



Kornea Neovaskülarizasyonunda Yeni Bir Potansiyel Biyobenzer Bevacizumabın Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Evaluation of a New Potential Bevacizumab Biosimilar in Corneal Neovascularization

Armağan Özgür¹, Nilüfer Yeşilirmak², Mehmet Arda İnan³, Emin Ümit Bağrıaçık⁴, Mehmet Cüneyt Özmen⁵

¹Ankara Bilkent Şehir Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye

²Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁵Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Tavşanlarda sütür ile indüklenmiş kornea neovaskülarizasyonunda (KNV), bevacizumab ile yeni bir potansiyel biyobenzer bevacizumabın (anti-human VEGF GU01) antianjiyogenik etkilerini karşılaştırmak.

Gereç ve Yöntem: On beş tavşanın sağ göz kornealarının stromalarına 7-0 siyah ipek sütür yerleştirilerek KNV indüklendi (süperior limbustan 1-1,5 mm mesafeden ve 3 mm genişlikte). Yedinci günde, sütürler kaldırıldıktan sonra, tavşanlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı: 1. gruptaki 5 göze 0,1 mL dengeli tuz solüsyonu (kontrol grubu), 2. gruptaki 5 göze 0,1 mL/2,5 mg bevacizumab (bevacizumab grubu), 3. gruptaki 5 göze 0,1 mL/2,5 mg anti-human VEGF GU01 (biyobenzer bevacizumab grubu) enjeksiyonları, subkonjonktival olarak uygulandı. KNV alanını analiz etmek için, sütür uygulaması sonrası 7. (enjeksiyon öncesi) ve 14. (enjeksiyondan 7 gün sonra) günlerde ameliyat mikroskobu yardımıyla standart görüntüler kaydedildi. Korneadaki neovasküler alan ImageJ programı yardımıyla, milimetre kare cinsinden hesaplandı. On dördüncü günde, bütün hayvanlar sakrifiye edildikten sonra, sağ göz kornea örnekleri hematoksisilen-eozin boyası ile histopatolojik olarak analiz edildi.

Bulgular: Enjeksiyonlar sonrası yedinci günde, bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında, KNV alanlarının azalma oranlarının,

kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu izlendi (kontrol: %24,6, bevacizumab: %82,2, biyobenzer: %83,4; $p<0,05$). Bevacizumab ve biyobenzer bevacizumab gruplarında, KNV azalma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0,05$).

Sonuç: Bu deneysel çalışmada, bevacizumabın potansiyel biyobenzeri olan anti-human VEGF GU01'in KNV tedavisinde subkonjonktival bevacizumab kadar etkili olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bevacizumab, biyobenzer bevacizumab, anti-human VEGF GU01, kornea neovaskülarizasyonu

Abstract

Objectives: To compare the antiangiogenic effects of bevacizumab and a new potential bevacizumab biosimilar (anti-human VEGF GU01) on suture-induced corneal neovascularization (CNV) in rabbits.

Materials and Methods: CNV was induced in the right eyes of 15 rabbits by placing 7-0 black silk suture in the corneal stroma (3 mm wide and 1-1.5 mm from the superior limbus). All sutures were removed on day 7, and the rabbits were randomly divided into three groups. An injection of 0.1 mL balanced salt solution (control group), 2.5 mg/0.1 mL bevacizumab (bevacizumab group), or 2.5 mg/0.1 mL of anti-human VEGF GU01 (potential bevacizumab biosimilar group) was administered subconjunctivally. After suturing, standard corneal images were obtained with a surgical microscope on day 7 (pre-injection) and day 14 (7 days post-injection) to analyze the CNV area, which was calculated in square millimeters using the ImageJ program. On day 14, all animals were sacrificed and corneal specimens were analyzed histopathologically by hematoxylin-eosin staining.

Results: On day 14, the percent reduction in CNV area was significantly greater in the bevacizumab and bevacizumab biosimilar groups compared to the control group (control: 24.6%, bevacizumab: 82.2%, biosimilar: 83.4%; $p<0.05$). There was no statistically significant difference between the bevacizumab and biosimilar groups with respect to the CNV regression rates ($p>0.05$).

Conclusion: This experimental study showed that the potential bevacizumab biosimilar anti-human VEGF GU01 was as effective as subconjunctival bevacizumab in the treatment of CNV.

Keywords: Bevacizumab, bevacizumab biosimilar, anti-human VEGF GU01, corneal neovascularization

Cite this article as: Özgür A, Yeşilirmak N, İnan MA, Bağrıaçık EÜ, Özmen MC. Evaluation of a New Potential Bevacizumab Biosimilar in Corneal Neovascularization.

Türk J Ophthalmol. 2025;55:299-304

Bu çalışma, 30 Eylül-2 Ekim 2022 tarihleri arasında çevrim içi olarak düzenlenen 2. Uluslararası Safiye Ali Sağlık Bilimleri'nde Multidisipliner Çalışmalar Kongresi'nde sunulmuş olup, özeti kongre özet kitabında yayımlanmıştır.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Armağan Özgür, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye
E-posta: drarmaganozgur@gmail.com ORCID-ID: orcid.org/0000-0001-9111-8060
Geliş Tarihi/Received: 09.02.2025

Revizyon Talebi/Revision Requested: 05.05.2025

Son Revizyon Alınma/Last Revision Received: 05.06.2025

Kabul Tarihi/Accepted: 28.09.2025

Yayın Tarihi/Publication Date: 25.12.2025

DOI: 10.4274/tjo.galenos.2025.34783

Telif Hakkı © 2025 Yazar(lar). Türk Oftalmoloji Derneği adına Galenos Yayınevi tarafından yayımlanmıştır.

Bu, Creative Commons Atıf-GayriTicari-TürevleriYaratılamaz 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı kapsamında açık erişimli bir makaledir.



Giriş

Korneanın saydamlığını koruması net görme için en önemli etmenlerden biridir.¹ Stres ve oksijen eksikliği gibi bazı nedenlerle (enfeksiyon, enflamasyon, iskemi, dejenerasyon, travma veya limbal kök hücre eksikliği) patolojik kan damarları kornea boyunca büyüebilmekte ve korneanın damarlanarak saydamlığını yitirmesine neden olabilmektedir. Bu duruma korneal neovaskülarizasyon (KNV) adı verilmektedir.²

KNV tedavisinde farklı derecelerde başarı sağlayabilen cerrahi ve medikal yöntemler kullanılmaktadır.^{3,4} Bu tedavilerin amacı hem yeni damar oluşumunu önlemek (altta yatan etiyoloji ve patofizyolojiye odaklanarak) hem de oluşmuş patolojik damarların regresyonunu sağlamaktır.⁵ Damar gelişiminde önemli rolü olan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) KNV oluşumunda önemli bir rolü olduğu ve VEGF inhibisyonunun bu durumu azaltabileceği gösterilmiştir.⁶

Günümüzde KNV tedavisinde denenmiş veya kullanılmakta olan ranibizumab (Lucentis; Genentech, ABD), bevacizumab (Avastin; Genentech, ABD) ve aflibercept (EYLEA; Bayer, Almanya) gibi iyi bilinen bazı anti-VEGF ajanlar bulunmaktadır.⁷ Bu ajanlardan bevacizumabın topikal veya subkonjonktival uygulaması endikasyon dışı olmasına rağmen KNV'yi azaltmada en sık kullanılan ajanlardan biridir.⁸ Diğer anti-VEGF'ler KNV tedavisinde etkili olsalar da yüksek maliyetlerinden dolayı sık tercih edilmemektedir. Anti-VEGF ajanlara erişimi kolaylaştırmak için biyobenzer moleküller geliştirilmeye başlanmıştır.^{9,10} Üniversitemizin immünoloji laboratuvarında da bu amaçla bevacizumabın potansiyel bir biyobenzeri olan yeni bir monoklonal VEGF antikor (anti-human VEGF GU01) geliştirme çalışması yürütülmektedir (bu ajan Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından proje no: 0192-SanTez-2013-1 projesi kapsamında desteklenmiştir).¹¹ Anti-human VEGF GU01, hibridoma yöntemi ile, HiTrap Protein G HP klonu kullanılarak Fast Protein Liquid Chromatography cihazında saflaştırılmış, fare kökenli monoklonal immüno globulin G antikorudur.¹¹

Çalışmamızın amacı, anti-human VEGF GU01 ajanının KNV'yi azaltmada etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızın onayı Gazi Üniversitesi Hayvan Bakımı Etik Komitesi'nden alındı (proje no: G.Ü.ET-15.025, tarih: 17/4/2015). Çalışmamız için ağırlıkları 2,5 ila 3 kg arasında olan 15 sağlıklı ve genç Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı.

İşlemler öncesinde gözlere topikal proparakain HCl %0,5 (Alcaïne; Alcon, ABD) damlatıldı. On beş tavşanın sağ gözüne genel anestezi altında (intramusküler ketamin [50 mg/kg] ve ksilazin [5 mg/kg]) 7,0 siyah ipek sütürler cerrahi mikroskop altında atıldı. Sütürler, üst limbustan santrale doğru, orta stromal düzeyde, 1-1,5 mm uzunluğunda ve 3 mm genişliğinde olacak şekilde aynı araştırmacı tarafından (M.C.Ö.) yerleştirildi. Enfeksiyon profilaksisi için gözle bir hafta boyunca günde iki kez topikal moksifloksasin (Vigamox, Alcon, Fort Worth, Teksas, ABD) göz damlası uygulandı. Yedinci günün ardından,

KNV'nin tüm gözlerde yeterli oranda olduğu izlendi ve genel anestezi altında sütürler çıkarıldı.

Sütürler çıkarıldıktan sonra, 15 tavşan rastgele olarak üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 0,1 mL dengeli tuz solüsyonu; bevacizumab grubuna 0,1 mL/2,5 mg bevacizumab (Avastin; Genentech, ABD) (4 mL/100 mg); biyobenzer grubuna 0,1 mL/2,5 mg anti-human VEGF GU01 (Gazi Üniversitesi İmmünoloji Laboratuvarı; Ankara, Türkiye) (0,4 mL/10 mg), subkonjonktival olarak uygulandı (Tablo 1). Enjeksiyonlar üst kadrandan, limbustan 1 mm uzaklıktan 30 gauge iğne ile uygulandı (M.C.Ö.).

Görüntülemeler için bir ameliyat mikroskobu (Möller-Wedel FS 3000, Haag Streit, Almanya) ve ona monte edilmiş bir kayıt sistemi (Avermedia software, Tayvan) kullanıldı. 16x'lik büyütmede görüntülen KNV alanı yedinci (enjeksiyon öncesi) ve on dördüncü günlerde (enjeksiyondan 7 gün sonra) ImageJ programı (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak milimetre kare cinsinden hesaplandı. Alan hesaplamalarından önce standardizasyon için, ameliyat mikroskobu ile 16x'lik büyütmede çekilen bir cetvel fotoğrafı kullanıldı. ImageJ programına yüklenen standart cetvel görüntüsü üzerine çizilen 1 mm uzunluğundaki bir çizgi, programın numerik analizleri için 1 mm olarak uygulamaya kaydedildi. Fotoğraflardaki neovasküler bölge uygulama imleci yardımıyla çevrelendi. Numerik değerlendirmeler için tedavi öncesi hesaplanan KNV alanları %100 olarak kabul edildi. Tedavilerden 1 hafta sonra KNV alanlarının yüzde olarak ne kadar azaldığı hesaplandı. Bu ölçümler tedavi grubuna kör araştırmacı (A.Ö.) tarafından gerçekleştirildi. Sonrasında tüm hayvanlar kurban edilerek sağ gözle enükleasyon uygulandı. Limbus bölgesi sağlam bırakılarak KNV bölgesinin bulunduğu kornea bölgeleri eksize edildi. Alınan dokuların yarısı histopatolojik değerlendirme için hematoksilen-eozinle boyanmak üzere 24 saat formaldehitte tutularak parafine gömüldü. Dokuların diğer yarısı endotel hücreleri belirteci olan CD31 boyası ile immünohistokimyasal inceleme için immünoloji laboratuvarına yollandı. 4 mikronluk kesitlerle hazırlanan örnekler mikroskopta 200'lük büyütmede fotoğraflanarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada örneklem büyüklüğü belirlenirken, alandaki benzer deneysel modellerde kullanılan hayvan sayıları referans alınmış; çalışma öncesinde güç analizi yapılmamıştır. İstatistiksel analizler için SPSS programı (versiyon 22, IBM, ABD) kullanıldı. Verilerimizin dağılımı ve örneklem sayısı parametrik analizler için yeterli olmadığından, tedavi öncesi ve sonrası alan karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis testi, tedavi sonrası KNV alanı regresyon oranlarını karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 1. Çalışma grupları ve uygulanan tedaviler

Kontrol grubu (n=5)	0,1 mL dengeli tuz solüsyonu
Bevacizumab grubu (n=5)	0,1 mL/2,5 mg bevacizumab
Biyobenzer grup (n=5)	0,1 mL/2,5 mg anti-human VEGF GU01
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü	

Bulgular

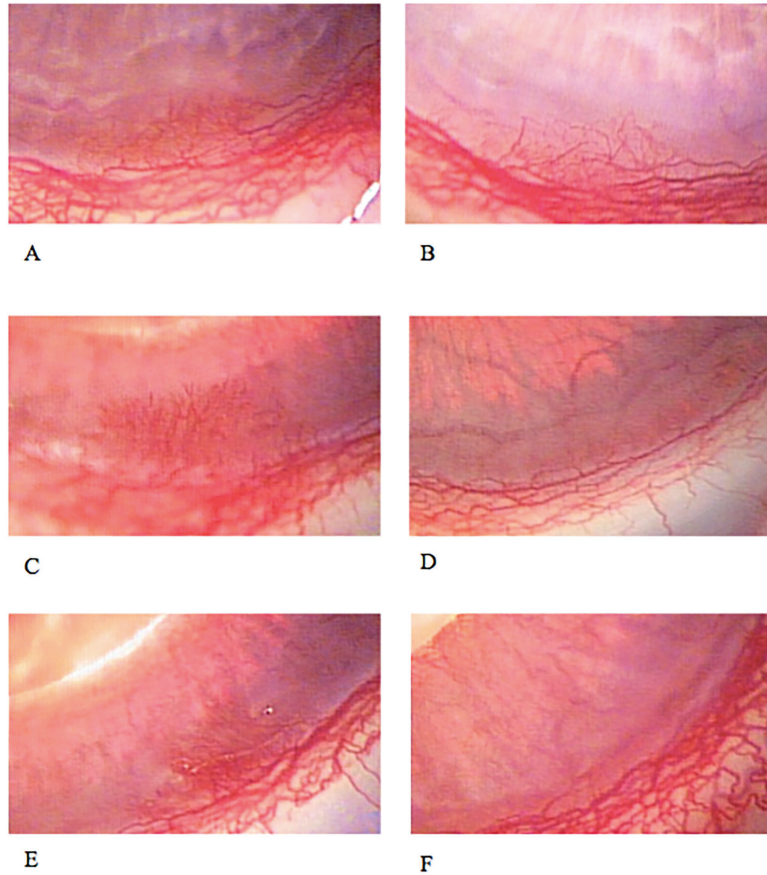
Sütürasyondan sonraki 7. günde, tüm gözlerde yeterli oranda KNV'nin oluştuğu izlendi. Kontrol, bevacizumab ve biyobenzer gruplarında hesaplanan ortalama KNV alanları sırasıyla $2,59 \pm 0,34 \text{ mm}^2$, $2,37 \pm 0,40 \text{ mm}^2$ ve $2,36 \pm 0,44 \text{ mm}^2$ idi. Gelişen KNV alanları arasında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$) (Şekil 1 ve 2). Sütürasyonlara bağlı keratit veya başka bir komplikasyon izlenmedi.

Ortalama KNV regresyon oranları bevacizumab ve biyobenzer gruplarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksekti (kontrol grubu: $\%24,6 \pm 3,9$ bevacizumab grubu: $\%82,2 \pm 3,0$ biyobenzer grubu: $\%83,4 \pm 3,8$; $p < 0,05$). Bevacizumab ve biyobenzer grupları arasında KNV regresyon oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 1 ve 3). Hematoksilen-eozin boyamada, kontrol grubunda çok sayıda damar izlenirken bevacizumab ve biyobenzer gruplarında neredeyse hiç damar görülmedi (Şekil 4). CD31 ile boyamanın yetersiz olması nedeniyle immünohistokimyasal değerlendirme yapılamadı.

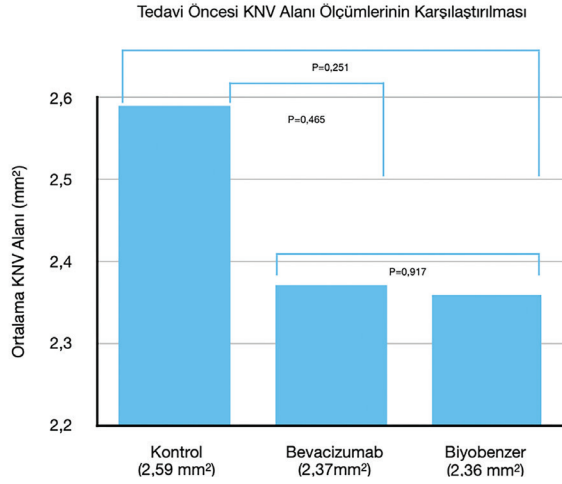
Tartışma

Biyobenzer terimi, biyolojik ajanlara çok benzeyen ancak etkinlik, güvenlik ve saflık açısından aynı olmayan maddeler için kullanılır. Biyobenzer ilaçların yaygınlaşması, ilaç maliyetlerini düşürmekte ve hastaların ilaçlara ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Biyobenzer ilaçların üretimi karmaşık bir süreçtir. Üretim sürecindeki küçük yapısal farklar ilacın etkinliğinde ve güvenliğinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir.⁹ Çalışmamızda, immünoloji laboratuvarımızda üretilen bevacizumabın potansiyel biyobenzeri anti-human VEGF GU01'in deneysel KNV modeli üzerindeki etkisini araştırdık.¹¹

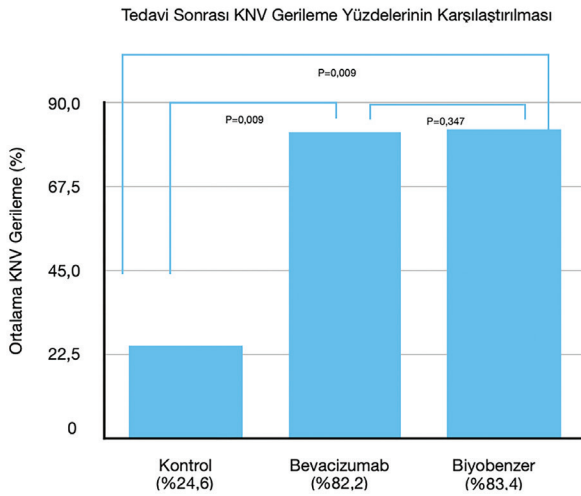
Bevacizumabın oküler kullanımlar için üretilmiş formları bulunmamaktadır. İlacın oküler kullanım için hazırlama süreçleri ülkeden ülkeye farklılıklar göstermektedir. İlaç, ticari olarak 4 mL veya 16 mL'lik tek şişelerde bulunmaktadır. Oküler kullanım için gereken küçük dozlar enjektörlerle hazırlanmaktadır. Bu hazırlama aşamalarının kişiye bağımlı olması ilacı kontaminasyon açısından riskli kılmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde bevacizumaba bağlı ağır endoftalmi ve görme kaybı olguları bildirilmiştir.^{12,13,14}



Şekil 1. Tedavi öncesi (7. günde, sütürlerin alınmasından hemen sonra) ve tedavi sonrası (14. günde) KNV alanlarının görüntümü. A) Tedavi öncesi kontrol grubu. B) Tedavi sonrası kontrol grubu. C) Tedavi öncesi bevacizumab grubu. D) Tedavi sonrası bevacizumab grubu. E) Tedavi öncesi biyobenzer grubu. F) Tedavi sonrası biyobenzer grubu
KNV: Kornea neovaskülarizasyonu

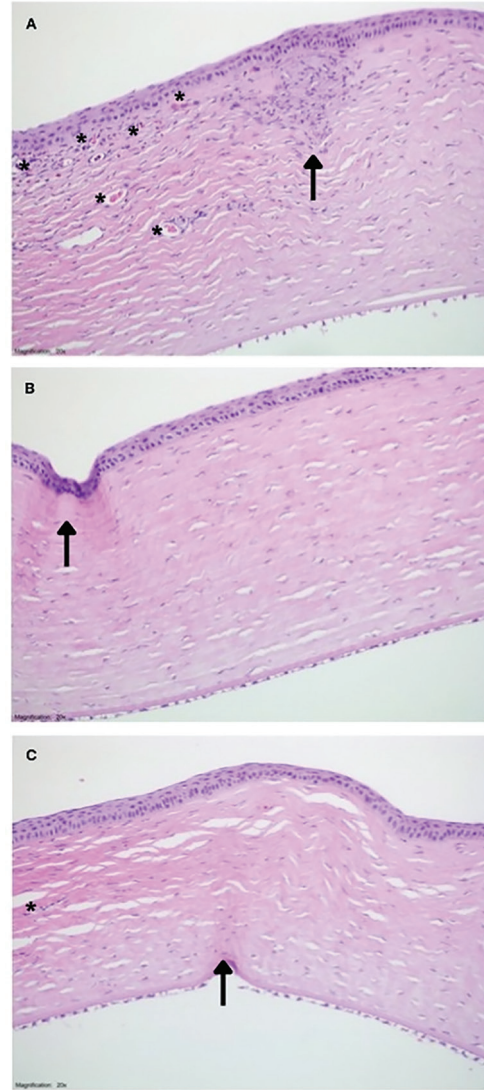


Şekil 2. Sütürasyon sonrası 7. günde kornea neovaskülarizasyonu (KNV) alanları, p değerleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi



Şekil 3. Tedavilerden 7 gün sonra kornea neovaskülarizasyonu (KNV) alanlarındaki regresyon yüzdeleri, p değerleri Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı. KNV bevacizumab ve biyobenzer gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde geriledi. Bevacizumab ve biyobenzer grupları arasında KNV regresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi

1998'de Yatoh ve ark.¹⁵ VEGF inhibisyonunun farelerde greft sağkalımının uzamasını sağladığını göstermesiyle beraber bevacizumabın KNV üzerine olan etkisiyle ilgili birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmaya başlanmıştır. Deneysel çalışmalar genellikle sütürle oluşturulan KNV modelleriyle yapılmıştır. Bu modellerde oluşturulan KNV, hem patofizyolojik açıdan hem de görünüm olarak insanlarda gelişen KNV ile daha uyumludur.^{16,17} Biz de bu bilgiler ışığında çalışmamızda sütür ile oluşturulmuş KNV modelini kullandık.



Şekil 4. Histopatolojik görüntüler: A: Kontrol grubu; stromada sütürasyon bölgesinde enflamasyon görünümü (ok) ve eritrosit içeren damarlar (yıldızlar). B: Bevacizumab grubu; Sütürasyon bölgesinde enflamasyon görünümü (ok), stromada eritrosit içeren damar yok. C: Biyobenzer grubu; sütürasyon bölgesinde enflamasyon görünümü (ok) ve stromada az miktarda eritrosit içeren damarlar (yıldız)

KNV'nin ne kadar süredir var olduğu tedavinin seçiminde önemli bir faktördür. Aktif damar oluşumu sırasında yani KNV'nin yeni geliştiği aşamalarda tıbbi tedavi daha etkili olabiliyorken; olgun damarların geliştiği yani KNV'nin kronikleştiği aşamalarda ince iğne diatermi gibi cerrahi müdahalelerin daha etkili olduğu gösterilmiştir.^{18,19} Bu farklılığın oluşmasında KNV geliştikten hemen sonraki iki hafta içinde damarların farmakolojik ajanlara duyarlılığını azaltan perisitler tarafından kaplanması önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir.⁵ Lin ve ark.¹⁸, yaptığı bir çalışmada KNV tedavisinde anti-VEGF tedavinin zamanlamasını incelemiştir.

Çalışmada erken dönemde başlanan anti-VEGF tedavinin fayda sağladığı izlenirken, geç dönemde başlanan anti-VEGF tedavinin ise KNV'yi geriletilici etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda erken dönemde tedavilerimizi uyguladık. Sonuçlara baktığımızda hem bevacizumab hem de anti-human VEGF GU01 enjekte edilen gruplarda, 14. günde KNV alanlarının %80'den fazlasının gerilemiş olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda sütürlü indüklenen KNV modeli tercih edilmiştir çünkü bu model hem oluşturulması kolay hem de insanlardaki KNV patofizyolojisi ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Ancak klinikte özellikle kimyasal yanık ve limbal kök hücre yetmezliği gibi durumlar daha agresif ve kalıcı neovaskülarizasyonlar izlenebilmektedir. Bu nedenle anti-human VEGF GU01'in bu tür zorlu modellerde de etkinliğinin değerlendirilmesi, ilacın gerçek klinik potansiyelini ortaya koyması açısından önemli olabilir.¹⁷

KNV tedavisinde bevacizumabın subkonjonktival uygulamasının dozu ve sıklığı konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. Yirmi dört hastalık bir çalışmada, 2,5 ve 5 mg subkonjonktival bevacizumabın tek doz uygulamasının KNV gerilemesi üzerinde benzer şekilde etkili olduğu bulunmuştur.²⁰ Yüz sıçanı içeren başka bir deneysel çalışmada, 1 mg, 5 mg ve 25 mg subkonjonktival bevacizumabın KNV tedavisindeki etkisinin benzer olduğu bulunmuştur.²¹ Biz de çalışmamızda ilaç dozunu 2,5 mg olarak uyguladık. Subkonjonktival bevacizumabın yarı ömrünün tavşanlarda 1,8-2,8 hafta arasında gösterilmiş olması sebebiyle çalışmamızda enjeksiyonları tekrarlamadık.²²

Kornea naklinin tüm organ nakilleri arasında %90'lık bir başarı oranıyla en başarılı yöntem olduğu gösterilmiştir.²³ Ancak cerrahi enflame veya vaskülarize bir alıcı yatakta gerçekleştirildiğinde bu başarı oranı %20-40'lara düşebilmektedir.²⁴ Bevacizumab KNV tedavisinde en sık kullanılan anti-VEGF ajanlarından biridir. Dekaris ve ark.²⁵, ameliyat için yüksek riskli kabul edilen 50 gözde penetran keratoplasti sonrası greft sağkalımına faydasını değerlendirmek için ameliyat sonrası 0,5 mL/25 mg subkonjonktival ve 25 mg/mL topikal bevacizumab kullanmışlardır. Çalışmada üç yıllık takip sonrası hastaların %70'inde greft saydamlığının korunduğu tespit edilmiştir.

KNV'de yalnızca pro-anjiyojenik büyüme faktörlerinin artışı değil, aynı zamanda ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi de önemli rol oynamaktadır. Bu süreçte matriks metalloproteinazlar (MMP), özellikle MMP-2 ve MMP-9, bazal membran ve stromal yapıyı yıkarak yeni damarların invazyonunu kolaylaştırmaktadır. Enflamatuvar hücreler ve aktive olmuş epitel/stromal hücreler tarafından salgılanan bu enzimler, VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin etkisini potansiyel olarak artırmakta ve damarlanmanın ilerlemesini desteklemektedir. Çalışmamızda MMP düzeyleri doğrudan değerlendirilmemiş olmakla birlikte, biyobenzer VEGF inhibitörünün neovaskülarizasyonu baskılaması, dolaylı olarak MMP aktivitesinin de azalmış olabileceğini düşündürmektedir.^{26,27}

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın önemli sınırlılıklarından biri, deney gruplarında yer alan hayvan sayısının az olmasıdır. Grup başına beşer hayvan ile çalışılmış olması, elde edilen sonuçların istatistiksel gücünü ve genellenebilirliğini kısıtlayabilir. Çalışma sonrası yaptığımız güç analizinde yeterli güç elde edilmiş olsa da (>%95), daha büyük örneklemli ileri faz deneysel ve klinik çalışmalar anti human VEGF GU01'in etkinliğini daha kuvvetli değerlendirebilir. Çalışmamızın diğer kısıtlılıklarından biri, korneal damarlanmanın immünohistokimyasal düzeyde değerlendirilmesi amacıyla kullanılan CD31 antikoruna ile yapılan boyamanın başarısızlıkla sonuçlanmasıdır. Bu durumun olası nedenlerinden biri, CD31 antikorunun taşınması veya saklanması sırasında soğuk zincirin bozulmuş olmasıdır. CD31 gibi sıcaklığa duyarlı antikorların biyolojik aktivitesinin korunabilmesi için 2-8 °C aralığında sabit sıcaklıkta saklanması gerekmektedir. Soğuk zincirdeki herhangi bir aksama, antikorun hedef antijene bağlanma kapasitesini azaltarak boyama sonucunu olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle çalışmamızda immünohistokimyasal analiz yapılamamış, sadece klinik ve histopatolojik değerlendirme ile sonuçlara ulaşılmıştır. Gelecek çalışmalarda bu teknik sorun dikkate alınarak, CD31'in yanı sıra CD34 veya von Willebrand faktörü gibi alternatif damar endotel belirteçlerinin kullanılması gündeme gelebilir. Çalışmayı güçlendirecek proanjiyojenik ve anjiyojenik molekülleri düzeylerine bakılmaması çalışmanın diğer kısıtlılıklarıdır.

Sonuç

Sonuç olarak, bu bilgiler ışığında bevacizumabın kornea nakli ameliyatlarında kullanımının yaygınlaşmasının cerrahi başarıyı artıracağını düşünmekteyiz. Faz çalışmaları tamamlandığında, bevacizumabın potansiyel bir biyobenzeri olan anti-human VEGF GU01 de yüksek riskli penetran keratoplastilerde cerrahi başarı oranlarını artırma potansiyeli bulunmaktadır. Bu deneysel çalışmada, literatürde ilk olarak, anti-human VEGF GU01'in subkonjonktival uygulaması yapılmıştır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışmamızın onayı Gazi Üniversitesi Hayvan Bakımı Etik Komitesi'nden alındı (proje no: G.Ü.ET-15.025, tarih: 17/4/2015).

Hasta Onayı: Uygulanamaz (hayvan çalışması).

Teşekkür

Dr. Ahmet Yücel Üçgül'e istatistiksel analizlerdeki yardımları için teşekkür ederim.

Beyan

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: A.Ö., E.Ü.B., M.C.Ö., Konsept: A.Ö., E.Ü.B., M.C.Ö., Dizayn: A.Ö., E.Ü.B., M.C.Ö., Veri Toplama veya İşleme: A.Ö., M.A.İ., M.C.Ö., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., M.A.İ., M.C.Ö., Literatür Arama: A.Ö., N.Y., M.C.Ö., Yazan: A.Ö., N.Y., M.C.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Surv Ophthalmol*. 2012;57:415-429.
2. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001;12:242-249.
3. Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1625-1632.
4. Kruse FE, Jousens AM, Rohrschneider K, Becker MD, Völcker HE. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1998;36:461-466.
5. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Kuchle M, Schlötzer-Schrehardt U. Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:101-106.
6. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo*. 1994;8:961-965.
7. Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, Cheung AY, Kurji K, Jabbehdari S, Maiz A, Jalali S, Djalilian AR, Holland EJ. Current and emerging therapies for corneal neovascularization. *Ocul Surf*. 2018;16:398-414.
8. Cheng SF, Dastjerdi MH, Ferrari G, Okanobo A, Bower KS, Ryan DS, Amparo F, Stevenson W, Hamrah P, Nallasamy N, Dana R. Short-term topical bevacizumab in the treatment of stable corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol*. 2012;154:940-948.
9. Zalberg J. Biosimilars are coming: ready or not. *Intern Med J*. 2018;48:1027-1034.
10. Casak SJ, Lemery SJ, Chung J, Fuchs C, Schrieber SJ, Chow EY, Yuan W, Rodriguez L, Gwise T, Rowzee A, Lim S, Keegan P, McKee AE, Pazdur R. FDA's approval of the first biosimilar to bevacizumab. *Clin Cancer Res*. 2018;24:4365-4370.
11. Bagriacik UE, Yaman M, Oruklu N. Development and characterization of monoclonal antibodies specific for human vascular endothelial growth factor [conference abstract]. *J Biotechnol*. 2017;256 Supplement:S31-S32.
12. Falavarjani KG, Modarres M, Hashemi M, Parvaresh MM, Naseripour M, Zare-Moghaddam A, Nekoozadeh S. Incidence of acute endophthalmitis after intravitreal bevacizumab injection in a single clinical center. *Retina*. 2013;33:971-974.
13. Goldberg RA, Flynn HW Jr, Isom RF, Miller D, Gonzalez S. An outbreak of *Streptococcus endophthalmitis* after intravitreal injection of bevacizumab. *Am J Ophthalmol*. 2012;153:204-208.
14. Gonzalez S, Rosenfeld PJ, Stewart MW, Brown J, Murphy SP. Avastin doesn't blind people, people blind people. *Am J Ophthalmol*. 2012;153:196-203.
15. Yatoh S, Kawakami Y, Imai M, Kozawa T, Segawa T, Suzuki H, Yamashita K, Okuda Y. Effect of a topically applied neutralizing antibody against vascular endothelial growth factor on corneal allograft rejection of rat. *Transplantation*. 1998;66:1519-1524.
16. Williams KA, Grutzmacher RD, Roussel TJ, Coster DJ. A comparison of the effects of topical cyclosporine and topical steroid on rabbit corneal allograft rejection. *Transplantation*. 1985;39:242-244.
17. Montezuma SR, Vavvas D, Miller JW. Review of the ocular angiogenesis animal models. *Semin Ophthalmol*. 2009;24:52-61.
18. Lin CT, Hu FR, Kuo KT, Chen YM, Chu HS, Lin YH, Chen WL. The different effects of early and late bevacizumab (Avastin) injection on inhibiting corneal neovascularization and conjunctivalization in rabbit limbal insufficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:6277-6285.
19. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2148-2153.
20. Acar BT, Halili E, Acar S. The effect of different doses of subconjunctival bevacizumab injection on corneal neovascularization. *Int Ophthalmol*. 2013;33:507-513.
21. Hashemian MN, Moghimi S, Kiumehr S, Riaz M, Amoli FA. Prevention and treatment of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with corticosteroid in experimental rats. *Ophthalmic Res*. 2009;42:90-95.
22. Nomoto H, Shiraga E, Kuno N, Kimura E, Fujii S, Shinomiya K, Nugent AK, Hirooka K, Baba T. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:4807-4813.
23. Rocha G, Deschênes J, Rowsey JJ. The immunology of corneal graft rejection. *Crit Rev Immunol*. 1998;18:305-325.
24. The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol*. 1992;110:1392-1403.
25. Dekaris I, Gabrić N, Drača N, Pauk-Gulić M, Miličić N. Three-year corneal graft survival rate in high-risk cases treated with subconjunctival and topical bevacizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253:287-294.
26. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*. 2005;169:681-691.
27. Dean RA, Butler GS, Hamma-Kourbali Y, Delbé J, Brigstock DR, Courty J, Overall CM. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol Cell Biol*. 2007;27:8454-8465.