

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

**DENEYSEL KORNEAL NEOVASKÜLARİZASYON
MODELİNDE BEVACİZUMAB VE MOTESANİB ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Mukaddes ÇELENK

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILDIRIM

ELAZIĞ
2021

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Metin Kaya GÜRGÖZE

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILDIRIM

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

—

.....

—

.....

—

.....

—

.....

—

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve cerrahi deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Doç. Dr. Mehmet BALBABA, Dr. Öğr. Üyesi Onur ÇATAK ve Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILDIRIM’a sonsuz saygı, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında desteklerini gece gündüz demeden esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILDIRIM’a ve laboratuvar çalışmalarında destek olan Arş. Gör. Dr. Ahmet TEKTEMUR’a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitim süresince beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma da ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Zorlu eğitim hayatımın her adımında desteklerini esirgemeyen, üstün bir fedakârlık ve özveri gösteren çok kıymetli ailem ve sevgili eşim Dr. Yusuf Bilal ÇELENK’e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mukaddes ÇELENK

ÖZET

Kornea şeffaf ve avasküler yapısı ile uygun bir ön kırılma yüzeyi sağlamak için gereklidir. Kornea avasküleritesini korumak, kornea fizyolojisinin hayati bir özelliğidir. Fiziksel, kimyasal ya da patolojik travmalar sonucu ortaya çıkabilen korneal neovaskülarizasyon; düzensiz optik yüzeye, zayıflamış gerilme mukavemetine ve yetersiz bariyer işlevi ile fonksiyonel olarak ciddi görme kaybına yol açabilir. Çalışmamızın amacı; deneysel korneal neovaskülarizasyon modelinde topikal Bevacizumab ve topikal Motesanib'in etkinliklerinin, Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile VEGF-A mRNA, VEGFR-2 mRNA ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülen mikro RNA ifade düzeyleri ile karşılaştırılması ve topikal Motesanib'in en etkin dozunun tespit edilmesidir.

42 adet Wistar Albino cinsi ratlar rastgele olarak her grupta eşit sayıda rat olacak şekilde altı gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışında bütün gruplara korneal koterizasyon uygulandı. Grup I (kontrol)'e herhangi bir tedavi uygulanmadı. Grup II (sham)'e DMSO günde 3 defa uygulandı. Grup III' e 5 mg/ml topikal Bevacizumab damla günde 3 defa uygulandı. Grup IV'e 2.5 mg/ml, grup V'e 5 mg/ml, grupVI'ya 7.5 mg/ml topikal Motesanib damla günde 3 defa uygulandı. Yedi günlük tedavi süresinin ardından, genel anestezi altında tüm ratların korneal fotoğrafları çekildi. Neovaskülarizasyon alanlarının tüm korneal yüzeye oranı belirlendi. Kornealar ameliyathane mikroskopu altında 4 mm'lik panç yardımı ile eksize edildi, ardından ratlar dekapite edildi. Alınan kornealarda qRT-PCR yöntemi ile VEGF-A mRNA, VEGFR-2 mRNA, miRNA-21, miRNA-27a, miRNA-31, miRNA-126, miRNA-184 ve miRNA-204 parametreleri değerlendirildi.

Korneal neovaskülarizasyon alanlarının tüm korneaya yüzdesi, tedavi gruplarında DMSO grubuna oranla daha düşük saptandı. VEGF-A mRNA düzeyleri tüm tedavi gruplarında; kontrol grubuna ve DMSO grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı saptandı ($p<0.05$). Tedavi grupları arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$). VEGFR-2 mRNA ifade düzeyleri açısından tüm tedavi gruplarında; kontrol grubuna ve DMSO grubuna oranla azaldığı izlendi. Tedavi grupları arasında, Motesanib 7,5 mg/ml grubunun diğer tedavi gruplarına (Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5

mg/ml) oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda VEGFR-2 mRNA ifade düzeyinde azalma saptandı (sırasıyla; $p=0.016$, $p=0.046$ ve $p=0.015$) Ayrıca, çalışmada değerlendirilen miRNA'lar içerisinde sadece miRNA-126'nın ifade düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde değişiklikler tespit edildi. Tedavi grupları arasında anlamlı değişim izlenmedi.

Sonuç olarak korneal neovaskülarizasyon belirteci VEGF-A mRNA ve VEGFR-2 mRNA düzeylerinde azalma sağlaması ile Motesanib; korneal neovaskülarizasyon tedavisinde yeni bir ajan olarak kullanılabilir. Motesanib 7.5 mg/ml'nin diğer tedavi dozlarına ve Bevacizumab 5 mg/ml oranla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde VEGFR-2 mRNA düzeyini baskılamış olması, Bevacizumab'dan daha etkili olabileceğini ve doz bağımlı etkinliğinin artabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmada değerlendirilen miRNA'lar içerisinde anlamlı değişimi tespit edilen miRNA-126'nın proanjiogenik bir genetik marker olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Motesanib'in kornea neovaskülarizasyonu üzerine etkinliği ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Korneal neovaskülarizasyon, Bevacizumab, Motesanib

ABSTRACT

The cornea with its transparent and avascular structure is necessary to provide a suitable anterior refractive surface. Maintaining corneal avascularity is a vital feature of corneal physiology. Corneal neovascularization, which may occur as a result of physical, chemical or pathological traumas, can lead to functionally severe vision loss with irregular optical surface, weakened tensile strength and inadequate barrier function. The aim of our study; comparison of the efficacy of topical Bevacizumab and topical Motesanib in experimental corneal neovascularization model through quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) method, VEGF-A mRNA, VEGFR-2 mRNA and microRNA expression levels that are predicted to be used as biomarkers and determining the most effective dose of topical Motesanib.

42 Wistar Albino rats were randomly divided into six groups with an equal number of rats in each group. Corneal cauterization was applied to all groups except the control group. Group I (control) did not receive any treatment. Group II (sham) were applied DMSO 3 times a day. Group III were applied 5 mg/ml topical Bevacizumab drops to 3 times a day. Topical Motesanib drops of 2.5 mg/ml were applied to group IV, 5 mg/ml to group V, and 7.5 mg/ml to group VI, 3 times a day. After seven days of treatment, corneal photographs of all rats were taken under general anesthesia. The ratio of neovascularization areas to the entire corneal surface was determined. The corneas were excised with a 4 mm punch under the operating microscope, then the rats were decapitated. VEGF-A mRNA, VEGFR-2 mRNA, miRNA-21, miRNA-27a, miRNA-31, miRNA-126, miRNA-184 and miRNA-204 parameters were evaluated by qRT-PCR method in the removed corneas.

The percentage of corneal neovascularization areas to the entire cornea was lower in the treatment groups compared to the DMSO group. VEGF-A mRNA levels in all treatment groups; It was found to be statistically significantly decreased compared to the control group and the DMSO group ($p < 0.05$). There was no significant difference between the treatment groups ($p > 0.05$). VEGFR-2 mRNA expression levels in all treatment groups; It was observed that it decreased

compared to the control group and DMSO group. Among the treatment groups, there was a statistically significant decrease in VEGFR-2 mRNA expression level in the Motesanib 7.5 mg/ml group compared to the other treatment groups (Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2.5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml) (respectively; $p=0.016$, $p=0.046$ and $p=0.015$) In addition, statistically significant changes were detected in the expression levels of only miRNA-126 among the miRNAs evaluated in the study. No significant change was observed between the treatment groups.

In conclusion, motesanib can be used as a new agent in the treatment of corneal neovascularization because it reduces the levels of VEGF-A mRNA and VEGFR-2 mRNA, which are corneal neovascularization markers. The fact that Motesanib 7.5 mg/ml suppressed VEGFR-2 mRNA level at a statistically significant level compared to other treatment doses and Bevacizumab 5 mg/ml suggests that it may be more effective than Bevacizumab and its dose-dependent effectiveness may increase. In addition, we think that miRNA-126, whose significant changes were detected among the miRNAs evaluated in the study, can be used as a proangiogenic genetic marker. Further studies are needed to evaluate the efficacy and safety of motesanib on corneal neovascularization.

Keywords: Corneal neovascularization, Bevacizumab, Motesanib

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	2
1.1.1. Kornea	2
1.1.1.1. Korneanın makroskopik anatomisi	3
1.1.1.2. Korneanın mikroskopik anatomisi	3
1.1.1.3. Korneanın optik özellikleri	3
1.1.1.4. Korneanın innervasyonu	4
1.1.1.5. Korneanın gözyaşı film tabakası	5
1.1.1.6. Korneanın tabakaları	7
1.1.1.6.1. Epitel ve bazal membran	7
1.1.2. Kornea Embriyolojisi	11
1.1.3. Kornea Fizyolojisi	12
1.1.4.Kornea Yara İyileşmesi	14
1.1.4.1. Korneal Epitelyal Yara İyileşmesi	14
1.1.4.2. Korneal Stromal Yara İyileşmesi	15
1.1.4.3. Kornea Endotelyal Yara İyileşmesi	16

1.1.5. Korneal Neovaskülerizasyon	17
1.1.5.1. Tarihçe	17
1.1.5.2. Prevalansı	17
1.1.5.3. Patofizyolojisi	18
1.1.5.4. Etiyolojisi	20
1.1.5.5. Korneal Neovaskülerizasyonunu Uyaran Faktörler (Proanjiogenik Faktörler)	21
1.1.5.6. Korneal Neovaskülerizasyonunu İnhibe Eden Faktörler (Antianjiogenik Faktörler)	21
1.1.5.7. Korneal Vaskülerizasyonun Değerlendirilmesi	22
1.1.5.8. Korneal Neovaskülerizasyon Fazları	24
1.1.6. Mikro RNA	26
1.1.6.1. Mikro RNA	26
1.1.6.2. Mikro RNA Biyogenezi	26
1.1.6.3. Mikro RNA'lar ve Korneal Neovaskülerizasyon İlişkisi	27
1.1.6.3.1. MiRNA-21	27
1.1.6.3.2. MiRNA-27	28
1.1.6.3.3. MiRNA-31	28
1.1.6.3.4. MiRNA-126	28
1.1.6.3.5. MiRNA-184 ve MiRNA-204	29
1.1.7. Korneal Neovaskülerizasyon Tedavisi	29
1.1.7.1. Steroid	30
1.1.7.2. Non-Steroid Anti İnflamatuar İlaçlar	30
1.1.7.3. Siklosporin A	31
1.1.7.4. Anti-Vegf Ajanlar	31
1.1.7.5. Kornea Nakli	32

1.1.7.6. Laser/ Fototerapi	33
1.1.7.7. Enjeksiyon Tedavileri	34
1.1.8. Bevacizumab	34
1.1.9. Motesanib	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	41
2.1. Gruplar	41
2.2. Anestezi Tekniği	42
2.3. Korneaya Kimyasal Koterizasyon Yapılması	42
2.4. İlaçlar	43
2.5. Muayene ve Enükleasyon	43
2.6. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi	43
2.7. Kantitatif Real-Time PCR ile İnceleme	44
2.7.1. Total RNA İzolasyonu	44
2.7.2. Komplementer DNA Sentezi	44
2.7.2.1. mRNA Analizi için Komplementer DNA Sentezi	44
2.7.2.2. miRNA Analizi için Komplementer DNA Sentezi	45
2.7.3. Kantitatif Real Time PCR ile Komplementer DNA Amplifikasyonu	45
2.8. İstatistiksel Analiz	48
3. BULGULAR	49
3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması	49
3.2. Kantitatif RT-PCR Bulguları	50
4. TARTIŞMA	55
5. KAYNAKÇA	65
6. ÖZGEÇMİŞ	87

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan qRT-PCR mRNA primerleri	46
Tablo 2: Çalışmada kullanılan qRT-PCR miRNA primerleri	47
Tablo 3: Farklı uygulamaların qRT-PCR ile VEGFA ve VEGFR-2'nin mRNA ifadeleri üzerine etkileri	52
Tablo 4: qRT-PCR ile miRNA ifadeleri üzerindeki kat değişimleri	54



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Korneal sinirlerin şematik gösterimi	4
Şekil 2: Gözyaşı filminin tabakaları	5
Şekil 3: Gözyaşı üretiminin sinirsel komponenti	6
Şekil 4: Korneal tabakalar	11
Şekil 5: Gözün 6-8. haftalar arası embriyolojik gelişimi	12
Şekil 6: Korneal neovaskülarizasyonu etkileyen proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler	20
Şekil 7: Farklı görüntüleme yöntemleri altında korneal neovaskülarizasyon .	23
Şekil 8: Neovaskülarizasyona yol açan anjiyojenik süreç.	25
Şekil 9: Memeli hücrelerinde miRNA biyosentezi ve işlevleri	27
Şekil 10: VEGF, PDGF, KIT inhibitörü olan Motesanib molekülünün şematik görünümü	38
Şekil 11: Motesanib molekülünün kimyasal yapısı	40
Şekil 12: %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış aplikatör çubuk	42
Şekil 13: Gümüş nitrat aplikatör çubuk ile korneal kimyasal yanık oluşturma	43
Şekil 14: Grup 1, sağlıklı kontrol grubu sağ kornea ve negatif görüntüleri	49
Şekil 15: Grup 2, DMSO grubu sağ kornea ve negatif görüntüleri	50

KISALTMALAR LİSTESİ

bFGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
cDNA	: komplementer DNA
COX-2	: Siklooksijenaz Enzimi
DLL4	: Delta Benzeri Ligand
DMSO	: Dimetilsülfatoksidad
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Extracellular Matrix, Ekstraselüler Matriks, Hücre Dışı Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü Ailesi
FIH-1	: HIF-1 α 'yı İnhibe Eden Faktör
FND	: Fine Needle Diathermy, İnce İğne Diatermi
GAG	: Glikozaminoglikan
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HGF	: Hepatocyte Growth Factor, Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF	: Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IgG1	: İmmünoglobulin G1
IL	: İnterlökin
KDR	: Kinase İnsert Domain Receptor
KGF	: Keratinocyte Growth Factor, Keratinosit Büyüme Faktörü
mAb	: monoklonal antikor
MiRNA	: Mikro RNA, Mikro Ribonükleik Asit
MMP	: Matriks Metaloproteinaz
ncRNA	: Non-Coding RNA, Kodlanmayan RNA
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NSAİ	: Non-Steroid Anti-İnflamatuar İlaç
OGF	: Opioid Büyüme Faktörü
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor, Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR	: Platelet Derived Growth Factor Receptor, Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü

PDR	: Proliferatif Diyabetik Retinopati
PHD	: Prolyl Hidroksilaz
PPARγ	: Peroksizom Proliferatör İle Aktive Edilen Reseptör Gamma
qRT-PCR	: Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction, Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	: RNA-İnduced Silencing Complex, RNA Kaynaklı Susturma Kompleksinin
RNA	: Ribonükleik Asit
ROP	: Prematür Retinopatisi
SBNP	: Subbasal Sinir Pleksusu, Subbasal Never Plexus
shRNA	: Short Hairpin RNA
SPRED-1	: Sprouty-Related EVH1 Domain-Containing Protein 1
TGF-B	: Transforming Growth Factor- Beta
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TPM1	: Tropomiyosin 1
Tβ 4	: Timozin-B 4
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VPF	: Vasküler Geçirgenlik Faktörü
YBMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenereasyonu

1. GİRİŞ

Kornea ve sklera, göz küresinin dış yüzeyini oluşturur. Bu yüzeyin temel amacı göz içindeki yapıları korumaktır. Kornea, yapısal bariyer görevi gören ve gözü enfeksiyonlara karşı koruyan şeffaf avasküler bir dokudur. Gözyaşı filmi ile birlikte ışığın kırılması için uygun yüzeyi sağlar (1). Hücresel ve asellüler bileşenlerden oluşur. Hücresel bileşenler arasında epitel hücreleri, keratositler ve endotelial hücreler bulunur. Asellüler bileşenler, kollajen ve glikozaminoglikanlardır (GAG). Epitel hücreleri epidermal ektodermiden; keratosit ve endotel hücreleri, nöral krestten kök almaktadır. Kornea tabakaları arasında epitel, bowman tabakası, stroma, descemet membran, dua ve endotel bulunur (2). Korneanın saydamlığı, kollajen lamellerinin düzenli dizilimi, kısmi dehidratasyon ve damarsız yapısı sayesinde korunmaktadır (3-5).

Korneadaki anormal, yeni gelişen kan damarları, önceden var olan perikorneal vasküler yapılardan filizlenir. Etiyolojik nedene spesifik olmayan bir yanıt olan korneal neovaskülarizasyon; konjenital hastalıklar, kontakt lensle ilişkili hipoksi, inflamatuvar bozukluklar, kimyasal yanıklar, limbal kök hücre eksikliği, dejenerasyon, alerji, travma, enfeksiyon gibi çok çeşitli kornea patolojilerinde ortaya çıkar. Bu patolojiler, proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasında, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonuna ve kornea stromasına göçüne neden olabilecek bir dengesizliğe yol açar (6). Sonuç olarak, ortaya çıkan yapı optik açıdan yetersizdir ve görmenin bozulmasına neden olur. Ayrıca bu durum; zayıflamış gerilme mukavemetine ve yetersiz bariyer işlevine yol açar.

Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) proteolitik aktivite, migrasyon, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi anjiogenezin birçok basamağında görev alır (7, 8). VEGF korneada epitel hücrelerinden, keratositlerden, korneal ve vasküler endotel hücreleri tarafından salınmaktadır. VEGF'in, VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olmak üzere üç adet tirozin kinaz reseptörü mevcuttur (7). Korneal neovaskülarizasyonda VEGF'in önemli rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (9-11).

Mikro Ribonükleik Asit (miRNA) ilk kez 1993 yılında keşfedilen, ancak isimlendirilmesi 2001 yılında gerçekleşen tek sıralı nükleotid dizisinden oluşan

moleküllere verilen isimdir (12). Yapısal olarak, 20-25 nükleotid uzunlukta tek sarmal RNA molekülleridir. Çoğu miRNA, Deoksiribonükleik Asit (DNA)’ten transkribe edilen genler tarafından (intron bölgesi) kodlanır, ekzonlar veya intergenik bölgeler tarafından da kodlanabilirler. Proteine translasyon (son ürün) olmaz ve bu yüzden “non-coding RNA” parçacığı (protein ürüne dönüşmeyen RNA) olarak bilinirler. Genlerin protein ürünlere dönüşmesini düzenlerler (13).

Motesanib; VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-KIT inhibe eden multiple tirozin kinaz inhibitörüdür (14). Önceki klinik ve deneysel kanıtlar, Motesanib'in güçlü antianjiogenik etkilere sahip olduğunu ve tümör anjiogenezini baskıladığını göstermiştir. Esas olarak endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve canlılığı ile ilişkili VEGF sinyal yolunu bloke ederek işlev görür (15, 16). Bir çalışmada Motesanib'in oral uygulaması rat kornea modelinde VEGF ile indüklenen anjiogenezini güçlü bir şekilde inhibe ettiği, iyi tolere edildiği ve vücut ağırlığı veya hayvanların genel sağlığı üzerinde önemli bir toksik etkisi olmadığı tespit edilmiştir (17). Başka bir çalışmada topikal Motesanib'in, deneysel fare modelinde laser kaynaklı koroidal neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (18).

Korneal neovaskülarizasyonda önemli rol oynayan VEGF'in inhibe edilmesi neovaskülarizasyonun durdurulması hatta geriletilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan korneal neovaskülarizasyonunda topikal uygulamada Motesanib'in etkinliğinin ve etkin olan dozunun bulunması, topikal Bevacizumab ile karşılaştırılması ve miRNA subtipleri ve VEGF üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

1.1.Genel Bilgiler

1.1.1. Kornea

Kornea ve sklera, göz küresinin dış yüzeyini oluşturur (1). Bu yüzeyin temel amacı göz içindeki yapıları korumaktır. Kornea, yapısal bir bariyer görevi gören ve gözü enfeksiyonlara karşı koruyan şeffaf avasküler bir dokudur (19, 20). Gözyaşı filmi ile birlikte ışığın kırılması için uygun yüzeyi sağlar. Kornea, gözün kırma gücünün üçte ikisini oluşturmaktadır (1).

1.1.1.1. Korneanın makroskopik anatomisi

Kornea, avasküler ve saydam karakterdedir. Dışbükey ve asferik bir yapıya sahiptir, yatay olarak 11–12 mm ve dikey olarak 9–11 mm'dir (20). Ön eğrilik çapı (konveks) 7,8 mm ve arka eğrilik çapı (konkav) yaklaşık 6,5 mm'dir. Kornea yaklaşık 40-44 D kırılma gücüne katkıda bulunur ve toplam kırılmanın yaklaşık %70'ini oluşturur. Korneanın kırılma indeksi 1.376'dır (1, 21). Merkezi korneadan çevreye doğru kalınlıkta kademeli bir artış vardır. Doku kalınlığındaki değişiklik, periferik stromadaki kollajen miktarındaki artıştan kaynaklanmaktadır. Farklı değerlendirme yöntemleriyle, normal gözlerde merkezi kornea kalınlığının 551 μ ila 565 μ arasında ve periferik kornea kalınlığının 612 μ ila 640 μ arasında olduğu tespit edilmiştir (22). Kornea kalınlığının yaşla birlikte azaldığı bulunmuştur. Kornea eğriliğinin korunmasında ön korneal stromal sertliğin özellikle önemli olduğu görülmektedir (19).

1.1.1.2. Korneanın mikroskopik anatomisi

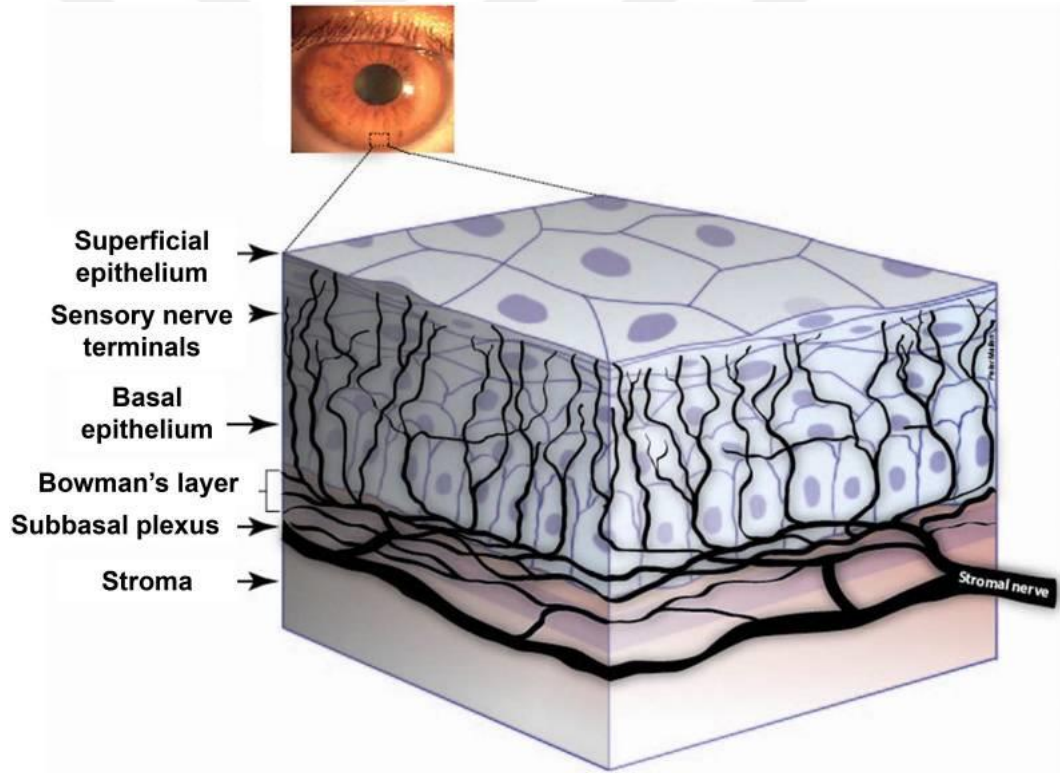
Gözün ön kısmını kaplayan şeffaf doku olan kornea, vücutta en yoğun şekilde innerve edilen dokudur. Altı katmandan oluşur: Epitel, Bowman, Stroma, Descemet zarı, Dua ve Endotel (2, 23).

1.1.1.3. Korneanın optik özellikleri

Korneanın santral kısmı sferik yapıya yakındır. Normal bir gözde yaklaşık 4 mm çapındadır. Bu santral bölgeden uzaklaşıldıkça kornea eğimi azalır, kırıcılığı düşer. Gözün toplam kırıcılığının %70'i korneadan kaynaklanmakta olup, ortalama kırıcılığı 40–44 diyoptri arasındadır (1). Korneanın optik özelliklerini; saydamlığı, yüzey düzgünlüğü, eğimi ve refraktif indeksi belirler. Kollajenin saydamlığı en çok stromadaki kollajen liflerin düzenli dizilişine atfedilmiştir. Kollajen lifler arasındaki mesafenin azaldığı (örn. fibrozis) veya mesafenin arttığı (örn. ödem) durumlarında korneal saydamlık kaybolmaktadır. Korneanın eğiminin ve anatomisinin bozulduğu keratokonus, skar gelişimi, refraktif cerrahi girişimleri veya yaralanma gibi durumlarda optik kalite ve korneal saydamlık bozulur (24).

1.1.1.4. Korneanın innervasyonu

1957'de Kitano, kornea epitelinin innervasyonunun ilk olarak gebeliğin 5. ayında gerçekleştiğini gösterdi (25). Korneal duyu, trigeminal sinirin oftalmik dalı tarafından alınarak merkezi sinir sistemine iletilir. Oftalmik sinirin nazosiliyer dalı, daha ince sinir dallarına ayrılarak korneaya nüfuz eder. Bu dallar, bazal epitel ile bowman tabakası arasında dallanıp korneal yüzeye paralel uzanarak, üstteki kornea epitelini innerve eden subbasal sinir pleksusunu (SBNP) oluşturur (26, 27). Kornea sinir liflerinin aşırı dallanması, her duyuşal akson için geniş innervasyon alanları oluşturur. Milimetrekare başına yaklaşık 7.000 nosiseptörlük merkezi sinir yoğunluğuna sahip olmasıyla kornea ciltten 300 ila 600 kat daha hassastır (28).



Şekil 1: Korneal sinirlerin şematik gösterimi (27)

Korneal sinirler, kornea epitel bütünlüğünü, epitel proliferasyonunu ve yara iyileşmesini düzenlemek için çok önemli olan nöropeptidler, nörotrofinler ve büyüme faktörleri gibi çok sayıda trofik madde salgılar (29, 30).

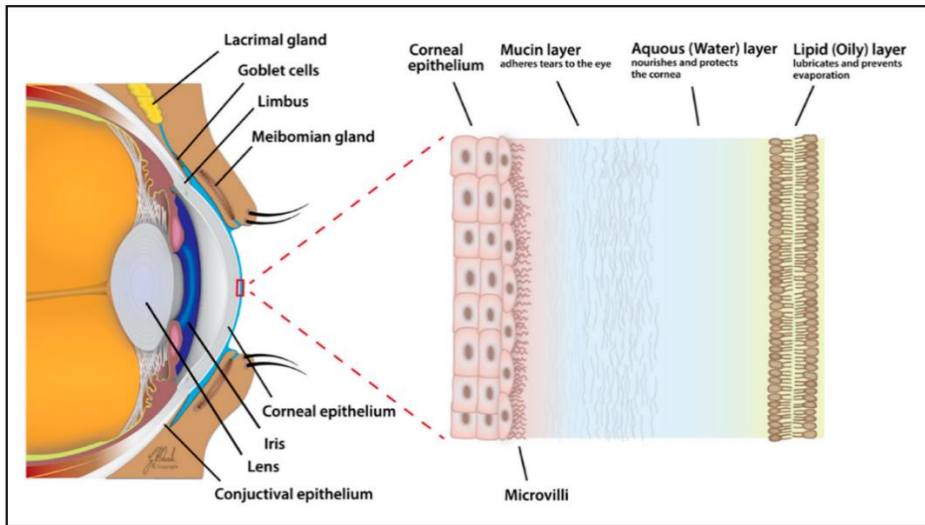
Korneanın innervasyonu, oküler yüzeyin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için kritik öneme sahiptir. Gözdeki cerrahi prosedürler, travma ve hastalıkların tümü potansiyel olarak kornea sinirlerine zarar verebilir ve hissi azaltarak geçici veya uzun süreli oküler komplikasyonlara neden olabilir (23).

Korneanın innervasyon duyarlılığı yaşla birlikte azalma eğilimindedir. Bununla birlikte, mevcut araştırmalar, büyük olasılıkla görüntüleme teknikleri ve analizlerdeki farklılıklar nedeniyle, yaşlanmanın SBNP yoğunluğundaki değişikliklerle korelasyonuna ilişkin çelişkili sonuçlar vermektedir.

Tandem tarayıcı konfokal mikroskopiden elde edilen veriler, SBNP yoğunluğunun yaştan bağımsız bir şekilde korunduğunu öne sürerken, laser taramalı konfokal mikroskopi yaşla birlikte korneal epitel sinir terminallerinde belirgin bir kayıp olduğunu ve SBNP yoğunluğunun azaldığını ortaya koymaktadır (31, 32). Parissi ve ark, SBNP yoğunluğunda yıllık yüzde 0,25 ila yüzde 0,9'luk bir düşüş olduğunu tespit etmiştir (33). Sonuç olarak korneal sinirler, göz sağlığı ve görmeyi korumada önemli bir rol oynar (23).

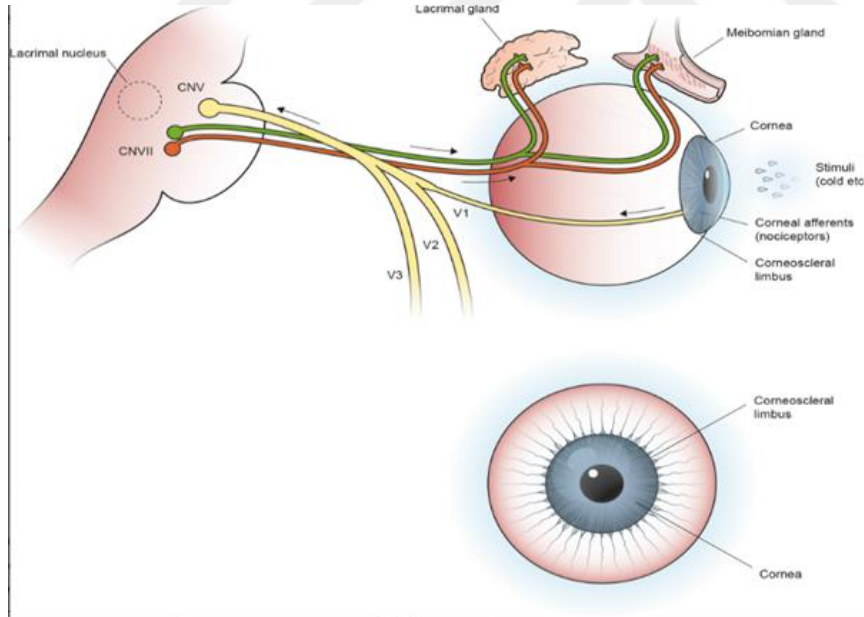
1.1.1.5. Korneanın gözyaşı film tabakası

Kornea gözyaşı film tabakası ile epitel yüzeyindeki düzensizliklerinden arınır. Işığın temas ettiği korneanın ilk tabakası gözyaşı film tabakasıdır. Bu tabaka oküler yüzeye kayganlık ve hidrasyon sağlar. Aynı zamanda oksijen, immünoglobulinler, lizozimler, laktoferrin ve α - ile β -defensin kaynağıdır (34, 35).



Şekil 2: Gözyaşı filminin tabakaları (36)

Gözyaşı filmi üç farklı katmandan oluşur. En yüzeyel katman, meibomian bezlerinin lipid salgılarından oluşur. Lipid salgı sudan daha az yoğun olduğu için, sekresyonlar pürüzsüz bir kırılma yüzeyi oluşturmak için gözyaşı filminin üstünü kaplar. Bu lipid tabaka ayrıca gözyaşı filminin buharlaşmasına karşı önemli bir bariyer oluşturur. Gözyaşı filminin aköz orta tabakası, lipid tabakanın hemen altında yer alır. Üst temporal bölgede bulunan gözyaşı bezi tarafından üretilir. Aköz salgı, superior fornikste ki kanallardan oküler yüzey üzerine salgılanır. Ayrıca bu aköz tabakaya katkıda bulunan konjonktiva stroması içinde gömülü çok sayıda dağılık aksesuar gözyaşı bezi vardır. En içteki müsin tabakası esas olarak konjonktival goblet hücreleri tarafından üretilir, ancak korneanın epitel hücreleri ve konjonktiva da katkıda bulunur. Şu anki anlayış, üç tabakanın hepsinin oküler yüzey üzerinde bir jel şeklinde olduğudur. Konjonktival goblet hücreleri, korneal birikintilerin giderilmesi ve immün mekanizma işlevlerini yerine getirmede önemli görünmektedir (35).



Şekil 3: Gözyaşı üretiminin sinirsel komponenti. Çevresel faktörler korneoskleral limbusta bir pleksus oluşturan ve korneaya nüfuz eden nosiseptörleri uyarır. Bu uyarı trigeminal (kraniyal sinir V; CNV) sinir ile beyin sapına iletilir. Parasempatik refleks döngüsü sonucunda, fasyal sinir (CNVII) lakrimal bez, meibomian gland, konjonktival goblet hücrelerinden aköz, lipid ve müsin içeriği salgılatır (37).

1.1.1.6. Korneanın tabakaları

1.1.1.6.1. Epitel ve bazal membran

Korneal epiteli, oldukça homojen bir şekilde 5-7 hücre katmanından oluşur. Yaklaşık 50 µ kalınlığındadır. Epitel, düzgün bir yüzey sağlamak için tek tiptir ve nonkeratinize skuamöz epitelden oluşur. Epitel, gebeliğin 5 ila 6. haftaları arasında yüzey ektoderminden kaynaklanmaktadır. Epitel ve üzerini örten gözyaşı film tabakası simbiyotik ilişkiye sahiptir. Kornea epiteliliyle doğrudan temas halinde olan gözyaşı filminin müsin tabakası, konjonktival goblet hücreleri tarafından üretilir. Müsin tabakası kornea epitel hücrelerinin glikokaliksiyle yakından etkileşime girerek, göz kapağı kapanıp açıldığında gözyaşı filminin hidrofilik bir şekilde yayılmasına izin verir (38).

Kornea epitel hücrelerinin yaşam süresi 7 ila 10 gündür; involüsyon, apoptoz ve deskuamasyon geçirir. Epitel, üç tip hücre içeren 5-6 katmanlı bir yapıya sahiptir: skuamöz yüzey hücreler, kanat hücreler ve kolumnar bazal hücreler. Skuamöz yüzey hücreleri; düz poligonal hücrelerden oluşan 2-3 katmandır. Yaklaşık 2-6 µ kalınlığında 40-60 µ çapa sahiptirler. Yüzeydeki mikrovilluslar yüzey alanını artırır. Desmozomlar, skuamöz yüzey hücreler arasındaki sıkı bağlantıyı oluşturur. Kanat hücreleri 2-3 katlıdır ve kanat benzeri bir yapıya sahip oldukları için bu şekilde adlandırılmışlardır. 64 kDa keratin içerirler. Kolumnar bazal hücreler; epitelin kübik veya kolumnar şeklinde olan tek katlı tabakasıdır. Bol miktarda organelleri vardır ve mitotik olarak aktiftirler (39).

Kök hücreler ve geçici amplifiye hücrelerin yanı sıra, bazal hücreler mitoz yapabilen tek kornea epitel hücreleridir. Kanat ve yüzey hücrelerinin kaynağıdır. Epitel hücrelerini birbirine yapışık tutmak için tüm epitel hücrelerinin yan zarları boyunca desmozomlar bulunur. Bazal hücreler, hemidesmozomal bir sistem tarafından alttaki bazal membrana bağlanır. Güçlü bağlanma, epitelin alttaki katmanlardan ayrılmasını önler. Bu bağlanmanın anormal olması, kornea erozyonlarına ve iyileşmeyen epitel kusurlarına neden olur (21).

Epitel hücrelerinin bazal membranı 40-60 nm kalınlığındadır ve bazal hücreler tarafından salgılanan Tip IV kollajen ve lamininden oluşur. Taban zarı

lamina lucida ve lamina densadan oluşur. Bazal epitel hücrelerinden, ankraj fibrilleri, bazal membrandan geçer ve ankraj plakları olarak son bulur. Ankraj fibrilleri Tip VII kollajenden oluşur ve ankraj plakası Tip I kollajenden yapılır. Bazal membran hasar görürse fibronektin seviyeleri yükselir ve iyileşme süreci 6 haftaya kadar sürebilir (40).

Santral ve periferik kornea epitelleri arasında farklılıklar vardır. Merkezi korneada epitel 5-7 katlıdır. Bazal hücreler kolumnar şeklindedir. Melanosit veya langerhans hücresi yoktur. Keratan sülfat içeren düz bir bazal hücre tabakası vardır ve lenfatik sistem yoktur. Periferik korneada epitel 7-10 tabakalıdır. Bazal hücreler kübiktir. Melanositler ve langerhans hücreleri vardır. Taban katmanının dalgalı uzantıları vardır. Keratan sülfat ve lenfatik sistem yoktur (41).

1.1.1.6.1.1. Bowman tabakası

Bowman tabakası, kollajen ve proteoglikanların yoğunlaşmasından oluşmaktadır. 12 µ'luk bir yapıdır, Tip I ve V kollajen ile proteoglikanlardan oluşur. Rejenerasyon yeteneği yoktur. Bowman tabakası, stromanın hemen önünde yer alır ve gerçek bir zar değildir. Stromanın en ön kısmının aselüler yoğunlaşmasıdır. Bu pürüzsüz tabaka, korneanın şeklini korumasına yardımcı olur. Yaralandığında, bu katman yenilenmez ve skar ile sonuçlanabilir (42).

1.1.1.6.1.2. Stroma tabakası

Stromal tabaka; su, inorganik tuzlar, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşan hücre dışı bir matriks (ECM, ekstraselüler matrix) ile kollajen liflerinden oluşur (43). Stroma, korneanın yapısal çerçevesinin çoğuna katkıda bulunur, insanlarda yaklaşık 500 µm ölçülür ve kornea ön-arka ekseninin yaklaşık %90'ını temsil eder (44).

Stroma karakteristik olarak şeffaftır, stromal liflerin ve ECM'in hassas organizasyonu sonucunda meydana gelir. Korneal fibrillerdeki kollajen ağırlıklı olarak Tip I'dir. Tip VI kollajen ve Tip XII kollajen de stromada bulunur (40). Kollajen lifleri, fibril adı verilen paralel demetler halinde düzenlenmiştir. Bu fibriller, tabakalar veya lameller halinde paketlenmiştir. Kornea stroması, her biri

bitişik lameldeki liflere göre dik açılarda düzenlenmiş 200–250 farklı kollajen lamel içerir. Stromadaki kollajen lamellerin içine yerleştirilir. Bu yapılar insanlarda 0,2 mm genişliğe ve 2 µm kalınlığa kadar değişken kalınlıktadır. İnsan korneasının merkezinde yaklaşık 200 kollajen lameli kalınlığı vardır. Ön stromadaki lamellerde tampon yoğunluğu arka stromada olduğundan daha yüksektir. Bu ön lameller oldukça iç içe geçmiş durumdadır, çoğu Bowman katmanına giriyor gibi görünmektedir (45).

ECM; kollajenlerden (Tip I, III, V, VI) ve GAG’lardan oluşur. GAG’lar; keratan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfattan oluşur. GAG’lar ağırlıklı olarak keratan sülfat içerir. Daha az olarak dermatan sülfat ve kondroitin sülfat bulunmaktadır. Hyalüronik asit bebeklik döneminde görülmektedir (46, 47).

Keratositler, stromanın ana hücre tipidir. ECM ortamının korunmasına katkı sağlarlar. Matriks metaloproteinazları (MMP) oluştururken, stromal homeostazın korunmasında önemli olan, kollajen moleküllerini ve GAG’ları sentezleyebilirler. Keratositlerin çoğu ön stromada bulunur (41).

Korneal stroma, insan vücudundaki en yüksek düzeyde innerve edilmiş dokulardan birini temsil eder. Trigeminal sinirin oftalmik bölümünün nazosiliyer dalından gelen duyu sinirleri, radyal olarak ön stroma yoluyla merkezi korneaya doğru seyreder. Bowman tabakası ile ön stroma arasında, bu sinirler subepitelyal sinir pleksusunu oluşturur ve ardından Bowman tabakasından geçerek subbasal epitel sinir pleksusu haline gelir ve bazal epitel tabakasını innerve eder (44).

1.1.1.6.1.3. Dua tabakası

Dua tabakası; pre-descement tabakası olarak da bilinen, iyi tanımlanmış, hücre içermeyen, mekanik olarak güçlü bir tabakadır. Bu tabakanın kalınlığı 6 ila 15 µ arasında değişir. Kollajen liflerden oluşan 5-8 lamel olduğu bulunmuştur. Bu katmanda keratosit yoktur ve hava geçirimsizdir. 0.5-2 bar basınca dayanıklıdır. Çocuklarda da bulunur (2).

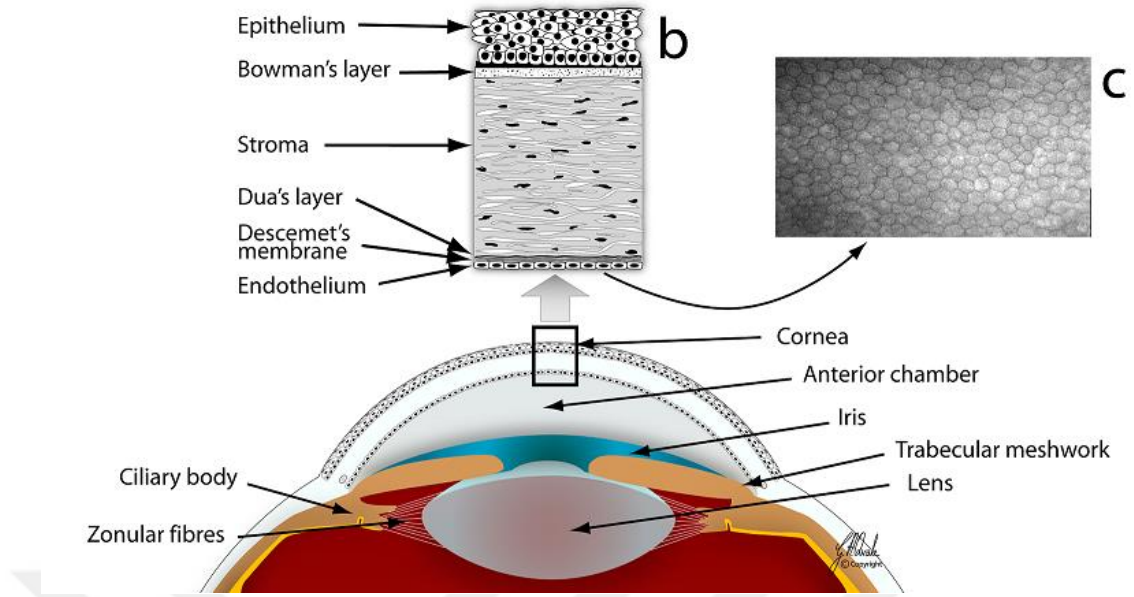
1.1.1.6.1.4. Descemet membranı

Descemet membranı 7 μ 'luk bir yapıdır. Tip IV kollajen ve lamininden oluşur. Endotel hücreleri sürekli olarak Descemet membranını salgılar. Doğumdan önce salgılanan ön 3 μ yapı, belirgin bantlı bir görünüme sahiptir. Descemet membranının doğumdan sonra üretilen zarı bantsızdır ve amorf bir ultrastrüktürel dokuya sahiptir. Descemet membranı yaşla birlikte 10 μ kalınlığa kadar çıkabilir. Descemet membranı elastik bir yapıya sahiptir ve koparken kıvrılır (48).

Descemet membranı, trabeküler ağa periferik kaynaşması ile sürekli ve tekdüze hale gelir. Schwalbe hattı olarak bilinen füzyon bölgesi, Descemet membranının sonunu ve trabeküler ağ örgüsünün başlangıcını tanımlayan gonyoskopik bir dönüm noktasıdır (41).

1.1.1.6.1.5. Endotel tabakası

Endotel tek katmanlı, 5 μ kalınlığında bir yapıdır. Hücreleri altıgen şeklindedir ve metabolik olarak aktiftir. Su içeriğini düzenleyen bir endotel pompası vardır. Endotel, arkadan bakıldığında petek benzeri mozaik olarak görünen tek tabakalı bir yapıya sahiptir. Erken embriyogeneizde, arka yüzey, nöral krestten köken alan düzenli olarak sıralanmış kübik hücrelerden oluşan tek bir tabaka ile kaplıdır. Bireysel hücreler zamanla düzleşmeye devam eder ve yetişkinlikte yaklaşık 4 μ kalınlıkta stabilize olur. Lateral membran, yüksek yoğunluklu Na^+ / K^+ ATPaz pompa bölgelerini içerir. En önemli iki iyon taşıma sistemi; membrana bağlı Na^+ / K^+ ATPaz yolağı ve hücre içi karbonik anhidraz yoludur. Her iki yoldaki aktivite, stromadan aköz hümöre net iyon akışını sağlar. Endotelin bazal yüzeyi, Descemet membranına adezyonu sağlayan çok sayıda hemidesmozom içerir (41,49).

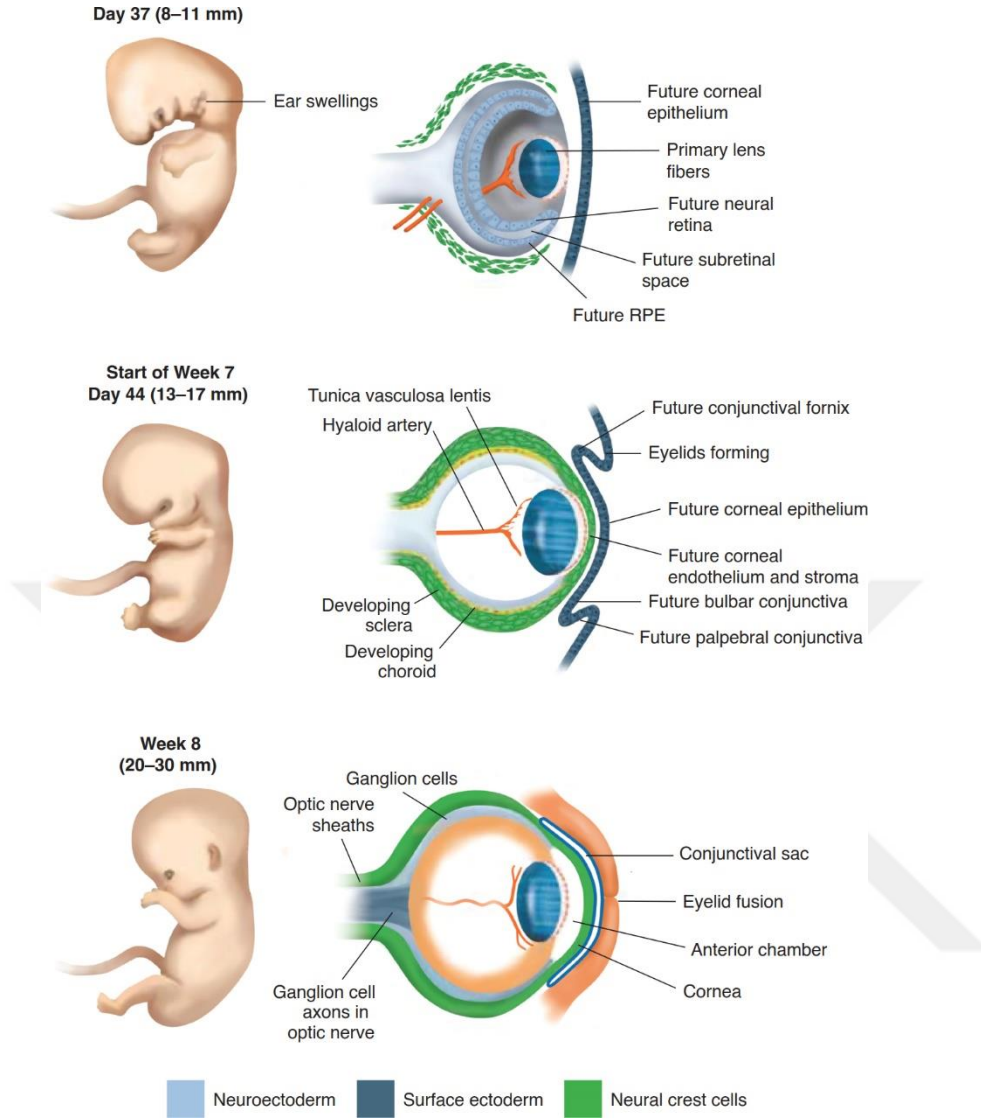


Şekil 4: Korneal tabakalar (50)

1.1.2. Kornea Embriyolojisi

İntrauterin dönemin beşinci haftasında, epitel ve endotel hücreleri nöral krest orjinli olup yüzey ektoderminden gelişirken; on üçüncü haftasında, Descemet membranı yassılaştırmış endotel hücrelerinden gelişir. Mezodermden gelişen stroma, intrauterin altıncı haftanın sonunda oluşmaya başlar ve dördüncü ayda epitel altında yoğunlaşarak Bowman tabakasını oluşturur (51).

Kornea ve ön kamara altıncı hafta sonunda (embriyo yaklaşık 17-18 mm iken) gelişmeye başlar. Altıncı haftaya kadar yüzey epitel ile lens ön yüzü arasındaki boşluk iyi organize olmamış mezenkimal doku ile doludur. Altıncı hafta sonunda mezoderm içinde dar bir şerit halinde beliren boşluk genişlemeye başlar ve mezodermi, korneal stromayı oluşturacak olan ön tabaka ve iris stromasını oluşturacak olan arka tabaka olmak üzere ikiye ayırır. Aradaki boşluk ise ön kamarayı oluşturur. Descemet membranı, ön kamara belirdikten hemen sonra şekillenmeye başlar. Korneoskleral açıdan itibaren iç yüzey boyunca gelişen nöroektodermal kökenli hücreler, arka yüzeyi örten yassı endotel hücrelerine dönüşürler ve endotel ön yüzüne hyalen membran salgırlar (51).



Şekil 5: Gözün 6-8. haftalar arası embriyolojik gelişimi (52)

1.1.3. Kornea Fizyolojisi

İnsan korneası, iki kritik işlevi olan benzersiz bir dokudur. Kornea bir yandan gözün dış kılıfının ön kısmını oluşturur ve gözün iç kısmını dış ortamdan korur. Öte yandan, gözün tek ve en güçlü odaklanma unsurudur. Gözün yaklaşık %80 oranında kırılma gücünü sağlar ve lensin kabaca iki katı kadar güçlüdür. Bu fonksiyonlar nedeniyle kornea hem mekanik olarak güçlü hem de şeffaf yapıya sahiptir (53).

Kornea epitelinin iki önemli görevi vardır. Birincisi normal görme fonksiyonunun devam edebilmesi için gözyaşı ile birlikte düzgün bir yüzey

oluşturmak, ikincisi ise sıkı bağlantılar (tight junctions) ile koruyucu bir bariyer oluşturarak stromaya sıvı ve patojen mikroorganizmaların girişini engellemektir (54).

Kornea epitel hücreleri metabolik olarak en aktif hücrelerdir. Epitel tabakasına oksijen gözyaşı yoluyla diffüzyonla sağlanırken, göz kapalı durumda iken limbal ve tarsal konjonktiva damarlarının da katkısı vardır (55).

Korneaya aminoasit ve vitamin desteği, aköz humörden sağlanır. Glikoz ve glikojen epitel hücrelerinin başlıca enerji kaynağını oluştururlar. Glikoz çoğunlukla aköz humörden elde edilmekle beraber, %10 veya daha azı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilir. Epitel hücreleri glikojeni depolayabilirler, böylelikle hipoksi ve travma gibi durumlarda bu kaynağı kullanabilmektedirler. Endotel hücreleri hem aktif bir pompa gibi çalışıp, hem de mekanik bir bariyer teşkil ederek, korneanın şeffaf ve saydam kalmasını sağlarlar. Aköz humörden sağlanan glikoz ve oksijen endotel hücrelerinin ana enerji kaynağıdır. Aktiviteleri için anaerobik, daha az olarak da aerobik yolları kullanırlar. Kornea endoteli dehidratasyon görevini yaptığı sürece, stromanın su içeriği %78 ve kalınlığı 500 µm civarında kalarak, korneal saydamlığı korur ve korneanın normal fonksiyonlarını sürdürmesini sağlar. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bariyer görevi görürler. Endotel tabakası metabolik aktivitesini stromadan aköz humöre su pompalamak üzere gerçekleştirir. Net su akımı için Na^+ , K^+ ve H^+ iyon konsantrasyon gradientinin gerçekleşmesi gereklidir. Endotel hücre yüzeyindeki iyon pompaları ile gerekli gradient sağlanır. Endotel hücrelerin dış kenarlarına lokalize olan Na^+/K^+ ATPaz pompa sistemi enerji harcayarak sodyumun hücre dışına çıkmasını sağlar, bunu suyun hücreyi terk etmesi izler. Böylece kornea stromasından ön kamaraya doğru devamlı sıvı geçişi olurken, korneanın şeffaflığı korunur. Korneadan ön kamaraya geçen sıvının geri dönmesi, endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile önlenmektedir (56).

Hekzagonal yapıda olan endotel hücreleri, sıvı regülasyonu için ideal dizilimi oluşturmaktadır. Bu geometrik düzen maksimum sayıda hücre ve maksimum sayıda pompa yoğunluğunu temin etmektedir. Korneanın şeffaflığının korunması, endotel hücrelerinin etkin fonksiyonlarının yanı sıra, korneada damarsal

yapıların bulunmamasına, sinir liflerinin myelinsiz olmasına ve stroma tabakasındaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine bağlıdır (57).

1.1.4.Kornea Yara İyileşmesi

Kornea yara iyileşmesi, diğer yara iyileşmelerinde olduğu gibi dört aşamaya ayrılmış karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Bu dört aşama; hemostaz, inflamasyon, hücre çoğalması ve remodeling aşamalarıdır. Yara iyileşmesi, çeşitli farklı hücre tiplerinin etkileşimini, eksik doku veya hücrel yapıların yeniden yerine konması ile sonuçlanan planlanmış bir dizi hücrel olayı kapsar (53). Bu süreç, epitelyal hücre proliferasyonu ve göçünü, stromal hücre ölümünü, keratosit proliferasyonunu, miyofibroblast oluşumunu, kollajen birikimini ve enflamatuar hücre infiltrasyonunu içerir. Yara iyileşmesinde keratositlerin miyofibroblastlara dönüşmesi için korneal epitel ile stroma arasındaki etkileşimin önemli olduğu bilinmektedir (58). Epitel ve stromal hücreler arasındaki bu hücreler arası sinyal sitokinler, nöropeptitler, büyüme faktörleri, kemokinler ve MMP'lar aracılığıyla gerçekleşir. Bu faktörler aracılığıyla kornea epitel hücreleri, kornea yara bölgelerinde keratosit çoğalmasını uyarır (59). Kornea epitel, stroma ve endotel hücrelerinin iyileşme süreçlerinde ve hücreye özgü farklılıkların yanı sıra birçok benzerlikler de gözlenmektedir. Kornea epitelinin iyileşmesi büyük ölçüde limbal kök hücrelere ve bazal membranın yeniden şekillenmesine bağlıdır. Stromal iyileşme sırasında, keratositler miyofibroblastlara dönüşür. Endotel hücreleri çoğunlukla göç ve yayılma yoluyla iyileşir ve hücre proliferasyonu ikincil bir rol oynar (60).

Kornea, yara iyileşmesi için bir tedavi stratejisi belirlerken dikkate alınması gereken karakteristik özelliklere sahiptir. Korneanın en belirgin özellikleri arasında; limbus zonunu içermesi, avasküler bir doku olması ve immün ayrıcalığının olması sayılabilir (53).

1.1.4.1. Korneal Epitelyal Yara İyileşmesi

Korneal epitel onarımını ve yenilenmesini destekleyen kök hücrelerin bulunduğu limbus zonunu içermesi ile kornea epiteli kendi kendini rejenerasyon

sağlayabilen bir dokudur (61, 62). Çeşitli fiziksel, kimyasal ve patolojik hasarlar kornea epiteline zarar vererek epitel bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir. Kornea şeffaflığının devamı için kornea epitel yüzeyinin bütünlüğünün ve fonksiyonelliğinin korunması gereklidir (60).

Korneal epitelyal yara iyileşmesi; hücre göçü, proliferasyon, adezyon ve diferansiyasyon dahil olmak üzere bir dizi mekanizmayı içerir. Epitelyal onarımının sağlanması için büyüme faktörleri/sitokinler ve ECM sinyali yara kenarı ile etkileşime geçer. Epitelyal yara iyileşmesi iki farklı faz içerir: Başlangıç latent faz ve kapanma fazı. Başlangıç fazı, epitel hücrelerinin yara kenarına göçünü tetiklemek için hücrel reorganizasyonu içerir (63, 64). Kapatma fazı, hücre mitozundan bağımsız hücre göçü ile başlayan ardından hücre çoğalması ve farklılaşması ile devam eden, nihayetinde orjinal çok hücreli epitel tabakasını oluşturan birkaç sıralı olayı içerir (64).

Büyüme faktörleri ve sitokinler; yara iyileşmesinde rol oynayan hücrelerin büyümesini, çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını, adezyonunu, ECM birikimini ve proteinaz düzenlemesini uyaran önemli düzenleyicilerdir. Korneal hücreler, büyüme faktörleri ve sitokinleri eksprese ederler. Bunlar içerisinde; epidermal büyüme faktörü ailesi (EGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforming büyüme faktörü (TGF- β), tümör nekroz faktörü (TNF)- α , trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), timozin- β_4 (T β_4), interlökinler (IL-6 ve -10), sinir büyüme faktörü (NGF), opioid büyüme faktörü (OGF) ve metiyonin-enkefalin yer alır (54, 60, 65).

1.1.4.2. Korneal Stromal Yara İyileşmesi

Korneal stromal yaralar, refraktif cerrahi ve travmalardan kaynaklı olarak diğer kornea tabakalarının yaralanmalarına nispeten daha sık görülür. Bunun yanı sıra, korneal epitelin fiziksel veya kimyasal yaralanması ile de stromal hücreler zarar görebilir (60).

Stromal yara iyileşmesi karmaşık bir süreçtir. Yara bölgesindeki ilk yanıt, kornea epitelinin altındaki keratositlerin ani apoptozu veya nekroza uğramasıdır (66). Yaraya bitişik olan keratositler proliferasyon ve migrasyonun ardından, aktifleşerek fibroblastlara dönüşür. Fibroblastlar da miyofibroblastlara dönüşür

(67). Fibroblastlar ve miyofibroblastlar geçici bir matriks iskeleti oluşturur (68). Epitelyal ve stromal hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar kemokinler, inflamasyonu tetikler. Bu inflamasyon, apoptotik ve nekrotik kalıntıların temizlenmesine yardımcı olur. Stromal yaralar; epitel hücreleri, fibroblastlar, miyofibroblastlar ve inflamatuvar hücreler tarafından salınan çeşitli MMP'ler tarafından onarılır ve yeniden yapılandırılır (69). Stromal iyileşme süreci sonunda tam stromal şeffaflık sağlanamayabilir (70).

Birçok dokuda yara iyileşmesi sonucu oluşan fibrotik skar, doku fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemezken, korneal yara iyileşmesi ile oluşan skar dokusu kornea şeffaflığını azaltabilir ve görüşü bozabilir. Korneal avaskülarizasyon ve şeffaflık için yara iyileşmesinde, kornea stromal kollajen lameller düzgün bir şekilde dizilmelidir (71).

1.1.4.3. Kornea Endotelyal Yara İyileşmesi

Endotel hasarı; tam kat penetran yaralanmaların yanı sıra hücresel tabakanın hızlı fokal distorsiyonuna bağlı da oluşabilir. Endotel hücrelerindeki bu hasar, ekstrakapsüler katarakt cerrahisi gibi büyük kesili ameliyatlarda aşırı kornea bükülmesine bağlı ve/veya yüksek sıvı tırbülansının neden olduğu katarakt cerrahisi sonrası ortaya çıkabilir (19).

Endotel defektleri komşu sağlıklı endotel hücrelerinin inceli fibronektin matriks üzerinde yayılması ile kapatılır. Endotel tabakasındaki hasarın kapatılması üç aşamada gerçekleşir. Birinci aşama; komşu endotel hücrelerin hasarlı alanı kapatmak için göç etmesidir. İkinci aşama; endotelin bariyer ve pompa fonksiyonlarının normal seviyeye ulaşmasıdır. Üçüncü aşama; endotel hücrelerinin altıgen formunu oluşturmak üzere biçimlenmesidir. Bu süreç diğer aşamalara göre daha uzun sürer (72).

Kornea endoteli sahip olduğu pompalama fonksiyonu ile kornea stroması içindeki su miktarını düzenleyerek kornea saydamlığını korur. Kornea endotel hücrelerinin rejenerasyon kapasiteleri zayıftır (73). Kornea endoteli hasarlandığı zaman, kalan endotel hücreleri yara alanını kapatacak şekilde göç eder ve yayılır. Dolayısıyla milimetre kare başına düşen endotel hücre sayısı azalır. Normal korneada endotel hücre yoğunluğu 2000-2500 hücre / mm² dir. Bu yoğunluğun

500-1000 hücre / mm ²'den daha alt seviyelere düşmesi korneal dekompanseasyon oluşturarak korneanın şeffaflığını kaybetmesi açısından risk oluşturur (74).

1.1.5. Korneal Neovaskülarizasyon

1.1.5.1. Tarihçe

Korneal neovaskülarizasyon, limbusta önceden var olan vasküler yapılardan gelişen yeni damarların, başlangıçta vaskülarize olmayan korneayı istila etmesi olarak tanımlanır. İngiliz cerrah John Hunter, yeni gelişen damarları tanımlamak için ilk kez 1787 yılında anjiogenez terimini kullanmıştır. Bu, mevcut olan vasküler yapının genişlemesiyle sonuçlanan çoklu hücre tiplerini (endotelial hücreler, perisitler, dolaşımdaki hücreler, parankimal hücreler) içeren, henüz tam olarak anlaşılmamış bir mekanizmaydı. Henry Brem'in yardımıyla kıkırdaktan izole edilen ilk anjiogenez inhibitörü ileriki yıllarda tanımlanmıştır. 1980'lerde ilk proanjiogenik moleküller keşfedildi, 1983'te Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), 1989'da Vasküler Geçirgenlik Faktörü (VPF) keşfedildi. 1984 yılında Harvard Üniversitesi'nde Yuen Shing tarafından saflaştırılarak Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) bulundu. İlk antianjiogenik tedaviler 1990'larda ortaya çıktı. O'Reilly 1997'de endostatin ile tedavi edilen tümörlerin tam gerileme gösterdiği vakaları tanımladı. Son olarak, 1999'da FDA, anjiogenezi hedefleyen bir molekül aracılığıyla yaşa bağlı maküler dejenerasyon (YBMD) için ilk tedavi molekülünü onayladı. Aynı yıl, VEGF'i hedefleyen ilk monoklonal antikor olan Bevacizumab geliştirildi. 2004 yılında kolorektal kanser tedavisi için ilaç olarak kullanıma sunuldu. (75)

1.1.5.2. Prevalansı

Neovaskülarizasyon, kornea enfeksiyonunun sık görülen bir komplikasyonudur ve enfeksiyöz keratitin prevalansı, dünya çapında meydana gelen korneal neovaskülarizasyonun genel bir tablosunu yansıtır. Dünyada görme kaybının yaklaşık %15'i (6 milyon kişi) klamidya enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır ve 146 milyon vakada aktif enfeksiyon vardır. Onkoserkiyaz

enfeksiyonu, korneal neovaskülarizasyona neden olan bir başka önemli körlük nedenidir ve dünya çapında risk altında 120 milyon kişi ile yaklaşık 270.000 kişide görme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (76). ABD'de herpetik keratitin 500.000 kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. Korneal neovaskülarizasyon aynı zamanda kontakt lensle ilgili hipoksi sonucunda da olabilir. 9 milyon kontakt lens kullanıcısının %1,3'ünde neovaskülarizasyon geliştiği tahmin edilmektedir. Neovaskülarizasyon, aynı zamanda korneadaki kimyasal hasarlanmaya verilen cevabın da bir parçasıdır. Kimyasal maddelerin (vernük çıkarıcılar, boyalar, asitler ve alkali) neden olduğu neovaskülarizasyon prevalansı ABD'de yaklaşık 37.000 kişiyi etkilemektedir (77).

1.1.5.3. Patofizyolojisi

Vaskülogenez ve anjiyogenez, embriyonik gelişimde önemli bir rol oynamaktadırlar. Oküler dokulardaki patolojik neovaskülarizasyon; proliferatif diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı, prematüre retinopatisi, koroidal neovaskülarizasyon ve korneal neovaskülarizasyon dahil olmak üzere görmeyi tehdit eden vasküler hastalıklara yol açabilir. Neovaskülarizasyon, çeşitli hücreyel süreçleri ve sinyal yollarını içerir, VEGF ve hipoksi ile indüklenbilir faktör (HIF) gibi anjiyogenik faktörlerle düzenlenir (78).

Hem vaskülogenez hem de anjiogenez, vasküler ağların oluşumu için gereklidir. Vaskülogenez, mezoderm kaynaklı progenitör hücrelerden kaynaklanan endotel hücreleri tarafından kan damarı gelişimi sürecidir (79). Anjiogenez, anjiyogenik faktörlere yanıt olarak yeni damarların oluşmasıdır. Yeni damarlar, önceden var olan damarlardan endotel hücrelerinin filizlenmesiyle oluşur (80). Anjiogenez, embriyonik gelişim sırasında yaygın olarak görülmektedir, ancak aynı zamanda yara iyileşmesi ve tümör gelişimi gibi belirli koşullar altında matür dokularda da yeniden ortaya çıkmaktadır. Neovaskülarizasyonda hem vaskülogenez hem de anjiogenez rol oynar (81).

Anjiogenez birkaç adımda gerçekleşir. Anjiyogenik faktörler endotelial hücre filizlenmesini tetikler (82), ardından endotelial hücre proliferasyonu, yer değiştirmesi ve sonrasında da bunu damar büyümesi izler (83). Aktive edilmiş endotelial hücrelerin bir alt kümesi, çok sayıda filopodia uzantısı içeren 'tip'

hücreler haline gelir; tip hücreler damarın filizlenmesini VEGF ve delta benzeri ligand 4 (DLL4) gibi anjiogenik faktörlere doğru yönlendirir (84). Notch sinyalinin (kök ve öncü hücre katmanlarını kontrol eden, iki yönlü hücre akıbeti kararlarının regülasyonunu sağlayan yolaktır (85)) ardından, tip hücrelere bitişik olan endotel hücreleri, lümen oluşumunu teşvik eden 'stalk' hücrelerine dönüşür (86). Perisitler ve vasküler düz kas hücreleri tarafından bazal membranın oluşturulmasının ardından yeni damarlar olgunlaşmış olur (87).

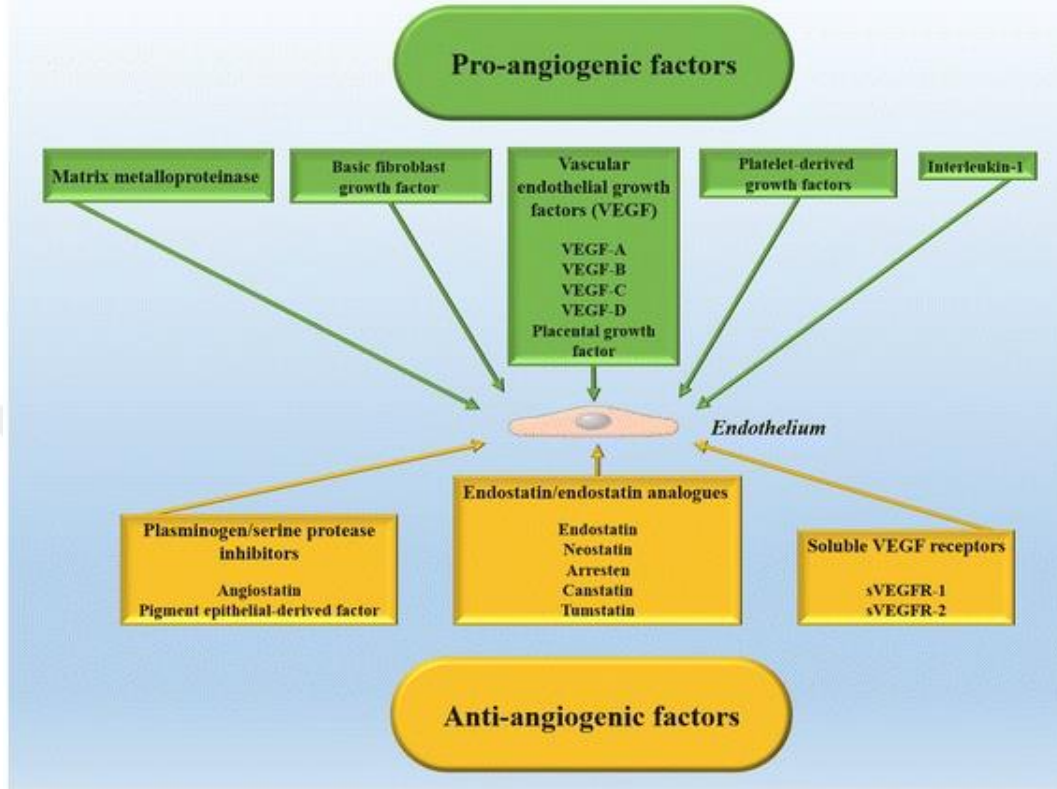
Olgun kan damarları genellikle stabil haldedir ve fizyolojik koşullar altında anjiogenez meydana gelmez. Bununla birlikte, birçok uyarının neovaskülarizasyonu tetiklemesi sonucu patolojik neovaskülarizasyon ortaya çıkabilir (78).

Kornea avaskülaritesi, mevcut proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki dengeyle korunur. Anjiogenik durum, aktif bir süreçtir. Korneal neovaskülarizasyon süreçlerinde hâkim olan merkezi moleküler yollar, proanjiogenik ve antianjiogenik ajanlar arasında bir dengesizliğe sebep olan aşırı proanjiogenik uyarılardan kaynaklanır (6).

Kornea hasar gördüğünde, epitel defektleri normalde kornea ve limbal epitel tarafından iyileşir. Korneal limbus, korneoskleral bileşkede bulunur. Limbal epitel, normal kornea epitelinden farklılaşma kapasitesi ile kök hücreler açısından zengindir. Bununla birlikte, bu hücrelerin apoptoz geçirmesine ve konjonktival epitel tarafından anormal şekilde onarılmasına yol açabilir (88). Korneal neovaskülarizasyon; konjonktiva epitelinin goblet hücreleri bakımından zengin olması ve yüksek oranda vaskülarize olması nedeniyle ortaya çıkar. Sonuç olarak, ortaya çıkan yapı optik açıdan yetersizdir ve görmenin bozulmasına neden olur. Ayrıca bu durum; düzensiz optik yüzeye, zayıflamış gerilme mukavemetine ve yetersiz bariyer işlevine yol açar (89).

Klinik olarak korneal neovaskülarizasyon; anjiogenik invazyon modeline göre 3 gruba ayrılır: 1) Yüzeysel neovaskülarizasyon; kornea epitelinin hemen altından stromaya giren yeni damarlar, bu genellikle stromal keratitte görülür, 2) Vasküler pannus; hem damarların hem de fibröz dokuların periferik kornea üzerine uzamasını içerir ve esas olarak oküler yüzey bozukluklarında görülür, 3)

İnterstisyel ve derin neovaskülarizasyon; stromadaki yeni damarların laminasından oluşur, herpetik ve interstisyel keratitte görülür (90).



Şekil 6: Korneal neovaskülarizasyonu etkileyen proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler (91)

1.1.5.4. Etiyolojisi

Korneadaki anormal, yeni gelişen kan damarları, önceden var olan perikorneal vasküler yapılardan filizlenir. Etiyolojik nedene spesifik olmayan bir yanıt olan korneal neovaskülarizasyon; konjenital hastalıklar, kontakt lensle ilişkili hipoksi, inflamatuvar bozukluklar, kimyasal yanıklar, limbal kök hücre eksikliği, dejenerasyon, alerji, travma, enfeksiyöz gibi çok çeşitli kornea patolojilerinde ortaya çıkar (92). Bu patolojiler, proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasında, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonuna ve kornea stromasına göçüne neden olabilecek bir dengesizliğe yol açar (93, 94).

1.1.5.5. Korneal Neovaskülarizasyonunu Uyarın Faktörler (Proanjiogenik Faktörler)

Korneal neovaskülarizasyonu uyarın anjiogenik faktörler; VEGF, MMP, bFGF, PDGF'ler ve IL-1'i içerir (95, 96).

VEGF ailesi; memelilerde VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörünü içerir (97). VEGF-A, VEGF ailesinin en önemli üyesidir ve makrofajlar, T hücreleri, fibroblastlar, perisitler, astrositler, retina pigment epitel hücreleri ve korneal hücreler (epitel, keratositler ve endotel hücreler gibi çok çeşitli heterojen hücreler) tarafından salgılanır. İnflamasyon veya yaralanma ile uyarılan makrofajlar, kornea stromasında da VEGF-C ve VEGF-D salgılayabilir. VEGF-A, tirozin kinaz reseptörleri olan VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile etkileşime girerek etkisini oluşturur. VEGFR-1; bir transmembran reseptör tirozin kinaz iken VEGFR-2, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü tetikleyen VEGF için önemli bir sinyal reseptörüdür. Lenfanjiyogenez, VEGFR-3 ile etkileşim yoluyla VEGF-C ve VEGF-D tarafından uyarılabilir (91).

Korneal neovaskülarizasyon ile ilişkili diğer faktörler; doku yeniden şekillenmesi, hücre büyümesi, bölünmesi ve anjiogenez ile ilgili olan PDGF 'dir. PDGF-A ve PDGF-B gibi ligandların reseptörleri PDGFR-a ve PDGFR-b ile etkileşimlerinin korneal neovaskülarizasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (98). bFGF; VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D üretimi üzerindeki etkileriyle korneal anjiogenezi destekler (96, 99). MMP14; VEGFR-1 ile etkileşime girer ve enzimatik aktivitesi, VEGF-A ile indüklenen anjiogenez için gereklidir (96). IL-1; fibroblastlar, makrofajlar ve nötrofiller gibi farklı hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar bir moleküldür ve neovaskülarizasyona yol açan adezyon molekülleri, kemokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu indükler (100).

1.1.5.6. Korneal Neovaskülarizasyonunu İnhibe Eden Faktörler (Antianjiogenik Faktörler)

Korneal neovaskülarizasyonu inhibe eden antianjiogenik faktörler; endostatin / endostatin analogları (endostatin, neostatin, arreten, canstatin ve

tumstatin), plazminojen / serin proteaz inhibitörleri (anjiyostatin ve pigment epitelden türetilmiş faktör [PEDF]) ve çözünür VEGF reseptörleri olarak kategorize edilebilir (91, 101).

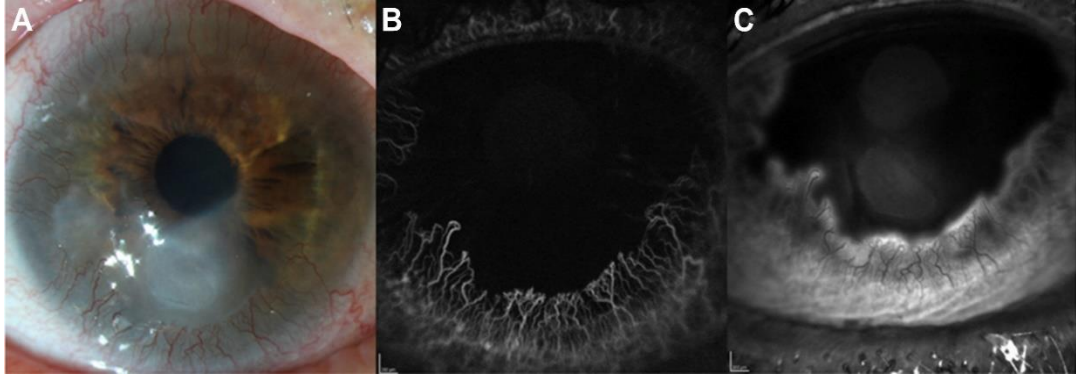
Anjiyostatin; plazminojenden ayrılan endojen bir antianjiogenik faktördür. Bu faktör aynı zamanda korneada da üretilir ve vasküler endotelial hücrelerde çeşitli yüzey proteinlerine bağlanabilir, bunların göçünü ve tübül oluşumunu engelleyebilir (102, 103).

Çözünür VEGF reseptörleri, VEGF'i yakalar, VEGF'in hücre membranına bağlı VEGF reseptörlerine bağlanmasını önleyerek VEGF ligandının etkisini bloke edebilir. VEGFR-1'in çözünür kesik formu olan sVEGFR-1 (soluble VEGFR-1), VEGF-A'ya yüksek afiniteye sahiptir ve gelişim sırasında korneal avaskülaritenin sürdürülmesi için gereklidir. Benzer şekilde sVEGFR-2, VEGFR-2'nin çözünür formudur. sVEGFR-2'nin artan ekspresyonu, lenfanjiogenezi inhibe edebilir ve suturela indüklenen bir modelde VEGF-C'yi bloke ederek korneal greft sağkalımını artırabilir. Bu gözlemler, çözünebilir VEGF reseptörlerinin aşırı ekspresyonunun lenfanjiogenezi ve hemanjiogenezi inhibe etmek için kullanılabileceğini düşündürmektedir (104).

1.1.5.7. Korneal Vaskülarizasyonun Değerlendirilmesi

Korneal neovaskülarizasyonu değerlendirmek için çok sayıda yöntem kullanılmıştır. Tarihsel olarak en yaygın yöntem, yarı lamba biyomikroskopi ile alınan korneaların fotoğrafik görüntülerinin incelenmesidir, ancak ilerleyen yıllar ile daha gelişmiş görüntüleme teknikleri geliştirilmiştir (90).

Korneal neovaskülarizasyonun tedavisi için yeni müdahale yöntemleri ortaya çıktıkça, kornea damarlarının kapsamlı bir klinik değerlendirilmesi, korneal vaskülarizasyon seviyesi ve damar aktivitesinin durumu, tedavi planlaması ve tedaviye cevabı izlemek için çok önemlidir. Floresein ve indosiyanın yeşili kullanan korneal anjiyografi, neovasküler komplekslerin ayrıntılarını gösterir ve böylece korneal damar anatomisi ve aktivitesinin doğru değerlendirilmesini sağlar (105).



Şekil 7: Farklı görüntüleme yöntemleri altında korneal neovaskülarizasyon .

A: Biyomikroskopik fotoğraf; B: indosiyanin yeşili anjiyografi ; C: floresein anjiyografi (90)

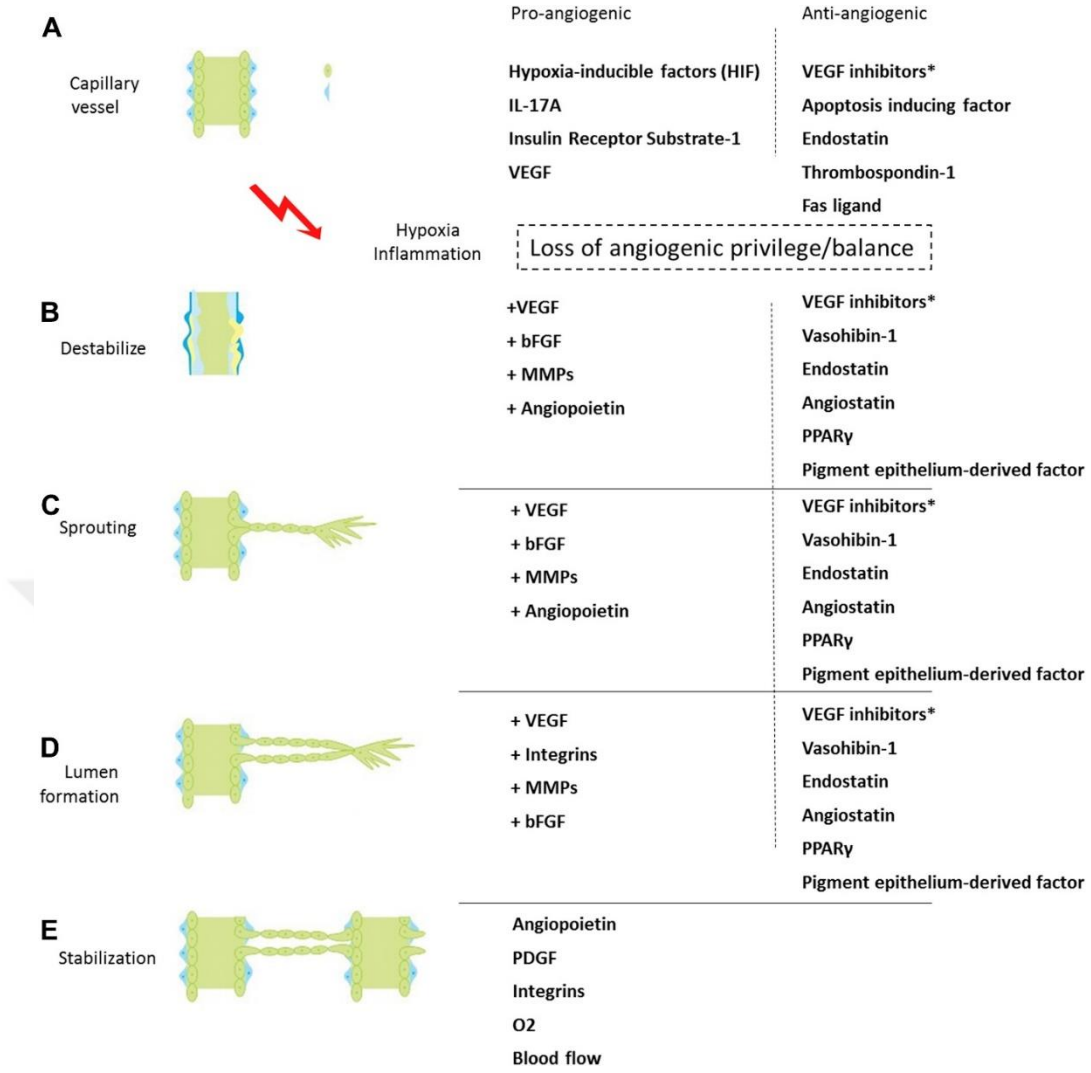
Floresein anjiyografi; damar sızıntı aktivitesi ve damar matürasyonunu belirlerken, indosiyanin yeşili anjiyografi; özellikle korneal skar varlığında kapillerlerin ve daha derin damarların daha iyi gösterilmesini sağlar. İndosiyanin yeşili anjiyografi, kornea damarlarının kökenlerini ve yaygınlığını başarılı bir şekilde tespit etmeye yardımcı olur. Bununla birlikte, korneal anjiyografi zaman alıcıdır, invazivdir ve yaygın olmayan ancak ciddi yan etki riskleri taşır. Buna karşın, anjiyografi, kornea patoloji ile ilişkili neovasküler komplekslerin derinliğini belirleyemez (105, 106).

Optik koherens tomografi (OCT) anjiyografi, non-invaziv tamamlayıcı yaklaşım sunar. OCT sistemleri, koronal bölümleri yeniden yapılandırmak için üç boyutlu bir hacim üzerinden yüksek çözünürlüklü taramaları hızlı bir şekilde elde edebilir ve taranan alanın "en face" görünümünü üretebilir. Ek olarak, çeşitli koşullarda patolojik kornea damarlarını tanımlar ve ilişkili kornea patolojisine göre istila eden damarların derinliğinin değerlendirilmesine olanak tanır. Bu özellikler, anterior lameller keratoplasti veya diyatermi gibi cerrahi müdahaleler planlanırken değerlidir. Ancak bu görüntüleme sisteminin bazı sınırlamaları vardır. Birincisi, afferent ve efferent damarları ayırt edemez. İkincisi, mevcut OCT anjiyografi yöntemlerinin çözünürlüğü sırasıyla yaklaşık 5 mm ve 20 mm'lik eksenel ve yanal çözünürlükle sınırlıdır, böylece kapiller halkalar gibi küçük damarların bileşenleri fark edilemeyebilir. Ek olarak, OCT kırmızı kan hücresi hareketine dayanır ve bu nedenle asellüler akışa, özellikle sızıntıya duyarlı değildir (107, 108).

1.1.5.8. Korneal Neovaskülarizasyon Fazları

Korneal neovaskülarizasyon üç fazdan oluşmaktadır: Latent prevasküler faz, aktif neovaskülarizasyon fazı ve maturasyon fazı (109).

Yaralanma veya hipoksi gibi bir uyarana maruz kalındığında, kornea epitel, lökositler, perikorneal vasküler yapılar ve ECM tarafından anjiogenik büyüme faktörleri serbest bırakılır. Bu anjiogenik büyüme faktörleri, perikorneal vasküler endotelial hücrelerin üzerindeki reseptörlere bağlanır (110). Perikorneal vasküler yapılar dilate olur ve geçirgenlikleri artar. Damar dışına çıkan lökositler çevredeki kornea stromasına göç ederek inflamatuvar ödem ve opasifikasyona neden olur (111). Daha sonra, perikorneal vasküler endotelial hücreler aktive olarak, hücreler arası bağlantılar azalır ve endotelial lamina bütünlüğü bozulur. Endotelial hücreler tarafından salgılanan MMP'lar ve göç eden lökositler, ECM'i bozarak vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonuna ve invazyonuna neden olur (112). Bunu, anjiogenik uyaran kaynağına doğru endotelial hücre göçü izler. İntegrinler ve selektinler gibi adeziv proteinlerin ekspresyonu ve hücre iskeletinin reorganizasyonu ile ana vasküler yapılardan endotel göçü ve proliferasyonu kolaylaştırılır (113). Son olarak, perisitlerin toplanması ile vasküler lümen ve anastomozlar oluşur (90).



Şekil 8: Neovaskularizasyona yol açan anjiyojenik süreç.

A:Stabil durumda mevcut kan damarları anjiogenik stabilizasyon korunur. Hipoksik hasar veya inflamasyona maruz kaldıktan sonra endotel hücreleri , VEGF ve bFGF gibi proanjiogenik faktörlerle aktive edilir; B: ECM ve bazal membran MMP'ler tarafından yıkılır. C: Endotel hücreleri, endotel filizlerini çevreleyecek şekilde “tip” hücelere dönüşür. D: Endotel hücreleri, tip hücrelerini takiben migrasyon, proliferasyon ve vasküler tüp oluşturmaya devam eder. E: Yeni oluşan damarlar, bu yeni damarların olgunlaşmasını işaret eden perisit ile stabilize edilir . * VEGF inhibitörleri: sFlt, heparan sülfat proteoglikan , plasental büyüme faktörü , decorin ve kannabinoid reseptör tipi-1 (90)

1.1.6. Mikro RNA

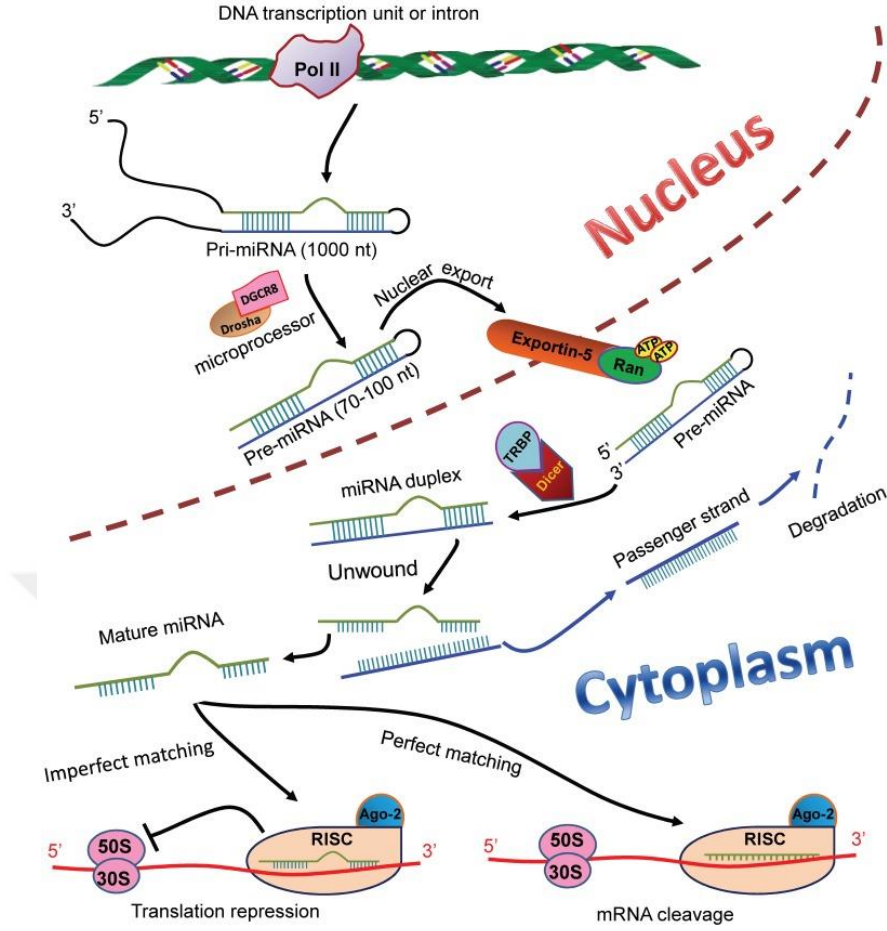
1.1.6.1. Mikro RNA

MikroRNA'lar veya kısaca miRNA'lar kodlanmayan RNA'ların bir alt kümesidir. Hedef mRNA'ları post-transkripsiyonel olarak düzenlediği veya sadece translasyonunu baskıladığı düşünülen ~ 22-nükleotid uzunluğunda, endojen olarak üretilen kısa RNA molekülleridir. MiRNA'ların; memeliler, nematodlar ve sineklerdeki tüm genlerin yaklaşık % 1'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir (114, 115).

Araştırmalar, miRNA'ların; hücrelerin çoğalması, farklılaşması, apoptozu, immün yanıt ve anjiyogenez de dahil olmak üzere sayısız biyolojik süreçte kritik roller oynadığını göstermiştir (116-118).

1.1.6.2. Mikro RNA Biyogenezi

MiRNA'lar, post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen endojen ncRNA (non-coding RNA, kodlanmayan RNA) 'lardır. MiRNA'lar pri-miRNA'lardan köken alır. Pri-miRNA'lar memeli hücre çekirdeğinde; RNA polimeraz II (Pol II) enzimi aracılığıyla, DNA transkripsiyon ünitesi veya intronlardan sentezlenir (119, 120). Daha sonra pri-miRNA'lar, Drosha ve onun kofaktörü olan “DiGeorge sendromu kritik bölge protein 8 (DGCR8)” ile birlikte oluşan “mikro işlemci kompleksi” tarafından 70-100 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA yapılarına dönüştürülür (121). Pre-miRNA'lar nükleer taşıma reseptörü aracılığıyla sitoplazmaya aktarılır (122). Burada bir endonükleaz Dicer enzimi tarafından bölünür ve miRNA-miRNA dubleks oluşur. Dubleksin parçalarından biri olan olgun miRNA, RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RNA-induced silencing complex, RISC) oluşumunda rol oynar (123). MiRNA-RISC kompleksi; hedef mRNA'ların 3'-tercüme edilmemiş bölgesine (3'-UTR) bağlanır. Bu şekilde hedef transkriptlerin translasyon inhibisyonuna ve / veya yıkımına sebep olur (124).



Şekil 9: Memeli hücrelerinde miRNA biyosentezi ve işlevleri (125)

1.1.6.3. Mikro RNA'lar ve Korneal Neovaskülarizasyon İlişkisi

Neovasküler göz hastalığı olan hastalarda miRNA'ların dolaşımdaki ve oküler düzeylerindeki değişiklikler, bu ncRNA'ların oküler neovaskülarizasyonla klinik ilişkisini ortaya koymaktadır (125).

1.1.6.3.1. MiRNA-21

Yapılan çalışmalar, miRNA-21'in proanjiojenik aktivitesini belgelemiştir. Zhu ve arkadaşları, tümör baskılayıcı tropomiyosin 1'i (TPM1) miRNA-21 için bir hedef olarak tanımladılar. MiRNA-21'in, TPM1'in down regülasyonu ile anjiogenezi arttırdığını gösterdiler (126). Zhang ve arkadaşları deneysel korneal neovaskülarizasyon modelinde, subkonjonktival antagomir-21

enjeksiyonu uygulamışlardır. Antagomir-21 enjeksiyonunun; miRNA-21'i etkisiz hale getirdiğini, VEGF-A ve HIF-1 α 'nın ekspresyonunu inhibe ederek neovaskülarizasyon ilerlemesini azalttığını göstermişlerdir (127).

1.1.6.3.2. MiRNA-27

miRNA-27, endotel hücrelerinde eksprese edilir. miRNA-27a ve miRNA-27b'nin aşırı ekspresyonu endotelyal hücre proliferasyonunu artırır. Urbich ve arkadaşları, in vivo ve in vitro olarak miRNA-27'nin semoforin (membran proteini) üzerinden VEGF ekspresyonunu artırdığı ve anjiogenezi indüklediğini göstermişlerdir (128).

1.1.6.3.3. MiRNA-31

MiRNA-31, sırasıyla vasküler perisitlerde ve endotel hücrelerinde proanjiogenik faktörler olarak işlev gören PDGF- β ve HIF-1 α 'yı hedefler. Shen ve arkadaşları iskemiye bağlı retinal neovaskülarizasyon modelinde yaptığı çalışmada, intraoküler pre-miRNA-31, pre-miRNA-150, pre-miRNA-184 enjeksiyonunun retinal neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (129). Normal şartlar altında korneal avasküleritenin sağlanması için HIF-1 α yıkılır (130). Hipoksik koşullarda ise HIF-1 α , prolyl hidroksilazın (PHD) inaktivasyonu ve HIF-1 α 'yı inhibe eden faktör (FIH-1) tarafından stabilize edilerek yıkımı engellenir (131, 132). Chen ve arkadaşları, kontakt lens ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyon fare modelinde, shRNA (Short hairpin RNA) tarafından HIF-1 α 'nın hedeflenmesinin, VEGF ekspresyonunu ve korneal neovaskülarizasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (133). Bu çalışmaların ışığında, miRNA-31'in retinal neovaskülarizasyon üzerinde antianjiogenik, korneal neovaskülarizasyonda ise proanjiogenik olduğu gösterilmiştir.

1.1.6.3.4. MiRNA-126

MiRNA-126, anjiogenik yolun negatif düzenleyicilerini hedefleyerek anjiogenezi destekler. miRNA-126 hücre göçünü, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini, kapiller stabilitesini ve in vitro hücre sağkalımını etkiler. Aynı

zamanda gelişimsel anjiogenez ve vasküler bütünlüğü de değiştirir (134). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan laserle indüklenen koroidal neovaskülarizasyon çalışmasında, miRNA-126 'nın, VEGF-A, KDR (Kinase insert domain receptor) ve SPRED-1 (Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1) ekspresyonunu azaltarak anjiogenezi negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir (135). Kunhert ve arkadaşlarının çalışmasında ise, korneal neovaskülarizasyon üzerinde miRNA-126'nın proanjiogenik etkisinin olduğu gösterilmiştir (136).

1.1.6.3.5. MiRNA-184 ve MiRNA-204

MiRNA-184 ve miRNA-204, normal koşullar altında kornea endotelinde en çok eksprese edilen 2 miRNA subtipidir (125). An ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 6 farenin korneal yara iyileşme süreci izlenmiştir. Yara iyileşmesi sırasında miRNA profil değişikliklerini izlemek için korneal epitel kazıma yapılarak 29 subtip miRNA üzerinde çalışılmıştır. Korneal yara iyileşme sürecinde 29 miRNA'dan 15 miRNA'da düşme gözlenmiş, bu 15 miRNA'dan en çok düşüş gösterenler ise miRNA-204 ve miRNA-184 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, diğer 14 miRNA'nın korneal yara iyileşmesi sürecinde yükseldiği gözlenmiştir (137).

Zong ve arkadaşlarının korneal sütur ilişkili yara iyileşmesinde miRNA-184'ün rolünü saptamak için yaptığı çalışmada; miRNA-184 ekspresyon seviyesinin, korneal süturasyon yapılmış ratlarda kontrol grubuna göre %75 oranında azaldığı gösterilmiştir (138).

1.1.7. Korneal Neovaskülarizasyon Tedavisi

Korneal neovaskülarizasyonunun tedavisi henüz net değildir. Bununla birlikte, topikal tedaviler, enjeksiyonlar ve laser / fototerapi gibi etkisi olan çeşitli tedavi prosedürleri vardır. Bu tedavilerin terapötik amacı, antianjiogenezi başlatmak ve neoanjiogenezi erken aşamalarda durdurmaktır. Diğer bir tedavi yöntemi, olgunlaşmamış damarların tersine çevrilmesini indükleyerek anjioregresyonu sağlamayı amaçlamaktadır. (139).

1.1.7.1. Steroid

Steroidler ve anti-VEGF ajanları şu anda korneal neovaskularizasyon için temel başlangıç tedavisidir (140). Kortizon, deksametazon ve prednizolon gibi topikal steroidlerin hepsinin antianjiogenik etkiye sahip olduğu ve bu nedenle korneal neovaskularizasyonunu engellediği gösterilmiştir (141). Klintworth, steroid kullanımının, kornea hasarından hemen sonra veya hemen önce uygulandığında anjiogenezi baskılamada en etkili tedavi olduğunu ve geç dönemde uygulandığında ise korneal vaskularizasyon gelişimi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını göstermiştir (110). Steroidlerin hücre kemotaksisini inhibe ederek ve IL-1 ile IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri inhibe ederek etki oluşturduğu düşünölmektedir. Ayrıca lenfositlerin öldürölmesine ve vasköler genişlemenin inhibe edilmesine neden olurlar ki bunların tümü antianjiogenik etkilerine karşılık gelir (142). Steroidlerin, heparin ve siklodekstrinlerle birlikte kullanılması daha büyük bir antianjiogenik etkiye neden olur ve bu, kan damarlarının temel zarını tamamen parçalayabilen kollajen metabolizmasını modöle ettiği düşünölen 'anjiostatik steroidlerin' gelişmesine yol açar (143).

Bununla birlikte, steroidler, bağışıklık baskılayıcı etkileri nedeniyle artmış enfeksiyon duyarlılığı ve glokom gibi önemli bir yan etki profiline sahiptirler (91).

1.1.7.2. Non-Steroid Anti İnflamatuvar İlaçlar

Flurbiprofen, indometasin, ketorolak, diklofenak ve nepafenak dahil olmak üzere birkaç non-steroid anti-inflamatuvar ilacın (NSAİİ) deneysel çalışmalarda korneal neovaskularizasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. NSAİİ'ler, araşidonik asidi prostaglandinlere (E2) dönüştüren siklooksijenaz enzimini (COX-2 izoformu) inhibe eder. COX-2 tarafından üretilen eikosanoidler, diğer faktörlerin yanı sıra, inflamasyon ilişkili anjiogeneizde VEGF ekspresyonuna aracılık eder. COX-2 enzimi NSAİİ'ler tarafından inhibe edilince inflamasyon ilişkili anjiogeneizdeki VEGF ekspresyonu da baskılanmış olur (144, 145). Bununla birlikte, uzun süreli NSAİİ kullanımıyla ilişkili değişken etkililik ve korneal perforasyon riski, NSAİİ'lerin korneal neovaskularizasyon tedavisi için klinik kullanımını kısıtlar. Bu nedenle bu ajanlar birinci basamak ajanlar olarak kabul edilmez (146).

1.1.7.3.Siklosporin A

Siklosporin A; çeşitli T hücre fonksiyonları üzerinde inhibe edici etkileri olan bir immünomodülatör ajandır. İn vitro çalışmalarda ve hayvan modellerinde, primer endotelial hücrelerdeki VEGF'i aktive eden IL-2 ve COX-2 enziminin fonksiyonlarını inhibe ederek korneal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (147, 148). Bununla birlikte, insan kornealarında korneal neovaskülarizasyon tedavisinde Siklosporin A'nın rolü, özellikle kornea greft reddi bağlamında, sistemik ve topikal Siklosporin A'nın etkinliği konusunda çelişkili sonuçlar ortaya çıktığından dolayı Siklosporin A'nın korneal neovaskülarizasyonda kullanımı halen tartışmalıdır (149, 150).

Bock ve arkadaşları, yüksek riskli penetran keratoplastiden sonra yüksek doz subkonjonktival Siklosporin A uygulamasının korneal neovaskülarizasyon üzerinde önemli bir etkisi olmadığını bildirmiş ve topikal Siklosporin A'nın en azından transplant ortamında insan korneasında minimal antianjiogenik etkiye sahip olduğu sonucuna varmıştır (151). Ayrıca Gottsch ve Akpek, steril santral kornea ülseri olan bir hasta serisinde topikal Siklosporin A'nın korneal neovaskülarizasyon üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğunu bildirmiştir (152).

1.1.7.4. Anti-VEGF Ajanlar

VEGF, güçlü bir endotelial hücreye özgü mitojendir. VEGF'in düşük ekspresyon seviyelerinin, yetişkinlerde fare embriyolarının hayatta kalma oranının zayıf olması ve vasküler anormallik ile sonuçlandığı bildirilmiştir; tersine, hipoksik koşullar altında VEGF yüksek ekspresyon seviyeleri, anjiogenezi uyardığı gözlenmiştir (153, 154). Oküler VEGF, normal damar gelişimi ve hastalığın ilerlemesi ile yakından ilişkilidir (155). Retinadaki periferik avasküler alan, vasküler gelişimi uyarmak için daha fazla VEGF salgılar; ROP (Prematür Retinopatisi), PDR (Proliferatif Diyabetik Retinopati) ve Santral Retinal Ven Tıkanıklığı gibi patolojik koşullar altında anormal derecede yüksek VEGF seviyeleri neovaskülarizasyona neden olur (156). Bu nedenle, oküler neovaskülarizasyonu tedavi etmek için anti-VEGF ajanlar kullanılmış ve belirli bir etkinlik elde edilmiştir. Bununla birlikte, önemli sayıda hasta anti-VEGF'lere yanıt

vermez. Anti-VEGF ajanların; subretinal fibroz, endoftalmi, intraoküler kanama, hipertansiyon ve felç gibi lokal ve sistemik advers olayları meydana gelebilir (157, 158).

Anti-VEGF ajanlar, korneal neovaskülarizasyonu tedavi etmek için endikasyon dışı kullanılmıştır, ancak yalnızca kısmi etkinlikte olduğu saptanmıştır ve uzun süreli kullanımları toksik olabilir (159). Bevacizumab, Ranibizumab, Pegaptanib ve Aflibercept gibi anti-VEGF ajanlar bu konsept etrafında tasarlanmıştır (160-162).

1.1.7.5. Kornea Nakli

Kornea nakli, dünya çapında en eski, en yaygın ve en başarılı doku nakli biçimidir. Günümüzde yaygın prosedürler, 360 derecelik tam kalınlıkta kornea kesisi gerektiren bir teknik olan penetran keratoplastiden, korneanın sadece hastalıklı tabakasının yerini alan lamelli keratoplasti tekniklerine kadar uzanmaktadır. Penetran keratoplastiden sonra, kesilmiş SBNP demetlerinin rejenerasyonu, katarakt cerrahisi ve refraktif cerrahiye oranla çok daha yavaş bir hızda gerçekleşir. SBNP'deki sinir lifi yoğunluğu ve dallanma, penetran keratoplastiden 40 yıl sonra hala anormal olabilir (163).

24.000 kornea grefti ile yapılan bir meta analiz çalışması, korneal neovaskülarizasyonlu hastalarda nakledilen korneaların reddinin daha yüksek oranda olduğunu ortaya koymuştur. Analiz, “ameliyattan önce korneal neovaskülarizasyon varlığının, naklin başarısız olma olasılığını % 30 arttırdığını ve greft reddi riskini de iki katından fazla arttırdığını”, başka bir deyişle, neovaskülarizasyon ne kadar büyük olursa, reddedilme riskinin o kadar yüksek olduğunu bildirmiştir (164). Korneal neovaskülarizasyon oluşumu, antijenlerin ve antijen sunan hücrelerin bölgesel lenf düğümlerine çıkışını sağlayan korneal lenfanjiogenez ile de ilişkilidir. Hafif vaskülarize kornealara oranla, ağır vaskülarize kornealarda lenfatik damarların bulunma ihtimali daha yüksektir. Nakledilen dokuya komşu vaskülarize alıcı kornea yataklarında bulunan kornea lenfatikleri, greft kaynaklı antijenin bölgesel lenf düğümlerine geçişini artırarak greft reddi ihtimalini arttırabilir (165). Korneal neovaskülarizasyon, önceden var olan korneal anjiogenez olmasa

bile penetran keratoplastiden sonra gözlerin % 41'inde de gelişmektedir. Korneal neovaskülarizasyon bu nedenle greft yetmezliği için bir risk faktörüdür (90).

1.1.7.6. Laser/ Fototerapi

Argon laser; şeffaf korneadan direk geçer, ancak korneal damar içindeki hemoglobin moleküllerinin argon enerjisini absorbe etmesi damar içinde pıhtı oluşmasına neden olur. Argon laser ve 577 nm sarı boya laser greft reddinde ve lipid keratopatide korneal vaskülarizasyon tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır (166). Yapılan çalışmalar, korneal neovaskülarizasyonun gerilemesinde etkinliğini göstermiştir (139).

Fotodinamik terapi; fotosensitif bir bileşik olan vertoporfinin intravenöz verilmesini takiben düşük güçte, uzun süreli kızlötesi laser tedavisinin uygulanmasını içerir. Bileşik, neovasküler doku tarafından absorbe edilir ve laser tedavisi ile aktif hale gelerek sitotoksik serbest radikaller üretir. Serbest radikaller çevredeki neovasküler dokuda, intravasküler tromboza neden olur ve korneal neovaskülarizasyonu tersine çevirir. Fotodinamik terapinin güvenli olduğu ve insanlarda yüksek bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir; ancak, çok maliyetli ve zaman alıcı bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir (167). Buna karşın stromal dokuların kollateral hasarı, reperfüzyon ve anjiogenezi riskini artıran bir inflamatuvar reaksiyonu şiddetlendirebileceğini söyleyen yayınlar da mevcuttur (168).

Hem laser hem de fototerapi, diğer terapötik stratejilerle karşılaştırıldığında etkinliklerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyar. Şu anda, laser tedavisi ile ilişkili güvenlik endişeleri ve fototerapinin maliyeti ve süresi, bu yenilikçi tedavilerin olumsuz yönlerini oluşturmaktadır ve bu da klinik olarak bu tedavi yöntemlerinin nispeten daha az kullanılmasına neden olmaktadır.

Bununla birlikte, Gerten, Bevacizumabın argon laser tedavisi ile kombinasyon tedavisinin korneal neovaskülarizasyonda belirgin bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni argon laserin indüklediği pıhtılaşmanın olgun patolojik kan damarlarını kapatırken bevacizumabın yeni anjiogenezi önlemesidir (169).

1.1.7.7. Enjeksiyon Tedavileri

Laser tedavisine alternatif olarak kullanılabilen ince iğne diyatermi (FND), korneal neovaskülarizasyonun yönetimi için ucuz ve kullanışlı bir prosedürdür. Bu basit prosedür, topikal anestezi altında gerçekleştirilebilir ve farklı kornea derinliklerinde afferent ve efferent damarları eşit derecede kapatır. Ancak istenen sonucu elde etmek için yeniden tedavi gerekebilir. Olası ciddi bir yan etki, özellikle ince damarlanmış kornealarda iğnenin geçişi sırasında ortaya çıkabilen korneal mikro perforasyondur. Diğer potansiyel advers olaylar arasında korneal kanamalar, korneanın geçici opaklaşması ve stria oluşumu yer alır. Bu komplikasyonlar geri döndürülebilir. En yaygın komplikasyon olan intrakorneal hemoraji, ameliyat sırasında veya hemen postoperatif dönemde ortaya çıkar ve bazı durumlarda geride kristalin birikintiler bırakarak birkaç hafta içinde düzelir. Korneanın geçici opaklaşması, iğneye komşu stromada meydana gelir ve 24 ila 48 saat sonra tamamen düzelir (170).

İnce iğne diyaterminin limbal epitelyal kök hücre fonksiyonu ve lokal endotel hücre sağkalımı üzerindeki uzun vadeli sonuçları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu teknik, derin periferik korneal stroma dahil olmak üzere tüm kornea yapılarına kapsamlı termal enerji uygulamasıyla ilişkilendirilebilir, bu da tedavi edilen bölgenin altındaki kornea endoteline ve korneoskleral limbusta potansiyel olarak zarar verir (105). Ek olarak ince iğne diyatermi, proanjiogenik faktörlerin sekonder salınımı yoluyla daha fazla vaskülarizasyonu uyarmabilir (171). Bu nedenle, diyaterminin korneaya uygulanmasının minimize edilmesi önerilir. Son zamanlarda, afferent damarları tedavi etmek için anjiografi kılavuzluğunda ince iğne diyatermi kullanılmıştır (172). Bu yaklaşım, korneaya uygulanan minimum termal enerji ve azaltılmış stromal hemoraji riskiyle besleyici damarları seçici olarak tedavi edebilir (173).

1.1.8. Bevacizumab

Bevacizumab, bilinen tüm VEGF-A izoformlarına bağlanan rekombinant insanlaştırılmış bir monoklonal antikordur. 149 KDa'lık uzunlukta, iki değerlikli monoklonal antikor yapısındadır (174).

VEGF-A ile VEGFR-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/flk-1) arasındaki etkileşimi endotel hücrelerinin yüzeyinde bloke eder. Protein diziliminde %93 insan ve %7 murindir. VEGF-A'nın VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanması, endotelial hücre proliferasyonuna ve hayatta kalma yollarının aktivasyonunun yanı sıra yeni vaskülogenez ve anjiogenezin oluşumuna yol açar. Bevacizumab uygulaması bu nedenle mikrovasküler büyümeyi ve anjiogenezini inhibe eder, bu amaçla kanser tedavisi düzeninde habis hücre büyümesini ve kan damarı oluşumunu inhibe etmek için kullanılır (175).

Bevacizumab, FDA onaylı olarak; serviks kanseri, metastatik kolorektal kanser, glioblastoma, skuamöz olmayan küçük hücreli akciğer kanseri, over kanseri, primer periton kanseri, metastatik renal hücreli karsinom tedavilerinde kullanılmaktadır. Endikasyon dışı olarak; metastatik meme kanseri, endometriyal kanser, anjiyosarkom, gliomalar, malign plevral mezotelyoma, medulloblastom (pediyatrik), hemanjioperisitom ve malign soliter fibröz tümör, diyabetik makula ödemi, YBMD tedavilerinde kullanılmaktadır (175).

Bevacizumab'ın henüz oküler hastalıkların tedavisinde kullanım ruhsatı olmamasına rağmen VEGF'in anjiogenezdeki merkezi rolü, onu çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda; diyabetik makula ödemi, YBMD, anjioid streak, yüksek miyopiye sekonder gelişen koroidal neovasküler membran, retinal ven oklüzyonu, korneal neovaskülarizasyon, neovasküler glokom ve prematür retinopatisinde olası bir tedavi seçeneği olarak hedef ajan haline getirmiştir (176).

Diyabetik makula ödemi, popülasyona dayalı çalışmalarda tip 1 diyabetlilerde %4-14 arasında ve tip 2 diyabetlilerde %1-13 arasında değişen prevalans oranları ile görme bozukluğunun önemli bir nedenidir. İlk görme keskinliği kaybı hafif olduğunda, diyabetik makula ödemi tedavisi için Bevacizumab ve diğer anti-vegf ajanlar (Ranibizumab, Aflibercept) arasında ortalama olarak belirgin bir fark bulunmamıştır. Görme keskinliği kaybı orta veya daha kötü olduğunda ise; Bevacizumab'ın Aflibercept'e göre görme keskinliğini iyileştirme olasılığı daha düşük olarak bulunmuştur (177).

YBMD, 60 yaş üstü hastalarda görme bozukluğunun önde gelen nedenidir. Hastalığın en yaygın ileri formu olan “kuru” (atrofik) form, retina pigment epitelinin yavaş, ilerleyici disfonksiyonu, fotoreseptör kaybı ve retinal

dejenerasyon ile karakterize edilir. Aksine, “yaş” (neovasküler) form daha az sıklıkta görülür, ancak YBMD’ye bağlı akut körlüğün %90’ından sorumludur. Anti-VEGF ajanlar, neovasküler YBMD tedavisinin bir direği haline gelmiş ve iki yıllık tedaviden sonra %90’ın üzerinde görme keskinliğinde artış veya görme keskinliğini stabilize etme şansı sağlamıştır (178).

Korneal neovaskülarizasyon; fiziksel, kimyasal ve patolojik travmalar sonucu oluşabilen, görmeyi tehdit eden ciddi bir komplikasyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Tedavi edilmesi güç ve gerekli bir durumdur. Diğer anjiogenez mekanizmalarına sahip hastalıklarda olduğu gibi, korneal neovaskülarizasyonda da VEGF düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir. İnsan ve hayvan modellerinde vaskülarize ve enfekte kornealarda önemli bir anjiogenik faktör olarak gösterilmiştir (179).

Korneal neovaskülarizasyon tedavisi için kullanılan anti-VEGF tedavisi, birçok ön in vivo hayvan deneyinde başarılı sonuçlar elde etmiştir. Sıçan modellerinde, 1 hafta boyunca günde iki kez uygulanan topikal Bevacizumab (4 mg/ml), kimyasal olarak indüklenen korneal neovaskülarizasyonu zayıflatmıştır (180). Yıldırım ve ark; gümüş nitrat ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 42 Wistar Albino rat modeli üzerindeki çalışmada, Bevacizumab ve Sorefenib (multipl tirozin kinaz inhibitörü) topikal damla formunda uygulamıştır. VEGF ELİSA düzeyleri ve immünohistokimyasal olarak bakılmış, her iki damla formunun da etkin olduğu saptanmıştır (181).

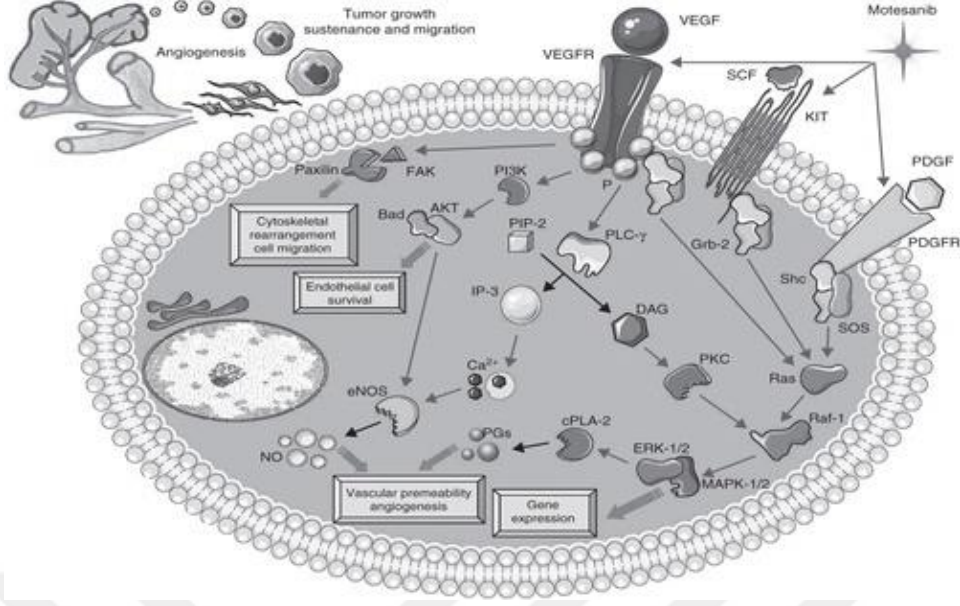
Baradaran-rafi ve ark; sütür ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 30 tavşan gözünde, 2 haftalık Adinopektin ve Bevacizumab topikal damla uygulamıştır. Her iki topikal formda da neovaskülarizasyonun azaldığını, Adinopektin’in daha etkin olduğunu bulmuştur (182). Şahan ve ark; gümüş nitrat ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 39 Sprague Dawley rat modelinde, Dovatinib (multipl tirozin kinaz inhibitörü) ve Bevacizumab topikal damla formunda uygulamıştır. Ön segment fotoğraf ve hematoksilen eozin ile yapılan inceleme sonunda, Dovatinib’in Bevacizumab’tan daha az etkin olmak üzere, her iki ilacın da neovaskülarizasyonu geriletmediğini bulmuştur (183). Yoon ve ark; fare korneal neovaskülarizasyon modelinde, topikal Rivoceranib (tirozin kinaz inhibitörü) (%0.1 ve %0.5) ve Bevacizumab (%0.5) damla formunda uygulamıştır.

CD31 (cluster of differentiation) ve LYVE1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) düzeylerine immüno Floresan ile bakılmıştır. Korneal neovaskülarizasyonda azalma görülmüş, %0.5 Rivoceranib ve %0.5 Bevacizumab grupları arasında belirgin fark izlenmediği saptanmıştır (184).

Korneal neovaskülarizasyonun bir sonucu olarak, sonraki penetran keratoplastinin prognozunu kötüleştiren ve görme keskinliğini önemli ölçüde değiştiren lipid birikimi, inflamasyon, kornea skarlaşması ve ödem meydana gelmesi muhtemeldir. Bu nedenle korneal neovaskülarizasyonu inhibe etmek ve gözün yaralanma ve hastalıktan kaynaklanan inflamatuvar yanıtını önlemek önemlidir (179). Gupta ve ark; keratoplasti sonrası yüksek greft reddi taşıyan, kronik derin korneal vaskülarizasyonu olan 14 hastanın 14 gözüne nakil öncesi, intrastromal Bevacizumab (0.05-0.1 mL 2.5 mg/ 0.1 mL) enjeksiyonu uygulamıştır. Uygulamayı 4-8 haftada tekrar etmiş, ortalama 1-3 seans şeklinde uygulama yapılmıştır. Uygulamayı takiben, %14.2'sinde var olan neovaskülarizasyon tamamen gerilemiş, keratoplasti ihtiyacının da tamamen ortadan kalkmış olduğu tespit edilmiştir. Geride kalan gözlerde ise greft sağ kalımını artırdığı bulunmuştur (185).

1.1.9. Motesanib

Motesanib (AMG 706); tüm VEGFR'leri (VEGFR-1, -2 ve -3), PDGF reseptörünü (PDGFR) ve kök hücre faktör reseptörü / CD117'yi inhibe eden yeni bir nikotinamid, küçük molekülü multipl tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI -KIT). Kimyasal yapı *N* - (2,3-dihidro-3,3-dimetil-1 *H* -indol-6-il) -2 - [(4-piridinilmetil) amino] -3-piridinkarboksamid'dir (186).



Şekil 10: VEGF, PDGF, KIT inhibitörü olan Motesanib molekülünün şematik görünümü (186)

Tirozin kinaz, ATP'deki fosforun hedef proteine transferini sağlayarak, protein fosforilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (187). Hücrelerin bölünmesinde, hücreler arası sinyal iletiminde, hücresel proliferasyonda ve farklılaşmada, hücrenin canlılığı ve hücre hareketi gibi önemli işlevlerde rol alır (188, 189). Tirozin kinazlar; reseptör protein kinazlar (membran yerleşimli protein kinazlar) ve non-reseptör protein kinazlar (sitoplazmik protein kinazlar) olarak 2 sınıfa ayrılır (189). Reseptör tirozin kinazlar (RTK); hücre-hücre iletişimine yardım eden sinyal taşıma yollarının temel bileşenidir (190). RTK sınıfında 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler; insülin reseptörü, efrin reseptörleri (EphA, EphB) ve büyüme faktörleri (EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleridir (189). Non-reseptör (sitoplazmik) protein kinazlar, ATP'deki fosfat grubunu tirozin amino asidine transfer eden fosfotransferaz enzimidir. Bu enzim sınıfında Src, ABL, fokal adezyonkinaz (FAK) ve januskinaz (JAK) proteinleri bulunmaktadır (191). Sitoplazmik tirozin kinazların devamlı aktivasyonu ve karsinojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, anjiogenez gibi malign fenotipe yönelik hücresel olayları aktive eder (192).

Etkinliği gösterilmiş ilk tirozin kinaz inhibitörü İmatinib Mesilat'tır. Zamanla yeni etken maddeler keşfedilmiştir. Bunlar arasında; Gefitinib, Erlotinib, Sorefenib, Dasatinib, Lapatinib, Nilotinib, Pazotinib, Vandetanib, Vemurafenib,

Ruksolitininib, Krizotinib, Aksitinib, Bosutinib, Kabozantinib, Ponatinib, Regorafenib, Tofacitinib, Afatinib, Ceritinib, Dabrafenib, İbrutinib, Cetuximab, Nintedanib, Lenvatinib, Alectinib, Osimertinib, Brigatinib, Palbociclib, Temsirolimus, Everolimus, Sirolimus ve Motesanib bulunmaktadır (193).

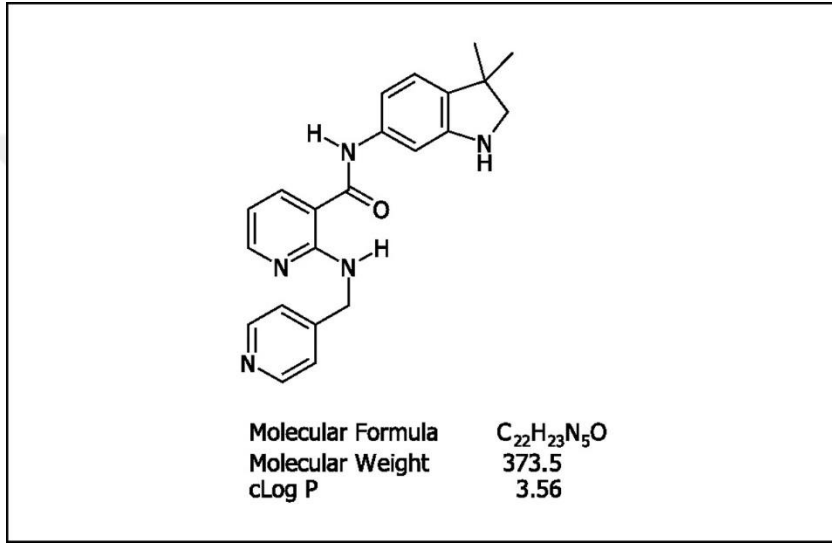
Önceki klinik ve deneysel kanıtlar, Motesanib'in güçlü antianjiogenik etkilere sahip olduğunu ve tümör anjiogenezini baskıladığını ileri sürmüştür. Motesanib; VEGF'in neden olduğu hücrel proliferasyonu ve vasküler geçirgenliği inhibe ettiği, tümör hücrelerinde neovaskülarizasyonu seçici olarak hedefleyerek in vivo tümör gerilemesini indüklediği tespit edilmiştir (17, 18).

Motesanib'in, VEGF protein ekspresyonu indüklendiğinde, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK1 / 2) protein seviyelerinin fosforilasyonunun arttırdığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise, ERK1 / 2 ve NOS'un VEGF'nin neden olduğu aşırı geçirgenlikte farklı sinyal yollarının elemanları olduğunu bildirmiştir. Laser hasarının neden olduğu artmış VEGF ve Motesanib seviyelerinin, ERK1 / 2 proteininin sonraki fosforilasyonunu azaltmak için VEGFR'i inhibe ettiği düşünülmüştür (18).

Motesanib; metastatik meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümörler, tiroid kanseri gibi birçok kanser tedavisinde deneme aşamasındadır. Ho ve ark; Motesanib'in, Sisplatin dirençli mesane kanserinde kullanılabileceğini önermişlerdir (194). Coxon ve ark; medüller tiroid kanseri oluşturulan fare modelinde, Motesanib kullanımı ile tümörün boyutlarında ve damar gelişimde azalma saptamışlardır. Bu durum, Motesanibin anti-tümör ve antianjiogenik aktivitesini destekler niteliktedir (195).

Bunun yanı sıra, oküler neovaskülarizasyonda etkinliği konusunda da çalışmalar yapılmıştır. Rho ve ark; 46 adet erkek rat laser fotokoagülasyon ile indüklenmiş koroidal neovaskülarizasyon modelinde topikal Motesanib ve topikal dimetilsülfatoksidaz (DMSO) damla uygulamıştır. Fundus floresein anjiografi ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda, topikal Motesanib damlanın topikal DMSO'ya oranla koroidal neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığını saptamıştır (18). Polverine ve ark; korneal neovaskülarizasyon modelinde oral gavaj yolu ile uyguladıkları Motesanib'in doz bağımlı olarak neovaskülarizasyonu geriletmediğini bulmuştur (17).

Topikal ilaç uygulaması, glokom tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yol, intravitreal enjeksiyonla karşılaştırıldığında noninvazivdir ve oral uygulamaya oranla daha düşük sistemik yan etki oranları ile ilişkilidir (18). Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde, tedaviye bağlı komplikasyonları azaltmak ve alternatif bir terapötik modaliteyi belirlemek için yeni bir ilaç ve uygulama sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla; çalışmamızda non-invaziv olan topikal damla formu ile Motesanib kullanılmıştır.



Şekil 11: Motesanib molekülünün kimyasal yapısı (186)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Necmettin Erbakan Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alındı. Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında yapıldı. Fırat Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvar incelemeleri tamamlandı.

Çalışmamızda kullanılacak sıçanlar 22-25°C oda ısısında 12 saat ışık (7:00–19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00–7:00) tutulacak şekilde özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Tüm gruba aynı standart sıçan yemi verilerek add-libitum su, yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük olarak altları temizlenerek bakımları yapıldı. Ağırlıkları 225-300 gr arasında değişen 8-10 haftalık 42 adet Wistar Albino cinsi erkek 7'şerli sıçanlar 6 gruba ayrıldı.

2.1. Gruplar

- **Grup I (Kontrol):** Herhangi bir müdahalede bulunulmayan, sağlıklı kontrol olarak ayrıldı.
- **Grup II (Sham):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 7 gün boyunca topikal DMSO 3 defa birer damla uygulandı.
- **Grup III (Bevacizumab 5mg/ml):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 7 gün boyunca topikal Bevacizumab damla 5 mg/ml 3 defa birer damla uygulandı.
- **Grup IV (Motesanib 2.5 mg/ml):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 7 gün boyunca topikal Motesanib damla 2.5 mg/ml 3 defa birer damla uygulandı.
- **Grup V (Motesanib 5 mg/ml):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 7 gün boyunca topikal Motesanib damla 5 mg/ml 3 defa birer damla uygulandı.
- **Grup VI (Motesanib 7.5 mg/ml):** Gümüş nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyondan sonra 7 gün boyunca topikal Motesanib damla 7.5 mg/ml 3 defa birer damla uygulandı.

2.2. Anestezi Tekniği

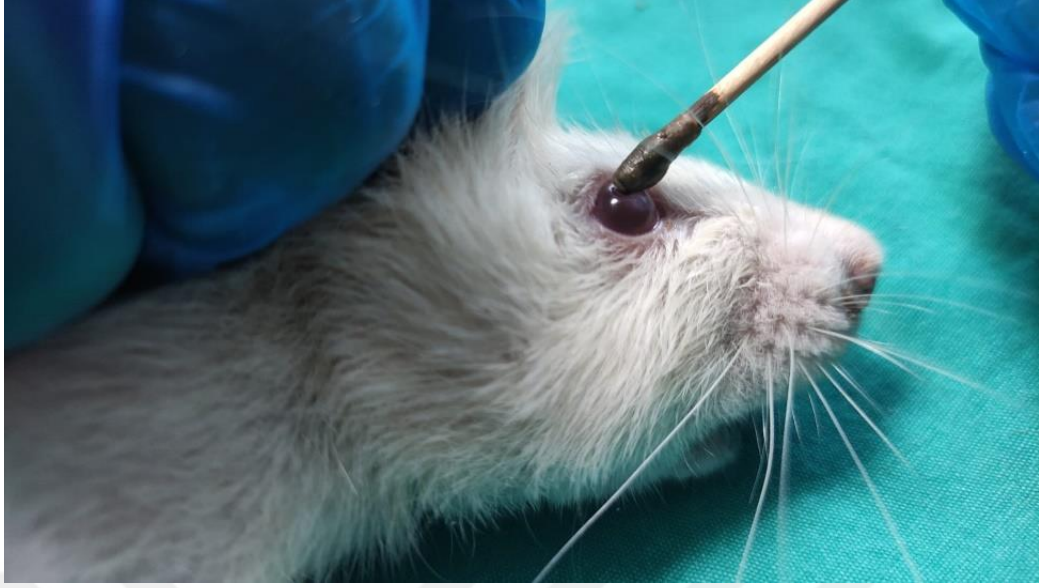
Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 50 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0.5'lik proparakain hidroklorid (Alcaine, Alcon, Fort Worth, Texas, ABD) damlatıldı.

2.3. Korneaya Kimyasal Koterizasyon Yapılması

Korneal yanık ve neovaskülarizasyon oluşturmak için Mahoney ve Waterbury tarafından tarif edilen gümüş nitrat ile koterizasyon tekniği uygulandı (196). Tüm deneklerin sağ gözlerinin korneası %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat (Şekil 12) ile kaplanmış çubuk 10 saniye süresince saat 12 hizasında, limbustan 3 mm uzaktaki parasantral korneaya temas ettirilerek kimyasal koterizasyon uygulandı (Şekil 13). Korneada 2–2,5 mm çapında alkali yanık oluşturuldu. Hemen ardından küçük bir spanç ile geride kalan gümüş nitrat ve potasyum nitrat partikülleri uzaklaştırıldı, 10 ml serum fizyolojikle kornea ve forniks yıkanarak temizlendi.



Şekil 12: %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat ile kaplanmış aplikatör çubuk



Şekil 13: Gümüş nitrat aplikatör çubuk ile korneal kimyasal yanık oluşturma

2.4. İlaçlar

Ratlarda deneysel olarak oluşturulan kornea neovaskülarizasyon tedavisinde Bevacizumab (Altuzan 100mg/ml ampul, Bristol Myers Squibb Co, Princeton, NJ, ABD) DMSO (Emagrup, Elazığ, TR) çözeltisi ile 5 mg/ml dozajında hazırlanarak ve Motesanib (Genbiotek Biosistem, İstanbul, TR) molekülünden DMSO çözeltisi ile 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml dozajlarında ilaçlar hazırlanarak kullanıldı. Sağlıklı kontrol grubu dışındaki gruplara, kendi ilaçları günde 3 kere birer damla olacak şekilde 7 gün boyunca tedavi uygulandı.

2.5. Muayene ve Enükleasyon

Ratlara ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, TR) (90 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, TR) (10 mg/kg) uygulanarak genel anestezi altında sağ gözleri enükle edildi.

2.6. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi

Rat korneaları Zeiss S100/OPMI® Pico ameliyathane mikroskopu (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) kullanılarak fotoğraflandı. Fotoğraf üzerinde

neovaskularizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi MATLAB R2015a (MathWorks, Natick, Massachusetts, ABD) programı kullanılarak hesaplandı.

2.7. Kantitatif Real-Time PCR ile İnceleme

Rat kornealarında kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile VEGF-A ve VEGFR-2 genlerinin mRNA düzeylerindeki ifade farklılıkları ile miRNA-21, miRNA-27a, miRNA-31, miRNA-126, miRNA-184 ve miRNA-204 parametreleri değerlendirildi.

2.7.1. Total RNA İzolasyonu

-80 °C’de muhafaza edilen rat kornea örneklerinden total RNA izolasyonu için Hibrizol (Hibrogen, Türkiye) kullanıldı. Üretici firma tarafından önerilen protokole uyularak RNA izolasyonu yapıldı. RNA miktarları, nanodrop cihazında (Nano-400A, ALLSHENG, ÇİN) ölçüldü. Her gruba ait RNA örnekleri, eşit düzeyde total RNA içerecek şekilde, kendilerine ait havuzlarda toplandı.

2.7.2. Komplementer DNA Sentezi

2.7.2.1. mRNA Analizi için Komplementer DNA Sentezi

İlgili genlere ait mRNA düzeyindeki ifade farklılıklarının tespitinde kullanılacak komplementer DNA (cDNA)’lar için havuz yapılan RNA örnekleri kullanıldı. Toplam 20 µl’lik hacimde gerçekleştirilen cDNA sentezi için 10 µl RNA örneği, 2 µl 10×RT random primer, 2 µl 10×RT buffer, 0.8 µl 25×dNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirilerek 25 °C’de 10 dakika, 37 °C’de 120 dakika, 85 °C’de 5 dakika ve en son sıcaklık 4 °C olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20 °C’de saklandı.

2.7.2.2. miRNA Analizi için Komplementer DNA Sentezi

MiRNA'dan cDNA oluşturma işlemi; ön aşama ve ana aşama olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. mRNA için oluşturulan cDNA'da kullanılan "10×RT random primer" yerine, ilgili miRNA'lara spesifik RT primerleri kullanıldı.

Ön aşamada kullanılmak üzere 10 mikromolar (μM)'lık RT Primer'lerinden 10'ar μl alınarak yeni bir tüpe konuldu ve 1000 μl 'ye tamamlamak için nükleaz içermeyen su ilave edildi. Böylece 1 μM 'lık RT Primer havuzu oluşturuldu. Bir örnek için 10 μM 'lık dNTP'den 0.5 μl ; 1 μM 'lık RT Primer havuzundan 5 μl ve 100 ng/ μl 'lik miRNA'dan 8 μl alınıp nükleaz içermeyen steril bir tüp içerisinde karıştırıldı. 65 °C'de 5 dakika ve sonrasında buz içerisinde 2 dakika bekletilerek pre-cDNA oluşturuldu.

Ana aşamada; cDNA sentez kiti (Applied Biosystems) kullanılarak bir örnek için 10×RT buffer'dan 1 μl , MultiScribe™ Reverse Transcriptase'dan 0.5 μl , nükleaz içermeyen sudan 3.5 μl ve pre-cDNA'dan 5 μl alınıp nükleaz içermeyen steril bir tüp içerisinde karıştırıldı. cDNA sentez kitine göre termal döngü cihazında 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve en son sıcaklık 4 °C olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

2.7.3. Kantitatif Real Time PCR ile Komplementer DNA Amplifikasyonu

Elde edilen cDNA'lar, bir dizi spesifik primerler varlığında qRT-PCR aracılığıyla amplifiye edildi. Sıçan kornea örneklerindeki mRNA ifade düzeyleri incelenirken Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) referans gen olarak kullanıldı (Tablo 1). Ayrıca yine aynı örneklerde Tablo 2'de verilen miRNA'lar için de ekspresyon düzeyleri belirlenirken RNU48 referans gen olarak kullanıldı (Tablo 2). qRT-PCR analizi, 96 kuyucuklu platelerde, toplamda 10 μl hacimde (1 μl cDNA ve 9 μl karışım) üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bu analiz, BrightGreen 2X qPCR Master Mix (MasterMix-S, abm, Kanada) kullanılarak

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sisteminde üretici firmanın belirttiği protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan qRT-PCR mRNA primerleri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ (5'-3')	
GAPDH	FORWARD	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	REVERSE	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
VEGFA	FORWARD	GCAGCGACAAGGCAGACTAT
	REVERSE	GCAACCTCTCCAAACCGTTG
VEGFR-2	FORWARD	TCCACATGGGCGAATCACTC
	REVERSE	ACGGTGCCATTCAAGTTTCCA

Tablo 2: Çalışmada kullanılan qRT-PCR miRNA primerleri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ (5'-3')	
RNU48	RT	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGGAGACGGTCAG
	FORWARD	TCTGAGTGTCTTCGCTGACG
miR-21	RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCGACAGCCC
	FORWARD	CAACAGCAGTCGATGGGCTGTC
miR-27a	RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCGCGGAACT
	FORWARD	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC
miR-31	RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCGATGGCAA
	FORWARD	TGCTATGCCAACATATTGCCATC
miR-126	RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCGCGCATTAT
	FORWARD	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG
miR-184	RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCACCCTTAT
	FORWARD	TGGACGGAGAACTGATAAGGGT
miR-204	RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTC AACGTCCC
	FORWARD	GCTGGGAAGGCAAAGGGACGTT
Universal	REVERS	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

2.8. İstatistiksel Analiz

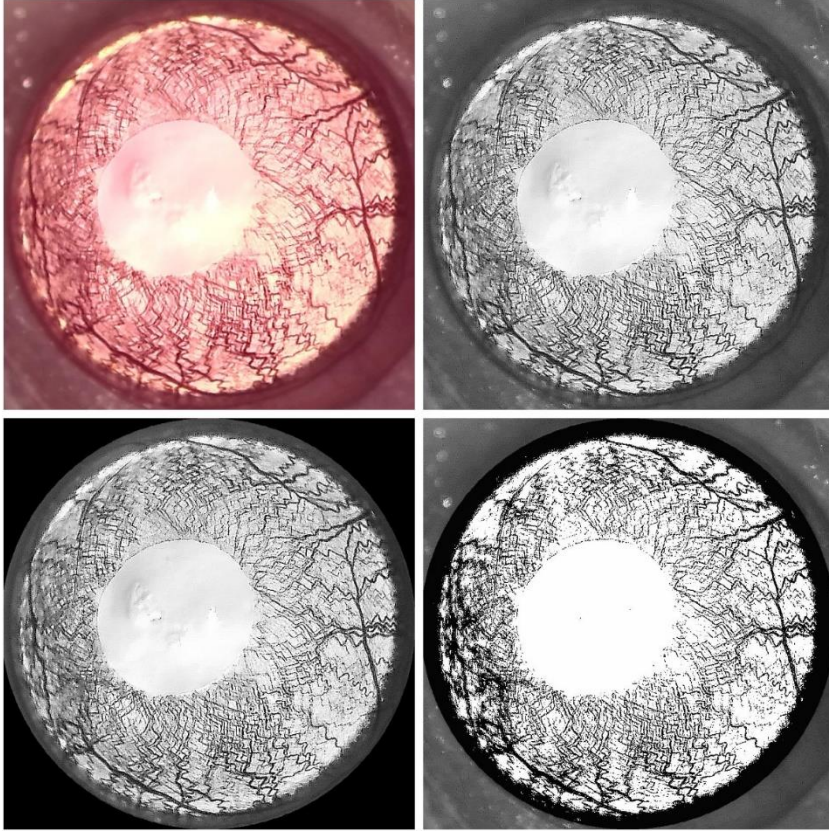
qRT-PCR verilerinin istatistiksel analizi için çevrimiçi “qiagen gene globe PCR data analyze” yöntemi kullanıldı. Analizler sonucunda gruplar arasındaki mRNA ve miRNA ifadelerindeki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.



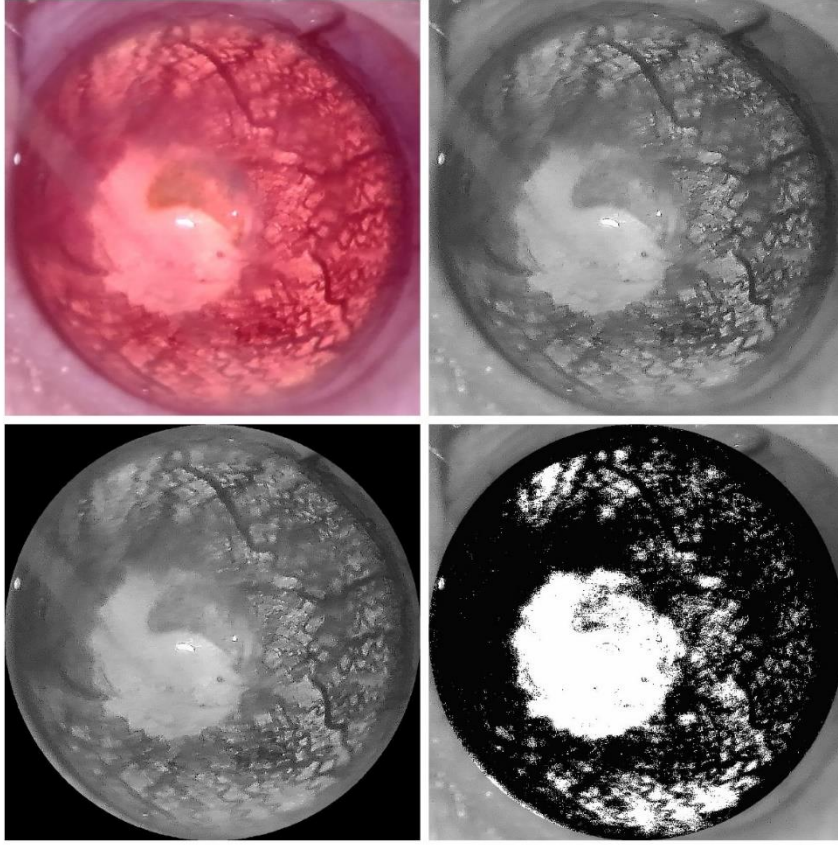
3. BULGULAR

3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması

Grup 1 sağlıklı kontrol grubunda neovaskülarizasyon izlenmemiştir. Grup 2 DMSO grubunda korneal neovaskülarizasyon miktarı %43.52'ye yükselmiştir. Tedavi alan diğer gruplarda ise; topikal Bevacizumab 5mg/ml alan Grup 3'te %18.11, topikal Motesanib 2.5 mg/ml tedavi alan grup 4' te %17.52, topikal Motesanib 5 mg/ml tedavi alan grup 5'te %17.46, topikal Motesanib 7.5 mg/ml tedavi alan grup 6'da %14.90 oranında korneal neovaskülarizasyon alanı tespit edilmiştir. Tedavi gruplarındaki neovaskülarizasyon alanlarının, DMSO grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Tedavi grupları arasında belirgin fark izlenmemiştir.



Şekil 14: Grup 1, sağlıklı kontrol grubu sağ kornea ve negatif görüntüleri



Şekil 15: Grup 2, DMSO grubu sağ kornea ve negatif görüntüleri

3.2. Kantitatif RT-PCR Bulguları

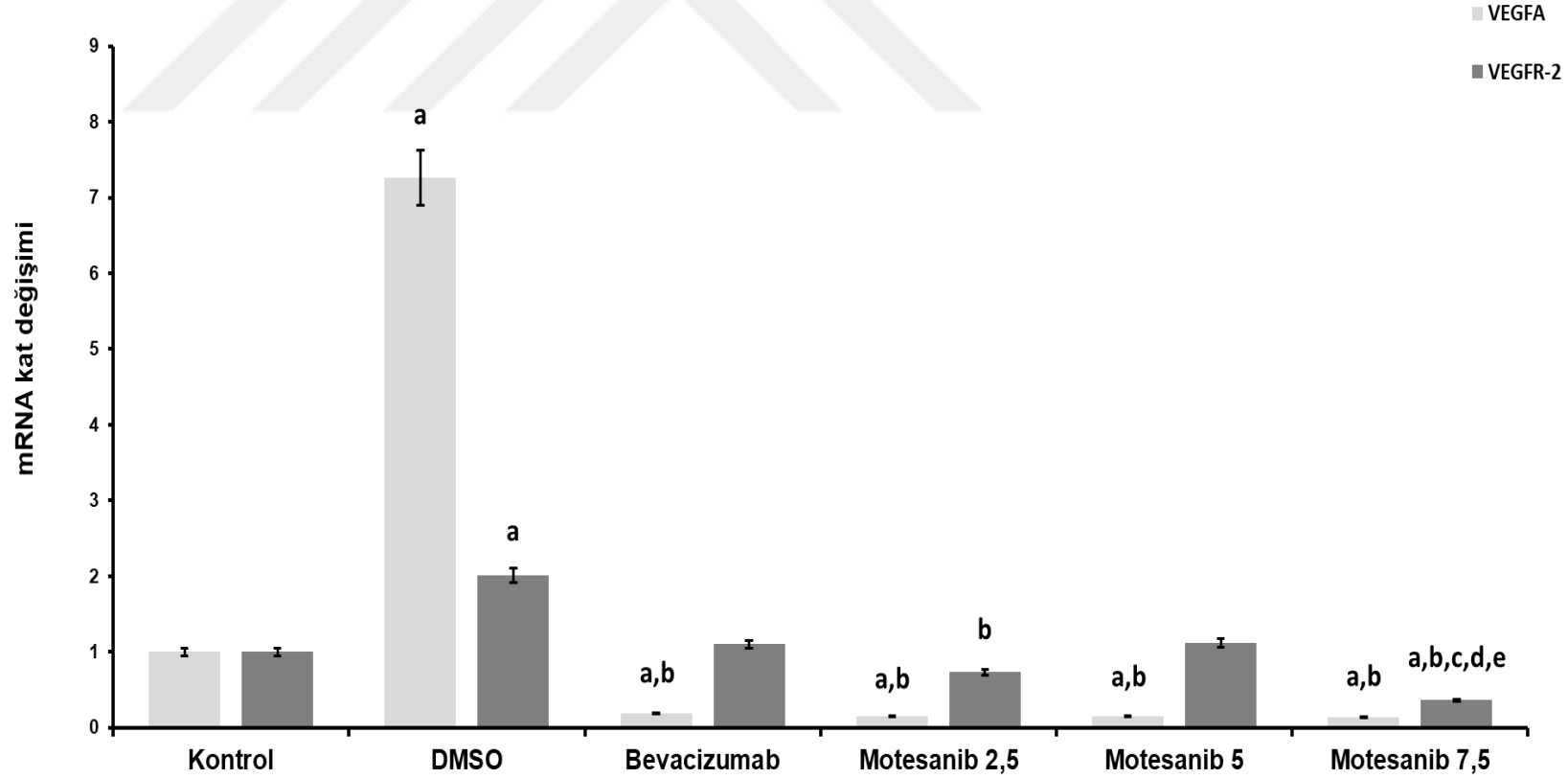
qRT-PCR verilerinin analizi neticesinde; VEGF-A mRNA düzeylerinin kontrol grubuna oranla DMSO grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p=0.005$) bununla birlikte Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml gruplarında ise azaldığı (sırasıyla; $p=0.008$, $p=0.007$, $p=0.007$ ve $p=0.006$) belirlendi. DMSO grubuna oranla ise, Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla; $p=0.003$, $p=0.003$, $p=0.003$ ve $p=0.003$) görüldü. Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml grupları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında gruplar arasında VEGF-A mRNA ifade düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim görülmedi ($p>0.05$). Öte yandan, VEGFR-2 mRNA düzeylerinin ise, kontrol grubuna oranla DMSO grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p=0.048$) ve Motesanib 7,5 mg/ml grubunda

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p=0.022$) tespit edildi. DMSO grubuna oranla ise, Motesanib 2,5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (sırasıyla; $p=0.019$ ve $p=0.007$). Motesanib 7.5 mg/ml tedavi alan grup diğer tedavi alan gruplar (Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml) ile oranlandığında anlamlı düzeyde VEGFR-2 mRNA düzeylerinde azalma tespit edildi (sırasıyla; $p=0.016$, $p=0.046$ ve $p=0.015$).

(Tablo 3).

Ayrıca, çalışmada değerlendirilen miRNA'lar içerisinde sadece miRNA-126'nın ifade düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde değişiklikler tespit edildi. Kontrol grubuna oranla sadece DMSO grubunda anlamlı düzeyde artış belirlendi ($p=0.01$). DMSO grubuna oranla ise, Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla; $p=0.008$, $p=0.011$, $p=0.011$ ve $p=0.015$) görüldü. Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml grupları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında gruplar arasında miRNA-126 ifade düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim görülmedi ($p>0.05$). Diğer miRNA'ların ifade düzeyleri gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim göstermedi ($p>0.05$) (Tablo 4).

Tablo 3: Farklı uygulamaların qRT-PCR ile VEGFA ve VEGFR-2'nin mRNA ifadeleri üzerine etkileri



*Tablo, kontrol grubuna oranla diğer gruplardaki mRNA kat değişimlerine göre hazırlanmıştır.

^a Kontrol grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p<0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

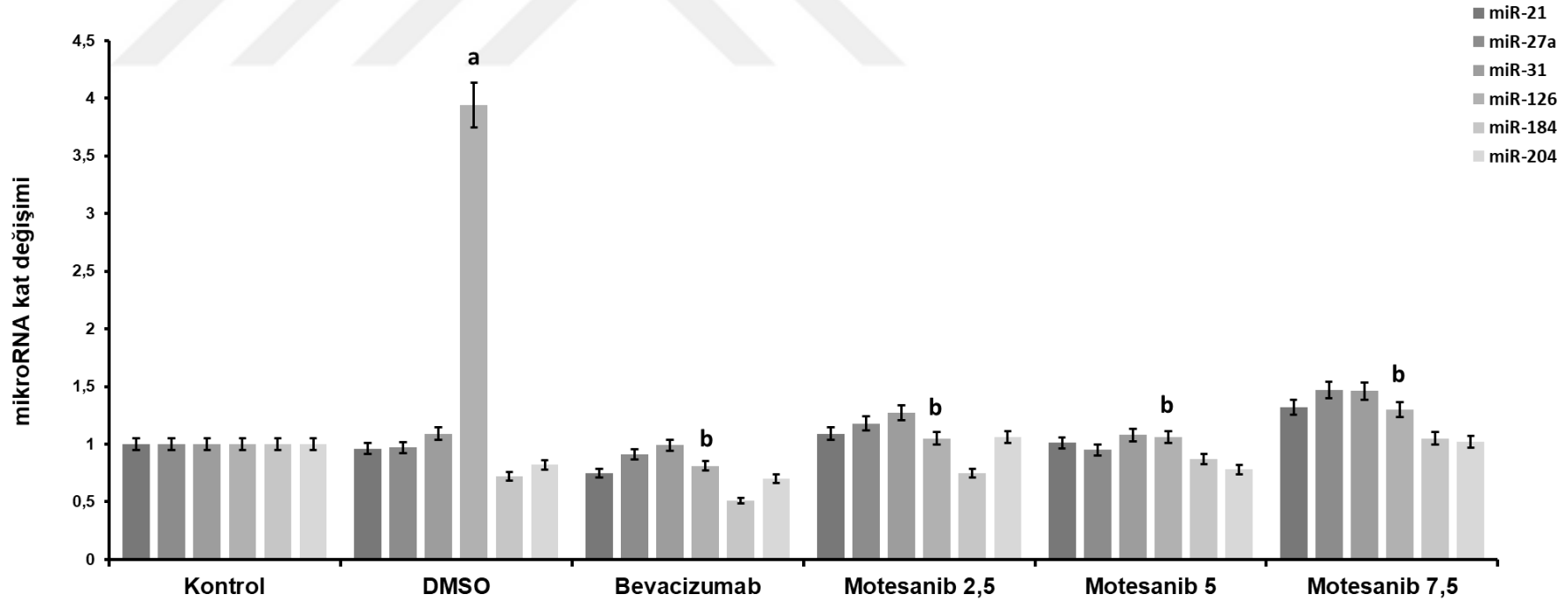
^b DMSO grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p<0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

^c Bevacizumab grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p<0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

^d Motesanib 2,5 grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p<0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

^e Motesanib 5 grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p<0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

Tablo 4: qRT-PCR ile miRNA ifadeleri üzerindeki kat değişimleri



*Tablo, kontrol grubuna oranla diğer grublardaki mRNA kat değişimlerine göre hazırlanmıştır.

a Kontrol grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p < 0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

b DMSO grubuna oranla mRNA kat değişiminde anlamlı değişim ($p < 0.05$) meydana geldiğini ifade etmektedir.

4. TARTIŞMA

Vasküler sistem; besinleri organlara ve dokulara iletir, katabolik ürünleri uzaklaştırır. Bu işlevleri nedeniyle anjiogenez; hem fizyolojik gelişimde hem de homeostazda çok önemli roller oynar (197, 198). Vasküler büyüme düzensizliğinin birçok kardiyovasküler hastalık, kanser, nörodejeneratif bozukluk ve vasküler göz hastalıkları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (199).

Korneal neovaskülarizasyon gelişimi dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen oldukça ciddi bir durumdur. Neovaskülarizasyon gelişimi sonucunda, korneanın optik açıdan yetersizliği, zayıflamış gerilme kuvveti ve yetersiz bariyer işlevi söz konusu olur. Tüm bu durumlar görme kalitesi üzerinde ciddi fonksiyonel kayba neden olur (89).

Korneal neovaskülarizasyon; önceden var olan perikorneal vasküler yapılardan yeni damarların filizlenmesidir. Etiyolojik nedene spesifik olmayan bir yanıt olarak gelişen korneal neovaskülarizasyon; konjenital hastalıklar, kontakt lens ile ilişkili hipoksi, inflamatuvar bozukluklar, kimyasal yanıklar, limbal kök hücre eksikliği, dejenerasyon, alerji, travma, enfeksiyon gibi çok çeşitli kornea patolojilerinde ortaya çıkabilir (91).

Korneal neovaskülarizasyon; proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki dengesizlik sonucu vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonu ve kornea stromasına göçü ile oluşur. Korneal neovaskülarizasyonu uyaran proanjiogenik faktörler; VEGF, MMP, bFGF, PDGF'ler ve IL-1'i içerir. Bunların içerisinde VEGF en önemli proanjiogenik ajan olarak görülmektedir ve VEGF-A diğer izoformlara oranla oküler anjiogenezde en önemli rolü oynamaktadır. VEGF-A etkisini VEGFR-2 reseptörü ile sergilemektedir (200). Korneal neovaskülarizasyonu inhibe eden antianjiogenik faktörler; endostatin / endostatin analogları (endostatin, neostatin, arresten, canstatin ve tumstatin), plazminojen / serin proteaz inhibitörleri (anjiostatin ve pigment epitelden türetilmiş faktör [PEDF]) ve çözünür VEGF reseptörleri olarak kategorize edilebilir (91). Bu faktörlerin dışında anjiogenez sürecine gen ekspresyonu ve endotelial fonksiyonlar üzerindeki etkisi ile miRNA'lar da dahil olmaktadır. Birçok miRNA vasküler

endotel hücrelerinde eksprese edilir. Anjiogenez ile VEGF sinyali üzerinden, farklı mekanizmalar ile etki gösterir.

İlk olarak 1993'te tanımlanan miRNA'lar, büyüklükleri 19 ila 25 nükleotid arasında değişen, doğal olarak oluşan küçük ncRNA'ların bir sınıfıdır. Bunların ana işlevi, transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenlemektir. Şimdiye kadar yapılan oküler konulu çalışmalarda miRNA'ların özellikle retina üzerindeki rolleri araştırılmıştır. Diyabetik retinopati, YBMD ve prematürite retinopatisi gibi neovasküler göz hastalıklarında yapılan çalışmalarda; miRNA'ların ve miRNA biyogenez mekanizmalarının değiştirilebileceği ve düzenlenebileceği gösterilmiştir, bu durumlar miRNA'ların kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır (199).

İlk miRNA'nın tanımlanmasının ardından bugüne kadar hayvanlar, bitkiler, protistler ve virüslerde de miRNA'lar bulunmuştur (201). MiRNA verileri miRBase, MiRDB, miR2Disease, HMDD ve PhenomiR dahil olmak üzere bir dizi veri tabanında saklanır. MiRDB veritabanında şu anda kayıtlı 2656 insan miRNA'sı ve 764 rat miRNA'sı tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, oküler neovaskülarizasyon ile ilişkisine en çok atıfta bulunulmuş olan miRNA'lardan aşağıda sıralanmış olan altı miRNA subtipi çalışmamıza dahil edildi (159).

MiRNA-21; anjiogenez, tümör büyümesi ve metastazın düzenlenmesinde ayrıca kardiyak hipertrofide önemli bir rol oynar (199). Zhu ve arkadaşları, tümör baskılayıcı TPM1'i miRNA-21 için bir hedef olarak tanımladılar. MiRNA-21'in, TPM1'in down regülasyonu ile anjiogenez arttırdığını gösterdiler (126). Zhang ve arkadaşları deneysel korneal neovaskülarizasyon modelinde, subkonjonktival antagomir-21 enjeksiyonu uygulamışlardır. Antagomir-21 enjeksiyonunun; miRNA-21'i etkisiz hale getirdiğini, VEGF-A ve HIF-1 α 'nın ekspresyonunu inhibe ederek neovaskülarizasyona ilerlemesini azalttığını göstermişlerdir (127).

MiRNA-27a; endotel hücrelerinde eksprese edilir. miRNA-27a ve miRNA-27b'nin aşırı ekspresyonu endotel hücre proliferasyonunu artırır. Urbich ve arkadaşları, in vivo ve in vitro olarak miRNA 27'nin semoforin (membran proteini) üzerinden VEGF ekspresyonunu artırdığı ve anjiogenez indüklediğini göstermişlerdir (128).

MiRNA-126; vasküler büyüme için VEGF ve FGF dahil olmak üzere anjiyogenik faktörlerin düzenlenmesinde rol oynar. Embriyonik anjiogenezi ve kardiyak anjiogenezi düzenler. Wang ve ark çalışmasında, laserle indüklenen koroidal neovaskülarizasyonda miRNA-126'nın; VEGF-A, KDR ve SPRED-1 ekspresyonunu azaltarak anjiogenezi baskıladığını bulmuştur (135). Bai ve ark; miRNA-126'nın iskemi kaynaklı retinal neovaskülarizasyon modelinde, neovaskülarizasyonu azalttığını tespit etmişlerdir (202). Aksine; Kunhert ve arkadaşlarının çalışmasında; korneal neovaskülarizasyon üzerinde miRNA-126'nın proanjiyogenik etkisi olduğu gösterilmiştir. (136)

MiRNA-31, sırasıyla vasküler perisitlerde ve endotel hücrelerinde proanjiyogenik faktörler olarak işlev gören PDGF- β ve HIF-1 α 'yı hedefler. Shen ve arkadaşları iskemiye bağlı retinal neovaskülarizasyon modelinde yaptığı çalışmada, intraoküler pre-miRNA-31, pre-miRNA -150, pre-miRNA -184 enjeksiyonunun retinal neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (129). Normal şartlar altında korneal avasküleritenin sağlanması için HIF-1 α yıkılır. (130) Hipoksik koşullarda ise HIF-1 α , PHD'nin inaktivasyonu ve HIF-1 α 'yı inhibe eden faktör FIH-1 tarafından stabilize edilerek yıkımı engellenir (131, 132). Chen ve arkadaşları, kontakt lens ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyon fare modelinde, shRNA tarafından HIF-1 α 'nın hedeflenmesinin, VEGF ekspresyonunu ve korneal neovaskülarizasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (133). Bu çalışmaların ışığında, miRNA-31'in retinal neovaskülarizasyon üzerinde antianjiyogenik, korneal neovaskülarizasyonda ise proanjiyogenik olduğu söylenebilir.

MiRNA-184 ve miRNA-204, normal koşullar altında kornea endotelinde en çok eksprese edilen 2 miRNA'dır (125). An ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 6 farenin korneal yara iyileşme süreci izlenmiştir. Yara iyileşmesi sırasında miRNA profil değişikliklerini izlemek için korneal epitel kazıma yapılarak 29 subtip miRNA üzerinde çalışılmıştır. Korneal yara iyileşme sürecinde 29 miRNA'dan 15 miRNA'da düşme gözlenmiş, bu 15 miRNA'dan en çok düşüş gösterenler ise miRNA-184 ve miRNA-204 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık, diğer 14 miRNA'nın korneal yara iyileşmesi sürecinde yükseldiği gözlenmiştir (137). Zhong ve arkadaşlarının korneal sütur ilişkili yara iyileşmesinde miRNA-184'ün

rolünü saptamak için yaptığı çalışmada; miRNA-184 ekspresyon seviyesinin, korneal süturasyon yapılmış ratlarda kontrol grubuna göre %75 oranında azaldığı gösterilmiştir (138).

Ele aldığımız oküler anjiogeneze dışında, patolojik anjiogeneze sahip birçok hastalıkta da oldukça sık kullanımda olan tirozin kinaz inhibitörlerinin son dönemde bilimsel açıdan popüleriteleri artmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörlerinin etki mekanizması kısaca şu şekilde özetlenebilir: Tirozin kinaz, ATP'deki fosforun hedef proteine transferini sağlayarak, protein fosforilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (187). Hücrelerin bölünmesinde, hücreler arası sinyal iletiminde, hücreler proliferasyonda ve farklılaşmada, hücrenin canlılığı ve hücre hareketi gibi önemli işlevlerde rol alır (188, 189). Tirozin kinaz inhibitörleri ile bu işlevlerin baskılanması sonucunda antianjiogenik ve anti tümör aktivitesi beklenmektedir. Tirozin kinaz inhibitörleri özellikle hematolojik hastalıklarda kullanılmakta olup, etki mekanizması nedeni ile hematoloji dışı birçok hastalıkta da etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında; nörofibromatozis, bullöz pemfigoid, romatoid artrit, birçok kanser türü ve YBMD yer almaktadır (203). Oftalmoloji alanında şu anda, VEGF ve PDGF inhibisyonu yapan oral tirozin kinaz inhibitörü X-82'nin YBMD'li hastalarda oral uygulama için güvenli olduğu sonucuna varan yayınlanmış bir Faz I çalışması bulunmaktadır. YBMD için intravitreal monoterapi veya anti-VEGF adjuvanları olarak bu ilaçların etkinliğini değerlendirmek için Faz II denemeleri henüz başlamamıştır (204). Axitinib bu kategoride neovasküler YBMD tedavisi için araştırılan başka bir tirozin kinaz inhibitörüdür (205). Literatürde, diğer oküler neovaskülarizasyon patolojilerinde de deneme çalışmaları devam etmektedir.

Etkinliği gösterilmiş ilk tirozin kinaz inhibitörü İmatinib Mesilat'tır. Zamanla yeni etken maddeler keşfedilmiştir. Bunlar arasında; Gefitinib, Erlotinib, Sorefenib, Dasatinib, Lapatinib, Nilotinib, Pazotinib, Vandetanib, Vemurafenib, Ruksolitinib, Krizotinib, Aksitinib, Bosutinib, Kabozantinib, Ponatinib, Regorafenib, Tofacitinib, Afatinib, Ceritinib, Dabrafenib, İbrutinib, Cetuximab, Nintedanib, Lenvatinib, Alectinib, Osimertinib, Brigatinib, Palbociclib, Temsirolimus, Everolimus, Sirolimus ve Motesanib bulunmaktadır (193).

Ren ve ark; laserle indüklenen koroidal neovaskülarizasyon rat modelinde, tirozin kinaz inhibitörü olan Vorolanib (CM082)'i oral yolla uygulamıştır.

Değerlendirme fundus floresein anjiografi ile yapılmıştır. Vorolanib ile tedavi edilen (10 mg/kg/gün veya 30 mg/kg/gün) ratların kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha az neovaskülarizasyon sergilediğini göstermiştir (206). Keskin ve ark; gümüş nitrat ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 20 fare modelinde, 7 gün boyunca intraperitoneal olarak tirozin kinaz inhibitörü olan Semaxanib (SU5416) (25/mg/kg) uygulamıştır. Kontrol grubuna 7 gün boyunca intraperitoneal DMSO uygulanmıştır. Korneal neovaskülarizasyon fundus floresein anjiografi ile alınan fotoğraflar üzerinde değerlendirilmiştir. Tirozin kinaz inhibitörü olan Semaxanib'in korneal neovaskülarizasyonda belirgin inhibitör etkisi olduğu tespit edilmiştir (207). Lledó Riquelme ve ark; süturla indüklenen korneal neovaskülarizasyonlu Yeni Zelanda tavşan modelinde, tirozin kinaz inhibitörü olan Aksatinib'i topikal form da uygulamıştır. Aksatinib'in, VEGF ve PDGF yollarını bloke ederek korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunu indüklediğini bulmuştur (208).

Yıldırım ve ark; gümüş nitrat ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 42 Wistar Albino rat modeli üzerindeki çalışmada, Bevacizumab ve Sorafenib (multipl tirozin kinaz inhibitörü) topikal damla formunda uygulamıştır. VEGF ELISA düzeyleri ve immünohistokimyasal olarak bakılmış, her iki damla formunun da etkin olduğu saptanmıştır (181). Şahan ve ark; gümüş nitrat ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 39 Sprague Dawley rat modelinde, Dovatinib (multipl tirozin kinaz inhibitörü) ve Bevacizumab topikal damla formunda uygulamıştır. Ön segment fotoğraf ve hematoksilen eozin ile yapılan inceleme sonunda, Dovatinib'in Bevacizumab'tan daha az etkin olmak üzere, her iki ilacın da neovaskülarizasyonu geriletmediğini bulmuştur (183).

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde şimdiye kadar birçok medikal ve cerrahi metod denenmiştir. Medikal tedavi seçenekleri içerisinde; kortikosteroidler, nonsteroid antiinflamatuvarlar, siklosporin A, somatostatin analogları, askorbik asit, anti-VEGF ajan (Ranibizumab, Bevacizumab vb.) uygulamaları yer almaktadır. Cerrahi tedavi seçenekleri içerisinde ise; keratoplasti, laser, fototerapi ve enjeksiyon uygulamaları mevcuttur. Bu tedavilerin terapötik amacı, antianjiogenezi başlatmak ve neoanjiogenezi erken aşamalarda durdurmaktır (139). Ancak tedavi protokolü henüz netlik kazanmamıştır.

VEGF-A blokajı, kanser ve oküler patolojilerde neovaskülarizasyon inhibisyonu için etkili bir strateji olarak kullanılmaktadır. Ancak; bazı çalışmalar anti-VEGF tedavisinin neovaskülarizasyon regresyonunda yeterince etkili olmadığını göstermiştir. Bu durum neovaskülarizasyonun VEGF-A'ya daha az bağımlı olduğu gerekçesine dayandırılmaktadır. Damarların VEGF-A bağımlılığı, vasküler duvarı oluşturan perisitler ve düz kas hücrelerinin varlığı ile ilişkili olabilir. Vasküler duvar yapısının gelişimi; PDGF-B sinyali ile düzenlenir. Bu yolağa müdahale, endotel hücresi ile duvar hücresi arasındaki etkileşimlerin bozulmasına ve duvar hücrelerinin kaybına neden olur. Jo ve ark. yaptıkları çalışmada, VEGF-A ve PDGFR- β yolaklarını ortak şekilde inhibe eden ajanlar kullanarak anjiogenezin VEGF-A'ya bağımlılığını araştırmıştır. Çalışmalarında, fare modelinde koroidal ve korneal neovaskülarizasyon tedavisinde, intraperitoneal girişim ile anti-VEGF aptamer (25 mg/kg'da), anti-PDGFR- β antikoru (5 mg/kg'da) ve reaktif kombinasyonu (bir anti-VEGF aptamer ve bir anti-PDGFR- β antikoru) günde iki kez intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Yeni oluşan damarların zamanla VEGF-A yoksunluğuna dirençli hale geldiğini göstermişlerdir. Ayrıca, birden fazla neovasküler büyüme modelinde, VEGF-A ve PDGF-B sinyalinin inhibisyonunun, sadece VEGF-A inhibisyonuna oranla daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular ışığında, anjiogenez tedavisinde kombine tedavi stratejisinin daha üstün olduğunu savunmaktadırlar (209).

Biz çalışmamızda; gümüş nitrat ile koterizasyon işlemi ile indüklenen korneal neovaskülarizasyon modelini ele aldık. Oluşturulan model üzerinde daha önceki literatür bilgileri ışığında korneal neovaskülarizasyonda etkin olduğu kanıtlanmış olan Bevacizumab ve etkin olmasını beklediğimiz tirozin kinaz inhibitörü olan Motesanib uyguladık.

Bevacizumab; tüm VEGF-A izoformlarını seçici olarak antagonize eden VEGF'e karşı humanize edilmiş bir monoklonal antikoru (mAb) immünoglobulin G1 (IgG1) 'dir. Bevacizumab, solid tümörlerin vasküler olarak beslemesini önleyerek sistemik olarak anjiogenezini inhibe etmek için tasarlanmış, 149 KDa'lık uzunlukta, iki değerlikli bir monoklonal antikordur (179). Literatürde Bevacizumab'ın oldukça yaygın alanda ve farklı kullanım şekilleri ile kullanıldığına rastlamaktayız. FDA onaylı olarak; serviks kanseri, metastatik kolorektal kanser, glioblastoma, skuamöz

olmayan küçük hücreli akciğer kanseri, over kanseri, primer periton kanseri, metastatik renal hücreli karsinom tedavilerinde kullanılmaktadır. Endikasyon dışı olarak ise; metastatik meme kanseri, endometriyal kanser, anjiyosarkom, gliomalar, malign plevral mezotelyoma, medulloblastom (pediatrik), hemanjioperisitom ve malign soliter fibröz tümör, diyabetik makula ödemi, YBMD ve korneal neovaskülarizasyon tedavilerinde de kullanılmaktadır (175).

Gupta ve ark; keratoplasti sonrası greft reddi riski yüksek olan, kronik derin korneal vaskülarizasyonu olan 14 hastanın 14 gözüne nakil öncesi, intrastromal Bevacizumab (0.05-0.1 mL 2.5 mg/ 0.1 mL) enjeksiyonu uygulamıştır. Uygulamayı 4-8 haftada tekrar etmiş, ortalama 1-3 seans şeklinde uygulama yapılmıştır. Uygulamayı takiben, %14.2'sinde var olan neovaskülarizasyon tamamen gerilemiş, keratoplasti ihtiyacının da tamamen ortadan kalmış olduğu tespit edilmiştir. Geride kalan gözlerde ise greft sağ kalımını artırdığı bulunmuştur (185).

Baradaran-rafi ve ark; sütur ile indüklenmiş korneal neovaskülarizasyonu olan 30 tavşan gözünde, 2 haftalık Adinopektin ve Bevacizumab topikal damla uygulamıştır. Her iki topikal formda da neovaskülarizasyonun azaldığını, Adinopektin'in daha etkin olduğunu bulmuştur (182). Yoon ve ark; fare korneal neovaskülarizasyon modelinde, topikal Rivoceranib (Apatinib, tirozin kinaz inhibitörü) (%0.1 ve %0.5) ve Bevacizumab (%0.5) damla formunda uygulamıştır. CD31 (cluster of differentiation) ve LYVE1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan recetor 1) düzeylerine immünofloresan ile bakılmıştır. Korneal neovaskülarizasyonda azalma görülmüş, %0.5 Rivoceranib ve %0.5 Bevacizumab grupları arasında belirgin fark izlenmediği saptanmıştır (184).

Motesanib; tüm VEGFR'leri (VEGFR-1, -2 ve -3), PDGF reseptörünü (PDGFR) ve kök hücre faktör reseptörünü/CD117'yi inhibe eden, küçük molekül, multipl tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI-KIT). Önceki klinik ve deneysel kanıtlar, Motesanib'in güçlü antianjiyogenik etkilere sahip olduğunu ve tümör anjiogenezi baskıladığını öne sürmüştür. Motesanib esas olarak endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve hayatta kalması ile ilişkili olan VEGF sinyal yolunu bloke ederek işlev görür (18).

Motesanib; metastatik meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümörler, tiroid kanseri gibi birçok

kanser tedavisinde deneme aşamasındadır (17, 195, 210, 211). Bunun yanı sıra, oküler neovaskülarizasyonda etkinliği konusunda da çalışmalar yapılmıştır.

Ho ve ark; Motesanib'in, Sisplatin dirençli mesane kanserinde kullanılabileceğini önermişlerdir (194). Coxon ve ark; medüller tiroid kanseri oluşturulan fare modelinde, Motesanib kullanımı ile tümörün boyutlarında ve damar gelişimde azalma saptamışlardır. Bu durum, Motesanib'in antitümör ve antianjiyogenik aktivitesini destekler niteliktedir (195).

Rho ve ark; 46 adet erkek rat laser fotokoagülasyon ile indüklenmiş koroidal neovaskülarizasyon modelinde topikal Motesanib ve topikal DMSO damla uygulanmıştır. Fundus floresein anjiyografi ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda, topikal Motesanib damlanın topikal DMSO'ya oranla koroidal neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (18). Polverine ve ark; korneal neovaskülarizasyon modelinde oral gavaj yolu ile uyguladıkları Motesanib'in doz bağımlı olarak neovaskülarizasyonu geriletmediğini bulmuştur. Bu çalışmada Motesanib'in iyi tolere edildiği, vücut ağırlığı veya hayvanların genel sağlığı üzerinde önemli bir toksik etkisi olmadığı tespit edilmiştir (17).

Yapılan çalışmalarda, korneal neovaskülarizasyon inhibisyonu için oral, intraperitoneal, subkonjonktival, topikal damla formu gibi farklı tedavi modaliteleri denenmiştir. Biz de çalışmamızda, daha önce deneysel korneal neovaskülarizasyon modelinde topikal formu kullanılmayan Motesanib'i kullanmayı tercih ettik.

Çalışmamızda; ilaç etkinliklerini değerlendirmek için ameliyathane mikroskopu ile ön segment fotoğrafı çekildi. Fotoğraf üzerinde neovasküler alan yüzdesi MATLAB R2015a programı ile değerlendirildi. Kornealar 4 mm'lik panç yardımı ameliyathane mikroskopu görüntüsü eşliğinde eksize edildi, ardından ratlar dekapite edildi. Alınan kornealarda qRT-PCR yöntemi ile VEGF-A mRNA, VEGFR-2 mRNA, miRNA-21, miRNA-27a, miRNA-31, miRNA-126, miRNA-184 ve miRNA-204 parametreleri değerlendirildi.

Çalışmamızda, sağlıklı kontrol grubu dışında tüm gruplarda korneal neovaskülarizasyon görüldü. DMSO grubunda, tedavi alan gruplara göre daha fazla korneal neovaskülarizasyon alanı izlendi. DMSO grubunda %43,52 oranında korneal neovaskülarizasyon alanı saptanmıştır. Topikal Bevacizumab 5 mg/ml alan grupta % 18,11 oranında, topikal Motesanib 2.5 mg/ml tedavi grubunda %17,52

oranında, topikal Motesanib 5 mg/ml tedavi grubunda % 17.46 oranında, topikal Motesanib 7.5 mg/ml tedavi grubunda % 14,90 oranında korneal neovaskülarizasyon alanı saptandı.

Çalışmamızda; qRT-PCR verilerinin analizi neticesinde, VEGF-A mRNA düzeyleri kontrol grubuna oranla DMSO grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p=0.005$), tedavi alan diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığını (sırasıyla; $p=0.008$, $p=0.007$, $p=0.007$ ve $p=0.006$) bulduk. DMSO grubuna oranla tedavi alan gruplarda VEGF-A mRNA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla; $p=0.003$, $p=0.003$, $p=0.003$ ve $p=0.003$) görüldü. Tedavi alan gruplar kendi içerisinde oranlandığında VEGF-A mRNA ifade düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim izlenmedi ($p>0.05$).

Öte yandan, VEGFR-2 mRNA düzeylerinin kontrol grubuna oranla DMSO grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p=0.048$) ve tedavi gruplarından ise Motesanib 7.5 mg/ml tedavi alan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p=0.022$) tespit edildi. DMSO grubuna oranla ise, Motesanib 2,5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (sırasıyla; $p=0.019$ ve $p=0.007$). Motesanib 7.5 mg/ml tedavi alan grup diğer tedavi alan gruplar (Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml) ile oranlandığında anlamlı düzeyde VEGFR-2 mRNA'da azalma tespit edildi (sırasıyla; $p=0.016$, $p=0.046$ ve $p=0.015$).

Ayrıca, çalışmada değerlendirilen miRNA'lar içerisinde sadece miRNA-126'nın ifade düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde değişiklikler tespit edildi. Kontrol grubuna oranla sadece DMSO grubunda anlamlı düzeyde artış belirlendi ($p=0.01$). DMSO grubuna oranla ise, Bevacizumab 5 mg/ml, Motesanib 2,5 mg/ml, Motesanib 5 mg/ml ve Motesanib 7,5 mg/ml gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla; $p=0.008$, $p=0.011$, $p=0.011$ ve $p=0.015$) görüldü. Tedavi alan gruplarda kendi içerisinde karşılaştırıldığında gruplar arasında miRNA-126'nın ifade düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim görülmedi ($p>0.05$). Diğer miRNA'ların ifade düzeyleri gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim göstermedi.

Sonuç olarak; Motesanib Bevacizumab gibi korneal neovaskülarizasyonun regresyonunda etkilidir. VEGFR-2 mRNA düzeylerini baskılaması göz önüne

alındığında Motesanib 7.5 mg/ml'nin korneal neovaskülarizasyonun regresyonunda Bevacizumab'tan daha etkin olduğu ve Motesanib'in etkinliğinin doz bağımlı olduğu öngörülebilir. VEGF-A ve PDGF-B sinyal yollarının kombine inhibisyonunun, sadece VEGF-A inhibisyonundan daha üstün olduğuna dair kanıtlar bulunmuş olmakla beraber (209), VEGFR blokajı yanında PDGFR blokajı da yapabilen Motesanib'in, korneal neovaskülarizasyon regresyonunda PDGFR inhibisyonunu değerlendirmek için taranamamış olması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. qRT-PCR sonuçlarının immünohistokimyasal olarak da desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Çalışmamıza dahil edilen miRNA'lar içerisinde, miRNA-126'nın VEGF-A ve VEGFR-2 gibi biyobelirteçler ile benzer sonuçlar vermesi bakımından miRNA-126 genetik marker olarak kullanılabilir. Diğer miRNA'lar için örneklem sayısının artırılması ile daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda kullanılan ilaçların sistemik yan etkileri değerlendirilememiştir, daha uzun süreli tedavi süresince farklı dozlarda yan etki profilleri ile değerlendirilebileceği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKÇA

1. Palanker D. Optical properties of the eye. AAO One Network. 2013; 48.
2. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013; 120: 1778-1785.
3. Zhang SX, Ma J-x. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in retinal and eye research*. 2007; 26: 1-37.
4. Reinhard T, Larkin F. *Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease*: Springer; 2006; 2: 24-25.
5. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of ophthalmology*. 1997; 41: 275-313.
6. Feizi S, Azari AA, Safapour S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization. *Eye and Vision*. 2017; 4: 1-10.
7. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000; 41: 2514-2522.
8. Ho QT, Kuo CJ. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39: 1349-1357.
9. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound-and inflammation-related corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1998; 39: 18-22.
10. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2004; 82: 557-563.

11. Scholl S, Kirchhof J, Augustin AJ. Antivascular endothelial growth factors in anterior segment diseases. *Anti-VEGF*. 46: Karger Publishers; 2010; 133-139.
12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993; 75: 843-854.
13. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2012; 3: 311-330.
14. Li C, Kuchimanchi M, Hickman D, Poppe L, Hayashi M, Zhou Y, et al. In vitro metabolism of the novel, highly selective oral angiogenesis inhibitor motesanib diphosphate in preclinical species and in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009; 37: 1378-1394.
15. Sawaki A, Yamada Y, Komatsu Y, Kanda T, Doi T, Koseki M, et al. Phase II study of motesanib in Japanese patients with advanced gastrointestinal stromal tumors with prior exposure to imatinib mesylate. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2010; 65: 961-967.
16. Sherman SI, Wirth LJ, Droz J-P, Hofmann M, Bastholt L, Martins RG, et al. Motesanib diphosphate in progressive differentiated thyroid cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359: 31-42.
17. Polverino A, Coxon A, Starnes C, Diaz Z, DeMelfi T, Wang L, et al. AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer research*. 2006; 66: 8715-8721.
18. Rho CR, Kang S, Park KC, Yang K-J, Choi H, Cho W-K. Antiangiogenic effects of topically administered multiple kinase inhibitor, motesanib (AMG 706), on experimental choroidal neovascularization in mice. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2015; 31: 25-31.
19. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2011; 37: 588-598.

20. Rüfer F, Schröder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea*. 2005; 24: 259-261.
21. Fares U, Otri AM, Al-Aqaba MA, Dua HS. Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2012; 35: 39-45.
22. Feizi S, Jafarinasab MR, Karimian F, Hasanpour H, Masudi A. Central and peripheral corneal thickness measurement in normal and keratoconic eyes using three corneal pachymeters. *Journal of ophthalmic & vision research*. 2014; 9: 296-304.
23. Yang AY, Chow J, Liu J. Focus: sensory biology and pain: corneal innervation and sensation: the eye and beyond. *The Yale journal of biology and medicine*. 2018; 91: 13-21.
24. Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain research bulletin*. 2010; 81: 198-210.
25. Kitano S. An embryological study on the human corneal nerves. *Jpn J Ophthalmol*. 1957; 1: 48-55.
26. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental eye research*. 2003; 76: 521-42.
27. Cruzat A, Qazi Y, Hamrah P. In vivo confocal microscopy of corneal nerves in health and disease. *The ocular surface*. 2017; 15: 15-47.
28. Belmonte C, Acosta MC, Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Experimental eye research*. 2004; 78: 513-525.
29. Beuerman R, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Experimental neurology*. 1980; 69: 196-201.
30. Nishida T. Neurotrophic mediators and corneal wound healing. *The ocular surface*. 2005; 3: 194-202.

31. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea*. 2005; 24: 705-709.
32. Patel DV, Tavakoli M, Craig JP, Efron N, McGhee CN. Corneal sensitivity and slit scanning in vivo confocal microscopy of the subbasal nerve plexus of the normal central and peripheral human cornea. *Cornea*. 2009; 28: 735-740.
33. Parissi M, Karanis G, Randjelovic S, Germundsson J, Poletti E, Ruggeri A, et al. Standardized baseline human corneal subbasal nerve density for clinical investigations with laser-scanning in vivo confocal microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013; 54: 7091-7102.
34. Haynes RJ, Tighe PJ, Dua HS. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. *British journal of ophthalmology*. 1999; 83: 737-741.
35. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007; 48: 4391-4398.
36. Yazdani M, Elgstøen KBP, Rootwelt H, Shahdadfar A, Utheim ØA, Utheim TP. Tear metabolomics in dry eye disease: a review. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20: 3755.
37. Labetoulle M, Baudouin C, Calonge M, Merayo-Llodes J, Boboridis KG, Akova YA, et al. Role of corneal nerves in ocular surface homeostasis and disease. *Acta ophthalmologica*. 2019; 97: 137-145.
38. Zieske JD. Corneal development associated with eyelid opening. *International Journal of Developmental Biology*. 2004; 48: 903-911.
39. Ikeda A, Maisel H, Waggoner D. An immunofluorescent study of cornea development in the chick. 1975; 33: 279-290.
40. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental eye research*. 2004; 78: 503-512.
41. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*. 2018; 66: 190-194.

42. Araie M, Maurice DM. A reevaluation of corneal endothelial permeability to fluorescein. *Experimental eye research*. 1985; 41: 383-390.
43. Torricelli AA, Wilson SE. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Experimental eye research*. 2014; 129: 151-160.
44. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the cornea: structure, function, and development. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015; 134: 7-23.
45. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Progress in retinal and eye research*. 2015; 49: 1-16.
46. Quantock AJ, Boote C, Siegler V, Meek KM. Collagen organization in the secondary chick cornea during development. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003; 44: 130-136.
47. Funderburgh JL, Caterson B, Conrad GW. Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea. *Developmental biology*. 1986; 116: 267-277.
48. Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF. The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *The Journal of cell biology*. 1990; 110: 1457-1468.
49. Reneker LW, Silversides DW, Xu L, Overbeek PA. Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development-a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis. *Development*. 2000; 127: 533-542.
50. Navaratnam J, Utheim TP, Rajasekhar VK, Shahdadfar A. Substrates for expansion of corneal endothelial cells towards bioengineering of human corneal endothelium. *Journal of functional biomaterials*. 2015; 6: 917-945.
51. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1988; 86: 178-207.
52. Cibis GW. Fundamentals and principles of ophthalmology: American Academy of Ophthalmology; 2007; 14: 567-586.

53. Mobaraki M, Abbasi R, Omidian Vandchali S, Ghaffari M, Moztarzadeh F, Mozafari M. Corneal repair and regeneration: current concepts and future directions. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019; 7: 135.
54. Lu L, Reinach PS, Kao WW-Y. Corneal epithelial wound healing. *Experimental biology and medicine*. 2001; 226: 653-664.
55. Efron N, Carney LG. Oxygen levels beneath the closed eyelid. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1979; 18: 93-95.
56. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Progress in retinal and eye research*. 2003; 22: 69-94.
57. Aydın P, Akova YA. Temel göz hastalıkları: Güneş; 2001 5: 146-155.
58. Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial–stromal injury. *Experimental eye research*. 2016; 142: 110-118.
59. Zieske JD, Guimarães SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Experimental eye research*. 2001; 72: 33-39.
60. Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Progress in retinal and eye research*. 2015; 49: 17-45.
61. Di Girolamo N. Moving epithelia: tracking the fate of mammalian limbal epithelial stem cells. *Progress in retinal and eye research*. 2015; 48: 203-225.
62. West JD, Dorà NJ, Collinson JM. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance. *World journal of stem cells*. 2015; 7: 281-299.
63. Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG. Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1976; 15: 4-14.
64. Crosson C, Klyce S, Beuerman R. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1986; 27: 464-473.

65. Fu-Shin XY, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain research bulletin*. 2010; 81: 229-235.
66. Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, Hong J, Lee J, Mohan RR, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Experimental eye research*. 2003; 76: 71-87.
67. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006; 38: 1625-1631.
68. Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Current opinion in ophthalmology*. 2001; 12: 237-241.
69. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2006; 104: 264-302.
70. Kamil S, Mohan RR. Corneal stromal wound healing: Major regulators and therapeutic targets. *The Ocular Surface*. 2021; 19: 290-306.
71. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 2005; 24: 2-11.
72. Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Experimental eye research*. 1989; 49: 751-767.
73. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in retinal and eye research*. 2003; 22: 359-389.
74. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. Application of Rho kinase inhibitors for the treatment of corneal endothelial diseases. *Journal of ophthalmology*. 2017; 2017: 2646904.
75. Benayoun Y, Casse G, Forte R, Dallaudiere B, Adenis J, Robert P. Corneal neovascularization: epidemiological, physiopathological, and clinical features. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2013; 36: 627-639.

76. JMJ R. Leading causes of blindness worldwide. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 2002; 283: 19-25.
77. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Survey of ophthalmology*. 1998; 43: 245-269.
78. Terao R, Kaneko H. Lipid Signaling in Ocular Neovascularization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 4758.
79. Moccia F, Negri S, Shekha M, Faris P, Guerra G. Endothelial Ca²⁺ signaling, angiogenesis and vasculogenesis: just what it takes to make a blood vessel. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20: 3962.
80. Moriya J, Minamino T. Angiogenesis, cancer, and vascular aging. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2017; 4: 65.
81. Afzal A, Shaw L, Ljubimov A, Boulton M, Segal M, Grant M. Retinal and choroidal microangiopathies: therapeutic opportunities. *Microvascular research*. 2007; 74: 131-144.
82. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 2000; 6: 389-395.
83. Rajabi M, Mousa SA. The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines*. 2017; 5: 34.
84. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017; 20: 409-426.
85. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser Yolakları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011; 20: 187-229.
86. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473: 298-307.
87. Duran CL, Howell DW, Dave JM, Smith RL, Torrie ME, Essner JJ, et al. Molecular regulation of sprouting angiogenesis. *Comprehensive Physiology*. 2011; 8: 153-235.
88. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of ophthalmology*. 2000; 44: 415-425.

89. Clements JL, Dana R, editors. Inflammatory corneal neovascularization: etiopathogenesis. *Seminars in ophthalmology*; 2011; 26: 235-245.
90. Liu S, Romano V, Steger B, Kaye SB, Hamill KJ, Willoughby CE. Gene-based antiangiogenic applications for corneal neovascularization. *Survey of ophthalmology*. 2018; 63: 193-213.
91. Feizi S, Azari AA, Safapour S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization. *Eye and Vision*. 2017; 4: 28.
92. Chang J-H, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Current opinion in ophthalmology*. 2001; 12: 242-249.
93. Strömblad S, Cheresh DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chemistry & biology*. 1996; 3: 881-885.
94. Lee HS, Chung SK. The effect of subconjunctival suramin on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*. 2010; 29: 86-92.
95. Chang J-H, Garg NK, Lunde E, Han K-Y, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Survey of ophthalmology*. 2012; 57: 415-429.
96. Han K-Y, Chang J-H, Lee H, Azar DT. Proangiogenic interactions of vascular endothelial MMP14 with VEGF receptor 1 in VEGFA-mediated corneal angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016; 57: 3313-3322.
97. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB journal*. 1999; 13: 9-22.
98. Kim W-J, Mohan RR, Wilson S. Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999; 40: 1364-1372.
99. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in retinal and eye research*. 2010; 29: 208-248.

100. Lu P, Li L, Liu G, Zhang X, Mukaida N. Enhanced experimental corneal neovascularization along with aberrant angiogenic factor expression in the absence of IL-1 receptor antagonist. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009; 50: 4761-4768.
101. Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature medicine*. 2009; 15: 1023-1030.
102. Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotinan angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *The Journal of cell biology*. 2001; 152: 1247-1254.
103. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin $\alpha v \beta 3$ in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 39562-39568.
104. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006; 443: 993-997.
105. Kirwan RP, Zheng Y, Tey A, Anijeet D, Sueke H, Kaye SB. Quantifying changes in corneal neovascularization using fluorescein and indocyanine green angiography. *American journal of ophthalmology*. 2012; 154: 850-858.
106. Steger B, Romano V, Kaye SB. Corneal indocyanine green angiography to guide medical and surgical management of corneal neovascularization. *Cornea*. 2016; 35: 41-45.
107. Ang M, Cai Y, Shahipasand S, Sim DA, Keane PA, Sng CC, et al. En face optical coherence tomography angiography for corneal neovascularisation. *British Journal of Ophthalmology*. 2016; 100: 616-621.
108. Ang M, Sim DA, Keane PA, Sng CC, Egan CA, Tufail A, et al. Optical coherence tomography angiography for anterior segment vasculature imaging. *Ophthalmology*. 2015; 122: 1740-1747.

109. Scroggs MW, Proia AD, Smith C, Halperin EC, Klintworth GK. The effect of total-body irradiation on corneal neovascularization in the Fischer 344 rat after chemical cauterization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1991; 32: 2105-2111.
110. Klintworth GK. Corneal angiogenesis: a comprehensive critical review. 2012.
111. Fromer C, Klintworth G. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. III. Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *The American journal of pathology*. 1976; 82: 157-170.
112. Ma DH-K, Chen J-K, Kim W-S, Hao Y-X, Wu H-C, Tsai RJ-F, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in inflammation-induced corneal neovascularization. *Ophthalmic research*. 2001; 33: 353-362.
113. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1995; 6: 230-247.
114. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2009; 7: 147-154.
115. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 2007; 447: 823-828.
116. Li C, Li X, Gao S, Li C, Ma L. MicroRNA-133a inhibits proliferation of gastric cancer cells by downregulating ERBB2 expression. *Oncology research*. 2017; 25: 1169-1176.
117. Malpeli G, Barbi S, Zupo S, Tosadori G, Scardoni G, Bertolaso A, et al. Identification of microRNAs implicated in the late differentiation stages of normal B cells suggests a central role for miRNA targets ZEB1 and TP53. *Oncotarget*. 2017; 8: 11809-11826.
118. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and

- its alterations in atherosclerotic disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016; 97: 47-55.
119. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004; 10: 1957-1966.
 120. Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development*. 2008; 22: 3172-3183.
 121. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004; 432: 231-235.
 122. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003; 17: 3011-3016.
 123. Fukunaga R, Han BW, Hung J-H, Xu J, Weng Z, Zamore PD. Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell*. 2012; 151: 533-546.
 124. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008; 455: 64-71.
 125. Zhang Y, Cai S, Jia Y, Qi C, Sun J, Zhang H, et al. Decoding noncoding RNAs: role of microRNAs and long noncoding RNAs in ocular neovascularization. *Theranostics*. 2017; 7: 3155-3167.
 126. Zhu S, Si M-L, Wu H, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 14328-14336.
 127. Zhang Y, Zhang T, Ma X, Zou J. Subconjunctival injection of antagomir-21 alleviates corneal neovascularization in a mouse model of alkali-burned cornea. *Oncotarget*. 2017; 8: 11797-11808.

128. Urbich C, Kaluza D, Frömel T, Knau A, Bennewitz K, Boon RA, et al. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012; 119: 1607-1616.
129. Shen J, Yang X, Xie B, Chen Y, Swaim M, Hackett SF, et al. MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Molecular Therapy*. 2008; 16: 1208-1216.
130. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim T-Y, Huang LE, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel–Lindau protein. *Nature cell biology*. 2000; 2: 423-427.
131. Coleman ML, McDonough MA, Hewitson KS, Coles C, Mecinović J, Edelmann M, et al. Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 24027-24038.
132. Ratcliffe P, Koivunen P, Myllyharju J, Ragoussis J, Bovée JV, Batinic-Haberle I, et al. Update on hypoxia-inducible factors and hydroxylases in oxygen regulatory pathways: from physiology to therapeutics. *Hypoxia*. 2017; 5: 11-20.
133. Chen P, Yin H, Wang Y, Wang Y, Xie L. Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by shRNA targeting HIF-1 α in a mouse model of closed eye contact lens wear. *Molecular vision*. 2012; 18: 864-873.
134. Agrawal S, Chaqour B. MicroRNA signature and function in retinal neovascularization. *World journal of biological chemistry*. 2014; 5: 1-11.
135. Wang L, Lee AYW, Wigg JP, Peshavariya H, Liu P, Zhang H. miR-126 regulation of angiogenesis in age-related macular degeneration in CNV mouse model. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17: 895.
136. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen C-Z, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development*. 2008; 135: 3989-39893.

137. An J, Chen X, Chen W, Liang R, Reinach PS, Yan D, et al. MicroRNA Expression Profile and the Role of miR-204 in Corneal Wound Healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015; 56: 3673-3683.
138. Zong R, Zhou T, Lin Z, Bao X, Xiu Y, Chen Y, et al. Down-Regulation of MicroRNA-184 Is Associated With Corneal Neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016; 57: 1398-1407.
139. Sharif Z, Sharif W. Corneal neovascularization: Updates on pathophysiology, investigations & management. *Romanian Journal of Ophthalmology*. 2019; 63: 15-22.
140. Maddula S, Davis DK, Maddula S, Burrow MK, Ambati BK. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology*. 2011; 118: 591-599.
141. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Archives of ophthalmology*. 1983; 101: 640-643.
142. Schleimer RP, Freeland H, Peters S, Brown K, Derse C. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989; 250: 598-605.
143. Aydin E, Kivilcim M, Peyman GA, Esfahani MR, Kazi AA, Sanders DR. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetone with low-molecular-weight heparin and doxycycline. *Cornea*. 2008; 27: 446-453.
144. Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. *Experimental eye research*. 2004; 79: 275-285.
145. Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, Mori K, Ando A, Yamamoto S, et al. Topical nepafenac inhibits ocular neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003; 44: 409-415.

146. Spiteri N, Romano V, Brunner M, Steger B, Kaye SB. The management of corneal neovascularisation—update on new clinical data and recommendations of treatment. *Journal-The Management of Corneal Neovascularisation—Update on New Clinical Data and Recommendations of Treatment*. 2016; 10: 86-93.
147. Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Archives of Ophthalmology*. 1992; 110: 405-407.
148. Benelli U, Ross JR, Nardi M, Klintworth GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery. Inhibition by cyclosporin A. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1997; 38: 274-282.
149. Birnbaum F, Böhringer D, Sokolovska Y, Sundmacher R, Reinhard T. Immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil after penetrating high-risk keratoplasty: a retrospective study. *Transplantation*. 2005; 79: 964-968.
150. Shimazaki J, Den S, Omoto M, Satake Y, Shimmura S, Tsubota K. Prospective, randomized study of the efficacy of systemic cyclosporine in high-risk corneal transplantation. *American journal of ophthalmology*. 2011; 152: 33-39.
151. Bock F, Matthaei M, Reinhard T, Böhringer D, Christoph J, Ganslandt T, et al. High-dose subconjunctival cyclosporine a implants do not affect corneal neovascularization after high-risk keratoplasty. *Ophthalmology*. 2014; 121: 1677-1682.
152. Gottsch JD, Akpek EK. Topical cyclosporin stimulates neovascularization in resolving sterile rheumatoid central corneal ulcers. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2000; 98: 81-87.
153. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380: 435-439.

154. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380: 439-442.
155. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2004; 56: 549-580.
156. Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circulation research*. 2003; 93: 664-673.
157. Falavarjani KG, Nguyen Q. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye*. 2013; 27: 787-794.
158. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*. 2005; 438: 960-966.
159. Mukwaya A, Jensen L, Peebo B, Lagali N. MicroRNAs in the cornea: Role and implications for treatment of corneal neovascularization. *The ocular surface*. 2019; 17: 400-411.
160. Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, et al. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *Journal of molecular biology*. 1999; 293: 865-881.
161. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99: 11393-11398.
162. Park SC, Su D, Tello C. Anti-VEGF therapy for the treatment of glaucoma: a focus on ranibizumab and bevacizumab. *Expert opinion on biological therapy*. 2012; 12: 1641-1647.
163. Kohlhaas M. Corneal sensation after cataract and refractive surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 1998; 24: 1399-1409.

164. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis. *Ophthalmology*. 2010; 117: 1300-1305.
165. Yamagami S, Dana MR. The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunity and graft rejection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001; 42: 1293-1298.
166. Reed JW, Fromer C, Klintworth GK. Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. *Archives of Ophthalmology*. 1975; 93: 1017-1019.
167. Gomer CJ, Ferrario A, Hayashi N, Rucker N, Szirth BC, Murphree AL. Molecular, cellular, and tissue responses following photodynamic therapy. *Lasers in surgery and medicine*. 1988; 8: 450-463.
168. Corrent G, Roussel TJ, Tseng SC, Watson BD. Promotion of graft survival by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization. *Archives of ophthalmology*. 1989; 107: 1501-1506.
169. Gerten G. Bevacizumab (avastin) and argon laser to treat neovascularization in corneal transplant surgery. *Cornea*. 2008; 27: 1195-1199.
170. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000; 41: 2148-2153.
171. Junghans BM, Collin HB. The limbal vascular response to corneal injury. An autoradiographic study. *Cornea*. 1989; 8: 141-149.
172. Romano V, Steger B, Kaye SB. Fine-needle diathermy guided by angiography. *Cornea*. 2015; 34: 29-30.
173. Romano V, Steger B, Brunner M, Ahmad S, Willoughby CE, Kaye SB. Method for angiographically guided fine-needle diathermy in the treatment of corneal neovascularization. *Cornea*. 2016; 35: 1029-1032.

174. Rodrigues EB, Farah ME, Maia M, Penha FM, Regatieri C, Melo GB, et al. Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. Progress in retinal and eye research. 2009; 28: 117-144.
175. Gerriets V, Kasi A. Bevacizumab. StatPearls [Internet]. 2020.
176. Campochiaro PA, Group FAPIW. Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. Investigative ophthalmology & visual science. 2006; 47: 462-474.
177. Cai S, Bressler NM. Aflibercept, bevacizumab or ranibizumab for diabetic macular oedema: recent clinically relevant findings from DRCR. net Protocol T. Current opinion in ophthalmology. 2017; 28: 636-643.
178. Plyukhova AA, Budzinskaya MV, Starostin KM, Rejdak R, Bucolo C, Reibaldi M, et al. Comparative safety of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept for treatment of neovascular age-related macular degeneration (AMD): a systematic review and network meta-analysis of direct comparative studies. Journal of clinical medicine. 2020; 9: 1522.
179. Al-Debasi T, Al-Bekairy A, Al-Katheri A, Al Harbi S, Mansour M. Topical versus subconjunctival anti-vascular endothelial growth factor therapy (Bevacizumab, Ranibizumab and Aflibercept) for treatment of corneal neovascularization. Saudi Journal of Ophthalmology. 2017; 31: 99-105.
180. Ahmed A, Berati H, Nalan A, Aylin S. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. Clinical & experimental ophthalmology. 2009; 37: 730-736.
181. Yildirim H, Aydemir O, Balbaba M, Özercan İH, İlhan N. Comparison of the effect of topical bevacizumab and sorafenib in experimental corneal neovascularization. Cutaneous and ocular toxicology. 2020; 39: 223-228.
182. Baradaran-Rafii A, Ashnagar A, Heidari Keshel S, Jabbehdari S, Baradaran-Rafii G. Regression of corneal neovascularization: Adiponectin versus bevacizumab eye drops. European journal of ophthalmology. 2019; 31: 78-82

183. Sahan B, Ciftci F, Eyuboglu S, Yaba A, Yilmaz B, Yalvac BI. Comparison of the effects of dovitinib and bevacizumab on reducing neovascularization in an experimental rat corneal neovascularization model. *Cornea*. 2019; 38: 1161-1168.
184. Yoon HJ, Woo JM, Ji YS, Yoon KC. Comparison of the therapeutic efficacies of topical rivoceranib and topical bevacizumab in a murine model of corneal neovascularization. *Medicina*. 2019; 55: 729.
185. Gupta AA, Mammo DA, Page MA. Intrastromal bevacizumab in the management of corneal neovascularization: A retrospective review. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2020; 258: 167-173.
186. Raghav KPS, Blumenschein Jr GR. Motesanib and advanced NSCLC: experiences and expectations. *Expert opinion on investigational drugs*. 2011; 20: 859-869.
187. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase–role and significance in cancer. *International journal of medical sciences*. 2004; 1: 101-115.
188. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature reviews cancer*. 2009; 9: 28-39.
189. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European journal of cancer*. 2002; 38: 3-10.
190. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology*. 2007; 19: 117-123.
191. Neet K, Hunter T. Vertebrate non-receptor protein–tyrosine kinase families. *Genes to Cells*. 1996; 1: 147-169.
192. Calabresi P, Welch A. Chemotherapy of neoplastic diseases. *Annual review of medicine*. 1962; 13: 147-202.
193. Gurkan-Alp AS, Bozca F. Tirozin Kinaz Enzim İnhibitörü Yeni Bileşikler ve Yapı-Aktivite İlişkilerinin Değerlendirilmesi. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 44: 65-78.

194. Ho JN, Byun SS, Lee SE, Youn JI, Lee S. Multikinase inhibitor motesanib enhances the antitumor effect of cisplatin in cisplatin-resistant human bladder cancer cells via apoptosis and the PI3K/Akt pathway. *Oncology reports*. 2019; 41: 2482-2490.
195. Coxon A, Bready J, Kaufman S, Estrada J, Osgood T, Canon J, et al. Anti-tumor activity of motesanib in a medullary thyroid cancer model. *Journal of endocrinological investigation*. 2012; 35: 181-190.
196. Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Current Eye Research*. 1985; 4: 531-535.
197. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery*. 2007; 6: 273-286.
198. Sholley M, Ferguson G, Seibel H, Montour J, Wilson J. Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1984; 51: 624-634.
199. Liu C-H, Huang S, Britton WR, Chen J. MicroRNAs in vascular eye Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21: 649.
200. Prasadani I, Zhou Y, Du Z, Chen J, Crawford R, Xiao Y. Osteocyte-induced angiogenesis via VEGF–MAPK-dependent pathways in endothelial cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014; 386: 15-25.
201. Kamanu TK, Radovanovic A, Archer JA, Bajic VB. Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Scientific reports*. 2013; 3: 1-8.
202. Bai Y, Bai X, Wang Z, Zhang X, Ruan C, Miao J. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. *Experimental and molecular pathology*. 2011; 91: 471-477.
203. Yenerel MN, Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Kml Dışı Kullanımı. XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, Belek, Antalya Kasım 3-7, 2010

204. Jackson TL, Boyer D, Brown DM, Chaudhry N, Elman M, Liang C, et al. Oral tyrosine kinase inhibitor for neovascular age-related macular degeneration: a phase 1 dose-escalation study. *JAMA ophthalmology*. 2017; 135: 761-767.
205. Giddabasappa A, Lalwani K, Norberg R, Gukasyan HJ, Paterson D, Schachar RA, et al. Axitinib inhibits retinal and choroidal neovascularization in in vitro and in vivo models. *Experimental eye research*. 2016; 145: 373-379.
206. Ren C, Shi H, Jiang J, Liu Q, Du Y, He M, et al. The effect of CM082, an oral tyrosine kinase inhibitor, on experimental choroidal neovascularization in rats. *Journal of ophthalmology*. 2017; 2017: 6145651.
207. Keskin U, Totan Y, Karadağ R, Erdurmuş M, Aydın B. Inhibitory effects of SU5416, a selective vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, on experimental corneal neovascularization. *Ophthalmic research*. 2012; 47: 13-18.
208. Lledó Riquelme M, Campos-Mollo E, Fernández-Sánchez L. Topical axitinib is a potent inhibitor of corneal neovascularization. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2018; 46: 1063-1074.
209. Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *The American journal of pathology*. 2006; 168: 2036-2053.
210. Coxon A, Bush T, Saffran D, Kaufman S, Belmontes B, Rex K, et al. Broad antitumor activity in breast cancer xenografts by motesanib, a highly selective, oral inhibitor of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and Kit receptors. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15: 110-118.

211. Tebbutt N, Kotasek D, Burris HA, Schwartzberg LS, Hurwitz H, Stephenson J, et al. Motesanib with or without panitumumab plus FOLFIRI or FOLFOX for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2015; 75: 993-1004.



6. ÖZGEÇMİŞ

30.07.1992 tarihinde Fransa/Montfermeil’de doğdum. İlköğrenimimi Sare Özkaşıkçı İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimimi Konya Meram Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2010 yılında girdiğim Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden 2016 yılında mezun oldum. Hadim Toplum Sağlığı Merkezi’nde kısa bir süre hizmet verdikten sonra 2017 yılında Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

