştır. $\alpha 5$ integrinde meydana gelen gen hedefli yıkılma sonucu embriyonik damar yapısında ve vitellus kesesinde meydana gelen bir takım defektler embriyonal ölümlere kadar giden sonuçlar meydana getirmektedir(69). $\alpha 5\beta 1$ veya fibronektinin, antikorlar veya blokaj peptidleri tarafından inhibisyonu, anjiyogenezi indükleyen büyüme faktörlerini bloke ettiği gösterilmiştir.

Gen hedefli $\alpha 5$ sınıfı integrinlerin anjiyogenezi etkilediği, fakat bunun endotel hücre invazyonu ve vasküler gelişimdeki rolünün ise daha kompleks olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda $\alpha v\beta 3$ 'ün proanjiyojenik sinyalleri baskı altında tuttuğu iddia edilmiştir. Bu etkileşim ya doğrudan büyüme faktörleri reseptörleri tarafından ya da hücre sağ kalımı düzenlenmesi ile gerçekleşir. İntegrin aracılı sinyal mekanizmasına ek olarak, ekstrasellüler matriks içeriğinin de tümör anjiyogenez mekanizmasında önemli rol oynadığı öne sürülmektedir(70).

Endotelial ve immün hücrelerin yanında stromal ve tümör hücrelerinde yeni ekstrasellüler matriks proteinleri ve MMP-2, MMP-9 gibi anjiyogenez süresince yıkılanmış olan ekstrasellüler matriks proteinlerinin temizlenmesinde ve yeniden oluşmasında görev alan matriks metalloproteinazlar üretilmektedir(71). MMP-2'nin otoproteolitik hemopeksin fragmanları gibi, matriks metalloproteinazların inhibitörleri, anjiyogenez esnasında birikir ve hücrelerin migrasyonunu azaltan aşırı ekstrasellüler matriksin aşırı yıkılmasına engel olur. Tümör ekstrasellüler matriks komponentlerinin matriks metalloproteinazlar tarafından yıkılması ve yarılanması sadece VEGF ve bFGF gibi anjiyojenik büyüme faktörlerinin salımına neden olmaz, aynı zamanda anjiyogenez gerçekleşirken meydana gelen hücre migrasyon ve hücre sağ kalımı için gerekli olan yeni integrin adhezyon bölgelerinin açığa çıkmasında olanak sağlar. Örnek olarak, fibriller kollajenin, fibronektinin ve laminin parçalanması ile $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha 3\beta 1$ integrinleri tarafından tanımlanan kriptik bölgelerin açığa çıkması söylenebilir. Bu olay, anjiyogenezde endotelial hücre büyümesi, farklılaşma ve tüp oluşumu için kritik bir öneme sahiptir(72). $\alpha v\beta 3$ integrini üzerinde en çok yoğunlaşan ve anjiyojenik kan damarlarının da bir belirteci olarak ilk defa tanımlanmış olan integrindir. Dinlenme halindeki endotel hücre yüzeyinde $\alpha v\beta 3$ ekspresyonu ya yoktur ya da çok az düzeydedir. Ancak endotel hücrelerinin bazı büyüme faktörleri tarafından uyarılması ile yeni oluşan kan damarlarında aşırı miktarda $\alpha v\beta 3$ ekspresyonu izlenebilmektedir. Bu olay, endotel hücrelerinin bu integrini eksprese etmesine olanak sağlar ve fibrin, vitronektin, fibronektin, osteopontin ve diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerinin endotele yapışmasını imkan tanır(73).

2.3.3.2.4.Fibroblast Growth Faktör-2(FGF-2,bFGF)

FGF ailesi içinde yer alan FGF-2, 18.8 kD ağırlığında olup, invitro olarak kapiller endotel hücrelerinde proliferasyonu invivo olarak anjiyogenez iuyardığı bildirilmektedir. Kùltür ortamındaki endotel hücrelerinde, proanjiyojenik bir karakter sergilediği, bu hücrelerde proliferasyonu uyarıp, kapiller benzeri yapılara neden olduğu gösterilmiştir. FGF-2 aynı zamanda ekstrasellüler matriks bileşenleri olan ve kan damarlarının matürasyonunda rol oynayan kadherin ve integrinlerin düzenlenimine de katkıda bulunur(74).

Fibroblast Growth Faktör Reseptör-1(FGFR1), FGFR2, FGFR3 ve FGFR4 olmak üzere 4 adet FGF reseptör kinaz tanımlanmış olup, FGF-2'nin bu reseptörlerin hepsine bağlanabilme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir(75). Diğer taraftan FGFR1 daha az sıklıkla FGFR2(76) endotel hücrelerinden eksprese olurken FGFR3 ve FGFR4'ün ekspresyonunu gösteren bir çalışma henüz bildirilmemiştir(76).

FGF-2 temelde, in vitro şartlarda, ekstrasellüler matriks içinde yer alırken, in vivo olarak damar endotelinin altında yer alan bazal membranda eksprese olur. Pek çok farmakolojik ve genetik çalışma, VEGF'ün hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenezde anahtar rol oynadığını göstermekte, FGF'in de, VEGF ile çok yakın ilişkide olduğunu bildirmektedir. Örneğin murin embriyo eksplantlarında VEGF ile tetiklenen tüp oluşumunun endojen FGF etkinliği altında da meydana geldiği öne sür÷lmektedir(77). Diğer taraftan, kùltür ortamındaki endotel hücrelerinde meydana gelen transkripsiyonal değişiklikleri inceleyen çalışmaların VEGF ve FGF-2'nin bu transkripsiyonel değişikliklerin düzenlenmesinde görev aldığını ortaya koymaktadır. Gerçekte, FGF ve VEGF'in çeşitli anjiyogenez modelleri üzerindeki etkileri sinerjik olabilmektedir(78). Çeşitli deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular, FGF-2'nin anjiyogenezi indirekt olarak VEGF/VEGFR'leri aracılığıyla etkilediğini göstermektedir. VEGFR2 antagonsitleri sadece VEGF'ü değil, aynı zamanda FGF-2 ile uyarılan anjiyogenezi de inhibe eder(79). Dominant negatif FGFR1 yada FGFR2 'nin glioma hücrelerindeki ekspresyonu, VEGF downregölasyonuna paralel olarak buradaki anjiyogenezi azaltır. Endojen ve eksojen FGF2 endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunu düzenler. Fare kornealarında, dinlenme halindeki limbus damar endotelinde VEGF ekspresyonu sadece FGF2 ve sistemik anti-VEGF tedavisi verildikten sonra FGF2 ile ind÷klenen anjiyogenezde tedricen bir azalma olduğu gösterilmiştir(80).

Pek çok patolojik durumda, inflamasyon FGF2 bağımlı anjiyogenezi uyaraabilmektedir. Mast hücreleri monon÷klear fagositler, CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri gibi inflamatuvar hücreler FGF2 ekspresyonu yaparlar(74). İnflamatuvar mediatörler endotel hücrelerini aktive edip, bu

hücrelerin FGF2 üretip aktive etmesini sağlayabilir, otokrin olarak da anjiyogeneze uyarılmış olunur. İnflamatuvar yanıt çoğu zaman hipoksi ve hücre hasarına neden olmaktadır. Hipoksi FGF2 üretimini, endotel ve perisit hücrelerinde upregüle eder(81). FGF2 korneanın hücreden yoksun tabakalarında yer alan reseptörlerine bağlanır. Diğer taraftan yeni oluşan kan damarlarının bazal membranlarında da değişen derecelerde tutulum izlenir(82).

2.3.3.2.5. Platelet Derived Growth Factor(PDGF)

Platelet derived growth faktör(PDGF) 1970 li yılların son dönemlerinde, plateletlerden mezenşimal kök hücrelerini uyaran bir faktör olarak saflaştırılmıştır. Bundan sonraki 10-15 yıl içerisinde, yapılan çalışmalarda PDGF'in 2 tane(A ve B) geni olduğu, bu iki gen kombinasyonu ile üç tip (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB) PDGF varlığı öne sürülmüştür(83). İki bin yılında, üç ayrı çalışma tarafından bu ailenin bir üyesinin(PDGF-C) daha varlığı ortaya konulmuş olup(84), izleyen yıl içinde yapılan bir çalışmada da, PDGF-D beşinci üye olarak ailedeki son yerini almıştır(86). Bu aile üyelerinden, PDGF-B'nin X-ray yapısal analizinde, VEGF'e olan benzerliği dikkat çekicidir(85). Şu ana kadar PDGF aile üyelerinin bağlandığı, toplam 3 adet PDGF reseptörü tanımlanmıştır. İki tane gen tarafından kodlanan PDGF reseptörleri, PDGFR α , PDGFR β ve PDGFR $\alpha\beta$ olarak tanımlanmışlardır. PDGF-B, her üç tip reseptöre de yüksek afinite göstermekte iken çoğu çalışma, PDGF-D'nin sadece PDGFR β 'ye bağlandığını öne sürmektedir. Benzer şekilde PDGF-A, PDGFR α 'ya özgü iken, PDGF-C ve PDGF-AB'nin aynı özelliğe sahip olduğu, PDGFR α ve PDGFR $\alpha\beta$ 'yı aktive ettiği bildirilmiştir(86).

Son çalışmalar PDGF'lerin, anjiyogeneze katkıda bulunan kemik iliği kökenli hücrelerin gelişimi için önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle PDGF-C'nin başta tümör anjiyogenezi üzerinde etkilerinin olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur(87).

PDGF-C, ovaryum, plasenta ve embriyonal dokular gibi anjiyojenik kapasitesi yüksek olan dokularda, aşırı bir şekilde üretilmektedir(80). Gerçekte, PDGF-C'nin pek çok organ ve dokuda anjiyojenik etkisi izlenmektedir. Buna ilaveten PDGF-C'nin anjiyojenik etkisi aortik çember, koryoallantoik membran ve korneal anjiyogeneze modellerinde VEGF ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu büyüme faktörünün anjiyojenik etkisinin özellikle endotel prekürsör hücreleri, kemik iliği hücreleri ve olgun vasküler hücrelerin üzerinde proliferatif, migratif ve differensiyatif düzeyde olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda, koroid, retina, ve korneal anjiyogeneze çeşitli hücreler üzerine etki ederek, oldukça kritik roller üstlenir(89).

PDGF-C'nin tümör anjiyogenezindeki rolünü araştıran çalışmalarda, pek çok tümör tipinde VEGF inhibisyonu sağlansa bile PDGF-C ekspresyonundaki artışın yeni damar gelişimi ile paralel seyrettiği ortaya konulmuştur(90). Bu bulgular, PDGF-C'nin, VEGF aktivitesine bağımsız bir anjiyojenik etkisinin olduğunu göstermektedir. Hem anti-PDGF-C'nin hem de anti-VEGF antikorunun kombine kullanılması, tek başına kullanılan anti-VEGF antikoruna nazaran tümör anjiyogenezinin inhibisyonunda daha etkili olduğu bildirilmektedir (87). Bununla birlikte VEGF ile uyarılan damar geçirgenliğinin artmasının aksine PDGF-C'yi aşırı eksprese eden tümörlerin vasküler permeabilitesinin azalması her iki growth faktörün anjiyogenez mekanizması sırasında, birbirinden bağımsız olarak etkidiği sonucunu doğuran kayda değer önemli bir bulgu olarak literatüre geçmiştir(91).

2.3.3.2.6.Epidermal Growth Faktör(EGF)

Amino asit dizilim analizleri EGF'nin 53 aminoasit ve 6 sistein rezidüsüne sahip küçük bir peptid olduğunu göstermektedir. Sistein rezidüleri, EGF içerisinde 3 adet intramoleküler disülfid bağı oluşturur ve bu bağlar EGF'nin biyolojik aktivitesi için oldukça önemlidir(92).

Bugüne kadar yaklaşık 11 farklı EGF benzeri polipeptid tanımlanmıştır, EGF ile birlikte bunlar EGF büyüme faktörleri ailesini oluştururlar. Bu faktörlerden her birinin en az bir disülfid bağı EGF'deki yapıya benzerdir. EGF ailesi TGF- β , amfiregulin(AR), Heparin bağı EGF(HB-EGF), Epiregulin(EPR), Betasellulin(BTC), Nöroregulin-1,2,3,4., ve teratokarsinoma kökenli büyüme faktörü (Cripto-1) gibi büyüme faktörlerinden oluşmuştur. EGF başlangıçta fare tükrük bezlerinden elde edilmiş, korneada yara iyileşmesini hızlandırıcı bir etken olarak tanımlanmış, ancak daha sonraki çalışmalarda bu faktörün pekçok hücre üzerinde farklı etkilerinin olduğu saptanmıştır(93).

Epidermal Growth Faktör Reseptörleri(EGFR) aynı zamanda ErbB1 ya da Human Epidermal Growth Faktör Reseptörleri (HER) olarak da adlandırılan , transmembran reseptör tirozin kinaz yapısındadır. Bu reseptör ailesi birbiriyle ilişkili olan EGFR (ErbB1/EGFR/HER1), ErbB2 (HER2/*neu*), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4) olmak üzere 4 tip reseptör içermektedir. Bu reseptörler, bir ekstrasellüler ligand bağlanan bölgeye, bir transmembran bölgeye, düzenleyici karboksil terminal segmentin yer aldığı intrasellüler tirozin kinaz bölgelerinden oluşmuş transmembran glikoprotein gibi yapılardan meydana gelmiştir. EGFR'nin ekstrasellüler kısmındaki N ucuna EGF, TGF- α ve amfiregulin gibi farklı ligandlar bağlanabilir.Bu bağlanma sonucunda, hem reseptörde dimerizasyon(homodimerizasyon), hem de diğer EGFR'ler de (heterodimerizasyon) olduğu

görülür(94). Dimerizasyon ile EGFR'nin intrasellüler tirozin kinaz reseptörleri aktive edilerek intrasellüler otofosforilasyon ve hücre içi olayların başlaması sağlanır. Bu olayların etkisiyle ve adaptör reseptörlerin devreye girmesiyle, çeşitli intrasellüler substratların, fosforilasyonu ve sınırlanması gerçekleşir. Söz konusu bu hücre içi olaylar içerisinde, Ras–Raf–MAPK önemli bir sinyal yolağı olarak görev alır. Ras sisteminin indüksiyonu, MAPK, ERK1 ve ERK2'nin kompleks fosforilasyon kaskadını aktive eder. ERK1 ve ERK2 hücre sağ kalımı, proliferasyonu, migrasyonu ve mutasyonun düzenlenmesinde gerekli olan transkripsiyon molekülünün sentezinden sorumludur. Diğer bir hedef PI3K ve serin/treonin kinaz Akt moleküllerinin büyüme ve proliferasyonu, gen aktivasyonunu ve apoptozis gibi farklı biyolojik olayların kontrolünde görev almasıdır. Bir diğer hedef, protein kinaz C ve Jak/Stat'ı içeren stres ile aktiflenen protein kinaz yolağıdır. Bu sistemlerin aktivasyonu ile hücre bölünmesi, motilite, invazyon, adhezyon, hücre onarım ve hücre sağ kalımı gibi çeşitli hücresel yanıtların düzenlenmesinde görev alan çeşitli transkripsiyon programlarının devreye girmesi gerçekleşir(95). Sinyal geçişinden sonra hücre yüzeyinde reseptörler ya internalize olurlar ya da rejenere edilirler. EGFR normal ve malign epitelyal hücrelerde eksprese edilir ve tümör biyolojisinde önemli rol oynar. Gerçekte, proliferasyonu, metastazı, anjiyogenezi ve apoptozis inhibisyonunda görev almaktadır(96).

2.3.3.2.7.Matriks Metalloproteinazlar

Tümör ile ilişkili anjiyogenez mekanizmasında temelde, daha önce var olan damardan ayrılan bir endotel hücresinin uyarılması ve tümör dokusuna doğru migrasyonu söz konusudur. Ancak, bazı tümör tiplerinde, sıklıkla kemik iliği kökenli ve dolaşımdaki endotel hücre prekürsörlerinin tümör damar gelişimine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür. Endotel hücrelerinin bazal membrana invazyonu ve ekstrasellüler matrikse adhezyonu, tümör hücrelerinin invazyon ve adhezyon mekanizmalarına büyük benzerlik göstermektedir(97).

Bu değişiklikler meydana gelirken ekstrasellüler matriks içinde bir takım yıkımlanmalar oluşur ve bu yıkımlanmalardan büyük ölçüde sorumlu tutulan proteazların başında matriks metalloproteinazlar (MMP) gelmektedir. MMP ailesi üyeleri hücre yüzey reseptörleri ve adhezyon molekülleri dahil ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkma kapasitesine sahiptir(98).

MMP ailesinin çoğu üyesi ve birkaç istisna dışında MT-MMP'lar inaktif pro-enzimler olarak sentezlenip salgılanırlar. Salgılanan bu pro-MMP'ler ekstrasellüler olarak, serin veya metalloproteinaz aracılı yarıklanma ile pro kısımlarından ayrılırlar(99).

MMP ailesinin tümör çevresindeki proteolitik aktivitesi için en az 2 adet endojen inhibitöre ihtiyaç duyulur. Bunlar içerisinde özellikleri ortaya konup daha fazla bilgi sahibi olunan Tissue Inhibitory Matriks Metalloproteinazlar(TIMP) lardır. TIMP ailesi küçük moleküler ağırlığa sahip olan 4 üye içermektedir(98).

MMP inhibitörlerinden ikinci olarak anjiyojenik yanıtı düzenleyen membran ile ilişkili MMP inhibitörü RECK adıyla bilinir. RECK, MMP-2, MMP-9 ve MT1-MMP gibi MMP ailesi üyelerinin etkilerini inhibe eder. RECK-mutasyonu olan farelerin 10,5.günde vasküler defektlerden dolayı öldükleri saptanmıştır(100,101).

Anjiyojenik faktörler tarafından endotel hücrelerinin uyarılması ve özellikle bu hücrelerde MMP-2ve MT1-MMP'lerdeki ekspresyon artışı dikkat çekmektedir. Ancak tümör anjiyogenezinde MMP'lerin rolünü araştıran genetik çalışmalarda, endotel hücrelerinin doğrudan MMP üretmediği sonucuna varılmıştır. Örneğin, MMP-9 ekspresyonunda, MMP'nin anjiyojenik başlangıç için kritik öneme sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu mekanizmanın özellikle MMP-9'un matrikse bağlı olan VEGF-A'yı anjiyojenik alana doğru mobilize etmesinden kaynaklandığı vurgulanmaktadır. Diğer taraftan MMP-9 perisit hücrelerinin endotel etrafında dizilimi için stromadan da sentezlenmektedir (102). Tümör ile ilişkili anjiyogenezin başlangıç dönemlerinde, damar geçirgenliğinde bir artış meydana gelmekte, bu da temelde trombinden oluşan matriks birikimine ve subendotel bazal membranın yıkımlanmasına neden olmaktadır(103). Bu nedenle tümör mikroçevresindeki endotel hücreleri tümör anjiyogenezi gerçekleşirken pek çok tipte ECM ile karşılaşmaktadır (104). Yapılan invivo ve invitro çalışmalarda, fibrinolizisin sadece fibrinolitik/plazminojen aktivatör sistemden değil aynı zamanda endotelyal MMP'ler aracılığıyla da olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, MT1-MMP'nin kollajenaz aktivitesi, endotel hücresinin kollajenden zengin matriks içindeki hareketinden dolayı anjiyogeneizde önemli bir yere sahiptir(105).

MT-1-MMP, TIMP2 varlığında MMP-2'yi aktive ederek, tümör mikroçevresinde Tip-1 kollajeni ve diğer kollajenleri doğrudan parçalar. MT1-MMP ve MMP-2 ve MMP-9'un proteolitik aktivitesi hep birlikte erken dönem tümör anjiyogenezindeki olaylar meydana gelirken dümen vazifesi görerek anahtar rol oynar(104). Bu nedenle, pek çok çalışma tümör anjiyogenezinde, MMP-9'un VEGF'i mobilize etmesi ve MT1-MMP'nin endotel hücrelerinin invazyonunda rol almasından ötürü MMP'lerin önemini vurgulamaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan çoğu çalışma, MMP'lerin endotel hücrelerinin invazyonunda, bazal membran yıkımlanmasında, görev aldığı vurgulanmaktadır(106). MMP'lerin aktivasyonu, bunların ECM proteinlerini yıkımlayıp, metabolize ederek, anjiyostatin ve endostatin gibi antianjiyojenik proteinlerin açığa çıkmasına olanak sağlayarak antianjiyojenik etki de gösterebilmektedirler.

Bunlar, prekürsörleri olan, plasminojen ve tip XVIII kollajenden üretilirler. Örneğin MMP-9, tip IV kollajenden farklı antianjiyogenik bir peptid olan tumstatinin oluşmasında görev alır. Tumstatin hem tümör hücrelerinin proliferasyonunu hem de anjiyogenezi inhibe eder. Yine dikkatlerin çekilmesi gereken bir diğer nokta da tumstatinin yapısında yer alan $\alpha 3\beta 1$ bağlanma bölgesi, thrombospondin gibi ilk doğal oluşan anjiyogenezi inhibitöründe de yer almasıdır(107).

2.4.Korneal Anjiyogenezi

2.4.1. Giriş

Korneal avaskularite, korneal saydamlık açısından ne kadar önemli ise, korneal saydamlıkta iyi görüş açısından önemlidir. Bu yüzden yüksek organizasyonlu organizmalarda kornea hem vasküler hem de lenfatik damarlardan yoksundur(108).

Bununla birlikte çeşitli hastalıklarda ve cerrahi girişimlerde, limbusta yer alan kan damarlarının korneanın sentraline doğru büyümesi şekillenebilmektedir. Korneal damarlanması, görme keskinliğini ciddi bir şekilde azaltabilir ve körlüğe neden olabilir. Gerçekte, korneal anjiyogenezi, korneal körlüğün (trahom) nedeniyle ilişkiliyken, infeksiyöz körlüğün batı ülkelerinde (herpetik keratit) ile ilişkilidir. Yıllardır invivo olarak anjiyogenezi mekanizmasının profilini ortaya koyma adına yapılan model çalışmaların aksine, son yıllarda insan korneasının normal avasküler yapısını nasıl koruduğuna yönelik çalışmalar üzerinde son dönemlerde çalışmalar yapılmaktadır(110).

2.4.2.Korneal Avaskularite Mekanizması

Anatomik pozisyonundan dolayı sürekli olarak çok sayıda minör inflamatuvar etkene dolayısıyla anjiyogenik uyarana maruz kalmasına rağmen kornea, avasküler yapısını koruyabilmektedir. Refraktif cerrahi gibi ciddi travmalardan sonra bile, diğer dokuların aksine kornea doğrudan anjiyogenik olarak yanıt vermez. Korneal avaskularitenin bu şekilde korunması korneal anjiyogenik ayrıcalık olarak tanımlanmaktadır(110). Korneal anjiyogenik ayrıcalık sadece görme keskinliğinin sağlanmasında değil, aynı zamanda keratoplasti sonrasında immün reddin oluşmasına da engel olur(109). Genel olarak, anjiyogenezi veya anjiyogenezi inhibisyonu, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler (Tablo-1) arasındaki dengeye bağlıdır. Eğer denge proanjiyogenikler yönünde ilerlerse anjiyogenezi başlar. Korneada, normalde, denge antianjiyogenik yönünde olduğundan dolayı avasküler yapı korunmaktadır. Gerçekte, pigment epitelium derived büyüme faktörü(PEDF), thrombospondin 1 ve 2, antianjiyogenik matriks yarıklanma ürünleri olan anjiostatin ve

endostatin gibi çeşitli antianjiyojenik faktörler, korneada tanımlanmıştır. Bu antianjiyojenik faktörlerin stratejik olarak daha çok Descemet ve Bowman membranlarında lokalize olduğu bildirilmektedir(108).

2.4.3.Korneal Anjiyogenez Mekanizması

Folkman'a göre herhangi bir dokuda ya da durumda anjiyogenezin olup olmayacağını, anjiyojenik ve antianjiyojenik faktörler arasındaki denge belirlemektedir. Eğer denge anjiyojenik büyüme faktörleri lehine kayarsa o zaman damar gelişimi şekillenir, aksi yönde olursa anjiyogenez başlamaz. Son yıllarda başta VEGF ailesi olmak üzere pek çok anjiyojenik büyüme faktörünün yanında PEDF, trombospondin, anjiyostatin, endostatin gibi anjiyogenez inhibitörleri son yıllarda tanımlanmıştır. Patolojik anjiyogenez ve lenfanjiogenez çoğunlukla inflamasyona bağlı şekillenen hipoksi ya da limbal bariyer defektinin bozulması sonucu şekillenir(108,110). Korneal anjiyogenez ile ilişkili klinik tabloların başında, keratitler (herpetik, bakteriyel), kontakt lens kullanımı, kalıtsal ya da sonradan şekillenen limbal yetmezlik (çoğunlukla kimyasal yanıklarda) gelmektedir. VEGF ailesi büyüme faktörlerinin hem korneal anjiyogenezde hem de lenfanjiyogenezde anahtar rol oynadıkları öne sürülmüştür(108). Anjiyojenik büyüme faktörlerinin salınımı, genelde inflamasyona ve inflamatuara sitokinlere bağlı olarak (keratitis) veya hipoksiye (kontakt lens kullanımına) bağlı olarak meydana gelir. Filizlenme anjiyogenezinin genel mekanizması burada da geçerli olmaktadır. Önce olarak vazodilatasyon şekillenir, daha sonra ekstrasellüler matriks yıkımlanır, endotel hücrelerinde mitotik aktivite artar, ve anjiyojenik uyarana doğru göç başlar ve yeni damar oluşumu şekillenmiş olur.

Anjiyojenik Faktörler	Antianjiyojenik Faktörler
Vasküler Endotelial Growth Faktör	Anjiyostatin
Fibroblast Growth Faktörü-2	Endostatin
Transforming Growth Faktör- α	Thrombospondin
Transforming Growth Faktör- β	MMP-doku inhibitörü
İnsülin like Growth Faktörü	Arresten
İntegrinler	Canstatin
Matriks Metalloproteinazlar	Tumstatin
Platelet Derived Growth Faktör	Tümör Necrosis Faktör- α
Leptin	İnterlökin-4
Anjiyojenin	İnterlökin-13
	Prolaktin

Tablo.1: Anjiyojenik ve antianjiyojenik moleküller(111).

2.4.4. Korneal Anjiyogenezin Yaygın Nedenleri

Korneal anjiyogeneze neden olan durumlar, altında yatan mekanizmaya göre, üç kategoride toplanabilir(112).

- 1.Ciddi inflamasyona neden olan hastalıklar
- 2.Hipoksiye neden olan hastalıklar, kontakt lens kullanımı
- 3.Kalıtsal veya sonradan antianjiyojenik bariyerin hasara uğraması.

Buna ilaveten, sekonder olarak da korneal anjiyogenezin meydana geldiği durumlar vardır. Özellikle korneal cerrahilerde, korneal suturların alınmasında (keratoplastiden, korneal yaraların onarılmasından ve blok eksizyondan sonra) esnasında sekonder korneal anjiyogenez şekillenebilir(113).

2.4.5.Korneal Anjiyogeneze Klinik Bulgular

Korneal anjiyogenez, avasküler bir yapıda olan korneada sadece damarların fiziksel varlığıyla değil, aynı zamanda bu damarlar oluşurken meydana gelen sızıntılarla birlikte görme keskinliğini azalmaktadır. Su sızmasından dolayı korneal ödem şekillenir, lipid sızmasından dolayı da lipid keratopatolojisi şekillenir, ayrıca intrastromal veya subepitelyal hemoraji de izlenmektedir(114).

2.4.6.Korneal Anjiyogenezde Antianjiyojenik Tedavi

Korneada antianjiyojenik tedaviyi üç kısımda kategorize etmek mümkündür(115)

1. Anjiyostatik/Antianjiyojenik tedavi (yeni kan damarlarının oluşumunu engellemeye yönelik olan klasik antianjiyojenik yaklaşımdır.)
2. Anjioregressif tedavi (oluşmuş olan patolojik damarların regresyonuna yönelik yapılan tedavidir)
3. Anjiyooklusiv tedavi (özellikle kornea cerrahisinden önce geçici olarak fonksiyonel okluzyon yapılan bir tedavi yöntemidir)

Şimdiye kadar spesifik bir antianjiyojenik tedavi yöntemi ortaya konulamamıştır. Çok sayıda spesifik antianjiyojenik ilaç faz-II ve faz-III klinik deneme aşamasındadır(114).

Korneal anjiyogenezi önlemeye yönelik olarak kullanılan ilaçlar sadece indirekt antianjiyojenik etkilere sahiptirler. Topikal steroidler ve siklosporin A, anjiyogenezi indükleyen inflamatuvar etkileri baskılar. Güçlü ve doğrudan bir antianjiyojenik mekanizmaya sahip olmadıkları için, kullanımları sınırlıdır(113). Şimdiye kadar alternatifleri olmadığı için hala topikal antianjiyojenik tedavide kullanılmaktadır. Amniyotik membran transplantasyonu ve amniyotik membran supernatantının bile antianjiyojenik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bunun antilenfanjiyogenetik etkisinin olup olmadığı ise bilinmemektedir. Korneal anjiyogenezi ve lenfanjiyogenezi inhibe etmedeki yoğun uğraşlar direkt olarak antianjiyojenik ajanlar ve mekanizmalar üzerinde olmuştur. Bugüne kadar FDA tarafından onay almış tek antianjiyojenik ilaç bevacizumabtır(114).

2.5.Bevacizumab

2.5.1.Genel Özellikleri

VEGF'e karşı ilk olarak 1993 yılında fareden elde edilen monoklonal antikorların çeşitli in vivo kanser hücre serilerindeki umut verici düzeydeki nötralize etkileri bevacizumabın gelişmesine neden olmuştur. Daha sonra, bevacizumab'ın kemoterapötiklerle olan kombinasyonun çeşitli kanser tiplerindeki klinik aktivitesi ortaya konulmuştur. 2004 yılında FDA tarafından da onaylanmıştır.

Bevacizumab, VEGF'e karşı üretilmiş, humanize monoklonal IgG1 tipte bir antikordur. Spesifik olarak, insan VEGF-A'nın bütün major izoformlarını tanır ve inhibe eder(116).

2.5.2.Etki Mekanizması

Pek çok çalışma, çeşitli tümör tiplerinde tümörün ilerlemesi, büyümesi ve metastazında anjiyogenezin oldukça belirgin bir rol oynadığını bildirmektedir(117). Bevacizumab'ın VEGF yolağını inhibe ettiği pek çok invivo ve invitro modellerde gösterilmiştir(118). İlacın etkileri damar endotel hücrelerinde ve mevcut tümörlerdeki damarların regresyonunda, yeni damar oluşumunun engellenmesinde ve tümör damarsal yapısının normalizasyonunda görülmektedir (119). Tümörün damar yapısının normalleşmesi, tümör hücrelerinin damar duvarından geçişini azaltabileceği, dolayısıyla metastaz riskinde azalmaya neden olabileceği bildirilmektedir. Anormal tümör mikrodamarsal yapısı her birinin kanı tümörün diğer kısımlarına taşıdığı yüksek damar yoğunluğunun heterojen dağılım gösterdiği alanlara, geniş çaplı damarlara ve zayıf damarlara neden olabilir. Tümör içerisindeki kan akımının normalizasyonu, bevacizumab verilmesinin ardından azalan intratumoral basınç ya da intersisyal sıvı basıncından kaynaklı olarak meydana gelmesi, bevacizumabın sitotoksik ilaçlarla birlikte verilmesinde etkinliği artırır. Bevacizumab kan akımının artmasına neden olur ve aynı zamanda radyasyon (tümör mikroçevresindeki oksijeni artırarak), küçük molekül hedefli terapi ve immunterapi (immün hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirmesi için gerekli olan daha fazla oksijen ve besin) gibi diğer terapötik uygulamaların etkinliğini artırır(118).

2.6.Cetuximab

2.6.1.Genel Özellikleri

Cetuximab (IMC-C225, Erbitux ImClone Systems Inc.,New York kimerik, insan-murin kökenli EGFR'nin ekstrasellüler kısmına bağlanan IgG1 monoklonal bir antikordur(120). Her bir çift zincir, sırasıyla 449 ve 214 aminoasitten oluşan iki ağır ve iki hafif zincir olmak üzere toplam 152-kDa ağırlığında olup, birbirlerine kovalent ve non-kovalent bağlarla bağlanırlar. Cetuximabın EGFR'ye bağlanma afinitesi, endojen ligandlardan yani EGF ve Transforming Growth Faktör- α (TGF- α) dan daha yüksektir. Bu bağlanma ile birlikte reseptör tirozin kinaz ve bununla ilişkili olan MAPK, PI3K/Akt ve Jak/Stat yolağını inhibe eder(121).

2.6.2.Etki Mekanizması

Cetuximabın antitümöral aktivite mekanizmalarının çok sayıda olduğu öne sürülmekle birlikte bu mekanizmaların nasıl geliştiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu mekanizmalar içerisinde, EGFR tirozin kinaz aktivitesinin doğrudan inhibisyonu, hücre siklusunun inhibisyonu, anjiyogenez, invazyon ve metastaz, pro-apoptotik moleküllerin

aktivasyonu sayılabilir(122). Bununla birlikte, cetuximab antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksiteyi (ABHS) indükleyebilir. Farklı çalışmalar cetuximabın farklı tümör hücre serilerinde, hücre siklusunun durmasına ve bir takım hücrelerin apoptozise doğru gitmelerine neden olduğunu öne sürmektedir. Yapılan bir çalışmada büyüme faktörleri uygunluğu ve CDK aktivasyonu arasındaki ilişki gözden geçirilmiş, insan DiFi kolon adenokarsinom hücrelerinde cetuximab aracılı EGFR blokajının hücre siklusunun G1 fazında durmasına neden olduğu öne sürülmüştür(123). Pek çok çalışma paralel bir şekilde cetuximabın tümör hücrelerinde VEGF, bFGF ve IL-8 gibi anjiyojenik faktörlerin üretimini azalttığını bildirmektedir. Anjiyojenik büyüme faktörlerindeki azalma, insan tümör ksenograftlarındaki mikrodamar yoğunluğundaki belirgin düşüş ile birlikte apoptotik endotel hücrelerindeki artışı gibi bulgular cetuximabın antianjiyojenik etkisini ilk olarak ortaya koymuştur(14). Bütün bu sonuçlar, diğer tümör hücre serilerinde yapılan çalışmalar tarafından da desteklenmiştir. Bu çalışmalardan birinde, idrar kesesinden elde edilen 253J B-V insan transisyonel karsinom hücreleri üzerine in vitro cetuximabın etkileri izlenmiştir. Söz konusu çalışmada, transisyonel karsinom hücreleri tarafından VEGF protein ve mRNA ekspresyonunun yanında bFGF ve IL-8 büyüme faktörlerinin üretiminin inhibe olduğu öne sürülmüştür(124). Bir diğer çalışmada hem in vivo hem de in vitro insan BBSHK hücreleri kullanılarak cetuximabın etkileri rapor edilmiştir. Anjiyogenez ile ilişkili olarak in vitro cetuximab uygulaması sonucu, human umbilikal ven endotel hücrelerinde(HUVEC) hücre-hücre etkileşiminde azalma ve tüp oluşumunda kesintiler olduğu gözlenmiştir. İn vivo tümör ksenograft anjiyogenez modeli kullanılarak, sistemik verilen cetuximabın hem kapiller damar sayısını azaltarak tümör gelişimini azaltarak, hem de tümör içine doğru damar gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, cetuximabın tümör hücre serilerinde anjiyogenezi baskılayan ciddi bir faktör olduğu gözlenmektedir. Pekçok tümör dokusu içinde yer alan endotel hücrelerinin EGFR ekspresyonu gösterdiği bildirilmektedir. Endotel hücreleri üzerindeki EGFR aktivasyonu, hücrenin proliferasyonunu uyarmaktadır. Bununla birlikte, EGFR inhibisyonun endotel hücrelerinin apoptozise gitmelerini ve anjiyogenezisi geriletliği öne sürülmüştür(125). Bu sonuçlar ışığında, tüp oluşumunun kesintiye uğramasında cetuximabın doğrudan endotel hücrelerini etkileyebileceğini öne sürmektedir. VEGF ve IL-8 immatur endotel hücreleri için yaşamsal faktörler olarak görev alırlar ve endotel hücrelerini apoptozisten koruyup, bevacizumab ile indüklenen azalmış VEGF üretimi, endotel hücrelerinin apoptozisini artırıp, anjiyogenezi düşürebilir. EGFR sinyal yolağının VEGF, IL-8 ve bFGF sentezini nasıl düzenlendiğine ilişkin bilgiler henüz tam olarak anlaşılamamışsa da, EGFR'nin, EGF veya TGF tarafından regüle edildiği açıkça bilinmektedir. VEGF

transkripsiyonu, AP-1 bağlanma bölgesinin dört bölgesi ve bunun teşvik edici kısmı tarafından artırılır. AP-1 bölgesi aynı zamanda bFGF ve IL-8'in teşvik edici bölgelerinde yer alır. EGFR aktivasyon sinyalinden hemen sonra, Ras ve Raf aktive edilir, bunun sonucunda c-fos ve c-jun fosforilasyonu şekillenip, AP-1 aktivitesinin artmasına neden olur. AP-1 aktivitesindeki bu artış VEGF ve IL-8 üretiminde artışa neden olur(126).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmaya, Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu(DEHEK) tarafından onay alındıktan hemen sonra başlanmıştır(18.06.2009/17). Çalışmamızda kullanılan bütün deney hayvanları Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkez (DÜSAM)’inden temin edildi. Ratların gruplandırılması Tablo.2’de gösterildiği şekilde yapıldı. 28 adet 250-300 gr. ağırlığında Spraque-Dawley erkek rat kullanılarak, 4 eşit gruba ayrıldı(n:7). Sağ gözlere Tablo.2’de gösterilen miktar ve sıklıkta ilaçlar(Şekil.2) uygulandı. Ratların sol gözleri ise sham grubu olarak kullanıldı.

Gruplar	Hayvan Sayısı	Verilen İlaç	Dozu	Veriliş Şekli	Veriliş Sıklığı ve Zamanı
Kontrol Grubu	7	Serum Fizyolojik	0.15ml	Subkonjunktival	1,4 ve 7.günlerde
Bevacizumab Grubu	7	Bevacizumab	0.05ml/1.25 mg	Subkonjunktival	1,4 ve 7.günlerde
Cetuximab Grubu	7	Cetuximab	0.1ml/ 5mg/kg	Subkonjunktival	1,4 ve 7.günlerde
Bevacizumab +Cetuximab Grubu	7	Bevacizumab + Cetuximab	0.1ml Cetuximab+ 0.05ml Bevacizumab	Subkonjunktival	1,4 ve 7.günlerde

Tablo.2: Çalışmada yer alan deney hayvanlarının gruplandırılması, verilen ilaçların sıklığı ve dozu.

3.2. Alkali Yanık Modelinin Oluşturulması ve Deney Prosedürü

Deneyde kullanılan ratların sağ gözleri uygulama kapsamına dahil edilip, sol gözler sham grubu olarak kullanıldı. Genel anestezi Ketamine HCl (60mg/kg) ve Xylazine HCl (5mg/kg) kombinasyonun intramusküler uygulanmasıyla sağlandı(129). Sağ gözlere, lokal anestezi sağlamak amacıyla Proparacaine HCl (%0.5, Alcon, Belgium) iki damla damlatıldı. Kurutma kağıdı ile lokal anestezi sağlanan gözlere 8sn süre ile gümüş nitrat(%75 gümüş nitrat,%25 potasyum nitrat) çubuğu kullanılarak kornealar sentralden yakılıp, alkali yanık modeli(128) oluşturuldu(Şekil.3). Ardından 30 ml serum fizyolojik ile irrigasyon yapıp, gözlerin yıkanması sağlandı.



Şekil.2: Deneysel korneal alkali yanık modelinde kullanılan ilaçlar ve gümüş nitrat çubukları.



Şekil.3: Deneysel korneal alkali yanık modelinin oluşturulması.

Daha sonra her grupta 7 rat olacak şekilde 4 ayrı grup oluşturuldu (Tablo.2). Birinci grupta yer alan ratlara alkali yanık oluşturulduktan sonra 1,4 ve 7.günlerde subkonjunktival(127) olarak 0.15ml serum fizyolojik verildi. İkinci grupta yer alan ratlara 1,4 ve 7. günlerde subkonjunktival olarak 0.05ml Bevacizumab (16ml/400mg, Avastin®,Basel) verildi. Üçüncü

grupta yer alan ratlara 0.1ml Cetuximab (100mg/20ml, Erbitux® ImClone Systems, Merck, Deutschland) verildi. Son olarak dördüncü grupta yer alan ratlara 1.4. ve 7. günlerde Bevacizumab (0.05ml) ve Cetuximab 0.1ml) kombinasyonu subkonjunktival olarak enjekte edildi.

3.3. Anjiyogenez Yoğunluğunun ve İnhibisyonun Saptanması

7.günün sonunda, ratlar sakrifiye edilmeden hemen önce genel anestezi uygulandı. Ardından lokal anesteziye alınan her sağ göz Fundus Flurocein Anjiyografi (FF450^{Plus} IR, Carl Zeiss Meditec AG, 07740 Jena, Germany) görüntüleme cihazı ile, Mahoney ve Waterbury (128)'nin izlediği yöntem esas alınarak korneal anjiyogenez skorlanıp (Tablo.3), inhibisyon yüzdesi belirlendi (Şekil.4). Değerlendirilen korneaların, aynı cihazın dijital kamerası yardımıyla fotoğrafları çekildi. Ayrıca Von Willebrand Faktör immunohistokimyasal boyama ile de VWF pozitif endotel hücrelerinin yer aldığı mikrovasküler damarlar da sayılarak anjiyogenez yoğunluğu tespit edildi. Bu işlemde immunohistokimyasal boyama yapıldıktan sonra, her korneal kesitte, anjiyogenezin yoğun olduğu 3 ayrı yer sayılıp ortalamalar elde edildikten sonra istatistiksel olarak değerlendirildi.

Skor	Oluşan Damarın Yoğunluğu
0	Anjiyogenez yok
1,5	Yanık alanına olan uzaklık oranı 1/4
2	Yanık alanına olan uzaklık oranı 3/4
3	Yanık alanına olan uzaklık oranı 1/2
4	Yanık alanına olan uzaklık oranı 2/3
4,5	Yanık alanına olan uzaklık oranı 3/4
6	Yanık alanına ulaştığında

Tablo.3: Deneysel korneal anjiyogenez modeli oluşturulduktan sonra, anjiyogenez skorlanması.

$$A:1 - \frac{B}{C} \times 100$$

A: % Anjiyogenez İnhibisyonu
B: İlaç Grubu Anjiyogenez Ort.Skoru
C: Kontrol Grubu Anjiyogenez Ort.Skoru

Şekil.4: Anjiyogenez inhibisyonunun hesaplanmasını gösteren formül(128).

3.4.Dokuların Alınması ve Parafine Gömme İşlemi için Doku Takibi

7.günün sonunda, yüksek doz ketalar anestezisi yardımıyla sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Deney kapsamında olan sağ gözlerin enükleasyonu yapıldıktan sonra tamponlanmış nötral formalin tespit solüsyonuna atılıp 12 saat kadar beklendi. Kornea disseksiyonu yapıldıktan sonra ek olarak 4 saat kadar tespit edilen kornealar, yıkama işlemi için 12 saat gece boyunca çeşme suyu altında bekletildi. Ardından sırasıyla, %30, %50, %70, %80, %90 ve %96'lık alkollerde 8 saat bekletilen dokular absolut alkol içerisinde 2X30 dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Saydamlaştırma ve alkolü dokudan uzaklaştırmak için 2X15 dakika ksilol kullanıldı. İnfiltrasyon için 58C° de ayarlanmış etüvde 2x1 saat parafin içinde bekletilen dokular daha sonra parafine gömülüp, bloklandı(130). Her bir parafin bloktan, tam otomatik, rotary mikrotom(Leica RM 2265,Germany) yardımıyla 4-6µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlere Hematoksilen-Eosin (H-E) ve VEGF,VWF immun boyamalar uygulandı.

3.5.Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilolde deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.Filtre edilmiş Harri's hematoksilen solüsyonunda yaklaşık olarak 8dk kadar bekletildi,
- 3.Kesitler 5 dakika akarsuda bekletilerek, Hematoksilen artıklarından arındırıldı.
- 4.Differensiyasyonu sağlamak için % 1 lik asit-alkol solusyonuna 1 kez batırılıp çıkarılan dokular tekrar çeşme suyundan geçirilerek yıkanmaları sağlandı.
- 5.Amonyaklı suda çekirdekler parlak mavi oluncaya kadar bekletildi.
- 6.10 dk. çeşme suyunda yıkandı ve %80'lik etil alkolde 1-2 dk. bekletildi.
- 7.Zıt boyama için eozin-floksin solusyonunda 2 dk. bekletildi.
- 8.Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entelan ile kapatıldı.

Histopatolojik incelemede, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibroblast aktivitesi, epitel ve kornea kalınlığına bakıldı(Tablo.3). Total kornea kalınlığı ve epitel kalınlığı Leica Q Win Image programı kullanılarak ölçüldü.

Skor	İnflamatuvar Hücre Yoğunluğu	Fibroblast Aktivitesi
0	Hücre yok	Yok
1	Az	Az
2	Orta	Orta
3	Yüksek	Yüksek

Tablo.4: İnflamatuvar hücre yoğunluğu ve fibroblast aktivitesinin skorlanması.

- 0:Herhangi bir inflamatuvar hücre varlığına rastlanmayan kesitler
1:Düşük düzeyde inflamatuvar hücre varlığına rastlanan kesitler
2: Bir ve üç arasındaki durumlar
3:Yüksek düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanan kesitler.

3.6. İmmunohistokimyasal Yöntem

3.6.1.VEGF İmmun Boyaması

4-6µm kalınlığında kesitler alındıktan sonra, bir gece 37C° etüvde bekletilen dokular, 58C° ye ayarlanmış etüve alınıp bir saat kadar bekletildi. Ardından 2X15 dakika ksilolden geçirildi. 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, antijen retrieval işlemi için önerilen EDTA solüsyonuna alındı. Mikrodalga içine alınan kesitler 3X5 dakika ışınladı. Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler, doğrudan oda sıcaklığında soğumaları için 20 dakika kadar bekletildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, kurulanıp, dokunun olduğu yer silikon kalem vasıtasıyla çevrenip, sınırlandı. İmmunohistokimya barına dizilen, kesitlerin üzerine 3X3dakika Phosphate Buffer Saline(PBS) damlatıldı. Bu sırada immunohistokimya barına nemliliği sağlamak için daha önceden hazırlanan sıcak su konuldu. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp üzerine Hidrojen peroksit blokaj solüsyonu(1ml %30 H₂O₂ + 9ml metanol) damlatılıp 10 dakika inkübe edildi. Ultra V Block (keçi, non-immun serum) solüsyonunda 10 dakikalık bekletmenin ardından yıkanmaksızın, VEGF primer antikoru (1:50, JH121 clone; Abcam) damlatılıp bir gece +4C° de inkübe edildi. Sonraki gün PBS solüsyonunda 3X3 yıkanan kesitler, sekonder antikoruyla 10 dakika inkübe edildi, streptavidin-peroxidase damlatılıp 10 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitlerin üzerine DAB damlatılıp 8-10 dakika kadar beklendi. PBS ile reaksiyon durdurulup Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler entelan ile kapatıldı. Nikon DS-2MV dijital kamera ile fotoğraflar çekildi. VEGF ekspresyonun değerlendirilmesi Tablo.5'te gösterildiği gibi yapıldı.

VEGF Ekspresyonu	Kornea Endoteli	Vasküler Endotel	Kornea Epiteli
+	Zayıf Ekspresyon	Zayıf Ekspresyon	Zayıf Ekspresyon
++	Zayıf-Kuvvetli Arası	Zayıf-Kuvvetli Arası	Zayıf-Kuvvetli Arası
+++	Kuvvetli Ekspresyon	Kuvvetli Ekspresyon	Kuvvetli Ekspresyon

Tablo.5: VEGF ekspresyonunun skorlanması

3.6.2. Von Willebrand Faktör(vWF) İmmun Boyaması

4-6µm kalınlığında seri kesitler elde edildikten sonra, bir gece 37C° etüvde bekletilen dokular, sonraki gün çıkarılıp, 58C° ye ayarlanmış etüve yerleştirilip bir saat kadar bekletildi. Ardından 2X15 dakika ksilolde tutuldu. 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, antijen retrieval işlemi için önerilen Sitrat Buffer (pH:6.0) solüsyonuna alındı. Bu solüsyon içinde mikrodalga fırın içine alınan kesitler 7+5 dakika ışınladı. Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler, doğrudan oda sıcaklığında soğumaları için 20 dakika kadar bekletildi. 2X5 dakika distile sudan geçirilen dokular, kurulanıp, dokunun olduğu yer silikon kalem(hidrofor) ile çevrelenip, sınırlandı. İmmunohistokimya barına dizilen, kesitlerin üzerine 3X2 dakika PBS damlatıldı. Bu sırada immunohistokimya barına nemliliği sağlamak için daha önceden hazırlanan sıcak su döküldü. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp üzerine hidrojen peroksit blokaj solüsyonu(1ml %30 H₂O₂ + 9ml metanol) damlatılıp 10 dakika inkübe edildi. 3X2 dakika PBS solüsyonunun ardından Ultra V Block (keçi, non-immun serum) solüsyonunda 10 dakikalık bekletmenin ardından yıkanmaksızın, primer antikor (tavşan anti-VWF, 1/800, ab6994, Abcam, USA) damlatılıp bir gece inkubasyon sağlandı. Daha sonra PBS solüsyonunda 3X3 dakika yıkanan kesitler, sekonder antikorla 10 dakika inkübe edildi. Ardından streptavidin-peroxidaz damlatılıp 10 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkandı. Kesitlerin üzerine DAB damlatılıp 10-12 dakika kadar reaksiyon izlendi. PBS ile reaksiyon durdurulup Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler entelan ile kapatılıp, değerlendirildi. Nikon DS-2MV dijital kamera ile fotoğraflar çekildi.

Stromada VWF immunreaktivitesi gösteren hücreler, mikrovasküler yapılar olarak değerlendirildi. Mikrovasküler yoğunluk açısından en yoğun üç bölge alınıp, bu bölgedeki kan damarları sayıldı.

3.7.İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler SPSS 15.0 paket programı yardımı ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmada öncelikli olarak Kruskal-Wallis testinden faydalanıldı. Anlamlılık bulunduktan sonra ikili karşılaştırmalarda, Mann-Whitney U testinden faydalanıldı. Kategorik verilerde bağımlılık testi olarak Pearson Ki-Kare testi kullanıldı. $P < 0,05$ olması durumunda anlamlı farklılığın olduğu, $P > 0,05$ olması durumunda ise anlamlı farklılığın olmadığı belirtilmiştir.

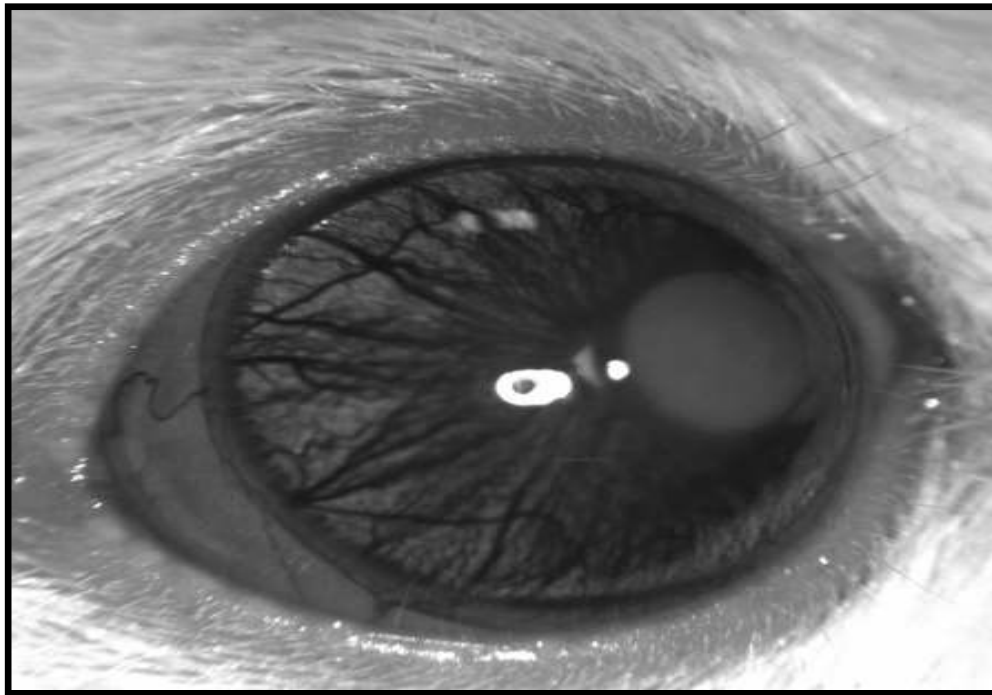
4.BULGULAR

4.1.Biomikroskopik Bulgular

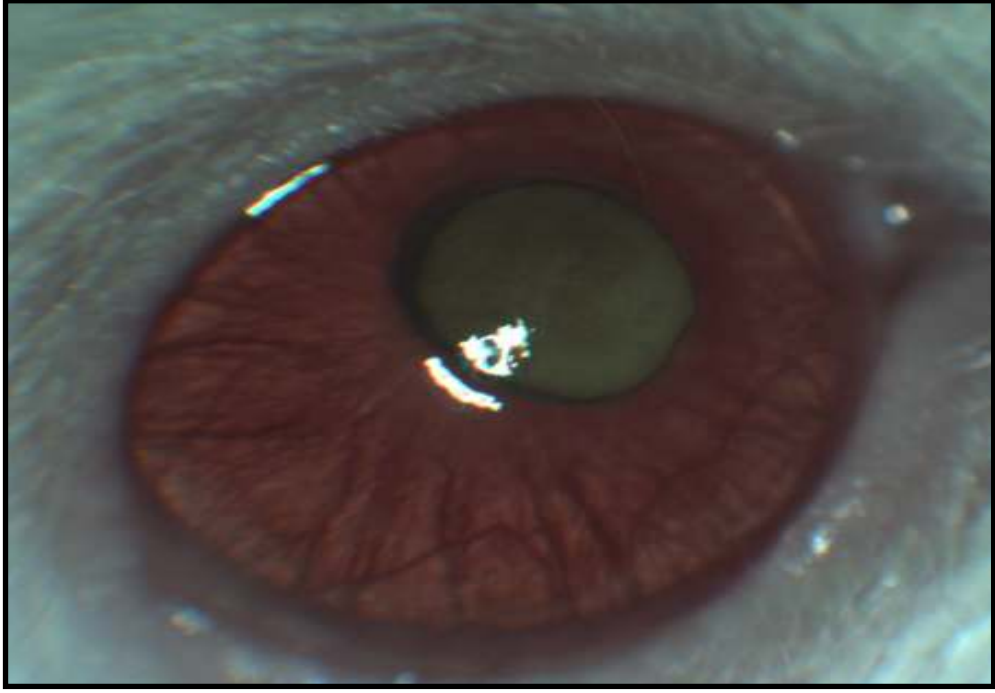
Genel anestezi altında, sakrifikasyon işleminin hemen öncesinde, her ratın koterize edilen sağ gözü, Fundus Flurocein Anjiyografi (FF450^{Plus} IR, Carl Zeiss Meditec AG,07740 Jena, Germany) cihazı ile incelendi. Mahoney ve Waterbury'nin(128) izlediği skarlama yöntemi(Tablo.3) esas alınarak, anjiyogenez yoğunluğu ve inhibisyonu değerlendirildi. Elde edilen görüntülerin aynı cihazın dijital kamerası yardımıyla fotoğrafları çekildi.

Kontrol grubundan elde edilen görüntülerde, limbustan kornea sentraline doğru çok sayıda kalın ve ince kan damarlarının varlığı dikkatleri çekmekteydi(Şekil.5-6).

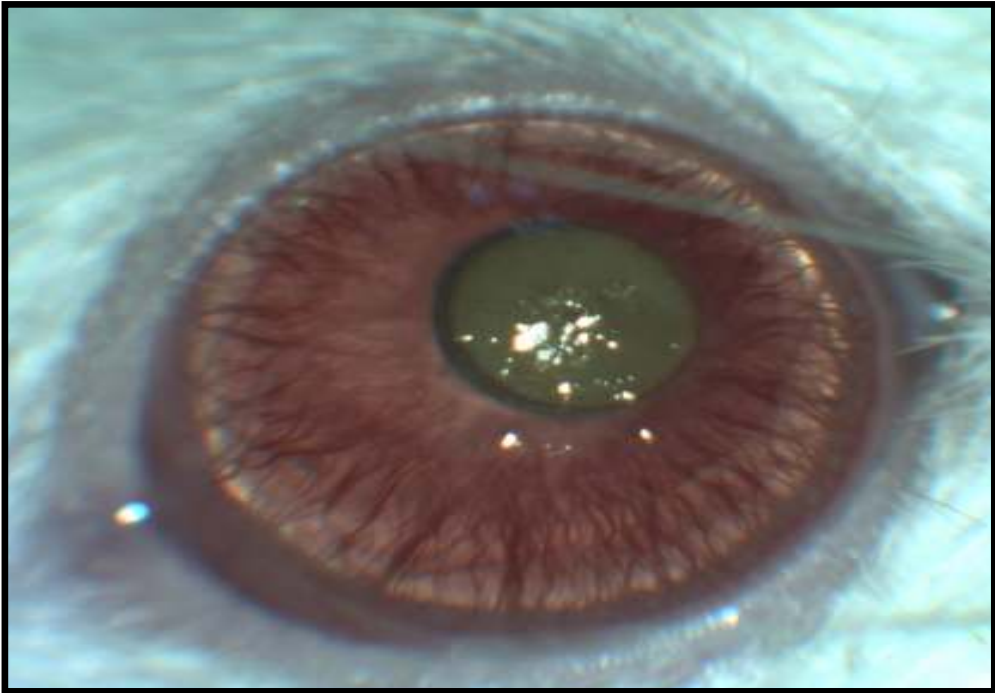
Bevacizumab verilen grubun anjiyogenez inhibisyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırılmasında önemli bir düşüşün olduğu izlendi. Anjiyogenezdeki bu inhibisyon %50.8 civarında iken(Şekil.7-8) Cetuximab verilen grubun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında anjiyogenezdeki inhibisyon %.54.3 olarak saptandı (Şekil.9-10). Bevacizumab+Cetuximab verilen grubun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında ise %15.8'lik düşük düzeyde inhibisyonun varlığı gözlemlendi (Şekil.11-12).



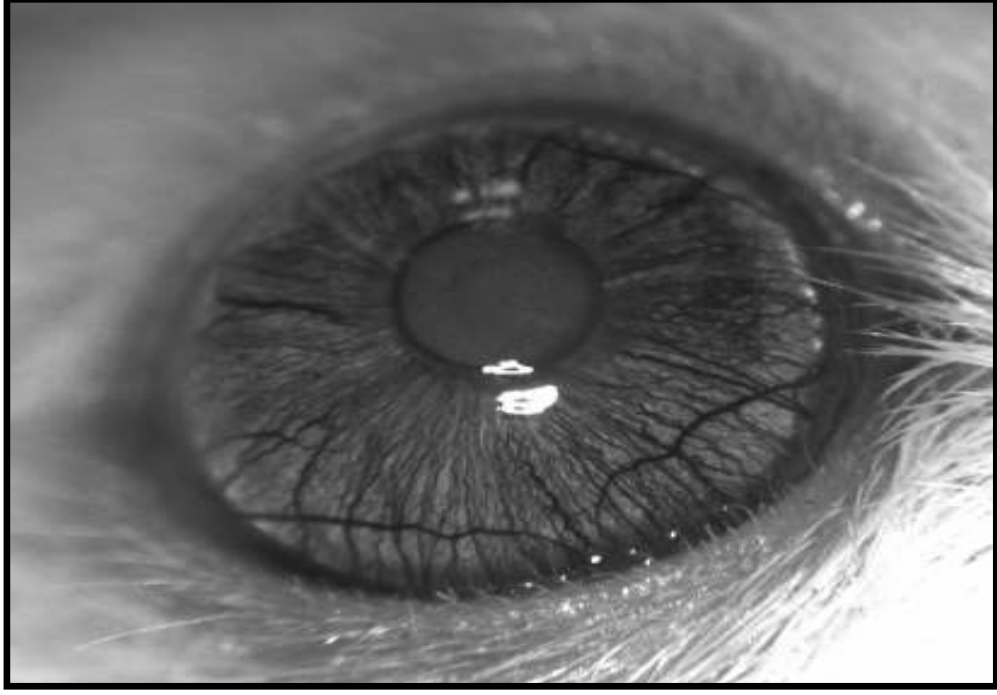
Şekil.5:Kontrol grubu; limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen ve yeni filizlenen çok sayıda büyük ve küçük kan damarı izlenmektedir (Orijinal büyütme X40).



Şekil.6: Kontrol grubu, limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen yeni filizlenen çok sayıda kan damarı izlenmektedir (Orijinal büyütme X40).



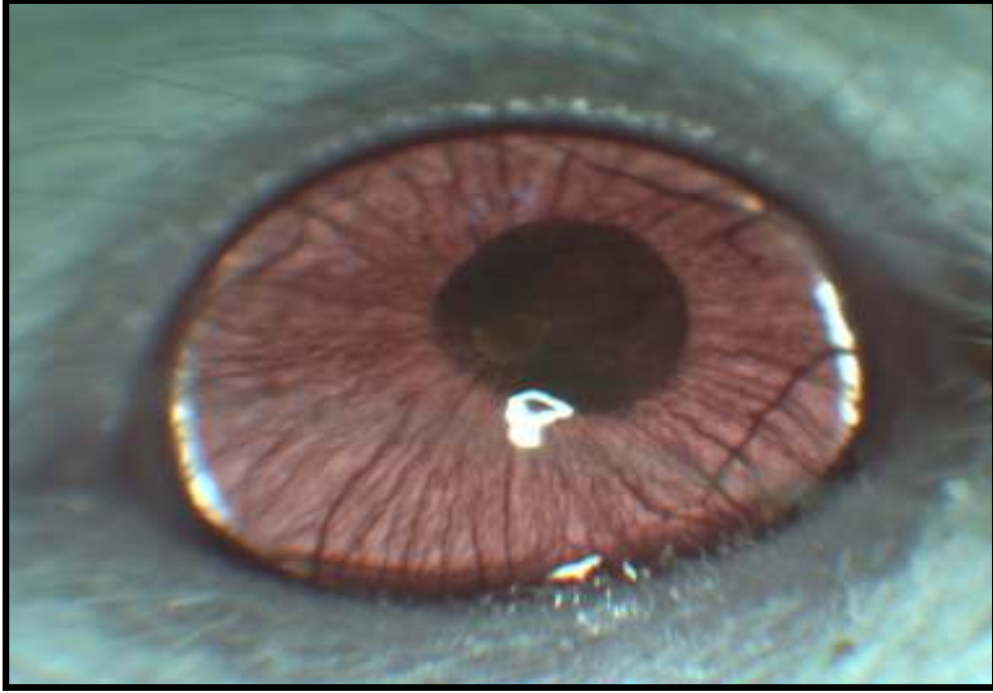
Şekil.7: Bevacizumab grubu, limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen az sayıda yeni filizlenen damarlar izlenmektedir (Orijinal büyütme X40).



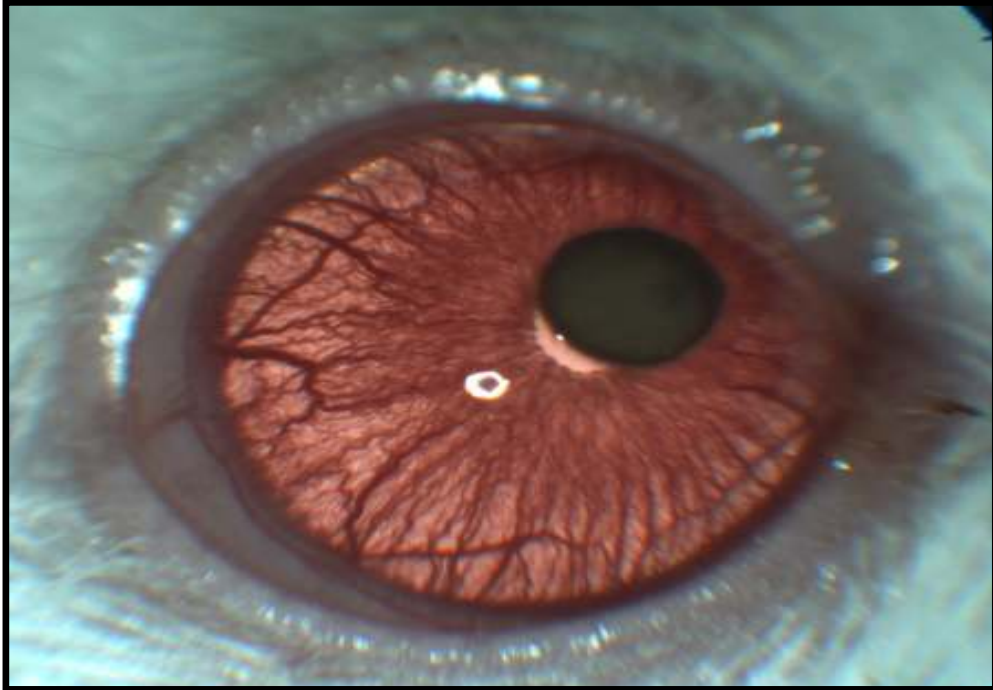
Şekil.8: Bevacizumab grubu, limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen yeni filizlenen damarlar izlenmektedir (Orijinal büyütme X40).



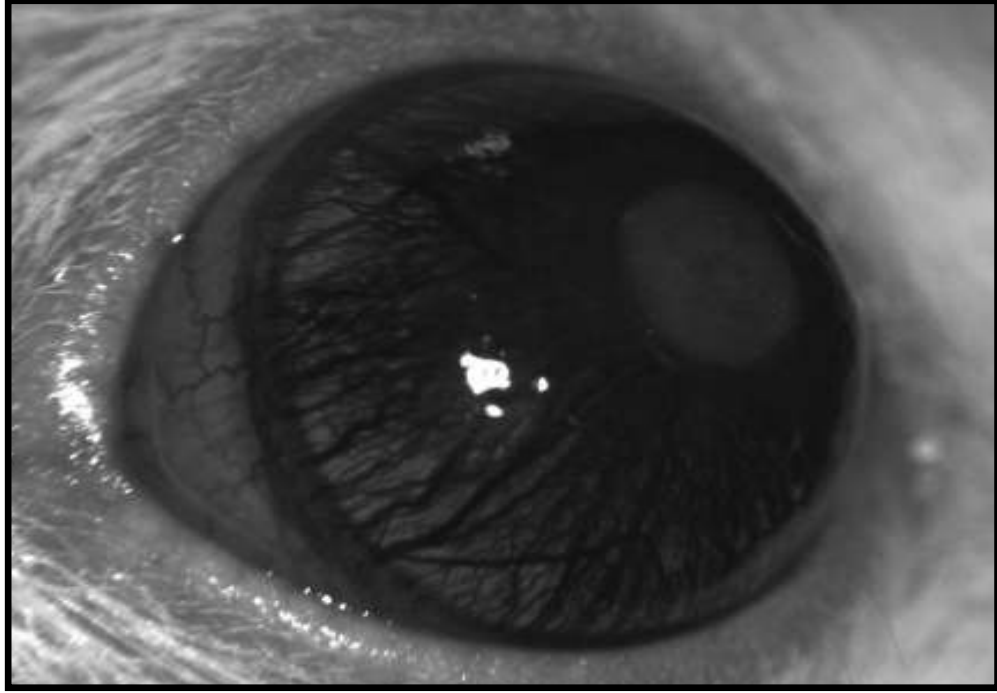
Şekil.9: Cetuximab grubu; limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen az sayıda yeni filizlenen kan damarları izlenmektedir (Orijinal büyütme X40)



Şekil.10: Cetuximab grubu, limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen yeni filizlenen az sayıda küçük kan damarları izlenmektedir (Orijinal büyütme X40)



Şekil.11:Bevacizumab+Cetuximab grubu, Limbustan başlayıp kornea merkezine doğru ilerleyen yeni filizlenen büyük kan damarları izlenmektedir (Orijinal büyütme X40)



Şekil.12:Bevacizumab+Cetuximab grubu, Limbustan başlayıp kornea merkezine (yanık merkezine) doğru ilerleyen yeni filizlenen çok sayıda büyük ve küçük kan damarları izlenmektedir (Orijinal büyütme X40)

4.2.Histopatolojik Bulgular

4.2.1.Morfometrik Bulgular

8.günün sonunda, ratlar yüksek doz ketalar anestezisi ile sakrifiye edildikten hemen sonra, deney kapsamında olan sağ gözlerin enükleasyonu yapıldı. Ardından kornealar çıkarılıp, rutin parafin doku takibine alındı. 4-6µm'lik kesitler alındıktan sonra H-E boyama yöntemi kullanılarak preparatlar hazırlandı. Kornea kalınlığı, epitel kalınlığı, fibroblast aktivitesi ve inflammatuar hücre infiltrasyonu yönünden incelenip, değerlendirildikten sonra görüntülendi.

a) İnflammatuar Hücre İnfiltrasyonu

İnflammatuar hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde, cetuximab grubunda, diğer gruplara göre daha az inflammatuar hücre varlığına rastlanmıştır (χ^2 : 14.072, p:0.029).

İnflamatuvar Hücre Yoğunluğu	Az n	(%)	Orta n:	(%)	Çok n:	(%)	K	p
Kontrol	0	0	4	57	3	42	14,073	0,029
Bevacizumab	2	28	4	57	1	14		
Cetuximab	5	71	2	28	0	0		
Bevacizumab+Cetuximab	0	0	3	50	3	50		

Tablo.6: Gruplar arası inflamatuvar hücre infiltrasyon oranının karşılaştırılması.

b) Fibroblast Aktivitesi

Fibroblast aktivitesi yönünden gruplar arası karşılaştırılma yapıldığında, bevacizumab ve cetuximab grubunda fibroblast aktivitesi düşük bulunmuştur. (χ^2 : 21,523, p:0.011).

Fibroblast Aktivitesi	Yok n	%	Az n	(%)	Orta n:	(%)	Çok n:	(%)	K	p
Kontrol	0	0	0	0	4	57	3	42	14,073	0,029
Bevacizumab	2	33.3	2	28	4	57	1	14		
Cetuximab	4	66.7	5	71	2	28	0	0		
Bevacizumab +Cetuximab	0		0	0	3	50	3	50		

Tablo.7: Gruplar arası fibroblast aktivitesinin karşılaştırılması.

c)Kornea Epitel Kalınlığı

Kornea epitelinin toplam kalınlığının her gruptaki ortalaması Tablo.8’te gösterilmiştir. Korneal epitel kalınlığının gruplararası karşılaştırmasında, sham grubuna göre bütün gruplarda kornea kalınlığı azalmıştır. Özellikle cetuximab verilen grubun kornea kalınlığı sham grubuna en yakın değerde bulunmuştur.

Kornea Epitel Kalınlığı (µm)	Sham	Kontrol	Bevacizumab	Cetuximab	Bevacizumab + Cetuximab
	26,16(±29,02)	21,70(±4,84)	19,97(±5,16)	26,72(±5,15)	16,70(±2.63)

Tablo.8 Grupların kornea epitel kalınlıklarının ortalama değeri.

Kornea Epitel Kalınlığı	Bevacizumab	Cetuximab	Bevacizumab + Cetuximab	Sham
Kontrol	0,423	0,15	0,037	0,055
Bevacizumab		0,037	0,337	0,037
Cetuximab			0,01	0,522
Bevacizumab +Cetuximab				0,004

Tablo.9.Kornea epitel kalınlığı açısından gruplar arası karşılaştırma ve p değerleri.

d)Kornea Total Kalınlığı

Kornea kalınlığı için yapılan ölçümler sonunda her gruba ait ortalama kalınlık değerleri Tablo.10’da gösterilmiştir. Total kornea kalınlığının gruplar arası karşılaştırmasında sham grubuna göre bütün gruplarda artış söz konusuydu. Özellikle hiçbir ilaç uygulanmayan kontrol grubu ortalaması diğer gruplardan daha yüksek bulundu. Gruplar arası karşılaştırmada p değerleri Tablo.11’de gösterilmiştir.

Kornea Kalınlığı (µm)	Sham	Kontrol	Bevacizumab	Cetuximab	Bevacizumab + Cetuximab
	139,94(±7,02)	282,07(±61,47)	231,06(±55,68)	272,83(±48,89)	277,06(±29,97)

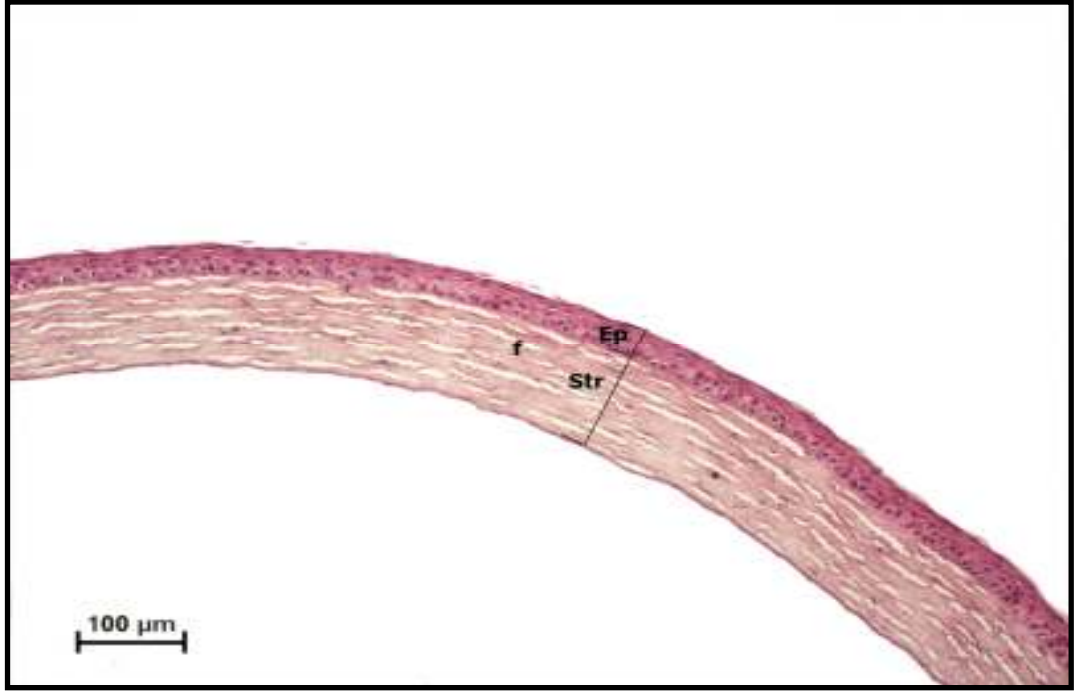
Tablo.10:Grupların total korneal kalınlık ortalama değerleri

Kornea Kalınlığı	Bevacizumab	Cetuximab	Bevacizumab + Cetuximab	Sham
Kontrol	0,078	0,423	0,631	0,004
Bevacizumab		0,037	0,055	0,004
Cetuximab			0,631	0,004
Bevacizumab +Cetuximab				0,004

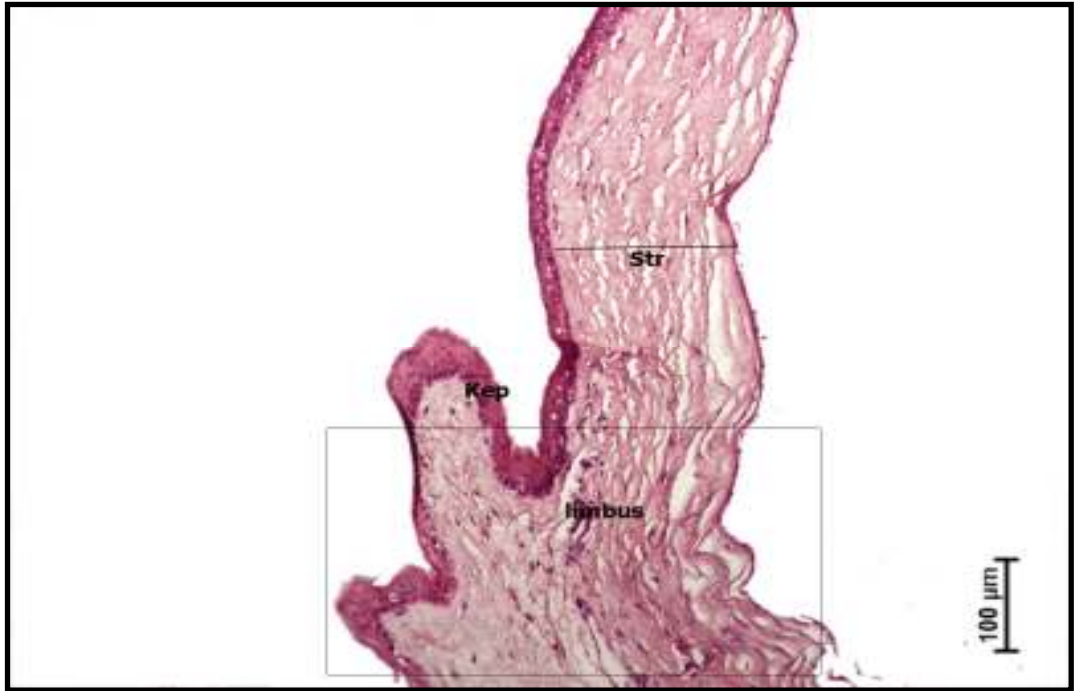
Tablo.11: Kornea kalınlığı açısından gruplar arası karşılaştırma ve p değerleri.

4.2.1.2.Mikroskopik Bulgular

Sham grubu olarak değerlendirilen sol gözlerden elde edilen korneal doku kesitlerinin histopatolojik incelenmesinde, bu dokuya ait normal histolojik yapı dışında herhangi bir bulguya rastlanmadı. Limbus kornea, kornea epiteli, korneal stroma, keratositler ve korneal endotel normal yapıda izlendi. Kısacası korneal avasküler yapının mevcut özellikleri korunmuş gözlemlendi(Şekil.13-14)

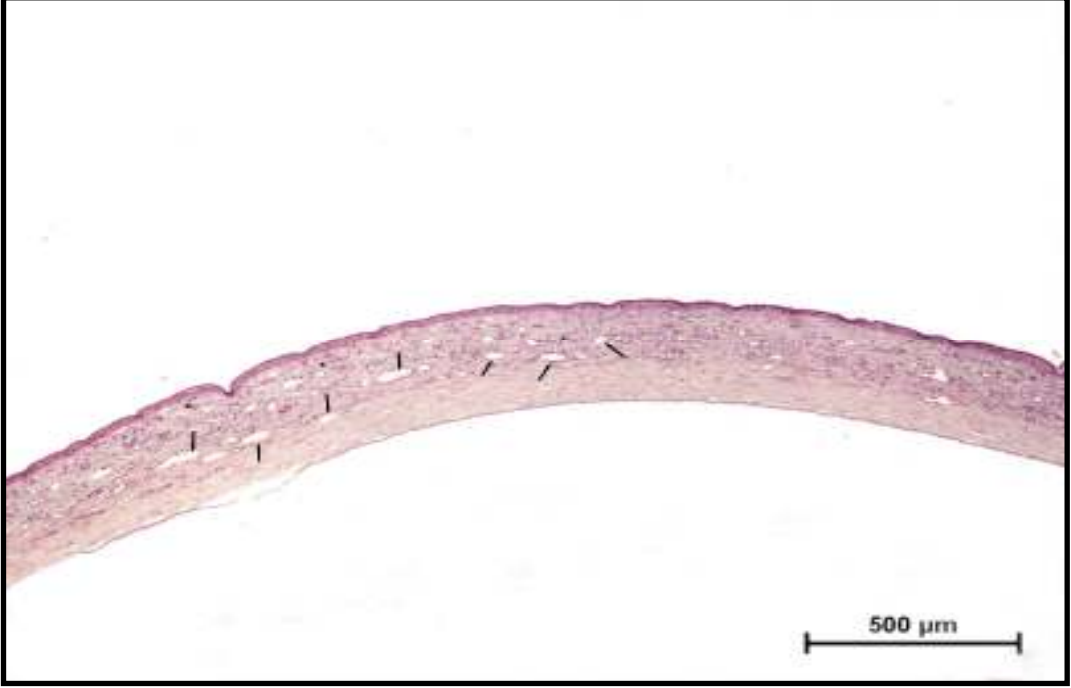


Şekil.13:Sham Grubuna ait kornea kesitinde, epitel(Ep),stroma(Str), fibroblast hücreleri(f) gözleniyor. H-E Bar:100μm

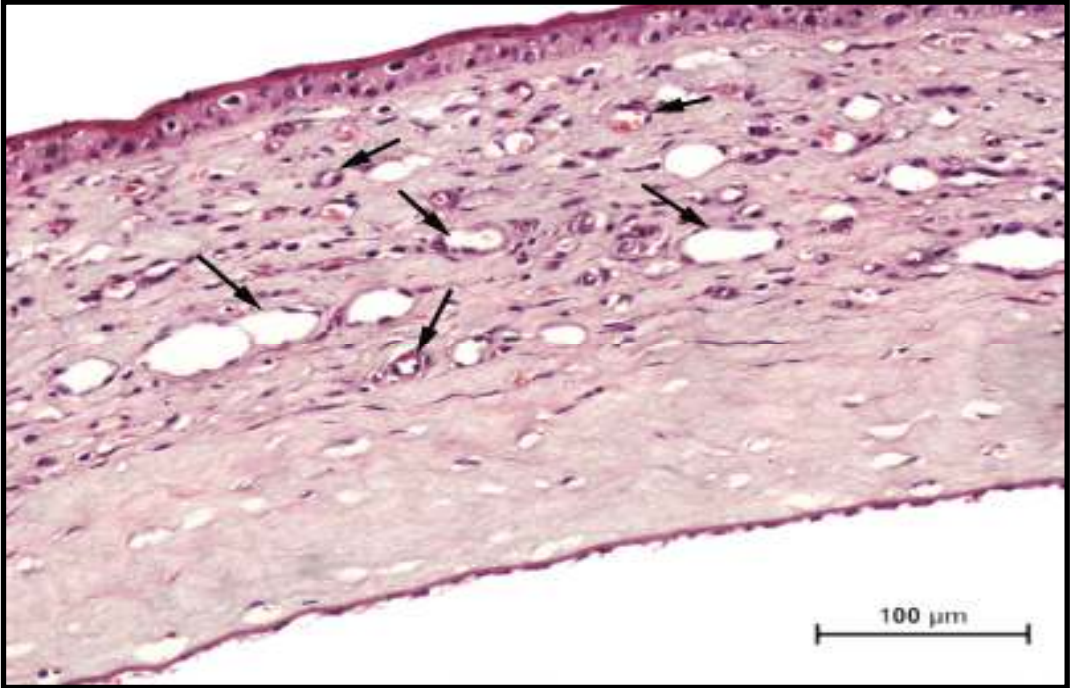


Şekil.14:Sham grubuna ait limbus bölgesinin normal histolojik görünümünde; konjunktival epitel (Kep) ve stroma(Str) izlenmektedir. H-E, Bar: 100μm

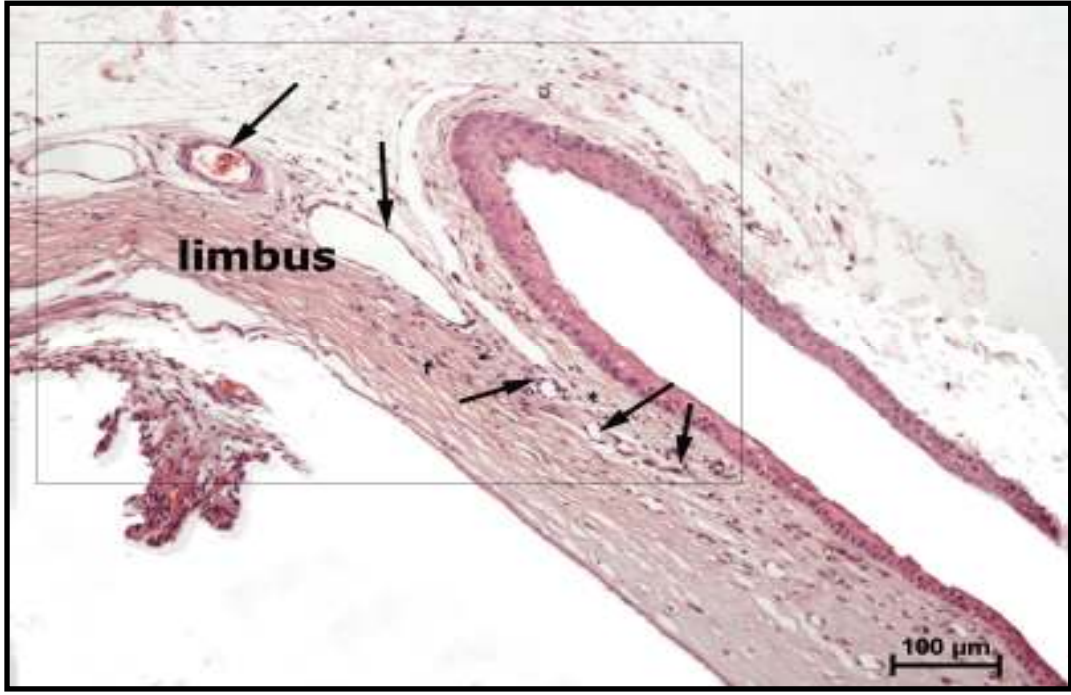
Kontrol grubu kesitleri incelendiğinde, stromada çok sayıda oluşmuş kan damarının varlığı dikkat çekmekteydi(Şekil.15-17)



Şekil.15: Kontrol grubunun sentral kornea kesitinde, çok sayıda kan damarı(ok) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu(*) izlenmektedir. H-E Bar: 500µm



Şekil.16: Kontrol grubuna ait stromanın büyük büyütme ile sentral kısımlarında daha fazla olmak üzere izlenen çok sayıda kan damarının varlığı(ok) dikkati çekmektedir. H-E. Bar: 100µm

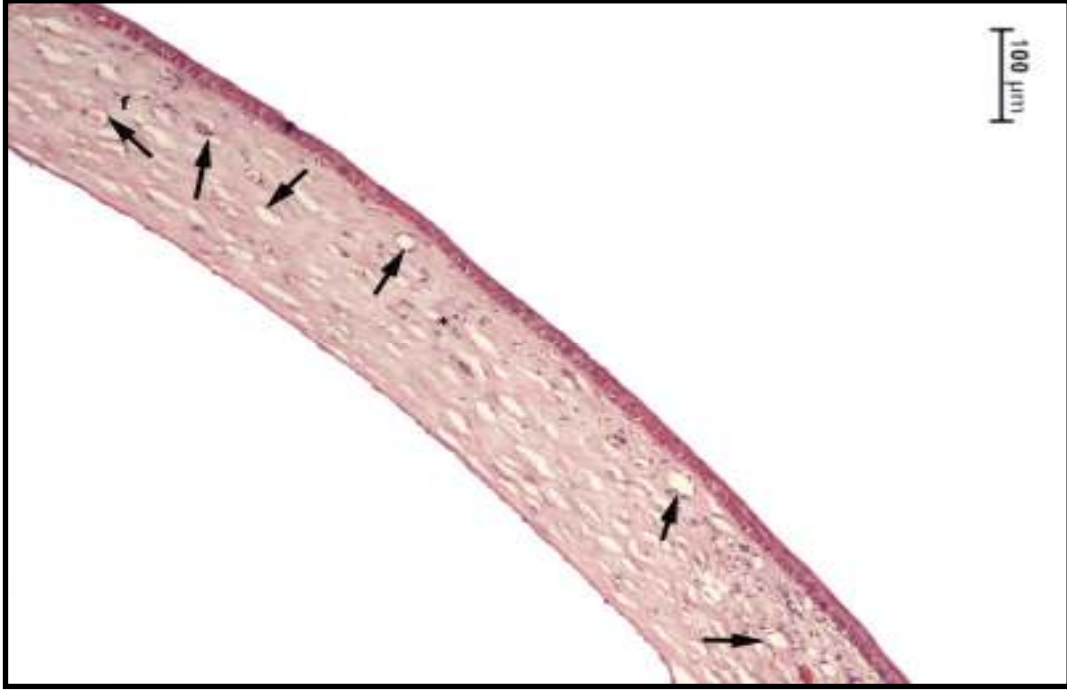


Şekil.17: Kontrol Grubu, bir diğer kesitinde limbus içerisinden başlayıp stromanın içine doğru penetre olan çok sayıda kan damarı(ok),fibroblast hücreleri(f) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu(*) izlenmektedir, H-E. Bar: 100µm

Bevacizumab grubunun korneal kesitleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, stromadaki kan damarlarında dolayısıyla da anjiyogenez inhibisyonundaki düşüş anlamlıydı(p:0.018). VEGF ekspresyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, korneal endotelde, stromada ve vasküler endotel hücrelerinde bir azalma söz konusuydu (Tablo.12). Korneal anjiyogenezin inhibisyonu açısından bevacizumab grubunun, cetuximab grubu ile karşılaştırılmasında (Şekil.18-19), istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0.701)

Cetuximab grubu, kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, anjiyogenezdeki düşüş anlamlı olarak izlendi(p:0.018).

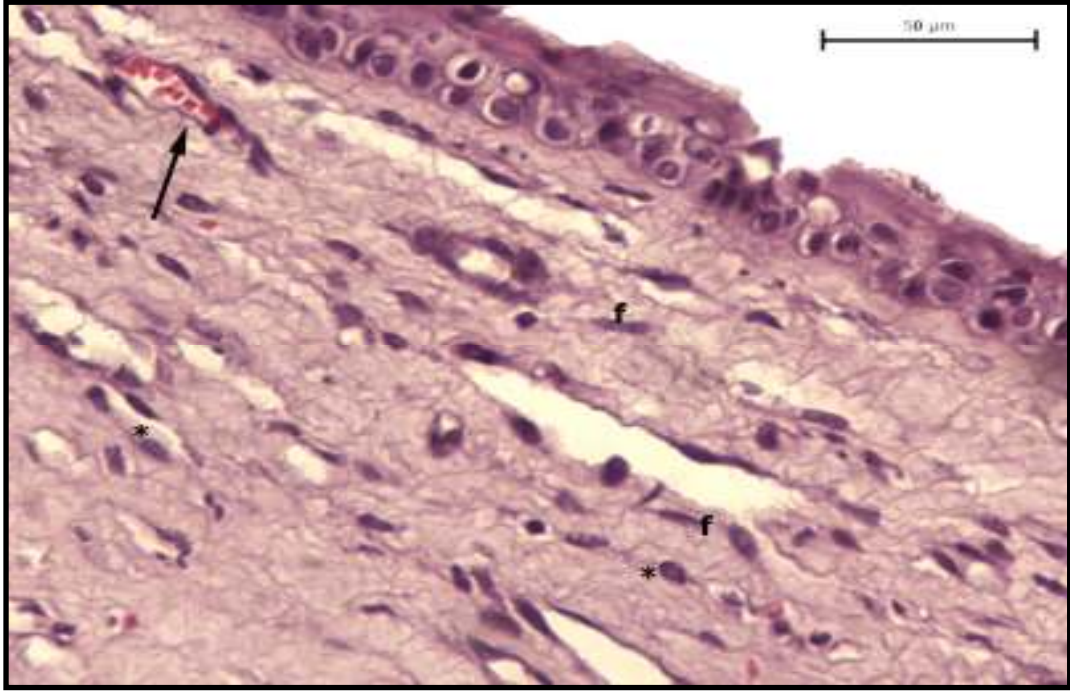
Bevacizumab+cetuximab grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasında (Tablo.12) anjiyogenezdeki inhibisyonun düşük olması istatistiksel olarak anlamlı değildi(p:0.314).



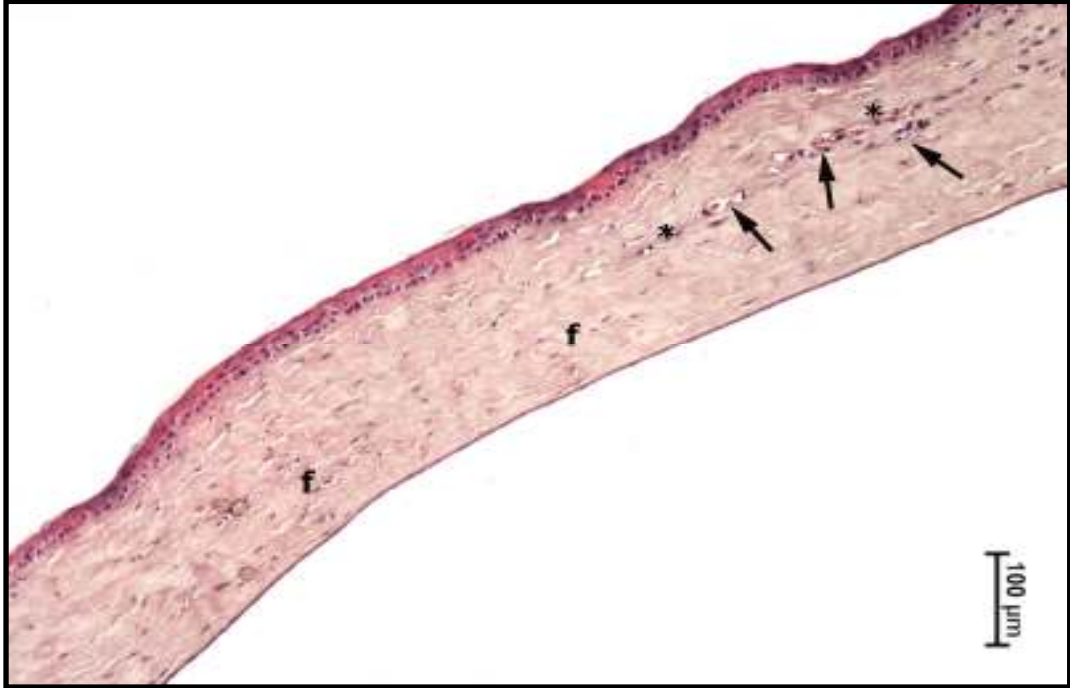
Şekil.18:Bevacizumab grubuna ait kornea kesitlerinde, stromanın daha çok yüzeysel kısımlarında kan damarları(ok) ve fibroblast hücreleri(f) izlenmektedir. H-E Bar: 100μm



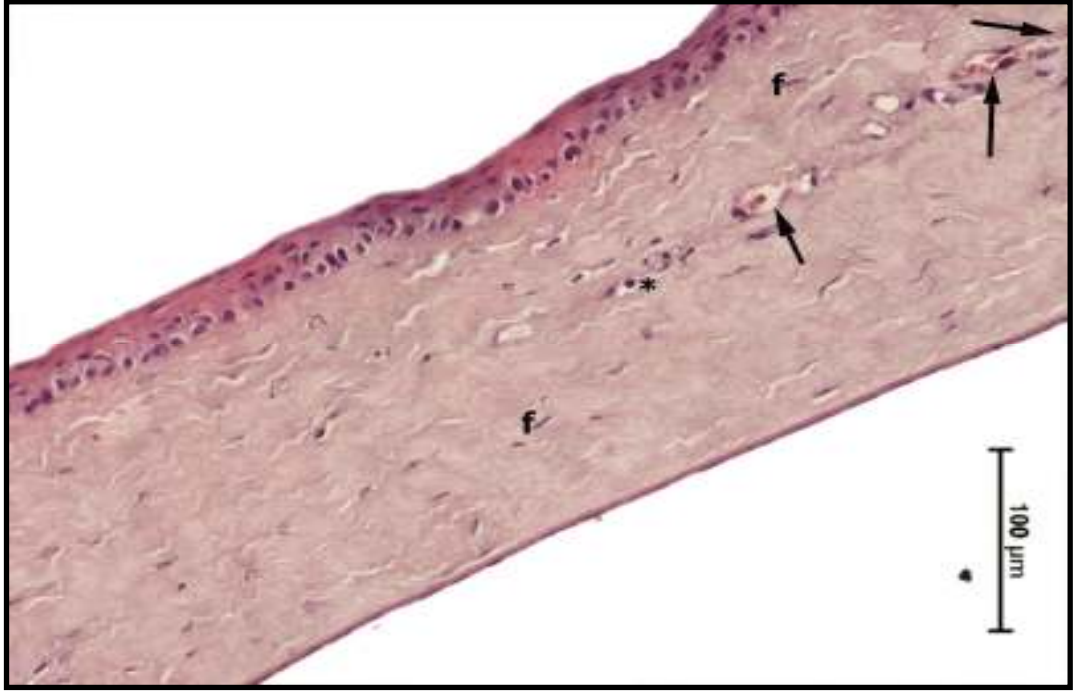
Şekil.19:Bevacizumab grubuna ait, kornea kesitlerinde, daha büyük büyütmede, stromanın daha çok yüzeysel kısımlarında olmak üzere kan damarları (ok) ve fibroblast hücreleri(f) izlenmektedir, H-E,Bar: 100μm



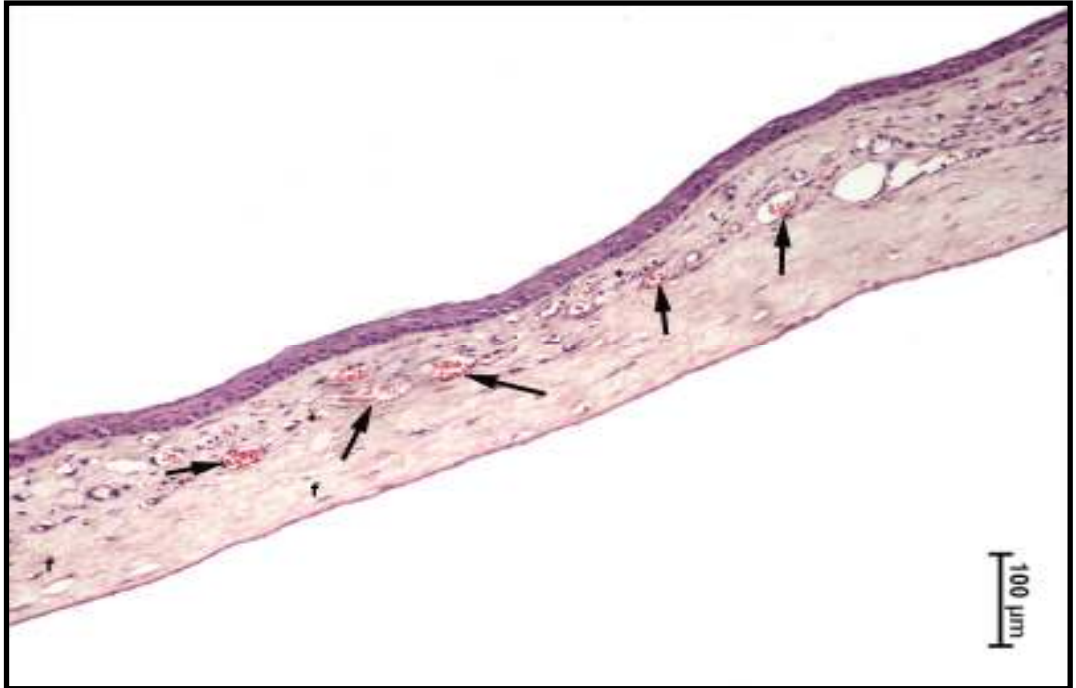
Şekil.20:Bevacizumab grubuna ait bir diğer kornea kesitinde, daha büyük büyütmede, stromanın daha çok yüzeysel kısımlarında olmak üzere kan damarları (ok), fibroblast hücreleri(f) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (*) izlenmektedir. H-E Bar: 50µm



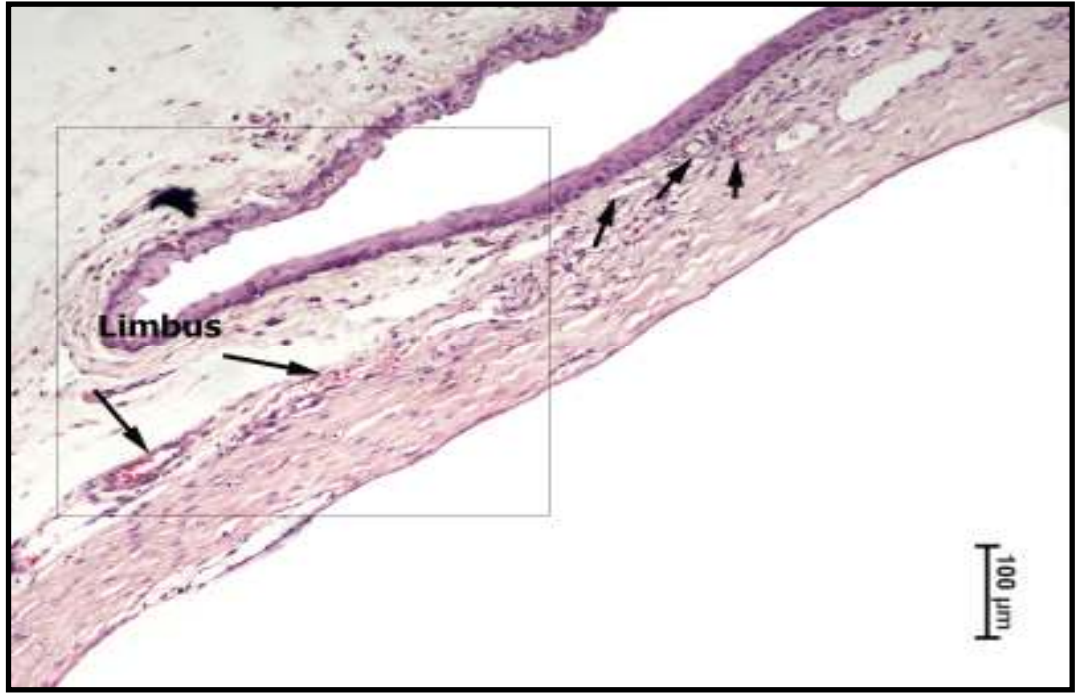
Şekil.21:Cetuximab grubu; Kornea sentralinde birkaç tane kan damarı(ok), fibroblast hücreleri(f) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu(*) izlenmektedir, H-E. Bar: 100µm



Şekil.22:Cetuximab grubuna ait kornea kesitinde, kornea sentralinde büyük büyütmede az sayıda içi eritrositlerle dolu kan damarı(ok), fibroblast hücreleri(f) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu(*) izlenmektedir, H-E Bar: 100µm



Şekil.23:Bevacizumab+Cetuximab grubuna ait bir kesitte korneal stroma sentralinde ve yüzeyel alanında çok sayıda içi eritrositlerle dolu kan damarı (ok), fibroblast hücreleri(f) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu(*) izlenmektedir. H-E Bar: 100µm



Şekil.24:Bevacizumab+Cetuximab grubuna ait limbus bölgesinden alınan bir kesitte limbal bölgeden, korneal stroma içine doğru geçen yeni oluşan kan damarları(ok), izlenmektedir. H-E Bar: 100μm

4.3.İmmunohistokimyasal Değerlendirme VEGF ve VWF ekspresyonu

İmmunohistokimyasal değerlendirme için VEGF ve VWF immunohistokimyasal boyama yöntemleri kullanıldı. Elde edilen preparat örnekleri, damar oluşumu (vWF immunpozitif endotel hücrelerinin sayımı) VEGF ekspresyonunun korneal endotelde, korneal stroma ve vasküler endotel hücrelerindeki ekspresyonları değerlendirilmiştir(Tablo12,13). (Şekil.25-36)

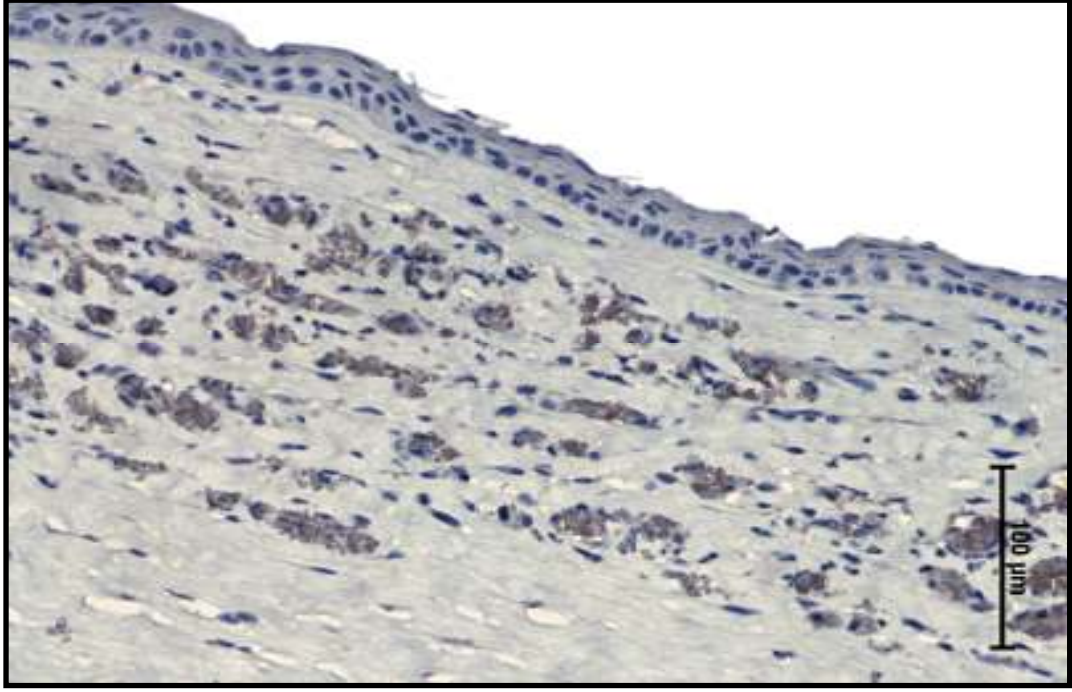
Mikrovasküler yoğunluk	Bevacizumab	Cetuximab	Bevacizumab + Cetuximab
Kontrol	0,018	0,018	0,314
Bevacizumab		0,701	0,008
Cetuximab			0,015

Tablo.12: Korneal anjiyogenez(mikrovasküler) yoğunluğun gruplararası karşılaştırılması ve p değerleri.

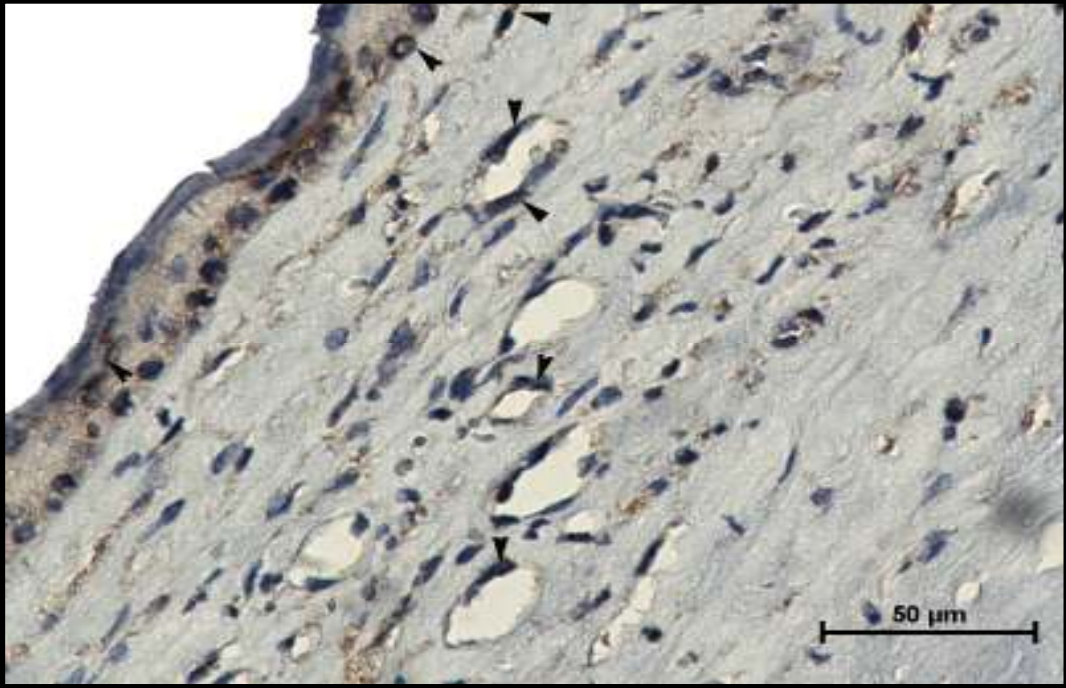
Grup ve Rat	Korneal Endotelde	Vasküler Endotelde	Korneal Epitelde
Kontrol-1	++	+	+
Kontrol-2	++	+	++
Kontrol-3	+	+	++
Kontrol-4	++	++	+
Kontrol-5	+	++	+
Kontrol-6	++	++	++
Kontrol-7	+++	+	++
Bevacizumab-1	+	+	+
Bevacizumab-2	++	+	+
Bevacizumab-3	+	+	+
Bevacizumab-4	+	+	+
Bevacizumab-5	++	+	+
Bevacizumab-6	+	+	++
Bevacizumab-7	+	++	+
Cetuximab-1	+	++	+
Cetuximab-2	+	++	++
Cetuximab-3	++	+	++
Cetuximab-4	+	+	+
Cetuximab-5	++	++	++
Cetuximab-6	+	+	+
Cetuximab-7	+	++	+
Bevacizumab+ Cetuximab-1	++	++	+
Bevacizumab+ Cetuximab-2	+	+	++
Bevacizumab+ Cetuximab-3	++	++	++
Bevacizumab+ Cetuximab-4	+++	++	+++
Bevacizumab+ Cetuximab-5	+	++	+
Bevacizumab+ Cetuximab-6	++	++	++
Bevacizumab+ Cetuximab-7	++	+	++

Tablo.13: VEGF ekspresyon düzeyi.

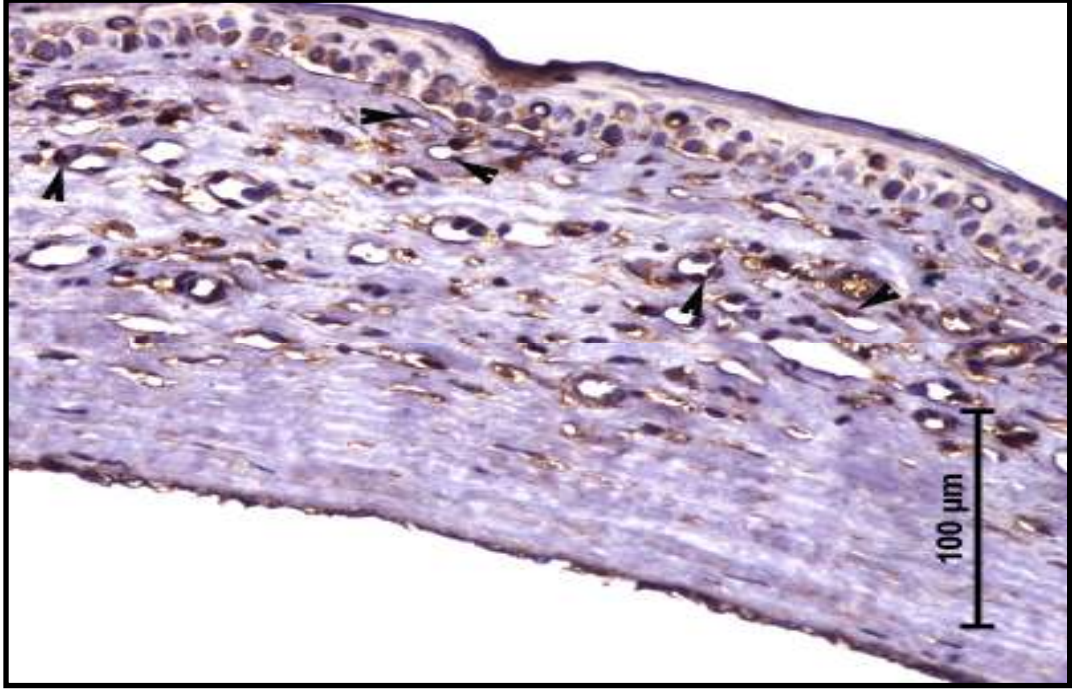
+ Hafif ekspresyon, ++ Orta şiddette ekspresyon, +++ Kuvvetli ekspresyon



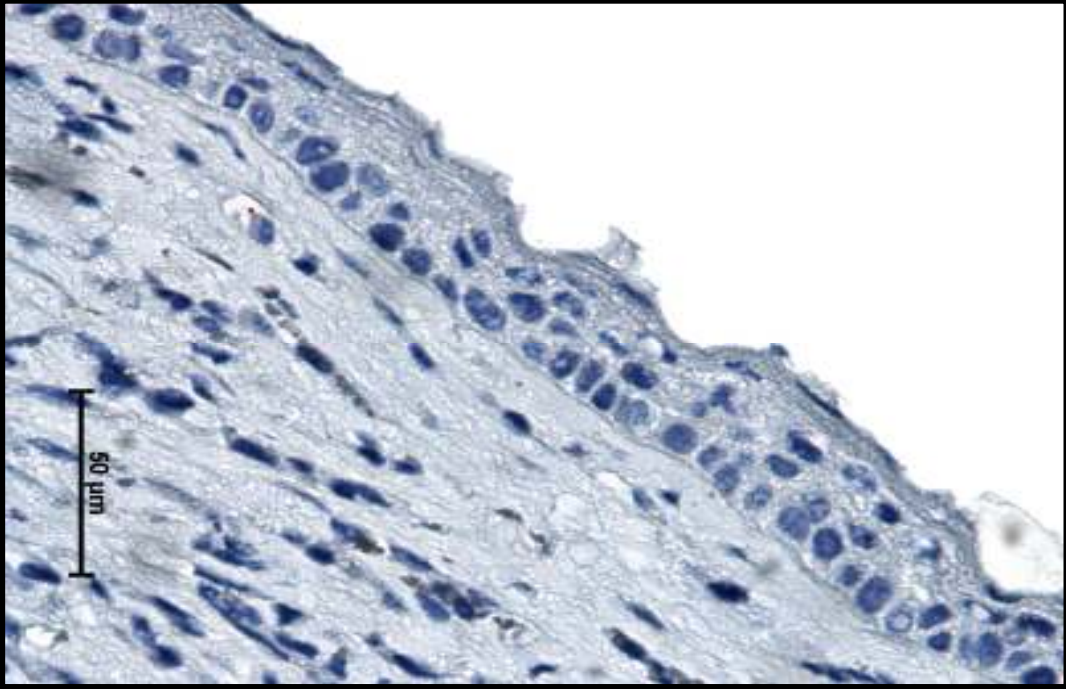
Şekil.25: Kontrol grubuna ait VEGF immün boyaması için negatif kontrol kesiti.
Bar: 100μm



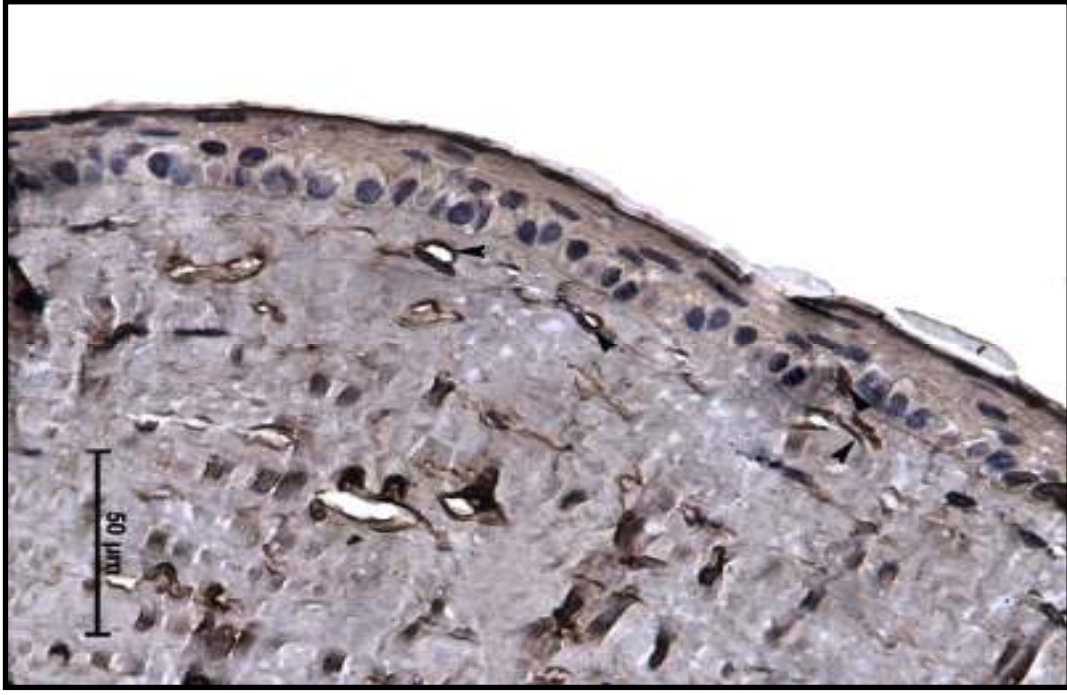
Şekil.26: Kontrol grubuna ait kornea kesitinde, VEGF ile (+) boyanan, VEGF(+) keratositler, stroma ve vasküler endotel hücreleri(ok başı) izlenmektedir. İndirekt immünoperoksidaz. Bar: 50μm



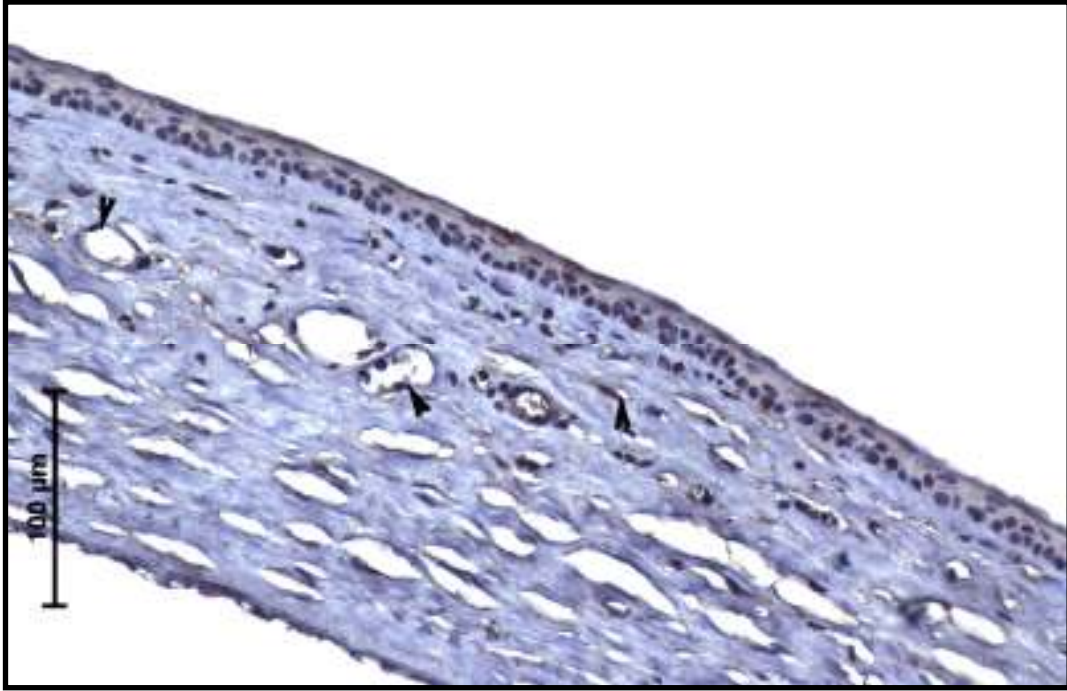
Şekil.27: Kontrol grubuna ait kornea kesitinde,VWF ile (+) boyanan vasküler endotel hücreleri(ok başı) gözleniyor. İndirekt immunoperoksidaz. Bar: 100µm



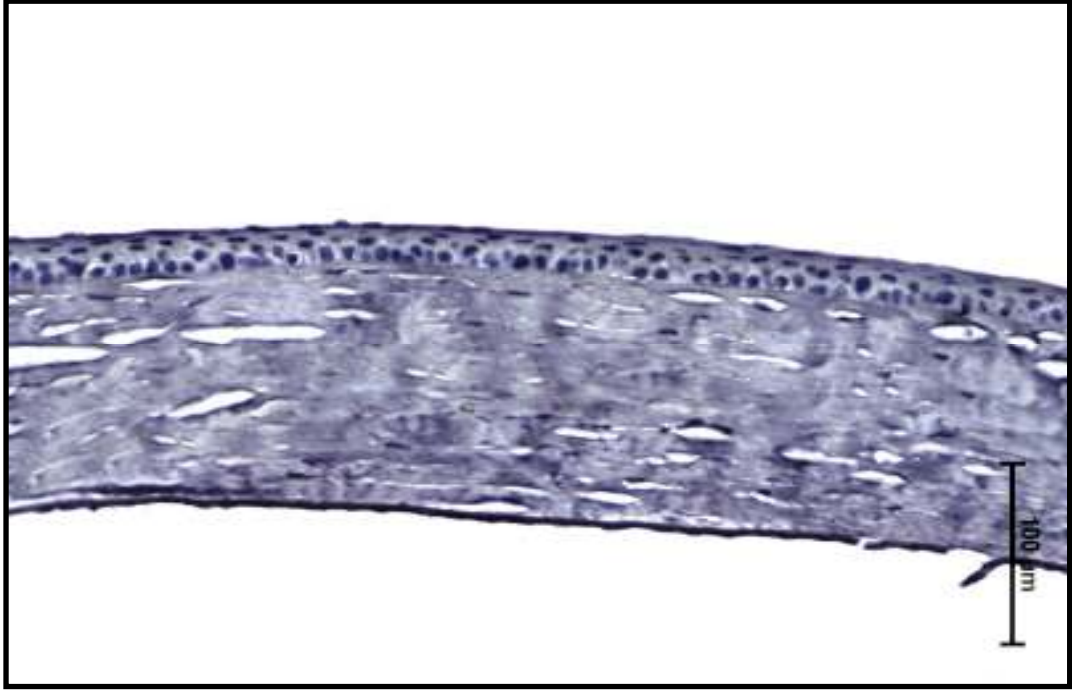
Şekil.28:Bevacizumab grubuna ait VEGF negatif kontrol kesiti. Bar: 50µm



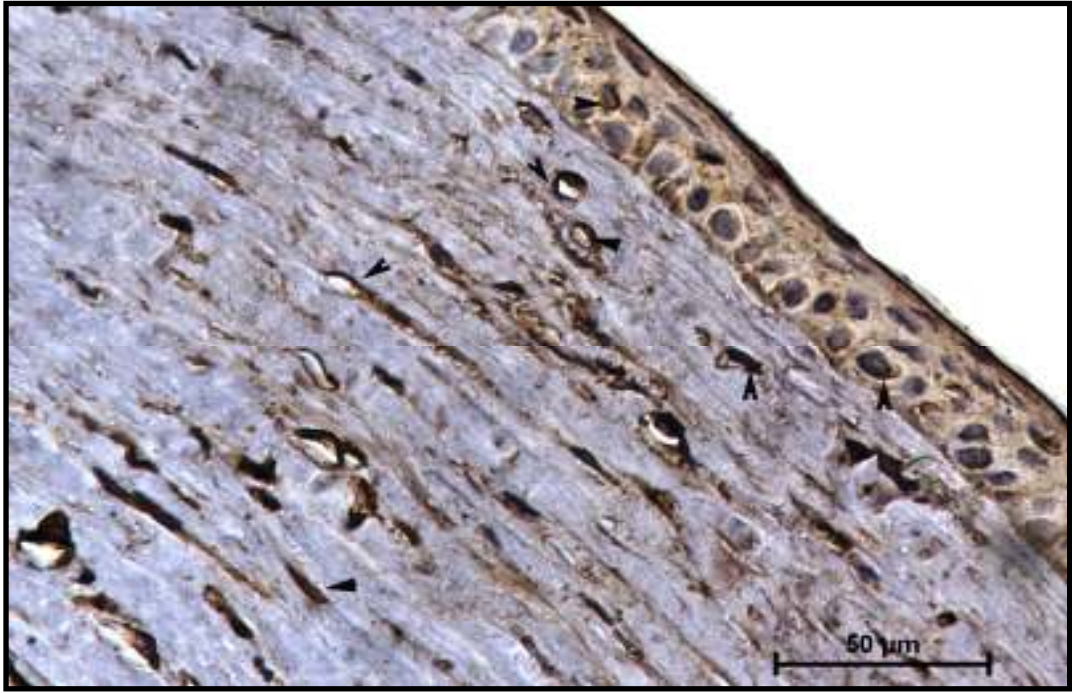
Şekil.29: Bevacizumab grubuna ait kornea kesitinde VEGF ile (+) boyanan vasküler endotel hücreleri, epitel hücreleri, fibroblast hücreleri (ok başı) izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz. Bar: 50µm



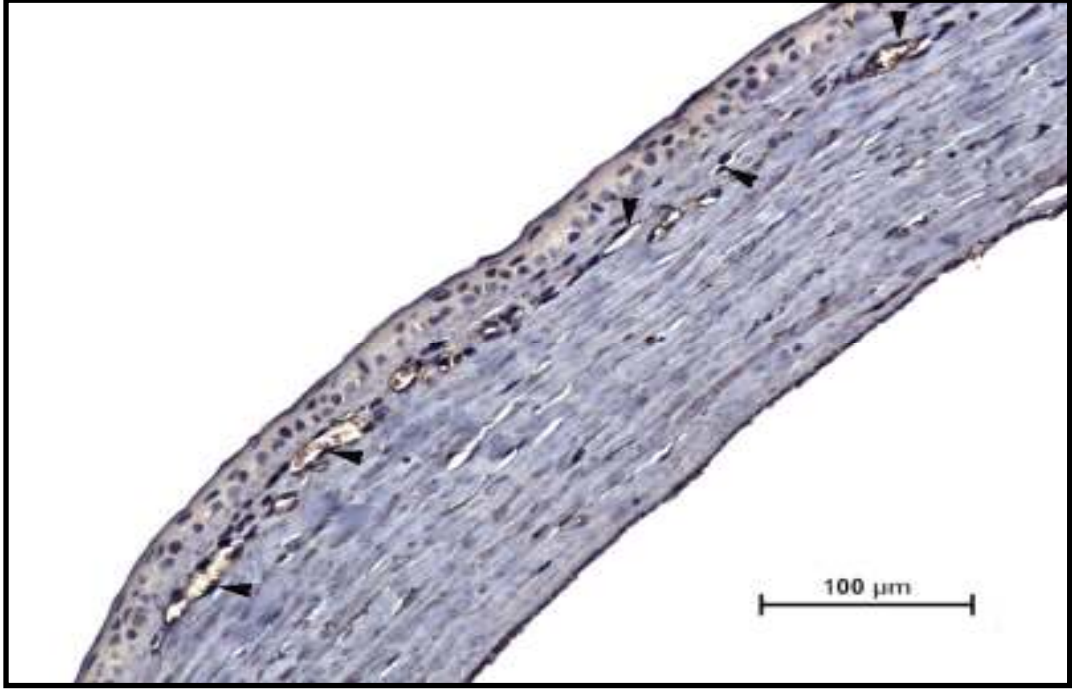
Şekil.30: Bevacizumab grubuna ait kornea kesitinde, VWF ile (+) boyanan vasküler endotel hücreleri (ok başı) izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz. Bar: 100µm



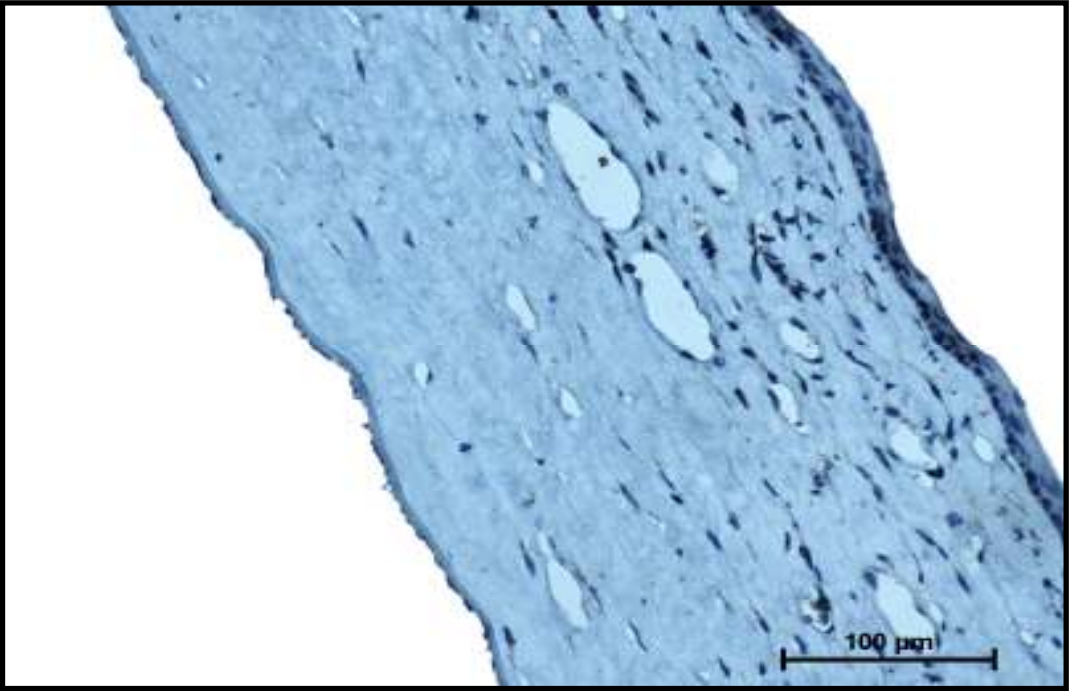
Şekil.31: Cetuximab grubuna ait VEGF immun boyama yapılmış negatif kontrol kesiti. Bar: 100µm



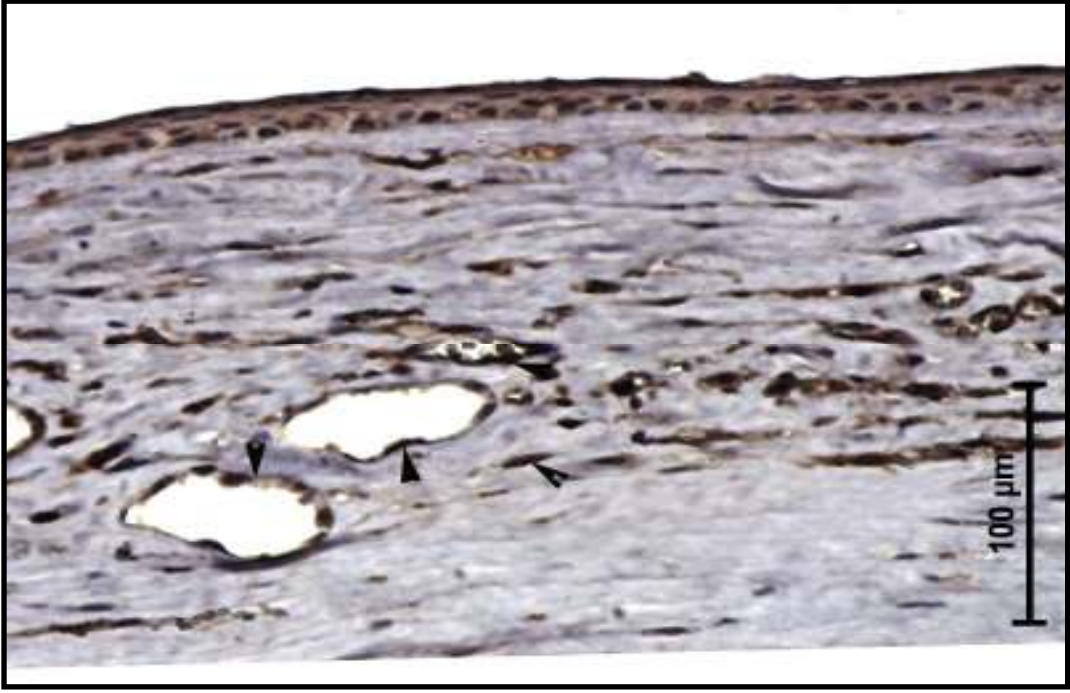
Şekil.32: Cetuximab grubuna ait kornea kesitinde VEGF ile (+) boyanan keratositler, korneal stroma ve vasküler endotel hücreleri(ok başı) izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz. Bar: 50µm



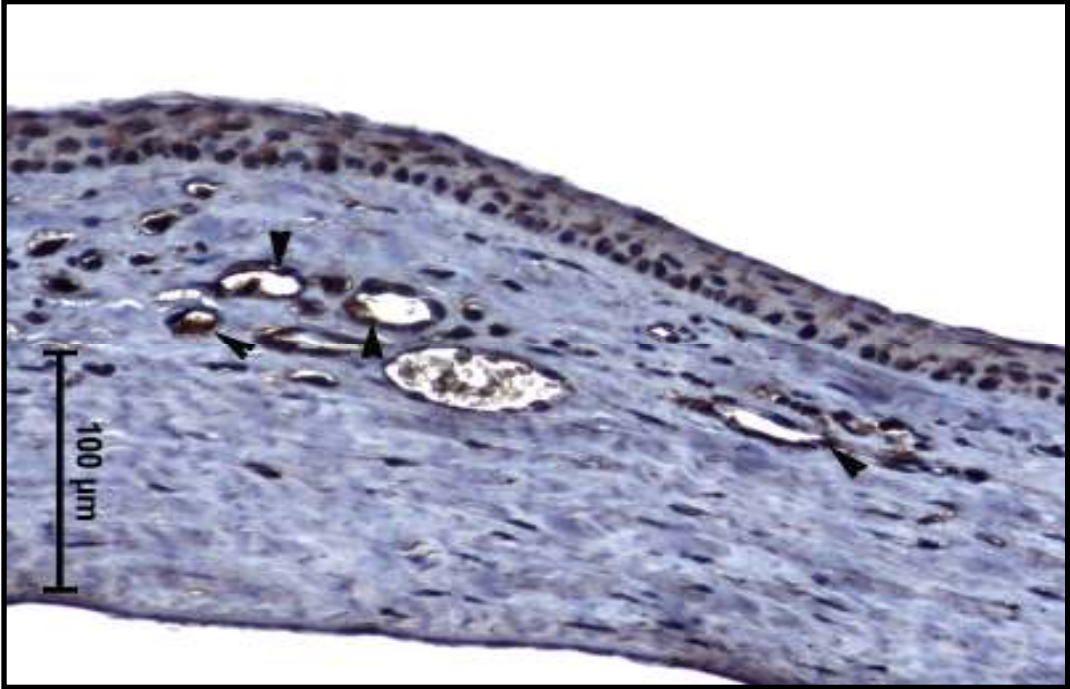
Şekil.33: Cetuximab grubu kornea kesitinde, VWF ile (+) boyanan vasküler endotel hücreleri(ok başı) izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidad. Bar: 100μm



Şekil.34:Bevacizumab+Cetuximab grubuna ait kornea negatif kontrol kesiti; Bar: 100μm



Şekil.35: Bevacizumab+Cetuximab grubuna ait kornea kesitinde VEGF immun işaretlenmesi, daha çok vasküler endotel hücrelerinde ve keratositlerde izlenen immunpozitivite (ok başı) izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz. Bar: 50µm



Şekil.36: Bevacizumab+Cetuximab grubuna ait kornea kesitinde, VWF immun işaretlenmesi, vasküler endotel hücrelerinde immunpozitivite(ok başı) izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz. Bar: 50µm

5.TARTIŞMA

Daha önce var olan bir damardan yeni damar oluşumu anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır(131). Vasküler yapıların şekillenmesi, sadece embriyolojik dönemde organların gelişimi ve farklılaşması için değil, aynı zamanda yetişkinde üreme fonksiyonları ve yara iyileşmesi için de hayati öneme sahiptir(132). Ayrıca anjiyogenez, proliferatif retinopati, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, tümörler, romatoid artrit ve psöriazis gibi pek çok hastalığın histopatolojik mekanizmasında yer almaktadır(132-133).

Normal, sağlıklı kornea, hem kan hem de lenfatik damarlardan yoksundur (134-136), ancak kimyasal yanık, travma veya enfeksiyon gibi inflamatuvar durumlarda anjiyogenez şekillenebilir(5,137-138). Korneada yeni kan damarlarının gelişmesi neovaskularizasyon olarak tanımlanmakta ve bu durumun tedavisi çoğu zaman dirençli olabilmekte, görmeyi olumsuz şekilde etkilemektedir(139).

Korneal anjiyogenez(neovaskularizasyon), çeşitli korneal hastalıkların çoğu zaman sekonder bir semptomu olarak ortaya çıkar. Görme kaybının yanında özellikle korneanın immün dokunulmazlığını yitirmesi nedeniyle korneal transplantasyon için yüksek derecede doku reddine neden olduğu bildirilmektedir(136). Korneal anjiyogenez için en önemli tetikleyici faktörün kronik inflamasyon olduğu öne sürülmüştür(140). Anjiyogenezin meydana gelmesinde temel etken proanjiyojenik ve antianjiyojenik büyüme faktörleri arasındaki dengenin proanjiyojenik yönünde kayması olduğu hususunda bir görüş birliği vardır(141). Bu süreçte, VEGF'in endotel hücreleri üzerinde proliferasyon ve vasküler permeabilite yönünden oldukça önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir(142-143).

Anjiyogenez mekanizmasında görev alan bir moleküle ya da reseptöre müdahalede bulunma, çeşitli kanser tipleri ve oftalmolojik hastalıklarda, anjiyogenezin önlenmesinde yada geriletilmesinde bir hedef haline gelmiştir(144-145).

Başlangıçta sadece kolorektal kanserde kullanılan bevacizumab VEGF'e karşı oluşturulmuş ve FDA onayı almış bir antikor olup, şu an için diyabetik retinopati ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon gibi sonradan oluşan kan damarı oluşumun istenmediği durumlarda sıklıkla kullanılmaktadır (146-147). Daha önce yapılan çalışmalarda bevacizumab'ın korneal anjiyogenez modellerinde ve birkaç vaka takdiminde, tek başına ve/veya bir takım ajanlarla kombine etkisi araştırılmıştır. Söz konusu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında bevacizumabın korneal anjiyogenezi geriletmediği ya da baskıladığı konusunda tam bir görüş birliği söz konusu değildir.

Çalışmamızda, bevacizumab, cetuximab ve her iki ilacın kombinasyonunun rat korneal anjiyogenez modelindeki etkinliğini araştırdık.

Bevacizumab ile ilgili yapılan deneysel çalışmalardan, Felix Bock ve arkadaşları(136) farelerde dikiş ile uyarılmış korneal anjiyogenez modelinde, sistemik verilen bevacizumabın yeni damar oluşumu üzerine olan etkilerini inceledikleri bir çalışmada, 5mg/kg bevacizumab (1.ve 3.gün) verdikleri grubun, kontrol grubu ile kıyaslanmasında anlamlı bir şekilde CD31(+) endotel hücrelerinin temsil ettiği mikrovasküler yoğunluğun dolayısıyla da yeni kan damarlarının oluşumunun azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, uzun süreli (2 hafta süreyle 5 kez 5mg/kg/ip, bevacizumab) kullanılan sistemik bevacizumabın da yeni damar oluşumunu stabile edici özelliği olduğu vurgulanmıştır. Manzano ve ark(9). Mahoney ve Waterbury'nin(128) yöntemiyle elde ettikleri rat korneal anjiyogenez modelinde, günde iki kez uyguladıkları 4mg bevacizumabın topikal olarak uygulanmasıyla anjiyogenezin anlamlı bir şekilde inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Hamid Hosseini ve arkadaşları(149) daha önce yapılan yöntemin(148) modifiye edilmiş uygulaması ile tavşanlarda elde ettikleri korneal anjiyogenez modelinde, 2.5mg bevacizumabın subkonjunktival etkinliğini ortaya koymaya çalışmışlardır. Çalışmada kontrol(serum fizyolojik verilen) grubunda ortalama anjiyogenez miktarı %59 iken, bevacizumab verilen grupta ise %40 civarında bulunmuştur. Wei-Li Chen ve arkadaşları(150) tavşanlarda yaptıkları değişik korneal anjiyogenez modellerinde(VEGF ve bFGF pelet içeren mikrocep), korneal alkali yanık ve limbal hasar ile oluşturulmuş anjiyogenez modeli) bevacizumabın etkinliğini incelemişlerdir. Bu çalışmada 2-8 hafta süresince haftada 2 kez, 0,25-2,5mg arası dozlarda bevacizumabın, korneal anjiyogenez üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Yapılan alışmalar içerisinde (alışmamızda dahil), en yüksek doz bevacizumab verilen bu çalışmanın korneal alkali modelinde, bevacizumab ile tedavi edilen bütün doz gruplarında 6-14.günler arasında yeni damar oluşumu izlenmemiş, tam olmasa bile belirgin bir şekilde inhibisyon izlenmiştir. Olga Dravitzman-Storobinsky ve arkadaşları(151), fare alkali yanık korneal anjiyogenez modelinde subkonjunktival ve intraokuler bevacizumab enjeksiyonunun, korneal anjiyogenez inhibisyonundaki rolünü araştırdıkları çalışmalarında anjiyogenez modeli, Mahoney ve Waterbury(128) yöntemine göre yapılmıştır. Koterizasyonun hemen ardından sağ gözlere, ilaç uygulaması 63 farenin 22'sine 2.5mg/ 0.1ml subkonjunktival, 20 tanesine 0.75mg/0.03ml intravitreal, 21 tanesine ise 0.5mg/0.02ml intrakameral olarak verilmiştir. 2, 4, 6, 8, 10 ve 14. günlerde (koterizasyondan sonraki) korneaların dijital resimleri çekilmiştir. Korneal anjiyogenez alanları, total korneal alana olan oranı yapılmıştır. Bevacizumab verilen grupların, korneal anjiyogenez alanlarının kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, daha düşük olduğu bildirilmiştir. Özellikle bu farklılığın 8,10 ve 14. günlerde daha belirgin olduğu vurgulanmıştır. Young Sang Han ve arkadaşları(152) tarafından, invitro ve invivo, bevacizumabın HUVEC(invivo) ve

subkonjunktival etkisinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada uygun laboratuvar koşullarında izole edilip, pasajlanmış olan HUVEC hücrelerinin VEGF ile uyarılmasının ardından değişen sürelerde (2,4,6 ve 24 saat) ve dozlarda bevacizumaba maruz bırakılması sağlanmış, ardından proliferasyon, migrasyon ve tüp oluşumu açısından çeşitli değerlendirmeler yapılmıştır. İn vitro olarak, 10 tavşan üzerinde 10 saniye süre ile Whatmann filtre kağıdı ile uygulanan NaNO_3 ile anjiyogenez modeli oluşturulmuş sonrasında tavşanlar iki eşit gruba (n:5) ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu, ikinci grup ise deney grubu olarak (2,5mg/ml bevacizumab subkonjunktival) kullanılmıştır. Daha sonraki aşamalarda değerlendirmeler, biomikroskopik, flouresan anjiyografik, ışık mikroskopik düzeyde yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre VEGF ile uyarılan HUVEC'lerin doza bağlı olarak yanıt verdiği ancak, değişik konsantrasyon gruplarının 24 saatlik olanlarında, inhibisyon doz bağımsız olarak şekillendiği izlenmiştir. İn vivo bulgular açısından incelendiğinde çalışmada, 3 ve 8.günlerde değerlendirilen korneal anjiyogenez, biomikroskopik, FA ve ışık mikroskopik düzeyde incelemede sadece SF grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bevacizumabın hem invivo hem de invitro sonuçları değerlendirildiğinde, anjiyogenezin inhibisyonunda, kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, 1.4 ve 7.günlerde olmak üzere toplam 3 doz subkonjunktival olarak 1.25mg/0.1ml bevacizumab verildi. 8.günün sonunda sakrifiye edilmeden hemen önce korneaları inceledik. Mahoney ve Waterbury'e(128) göre skorelama ve değerlendirme yaptık. Çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak bizde, bevacizumab grubunda %50.8 iyileşmenin (anjiyogenez inhibisyonunun) olduğunu gözlemledik. Her ne kadar ilaç uygulama doz, sıklığı, verilmiş şekli ve anjiyogenez hayvan modeli farklı olsa bile çalışmamızda bevacizumabın, söz konusu çalışmalarla paralellik gösterdiği ve anjiyogenezi inhibe ettiği sonucu görülmüştür.

Kim ve arkadaşları(154) toplam 20 adet tavşan üzerinde, Schmidt ve arkadaşlarının (153) kullandığı yöntemi modifiye ederek, korneal dikiş yöntemini kullanıp elde ettikleri anjiyogenez modelinde deneylerin hemen ardından ve bir hafta sonra uyguladıkları iki doz 5mg/ 0.2ml bevacizumabın korneal anjiyogenezin inhibisyonundaki rolünü incelemişler. Çalışmada immunohistokimyasal olarak korneal dokunun VEGF ekspresyonunu ve CD31 immunpozitif vasküler endotel hücrelerini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu ile bevacizumab grubunun karşılaştırılmasında, bevacizumab uygulanan grubun anjiyogenezi inhibe ettiği, ayrıca VEGF ekspresyon düzeyinin düştüğü kaydedilmiştir. Abdulgani Ahmed ve arkadaşları(155) yapmış olduğu bir çalışmada, alkali yanık modeli Ormerod ve Abelson(176)'un modifikasyonu ile elde edilmiş olan tavşan anjiyogenez modelinde

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

Bizde çalışmamızda, immunohistokimyasal olarak mikrovasküler yoğunluğu gösterme adına, bir endotel hücre markeri olan VWF ekspresyonu inceledik, bevacizumab grubu ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda, VWF(+) pozitif kan damarlarının yoğunluğunun azaldığını gözlemledik.

Bevacizumab ile ilgili yapılan bir klinik çalışmada, Yanyan Koenig ve arkadaşları(156) in vivo ve in vitro, uzun ve kısa süreli bevacizumab'ın korneal anjiyogenezdeki kullanımının etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmişlerdir. Çalışma insanlar üzerinde özellikle, konvansiyonel tedavilere yanıt vermemiş olan agresif korneal anjiyogeneze sahip hastalar(n:27) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada 0.5-12 aya kadar (günde 5 kez,5mg/ml) bevacizumab topikal olarak kullanılmıştır. Toplamda 14 gözde, görme keskinliğinde düzelmeler, iyileşmeler olmuş ve stabil bir hale gelmiş iken, sadece bir gözde görüş daha da kötüleşmiştir. Genel olarak bevacizumabın epitelyal defektlere neden olmadığı bildirilmekte, ancak 5 hastanın topikal bevacizumab uygulanmasının ardından, yeni epitel defektlerinin geliştiği ortaya konulmuştur. Toplam 21 gözden(19 hasta) elde edilen korneal fotoğraflarda, tedavi sonrası süreçte, ortalama vaskülarize alanların düşüşü %61 olarak bulunmuştur. Ahmed A.Zaki ve Samar F.Farid'in yapmış olduğu çalışmada(157), çeşitli oküler yüzey hastalıkları ile başvuran 10 hasta üzerinde, tek doz 2.5mg(0.1ml) bevacizumabın subkonjunktival etkisi incelenmiştir. İmaj analiz programı ile korneal anjiyogenez alanının total korneal alana olan oranı hesaplanmıştır.

Subkonjunktival enjeksiyondan iki hafta sonra, hastalardan elde edilen bulgular kıyaslandığında, oluşan kan damarlarından özellikle küçük olanlarında belirgin bir düşüş izlendiği bildirilmiştir. Büyük damarlarda(sonradan oluşan) meydana gelen gerileme 3.aya kadar etmiş, 6.aya doğru stabil hale gelmiştir. Felix ve ark(158), çeşitli klinik tanılarla hastaneye yatırılmış, 5 hasta üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, 5mg/ml bevacizumab göz damlasının topikal olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada 15.günden 6.aya kadar süren bir tedavi süresi izlenmiştir. Bevacizumab, göz damlası, en azından kısmi regresyon sağladıktan sonra ve de spesifik olarak anjiyojenik aktivitesinin işaretlerinin ortadan kalkmasıyla kesilmiştir. Tedavi süresince, bütün hastalarda, vaskülarize korneal alanlarda bir azalma söz konusu olmuştur. Bu bulguların tatmin edici bir düzeyde olması en azından yeni damar oluşumunun engellenmesi ile güçlendirilebilir yönünde görüş bildirilmiştir. Bu çalışmalar dikkate alındığında bevacizumabın uygun dozu ile ilgili kesin bir bilgiye ulaşılamadığını, bu konuda yapılması gereken yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu ortadadır.

Luiz F.M.Barros ve arkadaşları(159), toplam 20 adet erkek-wistar albino rat üzerinde yaptıkları bir çalışmada, her ratın her iki korneası limbustan yaklaşık olarak 2mm uzaklıkta sentralden koterize edilerek, rat alkali yanık anjiyogenez modeli oluşturulmuştur. Koterizasyonun hemen ardından, ratları, 4 gruba ayırmışlardır. Birinci grupta yer alan gözlere(n:10) subkonjunktival olarak 0.02ml, SF enjekte edilmiştir. İkinci grupta yer alan gözlere(n:10), 0.02ml bevacizumab lezyondan hemen sonra, 3.grupta yer alan gözlere(n:10) 0.02ml bevacizumab lezyon oluşturulduktan 3 gün sonra, dördüncü grupta yer alan gözlere(n:10) 0.02ml bevacizumab lezyon oluşturulduktan 5 gün sonra verilmiştir. Çalışmada bevacizumab verilen gözlerdeki mikrovasküler yoğunluğun enjeksiyon gününden (zamanından) bağımsız bir şekilde kontrol grubuna nazaran daha düşük çıktığı bildirilmektedir. Sadece bevacizumab verilen gruplar arası karşılaştırma yapıldığında mikrovasküler yoğunluk açısından herhangi bir anlamlılık olmadığı da öne sürülmüştür. Miltiadis Papathanassiou ve arkadaşları(160) tarafından tavşan alkali korneal anjiyogenez modeli üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bevacizumabın doza bağlı etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada alkali yanık modeli 12 tavşan üzerinde her birinin tek gözü kullanılarak elde edilmiştir. 10µl %5'lik NaOH'in damla şeklinde uygulanması ile elde edilen anjiyogenez modeli oluşturulduktan sonra, tavşanlar 4 eşit gruba ayrılmıştır. Birinci grupta yer alan tavşanlara herhangi bir uygulama yapılmamıştır. İkinci grupta yer alan tavşanlarda sadece anjiyogenez modeli oluşturulmuş ve SF verilmiştir. Üçüncü grupta yer alan tavşanlara 14.günde 3.75mg bevacizumab subkonjunktival olarak verilmiştir. Dördüncü grupta yer alan tavşanlar ise tek doz bevacizumabı(3.75mg) 1.günde almışlardır. Çalışmadan elde edilen

bulgular göz önüne alındığında, 28.günde, 2,3 ve 4.gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur. 3.gruptaki anjiyogenez alanı yaklaşık %42 oranında tespit edilirken, dördüncü grupta ise neredeyse tamamen ortadan kalktığı bildirilmiştir. Bizim bulgularımızın aksine neredeyse tamamen anjiyogenezin inhibe olduğu ve ortadan kalktığı öne sürülmektedir. Luiz M.Barros ve ark(159) uygulama zamanından bağımsız olarak etkinliğini savundukları bevacizumabın, Miltiadis Papathanassiou ve ark(160) tarafından erken verilmesinin daha etkili olduğunu bildirmeleri, VEGF'in önceden oluşmuş damarlar üzerinde değil de, daha sonradan oluşan damarlar üzerinde etkin olduğu göz önüne alındığında erken dönemde verilen bevacizumabın daha etkin olması gerektiği sonucunu güçlendirmektedir.

Bizde çalışmamızda erken dönemde (1.gün) vermeye başlanan bevacizumabın korneal anjiyogenezin inhibisyonunda etkili olduğu gözlemledik.

EGFR tipik, reseptör kinaz ailesi üyesidir. EGFR'nin alt üyesi içinde yer alan HER2 geni, EGFR ile ilişkili tirozin kinazı kodlar(161). HER2 onkoproteinleri, sinyal iletiminden sorumlu olan bir internal tirozin kinaz kısmına, kısa bir transmembran parçasına ve son olarak bir ekstrasellüler parça olmak üzere üç kısımdan meydana gelmiştir. Ekstrasellüler kısma büyüme faktörleri bağlanmaktadır. Bu reseptörler normal hücrelerin proliferasyonunun ve differensiyasyonun meydana gelmesinde aracı rol almakta ve bunların aktivasyonu, hücre proliferasyonu, tümör hücre motilitesi ve invazyonunda, anjiyogenez ve apoptozisin inhibisyonunda görev alırlar(162).

Çeşitli neoplazm türlerindeki endotel hücrelerinde, EGFR ekspresyonun olduğu gösterilmiştir(163). EGFR aktive olduktan sonra, endotel hücrelerinin kendisinin proliferasyonu da önüne sürülmüştür(164). Buna ilave olarak, EGFR blokajının endotel hücrelerinin apoptozise gitmesine ve neovaskularizasyonun azalmasına neden olduğu da gösterilmiştir (125).Düz kas hücreleri ve fibroblastlar için mitojenik ve kemotaktik bir faktör olduğu bilinen EGF anjiyogenezde rol alan önemli büyüme bir faktörü olup otonom olarak VEGF üretimini arttırdığı bildirilmektedir(167).

Bütün bu çalışmaların sonucunda, tüp oluşumu esnasında meydana gelen kesintilerin temel nedeninin, cetuximabın doğrudan endotel hücreleri üzerinde göstermiş olduğu etkiden kaynaklanabileceği vurgulanmaktadır. VEGF ve IL-8 immatür endotel hücreleri üzerinde yaşamsal destek sağlayıp(168), endotel hücrelerini apoptozisten koruyabilir dolayısıyla cetuximab ile uyarılan VEGF üretimindeki azalma sayesinde endotel hücrelerinin apoptozise gitmelerine ve neovaskularizasyonun azalmasına neden olduğu vurgulanmaktadır(165).

Cetuximab, Epidermal Growth Faktör Reseptörüne, Epidermal Growth Faktöre ve diğer ligandlara karşı yarışmalı inhibisyon ile bağlanan IgG1 monoklonal bir antikordur(169).

Cetuximabın antianjiyojenik etkisi ilk olarak Petit ve arkadaşlarının bir çalışmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, cetuximaba maruz bırakılan insan A431 SCC tümör ksenograftlarında tümör hücrelerinden salınan anjiyojenik büyüme faktörlerinin miktarının düştüğü öne sürülmüştür(14). Perrotte ve arkadaşları(166) in vitro olarak insan transisyonel hücre karsinomlarını maruz bıraktıkları cetuximabın, bu hücrelerde VEGF, bFGF ve IL-8'in mRNA ve protein üretimlerini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Hem invitro hem de invivo insan baş ve boyun skuamoz hücre karsinom(BBSHK) model sistemlerinde cetuximabın etkisi değerlendirilmiştir. Anjiyogenez ile ilişkili olarak, cetuximaba maruz bırakılmış HUVEC hücrelerinde hücre-hücre etkileşimlerinin azaldığı, dolayısıyla tüp oluşumun kesintiye uğradığı gösterilmiştir. İn vivo tümör ksenograft anjiyogenez modellerinde, sistemik cetuximab tedavisinin sadece tümör gelişimini ve kan damarlarını azaltmadığı, aynı zamanda yeni oluşan kan damarlarının tümöre doğru olan yöneliminin inhibe olduğu gösterilmiştir(170).

Mete Güler ve arkadaşları(171) yaptıkları bir çalışmada, kimyasal yanık modeli ile oluşturdukları rat anjiyogenez modelinde toplam 16 rat üzerinde trastuzumabın etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Kimyasal anjiyogenez modeli Mahoney ve Waterbury'nin modifiye uygulaması ile elde edilmiştir. Anjiyogenez modeli oluşturulduktan sonra, ratlar iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta yer alan ratlara(n:8) intraperitoneal olarak 4mg/kg trastuzumab tek doz verilmişken, ikinci gruba ise 1ml serum fizyolojik verilip, kontrol grubu(n:8) olarak kullanılmıştır. Deneyin sonunda 8.günde sakrifiye edilen ratların korneaları alınıp, rutin histopatolojik inceleme için 5µm'lik kesitler alınmıştır. VEGF ve CD31 immun boyamaların yanında rutin histopatolojik boyamalarda yapılmış aynı zamanda biomikroskop ile korneaların görüntüler elde edilmiştir.Çalışmada elde edilen bulgular açısından incelendiğinde yanık uyarını, açısından her iki grup arasında bir fark izlenmediği trastuzumab ile tedavi edilen grubun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında korneal anjiyogenez miktarının ve ortalama anjiyogenez alanının daha düşük olduğu ortaya konulmuştur. Trastuzumab grubundaki kornea epiteli ve endotel hücrelerindeki VEGF ekspresyonunun kontrol grubundaki ekspresyona nazaran anlamlı derecede daha düşük olduğu aynı zamanda stromadaki ekspresyonunda düşük olduğu fakat anlamlı olmadığı öne sürülmüştür. Christiane J Bruns ve arkadaşları(172) invivo ve invitro yaptıkları bir çalışmada, Cetuximab ve Cetuximab+ Gemcitabine ile muamele edilen insan pankreatik karsinom modelinde tümör neovaskülaritesinde azalma olduğu ve mikrovasküler yoğunluğun azaldığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, deneyin 1.4 ve 7.günlerde olmak üzere toplam 3 doz subkonjunktival 5mg/0.05ml cetuximab verildi. 8.günün sonunda sakrifiye edilmeden hemen önce korneaları

incelendi. Mahoney ve Waterbury'e göre skorlama ve değerlendirme yapıldı. Bu bulgularla uyumlu olarak bizde, bir diğer EGFR inhibitörü olan cetuximabın, kontrol grubu ile karşılaştırılmasında %54.3 iyileşmenin (anjyogenez inhibisyonunun) olduğunu gözlemledik. Her ne kadar uygulanan ilaç etken madde olarak farklı olsada bir EGFR inhibitörü olan cetuximabın, söz konusu çalışmalarla paralel olarak anjyogenezi inhibe ettiğini gözlemledik.

Literatürlerde VEGF ve EGF'nin doğrudan ya da dolaylı olarak tümör büyümesinde,metastaz/invazyonunda ve tümör anjyogenezi üzerinde biyolojik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. VEGF ve HER2 sinyal yolları birbirlerine moleküler düzeyde ara bağlantılarla bağlıdır ve her ikisi kombine olarak hücre proliferasyonunu teşvik eder. Ayrıca HER2 sinyalinin VEGF ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir. VEGF doğrudan endotel hücresi üzerindeki reseptörüne bağlanarak, bu hücrelerde, proliferasyonun, migrasyonun ve yeni kan damarlarının filizlenmesini sağlamaktadır. HER2, hipoksik durumlarda VEGF'in upregülasyonuna katılır, ancak son zamanlarda hipoksik olmayan durumlarda da görev aldığı bildirilmektedir(173). VEGF ve EGF tarafından oluşturulan biyolojik etkiler, kendilerine ait olan downstream sinyal yollarının devreye girmesi vasıtasıyla gerçekleşir.

Her iki faktörde(VEGF ve EGF) ortak downstream sinyal yolağını kullanır. Bu yüzden terapötik etkinliği artırma adına EGF/EGFR hedefli veya EGF/EGFR ile birlikte VEGF/VEGF reseptörlerinin hedef alındığı kombine ilaçlar kullanılmaktadır(174).

Louis Hoffart ve arkadaşları(175), gümüş nitrat koterizasyon tekniği ile(128) elde ettikleri rat korneal anjyogenez modelinde, bevacizumabın farklı dozlarda ve değişik farmakolojik ajanlarla kombine uygulamalarını incelemişlerdir. Bu çalışmada tek başına bevacizumabın anjyogenez ve inflamasyonu azaltmada deksametazon ile kombine uygulamasından daha başarısız olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Çalışmamızda deneyin 1,4 ve 7.günlerde olmak üzere toplam 3 doz subkonjunktival 5mg/0.1ml cetuximab ve 1.25mg/0.05ml bevacizumab verildi. 8.günün sonunda sakrifiye edilmeden hemen önce kornealar incelendi. Mahoney ve Waterbury'e(128) göre skorlama ve değerlendirme yapıldı. Bevacizumab+cetuximab kombinasyonunun, kontrol grubu ile karşılaştırılmasında %15.8 iyileşmenin (anjyogenez inhibisyonunun) olduğunu gözlemledik. Diğer ilaç uyguladığımız gruplarla karşılaştırma yaptığımızda, kombine ilaç uyguladığımız bu grubun, cetuximab ve bevacizumab grupları ile ayrı ayrı karşılaştırılmalarında anjyogenez inhibisyonunda etkinliğinin az olduğunu izledik.

Çalışmamızda, inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından gruplar arası karşılaştırma yaptığımızda, cetuximab grubunda, kontrol ve diğer ilaç uygulanan gruplara nazaran daha az inflamatuvar hücre varlığına rastlandı.

Fibroblast aktivitesi yönünden gruplar arası karşılaştırılma yapıldığında, bevacizumab+cetuximab ve kontrol gruplarının bevacizumab ve cetuximab grupları ile karşılaştırılmasında, bevacizumab ve cetuximab grubunda fibroblast aktivitesi düşük çıkmıştır.

Axer Siegel ve arkadaşları(177) geliştirmekte olan tavşan gözleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 1.25mg/0.05ml intravitreal bevacizumab enjeksiyonundan sonra, sentral korneal kalınlıkların deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda, tüm gruplarda kornea kalınlıkları ölçüldü ve ortalama değerleri saptandıktan sonra gruplararası karşılaştırma yapıldı. Total kornea kalınlığının gruplar arası karşılaştırılmasında, sham grubuna göre bütün gruplarda artış söz konusuydu. Kontrol grubu total korneal kalınlığı ortalaması, diğer gruplardan daha yüksek bulundu. Bu durum, uygulanan ilaçların korneal ödemi önlediği sonucunu doğurmaktadır.

Kornea epitel kalınlığının her gruptaki ortalama değerleri saptandıktan sonra, gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Korneal epitel kalınlığının gruplararası karşılaştırılmasında, sham grubuna en yakın değerin cetuximab grubunda olduğu izlendi. EGF'ün topikal uygulanması hem hücre bölünmesi hem de hücre migrasyonu aracılığıyla reepitelizasyonu teşvik ettiği bildirilmektedir(178). Çalışmamızda subkonjunktival uyguladığımız anti-EGF kimerik bir antikör olan cetuximabın korneal epitelde kalınlaşmaya neden olması, uygulama şekli olan subkonjunktival verilmesinden kaynaklı olabilir.

6.SONUÇ

Çalışmamızda, deneysel korneal anjiyogenez modeli kullanılarak, anjiyogenezin inhibisyonunda bevacizumab ve cetuximabın ayrı ayrı ve tek başlarına olan etkileri açıklanmaya çalışıldı. Elde ettiğimiz bulgulara göre;

1.Tek başına bevacizumab verilen grubun, kontrol grubu ile kıyaslanmasında anjiyogenez inhibisyonunun kısmi olarak sağlandığı,

2.Korneal anjiyogenezin inhibisyonunda ilk defa kullanılan bir ajan olan cetuximabın korneal anjiyogenezi inhibe etmede bevacizumab ile neredeyse aynı etkide olduğu, özellikle de anti-inflamatuar etkisinin izlendiği,

3.Her iki ilacın kombine kullanıldığı grupta az düzeyde bir anjiyogenez inhibisyonunun varlığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan bu düzeydeki bir inhibisyon, spontan iyileşmeye bağlı olarak meydana gelmiş olabileceği sonucuna varılabilir. Subkonjunktival verilen her iki ilacın birbirlerinin etkilerini baskılamış olabileceği ihtimalinin güçlü olduğu, daha ileri çalışmalarda ilaçların farklı uygulama yollarından kombine verilmesinin etkilerinin, anjiyogenez inhibisyonunda daha etkili sonuçlar verebilir.

7.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kurtalanda dünyaya geldim. İlk, orta ve lise öğrenimimi Diyarbakır'ın çeşitli okullarında tamamladım. 2005 yılında Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesinden dönem birincisi olarak mezun oldum. Aynı yıl Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora çalışmalarına başladım. 2006 yılında aynı kürsüde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. 2011 Nisan ayında, Deneysel Korneal Anjiyogeneizde Cetuximab ve Bevacizumabın Rolü, başlıklı tez çalışmam ile doktora çalışmalarımı tamamladım. Bekar olup, ingilizce bilmekteyim.

8.KAYNAKLAR

- 1.**Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*;86: 353.1996
- 2.**Ferrara N, Davis and Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.*;18:4 –25.1997
- 3.**Yen L, Benlimame N, Nie ZR, et al. Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4029–4044.
- 4.**Muthukkaruppan V, Auerbach R. Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 1979;205:1416–8
- 5.**Cursiefen, C., K. Maruyama, D. G. Jackson, J. W. Streilein, and F. E. Kruse. Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation. *Cornea* 25: 443–447.2006
- 6.**Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, Pulido JS, Marler RJ. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol* 142:162–164,2006
- 7.**Murata M, Nakagawa M, Takahashi S. Inhibitory effects of plasminogen fragment on experimentally induced neovascularization of rat corneas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2359:584-589.1997
- 8.**Benelli U, Ross JR, Nardi M, Klintworth GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery. Inhibition by cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 382:274-282.1997
- 9.**Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis P, Kivilecim M. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br.J. Ophthalmol.*91:804-807,2007
- 10.** Bock F, König Y, Dietrich T, Zimmermann P, Baier M, Cursiefen C. Inhibition of angiogenesis in the anterior chamber of the eye. *Ophthalmologie* 104:336–344,2007
- 11.**Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245:1577–1579. 2007
- 12.** Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*.112:1035–1047.2005
- 13.** Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J. Growth stimulation of A431 cells by EGF: identification of high affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*.80:1337–41.1983
- 14.**Petit AMV, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol*.151:1523–30.1997

- 15.**Michael H. Ross and Wojciech Pawlina, Histology, A Text and Atlas, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Sixth Edition, 2010.
- 16.** Leslie P. Gartner & James L. Hiatt, Color Textbook of Histology, 3rd Edition, Baltimore, Maryland, 2006
- 17.**Atlas of the Sensory Organs, Functional and Clinical Anatomy, Andras Csillag, Totowa New Jersey, Humana, Pres 2005.
- 18.** Kafarnik C, Murphy CJ, Dubielzig RR. Canine duplication of Descemet's membrane. Vet Pathol. 46(3):464-73. 2009.
- 19.**Agarwal S. Textbook of Ophthalmology. Vol II. Jaypee Company 3: 942-943. 2002
- 20.**Patrizia Ferretti, Andrew Copp, Cheryll Tickle and Gudrun Moore, Embryos, Genes and Birth Defects, Second Edition, John Wiley & Sons, England, 199-220, 2006
- 21.**T.W. Sadler, Langman's Medical Embryology, Lippincott Williams & Wilkins, Eleventh Edition, Baltimore, USA, 335-342, 2010
- 22.** Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science. 235(4787):442-447. 1987
- 23.** Martinez A. A new family of angiogenic factors. Cancer Lett 236:157-163. 2006
- 24.** Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lièvre F: Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and hematopoiesis during avian ontogeny. Development 105: 473-485, 1989
- 25.**M. Luisa Iruela-Arispe, Endothelial Cell Activation, Angiogenesis, An Integrative Approach from Science to Medicine. Chapter.3, page 35-43. 2008
- 26.** Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development. Annu Rev Cell Dev Biol. 18:541-573. 2002
- 27.** Iruela-Arispe. Vascular Development and Angiogenesis. In: Encyclopedia of Molecular Cell Biology. Ed: Robert A. Meyers. 15:201-232. 2005
- 28.**Ausprunk D, Folkman J: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc Res 14: 53- 65, 1977
- 29.** Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? Cancer Res 46: 467-473, 1986
- 30.** Gerhardt H, Betsholtz C. How do endothelial cells orientate? EXS. 94:3-15. 2005
- 31.**Short RHD: Alveolar epithelium in relation to growth of the lung. Philos Trans R Soc Lond Ser B 235: 35-87, 1950
- 32.** Caduff JH, Fischer LC, Burri PH: Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. Anat Rec 216: 154-164, 1986

33. Patan S, Haenni B, Burri PH: Evidence for intussusceptive capillary growth in the chicken chorio-allantoic membrane (CAM). *Anat Embryol* 187: 121–130, 1993
34. Patan S: TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 56: 1–21, 1998
35. Sybill Patan. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology* 50: 1–15, 2000
36. Ware JA, Simons M: Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nat Med* 3: 158–164, 1997
37. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*; 219:983–5.1983
38. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 246:1309–12.1989
39. Aase K, von Euler G, Li X, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation*.104:358–64.2001
40. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Med*.7:575–83.2001
41. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*.1:219–27.2002
42. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5:74–80.2004
43. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Med*.7:186–91.2001
44. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, et al. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*. 68:84–92.1994
45. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3071–6.1999
46. Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta*.327:1–23. 2003
47. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*.201:1089–99.2005

48. Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, et al. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem.*279:46304–14.2004
49. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.*79:1283–316.1999
50. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature.* 443:993–7.2006
51. Van Spronsen DJ, De Mulder PH. Targeted approaches for treating advanced clear cell renal carcinoma. *Onkologie.*; 29:394–402.2006
52. Morisada T, Oike Y, Yamada Y, et al. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood.* 105:4649–56.2005
53. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development.*129:4797–806.2002
54. Kim, I. et al. Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3 binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol* 10, 38–44 2003.
55. Kim, K.T. et al. Oligomerization and multimerization is critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate tie2. *J Biol Chem* 280, 20126–20131, 2005.
56. Mandriota, S.J. et al. Hypoxia-inducible angiopoietin-2 expression is mimicked by iodonium compounds and occurs in the rat brain and skin in response to systemic hypoxia and tissue ischemia. *Am J Pathol* 156, 2077–2089, 2000.
57. Fiedler, U. et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12, 235–239.2006.
58. Yamakawa, M. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res* 93, 664–673.2003.
59. Xu, Y., Liu, Y.J. & Yu, Q. Angiopoietin-3 is tethered on the cell surface via heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 279, 41179–41188, 2004.
60. Arai, F. et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149–161.2004.
61. Saharinen, P. et al. Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J Cell Biol* 169, 239–243.2005.
62. Sato, T.N. et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 367, 70–74. 1995.

63. Puri, M.C., Partanen, J., Rossant, J. & Bernstein, A. Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* 126, 4569–4580 1999
64. Vikkula, M. et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 87, 1181–1190.1996.
65. Gale, N.W. et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3, 411–423,2002.
66. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87(7):1153–5.1996
67. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1):11–25.1992
68. Okada Y, Copeland BR, Hamann GF et al.Integrin α v β 3 is expressed in selected microvessels after focal cerebral ischemia. *The American journal of pathology*. 149(1):37–44.1996
69. Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, et al. Central roles of α 5 β 1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.22(6):927–33.2002
70. Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *The Journal of biological chemistry*. 275(51):39867–73.2000
71. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase- 9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology* 2(10):737–44.2000
72. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *The Journal of cell biology*.154(5):1069–79.2001
73. Clark RA, Tonnesen MG, Gailit J, Cheres DA. Transient functional expression of α V β 3 on vascular cells during wound repair. *The American journal of pathology* 148(5): 1407–21.1996
74. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/ fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16:159–78.2005
75. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*.271:15292–7.1996
76. Dell'Era P, Belleri M, Stabile H, et al. Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells. *Oncogene*.20:2655–63,2001

77. Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res.* 88:1135–41.2001
78. Castellon R, Hamdi HK, Sacerio I, et al. Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 74:523–35.2002
79. Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 299:1073–85.2001
80. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor- 2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* 141:1659–73.1998
81. Calvani M, Rapisarda A, Uranchimeg B, et al. Hypoxic induction of an HIF-1 α -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* 107:2705–12.2006
82. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31;323-333,1990
83. Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 39:169–87.1985
84. Tsai YJ, Lee RK, Lin SP, Chen YH. Identification of a novel platelet-derived growth factor-like gene, fallotin, in the human reproductive tract. *Biochim Biophys Acta* 1492(1):196–202.2000
85. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure.* 5(10):1325–38.1997
86. Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R. Peptide growth factors and their receptors; 1990.
87. Crawford Y, Kasman I, Yu L et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti- VEGF treatment. *Cancer Cell* 15:21–34. 2009
88. Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:91–98.2003
89. Cao R, Brakenhielm E, Li X et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- $\alpha\alpha$ and - $\alpha\beta$ receptors. *Faseb J.* 16:1575–1583.2002
90. Li H, Fredriksson L, Li X, Eriksson U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene.* 22:1501–1510.2003

- 91.** di Tomaso E, London N, Fuja D, Logie J, Tyrrel JA, Kamoun W, Munn LL, Jain RK. PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS ONE* 2009
- 92.** Savage, C. R., Jr., Inagami, T., and Cohen, S. The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 247, 7612–7621. 1972
- 93.** Wells, M. F. Ware, F. D. Allen, and D. A. Lauffenburger, “Shaping up for shipping out: PLC γ signaling of morphology changes in EGF-stimulated fibroblast migration,” *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 44, no. 4, pp. 227–233, 1999.
- 94.** Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol.* 2:168–72. 2000
- 95.** Yarden Y, Sliwkowski M. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127–37. 2001
- 96.** Wells A. The epidermal growth factor receptor (EGFR)-a new target in cancer therapy. *Signal.* 1:4–11. 2000
- 97.** Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 103:1237–1241. 1999
- 98.** Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 69:562–573. 2006
- 99.** Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW: Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB Journal.* 18:734–736. 2004
- 100.** Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR: Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25:99–113. 2006
- 101.** Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 107:789–800. 2001
- 102.** Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, et al. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res.* 64:1675–1686. 2004
- 103.** van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH: Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:716–728. 2006
- 104.** Masson V, de la Ballina LR, Munaut C et al. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *Faseb J.* 19:234–236. 2005
- 105.** Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood.* 101:1810–1817. 2003

- 106.** Rundhaug JE: Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005;9:267–285.2005
- 107.** Rodrigues RG, Guo N, Zhou L et al. Conformational regulation of the fibronectin binding and alpha 3beta 1 integrinmediated adhesive activities of thrombospondin-1. *J Biol Chem*276:27913–27922.2001
- 108.** Cursiefen C, Seitz B, Dana MR et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in the cornea: pathogenesis, clinic and treatment. *Ophthalmologe* 100:292–299.2003
- 109.** Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature.*Nat Rev Immunol* 3:879–889.2003
- 110.**Cursiefen C,Masli S, Ng TF et al. Roles of thrombospondin 1 and 2 in regulating spontaneous and induced angiogenesis in the cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1117–1124.2004
- 111.**Abdulgani A. Deneysel Olarak Oluşturulan Kornea Neovaskularizasyonunda Bevacizumab Etkinliğinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara,2007
- 112.**Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GOH. Angiogenesis in corneal diseases: Histopathology of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 17:611–613.1998
- 113.**Cursiefen C,Wenkel H,Martus P et al. Peripheral corneal neovascularization after nonhigh- risk keratoplasty: influence of short- versus longtime topical steroids. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:514–521.2001
- 114.**Cornea and External Eye Disease. Claus Cursiefen, Friedrich E.KruseNew Aspects of Angiogenesis in the Cornea 83-99,2006
- 115.** Kruse FE, Cursiefen C, Seitz B et al.Klassifikation von Erkrankungen der Augenoberflaeche, part I. *Ophthalmologe* 100:899–915.2003
- 116.** Panares RL, Garcia AA. Bevacizumab in the management of solid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.*7(4):433–45. 2007
- 117.** Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29 (6 Suppl 16):15–8.2002
- 118.** Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.*65(3):671–80.2005
- 119.** Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307(5706):58–62.2005
- 120.**Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, et al. Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of

epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 259:7755–60.1984

121.Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*.94:1593–611.2002

122.Liu B, Fang M, Lu Y et al.Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene*.20:1913–22.2001

123.Wu X, Rubin M, Fan Z, et al. Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene*.12:1397–403.1996

124.Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 6(9):3739–47.2000

125.Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 60:2926–35.2000

126.Kizaka-Kondoh S, Sato K, Tamura K et al. Raf-1 protein kinase is an integral component of the oncogenic signal cascade shared by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol*.12:5078–86.1992

127.Masuzawa Koichi;Jesmin Subrina;Maeda Seui et al.Experimental biology and medicine 231.(6),1085-1089,2006

128.Mahoney J,Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Eye Res* 4:531-535, 1985

129.Green CJ.Animal Anaesthesia Laboratory. London:Oxford Press,1982:45:58

130.John.D.Bancroft and Marilyn Gamble,Theory and Practice of Histological Techniques ,Churchill Livingstone,China,2008,83-93

131.Folkman J.What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6

132. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27–31,1995.

133. Garner A. Vascular diseases. New York: Marcel Dekker, 1994.

134.Cursiefen C, Chen L, Saint-Geniez M et al.Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. *Proc Natl Acad Sci USA*.103:11405-10.2006

- 135.** Cursiefen C, Rummelt C, Junemann A, Vorwerk C, Neuhuber W, Kruse FE, Schroedl F. Absence of blood and lymphatic vessels in the developing human cornea. *Cornea* 2006; 25:722-6. 2006
- 136.** Bock F, Onderka J, Dietrich T et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*48:2545-52.2007
- 137.** Samolov B, Steen B, Seregard S, et al. Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Exp Eye Res.*80:159-66.2005
- 138.** Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol.*12:242-9.2001
- 139.** Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol.*43:245-69.1998
- 140.** Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, et al. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea.* 27:142–147.2008
- 141.** DeStafeno JJ, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol.*125:834–836.2007
- 142.** Lyn SS, Cheng CM. Bevacizumab for neovascular ocular diseases. *Ann Pharmacother.* 41: 614–625.2007
- 143.** Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*44:117–123.2003
- 144.** Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, PuliaWto CA et al. Systemic Bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty-four-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 113:2002–2011.2006
- 145.** Sarman S, Mancini J, van der Ploeg I et al. Involvement of purinergic p2 receptors in experimental retinal neovascularization. *Curr Eye Res* 33:285–291.2008
- 146.** Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD. Intravitreal bevacizumab(Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.*113:363–372.2006
- 147.** Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina.*26:275–278.2006
- 148.** Kwon YS, Hong HS, Kim JC et al. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*46: 454–60.2005
- 149.** Hamid Hosseini, Mahmood Nejabat, Morsal Mehryar et al. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clinical and Experimental Ophthalmology.*35: 745–748.2007

- 150.**Wei-Li Chen, Chung-Tien Lin, Nien-Ting Lin et al.Subconjunctival injection of Bevacizumab (Avastin) inhibits corneal neovascularization in different rabbit models of corneal angiogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,50:4,1659-1665.2009.
- 151.** Dratviman-Storobinsky O, Lubin BC, Hasanreisoglu M, Goldenberg-Cohen N. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization. *Molecular Vision*.15:2326-2338.2009
- 152.**Young Sang Han & Ji Eun Lee & Ji Won Jung & Jong Soo Lee Inhibitory effects of bevacizumab on angiogenesis and corneal neovascularization. *Cornea* 247,4, 541-548, 2009
- 153.**Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Schomacker K, et al. In vivo uptake of liposomal benzoporphyrin derivative and photothrombosis in experimental corneal neovascularization. *Lasers Surg Med*.17:178-188.1995
- 154.**Tae-im Kim, Sang Woo Kim, Sunwoong Kim et al. Inhibition of Experimental Corneal Neovascularization by Using Subconjunctival Injection of Bevacizumab (Avastin). *Cornea* 27:349–352.2008
- 155.**Abdulgani Ahmed, Hasanreisoglu Berati, Akyurek Nalan and Sepici Aylin. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. *Clinical and Experimental Ophthalmology*.37: 730–736.2009
- 156.**Yanyan Koenig, Felix Bock, Folkert Horn, et al. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops againstcorneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 247:1375–1382.2009
- 157.**Ahmed A. Zaki and Samar F. Farid Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol*;1755-3768.2009
- 158.**Felix Bock, Yanyan König, Friedrich Kruse, Martin Baier, Claus Cursiefen Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefe s Arch Clin Exp Ophthalmol* 246 (2): 281-4.2008
- 159.** Barros LF, Belfort R Jr. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea *An Acad Bras Cienc. Sep*;79(3):389-94. 2007
- 160.** Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Vasilios S, et al.Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal Model. *Am J Ophthalmol*.145:424 – 431.2008
- 161.** Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*.235:177–182.1987
- 162.** Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and inhibition in cancer. *The Oncologist*.8:5–17.2003

- 163.**Bohling T, Hatva E, Kujala M, Claesson-Welsh L, Alitalo K, Haltia M. Expression of growth factors and growth factor receptors in capillary hemangioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*.55:522–7.1996
- 164.**Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 4:121– 33.1993
- 165.**Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 273:13313–6.1998
- 166.**Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res*.5:257–65.1999
- 167.**Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.91: 2890-2894.1994
- 168.**Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol*.152:93–100.1998
- 169.**Mendelsohn J. Blockade of receptors for growth factors: an anticancer therapy—the fourth annual Joseph H Burchenal American Association of Cancer Research Clinical Research Award Lecture. *Clin Cancer Res* 6:747-53.2000
- 170.**Huang SM, Li J, Harari PM. Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther*.1(7):507–14.2002
- 171.** Mete Güler, Turgut Yılmaz, Ibrahim Özercan, Tamer Elkıran. The Inhibitory Effects of Trastuzumab on Corneal Neovascularization. *Am J Ophthalmol*.147:703–708.2009
- 172.**Christiane J. Bruns, Matthew T. Harbison, Darren W. Davis et al. Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Plus Gemcitabine Results in Regression of Human Pancreatic Carcinoma Growing Orthotopically in Nude Mice by Antiangiogenic Mechanisms. *Clinical Cancer Research*, 6, 1936–1948, May 2000
- 173.** Klos KS, Zhou X, Lee S, et al. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. *Cancer*.98:1377–1385.2003
- 174.** Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res* 12:7242–7251.2006
- 175.**Louis Hoffart, Frederic Matonti, John Conrath, Laurent Daniel, Bernard Ridings, Guillaume S Masson and Frederic Chavane Inhibition of corneal neovascularization after

alkali burn: comparison of different doses of bevacizumab in monotherapy or associated with dexamethasone. Clin Exp Ophthalmol 38(4):346-52.2010

176.Ormerod LD, Abelson MB. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter disc. Invest OphthalmolVis Sci.30: 2148–53.1989

177: Axer-Siegel R, Herscovici Z, Hasanreisoglu M et al.Effect of intravitreal bevacizumab (avastin) on the growing rabbit eye. Curr.Eye Res.34(8):660-665.2009

178. Tao W. Liou GI, Wu X, Reinach PS, ET_B and epidermal growth factor receptor stimulation of wound closure in bovine corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis.Sci,36:2614-2622,1995.