

Deneysel Kornea Neovaskularizasyonu Modelinde Subkonjonktival Bevacizumab ve Pegaptanib Sodyum Enjeksiyonunun Etkinliğinin Karşılaştırılması

Volkan Hürmeriç (*), Fazıl Cüneyt Erdurman (*), Tarkan Mumcuoğlu (*), Bülent Kurt (**), Ozan Dağlı (*), Umut Karaca (*), Ali Hakan Durukan (*)

ÖZET

Amaç: Kobaylarda oluşturulan deneysel kornea neovaskularizasyonu modelinde subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanib sodyum enjeksiyonlarının etkinliğinin incelenmesidir.

Yöntem: 21 kobayın sağ korneaları kimyasal olarak koterize edildi. Olgular 3 gruba ayrıldı. Birinci gruba (Kontrol grubu) subkonjonktival dengeli tuz solüsyonu, ikinci gruba subkonjonktival 1 mg bevacizumab, üçüncü gruba subkonjonktival 0.15 mg pegaptanib sodyum enjeksiyonu koterizasyonla aynı zamanda yapıldı. 10. günde kornealarda oluşan yanık ve neovaskularizasyon seviyesi değerlendirildikten sonra hayvanlar öldürüldü ve gözler histolojik incelemeye alındı.

Sonuçlar: Yanık ve neovaskularizasyon skorları açısından üç grup arasında fark yoktu (sırasıyla $p=0.173$ ve $p=0.082$). Kornea neovaskularizasyonu kapladığı yüzey alanı kontrol grubunda 73.83 ± 6.67 , bevacizumab grubunda 59.84 ± 6.85 , pegaptanib grubunda 82.96 ± 5.59 olarak tespit edildi ($p=0.001$). Histolojik değerlendirmede kornea vaskularizasyonu derecesi kontrol grubunda 13.05 ± 3.21 , bevacizumab grubunda 8.86 ± 2.89 , pegaptanib grubunda 12.67 ± 2.04 olarak tespit edildi ($p=0.052$).

Tartışma: Oluşturduğumuz deneysel modelde uyguladığımız dozlarda bevacizumab pegaptanib'e göre kornea neovaskularizasyonlarını azaltmada daha etkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bevacizumab, Pegaptanib Sodyum, Kornea Neovaskularizasyonu, Kobay

SUMMARY

Comparison of the Effect of Subconjunctival Bevacizumab and Pegaptanib Sodium in an Experimental Corneal Neovascularisation Model

Purpose: To compare the effect of subconjunctival injection of bevacizumab and pegaptanib sodium on experimental corneal neovascularization in guinea pigs.

(*) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

(**) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Yazışma adresi : Yard. Doç Dr. Volkan Hürmeriç, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Göz Hastalıkları AD Etlik/Ankara E-posta: vhurmeric@gata.edu.tr

Mecmuaya Geliş Tarihi: 12.04.2009
Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 22.06.2009
Kabul Tarihi: 05.07.2009

Methods: Right eyes of twenty one guinea pigs were chemically cauterized. The subjects were divided into three groups. The first group (control group) received subconjunctival injection of balanced salt solution, the second group received subconjunctival injection of 1 mg bevacizumab, the third group received subconjunctival injection of 0.15 mg pegaptanib sodium simultaneously with cauterization. After determining the burn and neovascularization scores for all groups the animals were killed on the 10th day and histologic evaluation were performed

Results: There were no statistically significant differences in burn and neovascularisation scores between three groups ($p= 0.173$ and $p= 0.082$ respectively). The area of neovascularization at the cornea surface was $73.83\pm 6.67\%$ in the control group, $59.84\pm 6.85\%$ in the bevacizumab group and $82.96 \pm 5.59\%$ in the pegaptanib group ($p= 0.001$). Histological examination show that the average number of corneal vessels were 13.05 ± 3.21 in the control group, 8.86 ± 2.89 in the bevacizumab group and 12.67 ± 2.04 in the pegaptanib group ($p= 0.052$).

Conclusion: The antineovascular effect of bevacizumab is found to be higher than pegaptanib in the doses that we used in our experimental corneal neovascularisation model.

Key Words: Bevacizumab, Pegaptanib Sodium, Corneal Neovascularisation, Guinea Pigs

GİRİŞ

Sağlıklı insan korneasında herhangi bir damar yapısı bulunmamaktadır. Ancak çeşitli patolojiler sonunda korneada derin ya da yüzeysel vaskülarizasyonlar oluşabilmektedir. Bu damarlar görme seviyesini olumsuz yönde etkilemekte, enflamasyon oluşturmakta ve kornea nakli gibi ameliyatların prognozu üzerinde olumsuz etki yapmaktadır (1-5). İnsanlarda korneadaki neovaskülarizasyonları (KN) azaltmak amacıyla diyatermi ve argon lazer fotokoagülasyon kullanılsa da bu tekniklerin klinik etkinlikleri sınırlıdır (4,5). Bununla birlikte deneysel amaçla oluşturulan vaskülarizasyonlar üzerinde çeşitli moleküllerin etkisi olduğu bilinmektedir (1,6). Ancak bu ilaçların klinik kullanımları istenen düzeyde etki göstermemektedir. Bu nedenle insanlarda çeşitli sebeplerle oluşmuş KN üzerinde etkili medikal bir tedavinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEBF) inhibitörleri retina ve koroideadaki neovaskülarizasyonlarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (7,8). Bu ilaçlardan bevacizumab, VEBF'nin tüm izoformlarını, pegaptanib sodyum ise sadece VEBF165'i inhibe etmektedir. Çeşitli vaka serilerinde KN üzerinde bevacizumabın etkili olabileceği bildirilmiştir (9,10). Ancak literatürde pegaptanib sodyumun KN üzerine olan etkisini inceleyen sınırlı sayıda kaynak bulunmaktadır (11). Çalışmamızda kobaylarda oluşturulan deneysel KN modelinde subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanib sodyum enjeksiyonlarının etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız hastanemizde bulunan Araştırma ve Eğitim Merkezi Akademi Bilimsel Kurulu ve Hayvan

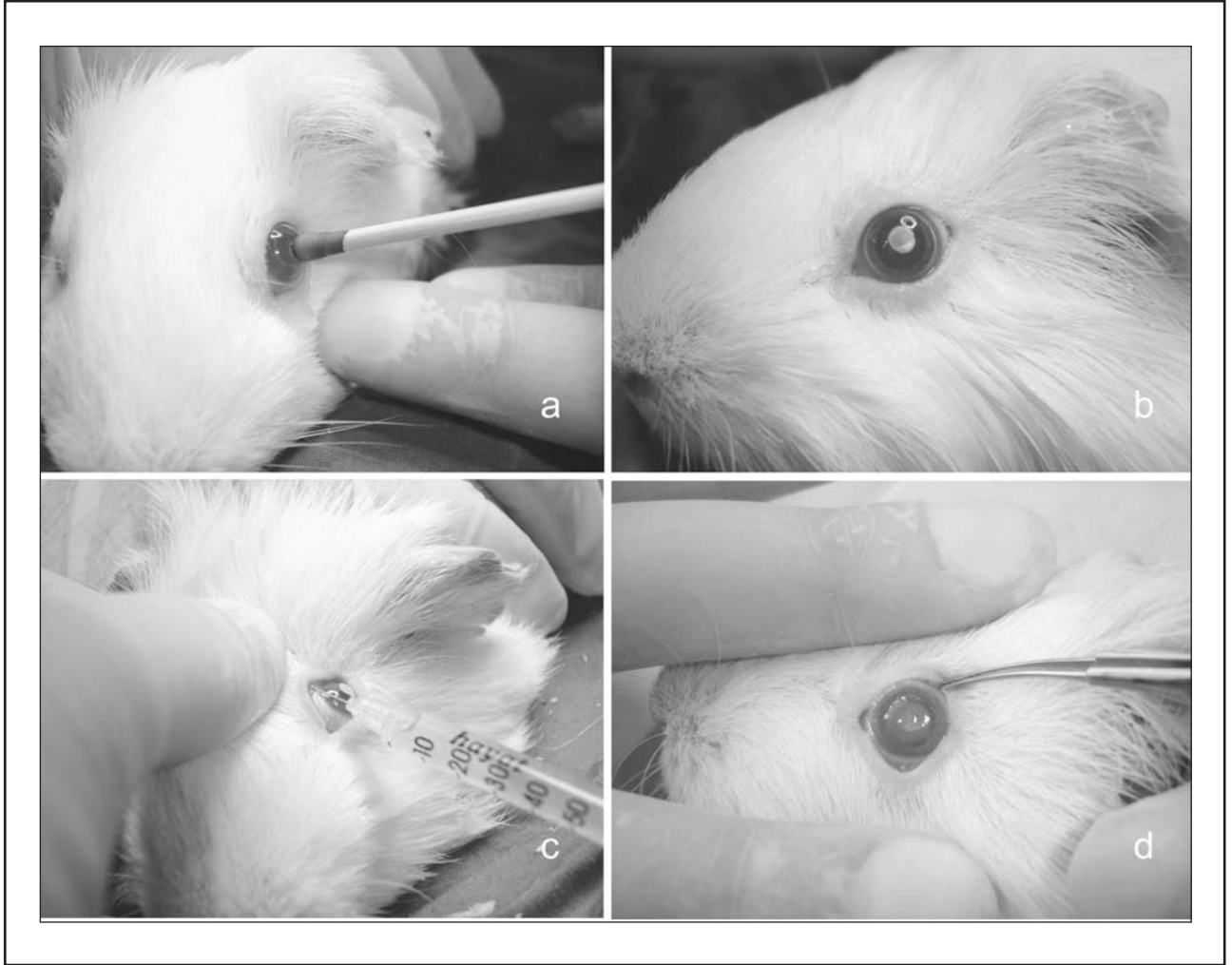
Deneyleri Etik Kurul Başkanlıkları'nın onayı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm hayvanlar ayrı kafesler içerisinde ve standart koşullar altında tutulmuştur.

400-450 gram arasında değişen toplam 21 kobay, yedişer hayvandan oluşan 3 gruba ayrıldı. Kimyasal kornea koterizasyonunu takiben subkonjonktival olarak birinci gruba (kontrol grubu) 0.1 ml dengeli tuz solüsyonu, ikinci gruba 0.1 ml'de 1 mg bevacizumab (Altuzan flakon; Roche, Genentech Inc, San Francisco, ABD), üçüncü gruba ise 0.1 ml'de 0.15 mg pegaptanib sodyum (Macugen; Pfizer, Gilead Sciences Inc, CA, ABD) enjeksiyonları gerçekleştirildi.

Tüm işlemler intraperitoneal 120 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar; Eczacıbaşı, Türkiye) ve 20 mg/kg xylazine (Rompun; Bayer, Türkiye) kombinasyonu ile sağlanan genel anestezi ve topikal %0.5 proparakain hidroklorid (Alcaine; Alcon, Fort Worth, Texas-ABD), damlatıldıktan sonra uygulandı. Anesteziyi takiben tüm hayvanların sağ gözlerinde kornea merkezi gümüş nitrat çubukları ile kimyasal olarak koterize edildi. Gümüş nitrat çubukları %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat içermektedir (HemoStop; Hizmet Medikal, İstanbul, Türkiye). Çubuklar tüm hayvanlarda 8 saniye süre ile kornea santraline bastırıldı (Resim-1a). Koterizasyondan sonra artık kimyasalların ortamdaki uzaklaştırılması için kornea ve forniksler bol miktarda dengeli tuz solüsyonu ile temizlendi (Resim-1b). Ardından subkonjonktival enjeksiyonlar limbusun 1-2 mm gerisinden superior bulber konjonktivaya 29 gauge ucu olan 1 ml'lik tüberkülin enjektörleri ile yapıldı (Resim-1c). Tüm işlemler aynı araştırmacı (VH) tarafından gerçekleştirildi.

Hayvanlar kimyasal koterizasyondan sonra 10. gün biyomikroskop ile muayene edildi ve dijital fotoğraf ma-

Resim 1. a) Gümüş nitrat çubuklarıyla kimyasal koterizasyon. b) Kimyasal koterizasyondan hemen sonraki görünüm. c) Subkonjonktival enjeksiyonun yapılışı. d) Koterizasyondan sonra 10. gündeki görünüm.



kinası ile fotoğrafları çekildi (Resim-1d). Her göz için yanık ve neovaskülarizasyon dereceleri Mahoney ve Waterbury (2) tarafından tanımlandığı şekilde belirlendi. Yanık skorları, oluşan yanığın kabarıklığına göre 0 (kornea yüzeyinde kabarma yok), +1 (kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık), +2 (kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık), +3 (kornea yüzeyinde büyük kabarıklık) şeklinde derecelendirildi. Kornea neovaskülarizasyonları yanık çevresinde, kornea yüzeyinde ve limbusta bulunan kızarıklık derecesine göre 0 ile +6 arasında derecelendirildi. Dijital fotoğraflar üzerinde Adobe Photoshop programı kullanılarak korneadaki yanık alanı ve neovaskülarizasyonun toplam kornea yüzey alanında kapladığı kısımlar yüzde şeklinde hesaplandı.

Ardından hayvanlar yüksek doz pentobarbital (Pentotal; Abbott, ABD) ile sakrifiye edildi. Gözler %10'luk for-

mol içerisinde 24 saat bekletilerek fikse edildi ve histolojik olarak incelendi. Hematoksilin-eosin ile boyanan kesitler çalışma gruplarını bilmeyen bir araştırmacı tarafından (BK) incelendi. Işık mikroskopu ile büyük büyütmede (x400) kornea dokusu içerisinde en fazla vaskülarizasyon bulunan alandaki damar sayısı sayıldı (12). Grupları bilmeyen bir başka araştırmacı tarafından dijital fotoğraflar üzerinde Adobe Photoshop 5.5 kullanılarak piksel cinsinden yanık ve neovaskülarizasyon alanları ölçüldü (OD). Korneadaki yanığın ve neovaskülarizasyonun toplam kornea yüzey alanı içerisinde kapladığı alan yüzde olarak belirlendi (Neovaskülarizasyon alanı X 100 / toplam kornea alanı). Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis ve Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testleri ile incelendi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 1.

Gruplar	Yanık Skoru	NV Skoru	Yanık Alan Yüzdesi	NV Alan Yüzdesi	Histolojik NV
Bevacizumab	2.07 ± 0.53	2.36 ± 1.35	13.95 ± 2.90	59.84 ± 6.85	8.86 ± 2.89
Pageptanib	2.64 ± 0.48	3.86 ± 0.94	13.38 ± 1.67	82.96 ± 5.59	12.67 ± 2.04
Kontrol	2.36 ± 0.63	3.93 ± 1.72	11.82 ± 2.52	73.83 ± 6.67	13.05 ± 3.21
p	0.173	0.082	0.101	0.001	0.052

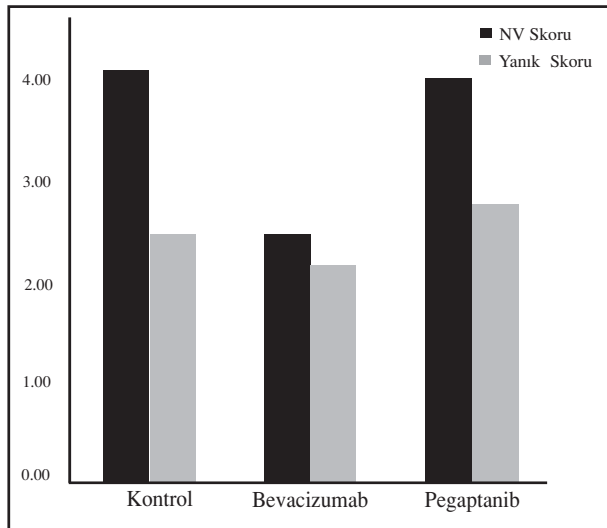
NV: Neovaskülarizasyon

SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler Tablo-1’de belirtilmiştir. Kornealarda oluşan yanık skorları açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.173$). En yüksek yanık skoru pegaptanib grubunda belirlenmiştir (Resim-2). Neovaskülarizasyon skorları açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.082$). Neovaskülarizasyon skorları arasında en yüksek değer kontrol grubunda belirlenmiştir. En az neovaskülarizasyon skoru ise Bevacizumab grubunda elde edilmiştir (Resim-2).

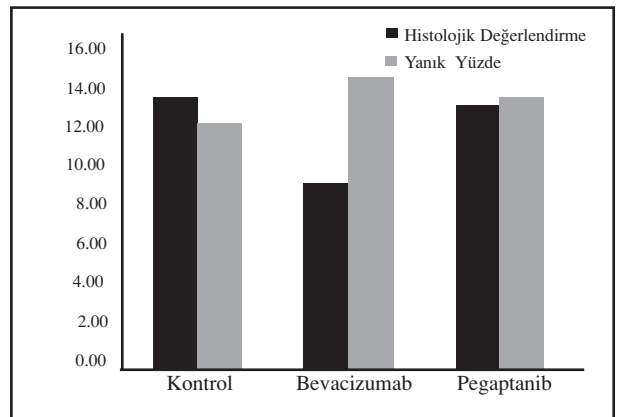
Kimyasal yanığın kornea yüzeyinde kapladığı alan açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktaydı ($p=0.101$) (Resim-3). Neovaskülarizasyonun kornea yüzeyinde kapladığı alan ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur ($p=0.001$).

Resim 2. Gruplardaki kornea yanığı ve neovaskülarizasyon skorları.



En az neovaskülarizasyon alanı Bevacizumab grubunda tespit edilmiştir. Bevacizumab grubu ile kontrol grubu arasında ($p=0.004$) ve Bevacizumab grubu ile Pegaptanib grubu arasındaki fark ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlıydı. Histolojik değerlendirme ile kornea içerisinde tespit edilen damar sayısı açısından gruplar arasında bulunan fark istatistiksel olarak sınırda anlamsız bulunmuştur ($p=0.052$). Histolojik kesitlerde damarlanma en az bevacizumab grubunda (8.86 ± 2.89), en fazla kontrol grubunda (13.05 ± 3.21) belirlenmiştir (Resim-3).

Resim 3. Gruplardaki kornea yanık alanı yüzdesi ve histolojik derecelendirme sonuçları.



TARTIŞMA

Bevacizumabın KN üzerine olan etkisi ilk olarak Manzano (6) tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada farelerde topikal uygulanan bevacizumabın kimyasal kote-rizasyon ile oluşturulan KN üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde farelerde, tavşanlar ve kobaylarda yapılan farklı modellerde bevacizumabın özellikle KN oluşmadan önce uygulanması durumunda neovaskü-

larizasyon gelişimini azaltan belirgin etkisi olduğu bilinmektedir (11,13). Ancak neovaskularizasyonlar oluştuktan sonra bevacizumab uygulaması yapıldığında görülen etki azalmaktadır (1,14).

Çalışmamızda uyguladığımız deneysel KN modeli ilk olarak farelerde Mahoney tarafından (15) topikal ilaç etkinliğinin değerlendirmesi amacıyla uygulanmıştır. Kendi oluşturduğumuz modelde ise göz yapısı daha büyük olduğu için kobaylarda çalışmayı uygun gördük. Daha önce yaptığımız bir ön çalışmada kobaylarda KN seviyesinin en üst düzeye koterizasyondan sonra 7-10 gün arasında çıktığını belirlemiştik. Bu nedenle ilaç etkinliği bu dönemde değerlendirilmiştir. Bununla birlikte ilaçların daha uzun süre etki göstermesi için topikal tedavi yerine subkonjonktival enjeksiyon uygulamayı tercih ettik.

Bevacizumabın kobaylarda KN üzerine etkili olduğu bildirilmiş olsa da pegaptanibin kobaylarda etkinliğini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (1). Eyetech çalışma grubunun yaptığı Faz-1 çalışmasında (11) farelerde kornea stromasına yerleştirilen polimerler ile KN oluşturulmuştur. Bu modelde intravenöz pegaptanib sodyum ile KN'larında %65 oranında gerileme sağlanmıştır. Bizim çalışmamızda subkonjonktival pegaptanib uygulanan grupta, korneadaki yanık skoru ve yanık alan yüzdesi kontrol grubundan daha yüksek olmasına rağmen histolojik olarak neovaskularizasyon derecesi kontrol grubundan daha düşük olarak belirlenmiştir. Ancak pegaptanibin etkisi, uyguladığımız dozda bevacizumabın etkisinden daha azdı. Bevacizumab grubundaki KN derecesi pegaptanib ve kontrol gruplarına göre belirgin şekilde daha düşüktü.

Bevacizumabın insanlarda çeşitli sebeplerle oluşan KN'ları üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (16). Ancak pegaptanibin benzer şekilde kullanımı ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız iki molekül de KN'ları azaltma amacıyla insanlarda kullanılma potansiyeline sahiptir, ancak fiyat avantajı nedeniyle bevacizumab üzerinde daha çok çalışma yapılmaktadır. Bununla birlikte oküler uygulamalarda sistemik kullanımına göre çok düşük dozda kullanılmasına rağmen bevacizumabın hayatı tehdit eden ciddi sistemik yan etki gösterebileceği bildirilmektedir (17). Pegaptanib ise pahalı bir ilaç olduğundan koroidea neovaskularizasyonları haricinde kullanımı sınırlıdır.

Çalışmamızda bevacizumab ve pegaptanib sodyumun sadece tek dozdaki etkinliği incelenmiştir. Bu husus bir eksiklik olarak kabul edilebilir. Ancak uyguladığımız dozda her iki molekülün de belirli seviyede KN üzerinde azaltıcı etki gösterdiğini gözlemledik. Bevacizumab

pegaptanib'den daha etkili gözükse de, pegaptanib'in daha yüksek dozda kullanımı ile bu etkinin artacağı düşüncesindeyiz. Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirilirken unutulmaması gereken önemli bir nokta hayvan çalışmalarında elde edilen sonuçların insanlarda elde edilecek klinik etkinliği tam gösterememesidir. İnsan korneasında kullanılacak etkili VEBF inhibitör dozu bu nedenle uyguladığımız dozdan çok daha düşük ya da fazla olabilir. Bu husus ileriki dönemde yapılacak çalışmalarla aydınlatılacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızda kobaylarda kimyasal koterizasyon ile oluşturulan KN modelinde, subkonjonktival bevacizumab ve pegaptanib sodyum enjeksiyonu neovaskularizasyon gelişimini azaltacak şekilde etkili bulunmuştur. Klinik uygulamada iki molekülün gerçek değerinin ortaya konulması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Daglı O, Durukan AH. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea*. 2008;27:357-62.
2. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, Stechschulte SU, Kirchhof B, Dartt DA, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 117-123.
3. Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110: 405-407.
4. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1986; 93: 1304-1309.
5. Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41: 2148-2153.
6. Manzano R, Peyman G, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by Bevacizumab (AVASTIN). *Br J Ophthalmol*. 2007; 91: 804-807.
7. Tabernero J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res*. 2007; 5: 203-220.
8. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Michels S, Marcus EN, Lenchus JD, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty-four-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. 2006; 113:1-12.
9. Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007; 245:1577-1579.