

**NANOTEKNOLOJİ BAZLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN
GÖZE İLAÇ UYGULAMALARINDA, TRANSKLERAL GEÇİŞ
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**EVALUATION of TRANSSCLERAL PERMEABILITY
EFFECTS of NANOTECHNOLOGY BASED DRUG DELIVERY
SYSTEM in OCULAR DRUG APPLICATIONS**

NAGİHAN UĞURLU

Prof.Dr.EMİR BAKİ DENKBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2013

NAGİHAN UĞURLU'nun hazırladığı "Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıma Sistemlerinin Göze İlaç Uygulamalarında Transskleral Geçiş Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman)

(Prof.Dr.Emir Baki Denkbaş)

Üye

(Doç. Dr. Nurullah Çağıl)

Üye

(Doç. Dr. Mustafa Türk)

Üye

(Doç. Dr. Hasan Basri Çakmak)

Üye

(Doç. Dr. Sibel Pehlivan)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma Sevin DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez tüm hayatım boyunca yanımda olan canım anneme ve canım babama ithaf edilmiştir.....

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçlarımı bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

02/04/2013

İmza



Dr. Nagihan UĞURLU

ÖZET

NANOTEKNOLOJİ BAZLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN GÖZE İLAÇ UYGULAMALARINDA, TRANSKLERAL GEÇİŞ ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

NAGİHAN UĞURLU

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Emir Baki Denkbaş

Nisan 2013, 104 sayfa

Bu tez kapsamında, kitosan nanopartiküller sentezlenerek ve bu nanopartiküllere bevasizumab yüklenmiş ve bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu ve zeta sizer ile yapılan ölçümlerde bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin boyutları 80-380 nm olarak ölçülmüştür. İlaç yükleme verimi 38 ± 22 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan bevasizumab nanopartiküllerin in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. Yüklü nanopartiküllerin 3 haftalık izleminde, ilaç salımının 5. günden sonra artmaya başladığı ve izlem yapılan 3 hafta boyunca ilaç salımının devam ettiği izlenmiştir. İn vivo çalışmalarda, yüklü nanopartiküller tavşan gözlerine subtenon olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası takip süresinde herhangi bir enfeksiyon veya inflamatuvar reaksiyon gelişmemiştir. İmünohistokimyasal incelemelerde yüklü nanopartiküllerin sklera duvarında bir miktar ilerlediği gözlemlenmiştir. Bevasizumab yüklü nanopartikül enjekte edilen deney hayvanlarından enjeksiyon sonrası 1, 3, 5 ve 7. gün alınan örneklerde vitreus serum ve vitreus bevasizumab düzeyleri ölçülmüş ve serbest bevasizumab enjekte edilen gözlerden alınan örnekle karşılaştırılmıştır. Yüklü nanopartikül enjekte edilen gözlerde vitreus bevasizumab konsantrasyonunun, serbest bevasizumab enjekte edilen gözlerle oranla daha erken yükseldiği izlenmiştir. Yüklü nanopartikül enjekte edilen grupta serum

bevasizumab konsantrasyonunun serbest bevasizumab enjekte edilen gruba oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kitosan, bevasizumab, nanopartikül

ABSTRACT

EVALUATION of TRANSSCLERAL PERMEABILITY EFFECTS of NANOTECHNOLOGY BASED DRUG DELIVERY SYSTEM in OCULAR DRUG APPLICATIONS

Dr. NAGİHAN UĞURLU

Doktor of Philosophy , Nanotechnology and Nanomedicine Department

Supervisor: Prof. Emir Baki Denkbaşı

April 2013, 104 pages

Chitosan nanoparticles were synthesized and bevacizumab was loaded to this chitosan nanoparticles in the present thesis. Characterization of bevacizumab loaded chitosan nanoparticles were made and the size of the bevacizumab loaded chitosan nanoparticles were measured between the range of 80-380 nm in Atomic force microscope and zeta sizer. Drug loading capacity was measured as 38 ± 22 . In *in vitro* studies it was observed that amount of drug release was increased after fifth day of injection and continued during 3 weeks. In *in vivo* studies of these bevacizumab loaded chitosan nanoparticle were studied. Loaded nanoparticles were injected as subtenon injections to rabbit eyes. No infectious or inflammatory reactions were developed during follow up period. Immunohistochemical sections showed some degree transport of bevacizumab loaded chitosan nanoparticles transport through sclera. After subtenon bevacizumab loaded chitosan nanoparticle injections serum and vitreous samples were obtained from the rabbits at first, third, fifth and seventh days. The values compared to those of rabbits that were applied free subtenon bevacizumab injection. Elevation of vitreous bevacizumab levels were observed earlier in bevacizumab loaded chitosan nanoparticle injected rabbits compared to free bevacizumab injected rabbits. Serum bevacizumab levels of bevacizumab loaded chitosan nanoparticle injected rabbits were lower than those of free bevacizumab injected rabbits.

Key words:chitosan, bevacizumab, nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana engin bilgi ve tecrübesiyle her aşamada destek olan ve yol gösteren hocam Emir Baki Denkbaş'a,
Tez çalışmaları sırasında tüm bilgisi ve enerjisi ile beni her zaman destekleyen Mehmet Doğan Aşık'a,
Bilimsel çalışmalarımnda fikirleri, bilgisini ve imkanlarını benimle paylaşan Mustafa Türk'e
Bilimsel çalışmalar konusunda desteğini ve yardımlarını her zaman hissettiğim hocam Nurullah Çağıl'a,
Özgün fikirleri ile tez çalışmalarının planlanmasında yardımları olan Hasan Basri Çakmak'a
Titizliği ve özeni ile tez çalışmalarında çok büyük emeği olan Sema Tuncer'e,
Çalışmalarım süresince vermiş oldukları destekler için Murat Demirbilek'e, Cem Bayram'a,
Tamer Çırak'a,
Tezin çalışmaları boyunca samimi desteklerini benden esirgemeyen tüm Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim dalı üyelerine,
Bu tez kapsamında yapılan çalışmaları 1002 Hızlı destek projesi kapsamında verdikleri proje ile destekleyen TÜBİTAK yetkililerin'ne,
Beni tüm yaşantım boyunca seven, destekleyen, ve iyiliğe yönlendiren sevgili annem Saadet Orhan'a ve babam Cemal Orhan'a ve
Hayatın her aşamasında olduğu gibi tez yazma sürecinde de beni sabır ve özveriyle destekleyen sevgili eşim Mahmut Uğurlu'ya ve ailesine

Teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
	No
ÖZ	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
TEŞEKKÜR	<i>v</i>
İÇİNDEKİLER	<i>vi</i>
SİMGELER VE KISALTMALAR	<i>ix</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>xi</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koroid Neovasküler Membran (KNVM)	4
2.1.1. KNVM oluşumunda Anjiyogenez	5
2.1.1.1. Anjiyogenezin Gelişim Mekanizması	6
2.1.1.2. KNVM Gelişiminde VEGF-A'nın Rolü	7
2.1.2. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)	8
2.1.2.1. VEGF Oluşumu ve Alt Tipleri	8
2.1.2.2. VEGF Reseptörleri	9
2.1.3. KNVM Tedavisinde Anti-VEGF İlaçlar	9
2.1.3.1. Göz Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Anti-VEGF Ajanlar	9
2.1.3.1.1. Bevasizumab haricinde kullanılan ilaçlar	10
2.1.3.1.2. Bevasizumab	10
2.1.3.2. KNVM Tedavisinde anti-VEGF Tedavilerin Etkinliği	11
2.1.3.3. Anti Anjiyogenik İlaçların Göze uygulanmasında geneleksenel Yöntemler	12

2.2.	Perioküler İlaç Uygulamaları	15
2.2.1.	Transskleral Bariyerler ve Özellikleri	17
2.2.1.1.	Statik Bariyerler	18
2.2.1.1.1.	Sklera	18
2.2.1.1.1.1.	Skleranın Yapısı	18
2.2.1.1.1.2.	Skleral Geçirgenlik	19
2.2.1.1.2.	Bruch membran-Koroid (BK) ve RPE	19
2.2.1.1.2.1.	Bruch membranın Yapısı	20
2.2.1.1.2.2.	Koroidin Yapısı	20
2.2.1.1.2.2.	Koroidin Yapısı	20
2.2.1.1.2.4.	Bruch membran-Koroid ve RPE Geçirgenlik Çalışmaları	20
2.2.1.2.	Dinamik Bariyerler	21
2.2.1.2.1.	Konjunktival/Episkleral akım	21
2.2.1.2.2.	Koroidal Akım	21
2.2.1.2.3.	Uveoskleral Akım	22
2.2.1.2.4.	Hidrostatik ve Osmotik Basınç	22
2.2.1.2.4.	RPE Taşıyıcı Proteinler	22
2.2.1.3.	Metabolik Bariyerler	22
2.2.2.	Transskleral İlaç Geçişlerinin Etkinliği	23
2.2.2.1	Antianjiyojenik Tedavide Karşılaşılan Sorunlar	24
2.3.	Gözde Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemlerinin Kullanılması	25
2.3.1.	Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıma Sistemleri	25
2.3.1.1.	Kitosanın Kaynağı, Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	26
2.3.1.2.	Kitosan Bazlı Taşıma istemlerinin Göze İlaç Taşınmasında Kullanılması	27

2.3.1.2.1.	Kitosan Nanopartiküllerin Göze İlaç Taşınmasında Kullanılması	28
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1.	Nanopartiküllerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve <i>in vitro</i> çalışmalar	30
3.1.1.	Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	30
3.1.2.	Bevasizumabın Kitosan Nanopartiküllere Yüklenmesi	31
3.1.3.	İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	32
3.1.4.	Salım Profillerinin Oluşturulması	32
3.1.5.	Yükleme Veriminin Hesaplanması	32
3.2.	Hazırlanan Nanopartiküllerle yapılan <i>in vivo</i> Çalışmalar	32
3.2.1.	Subtenon Enjeksiyon	33
3.2.2.	Enjeksiyon Sonrası Takip Muayeneleri	35
3.2.3.	Örneklerin Toplanması	35
3.2.4.	İmünohistokimya	36
3.2.5.	ELISA Ölçümleri	36
3.2.6.	Vitreusta Bulunan Bevasizumab Miktarının Hesaplanması	36
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1.1.	İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi Ve Karakterizasyonu	37
4.1.2.	Salım Profillerinin İncelenmesi	41
4.2.1.	Enjeksiyon Sonrası Muayene Sonuçları	42
4.2.2.	İmmunohistokimya Sonuçları	45
4.2.3.	Eliza Sonuçları	47
	SONUÇLAR	63
	KAYNAKLAR	65
	EK 1:APPENDİX	84
	ÖZGEÇMİŞ	884

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

YMD	Yaşa Bağlı Maküla Dejeneresansı
DRP	Diabetik Retinopati
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
FDA	Federal Drug Administration
KNVM	Koroidal Neovasküler Membran
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
TGF α	Transforming Büyüme Faktörü alfa
TGF β	Transforming Büyüme Faktörü beta
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
CTGF	Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
IL-8	Interleukin-8
PEDF	Pigment Epitel Kökenli Faktör
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
OCT	Optik Koherent Tomografi
IgG	İmün globülin G
VISION	VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization
ANCHOR	Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classical CNV in AMD

MARINA	Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab in the treatment of neovascular AMD
FFA	Fundus Florosein Anjiografi
PDT	Fotodinamik Tedavi
BK	Bruch Membranı-Koroid
RPE	Retina Pigment Epiteli
GAG	Glikozaminoglukan
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
GRAS	Genel olarak Güvenli Kabul edilen
NSAI	Non-steroid antiinflamatuvarlar
5 FU	5 Floro urasil
TPP	Tripolifosfat
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
PEG	Polietilen Glikol
PLGA	Polilaktoglikolik Asit
NLC	Nanostructured Lipid Carriers
HET-CAM	Hen'in Koryoallentoik Membran Yumurta Testi
NP	Nanopartikül
PLA	Polilaktik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Gözün tabakaları	3
Şekil 2.2. KNVM'nin Göz Kesitlerinde Görünümü	5
Şekil 2.3. Anjiyogenezin Şematik Gösterimi	7
Şekil 2.4. Avastinin üç boyutlu yapısı	10
Şekil 2.5. Transskleral geçişteki tabakalar	14
Şekil 2.6. Perioküler alandan vitreus ve posterior oküler yapılara transskleral yolla ilaç geçiş yolları	16
Şekil 2.7. Transskleral geçişteki statik bariyerler (sklera, koroid, retina pigment epiteli)	17
Şekil 2.8. Transskleral ilaç uygulamalarında konjoktiva / episklera ve koroiddeki temizlenme (clearance) yolları	21
Şekil 2.9. intravitreal enjeksiyonun şematik çizimi	24
Şekil 3.1. Kitosan nanopartikül üretim düzeneği	31
Şekil 3.2. Subtenon enjeksiyon uygulamasının şematik gösterilmesi	34
Şekil 3.3. A-B Tavşan gözünün enjeksiyona hazırlanması	34
Şekil 3.4. A-B Subtenon enjeksiyon uygulaması	35
Şekil 4.1. Hazırlanan kitosan partiküllerin Zeta Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği	37
Şekil 4.2. Hazırlanan kitosan partiküllerin: A: AFM görüntüsü B: AFM görüntüsünden oluşturulmuş 3 boyutlu yapısı	38
Şekil 4.3. Farklı miktarlarda Bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerden salınan ilaç miktarının zamana göre grafiği	42
Şekil 4.4. Subtenon enjeksiyon sonrası ön segment muayene sonuçları A: 1.	43

	Gün B: 5. gün	
Şekil 4.5.	Sklerin immünohistokimyasal boyamalar;A:Kontrol grubu 1,3,5. ve 7. gün sonuçları;B:İlaç Grubu 1,3,5. ve 7. gün sonuçları;C:İlaç yüklü partikül grubu 1,3,5. ve 7. gün sonuçları	46
Şekil 4.6.	ELISA testi ile belirlenen serumdaki bevasizumab miktarı	49
Şekil 4.7.	ELISA testi ile belirlenen, vitreustaki bevasizumab miktarları	50
Şekil 4.8.	Vitreusta bulunan bevasizuamb miktarının başlangıç bevasizumab miktarına oranları	60

1.GİRİŞ

Gözün arka segmentinde anjiyogenezle ilişkili hastalıklar tüm dünyada geri dönüşümsüz körlüklerin en önemli sebepleridir. İleri yaş grubunda yaşa bağlı maküla dejeneransı (YMD), orta yaş grubunda diabetik retinopati (DRP) ve bebek grubunda prematüre retinopatisi, retinal ve koroidal neovaskülarizasyona sebep olarak hastalarda görmenin ciddi oranda kaybedilmesine yolaçmaktadır. Bu hastalıkların sebep olduğu ağır görme kayıpları, hastalarda işgücünü kaybetme, günlük aktivitelerini yerine getirememe ve yaşam kalitesini ciddi oranda düşürme gibi istenmeyen etkilerinin yanısıra, bu hastalıkların tedavisinde ve görme kayıplarına ikincil gelişen patolojilerin tedavilerin yüksek maliyetleri sebebiyle sağlık harcamalarında ciddi artışlara neden olmaktadır.

Anti Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) tedavilerin gözdeki patolojik anjiyogenez tedavilerinde kullanılması 2004 yılında başlamıştır. Önce yaşa bağlı YMD tedavisinde yaygınlık kazanan anti-VEGF uygulamaları, elde edilen anatomik ve fonksiyonel başarılarından sonra DRP, ven dal tıkanıklığı, üveit gibi diğer hastalıklarda da gittikçe artan sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bugün artık arka segmentteki retina ve koroid neovaskülarizasyonla seyreden tüm hastalıklarda anti VEGF tedaviler tüm dünyada en yaygın kullanılan seçeneklerden biridir. Ön segment neovaskülarizasyonlarında da anti VEGF kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Bevasizumab, kolon kanseri tedavisi için Federal Drug Administration (FDA) onayı almış ancak, göz hastalıklarının tedavisindeki etkisi de pek çok yayınlara kanıtlanmış olan ve tüm dünyada intraoküler uygulamalar için en yaygın tercih edilen anti VEGF ajandır. Off label (ruhsatlı endikasyon dışı) olmasına rağmen, FDA onayı bulunan muadillerine karşı bu kadar sık tercih edilmesinin sebebi fiyatının ucuz olmasıdır. Anjiyogenezle seyreden hastalıklar kronik hastalıklar olduklarından gözdeki etkileri sürekli devam etmektedir ve bu uygulamalar hastalığın kesin tedavisini sağlamamakta sadece belli sürelerle bulguları düzeltmektedir. Bu nedenle uzun süreli tedaviler söz konusudur bu da tedavi maliyetlerini ciddi oranda arttırmaktadır.

Anti VEGF tedavilerdeki en önemli sorunu, tüm göz ilaçlarının uygulanmasında olduğu gibi, hedef dokuda istenen terapötik ilaç dozunun sağlanmasıdır. Gözün statik ve dinamik bariyerleri, uygulanan ilaç moleküllerinin göziçi dokulara ulaşmasını engellerler. Bu nedenle sistemik, topikal gibi geleneksel yollarla göz içinde istenen ilaç konsantrasyonlarını sağlamak mümkün olmadığından subtenon veya intravitreal uygulamalar tercih edilmektedir.

İntravitreal uygulamalarda, ilaç direk vitreus boşluğuna uygulanır. Bu uygulama ile istenen doz kolaylıkla sağlanabilmekle birlikte, uygulamanın retina dekolmanı, katarakt, üveit, endoftalmi gibi ciddi yan etkileri olabilmektedir. Ayrıca bu hastalıklar kronik hastalıklar olduğundan, yaklaşık bir aylık peryotlarla bu uygulamanın tekrar edilmesi gerekmektedir. Tedavi maliyetinin ve yan etki gelişme riskinin artmasının yanısıra, bu kadar sıklıkla tekrarlanan enjeksiyonlar hastalar için ciddi bir zorluktur.

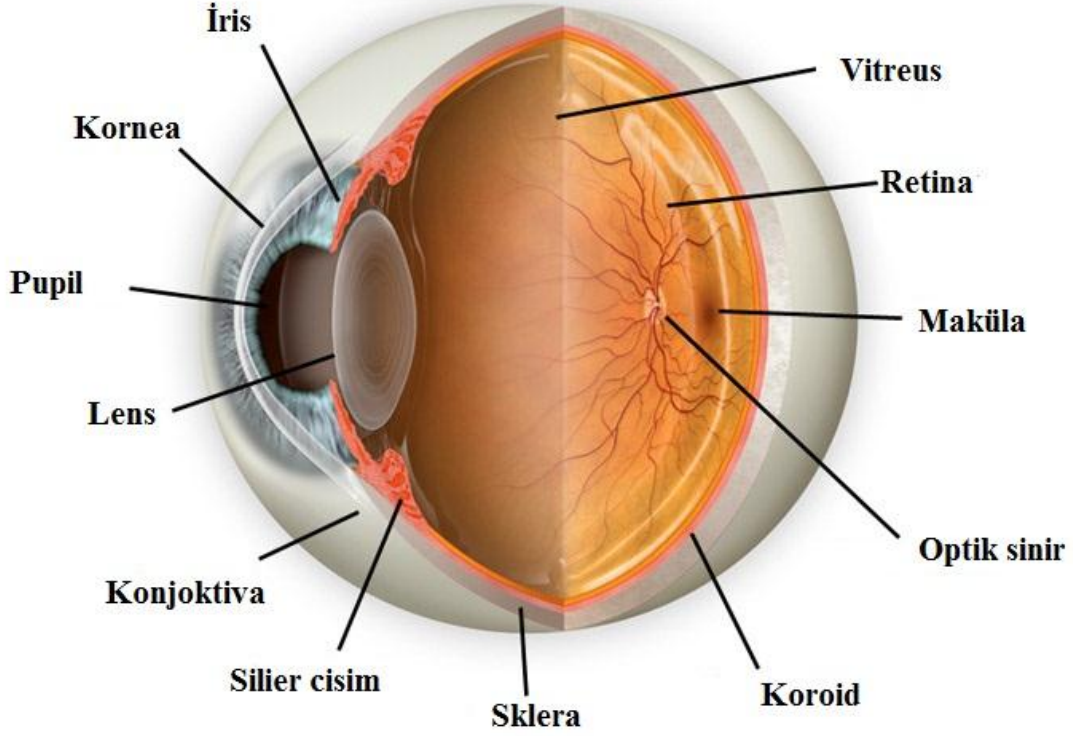
Trasskleral uygulamalar daha az riskli olması ve daha kolay uygulanabilmesi sebebiyle, intravitreal enjeksiyonlara alternatif olabilecek uygulamalardır. Transskleral uygulamaların en önemli dezavantajı intravitreal enjeksiyonlara oranla vitreusta istenen enjeksiyonların sağlanamamasıdır. Subtenon, subkonjoktival uygulanan ilaç moleküllerinin, göz içi dokulara ulaşması statik ve dinamik pek çok faktör tarafından engellenmektedir.

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri, her alanda olduğu gibi oftalmoloji alanında de çok yoğun olarak çalışılmaktadır. Göze uygulanan ilaçların çözünürlüğünü ve bariyerlerden geçişini arttırmak ve ilaç konsantrasyonunu daha uzun süre koruyabilmek için pek çok nanopartiküler taşıyıcı konusunda çalışılmaktadır.

Bu tez kapsamında gözde kullanılmak üzere 80-380 nm aralığında bevasizumab yüklü nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu nanopartiküllerin 3 hafta boyunca in vitro salımlarını incelenmiş ve 5. günde artan salımın izlem süresi boyunca sürdüğünü gözlenmiştir. Hazırlanan bevasizumab yüklü nanopartiküller tavşan gözlerine subtenon olarak uygulanmış ve tavşanlar enjeksiyon sonrası takip edilmiştir. Hiçbir hayvanın gözünde ön kamarada reaksiyon, üveit veya enfeksiyon gelişimi izlenmemiştir. Alınan doku örneklerinde imünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmış nanopartiküllerin sklera duvarında bir miktar ilerledikleri izlenmiştir. Enjeksiyondan 1, 3, 5 ve 7 gün sonra sakrifiye edilen tavşanların gözlerinden alınan örneklerde, serum ve vitreus bevasizumab düzeyleri ölçülmüş ve bu veriler serbest bevasizumab verilen gruptan elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Bevasizumab yüklü kitosan nanopartikül enjekte edilen gözlerde vitreus bevasizumab seviyesinin, serbest bevasizumab verilen gözler oranda daha erken yükseldiği izlenmiştir. Başta verilen bevasizumab dozları dikkate alındığında, aynı düzeyde vitreus ilaç dozu elde etmek için gerekli olan bevasizumab miktarının, nanopartiküle yüklü olan grupta daha az olduğu izlenmiştir. Serum düzeylerinin yüklü nanopartikül enjekte edilen grupta çok düşük olduğu izlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Göz cisimlerden yansıyan ışığı elektriksel uyarılara çevirerek optik sinir aracılığı ile beyne ileten organdır. Göz anatomik olarak ön ve arka segmentlere ayrılmıştır. Ön segment kornea, ön kamara, iris, arka kamara, silier cisim ve lensten oluşur. Arka segment vitreus, retina, retina pigment epiteli ve koroidden oluşur (şekil 2.1)



Şekil 2.1. Gözün Tabakaları [1]

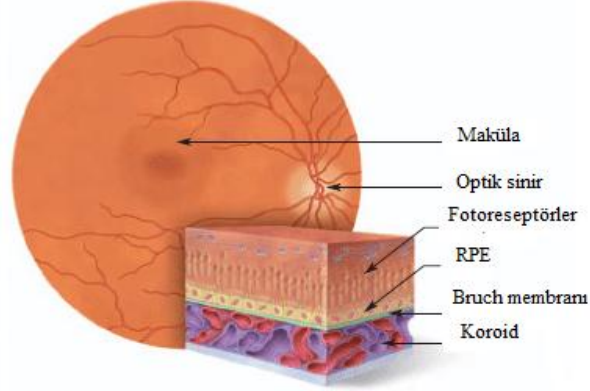
Ön segmentteki yapıların temel görevi ışık uyarılarını arka segmente geçirerek makülada odaklamaktır. Arka segmentte yer alan yapıların görevi ise bu uyarıları elektriksel uyarılara çevirmek ve beyne iletmektir. Arka segmentteki dokuların harabiyeti sıklıkla geri dönüşümsüz körlükle sonuçlanır. Tüm dünyada körlüklerin en önemli sebebi arka segmentteki anjiyogenez-ilişkili hastalıklardır [2-4]. Anjiyogenez ilişkili hastalıklarda en önemli bulgu koroidal neovasküler membran (KNVM) gelişimidir.

2.1.Koroid Neovasküler Membran (KNVM)

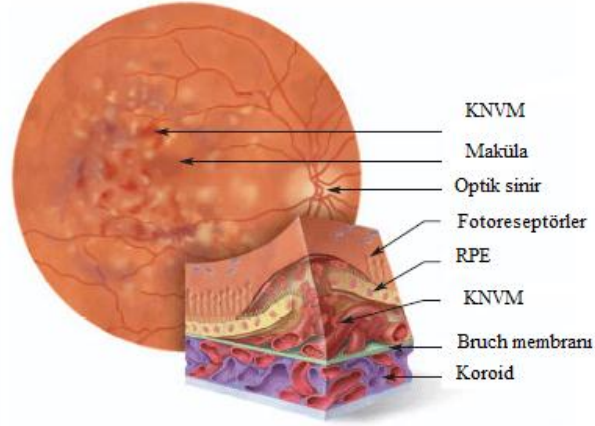
Gözdeki patolojik anjiyogenez, tüm dünyada çok ciddi görme kayıpları ile seyretmekte ve sonuçta tedavisi mümkün olmayan körlüğe neden olmaktadır. Oküler anjiyogenezin en önemli bulgusu KNVM gelişimidir ve tüm yaş gruplarını etkileyerek geri dönüşümsüz görmek kaybına sebep olabilen bu patoloji, yaşlı popülasyondaki görme kaybının en önemli sebebidir [5]. KNVM, koryokapillaristen köken alan damarların bruch membranı aşarak subretinal alanda yeni bir damar ağı yapısı oluşturmasıdır [6]. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, patolojik miyopi, oküler histoplazmozis, anjiyoid streaks, travma gibi kırktan fazla oküler patolojide görme kaybının nedeni, KNVM gelişimidir [7].

KNVM subretinal veya subretinapigment epitel alanda gelişir ve beraberinde, bu alanda sıvı birikimi ve kanama olabilir (şekil 2.2). Bu durum retina yüzeyinde düzensizliklere ve kabarıklıklara yol açar. Sonuç olarak hastada metamorfopsi olarak tanımlanan, objelerin şekillerinde deformasyon şikayetleri gelişir. Tabloya bazen nörosensoryel RD eklenebilir ve tüm bunların sonucunda gelişen fotoreseptör hücre hasarı tedavisi imkansız görme kaybına yol açar [8].

Normal Retina



Yaş tip AMD



Şekil 2.2. KNVM'nın Göz Kesitlerinde Görünümü [9]

2.1.1 KNVM oluşumunda Anjiyogenez

Koroidal neovaskülarizasyon hayvan modelleri konusunda yapılan yoğun çalışmalardan elde edilen veriler ve cerrahi sırasında veya mostmortem olarak eksize edilen KNVM'lerin incelenmeleri sonucunda elde edilen veriler, bu dokuların gelişimi ve etiyolojileri hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştı [10-13]. KNVM gelişiminde koryokapillaristen gelişen damarlar, anjiyogenez yoluyla subretinal alana doğru uzanarak burada patolojik bir membran oluştururlar [6]. Anjiyogenez, varolan kan damarlarından köken alan yeni damar ağlarının gelişimidir. Sağlıklı bireylerde, yara iyileşmesi, saç uzaması ve menstural siklus gibi birkaç fizyolojik anjiyogenez dışında anjiyogenezler genelde patolojik olaylara eşlik eder. Fizyolojik anjiyogenez, anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin çok kontrollü ekspresyonu ile dengede tutulan bir mekanizmadır [14]. Hastalık sürecinde farklı uyarıların etkisi ile anjiyogenik faktörlerin oranı artarken, antianjiyogenik faktörlerin

azalır ve bu dengeli mekanizma bozularak patolojik anjiyogenez süreci başlar. Solid tümörlerden hematolojik malignitelere, inflamatuvar bozukluklardan farklı göz hastalıklarında KNVM gelişimine kadar pek çok farklı patolijinin gelişmesinde ve yayılmasında patolojik anjiyogenez anahtar rol oynamaktadır [15,16].

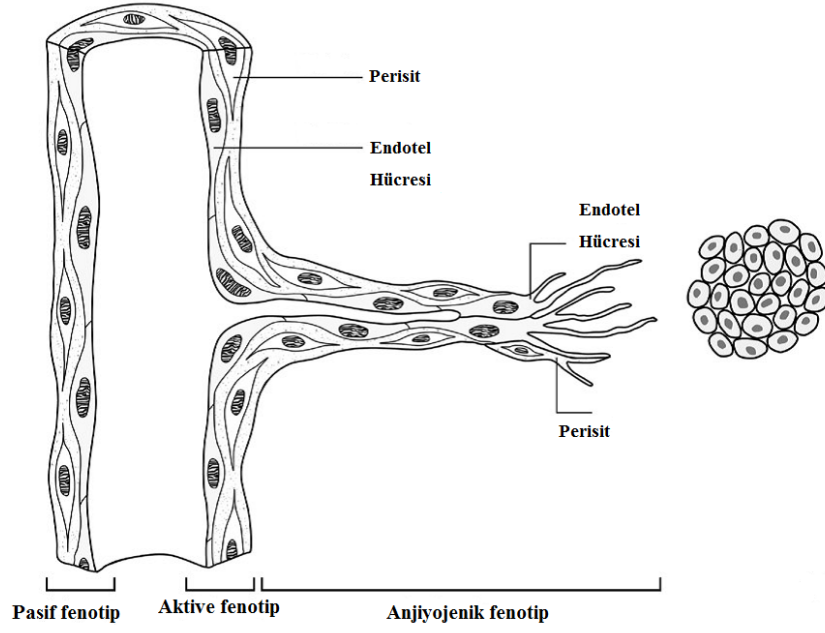
Gözdeki fizyolojik anjiyogenez, pozitif ve negatif uyaran faktörlerin arasındaki dinamik denge tarafından çok sıkı bir şekilde kontrol edilen, çok basamaklı bir süreçtir [16]. Anjiyogenezin pozitif uyaran faktörleri, VEGF-A, fibroblast büyüme faktörü (FGF), anjiyopoetinler, transforming büyüme faktörü alfa, (TGF α) ve transforming büyüme faktörü beta (TGF β), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ve interleukin 8 (IL- 8) olarak sayılabilir [17,18]. Bunlar arasında VEGF-A anjiyogenezin en önemli pozitif uyarandır [10,16].

Anjiyogenezin negatif düzenleyicileri incelendiğinde, thromboplastin, anjiyostatin, endostatin ve pigment epitelyum kökenli faktör (PEDF) gibi moleküller tanımlanır. Bu grubun içinde de anjiyogenez gelişimini en etkili şekilde önleyen PEDF'dür [18].

KNVM gelişiminde yeni damar gelişimini uyaran veya önleyen bu faktörlerin konsantrasyonu değişir ve bu hassas denge bozularda patolojik anjiyogenez süreci başlar. Özetle, KNVM gelişiminde pek çok farklı molekül etkili olmakla birlikte bunların bazılarının süreçte anahtar rol oynar. Bilinen en güçlü anjiyogenik uyarılardan biri olan VEGF, KNVM gelişiminin en güçlü ve en önemli molekülüdür [10,16,19].

2.1.1.1. Anjiyogenezin Gelişim Mekanizması

Anjiogenez çok aşamalı ve kompleks bir süreçtir. İlk aşama varolan damarların vasodilatasyonu ve geçirgenliklerinin artmasıdır. Bu aşamada başta VEGF-A olmak üzere anjiyojenik uyarılar vasküler endotel hücreleri uyarak kapiller duvarında yer alan endotel hücrelerinin aralarında boşluklar oluşmasına neden olur. Endotel hücreler bir tomurcuk oluşturur, bu tomurcuk yüzeyinde eksprese ettiği matriks metalloproteinazlar ve integrinler sayesinde ekstraselüler matriksi parçalar ve ilerler. Prolifere olan endotel hücreleri daha sonra tüp yapısını alır (şekil 2.3). Bu oluşan yeni damar ağı farklılaşan periendothelyal hücreler ve oluşan geçici matriks tarafından desteklenir. Lümen oluşumu ve komşu ağların anastomozu ile kapiller yumak oluşur [20].



Şekil 2.3: Anjiyogenezin Şematik Gösterimi [20]

2.1.1.2. KNVM Gelişiminde VEGF-A'nın Rolü

Korneal, iris, retinal ve koroidal neovaskülarizasyon hayvan modelleri konusunda yapılan yoğun çalışmalar, neovaskülarizasyon ve vasküler permeabilite artışı gözlenen pek çok göz hastalığında, VEGF'ün anahtar rol oynadığını göstermiştir [17,21]. Yine cerrahi olarak eksizye edilen KNMV'ların histopatolojik incelemeleri ve KNVM'lı gözlerde yapılan otopsi çalışmaları, VEGF'ün KNVM gelişimindeki rolünü desteklemiştir [11-13]. İnsanlardan alınan KNMV'larda ve laser uygulamaları ile oluşturulan YMD hayvan modellerinde VEGF ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir [10]. Tüm bu çalışmalar, koroidal neovaskülarizasyonda VEGF seviyesinin arttığını, deneysel olarak VEGF seviyesinin arttırılmasının KNVM gelişimine neden olduğunu ve VEGF'ün etkisinin baskılanmasının KNVM gelişimini engellediğini göstermiştir [22]. İntravitreal anti-VEGF monoklonal antikoları maymunlarda lazer uygulamasıyla KNVM oluşturulmasını engellemiştir [10]. Tüm bu çalışmalar, insanlardaki KNVM örneklerinde ve hayvan modellerinde, KNVM gelişiminde VEGF'ün çok önemli rolü olduğunu göstermektedir.

2.1.2. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), sentezlendiği organın gelişim evresine ve fizyolojik fonksiyonlarına göre önemli pek çok biyolojik aktiviteye sahip, multifonksiyonel bir moleküldür [23,24]. İlk olarak karsinoma hücre serilerinden salgılandığı keşfedilmiş ve tümörlerde asit sıvısını arttırdığı için vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak adlandırılmıştır [25]. Kısa süre sonra endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu uyararak endotel yaşam süresini uyardığı gösterilmiş ve VEGF'ün çok güçlü bir anjiyojenik molekül olduğu kanıtlanmıştır [26].

2.1.2.1. VEGF Oluşumu ve Alt Tipleri

VEGF ailesi, Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), süpergen ailesinin bir üyesidir ve altı büyüme hormonundan oluşmaktadır: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C VEGF-D ve viral VEGF analogu olan VEGF-E ve Plasental Growth Faktor (PLGF).² VEGF hipoksik ve inflamatuvar uyarıların etkisiyle, makrofajlardan, T hücrelerinden, retina pigment epitelyum hücrelerinden (RPE), astrositler, perisitler ve düz kas hücrelerinden salgılanır. VEGF-A grubun en iyi bilinen ve özellikleri en iyi karakterize edilmiş elemanıdır ve kanserden göz hastalıklarına, inflamasyondan koagülasyon bozuluklarına kadar pek çok hastalığın patogeneğinde temel rolü oynamaktadır [23,27, 28]. VEGF-B, non-anjiyojenik tümör gelişimde etkilidir. VEGF-C ve VEGF-D'nin kanser gelişimindeki lenfanjiyogenez ve anjiyogenezdeki rolü konusunda çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. PLGF, vasküler geçirgenliği artırır, proliferasyon, kemotaksis ve anjiyogenezde rol alarak, pek çok patolojik durumda VEGF-A, ile sinerjistik etki gösterir [23,24,29]. VEGF-A, 46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir. Literatürdeki VEGF-A'nın anjiyogenezin temel mediyatörü olduğunu kanıtlayan çok sayıda çalışma vardır [24,29,30]. İnsan VEGF-A geni, sekiz ekzon ve yedi introndan oluşmaktadır. Ekzonların alternatif kodlanması, altı farklı transkript oluşmasına ve altı farklı izoform üretilmesine sebep olmaktadır: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189, VEGF206. Bu izoformlar, moleküler ağırlıkları, asiditeleri ve heparine bağlanıp bağlanmamaları gibi özellikleri ile birbirlerinden ayrılırlar. Bu izoformların daha büyük yapıları matris-bağlı durumda bulunurken kısa olanları serbest difüzyon yapabilir. VEGF165 ve VEGF121 kovalent bağlı homodimerik proteinler olarak salgılanırlar. VEGF165, biyolojik olarak aktif olan ve ortamda en fazla bulunan isoformdur. VEGF165 hem matris bağlı formda bulunur hem de serbest difüze olabilir. VEGF121 asidik özelliktedir ve heparine bağlanmaz. Endotel hücrelerinde biyolojik aktiviteye sahip olmakla birlikte, aktivitesi VEGF165'den daha

düşüktür. Heparin-bağlayıcı ünitesi olmadığından en kolay difüze olabilen izoformdur. VEGF189 ve VEGF206 gibi daha büyük izoformlar, bazik özelliktedir, heparine bağlanırlar. Bu izoformlar hücre membranından geçerek, sitoplazmaya ulaşmadığından, ekstraselüler matrikste birikirler [24,29,31].

2.1.2.2. VEGF Reseptörleri

VEGF, tirozin kinaz ailesine ait hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Vasküler ve lenf damarı endotel hücrelerinin yanı sıra, monositler, makrofajlar, hemopoetik kök hücreler, epitelium hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri gibi non endotelial hücrelerin yüzeylerinde de VEGF reseptörleri ve koreseptörleri bulunur. Üç tip VEGF reseptörü vardır. VEGFR-1(flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1), ve VEGFR-3 (flt-4). VEGF-A için iki yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörü vardır: VEGFR-1(flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) [30,32,33,].

2.1.3. KNVM Tedavisinde Anti-VEGF Ajanlar

Kırktan fazla oküler hastalığın sonucunda gelişebilmesi ve ağır görme kayıplarına yol açması nedeniyle, KNVM hem yaygın olarak tanı konan, hem de yaşam kalitesini ciddi oranda düşüren önemli bir patolojidir. Bu nedenle KNVM tedavisi için günümüze dek pek çok farklı tedavi yöntemi denenmiştir. Lazer tedavisi, cerrahi yaklaşımlar ve fotodinamik tedavi seçenekleri KNVM yaygın olarak kullanılmakla beraber, tatmin edici sonuçlara ulaşmak mümkün olmamıştır [11-13, 34,35].

KNVM'in patogenezinin ait verilerin elde edilmesi ile birlikte, angiyojenin moleküler mekanizmasını hedefleyen tedaviler gündeme gelmiştir [36]. 2004 yılındaki Oküler Neovaskülarizasyonda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) baskılama çalışması, sonuçlarıyla bu alanda bir çığır açmıştır [37]. Bu çalışmada YMD bağlı KNVM tedavisinde, VEGF'ü hedefleyen tedavilerin, anatomik ve fonksiyonel iyileşmeye sebep olduğu sonucunu vermiştir. Daha sonra intravitreal anti-VEGF uygulamaları konusunda yapılan pek çok prospektif ve retrospektif çalışma, tedavi edilen hastalarda, görme seviyesinde artma, florosein anjiyografide sızıntıda azalma, optik koherent tomografi (OCT)'de santral retina kalınlığında azalma ve ödem miktarında %90'lara varan azalma göstermiştir [38-40].

2.1.3.1. Göz Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Anti-VEGF Ajanlar

Günümüzde Amerika Birleşik Devletlerinde, göziçi kullanım için üç anti-VEGF ajanı FDA (Federal Drug Administration) onayı almıştır: Pegaptanib sodyum (Macugen; Eyeteck

Pharmaceuticals, Inc, New York NY), Ranibizumab (Lucentis, Genentech Inc, South San Francisco, CA), Aflibercept (VEGF-Trab (Eylea) , Regeneron, Tarrytown, New York, USA). Diğ er bir ilaç bevasizumab, (Avastin; Genentech Inc, South San Francisco, CA) metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli olmayan akciğ er kanseri, ve metastatik meme kanseri i in FDA onayı olan ama tüm dünyada göz hastalıkları uzmanları tarafından, KNVM tedavisinde off-label (ruhsatlı, endikasyon dışı) olarak kullanılan bir ilaçtır [41,42].

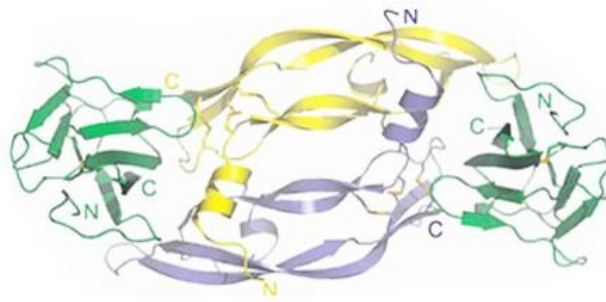
2.1.3.1.1. Bevasizumab haricinde kullanılan ilaçlar

Pegaptanib VEGF 165 izoformuna yüksek spesifisiteyle bağlanabilen diğ er izoformlara bağlanamayan bir ajandır. Pegaptanib ve Ranibizumabı, birbirlerinden ayıran en önemli özellik, bağlanma bölgeleri ve buna bağlı olarak farklı izoformlara olan afiniteleridir.

Kimerik bir molekül olan **Ranibizumab** tüm tanımlanmış VEGF isoformlarına bağlanabilen bir antikör fragmanıdır. Daha az antijenik olması i in bağlanmayan kısmı insan kkenliyen, anti-VEGF'e bağlanan yüksek afiniteli epitopu fare kökenlidir. VEGF Trab, rekombinant kimerik VEGF füzyon proteinidir. Diğ er anti VEGF ajanlardan farklı olarak VEGF-A'nın yanısıra diğ er tüm VEGF alt gruplarına ve VEGF reseptörlerine bağlanabilen bir ilaçtır.

2.1.3.1.2. Bevasizumab

Bevasizumab, tam boyutlu, VEGF-A'nın tüm izoformlarına etki eden, humanize monoklonal antikrdur ve 149 Kd ağırlığında rekombinan bir IgG molekülüdür (şekil 2.4).



şekil 2.5.

şekil 2.4. Avastinin üç boyutlu yapısı [41]

Bevasizumab 6.2 PH değerinde, renksiz, berrak, sterile zelti formudur. Orginalde intravenöz kullanım i in tasarlanmıştır ve 100 mg ve 400 mg etken madde içeren 4ml ve

16ml'lik (25 mg/ml) tek kullanımlık preservansız bevasizumab formları mevcuttur [41,42] Bevasizumab VEGF-A'nın tüm izoformlarının reseptör bağlayan ünitesine bağlanabilir. Böylece, VEGF-A'nın endotel hücre yüzeyinde yer alan reseptörü ile etkileşimini bloke ederek endotel hücre proliferasyonu ve yeni damar oluşumuna sebep olan hücre içi sinyal iletimini başlatmasını engeller [31].

2.1.3.2.KNVM Tedavisinde anti-VEGF Tedavilerin Etkinliği

KNVM tedavisinde anti-VEGF tedavisini değerlendiren çalışmaları incelendiğinde, antivasküler ajanların doz, tedavi etkinliğinin değerlendirildiği çok sayıda evre 1 düzeyde çalışma olmakla birlikte özellikle, özellikle 3 çalışmanın diğer çalışmalarda kaynak olarak kullanıldığı izlenir. Bu üç çalışma şunlardır:

VISION = VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization [37]

ANCHOR=Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classical CNV in AMD [43]

MARINA=Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab in the treatment of neovascular AMD [44]

Bu çalışmaların sonuçları kısaca değerlendirildiğinde, Vision çalışmasında, intravitreal pegaptanib sodium uygulamasının, neovasküler YMD hastalarında, görme kaybını yavaşlattığı, tedavi alan hastaların %70'inde 15 harften daha az görme kaybı gelişirken, kontrol grubunda bu oranının %50 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca intravitreal pegaptanib sodium tedavisi alan hastaların %6'sında en az 15 harf görme artışı olurken bu oran kontrol grubunda %2 olarak bildirilmiştir. Fundus Florosein Anjiografi (FFA)'da da, tedavi edilen grupta hem KNVM'nin total alanda küçülme hem de sızıntı miktarında azalma izlenmiştir [37]. MARINA ve ANCHOR çalışmalarında ise ranibizumab tedavisinin, tüm YMD subtiplerinde görme kaybını azalttığı ve görme seviyesini arttırdığı bildirilmiştir [43,44]. ANCHOR çalışmasında ranibizumab tedavisi verteporfin fotodinamik (PDT) tedavi ile karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar bildirilmiştir. FFA incelemelerinde de, hem MARINA ve hem ANCHOR çalışmasında toplam ve ortalama KNVM alanında, KNVM'den sızıntı miktarında, seroz retina dekolmanı miktarında ve subretinal fibrosis gelişimde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma bildirilmiştir.

Intravitreal bevasizumab halen tüm dünyada off-label olarak kullanılmaktadır ve etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendiren evre 1 çalışma yoktur. Bununla birlikte bevasizumab 2006 yılının başlarından itibaren çoğu retina uzmanı tarafında YMD tedavisinde ilk tercih olarak kullanılmaktadır ve literatürde bevacizumab tedavisi ile ilgili çok sayıda evre 2 ve 3 yayın

mevcuttur[45]. Bevacizumab neovasküler AMD tedavisinde ilk olarak intravenöz uygulama olarak denenmiş (5mg/kg) ve kısa dönemde iyi sonuçlar bildirilmiştir [46,47]. Fakat sistemik yan etkiler açısından daha güvenilir olması ve tedavi sayısının daha az olması açısından intravitreal uygulamalar tercih edilmiştir.

İntravitreal bevasizumab uygulamasına ait ilk klinik çalışmada, AMD'ye sekonder reküren KNVM gelişmiş ve daha önce pegaptanib, fotodinamik tedavi ve triamsinolon asetonit tedavisi almış bir hastada, tek doz 1 mg intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrası, uygulamadan 1 hafta sonra, santral retina kalınlığında azalma ve subretinal sıvıda emilime paralel olarak görme seviyesinde artma izlenmiştir [43]. Daha sonra intravitreal bevasizumab uygulamaları konusundaki pek çok prospektif ve retrospektif çalışma, tedavi edilen hastalarda, görme seviyesinde artma, floresein anjiyografide sızıntıda azalma, OCT'de santral retina kalınlığında azalma sonuçlarını vermiştir [38-40, 48]

İlk büyük bevasizumab tedavi serilerinden birinin rapor edildiği çalışmada, subfoveal KNVM'si olan ve 1.25 mg (0.05 ml) intravitreal bevacizumab tedavisi alan 81 göz incelenmiştir. Bu gözlerin %80'i daha önce pegaptanip, PDT veya her ikisini de almıştır. 3 ay sonra tedavi alan grupta merkezi retina kalınlığı, ortalama 340 µ'dan, 213µ'a düşmüş ve hastaların %38.3'ünde snellen eşeline göre 2 veya daha fazla sıra artış izlenmiştir [49].

Bu çalışmaları değerlendirirken gözönünde bulundurulması gereken önemli bir nokta da burada tedavi edilen gözlerin çoğunun daha önce tedavi edilmiş olmasıdır. AMD tanısı ile bevasizumab tedavisi alan 50 olgunun incelendiği bir çalışmada, daha önce herhangi bir tedavi almamış olguların tedaviye cevabının daha önce başka bir tedavi almış olgulara oranla daha iyi olduğu sonucunu vermiştir [50].

Anti VEGF ajanların KNVM tedavisinde uygulanması ile elde edilen anatomik ve fonksiyonel başarı, patolojik miyopi, anjioid streak, diabetik retinopati, retinal ven kök ve retinal ven dal tıkanıklığı gibi angiogenezeyle seyreden pek çok hastalıkta da anti VEGF ajanların uygulamasının kullanımına yolaçmıştır [51]. Son on yıldır giderek artan anti VEGF uygulamaları sonucunda anti VEGF ajanlar günümüzde, ön segmentte ve arka segmentte angiogenezeyle seyreden 50'den fazla göz hastalığında etkinliği gösterilmiş ve tüm dünyada göz hekimlerinin sıklıkla uyguladığı tedavi seçenekleridir [52].

2.1.3.3. Anti Anjiyogenik İlaçların Göze uygulanmasında geneleksenel Yöntemler

Göze ilaç uygulamalarda hedef, göz içinde hedef dokularda, güvenli bir uygulama yöntemi ile istenen tedavi edici ilaç dozunun sağlanmasıdır [53]. Halen bu amaçla göz ilaçları temel dört farklı yolla uygulanmaktadır [54-56]:

- a-) Topikal (damla, merhem, jel formları) uygulama
- b-)Peribulber (göz çevresine yapılan) uygulamalar (subtenon, subkonjuktival gibi)
- c-) İntravitreal (direk göz içine yapılan) uygulamalar
- d-) Sistemik uygulamalar (ağızdan ve damar içine uygulama)

Yukarıda da ifade edildiği gibi, göze ilaç verirken hedef, istenen dokularda istenen ilaç konsantrasyonunun sağlanmasıdır ve bunun hastaya en az zarar veren, yan etkisi en az olan yöntemle yapılabilmesidir. Maalesef bu hedef henüz tamamen yakalanamamıştır. Göz, sahip olduğu kompleks anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri sebebiyle tüm yabancı cisimlere ve ilaçlara karşı çok dirençlidir, bu nedenle halen uygulanmakta olan ilaçların oküler bariyerleri aşarak, göz içi dokularda istenen terapötik konsantrasyona ulaşmasında çok ciddi zorluklarla karşılaşmaktadır [57,58].

Geleneksel damla formundaki tedavilerle arka segmentte, etkin bir ilaç dozu elde etmek mümkün değildir Damla formunda göze uygulanan ilaçlar, gözün içine giremezler, daha damlatıldıkları andan itibaren gözün koruma mekanizmaları sayesinde hemen gözden uzaklaştırılmaya başlarlar ve çok kısa bir sürede gözden uzaklaştırılırlar [59]. Gözün yüzeysel hastalıklarında kullanılsalar da göz içindeki hastalıklarda hiçbir kullanım alanları yoktur. Perioküler ilaç uygulamalarında, özellikle transsklral ilaç uygulamalarında, ilaç gözün içine değil de göz çevresindeki dokulara enjekte edilir, böylece gözden ilacı uzaklaştıran mekanizmalardan bazılarının bypass edilmesi hedeflenir. Fakat burada ilaç göz içine ulaşmak için, bazı göz tabakalarını yine kendisi aşmak zorunda olduğundan, buralarda elimine edilir ve çok az bir kısmı gözün içine ulaşabilir (şekil 2.5). Bu nedenle maalesef istenen tedavi edici dozun elde edilmesi zordur. Ama direk olarak göz içine iğne yapılmadığı için bu yöntem güvenilir ve hasta için daha kabul edilebilir bir yöntemdir.

Halen uygulanmakta olmakla birlikte, istenen doz yakalanamadığından daha az tercih edilmektedir [60-61]. Fakat paraoküler uygulamaların etkinliğini arttırmak için dünyada yoğun çalışmalar yapılmaktadır [62-65].

Üçüncü yol olan intravitreal yolda ilaç direk olarak hastanın gözünün içine olarak uygulanır. Halen klinik uygulamalarda en sık uygulanan yöntem bu yöntemdir. Burada ilaç direk olarak göz içine verildiğinden istenen yüksek ilaç konsantrasyonları kolaylıkla sağlanır fakat uygulamanın şeklinden kaynaklanan çok ciddi zorluklar ve yan etkiler vardır[66-69].

Öncelikle göz içine iğne yapmak hasta için çok tedirgin edici ve rahatsızlık verici bir uygulamadır. Bunun yanında göz içine direk enjeksiyon yapıldığında, enfeksiyon gelişimi, katarakt, retina dekolmanı, üveit gibi çok ciddi ve göz kaybına kadar yolaçabilecek ağır komplikasyonların gelişme riski mevcuttur. Diğer bir önemli husus da, burada tedavi edilmeye çalışılan göz hastalıkları genelde kronik hastalıklardır. Bu nedenle uygulanan



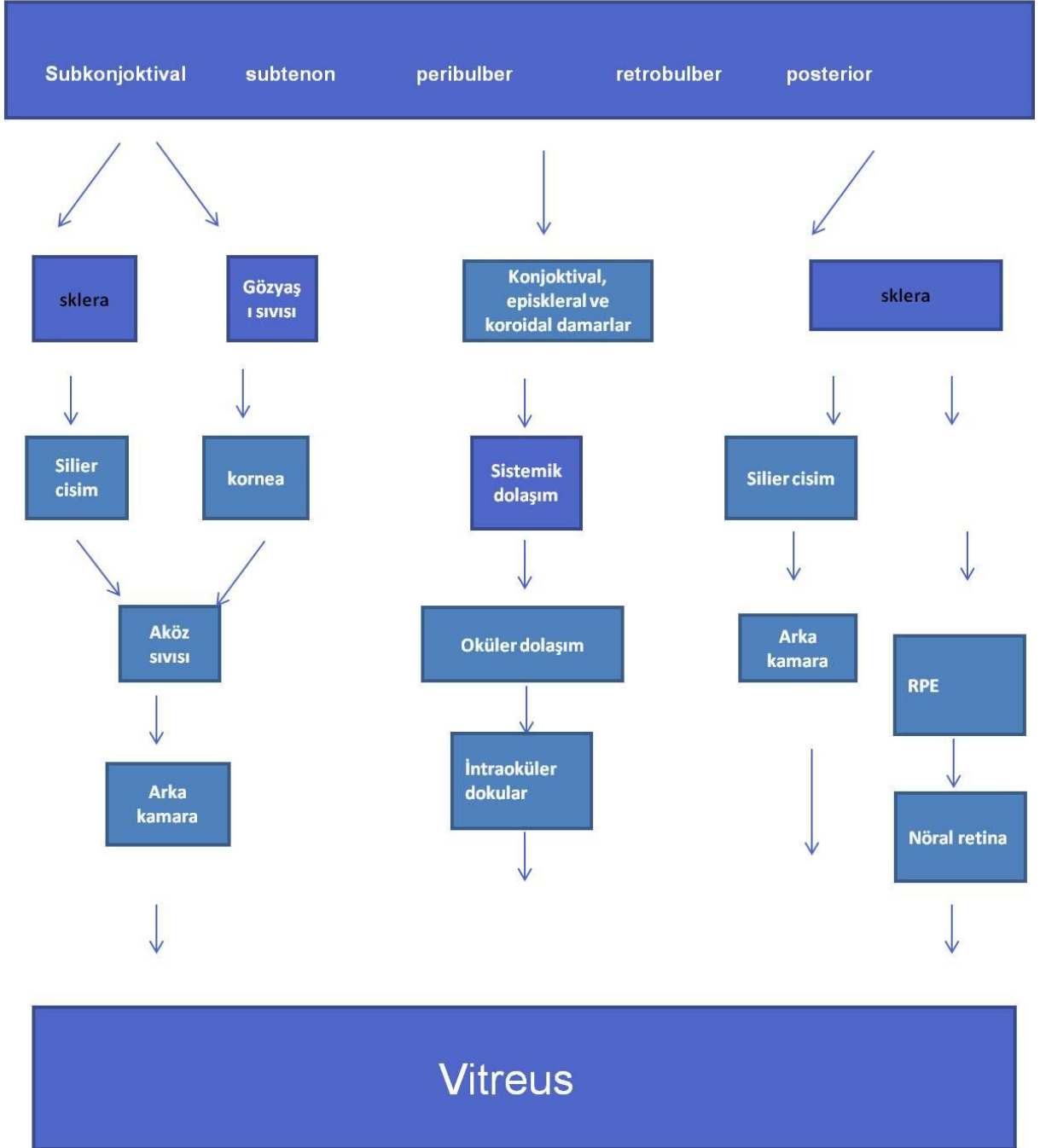
Şekil 2.5. Transskleral geçişteki tabakalar [70]

tedavi belli periyotlarda birçok kez tekrarlanmak zorundadır. Böyle riskli uygulama yollarının tekrarlanması da bir diğer önemli zorluktur. Tüm bu yan etkilerinden dolayı intravitreal ilaç uygulamaları, riskli yöntemlerdir fakat istenen doz kolaylıkla elde edilebildiğinden halen en sık tercih edilen yöntemdir.

Sistemi tedavilerin kullanımında da, gözde istenen tedavi edici dozun sağlanması için tüm vücuda çok yüksek oranda ilaç vermek gerekmektedir bu da doğal olarak vücudun diğer doku ve organlarında istenmeyen yan etkilerin ve toksik reaksiyonların gelişmesine sebep olmaktadır [71-72]. Bu nedenle sistemik uygulamalar sadece nadiren kısa süreli tedavilerde tercih edilmektedir.

2.2.Perioküler İlaç Uygulamaları

Gözün arka segmentine ilaç ulaştırmak için subkonjoktival, sub-tenon, peribulbar, posterior jukstaskleral ve retrobulbar gibi pek çok farklı perioküler ilaç uygulama yöntemleri kullanılabilir. Perioküler olarak uygulanan ilaç üç farklı yolla vitreusa ulaşabilir (şekil 2.6). İlk yol ön kamaradan vitreusa geçiş yoludur. Bu yolla ilaç ya sklera veya siliyer cisimden geçerek direk olarak veya konjoktivadan gözyaşı ve korneaya geçerek indirek olarak ön kamaraya ulaşır. Ön kamaradaki ilaç daha sonra arka kamaraya ve vitreusa geçer. İkinci yol ise ilacın konjoktival, episkleral ve koroidal damarlar aracılığı ile sistemik dolaşıma katılmasının ardından sistemik dolaşımda dilue olduktan sonra yine kan akımı yoluyla göze geçmesidir. Üçüncü yol olan direk yol ise ilacın sklera ve alttaki dokuları geçerek vitreusa ulaşmasıdır. Literatürde subkonjoktival enjeksiyondan sonra farklı yolların vitreusa geçen ilaç miktarı üzerindeki katkılarını araştıran pek çok çalışma vardır [73,75]. Bu çalışmalar vitreusa ilaç geçişinde en etkili yolun direk geçiş olduğunu göstermiştir. Transskleral ilaç uygulamalarında da hedef için ilacın sklera ve alttaki dokulardan geçerek vitreusta hedeflenen ilaç konsantrasyonu sağlayacak düzeye ulaşabilmesidir [76]. Dolayısıyla transskleral geçiş konusunda yapılan çalışmalarda kastedilen yol sklera, koroid, retina ve vitreustan oluşan yapıların oluşturduğu direk yoldur.



Şekil 2.6: Perioküler alandan vitreus ve posterior oküler yapılara transskleral yolla ilaç geçiş yolları [77]

Bunun yanında, maalesef henüz klinik olarak intravitreal uygulamalar kadar etkili bir transskleral ilaç formu mevcut değildir [60,61]. Çünkü transskleral uygulamalarda ilacın retinaya ulaşması için, sklera, bruch membranı-koroid, retina pigment epiteli gibi pek çok farklı dokuyu geçmek zorunda kalmaktadır. Tüm bu katmanlardan geçiş esnasında, ilaç sürekli olarak her bir tabakada elimine olduğundan, ilaç konsantrasyonları skleradan iç

katmanlara doğru hızlı bir şekilde azalmakta ve retinaya ulaşabilen ilaç konsantrasyonu, etkinlik için gerekli dozun çok altında olmaktadır. Transskleral uygulanan ilaçlar nöroretinaya ulaşması için, pek çok statik ve dinamik faktörleri aşmalıdır [76]. Halen transskleral uygulamaların klinik etkinliği ve kullanım yaygınlığı intravitreal uygulamalara oranla çok düşük olmakla birlikte, bu uygulamaların etkinliğinin artırılması konusunda yoğun çalışmalar devam etmektedir.

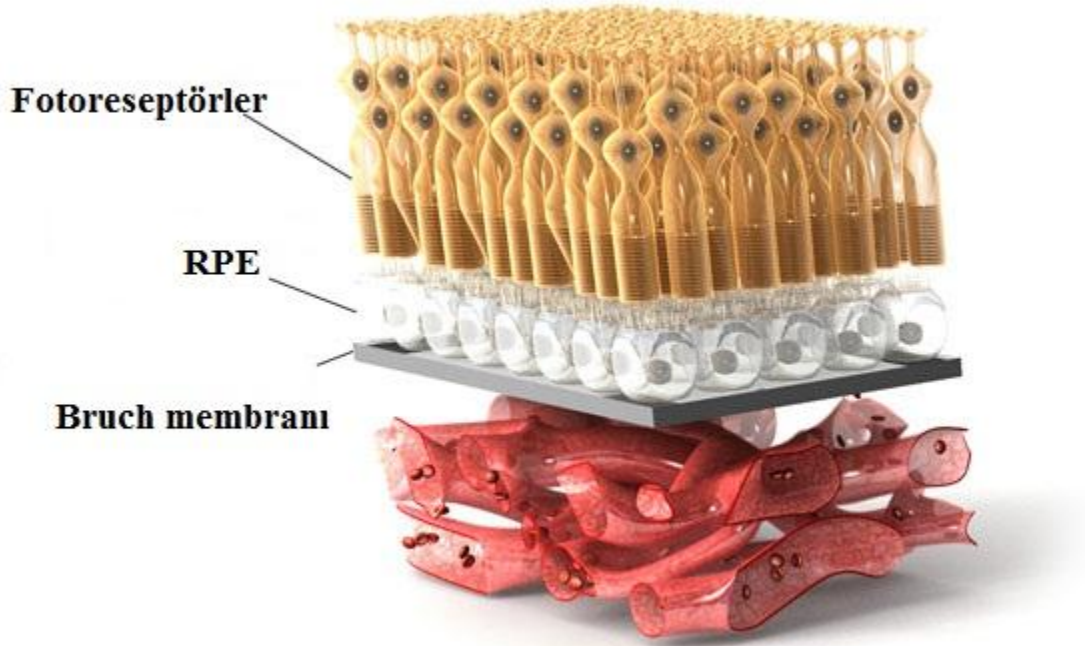
2.2.1. Transskleral Bariyerler ve Özellikleri

Bu konudaki literatür incelendiğinde, transskleral ilaç uygulamalarında, karşılaşılan bariyerlerin üç başlık altında toplandığı görülür [77] (şekil 2.7).

2.2.1.1. Statik bariyerler

2.2.1.2. Dinamik bariyerler

2.2.1.3. Metabolik bariyerler



Şekil 2.7. Transskleral geçişteki statik bariyerler
(sklera, koroid, retina pigment epiteli) [78]

2.2.1.1. Statik Bariyerler

İlaç moleküllerinin transskleral olarak, retinaya difüzyonuna karşı bariyer oluşturan dokular; sklera, bruch membranı-koroid (BK) ve retina pigment epiteli (RPE) statik bariyerleri oluştururlar [77].

2.2.1.1.1. Sklera

Gözün beyaz kısmı olarak tanımlanabilen sklera, göz içindeki hassas tabakaları ve hücreleri örten ve koruyan fibröz bir dokudur. Önde kornea ile arkada optik sinir dura kılıfları ile devamlılık gösterir. Sklera, korneanın devamıdır, ikisi de kolajenden oluşmuş dokulardır ve bu kolajenlerin diziliminin farklı olmasından dolayı kornea şeffaf bir dokuyken sklera opaktır. Sklera korneaya oranla daha hidrate durumdadır (%65-70). Korneanın temel fonksiyonu ışığı en yüksek oranda geçirebilmek için şeffaflık olurken, skleranın temel fonksiyonu dış etkenlere karşı ve göz dışı kasların göz küresinde oluşturduğu çekme kuvvetine karşı koruyuculuk sağlayabilmek için sert ve güçlü olmaktır.

2.2.1.1.1.1. Skleranın Yapısı

Sklera, glikozaminoglukan (GAG) matrikse gömülmüş kolajen liflerinden oluşmuştur ve yapısında az miktarda fibroblast ve elastik lifler bulunur. Skleranın temel bileşeni kolajendir, kuru ağırlığının %75'ini kolajen oluşturur. Skleranın yapısında bulunan kolajen temel olarak tip 1 [79]. Bunun yanında skleranın yapısında Tip III, V ve tip VIII ve XII kolajenin de yer aldığı gösterilmiştir [80-83]. Lamina kribroza ve koroidin basal membranları ise tip IV kolajen içerirler [84]. Kolajen fibrillerin çapı oldukça heterojendir (25-300 nm) ve çapları 500-600 nm civarında olan demetler şeklinde organize olmuşlardır. Sklera yüzeyinde çapları 80-140 nm arasında değişen retiküler bir dizilim gösterirken içte yer alan lifler düzensiz ramboid bir patern gösterirler [85]. Kolajen demetleri 35-75 nm 'lik makroperiyositelere ve 11 nm'lik mikroperiyositelere sahiptir. Santral korneadan periferde doğru gidildikçe lif yapısı santral korneadaki lameller, tek tip düzenli bir dizilim gösteren liflerden, sklerada değişik çaplarda dallanmış, içiçe geçmiş dizilim gösteren liflerle doğru değişir. Skleradaki kolajen liflerin oryantasyonunda kendi içinde de bölgesel farklılıklar vardır. Ekvator bölgesindeki liflerin çapları daha heterojendir (25-300 nm) ve bu bölgede yer alan lifler rastgele oriyente olmuş lameller demetler şeklinde dizilmişlerdir. Skleranın yapısında yer alan GAG'ların yapısı yer aldığı bölgeye göre farklılık gösterir. Peripepiller sklera dermatan sülfat açısından zengindir. Ekvator bölgesi yüksek oranda hyaloronik asit içerirken postekvatoryal bölgede kontroidin sülfat oranı fazladır. İnce miyopik skleralarda GAG konsantrasyonu azalmıştır. Sklera boyunca difüzyon perivasküler alanlarda, jel-

benzeri mukopolisakkarid aköz medyada ve sklera matriks yapısında gerçekleşir.

Skleranın kalınlığı limbus bölgesinde 0.53 mm, ekvatorda 0.39 mm optik sınır komşuluğunda ise 0.9-1 mm kadardır [86].Skleranın toplam yüzey alanı, 16.3 cm²'dir.

2.2.1.1.1.2. Skleral Geçirgenlik

Skleranın geniş yüzey alanı, intraoküler ilaç taşınması için çok önemli bir avantajdır. Bunun yanında hidrasyon derecesinin yüksek olması, hiposelüler olması, az sayıda proteolitik enzim içermesi ve geçirgenliğinin zamanla azalma göstermemesi gibi özellikleri de skleraya ilaç taşınması konusunda avantaj sağlayan diğer sebeplerdir.

Skleranın geçirgenliği üzerine yapılan çalışmalar, skleranın korneaya yaklaşık bir geçirgenliğe sahip olduğunu göstermektedir [87]. Korneal stromada olduğu gibi sklerada da ilaç geçişi aköz ortam boyunca pasif difüzyonla olmaktadır. Skleranın yapısı %70 oranında su, proteoglikanlar ve sıkı demetler halinde kolajen liflerden oluşmaktadır. Difüzyon yolunun, fibriller arasındaki proteoglikanların oluşturduğu jel-kıvamında aköz ortam sıvısından olmaktadır. Dekstran, değişen ağırlıklarda polietilen glikol molekülleri, antibiyotikler, oligonukleotidler, retinal antianjiogenik moleküller, ve lipofilik moleküller gibi çok değişik moleküllerin skleral geçirgenliği ölçülmüştür. Skleral geçirgenliğe etki eden pek çok önemli faktör vardır. Skleral geçirgenliğin moleküler ağırlığa bağlı olarak değiştiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir [87-89]. Fakat moleküler yarıçap, moleküler ağırlıktan daha belirleyici olmaktadır, globüler yapıda olan proteinler, aynı molekül ağırlığına sahip olmalarına rağmen, linear yapıda olan dekstranlara göre tavşan sklerasında daha yüksek geçirgenliğe sahiptir [88].

Lipid çözünürlüğün artması hem tavşan hem de insan sklerasında geçirgenliği azaltmaktadır [90]. Skleranın hidrasyonu, kriyoterapi uygulaması, transskleral diod lazer cerrahi inceltme ve göz içi basıncındaki değişiklikler gibi pek çok faktörün skleral geçirgenlik üzerine etkileri araştırılmıştır Skleranın hidrasyonunun ve skleranın cerrahi olarak inceltilmesinin skleral geçirgenliği arttırdığı bildirilirken kriyoterapi uygulaması ve transskleral diod lazer uygulamalarının skleranın geçirgenliğinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir [74,86].

2.2.1.1.2. Bruch membran-Koroid (BK) ve RPE

Bruch membranı ve koroid dokularını birbirinden ayırmak zor olduğundan, iki tabakanın geçirgenlik çalışmaları birlikte yapılmaktadır [91].

2.2.1.1.2.1. Bruch membranının Yapısı

Bruch membran 7 µ kalınlığında, koryokapillaris RPE'den ayıran ince bir zardır. Bruch membranı beş tabakadan oluşur:

RPE basal membranı

İç gevşek kolajen alan

Esnek liflerin oluşturduğu orta tabaka

Dış gevşek kolajen alan

Koryokapillaris endotelinin basal membranı

2.2.1.1.2.2. Koroidin Yapısı

Sklera ve retina arasında yer alan damar ve pigment açısından zengin dokudur.

2.2.1.1.2.3. RPE'nin Yapısı

RPE, bruch membranı ile retina arasında bulunan, nöroekdodermal kökenli, tek katlı, altıgen şekilli, küboidal hücre tabakasıdır. RPE hücreleri alçak ve yaklaşık 16 µm çaplı hücrelerdir. Komşu hücrelerin dış yüzeyleri ile yakın temastadırlar ve apikal kısma yakın olan sıkı bağlantı yapıları (zonula okludans) ile birbirine tutunmuşlardır. Bu sıkı bağlantı yapıları dış retinal kan-oküler bariyeri oluşturur.

2.2.1.1.2.4. Bruch membran-Koroid ve RPE Geçirgenlik Çalışmaları

Bruch membranı ve koroid dokularını birbirinden ayırmak zor olduğundan, iki tabakanın geçirgenlik çalışmaları birlikte yapılmaktadır [91]. RPE ise kolayca ayrılabilirdiği için bu tabakanın geçirgenlik çalışmaları bağımsız olarak yapılabilmektedir. Bir çalışmada floresen işaretli pigment epitel kökenli faktörün (50 kDa) RPE geçirgenliğini ölçmek için kültüre edilmiş maymun RPE hücreleri kullanılmıştır. Sıkı kavşakların (tight jnx) varlığına rağmen protein kültüre edilmiş RPE hücrelerinden geçiş göstermiştir [92]. Hidrofilik karboksiflorosein ve FITC-dextranla yapılan BK kompleks ve RPE geçirgenlik çalışmalarında geçirgenliğin molekül yarı çapındaki artışla orantılı olarak azaldığı gösterilmiştir [93]. Köpeklerde yapılan bir çalışmada BK kompleksinin 150 kDa büyüklüğündeki moleküllere geçirgen olduğu gösterilmiştir [94]. Lipofilik özelliğin artması BK kompleksinde geçirgenliği azaltırken, RPE'inde arttırmaktadır.

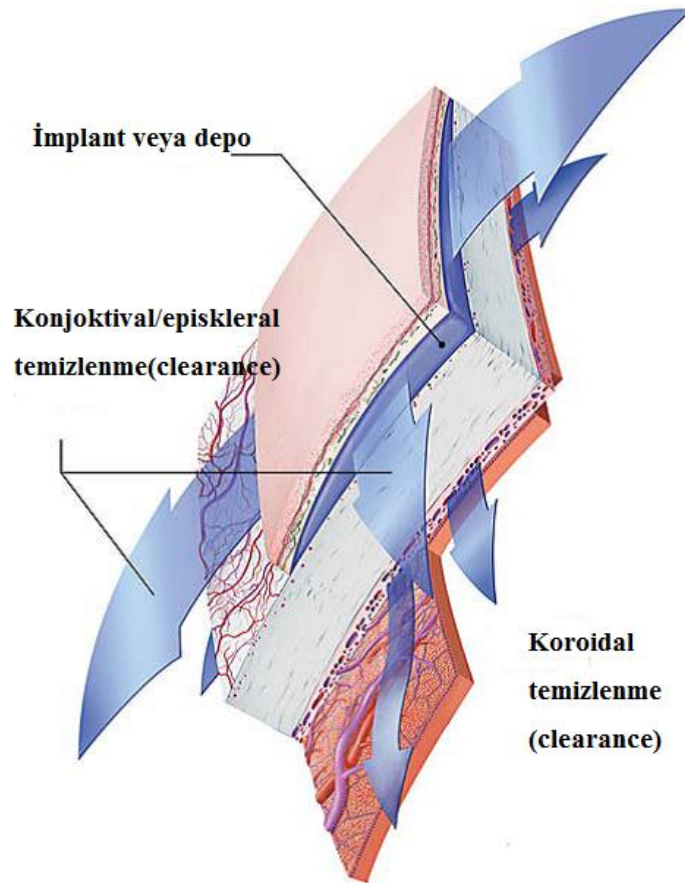
RPE'ine doğru pasif transportla geçen moleküller dışarı (retina koroid) ve içeri (koroid RPE) doğru aynı geçirgenliği gösterirken, aktif transportla geçen moleküller iki yönde farklı geçirgenlik gösterirler.

2.2.1.2. Dinamik Bariyerler

Sadece *in vivo* çalışmalarda değerlendirilebilen, *ex-vivo* çalışmalarda değerlendirilemeyen konjuktival/episkleral akım, koroidal akım, uveoskleral akım, RPE transport proteinleri, hidrostatik ve onkotik basınç, metabolik bariyerler ve organik iyon pompaları dinamik bariyerleri oluşturur.

2.2.1.2.1. Konjuktival/Episkleral akım

Subkonjuktival akım, perioküler alana enjekte edilen ilacın uzaklaştırılmasında önemli rol oynar (şekil 2.8). Yapılan çalışmalarda subkonjuktival alana enjekte edilen maddelerin servikal lenf nodunda izlendiği bildirilmiştir. Tavşanlarda subtenon enjeksiyon öncesi koroidal an akımı ve lenfatiklerinin inhibe edilmesi için konjuktival pencere uygulamasının, tavşanlarda ilacın vitreusa geçişini arttırdığı gösterilmiştir [95].



Şekil 2.8. Transskleral ilaç uygulamalarında konjuktiva/episklere ve koroiddeki temizlenme (clearance) yolları [96]

2.2.1.2.2. Koroidal Akım

Koroiddeki hızlı kan akımı sebebiyle koroidal akım transskleral geçişte ilaç moleküllerinin uzaklaştırılmasında çok etkili olarak düşünülse de, yapılan çalışmalar bu beklentiyi

desteklememiştir. Transskleral uygulama öncesi koroide kriyo uygulaması ile koryoretinal skar oluşturularak koroid akımın önlenmesi, transskleral geçiş miktarında bir artışa sebep olmamıştır. Bu nedenle bu çalışmalar koroidal akımın transskleral geçiş üzerinde belirgin bir etkisinin olmayabileceğini göstermektedir.

2.2.1.2.3. Uveoskleral Akım

Uveoskleral yol direk ve invaziv olmayan bir yöntemle değerlendirilemediğinden, bu yolun ilaç eliminasyonundaki etkisi çok net olarak açıklanamamıştır. Uveoskleral yol insanlarda tüm aköz drenajına katkısı %4 ile 60% arasında değişmektedir [96]. Uveoskleral yolun aköz drenajındaki rolünün değişken olması, onun transskleral geçişte de beklenenden daha yüksek rol oynadığının göstergesi olabilir.

2.2.1.2.4. Hidrostatik ve Osmotik Basınç

Koroid zengin vaskülarizasyona sahip, protein içeriği yüksek bir yapıdır. Tavşanlarda koroid basıncı 12-14 mm olarak ölçülmüştür [97]. Koroid sistemik basınca yakın bir osmotik basınca sahipken vitreus basıncı sistemik basınçtan çok düşüktür (0'a yakındır). Koroid ve vitreus arasındaki bu basınç farkı koroidden vitreusa doğru sıvı alışına neden olur.

2.2.1.2.4. RPE Taşıyıcı Proteinler

RPE iyonların ve moleküllerin subretinal alana geçişini düzenlemekle görevlidir. RPE üzerinde, iyon taşıyıcılar, aminoasit taşıyıcılar ve ilaç pompaları gibi pek çok taşıyıcı protein eksprese edilir. Taşıyıcı proteinler ilaçları koroide taşıdıklarından, transskleral geçiş azaltabilirler. Bu konuda yeterli çalışma olmamakla birlikte, transskleral geçişte RPE'de ilaç düzeyinin düşük olması, taşıyıcı proteinlerin bariyer görevi gördüğü tezini desteklemektedir.

2.2.1.3. Metabolik Bariyerler

Göz insan vücudunun atmosfere açık olan parçasıdır. Bu nedenle koruma mekanizması olarak göz, oküler yapılara zararlı olabilecek yabancı cisimleri parçalayabilecek koruma mekanizmalarına sahiptir. Pek çok göz dokusunda ilaç metabolize eden enzimler bulunmakla birlikte bu mekanizmaların en yoğun olduğu yapılar silier cisim ve RPE'dir. Bu dokularda yüksek oranda koruyucu enzim bulunmasının sebebi bu dokuların sistemik dolaşım ile gelen zararlı maddelerin parçalanmasında rol almalarıdır. Transskleral geçişte de RPE'deki metabolik enzimler ilaçların parçalanmasında ve geçişin azalmasında rol oynayabilir.

2.2.2. Transskleral İlaç Geçişlerinin Etkinliği

Subtenon enjeksiyonların intravitreal uygulamaya oranla iki önemli avantajı

1-Uygulama sırasında göziğine girilmediği için düşük komplikasyon riskine sahip olması

2- Uygulamanın daha az invaziv olması nedeniyle hasta uyumunun daha yüksek olması ve tedavinin tekrar edilebilirliğinin fazla olması olarak özetlenebilir.

Halen, klinik olarak intravitreal uygulamalar kadar etkili bir transskleral ilaç formu mevcut değildir [61,62]. Çünkü transskleral uygulamalarda ilacın retinaya ulaşması için, yukarıda anlatıldığı pek çok farklı bariyeri geçmek zorunda kalmaktadır. Tüm bu bariyerlerden geçiş esnasında, ilaç sürekli olarak her bir tabakada elimine olduğundan, ilaç konsantrasyonları skleradan iç katmanlara doğru hızlı bir şekilde azalmakta ve retinaya ulaşabilen ilaç konsantrasyonu, etkinlik için gerekli dozun çok altında olmaktadır. Bu nedenle transskleral ilaç uygulamaları güvenilir ve etkin bir yöntem olmasına rağmen, günümüzde yaygın olarak sadece steroid tedavileri için yaygın olarak tercih edilmektedir [98-101], intraoküler tümörlerin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların uygulanmasında da etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır [102-104]. Halen subtenon uygulamaların klinik etkinliği ve kullanım yaygınlığı intravitreal uygulamalara oranla çok düşük olmakla birlikte, ilaç taşıma sistemleri konusunda yapılan pek çok çalışma ile transskleral geçişin etkinliği arttırılmaya çalışılmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin kullanılması diğer alanlarda olduğu gibi bu alanda da pek çok farklılığı ve üstünlüğü beraberinde getirmiştir [105].

Nanoteknoloji bazlı ilaç taşıma sistemlerin kullanılması, ilaç moleküllerinin büyüklük, yük, yüzey özellikleri gibi parametrelerinin modifiye edilebilmesini sağlayarak ve istenen özellikleri taşıyan ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezlenmesini imkan vermektedir [106]. Bu veriler ışığında, nanoteknolojik yöntemlerle hazırlanan ve istenen özelliklere göre modifiye edilen ilaç taşıma sistemlerinin kullanılması ile transskleral uygulamalarda, etkin tedavi dozunun yakalanmasını son zamanlarda üzerinde çok çalışılan önemli bir konudur.

2.2.2.1. Antianjiyojenik Tedavide Karşılaşılan Sorunlar



Şekil 2.9. İntravitreal enjeksiyonun şematik çizimi[107]

İntravitreal uygulanan anti VEGF tedavilerinin en önemli komplikasyonu, endoftalmi, retina dekolmanı, üveit ve katarakt gelişimidir. İntravitreal anti VEGF uygulaması sonrası retina dekolmanı, endoftalmi gibi lokal komplikasyonların gelişme riski, herhangi bir intravitreal uygulama sonrası lokal komplikasyon gelişme riski ile aynıdır. Burada komplikasyon gelişiminde esas etken uygulama yoludur [66-69] (şekil 2.9). Kanser tedavilerinde intravenöz bevasizumab uygulamalarından sonra, hipertansiyon, artmış tromboemboli riski, gastrointestinal perforasyon, miyokard enfarktüsü ve ölüm gibi komplikasyonlar gelişmiştir. İntravitreal uygulamalardan sonra da serum bevasizumab düzeyleri yükseleceğinden, kanser tedavisinde izlenene benzer yan etkilerin gelişme riski vardır. Literatürde intravitreal enjeksiyon sonrasında gelişen pek çok sistemik bevasizumab yan etkisi bildirilmiştir [107-108].Özetle intravitreal anti-VEGF tedavilerinde retina dekolmanı, endoftalmi, katarakt ve üveit gibi ciddi komplikasyonlar gelişme riski olmakla birlikte bu risk, uygulamanın şekline bağlıdır. Ayrıca bu uygulamanın, tekrarlanmasının gerekmesi de hem komplikasyon riskini arttırmakta hem de hasta uyumunu düşürmektedir. Bu nedenle, intravitreal uygulamanın getirdiği bu yan etkileri azaltmak amacıyla, diğer lokal oküler ilaç uygulama yöntemleri gündeme gelmektedir. Bunlar arasında en yaygın

olarak kullanılan peribulber uygulamalardır. Peribulber uygulamaların etkinliğini arttırmak için pek çok farklı yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır [65]. Bunlar arasında üzerinde en fazla çalışılan sistemlerden biri de nanopartiküler sistemlerin kullanılmasıdır.

2.2.3. Gözde Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemlerinin Kullanılması

Nanoteknoloji 0.1-100 nm boyutlarındaki bilim ve teknoloji uygulamaları olarak tanımlanabilir [109]. Nanotıp, hastalıkların önlenmesi, tanısı, tedavisi ve insan sağlığının korunması için moleküler düzeydeki bilginin ve moleküler düzeydeki cihazların kullanılması olarak tanımlanabilir [110]. Nanoteknoloji uygulamaları elektronik, fizik kimya, bilgisayar bilimleri gibi pek çok bilim dalında olduğu gibi tıp ve eczacılık alanında da pek çok özgün uygulamanın gelişmesine ve çözümü mümkün olmayan konulara yeni çözümler üretilmesine sebep olmuşlardır. Tıp ve eczacılık alanında nanoteknoloji uygulamalarının en sıklıkla tercih edildiği konulardan biri nanoteknoloji bazlı ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesidir [111].

2.2.3.1. Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıma Sistemleri

İlaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde hedef, taşınan ilacın etkin ve güvenilir bir şekilde hedeflenen dokuya ulaştırılmasıdır. Başarılı bir ilaç taşıma sisteminin hedefi şu üç konuda etkin çözümler üretmektir:

- Etken maddeyi kontrollü bir şekilde salarak terapötik konsantrasyonu uzun süre korumak
- Organa veya dokuya özel hatta hastalığa özel hedeflendirmiş tedavi modaliteleri geliştirmek
- Ulaşılması güç olan organ ve dokulara ilaç taşınmasını sağlamak için yeni ve kullanılabilir uygulama yolları geliştirmek.

Bu hedeflerin sağlayabilecek özellikte ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilebilmesi için çok farklı teknolojiler kullanılmaktadır [112]. Nanoteknoloji bazlı ilaç taşıma sistemlerinin kullanılması da özellikle son iki dekada istenilen özelliklerde ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak tercih edilen yöntemlerden biridir [109-111].

Nanopartiküller boyutları, 1 ile 1000 nm arasında değişen polimerik parçacıklardır. Bu parçacıklar nanokabuklar ve nanoküreler olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Nanokabuklar merkezde bir boşluk ve çevrede onu saran polimerik bir membrandan oluşan küçük kapsüllerdir. Nanoküreler ise yoğun solid polimerik ağdan oluşan küçük monolitik kürelerdir. İlaç nanoküreler matrisine yüklenebileceği gibi yüzeyine de

bağlanabilir. Nanopartiküller son iki dekatta kornea epiteli gibi dokularda ilaç biyoyararlanımını arttırmak ve hedefleme yapmak için üzerinde en fazla çalışılan nano sistemlerdir.

Göz kendine has anatomik, biyokimyasal, fizyolojik özellikleri nedeniyle yabancı moleküllere ve ilaç uygulamalarına karşı çok korunaklıdır. İç ve dış retinal bariyerler sebebiyle retina ve vitreus sistemik dolaşımdan ayrılmışlardır. Göze uygulanan moleküllerde temel hedefler hem bariyerlerin etkin biçimde aşılırken, ilaçların göz dokularında çözünürlüğünün arttırılmasıdır [113,110].

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin oftalmik ilaçlarda kullanılmasının en önemli avantajları şöyle özetlenebilir [114].

- 1-İlaçların kontrollü bir şekilde uygulanmasının sağlanması
- 2-İlaç parçalanmasının en az düzeye indirilmesi
- 3-İstenmeyen zararlı yan etkilerin önlenmesi
- 4-İlaç biyoyararlanımının arttırılması
- 5-Hedeflenen alanda ilaç birikiminin arttırılması
- 6-İlaç geçirgenliğinin arttırılması

Nanopartiküllerin glokom [115,116] oküler enfeksiyonlar [117,118], oküler inflamasyonlar [119]ve oküler imün aracılı hastalıklar [120] gibi pek çok farklı göz hastalığında topikal veya lokal enjekte edilebilir sistemler olarak kullanılmaları konusunda çok yoğun araştırmalar yapılmaktadır. İlaç uygulamalarında başarıyı etkileyen faktörler ilaç yükleme kapasitesi, ilaç salım hızı ve kullanılan polimerin biyoyumluluğudur. Göze ilaç taşınmasında kullanılan nanopartiküler ilaç sistemlerinin başarısında en önemli faktörlerden biri polimer seçimidir. Günümüzde polimetilmetakrilat, polialkilsiyanoakrilat, polikaprolaktone, albümin, jelatin, polilaktik asit, kitosan ve Eudgarid gibi pek çok sentetik ve doğal biyoyumlu polimer göze ilaç taşınmasında kullanılmaktadır.

Kitosan sahip olduğu bioparçalanabilirlik, biyoyumluluk ve stabilite gibi özellikleri sebebiyle göz ilaç taşınmasında yaygın olarak tercih edilen bir materyaldir [121-123] .

2.2.3.1.1.Kitosanın Kaynağı, Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Kitosan, değişik derecelerde deasetile ve depolimerize edilmiş deasetile kitinlere verilen genel addir [124]. Kitin kabuklu deniz hayvanlarının dış kabuklarında, böceklerin üst derilerinde ve pek çok mantarın hücre duvarında bulunan doğal bir biyopolimerdir [125].

Kitosan glukozamin ve asetilglukozamin ünitelerinin her ikisine de sahip bir heteropolimerdir [121,122].Kitosan, polikasyonik, biyouyumlu ve biyobozunur olmasının yanısıra, mukoadhesiv ve geçirgenlik arttırıcı özelliklere sahip olması dolayısıyla mukozal yolla ilaç uygulamalarında en sık tercih edilen polimerlerden biridir [126-129].Yüksek molekül ağırlığına (yaklaşık 1400 Kd) sahip kitosan düşük molekül ağırlığına (500-800 Kd) sahip kitosanolara oranla daha iyi mukoadhesiv özellik gösterir. Bununla birlikte, görece olarak düşük molekül ağırlıklı kitosanların glutamat tuzları da iyi mukoadhesiv özelliğe sahiptir (25 – 50 kDa) [130]. Kitosan hem psödoplastik hem de elastik reolojik özelliklere sahiptir [131]. Kitosan biyouyumlu yapısı sebebiyle alerjik reaksiyonlara sebep olmaz. İnsan vücudunda, tamamen emilebilen zararsız amino gruplara parçalanır. İyonize radyasyon, buhar, sıcak uygulaması ve kimyasal yöntemler gibi pek çok farklı yöntemle sterilize edilebilir olması kitosanın klinik uygulamaları açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır [132].

Kitosan Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) Genel olarak Güvenli Kabul edilen (GRAS) maddeler sınıfında kabul edilmektedir. Japonya, İtalya ve Finlandiya'da da gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir [121,133, 134].

2.2.3.1.2.Kitosan Bazlı Taşıma istemlerinin Göze İlaç Taşınmasında Kullanılması

Kitosan sahip olduğu farklı ve özgün biyolojik özellikler, sebebiyle tüm dünyada farmasötik formülasyonların hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen bir polimerdir [135-137]. Kitosan geçirgenlik arttırıcı özelliğe sahip ve düşük toksisite riski taşıyan mukoadhesif ve biyobozunur bir polimerdir. Tüm bu seçkin biyofarmasötik özellikleri kitosanın sadece parenteral ilaç taşınmasında için değil oküler ilaç taşınması da dahil olmak üzere transmukozal yolla ilaç taşınmasında da taşıyıcı molekül olarak sıklıkla tercih edilmesine sebep olmaktadır [138-140].

Kitosanın göze ilaç taşınmasında yaygın olarak kullanılmasına sebep olan özellikleri incelendiğinde, kitosanın mukoadhesif karakteri ilk göze çarpan özelliktir. İlk olarak *ex vivo* çalışmalarla gösterilen bu özellik ilacın yüzeylere daha iyi yapışmasını sağlamak ve uygulama bölgesinde kalış süresini uzatmaktadır[121,141]. Diğer bir önemli özellikte kitosanın epitel hücreleri arasındaki sıkı kavşakları açabilmesinden veya parasellüler yollardan absorbe olabilmesinden kaynaklanan geçirgenlik arttırıcı özelliğidir. Bu özellik kitosan yüklü etken maddenin hedef dokulara ulaştırılmasında rol oynamaktadır [142,143].

Kitosanın psodoplastisitesi ve elastisitesi de hem uygulama alanında kalış süresini uzatarak hem de epitel yüzeylerini harabiyetten koruyarak, uygulanan ilacın etkinliğinin artırılmasında önemli rol oynar [144]. Göz dokularının kitosana karşı yüksek toleransı pek çok çalışma ile kanıtlanmış olan bir diğer önemli özelliktir [145,121]. Kesin mekanizması henüz açıklanamamış olmakla birlikte kitosanın antibakterial etkisi olduğu gösterilmiştir ve bu özellik te kitosanın göze ilaç taşınmasında etkin olmasına katkıda bulunan bir başka önemli özelliktir [146,121].

Günümüzde kitosanın farklı formülasyonlarının göze ilaç taşınmasında kullanımı konusunda çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Göze ilaç taşınmasında en sık tercih edilen kitosan formülasyonları solüsyonlar [147], jeller [148], lipozomlar [149], emülsiyonlar [150], nanoemülsiyonlar[151], mikro ve nanopartiküller[152,153] olarak özetlenebilir.

2.2.3.1.2.1.Kitosan Nanopartiküllerin Göze İlaç Taşınmasında Kullanılması

Kitosan nanopartiküller, ilaç taşıma sistemi olarak giderek artan sıklıkla tercih edilmeye başlanan formülasyonlardır. Kitosan nanopartiküllerin diğer alanlarda olduğu gibi göze ilaç uygulamalarında da yaygın olarak kullanılmalarına sebep bazı özellikleri şöyle özetlenebilir:

- Hazırlanmaları için çok ileri teknoloji gerektirmemeleri
- Homojen partikül popülasyonu elde edilebilmesi ve partiküllerin büyüklüğünün ve yüzey yüklerinin kolayca modifiye edilebilmesi
- Peptitler, proteinler ve nükleik asitler gibi çok farklı etken maddelerle etkileşebilmesi
- Poloksamerler, glukomannan, siklodekstrinler, hiyaloronik asit, aljinat gibi diğer moleküllerle nanomatriks yapısında kolayca birleşerek hibrit nanopartiküller oluşturabilmeleri.

Kitosanın farmasötik formu, göze ilaç taşınmasındaki etkinliğini belirlemede önemlidir. Yapılan çalışmalar kitosan çözeltisinin ve kitosan nanopartiküllerin göze uygulandığında,

mukoza ile etkileşiminin farklı olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, nanopartikül formunun çözelti formuna oranla uygulama sonrası kornea ve konjktiva gibi göz dokularında daha uzun süre kaldığını göstermiştir. Bunun yanında nanopartiküler formdaki kitosanın göze uygulama sonrası, oküler epiteli geçişinde paraselüler ve transselüler yolları kullandığını da göstermiştir.

Konu ile ilgili geniş literatür bilgisi incelendiğinde, kitosan nanopartiküllerin göze ilaç taşınmasında etkin ve güvenilir taşıma sistemi oldukları ve bu nedenle antibiyotiklerden NSAI'lara, siklosporinden 5 FU'e kadar pek çok farklı ilacın göz dokularına taşınmasında yaygın olarak tercih edildiği görülmektedir [153-156] .

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

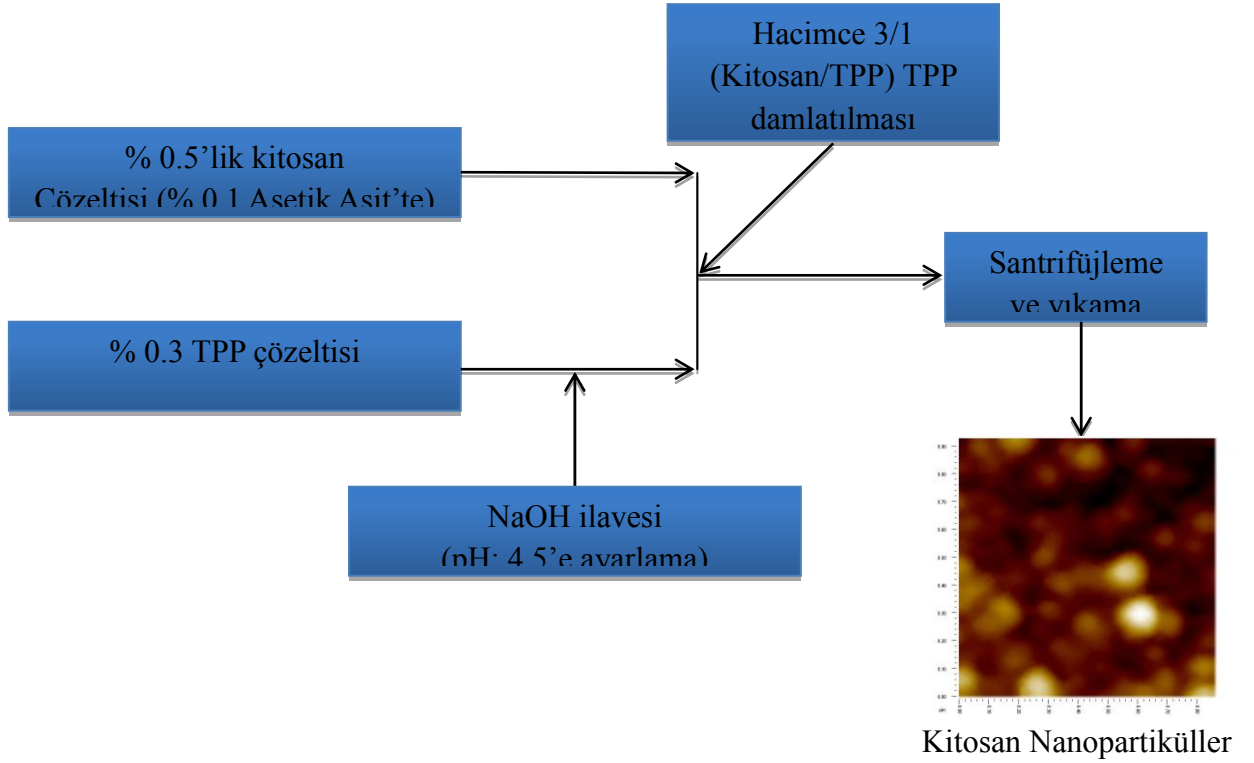
Yapılan çalışmada öncelikle kitosan nanopartiküller hazırlanıp bevasizumab yüklenmiş ve hazırlanan bu nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonrasında ise *in vitro* salım profili oluşturulan partiküller, *in vivo* 'da tavşan gözlerine uygulanarak salım profilleri gözlemlenmiştir. Bu aşamada, tavşanlara göz muayenesi yapılarak tedavi süreci takip edilmiştir.

3.1. Nanopartiküllerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve *In vitro* çalışmalar

Etken madde yüklü kitosan nanopartiküllerin ön segment hastalıklarında kullanım konusunda literatürde pek çok çalışma vardır [110,121,135]. Bu çalışmalarda kitosan nanopartiküllerin ön segment hastalıklarında etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış olduğundan sunulan çalışmada, subtenon uygulama amaçlı hazırlanacak bevasizumab yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında taşıyıcı madde olarak kitosan tercih edilmiştir.

3.1.1. Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Kitosan nanopartiküllerin hazırlanması geniş literatüre sahip birçok yöntemle yapılabilmektedir. Bu çalışmada iyonik jelasyon yöntemi tercih edilmiştir (şekil 3.1). Kitosan polimeri ve sodyum tripolifosfat (TPP) tuzunun 3 e 1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen nanopartiküller için, asetik asit içerisinde %0,5'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Benzer şekilde %0,5'lik sulu TPP çözeltisi hazırlandıktan sonra, kitosan çözeltisinin pH'sı 4,5 e ayarlanmıştır. pH ayarlamaları için çözeltiye 0,1 M NaOH ve HCl eklemeleri yapılmıştır. Daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 2 ml TPP damla damla 6 ml kitosan çözeltisine eklenmiştir. 1 saat süreyle karıştırıcıda homojenize olması beklenen partiküller daha sonra 12000 rpm'de 3 kere sentirüjlenerek yıkanmıştır.



Şekil 3.1.Kitosan nanopartikül üretim düzeneği

3.1.2. Bevasizumabın Kitosan Nanopartiküllere Yüklenmesi

Kitosan nanopartiküllerin hazırlanması kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan partiküllerin yıkama basamağına gelindikten sonra 12000 rpm'de 15 dk kadar santrifüj edilerek MES(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) tampon çözeltisiyle yıkanmıştır. 3.yıkamanın sonunda süpernatant atılarak üzerine kitosanın miktarına eş miktarda EDAC içeren 5ml solüsyon eklenmiş ve rotatorda yarım saat döndürülmüştür. Sonra tekrar santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve 2 kez daha MES ile yıkama yapıp EDAC uzaklaştırılmıştır. Son olarak da ilaç (bevacizumab-0,5 ml) pellet üzerine eklenmiş ve vortekslenip rotatora konulmuştur. Hazırlanan partikül ve ilaç etkileşmesi için 24 saat boyunca rotatorda dönmeye bırakılmıştır. İlaç yüklenen partiküller 24 saat sonunda santrifüjlenerek 3 kez distile suyla yıkanmıştır. Yıkamalardan alınan örnekler Zeta- Sizer'in (Nano-ZS Malvern, USA) 280 A IgG ölçüm yazılımı ile incelenerek, yüklenmeyen ilaç miktarları bulunmuştur. Toplam sisteme eklenen ilaç miktarından yüklenmeyen kısım çıkarılarak, yüklenen ilaç miktarı hesaplanmıştır. Toplam sisteme eklenen ilaç ile yüklenen ilaç oranlanarak, yükleme verimi teorik olarak hesaplanmıştır.

3.1.3. İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin morfolojik değerlendirilmeleri zeta sizer ve Atomik Kuvvet Mikroskopuyla (AKM, Nano Magnetics Instruments, Turkey) değerlendirilmiştir. Zeta sizer ile yapılan çalışmalarda hazırlanan kitosan nanopartiküller ve/veya bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküller deiyonize su ile yaklaşık 2 ml'lik çözeltiler halinde seyreltilmiş ve zeta sizer cihazının PS küvetine yerleştirilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kitosan nanopartiküllerin AKM incelemelerinde de yaklaşık 10 ml hacmindeki kitosan nanopartikül içeren örnekler alınmış ve mika örnek plakası üzerine damlatılarak AFM görüntüleri alınmıştır.

3.1.4. Salım Profillerinin Oluşturulması

Hazırlanan ilaç yüklü kitosan nanopartiküller 2,5 ml pH 7,4 PBS çözeltisinde dağıtılarak in vitro salım deneyleri başlatılmıştır. 15 ml'lik falkon tüplere alınan 2.5 ml çözelti oda sıcaklığında rotatora yerleştirilerek 100 rpm hızında dönmeye bırakılmıştır. Daha sonra örnek alabilmek için tüpler 12000 rpm'de sentrifüjlenerek ilaç yüklü partiküllerin dibeye çökmesi sağlanmış, üst kısımda serbest ilaç molekülleri kalmıştır. Üst kısımdan 100 ml örnek alınarak yerine 100 µl PBS eklenmiştir. Aynı işlem boş nanopartiküllerle aynı sırada tekrarlanmış, çöktürülen nanopartiküllerin üst kısımlarından örnek alınarak 100 µl PBS ile tazelenmiştir. Alınan örneklerden, salınan ilaç miktarı serbestilaç kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği yardımıyla belirlenmiştir.

3.1.5. Yükleme Veriminin Hesaplanması

Yükleme veriminin hesaplanması için ilk olarak yükleme için seçilen 12.5 mg bevasizumab nanodropta ölçülmüştür. Yükleme işlemleri 3.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Yıkama aşamasında yüklenmeyen ilaç miktarının belirlenmesi için her yıkama aşamasında süpernatanttan 100 µl 'lik örnekler alınarak nanodropta ölçülmüştür. 1., 2. ve 3. yıkamada atılan toplam ilaç miktarını hesaplamak için, toplam hacim ve elde edilen konsantrasyon miktarları çarpıldı ve elde edilen miktar başlangıç dozu olan 12.5 mg'dan çıkarılarak yükleme verimi hesaplanmıştır.

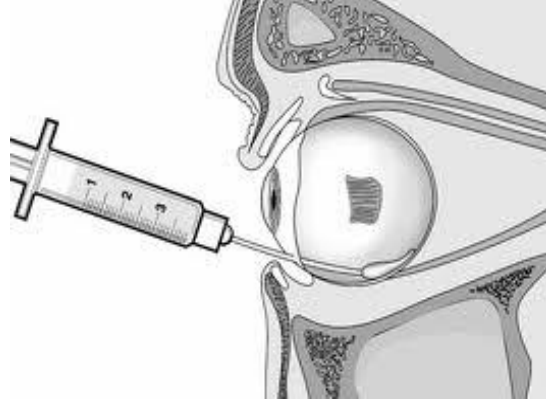
3.2. Hazırlanan Nanopartiküllerle yapılan *In Vivo* Çalışmalar

Sunulan çalışma kapsamında yapılan tüm *in vivo* çalışmalar için Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 05/11/2010 tarih ve 46 karar sayılı Etik Kurul onayı alınmıştır. Sunulan çalışmada 36 tane 2-3 aylık, 2-3 kg ağırlığında Yeni Zelanda tipi tavşan kullanılmıştır. Tavşanlar üç gruba ayrılmıştır. Bu

gruplar, ilaç içermeyen nanopartiküllerin enjekte edildiği kontrol grubu (n=12), serbest bevasizumabın enjekte edildiği ilaç grubu (n=12) ve bevasizumab yüklü nanopartiküllerin enjekte edildiği ilaçlı nanopartikül grubu (n=12) olarak ayrılmıştır. Enjeksiyonun yapıldığı günden 1, 3, 5 ve 7 gün sonra sakrifiye edilen tavşanların vitreus sıvısından ve kanlarından örnekler alınarak test edilmiş ve bir salım profili çıkarılmıştır. Ayrıca sklera dokusu üzerinde yapılan immunohistokimyasal çalışmalarla salım profilinin ilaç üzerinden gözlemlenmesi hedeflenmiştir.

3.2.1. Subtenon Enjeksiyon

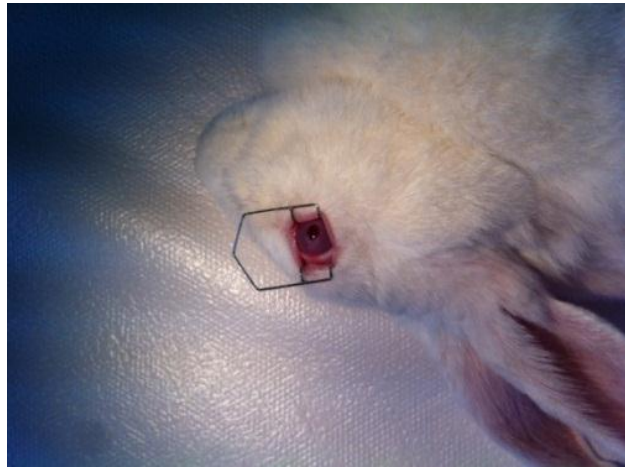
Subtenon enjeksiyonlar aseptik şartlarda ve genel anestezi altında yapılmıştır. Genel anestezi intramusküler olarak uygulanan 20 mg/kg ketamine and 2 mg/kg xylazine ile sağlanmıştır. Tüm enjeksiyonlar aseptik koşullarda hazırlanmıştır. Enjeksiyon öncesi tavşanların gözüne %4 oksibuprokain ile topikal anestezi uygulanmış ve gözler birer damla tropicamide ile dilate edilmiştir. Enjeksiyondan önce ve hemen sonra topikal antibiyotik (exocin) uygulanmıştır. Enjeksiyondan önce tüm gözlere 2 dakika boyunca %5'lik povidon iodi uygulanmıştır. Enjeksiyon öncesi basal ön segment incelemeleri ve enjeksiyondan sonra takip süresince yapılan kontrol muayeneleri taşınabilir el biyomikroskobu (Optotek Hawk Eye Dijital biomikroskop) ile yapılmıştır. Enjeksiyonlar tavşanların sağ gözüne uygulanmış ve enjeksiyon esnasında kapakları açık tutmak için bleferosto kullanılmıştır (Şekil 3.2, 3.3.A,B). Subtenon enjeksiyon esnasında, topikal anestezi uygulanmış gözde, üst rektus üzerindeki konjktiva penset yardımıyla kaldırılmıştır (Şekil 3.4.A), 30 gauge iğne ile bu alanda konjktivadan girilmiş ve enjekte edilecek materyal üst temporal kadranda limbustan 5-6 mm uzaklıktaki subtenon alana enjekte edilmiştir (Şekil 3.4.B). Her üç gruba da 0,5 ml enjeksiyon uygulanmıştır. İlaç grubu için içerisinde 12,5 mg ilaç içeren enjeksiyon, ilaçlı partikül grubunda ise 12,5 mg ilaç'ın %38 verimle yüklenmiş olduğu 30 mg kitosan nanopartikül ve kontrol grubunda ise 30 mg kitosan nanopartikül verilmiştir. Enjeksiyondan sonra iğne geri çekilerek konjktivadaki açıklıktan herhangi bir ilaç sızıntısı olmadığı izlenmiştir.



Şekil 3.2:subtenon enjeksiyon uygulamasının şematik gösterilmesi [157]



A

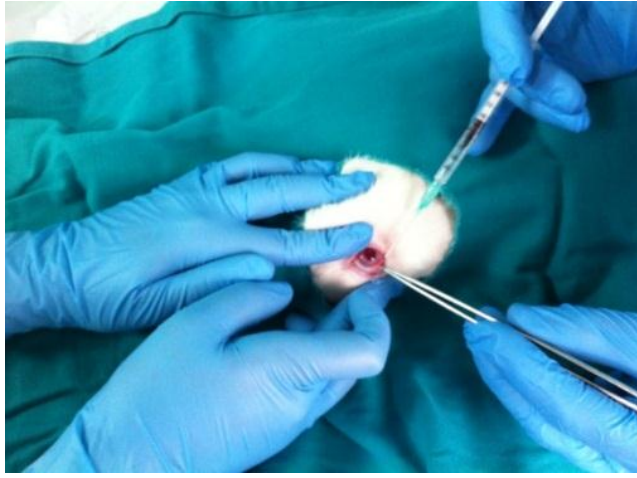


B

Şekil 3.3. A-B. Tavşan gözlerinin enjeksiyona hazırlanması



A



Şekil 3.4.A-B. Subtenon enjeksiyon uygulaması

3.2.2. Enjeksiyon Sonrası Takip Muayeneleri

Enjeksiyondan sonra takip süresince her gün hayvanların detaylı ön segment muayeneleri taşınabilir el mikroskobu ile yapılmış ve görüntüler kaydedilmiştir. Ön segment muayenesinin amacı, konjktival hiperemi, kemozis, subkonjktival kanama ve ön kamaradaki inflamatuvar reaksiyonun varlığını, sıklığını ve şiddetini belirlemektir.

3.2.3. Örneklerin Toplanması

Deney hayvanları 1, 3, 5 ve 7. günlerde ketamin (35mg/kg)/ksilazin (5mg/kg) verilerek anestezi altında intra kardiyak kan alınarak sakrifiye edilmişlerdir. Göz alınması işlemi, konjktiva 360 derece diseke edildikten sonra rektus kasları kas forsepsi yardımıyla ekarte edildikten sonra skleraya yapıştıkları yerden kesilmiştir. Orbita serbestleştirildikten sonra nazikçe öne çekilerek künt uçlu göz alma makası ile temporal taraftan globun arkasına ucu kapalı olarak girilmiştir. Optik sinir kapalı makas ucu ile hissedildikten sonra makasın ucu açılarak optik sinir çok kısa güdük kalmayacak şekilde

kesilmiştir. Göz küresi çevre bağ dokudan serbestleştirilerek çıkarılarak gözküresinin alınması tamamlanmıştır. Göz küresinin alınmasından sonra hemen sıvı azot içerisine alınan gözler ve serumu ayırıştırılmış kanlar daha sonra – 80 dereceye kaldırılarak eliza ve immünohistokimya çalışmaları için saklanmışlardır.

3.2.4. İmmunohistokimya

Vitreus çıkarma işlemi esnasında çözülmeye bırakılan göz küreleri, doku bloklarının üzerine yerleştirilerek doku sabitleyici ortam içerisinde dondurulmuştur. 30 µm 'lık kesitler alınan doku önceden soğutulmuş aseton içerisinde fikse edilmiştir. Alınan kesitler kurutulduktan sonra, 1 saat süreyle 1:100 oranında seyreltilmiş yine Matriks biotek laboratuvarlarından alınan VEGF'e bağlanması için geliştirilmiş rekombinant insan IgG1 antikoruna spesifik FITC işaretli antikorla boyanmıştır. 1 saat sonunda 3 kere PBS ile yıkanan dokular flüoresan mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.5. ELISA Ölçümleri

ELISA çalışması için Shikari Q-Beva kiti kullanılmıştır. Serum örnekleri ön hazırlığa tabi tutulmadan 1:100 oranında seyreltilerek çalışılmıştır. Vitreus örnekleri içinse, öncesinde - 80 derece donmuş göz örnekleri çözülmeye kesilerek, donmuş vitreus çıkartılmış, sonrasında ise çözülmeye 1 saat süreyle 6000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında üstte kalan berrak kısım başka bir tübe alınarak tekrar santrifüjlenmiş, böylece çeşitli doku parçaları ve vitreus içerisinde kırıcılık sağlayan diğer elementlerden uzaklaştırılmıştır. Süperantan alınarak 1:100 oranında seyreltilerek ELISA çalışması yapılmıştır.

3.2.6. Vitreusta Bulunan Bevasizumab Miktarının Hesaplanması

Bu hesaplamanın amacı ölçüm yapılan anlarda, vitreusta bulunan bevasizumab miktarının başlangıçtaki bevasizumab miktarına oranını belirlemektir. Bu amaçla her bir ölçüm anında vitreusta bulunan bevasizumab miktarı, eliza ölçümlerinden elde edilen konsantrasyonun, ortalama tavşan vitreus hacmi olan 1.5 ile çarpımı ile elde edilmiştir. Bu değer daha sonra başlangıçta uygulanan bevasizumab miktarına bölünmüştür. Serbest bevasizumab uygulanan gözlerde elde edilen değer 12.5 mg'a bölünmüştür. Bevasizumab yüklü kitosan nanopartikül enjekte edilen olgularda ise başlangıçta alınan bevasizumab düzeyleri 12.5 mg olmakla birlikte, ilaç yükleme verimi %38 oranında olduğundan, nanopartiküllere yüklenebilen miktar hesaplandığında;

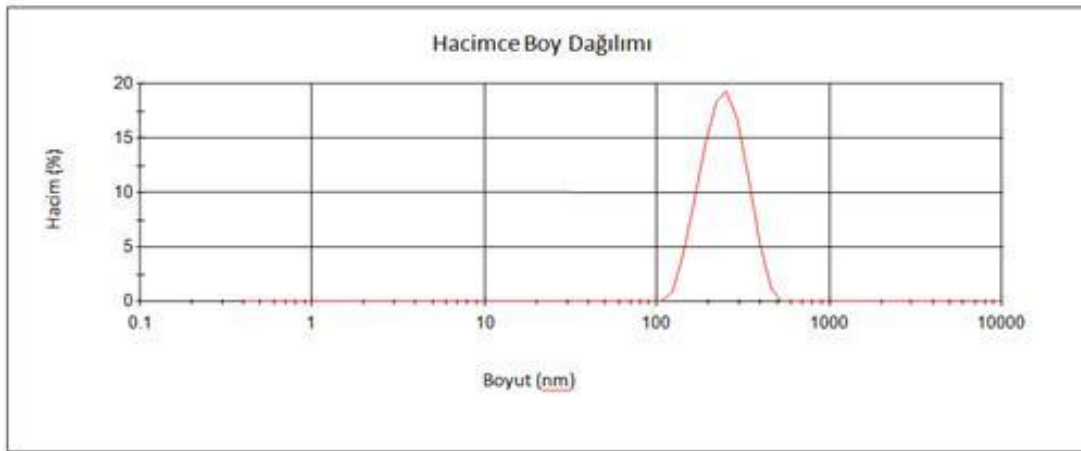
Nanopartiküle yüklü bevasizumab miktarı =Başlangıçtaki ilaç miktarı×İlaç yükleme verimi
4.75= 12.5×3.8 olarak hesaplanacağından bu olgularda başlangıç bevasizumab dozu 4.75 mg alınmış ve vitreusta ölçülen bevasizumab miktarı bu değere bölünmüştür.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

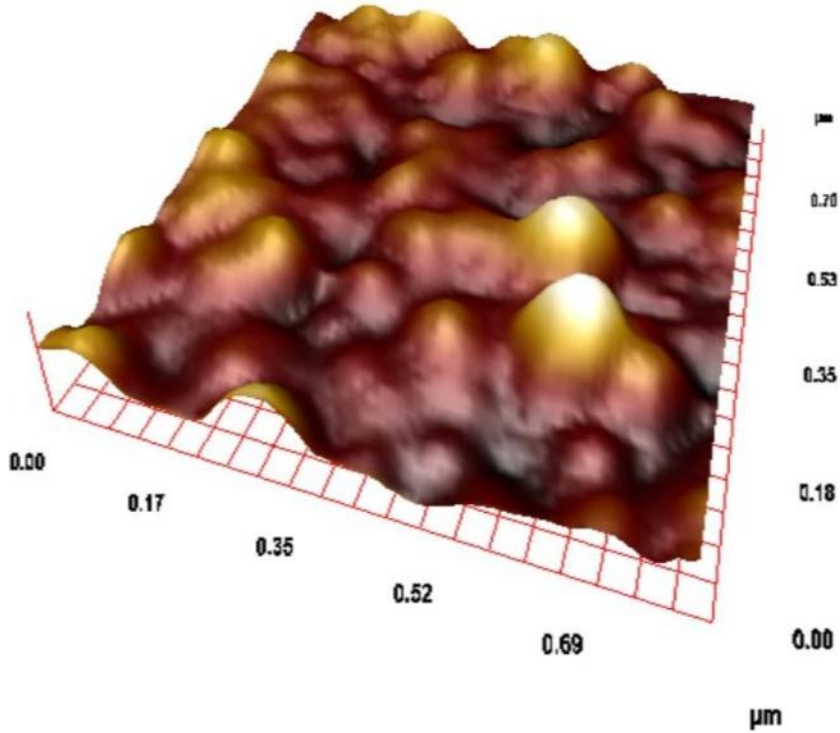
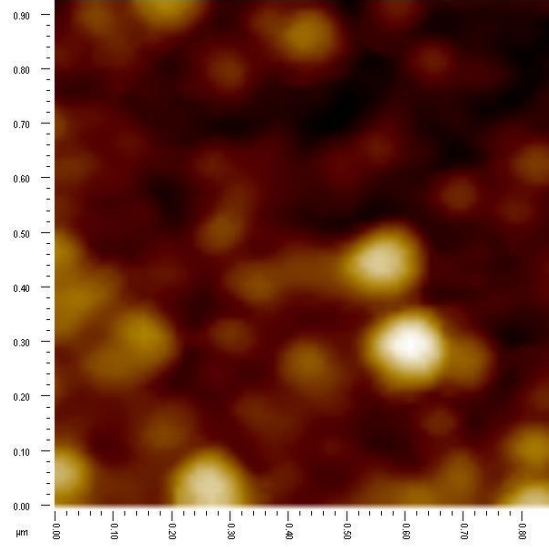
Bu çalışmada kitosan nanopartiküller hazırlanmış ve bu kitosan nanopartiküllere bevasizumab yüklenmiştir. Bu nanopartiküller karakterize edilmiş ve nanopartiküllerin *in vitro* ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. *In vivo* uygulamalarda, üç grup tavşana subtenon bölgeye boş nanopartikül, serbest bevasizumab ve bevasizumab yüklü nanopartikül uygulanmıştır. Enjeksiyondan sonra gözler takip edilmiş ve toksisite ve inflamatuvar cevap gelişip gelişmediği izlenmiştir. Enjeksiyondan sonra 1, 3, 5 ve 7. günlerde hayvanların feda edilmesinden sonra göz küreleri alınmış, vitreusta ve serumda eliza yöntemi ile bevasizumab düzeyleri tayin edilmiş ve imünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır. Sonuçta serbest bevasizumab enjekte edilen olgularla, bevasizumab yüklü nanopartikül enjekte edilen olgulardan elde edilen serum ve vitreus bevasizumab konsantrasyonu karşılaştırılarak, nanopartiküle yüklü ilacın transskleral geçiş ve kontrollü salım üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Göz dokularından alınan örneklerde imünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır.

4.1.1. İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi Ve Karakterizasyonu

Bu çalışma kapsamında edilen kitosan nanopartiküllerin boyutları zeta-sizer ile yapılan ölçümlerde 120-380 nm aralığındadır (Şekil 4.1). Buna karşın AFM ile alınan görüntülerde boyutlar 80-150 nm aralığında görülmektedir (Şekil 4.2.A, B). Partiküllerde çıplak gözle ve ve ya sonrasında yapılan Zeta sizer ve AFM ölçümlerde agregasyon görülmemiştir.



Şekil 4.1: Hazırlanan kitosan partiküllerin Zeta Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği.



Şekil 4.2. Hazırlanan kitosan partiküllerin A: AFM görüntüsü, B: AFM görüntüsünden oluşturulmuş 3 boyutlu yapısı

İlaçların, biyolojik bariyerleri geçişteki etkinliğini arttırmak ve kontrollü salım sağlayarak hedef konsantrasyonu daha uzun süre koruyabilmek amacıyla nanopartiküler taşıma sistemlerin kullanılması giderek yaygınlaşan bir uygulama olmakla birlikte literatürde bevasizumab yüklü nanopartiküllerin çalışıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır.

Leung karaciğer tümörlerinde manyetik rezonans görüntülenmesinde VEGF ekspresyonunun hedeflemek için anti-VEGF PLA-PEG-PLL-DTPA-Gd anti-VEGF PLA-

PEG-PLL-FITC ve nanopartiküller sentezlemiştir. Bu nanopartiküllerin boyutlarını sırasıyla 85.8 ± 7.2 nm ve 85.2 ± 5.8 nm olarak bildirmiştir. Araştırmacı, her iki nanopartikülün de DTPA-Gd'ye oranla karaciğer, kalp ve kas tümörlerinin görüntülenmesinde tümörden alınan sinyal yoğunluğunu arttırdığını bildirmiştir [158].

Yapılan literatür taramalarında bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin göze ilaç taşınması ile ilgili hiçbir çalışma bulunmazken, bevasizumabın başka taşıyıcılara yüklenmesi ile oluşturulmuş nanopartiküllerin arka segmente ilaç taşınması ile ilgili çok sınırlı sayıda literatür bulunmuştur. Bu çalışmalardan biri Pan ve ark [PAN 2011]. tarafından gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada PEG ile modifiye edilmiş bevasizumab ve bevasizumab yüklü PLGA nanopartikülleri olmak üzere bevasizumabın iki farklı formülasyonunu üretilmiş ve bevasizumab yüklü PLGA nanopartiküllerin büyüklüğünü ortalama 819 nm olarak bildirilmiştir. Bu iki formülasyonun intravitreal enjeksiyon sonrası sıçan gözünde deneysel KNVM modelinde etkilerini inceleyen araştırmacılar, PEG-bevasizumab ve bevasizumab-PLGA konjugasyonunun başarılı kombinasyonlar olduğunu ve bu şekilde hazırlanan bevasizumabın anjiyojenik etkinliğini koruduğu sonucunu bildirmişlerdir.

Abrishami ve ark [159] intravitreal bevasizumab uygulamasından sonra ilacın vitreusta kalış süresini uzatmak amacıyla lipozom kaplı bevasizumab nanopartikülleri hazırlamışlardır. Araştırmacılar, bir grup tavşana intravitreal serbet bevasizumab bir grup tavşana lipozoma yüklü bevasizumab enjekte etmişler ve vitreusta elde edilen bevasizumab konsantrasyonunun zamana göre değişimini incelemişlerdir. 6 haftalık izlem süreci sonunda lipozoma yüklü bevasizumab enjekte edilen gözlerde, serbest bevasizumab enjekte edilen gözlerle oranla hem maksimum vitreus bevasizumab düzeyleri (sırasıyla 246 $\mu\text{g/mL}$, 163 $\mu\text{g/mL}$), hem de 42 gün boyunca elde edilen tüm vitreus bevasizumab düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Li ve ark [160], yaşa bağlı maküla dejenerasansında kullanılan bevasizumabın etkinlik süresini uzatmak amacıyla bevasizumab yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamışlar ve karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar, nanopartikül sentezinde kullanılan farklı yöntemlerin ve ilaç/polimer oranının, oluşan partiküllerin şeklini ve salım profilini etkilediğini bildirmişler ve sentezledikleri 0.2-1.0 μ boyutlarındaki bevasizumab yüklü PLGA nanopartiküllerin *in vitro* ortamda 90 gün boyunca kontrollü salım sağladığını bildirmişlerdir.

Hao ve ark [161] da yaşa bağlı maküla dejenerasansının tedavisinde transskleral yolla uygulamak amacıyla 230 nm büyüklüğünde bevasizumab yüklü PLGA nanopartikülleri

sentezlemişler ve *in vitro* ortamda nanopartikülden salınan bevasizumabın yapısını ve aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Steroidler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve antibiyotikler oftalmolojide en sık kullanılan ilaçlardandır. Bevasizumabtan farklı olarak oftalmoloji alanında uygulanan bu ilaç gruplarının nanopartiküler formlarının geliştirilmesi konusunda literatürde çok fazla sayıda çalışma bulmak mümkündür. İlaç taşıyıcı sistem olarak lipozomlar, niazomlar, dendrimerler olmak üzere çok farklı ilaç taşıma sistemleri kullanılmaktadır.

Arajuo ve ark [162] oküler anjiogenik tedavilerde kullanılmak üzere triamsinolon yüklü NLC (nanostructured lipid carriers) hazırlamışlardır. Araştırmacılar parçacıkların ortalama büyüklüğünün 200 nm'nin (100-300) altında olduğunu ve partiküllerin *in vitro* çalışmalarda herhangi bir oküler toksisite göstermediğini bildirmişlerdir.

Badawi ve ark [163], indometazinin kornea üzerinde kalış süresini arttırmak ve oküler bioyararlanımını arttırmak için indometazin yüklü nanopartikül ve nanoemülsiyon formunda iki kitosan taşıyıcı sistem oluşturmuşlardır. Araştırmacılar nanopartikülün boyutlarını 280 nm olarak bildirirken, nanoemülsiyondaki parçacık boyutlarının 220-690 nm arasında değiştiğini ve her iki nanotaşıyıcı formunun da korneaya uygulama sonrası aköz sıvısında elde edilen indometazin konsantrasyonunun serbest indometazine göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Gupta ve ark [164] korneal geçirgenliği arttırmak, korneal kalış süresini uzatmak ve oküler bioyararlanımını arttırmak için sparfloxasin (yeni nesil hidrofobik florokinon antibiyotik) yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamışlardır. Araştırmacılar 180-190 nm boyutlarındaki partiküllerin HET-CAM testi sonunda göz dokuları için hiçbir iritan özellik taşımadığını izlediklerini bildirmişlerdir.

Nanopartiküler sistemlerde kullanılan hemen hemen tüm taşıyıcı sistemler oküler kullanım amaçlı hazırlanan nanopartiküllerin hazırlanmasında da kullanılmaktadır. Literatürde farklı özelliklere sahip nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin oküler kullanım açısından farklı olup olmadığını değerlendiren pek çok çalışma vardır.

Li ark [160], bevasizuamab yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan ilaç/polimer oranının değiştirilerek, salım profilinin modifiye edilebileceğini bildirmişlerdir.

Badawi ve ark [163] nanoemülsiyon ve nanopartikül formlarında hazırladıkları indometazin yüklü nanotaşıyıcıların her ikisinin de serbest indometazin uygulamasına göre indometazinin prekorneal kalış süresini uzattığını ve daha yüksek aköz indometazin seviyesi sağladığını bildirmekle birlikte, *in vivo* çalışmalarda ve histolojik incelemelerde

nanoemülsiyon uygulanan tavşanlarda nanopartikül uygulanan tavşanlara göre, kimyasal korneal yanığın daha etkin bir şekilde iyileştiğinin izlendiğini bildirmişlerdir.

Araujo ve ark [162] yüksek ve düşük viskositelere sahip flurbiprofen yüklü PLGA nanosferleri hazırlamışlar ve polimer viskozitesindeki farklılığın nanosferin fizikokimyasal özellikleri ve oküler tolerans üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, parçacığın stabilitesinin veya oküler toleransın polimer viskozitesinden etkilenmediğini bildirirken, ilaç salım profilinin ise polimer viskozitesinden etkilendiğini, yüksek viskositeli PLGA ile hazırlanan formülasyonun ilaç salım hızının daha yavaş olduğunu rapor etmişlerdir.

4.1.2. Salım Profillerinin İncelenmesi

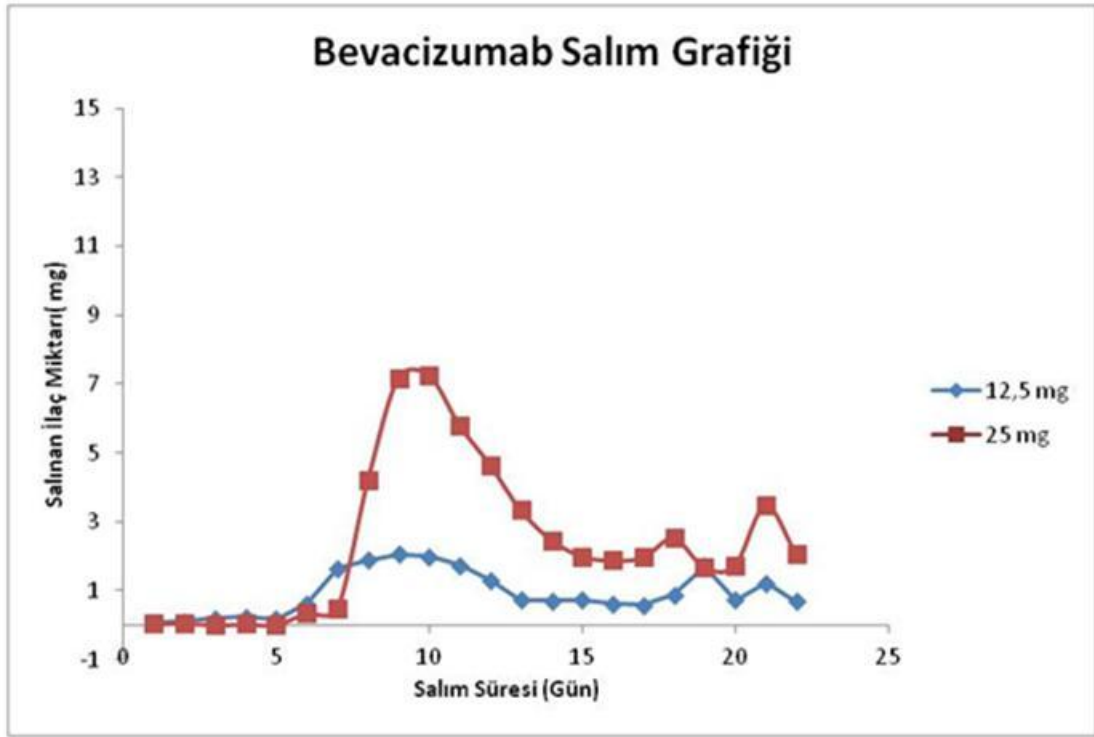
Kitosan yüklü nanopartiküllerin ilaç salımları deneysel çalışmalar bölümünde belirtildiği gibi 3 hafta süreyle takip edilmiştir (şekil 4.3). İki farklı yükleme miktarı arasında salım profillerinde büyük bir benzerlik olmakla birlikte, salınan ilaç miktarları arasındaki oran yükleme miktarları arasındaki orandan fazla olduğu izlenmiştir. *In vitro* salım grafiği değerlendirildiğinde 12.5 mg bevasizumab yüklü nanopartiküllerden ilk 5 gün anlamlı düzeyde bir salım izlenmezken, 5. günde salınan bevasizumabın arttığı ve bir hafta boyunca bir plato çizerek yüksek oranda bevasizumab salındığı, daha sonra ise izlem yapılan üç hafta boyunca salımın sabit bir oranda devam ettiği izlenmiştir. 25 mg bevasizumab yüklü nanopartiküllerden ilk 7 gün anlamlı düzeyde bir salım izlenmezken, salımın 7. gün civarlarında pik yaptığı ve 12. gün sonunda ise bu pikin düştüğü, izlem yapılan 3 hafta süresinde de yüksek oranda bevasizumab salımının devam ettiği izlenmiştir. Biodegradable partiküllerden ilaç salımı yüzeye adsorbe olmuş ilacın desorbsiyonu, dezentegrasyonu, matriksten difüzyonu, polimer duvarından difüzyonu, merkeze hapsolmuş ilacın ise yüzey ve kütledegradasyonu veya difüzyon veya degradasyon proseslerinin kombinasyonu olacak şekilde pek çok farklı mekanizma ile olabilir.

Hoa ve arkadaşlarının çalışmasında [161], bevasizumab PLGA nanopartiküllere % 45 oranında bir verimle yüklenebilirken, salım profilleri incelendiğinde nanopartiküllerden 4 hafta boyunca bevasizumab salımı olduğu bildirilmiştir.

Li ve ark'nın [160] çalışmasında ise PLGA nanopartiküllere bevasizumab yükleme verimi %95.4 olarak bildirilirken, nanopartiküllerden 90 gün boyunca bevasizumab salımı tespit edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, bildirdikleri sonuçların bevasizumab/PLGA oranının %1.6 olarak hazırlandığında elde edilen sonuçlar olduğunu bildirirken, bevasizumab/PLGA oranının %13 oranına arttırıldığında, bazı sferik partiküllerin varlığına rağmen genelde partiküllerin sferik şeklini kaybettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar,

bevasizumab/PLGA oranını %1.6 olarak hazırladıkları nanopartiküllerin in vitro salım profili değerlendirildiğinde ilk 55 gün 0.5 mg bevasizumabın rölatif olarak dengeli bir düzeyde salındığını, bu zamandan izlem yapılan 91. günün sonuna kadar ise anlamlı bir salım yapılmadığını bildirirken bevasizumab/PLGA oranının %13 oranında seçildiği nanopartiküllerin ise işlem yapılan 91 gün boyunca 1.9 mg bevasizumabı dengeli bir şekilde saldıgını ifade etmişlerdir.

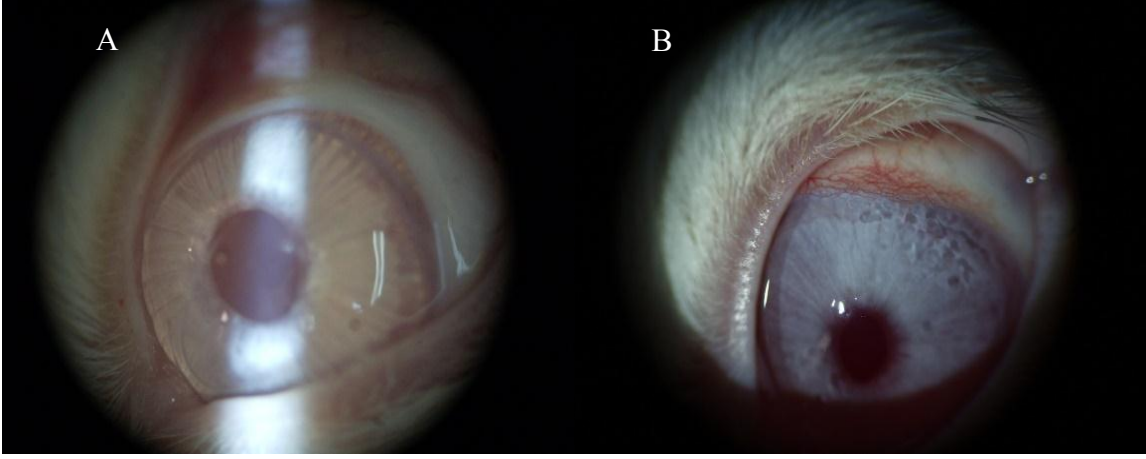
Abrishami ve ark [159] çalışmasında ise, etken madde yüklü nanolipozomlar hazırlanırken bevasizumab %45.5 oranında bir verimle lipozomlara yüklenmiş ve in vivo ortamda vitreusta 42 gün boyunca vitreus düzeyi izlenebilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı miktarlarda Bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerden salınan ilaç miktarının zamana göre grafiği.

4.2.1. Enjeksiyon Sonrası Muayene Sonuçları

Subtenon enjeksiyon sonrası göz muayeneleri sonucunda, enjeksiyon yerinde hafif kemozis ve konjktival hemoraji dışında herhangi bir bulgu izlenmemiştir. Hiçbir tavşanda üveit, ön kamara reaksiyonu ve inflamatuvar bir cevap gelişmemiştir. Enjeksiyona bağlı herhangi bir komplikasyon izlenmemiştir (şekil 4.4.A-B).



Şekil 4.4.Subtenon enjeksiyon sonrası ön segment muayene sonuçları; A:1. gün, B:5. Gün

Bevasizumabın arka segment hastalıklarının tedavisinde farklı dozlarda etkinliğini karşılaştıran kontrollü *in vitro* çalışmalar yoktur. Halen kullanımda yaygın olarak kullanılan doz intravitreal 1.25 mg dozdur. Literatürde intravitreal 1.25 mg ile 3 mg arasındaki dozların *in vivo* etkinliklerinin karşılaştırılması konusunda yapılan çalışmalar bu dozlar arasında etkinlik açısından fark olmadığını göstermiştir. Arka segment hastalıklarının tedavisinde subkonjoktival veya subtenon bevasizumab uygulamaları kullanılmamakla birlikte, ön segmentte anjiogenezle seyreden hastalıkların tedavisinde subkonjoktival bevasizumab uygulamaları giderek daha sıklıkla uygulanmaktadır [52]. Sunulan çalışma kapsamında, klinikte uygulanan formların dışında özgün bir uygulama yöntemi olarak subtenon uygulanan ilaç transskleral geçişin değerlendirilmesi ve vitreusta hedef dozun sağlanması amaçları ile kullanıldığından rutinde kullanılan dozlardan daha yüksek dozlar (12.5 mg) kullanılmıştır. Bu doz klinikte yaygın olarak kullanılan doz olmamakla birlikte, yüksek doz bevasizumab uygulamasının göz dokularında güvenle uygulanabileceği konusunda literatürde pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma vardır.

Yoeurek ve ark [165], *in vitro* ortamda insan keratinosit, keratinosit ve korneal endotel hücre kültürlerinde 5 mg/ml konsantrasyonunda bevasizumab uygulamasının güvenle uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Kernt ve ark da [166], *in vitro* ortamda RPE, optik sinir başı astrositleri, insan trabeküler ağ hücreleri ve kornea hücre kültürlerinde, rutinde kullanılan bevasizumab dozlarının 0.1, 1 ve 10 katını (25 µg/ml, 250 µg/ml, and 2,500 µg/ml) hücre toksisitesi açısından değerlendirmişler, 10 katı dozların sadece RPE hücrelerine toksik etki gösterdiğini, diğer hücre kültürlerine herhangi bir toksik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Thaler ve ark [167], uygulama öncesi retinal gangliyon hücre hasarı oluşturulmuş farelerde

ve normal farelerde, normal ve yüksek doz intravitreal VEGF inhibitörü (bevasizumab, ranibizumab ve pegaptanip), uygulamasının toksisite incelemesini yapmışlardır. Normal doz bevasizumab (0.2µl hacimde 25mg/ml) ve yüksek doz bevasizumab (0.2µl hacimde 125 mg/ml) uygulanan farelerde, ne normal grupta ne de uygulama öncesi retinal gangliyon hücre hasarı oluşturulmuş grupta herhangi bir toksisite izlenmediğini bildirmişlerdir.

Hoffart ve ark [168], farklı dozlarda subkonjoktival bevasizumab uygulamalarının alkali yanık sonrası gelişen korneal neovaskülerizasyonunda etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, kimyasal yanık sonrası korneal neovaskülerizasyon oluşturdukları farelerde subkonjoktival olarak farklı dozlarla sadece bevasizumab 2.5 mg/gün, 3.75 mg/gün, 5.0 mg/gün, sadece steroid (4 mg/gün deksametazon fosfat) veya steroid bevasiumab kombinasyonunu (4 mg/gün deksametazon fosfat ve 5.0 mg/gün bevasizumab) uygulamışlar ve bu uygulamayı 7 gün boyunca her gün tekrarlamışlardır. Sonuç olarak en yüksek etkinliğin 5mg/gün bevasizumab tedavisini monoterapi olarak veya steroidle elde edildiğini bildirmişler ve bu tedavilerle herhangi bir toksisite gelişmediğini rapor etmişlerdir.

Sakurai ve ark [169] intravitreal uygulanan yüksek doz bevasizumabın etkilerini değerlendirdikleri çalışmada bir grup maymuna 6.25 mg diğer gruba da 12.5 mg intravitreal bevasizumab uygulamışlar ve uygulamadan sonra 28 gün boyunca takip etmişlerdir. Enjeksiyon sonrası takip süresinde olguları fundus muayenesi, görüntüleme yöntemleri ve elektrofizyolojik testlerle toksisite açısından inceleyen araştırmacılar, hayvanların feda edilmesinden sonra da alınan göz dokularında histolojik incelemeler yapmışlardır. Araştırmacılar tüm bu testlerin sonucunda yüksek doz intravitreal bevasizumab uygulamasının göz dokularında geri dönüşümsüz herhangi bir toksisiteye yol açmadığı göstermişlerdir .

Bevasizumab yüklü kitosan nanopartikül konusunda literatürde herhangi bir çalışma olmamakla birlikte bevasizumabın yukarıda ifade edildiği gibi diğer taşıyıcılarla oluşturulmuş nanopartiküllerinin intravitreal uygulamaları konusunda çalışmalar vardır. Bu uygulamalar gözetildiğinde, Abrishami ve ark [159], bevasizumab yüklü nanolipozomları tavşan gözlerine intravitreal enjeksiyon sonrası 42 günlük takip süresinde herhangi bir komplikasyon izlemediklerini bildirmişlerdir.

Pan ve ark [170] da sıçan gözünde deneysel KNVM modelinde intravitreal uygulanan bevasizumab yüklü PLGA nanopartiküllerin etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, enjeksiyondan sonraki 8 haftalık takip süresince herhangi bir komplikasyon

bildirmemişlerdir.

Kitosan oküler ilaçların üretiminde sıklıkla kullanılan bir taşıyıcıdır [123,140]. Kitosan sıklıkla ön segment tedavisinde kullanılan ilaç moleküllerinin hazırlanmasında kullanılan bir moleküldür ve subkonjuktival ve subtenon uygulanan kitosan moleküllerinin güvenilirliği konusunda pek çok çalışma vardır.

Nagarval ve ark [171] oküler kullanım için, 5 florourasil yüklü kitosan kaplı kitosan-sodyum alginat nanopartikülleri hazırlamışlar ve karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar *in vitro*, *ex-vivo* ve *in vivo* çalışmalar sonucu hazırlanan nanopartikülün hem anterior hem de posterior segmente ilaç uygulanması için etkin ve güvenilir bir sistem olduğunu bildirmişlerdir.

Etken madde yüklü kitosan nanopartiküllerin anterior segment hastalıklarının tedavisinde topikal veya subkonjuktival uygulamaları sıklıkla kullanılmakla birlikte kitosanın veya kitosan nanopartiküllerin posterior segment hastalıkları için intravitreal veya subtenon uygulamaları konusunda literatürde sınırlı sayıda literatür vardır. Bu çalışmalardan biri

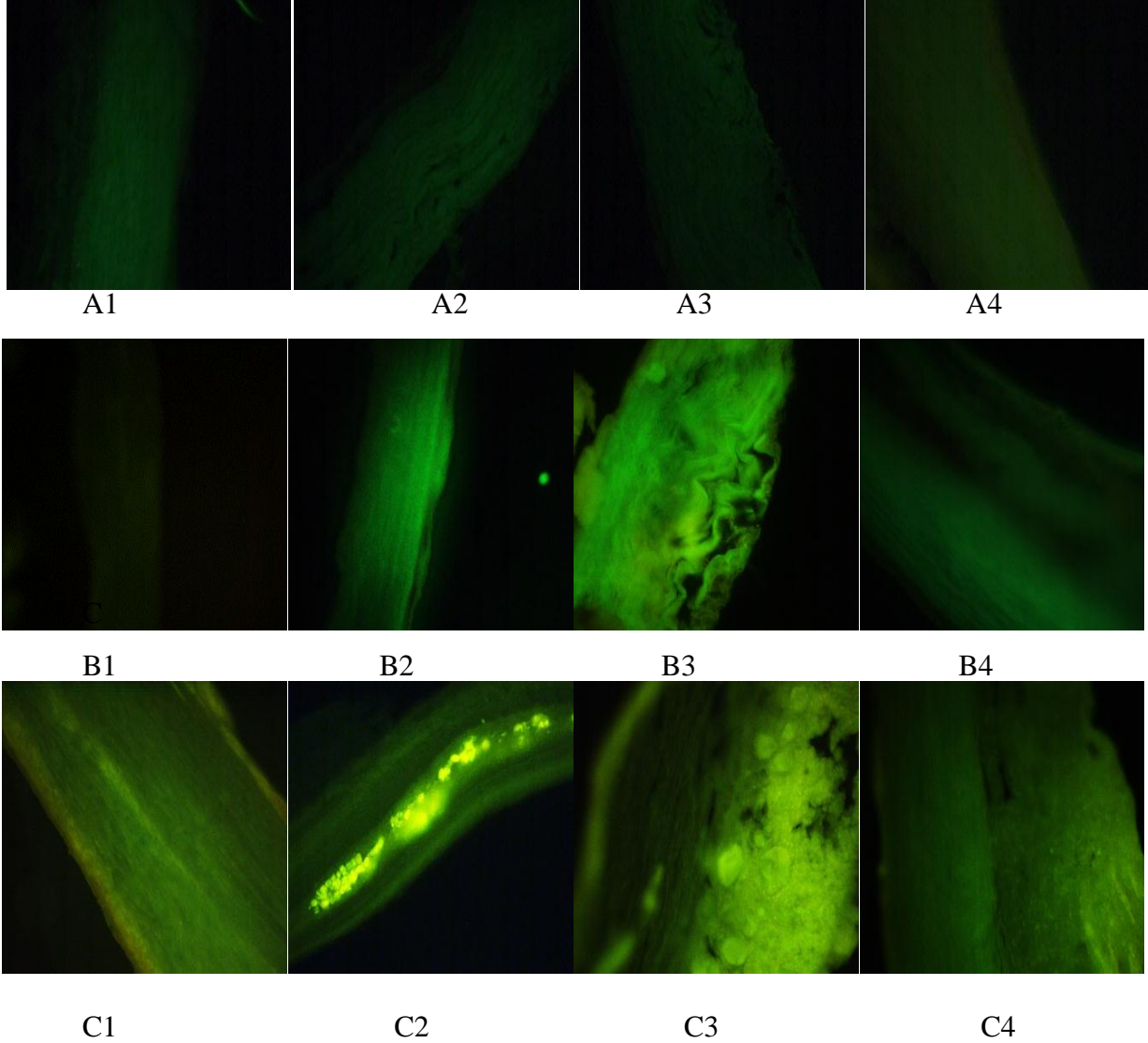
Jin ve ark [172] tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada nanopartikül aracılı plazminojen krinkle 5 (K5-NP) uygulamasının koroid neovaskülarizasyon ve retinal inflamasyon üzerindeki etkilerini araştırmak için, sıçan koroid neovasküler membran modelinde intravitreal K5 ekspresyon plazmidini içeren PLGA:kitosan nanopartikülleri uygulanmıştır. Araştırmacılar uygulamadan 2 hafta sonra retinada yoğun bir K5 ekspresyonu bildirirken ve K5-NP'nin KNVM üzerinde uzun süreli inhibitör etki sağladığını göstermişlerdir.

Yang ve ark [173] ise kitosanın intravitreal tamponad materyali olarak kullanmak için uygun bir madde olup olmadığını araştırmak için planladıkları çalışmada, intravitreal kitosan uyguladıkları tavşanları 30 gün inflamatuvar reaksiyon açısından takip etmişler ve takip süresinde ön ve arka segment muayenelerini ve göziçi basıncı değişimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar tavşanların feda edilmesinden sonra alınan göz dokularında da kornea, lens, silier cisim ve retinadaki morfolojik değişiklikleri ve aköz ve vitreus sıvılarında inflamatuvar markerları incelemişler ve inflamatuvar markerlarda anlamlı düzeyde olmayan bir yükseklik dışında anormal bir sonuç izlememişlerdir. Araştırmacılar bu verilere dayanarak kitosanın intravitreal tamponad ajanı olarak güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

4.2.2. İmunohistokimya Sonuçları

Göz dokusundan alınan kesitler, imunohistokimyasal boyamalar sonrası floresan mikroskop altında incelendiğinde kontrol grubunda hemen hemen hiç ışımaya gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5.A1-A4). Buna benzer şekilde ilaç grubunun 1.ve 3. gününde

anlamalı bir ışımaya gözlemlenmemiştir, ancak 5. günde bir miktar ışımaya ortaya çıkıp 7. günde ortadan kaybolmuştur (Şekil 4.5.B1-B4). Buna karşın, ilaçlı nanopartikül grubu tüm günlerde çeşitli miktarlarda ve skleranın çeşitli pozisyonlarında ışımaya vermiştir (Şekil 4.5.C1-C4). Özellikle 3. günde skleranın orta kısımlarında agregat olmuş bir grup partikülün bulunduğu bir alan gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.C2).



Şekil 4.5. Skleranın immünohistokimyasal boyamaları: A) Kontrol grubu A1:1., A2:3., A3:5. ve A4:7. gün sonuçları, B) İlaç grubu B1:1., B2:3., B3:5. ve B4:7. gün sonuçları, C) İlaç yüklü nanopartikül grubu C1:1., C2:3., C3:5. ve C4:7. gün sonuçları

Daha sonraki günlerde ise benzer bir yapı gözlenmemiş, partiküllerin dağıldıkları ve giderek miktarlarının azaldıkları ortaya konmuştur (Şekil 4.5.C3,C4). Skleral kesitlerde ilaçlı partikül grubunda 3. gün incelemelerinde elde edilen bu görüntüde, partiküllerden alınan ışımaların, bant şeklinde, skleranın yapısı ile uyumlu bir ışımaya olduğu izlenmektedir

[85]. Bu kesitlerde izlenen ışımada, serbest ilaç verilen grupta elde edilen homojen ışımının aksine, ilaç moleküllerinin grup halinde kümelenmiş olduğu da görülmektedir. Bu veriler, bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin sklerada bir miktar ilerleme kaydettikleri şeklinde yorumlanmıştır.

Literatürde nanopartiküllerin transskleral geçişlerini inceleyen çalışmalara bakıldığında farklı sonuçlar bildirildiği görülür.

Amrite ve ark [174] 20 nm ve 200 nm boyutlarında modifiye karboksile polisteren ve bodipy yüklü flourosein nanopartiküllerin perioküler enjeksiyonu sonrası sistemik ve oküler dokulardaki konsantrasyonlarını incelemiştir. Araştırmacılar, 20 nm boyutlarındaki parçacıkların sklera boyunca ilerlediklerini fakat sklera-BK-RPE hattını geçemediklerini, 200 nm boyutlarındaki parçacıkların ise sklerayı geçemediklerini bildirmişlerdir.

Amrite ve ark'nın [175] bir başka çalışmasında da, 20 nm, 200 nm ve 2 mikron boyutlarında flourosein işaretli polisterene nano-mikropartiküllerin subkonjunktival enjeksiyon sonrası göz dokularında dağılımını incelemiştir. Araştırmacılar partiküllerin büyüklüğe bağlı bir temizlenme eğrisine sahip olduğunu, 20 nm'lik küçük nanopartiküllerin 200 nm ve 2 mikronluk partiküllere oranda çok daha hızlı temizlendiğini, 2 ay sonra enjeksiyondan perioküler dokularda 20 nm boyutlarındaki partiküllerin hiç gözlemlenmediğini, 200 nm'lik partiküllerin ise gözlemlenebildiğini bildirmişlerdir.

Bourges ve ark.'nın [176] çalışmasında ise boyutları ortalama 140 ± 20 nm olan Rh yüklü PLA-PMMA-co-MA nanopartikülleri ile boyutları 310 ± 40 nm olan Nr PLA-PVA nanopartiküllerin oluşan $5 \mu\text{gr}$ 'lık karışımın sıçan gözünde intravitreal enjeksiyon sonrası farmakokinetiğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, farklı yük ve büyüklükteki nanopartiküllerin vitreustan retina tabakalarına doğru ilerlediğini ve RPE hücrelerinde biriktiğini göstermişlerdir.

Bejjani ve ark (177) da Rhodamine-6G yüklü PLA nanopartiküllerin RPE'ne direk gen transferi için kullanımına uygun olup olmadığını araştırdıkları çalışmada, 140 ± 20 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin intravitreal enjeksiyon sonrası RPE hücrelerini transfeke ettiğini göstermiş, bunun da nanopartiküllerin vitreustan bu dokulara doğru hareketinin göstergesi olarak yorumlamışlardır.

Suen ve ark [178] *in vitro* çalışmalarında, 130 nm triamsinolon asetonid yüklü folat-PEG-PCL nanopartiküllerin RPE hücreleri tarafından reseptör tarafından endosite edilerek hücre içine alındığını göstermişlerdir. Araştırmacılar, nanopartikülden 4 hafta boyunca ilaç salımı olduğunu göstermiş ve RPE hedefli tedaviler için folat-PEG-PCL nanopartiküllerin iyi bir aday olduğunu savunmuşlardır.

Literatürde etken maddenin nanopartiküllere yüklenmesinin transkleral geçiş üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmalarda kriter olarak ya ilacın hastalık üzerindeki tedavi edici etkisini veya serbest ilacın vitreustaki dozunun dikkate alındığı görülmektedir. Literatürde bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin transkleral geçişini inceleyen başka çalışma olmamakla birlikte farklı etken maddelerin, farklı taşıyıcı sistemlerle taşınmasının transkleral geçişte etkisini değerlendiren sınırlı sayıda çalışmada çalışma bulunmaktadır.

Kang ve ark [179] retinoblastom tedavisi için yüksek ve düşük dozda uygulanan subkonjuktival karboplatin yüklü dendrimerik nanopartiküllerin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında, tek doz uygulanan subkonjuktival karboplatinin yüklü dendrimerik nanopartiküllerin her iki dozda da etkin ve güvenilir bir tedavi sağladığını göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca yüksek doz yüklü nanopartikül uygulanan farelerde, diğer gözdeki tümör büyüklüğünde de anlamlı azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Shome ve ark [180], karboplatin nanomoleküllerinin nanopartikülere yüklü formunun transkleral geçişin değerlendirdikleri çalışmada, subkonjuktival uygulanan serbest karboplatin ile nanopartiküle yüklü karboplatinin transkleral geçiş sonrası intravitreal karboplatin düzeyini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar nanopartiküle yüklü karboplatin uygulanan gözlerde, vitreusta karboplatin düzeyinin daha erken yükselmeye başladığını ve bir hafta sonunda, nanopartiküle yüklü karboplatin uygulanan gözlerde vitreusta elde edilen karboplatin seviyesinin, serbest karboplatin elde edilen gözlere oranla anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark [181] *in vitro* ortamda kadavradan alınan insan sklerasında serbest doxorubisin ve vinkristinin skleradan geçişini, PLGA ve liposomal taşıyıcılara yüklenmiş doxorubisinin geçirgenliği ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, serbest doksorubisin sklera dokusuna nanopartiküle yüklü doksorubisine oranla daha fazla oranda tutunduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, floresen mikroskopi görüntülerinde de serbest doksorubisin uygulanan olgularda sklerada izlenen yaygın florosan görüntünün aksine nanopartiküle yüklü doksorubisin uygulanan olgularda, kümeleşmiş florosein tutulumları izlediklerini bildirmişlerdir.

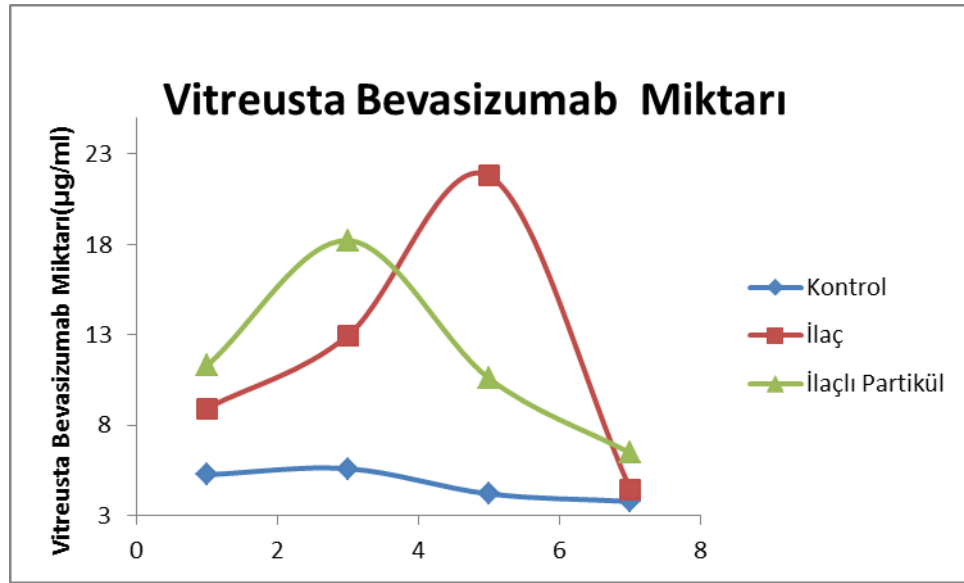
Bu çalışma kapsamında hazırlanan bevasizumab yüklü nanopartiküller gözü arka segmentindeki hastalıkların tedavisinde kullanılmak için tasarlanmış olmasına rağmen maalesef ülkemiz koşullarında hayvanlarda herhangi bir arka segment hastalık modelini oluşturacak araştırma merkezi bulunmadığından, transkleral geçiş etkinliği literatürdeki verilere dayanarak vitreustaki serbest bevasizumab moleküllerinin düzeyine göre

değerlendirilmiştir.

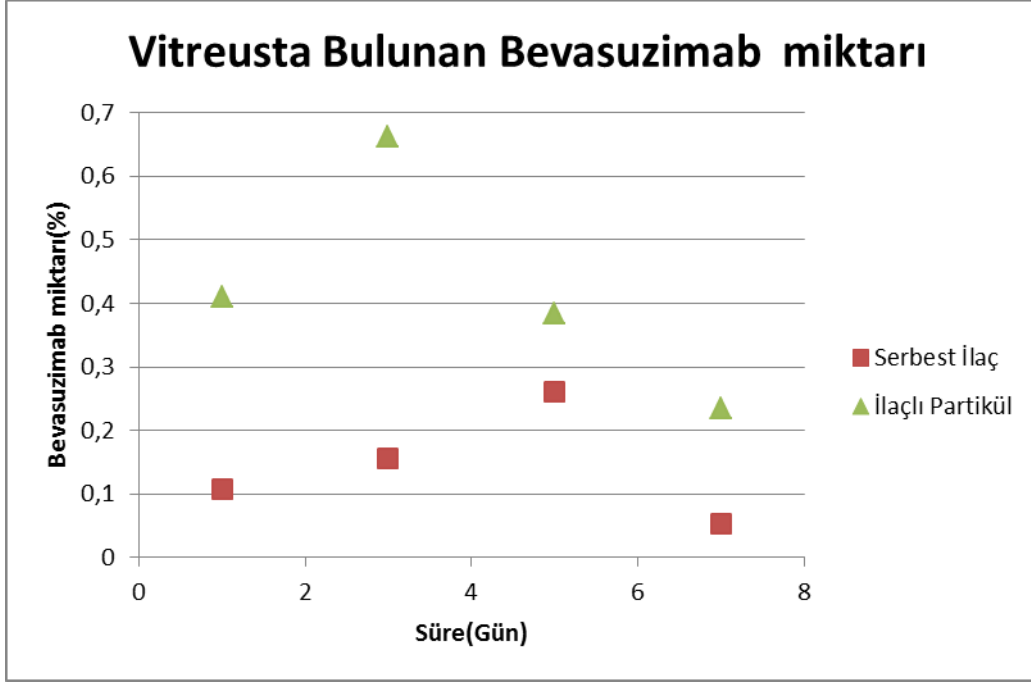
4.2.3. ELISA Sonuçları

Yapılan çalışma sonrasında, enjeksiyonu takip eden 1., 3., 5. ve 7. günlerde alınan kan ve vitreus örneklerinde bevasizumab miktarı ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda kontrol grubu olan ilaç yüklenmemiş kitosan nanopartikül minimal ve sabit bir oranda absorbans vermiştir. İlaç yüklenmiş nanopartikülde ise artışlar ve azalışlar mevcuttur. *In vivo* salım profili *in vitro* çalışmalarla uyumludur.

Vitreusta ölçülen bevasizumab düzeylerinin zamana göre değişimi, şekil 4.6'da, eliza ölçümleri sonucu vitreusta belirlenen bevasizumab miktarının başlangıçtaki bevasizumab miktarına oranını gösteren vitreusta bulunan bevasizumab miktarı ise şekil 4.7'de verilmiştir. Serumda ölçülen bevasizumab düzeylerinin zamana göre değişimi ise şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil.4.6.ELISA testi ile belirlenen, vitreustaki bevasizumab miktarları



Şekil 4.7.Vitreusta bulunan bevasizuamb miktarının başlangıç bevasizumab miktarına oranları

12.5 mg subtenon serbest bevasizumab enjekte edilen olgularda intravitreal bevasizumab düzeylerinin zamana göre değişimi incelendiğinde, bevasizumab seviyesinin, ilk üç günde yavaş bir artış gösterdiği, daha sonraki iki günde ise bu artışın hızlandığı, beşinci günden sonraysa vitreustaki bevasizumab düzeyinin hızla azaldığı izlenmektedir. Bu grupta, enjeksiyondan 1 gün sonra vitreustaki bevasizumab konsantrasyonu 8 $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçülürken, vitreustaki bevasizumab düzeyinin zirve değeri olan 21 $\mu\text{g/ml}$ düzeyine enjeksiyondan 5 gün sonra ulaşıldığı izlenmiş, enjeksiyondan 7 gün sonra ise vitreustaki bevasizumab düzeyinin 4 $\mu\text{g/ml}$ düzeyine düştüğü izlenmiştir (şekil 4.6). İlaç yükleme verimi 38 ± 22 olarak hesaplandığından, yüklü nanopartikül enjekte edilen grupta, enjekte edilen ilaç miktarı (4.75 mg), serbest ilaç enjekte edilen gruba oranla, daha düşük olmuştur. Yüklü nanopartikül enjekte edilen grupta, vitreustaki intravitreal bevasizumab düzeylerinin zamana göre değişimi incelendiğinde, bevasizumab seviyesinin, ilk üç günde hızlı bir artış gösterdiği, daha sonraki dört gün ise ilaç düzeylerinin düşmeye başladığı izlenmektedir. Vitreus bevasizumab düzeyi enjeksiyondan 1 gün sonra 11 $\mu\text{g/ml}$ düzeyine ulaşırken, enjeksiyondan 3 gün sonra, vitreustaki zirve değeri olan 18 $\mu\text{g/ml}$ değerine ulaşmış ve daha sonraki 4 gün yavaş yavaş azalarak, enjeksiyondan sonra 7. Günde 6 $\mu\text{g/ml}$

düzeyinde ölçülmüştür (şekil 4.6).

Transskleral yol, güvenilir ve etkin bir yöntem olmakla birlikte, günümüzde yaygın olarak sadece steroid tedavileri için yaygın olarak tercih edilmektedir [98-101], intraoküler tümörlerin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların uygulanmasında da etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır [102-104]. Klinik pratikte anti VEGF ajanlar transskleral olarak uygulanmamaktadır. Literatürde bevasizumb ve ranibizumab gibi anti VEGF ajanların transskleral geçişimi inceleyen sınırlı sayıda çalışma vardır.

Wen ve ark [182], insan sklerasının bevasizumab ve ranibizumab için transskleral geçişteki bariyer fonksiyonlarını değerlendirmek ve makromoleküllerin moleküler yapılarının insan sklerasından geçiş üzerindeki etkilerini incelemek için, bevasizumab, ranibizumab, florosein izosiyanat (FITC) işaretli sığır serum albümini (FITC-BSA), FITC-işaretli ficoll (FITC-ficoll) ve FITC-işaretli dekstran (FITC-dekstran) moleküllerinin in vitro ortamda insan sklerasından geçişlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar bevasizumab, ranibizumab, (FITC-BSA) moleküllerinin daha düşük transskleral geçirgenliğe ve daha uzun transport gecikme süresine sahip olduğunu bildirmişler ve bu durumun moleküler yapılarındaki farklılıklardan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Dekstranların lineer ve esnek bir yapıya sahip olmaları sebebiyle, skleral porlardan daha kolaylıkla geçebildiklerini savunan araştırmacılar bevasizumab ve ranibizumab moleküllerinin ise katı ve sert bir yapıda olmalarından dolayı geçiş süresince şekillerini kolaylıkla değiştiremediklerini ve bunun sonucu olarak daha büyük çapa sahip olan dekstranların daha küçük çapa sahip olan proteinlerden daha yüksek geçirgenliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Molekülün yapısının ve yükünün transskleral geçişte etkili faktörler olduğunu vurgulayan araştırmacılar ayrıca transskleral geçiş sonunda bevasizumab ve ranibizumabın yapısının stabil kaldığını ve ilacın aktivitesini sürdürdüğünü bildirmişlerdir.

Chopra ve ark [183] iyontoforesisin yüklü makromoleküllerin transskleral geçişi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, sığır serum albümini (BSA), polistrene sulfonik asit (PSA) ve bevasizumab moleküllerinin in vitro ortamda kadavradan elde edilen insan sklerasında pasif geçişi, anodal iyontoforesis ve katodal iyontoforesis altında geçişlerini ölçmüşlerdir. Her üç molekülün de transskleral geçişinin, hem anodal hem de katodal iyontoforesis ile arttığını gözlemleyen araştırmacılar, bevasizumabın anodal iyontoforesis uygulaması ile elde edilen transskleral geçişinin, pasif transskleral geçişi ve katodal iyontoforesis ile transskleral geçişine oranla da anlamlı oranda yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Pescina ve ark [184] da, iyontoforesisin bevasizumabın transskleral geçişi üzerindeki

etkilerini araştırdıkları çalışmada, FITC işaretli bevasizumab moleküllerinin iontoforesis uygulaması altında transskleral geçişini incelemişler ve anodal iyontoforesisin FITC işaretli bevasizumab moleküllerinin skleradan geçişini anlamlı olarak arttırdığını bildirmişlerdir.

Heiduscha ve ark [185] ise intravitreal enjekte edilen bevasizumab moleküllerinin retina tabakalarındaki penetrasyonunu inceledikleri çalışmalarında, intravitreal bevasizumab ve ¹²⁵I işaretli bevasizumab verdikleri maymun gözlerinden alınan kesitlerde, bevasizumab moleküllerinin retinaya penetre olduğunu belirterek RPE, koroid ve fotoreseptör dış segmentlerinde bevasizumab moleküllerinin görüntülemişlerdir. Bevasizumabın fotoreseptör dış segmentlerine muhtemelen vitreustan direk olarak gitmiş olduğunu savunan araştırmacılar, bunun yanında, hızla sistemik dolaşıma geçen bevasizumab moleküllerinin, bruch membranını geçerek RPE'ne ve oradan fotoreseptör dış segmentlerine ulaşmış olma ihtimalinin de tamamen dışlanamayacağını ifade etmişlerdir. Birinci yolun daha muhtemel olduğunu savunan araştırmacılar, bu görüş destekleyen kesin bir delil olmamasına rağmen, kesitlerin incelenmesi sonucunda bruch membran veya RPE tabakasında harabiyete dair herhangi bir bulgunun izlenmemiş olmasını ve enjeksiyondan 7 sonra dahi retinanın tüm tabakalarında radyoaktivitenin izlenmesini, birinci görüşü destekleyen bulgular olarak ifade etmişlerdir.

Shahar ve ark [186] da intravitreal 2.5 mg bevasizumab enjeksiyonu yaptıkları tavşanlarda bevasizumabın retinal penetrasyonunu ve güvenilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar enjeksiyondan 1 gün sonra tüm retinal tabakalarda bevasizumab moleküllerini izlediklerini bildirirken bu bulgunun klinik sonuçlarla da uyumlu olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmada elde edilen elektrofizyolojik testlerin sonuçları da bevasizumabın retina için toksik olmadığını göstermiştir.

Mordendi ve ark [187] , maymunlarda yaptıkları çalışmada intravitreal uyguladıkları ¹²⁵I işaretli tam uzunlukta insan ruMab HER2 antikorunun retina tabakalarına geçişini incelemişlerdir. Araştırmacılar enjeksiyondan 1 saat sonra ve 1, 3, 7 ve 14 gün sonra sakrifiye ettikleri olguların göz dokularında mikrootoradyografik olarak uygulanan antikorun retina tabakalarını dağılımını incelemişler ve hiçbir değerlendirme periyodunda, antikorun retina tabakalarına geçişinin izlenmediğinin bildirmişlerdir.

Shahar ve ark [186] sonuçlardaki bu farklılığın sebeplerini açıklarken, her iki çalışmada kullanılan antikorun yapısının farklı olmasının, retinal geçişin değerlendirilmesinde kullanılan tetkiklerin farklı olmasının ve her iki çalışmada uygulanan antikor dozlarının farklı olmasının, farklı sonuçlar elde edilmesine sebep olabileceğini savunmuşlardır.

Olsen ve ark [188] mikrokantül yardımıyla suprakoroidal alana uygulanan bevasizumabın farmakokinetiğini ve doku dağılımını incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, domuz gözlerinde bir gruba intravitreal bevasizumab, bir gruba da suprakoroidal alana mikrokantül yardımıyla viskoelastik madde içinde bevasizumab enjekte etmişlerdir. Araştırmacılar, intravitreal alana enjekte edilen bevasizumabın, çoğunlukla iç retinal tabakalara geçtiğini, suprakoroidal alana enjekte edilen bevasizumabın ise bruch membranı, RPE ve fotoreseptör dış segmentlerinde lokalize olduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun yanında araştırmacılar, intravitreal bevasizumabın aynı dozdaki suprakoroidal bevasizumaba oranla daha uzun süreli bir farmakolojik profil gösterdiğini fakat suprakoroid alana enjekte edilen bevasizumabın, serumda hızlı bir zirve değerine ulaştıktan sonra hızla gözden temizlendiğini ve göz dokularındaki konsantrasyonunun hızla düştüğünü ifade etmişlerdir. Literatürde bevasizumab yüklü nanopartiküllerin subtenon uygulama sonrası farmakokinetiğini araştıran herhangi bir çalışma bulunmazken, subtenon uygulanan serbest bevasizumabın in vivo ortamda transskleral geçişi konusunda bilgi veren yalnızca tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada Nomoto ve ark [189] tavşan gözlerine topikal, subkonjoktival ve intravitreal yolla enjekte edilen bevasizumabın farmakokinetiğini araştırmak amacıyla, enjeksiyonundan sonra 12 hafta boyunca serumdan ve göziçi sıvılarından alınan örneklerde bevasizumab seviyesini ölçmüşlerdir. Araştırmacılar, 1.25 mg/0.05ml subkonjoktival bevasizumab enjeksiyondan iki hafta sonra vitreustaki bevasizumab konsantrasyonunun 11.1 ± 1.0 ng/ml, serumda ise 3733.1 ± 174.9 ng/ml olarak bildirmişlerdir. Bu çalışma, subtenon alan uygulanan bevasizumabın farmakokinetiğini incelemesi bakımından sunulan çalışmaya benzemekle birlikte, sunulan çalışmadan iki yönüyle farklıdır. İlk olarak Nomoto ve ark. 1.25 mg bevasizumab enjeksiyonu yapmışlardır ve sunulan çalışmaya oranla daha uzun süreli sonuçlar vermişlerdir.

Sunulan çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar Nomoto ve ark'nın sonuçları ile karşılaştırıldığında, bildirilen serum bevasizumab düzeylerinin birbirine oldukça yakın olduğu, bildirilen vitreus bevasizumab düzeyleri arasında ise farklılık olduğu izlenmektedir. Transskleral geçiş kompleks bir süreçtir ve bu süreçte pek çok farklı statik, dinamik ve metabolik bariyerler ilacın eliminasyonunda rol alır [190]. Bu sebeple transskleral olarak uygulanan ilacın başlangıç dozundaki farklılıklar, ilacın vitreustaki konsantrasyonuna direk olarak yansımayaabilir.

Robinson ve ark. literatürde, transskleral geçiş konusunda sıklıkla refere edilen çalışmalarında 6 grup tavşana farklı dozlarda ve farklı skleral hazırlıkları takiben subtenon triamsinolon asetonid uygulamışlar ve transskleral geçiş üzerinde etkili olan statik ve

dinamik faktörleri araştırmışlardır. Araştırmacılar 10 mg subtenon triamsinolon enjeksiyonundan 3 saat sonra vitreusta ölçülebilir düzeyde bir ilaç konsantrasyonu elde edemezken, 20 mg subtenon triamsinolon enjeksiyonundan 3 saat sonra vitreusta 16.56 ± 16.4 µg/ml ilaç konsantrasyonu elde etmişlerdir [190]. Araştırmacılar 10 mg triamsinolon asetonid uygulamasında, ilacın subtenon bölgedeki yıkanma (clearance) hızı aşılamazken 20 mg triamsinolon uygulamasında bu hızın aşıldığı ve vitreusta 16.56 ± 16.4 µg/ml ilaç konsantrasyonu elde edildiği yorumunu yapmışlardır. Robinson ve ark daha önce triamsinolon asetonitin farmakokinetik modelini inceledikleri çalışmanın verilerine atıfta bulunarak [191] 10 mg triamsinolon asetonid-depo formunun 8 µg/saat, 20 mg triamsinolon asetonid-depo formunun 13 µg/saat olduğu göz önüne alındığında, triamsinolon asetonitin subtenon bölgeden temizlenme hızının 8 ile 13 µg/l arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Shahar ve ark [186] yaptıkları çalışma kapsamında intravitreal uygulanan bevasizumab moleküllerinin retina tabakalarına geçişini göstermelerine rağmen, Mordenti ve ark'nın [187] çalışmasında uygulanan tüm uzunlukta antikoron retinal tabakalara geçişinin gösterilememesinin sebeplerinin açıklarken, uygulanan miktarın artırılmasının geçişi arttıran sebeplerden bir olabileceğinin savunmuşlardır. Araştırmacılar iki çalışmada uygulanan dozlar arasında yaklaşık 100 katı fark olmasına dikkati çekerek (sırası ile 25µg/2.5mg), uygulanan dozun artırılmasının, geçiş esnasındaki bariyerlerin aşılmasında etkin olabileceği sonucuna varmışlardır.

Transskleral geçiş konusunda yapılmış çalışmalar incelendiğinde, benzer sonuçların bildirildiği izlenmektedir. Inaue ve ark [192] subtenon bölgeye 5 mg veya daha az triamsinolon asetonid depo formu enjekte ettiklerinde, enjeksiyondan 5.5 gün sonra olguların çoğunda vitreusta ölçülebilir düzeyde bir ilaç konsantrasyonu elde edemezken, Thomas ve ark [193] ise 40 mg depo subtenon triamsinolon enjeksiyonundan 4 hafta sonra bile sonra vitreusta ölçülebilir düzeyde ilaç konsantrasyonu elde ettiklerinin bildirmişlerdir. Depo kortikosteroid kullanılan hayvan çalışmalarında [194] vitreus ilaç düzeyinin subkonjunktival veya subtenon enjeksiyondan 24-72 saat sonra en yüksek olduğu, daha sonra 1-2 hafta içinde hızla düşerek ölçülemeyecek düzeye düştüğü bildirilmektedir. Buradaki hızlı düşüşün sebebini araştırmacılar, deponun zamanla küçülmesi sebebiyle salınan ilaç miktarının azalarak, temizlenme (clearance) için eşik değer olan düzeyin altına inmesi ve böylece temizlenme mekanizmalarını aşamaması olarak yorumlamışlardır [190]. Nanopartiküle yüklü bevasizumab enjekte edilen olgularda vitreusta elde edilen bevasizumab düzeyleri incelendiğinde, maksimum vitreus bevasizumab düzeyinin

enjeksiyondan 3 gün sonra 18 µg/ml olarak elde edildiği ve enjeksiyondan 7 gün sonra dahi vitreusta 6 µg/ml düzeyini koruduğu izlenmektedir (şekil 4.6). İki grup arasında vitreustaki maksimum ilaç düzeyleri karşılaştırıldığında serbest bevasizumab enjekte edilen olgularda maksimum bevasizumab konsantrasyonu, bevasizumab yüklü nanopartikül enjekte edilen olgulara oranla daha yüksek görünmekle birlikte (sırasıyla 21 µg/ml/18 µg/ml) bu fark başlangıçtaki bevasizumab miktarlarından kaynaklanmaktadır. Yukarıda da özetlendiği gibi her iki gruba da 12.5 mg bevasizumab verilmekle birlikte ikinci grupta bevasizumab kitosan nanopartiküle yüklendiğinden ve yaklaşık %38 oranında bir verimle yükleme sağlanabildiğinde, bu grupta verilen gerçek bevasizumab miktarı diğer gruba oranla üçte bir oranındadır yani bu gruba yaklaşık 4.75 mg düzeyinde bevasizumab enjeksiyonu yapılmıştır. Öte yandan, yüzdece vitreusta bulunan bevasizumab miktarlarını incelendiğinde, vitreusta bulunan bevasizumab miktarının başlangıç bevasizumaba oranının nanopartiküle yüklü bevasizumab enjeksiyonu yapılan olgularda serbest bevasizumab enjekte edilen olgulara oranla daha yüksek olduğu izlenmektedir. Enjeksiyondan sonra örnek alınan tüm günler için bu durum geçerlidir (şekil 4.7).

Bu veriler immunohistokimyasal incelemelerle birlikte değerlendirildiğinde, nanopartiküle yüklemenin, bevasizumabın hem transskleral geçişini kolaylaştırdığı hem de kontrollü salımı sağlayarak, vitreusta daha uzun süre daha yüksek konsantrasyonu sağladığı görülmektedir. Özetle hedeflenen intravitreal konsantrasyona ulaşmak için nanopartiküle yüklü ilaç uygulamasında daha az ilaç uygulamak gerekmektedir.

Bevasizumab tüm dünyada 50'nin üzerinde göz hastalığının tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan bir ilaç olmasına rağmen göz hastalıkları için kullanımında FDA onayı olmadığından halen endikasyon dışı (off-label) olarak bir ilaçtır bu nedenle hayvan veya insan gözlerinde bevasizumab farmakokinetiğini araştıran çok sınırlı sayıda yayın vardır. Gerek insan gerekse hayvan gözlerinde bevasizumab farmakokinetiğini inceleyen bu az sayıda çalışma incelendiğinde de bildirilen veriler arasında ciddi farklılıklar olduğu izlenmektedir [189,190,195-197] .

Zhu ve arkadaşları [196], koroid neovasküler membran tanısı ile intravitreal bevasizumab tedavisi yapılan 11 hastanın gözünden aldıkları vitreus örneklerinde bevasizumab farmakokinetiğini araştırmışlar ve bevasizumabın vitreusta iki kompartmanlı bir model izlediğini ve yarılanma ömrünün başlangıç ve terminal yarılanma ömürleri olarak sırasıyla 0.5 ve 6.7 gün olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ilk fazın hızlı bir dağılım fazı olduğunu ikinci fazın ise eliminasyon fazı olduğunu ve bu fazdaki bevasizumab yıkımının birinci derece kinetiğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Csaky ve ark[198] ise 18 olguda 1.25 mg intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrasında elde edilen bevasizumab konsantrasyonunun 80-170 µg/ml arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bevasizumabın vitreusta yarılanma ömrünün insanda 10 gün olduğunu ve birinci derece kinetiğine sahip olduğunu bildirmişlerdir . Zhu ve ark. ilk fazda vitreus boşluğunda çok hızlı bir bevasizumab dağılımı olduğundan intravitreal bevasizumab dozunda çok hızlı bir düşüş olduğunu, bu nedenle bu fazda çok sık örneklem yapılmazsa, bu fazın atlanarak yanlılıkla yıkımın tek fazlı modele sahipmiş gibi algılanabileceğini de bildirmişlerdir.

Bakri ve ark [195] tavşanlarda intravitreal bevasizumabın dağılımını ve farmakokinetiğini incelemişler ve bevasizumabın vitreusta 400 µ/ml'lik zirve konsantrasyonuna 1. günde ulaştığını ve yarılanma ömrünün 4.32 gün olduğunu, 8. günde intravitreal bevasizumab dozunun yaklaşık 100 µ/ml düzeylerinde olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar intravitreal uygulamadan sonra bevasizumab düzeylerinin serumda 8 günde zirve yaptığını (3.3 µg/ml) ve 6.86 günlük bir yarılanma ömrüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Sinapis ve ark [197] da yine tavşanlarda intravitreal bevasizumabın dağılımını ve farmakokinetiğini incelemişler ve bevasizumabın vitreusta enjeksiyondan 1 gün sonra 406 µg/ml'lik zirve konsantrasyonuna ulaştığını ve yarılanma ömrünün 6.61 gün olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar serum bevasizumab düzeylerinin intravitreal enjeksiyondan 8 gün sonra zirve değeri olan 0.413 µg/mL düzeyine ulaştığını ve 5.87 günlük bir yarılanma ömrüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Nomoto ve ark [189] ise tavşanlarda topikal, subkonjoktival ve intravitreal uygulama sonrası bevasizumabın farmakokinetiğini araştırmışlar ve intravitreal uygulama sonrasında bevasizumabın vitreusta yarılanma ömrünün yaklaşık 6 gün olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ilk bir hafta sonunda subkonjoktival enjeksiyon uygulanan gözlerde intravitreal bevasizumab konsantrasyonun 11.1 +1.0 ng/ml, intravitreal bevasizumab uygulanan gözlerde ise 59,730.8 ng/ml olarak bildirmişlerdir.

Bu sonuç farklılığının temel sebepleri oküler anatomisinin farklılığı ve bevasizumab düzeyi ölçüm yöntemlerinin farklılıkları olabilir. Konu ile ilgili literatürde yer alan bazı çalışmalarda insan, bazı çalışmalarda ise tavşan gözleri kullanılmıştır. Fakat sonuçlar incelendiğinde insan gözlerinde yapılan çalışmaların ve tavşan gözlerinde yapılan çalışmaların kendi aralarında da farklılık gösterdiği izlenmektedir ki bu durumun bevasizumab düzeyini belirlemede kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklandığı ifade edilmektedir.

Bakri ve ark sadece serbest bevasizumabı tanıyan bir yöntem kullanırken, Nomoto ve ark.

tavşan bevasizumabın hem hafif hem ağır zincirine bağlanabilme özelliği olan tavşan anti-human IgG kullandıklarından, hem VEGF' e bağlı bevasizumab düzeyini hem de serbest bevasizumab düzeyini ölçmüşlerdir.

Sunulan çalışmada, intravitreal enjeksiyon yapılmadığından, vitreusta sabit bir başlangıç dozu bulunmamaktaydı, vitreustaki bevasizumab dozu doz transskleral geçişle zamanla artmaktaydı. Bu nedenle bevasizumabın yarı ömrünü hesaplama imkanı olmamıştır. Bunun yanında vitreusta ölçülen bevasizumab düzeylerinin zamana göre değişimi incelendiğinde serbest bevasizumab verilen olgularda, maksimum bevasizumab dozunun (21 µg/ml) 2 gün içinde hızla azalarak 4 µg/ml düzeyine düştüğü, nanopartiküle yüklü bevasizumab enjekte edilen olgularda da benzer şekilde maksimum bevasizumab düzeyinin (6 µg/ml) hızla azaldığı izlenmektedir (şekil 4.6). Yukarıda ifade edildiği gibi, transskleral geçiş süresince bu sürede vitreusta sadece bevasizumab temizlenmesi (clearance) değil aynı zamanda transskleral yolla gelen bevasizumab da olduğundan, bu sonuçlar direk olarak vitreustaki bevasizumab yarıömrünü vermemekle birlikte bevasizumab yıkım hızı hakkında bir fikir vermektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki gruptaki olgularda da bevasizumabın literatürdeki verilere oranla çok daha hızlı bir şekilde yıkıldığı izlenmektedir. Bu farklılığın sebebinin vitreustaki bevasizumab düzeylerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bakri ve ark'nın çalışmasında 1.25 mg intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrasında bevasizumab yarı ömrü hesaplanmıştır ve bu çalışmada vitreusta elde edilen düzey 400 µg/ml, yarılanma ömrü 4.32 gündür. Synapis ve ark. çalışmasında da vitreusta elde edilen bevasizumab düzeyi 406 µg/ml, yarılanma ömrü 6.61 gün olarak bildirilmiştir. Sunulan çalışmada elde edilen maksimum bevasizumab düzeyleri iki grup için 21 µg/ml ve 18 µg/ml dir. Açıkça görülebildiği gibi Bakri ve Synapis'in çalışmaları ile sunulan çalışmada elde edilen vitreus bevasizumab düzeyleri arasında ciddi fark bulunmaktadır. Literatürde farklı dozlarda intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrası bevasizumab farmakokinetiğini inceleyen bir çalışma bulunmamakla birlikte farklı dozlarda intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrası ön kamaradaki bevasizumab farmakokinetiğini inceleyen bir çalışma vardır. Meyer ve ark [199], diabetik maküler ödem, KNVM ve ven tal tıkanıklığı tanısı almış 29 olguya intravitreal bevasizumab tedavisi uygulamışlardır. Olguların 13 tanesine 1.5 mg, 16 tanesine de 3.0 mg bevasizumab uygulayan araştırmacılar enjeksiyondan sonraki takip süresinde (1-60 gün) olgulardan ön kamaradan aköz sıvısı olarak bevasizumabın intraoküler farmakokinetiğini araştırmışlardır. 1.5 mg bevasizumab enjekte edilen olgularda maksimum aköz bevasizumab konsantrasyonu 14.86 µg/ml olarak

ölçülürken, 3.0 mg bevasizumab enjekte edilen olgularda maksimum aköz bevasizumab konsantrasyonu 27.74 µg/ml olarak ölçülmüştür. Bu olgularda bevasizumabın aközde yarılanma ömürleri incelendiğinde 1.5 mg bevasizumab enjekte edilen olgularda yarılanma ömrü 7.85 gün olarak belirlenirken, 3.0 mg bevasizumab enjekte edilen olgularda yarılanma ömrü 11.69 gün olarak belirlenmiştir. Buradan da anlaşılacağı gibi bevasizumabın göz içi sıvılarında yarılanma ömrü, başlangıçtaki maksimum bevasizumab konsantrasyonu ile ilişkili olarak değişmektedir [199]. Sunulan çalışmada da her iki gruptaki maksimum intravitreal bevasizumab düzeyleri (21 µg/ml, 18 µg/ml) hem Bakri'nin çalışmasındaki (400 µg/ml), hem de Synopsis'in çalışmasındaki (406 µg/ml) düzeylerle karşılaştırıldığında çok düşük düzeylerde olduğundan, bu kadar hızlı bir şekilde vitreustan temizlenmeleri normaldir. Sonuç olarak bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular literatürdeki verilerle uyumludur.

Steroidler, antibiyotikler, antineoplastikler, NSAİ ajanlar ve bevasizumab tüm dünyada göz hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte, göz hastalıklarının tedavisi için FDA onayları olmadığından off-label (ruhsatlı endikasyon dışı) olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların, üretim ve geliştirme aşamasında göz hastalıklarına yönelik kullanım planlanmadığından, doza bağlı kontrollü in vitro ve in vivo etkinlik ve güvenilirlik çalışmaları yapılmamıştır bu nedenle bu ilaçların kullanımı, genelde piyasadaki formülasyonun toksik olmayan en yüksek dozu olarak tercih edilmektedir. Uygulama esnasında elde edilen ampirik ve anekdotal veriler, resmiyet kazanmadan aktarılmakta ve klinik uygulamaları yönlendirmekte ve bazen bu veriler klinik çalışmalarla detaylı olarak incelenmektedir [200].

Literatürde bevasizumabın iris, koroid ve retinal neovaskülarizasyonların tedavisi için gereken etkin terapötik konsantrasyonu konusunda kesin bir bilgi bulunmamaktadır. In vitro çalışmalar, endotel proliferasyonunun maksimum düzeyde inhibisyonu için gerekli bevasizumab dozunun 2.6 ile 1 molar arasında olduğunu göstermiştir. Bevasizumabın maximum yarım inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) 22ng/ml'dir ve VEGF-indüklenmiş endotel hücre çoğalması, migrasyon ve hiperpermeabilite dahil tüm VEGF aktivitelerini tamamen bloke eden bevasizumab dozu da 500 ng/ml'dir [201].

Arka segment hastalıklarındaki gerekli etkin tedavi dozu tam olarak bilinmemekle birlikte, literatürde arka segment hastalıklarının tedavisi için bevasizumab uygulanmış olgulardan elde edilen vitreus örneklerinden ölçülen değerleri bildiren çalışmalar vardır. Zhu ve ark'nın [196] çalışmasında KNVM tedavisi için bevasizumab tedavisi uygulanan gözlerden alınan vitreus örneklerinde, intravitreal bevasizumab konsantrasyonu 165 µg/ml olarak

ölçülmüştür.

Klettner ve Roider [202] *in vitro* ortamda, VEGF nötralizasyonu için çok az miktarlarda bevasizumab ve ranibizumabın yeterli olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, *in vitro* ortamda bevasizumabın 1 µg/mL konsantrasyonda VEGF ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirirken, bu değer eşik değer olduğunu, 975 ng/mL konsantrasyondaki bevasizumabın VEGF nötralizasyonunda etkisini kaybettiğini bildirmişlerdir. Thomas, intravenöz mikrodoz (1.25-2.5mg) bevasizumab uygulanan 37 hastanın 11'inde tam iyileşme, 11'inde ise parsiyel iyileşme izlediklerini, 15 hastada ise herhangi bir cevap alamadıklarını bildirmiş ve mikrodoz bevasizumab tedavisinin seçilmiş hastalarda ve göziçi enjeksiyonu reddeden hastalarda tercih edilebileceğini savunmuştur [203].

Avery ve ark [204], proliferatif diabetik retinopati tanısı olan 32 olgunun 45 gözüne 6.2 µg ile 1.2 mg arasında değişen dozlarda intravitreal bevasizumab enjeksiyonu uygulamış ve elde edilen anatomik ve görsel başarıyı değerlendirmiştir. Araştırmacılar 6.2 µg intravitreal bevasizumab uygulanan olguda dahi belirgin bir biyolojik etki elde edildiğini bildirmişlerdir.

Buna ek olarak, enjeksiyon sonrası, literatürde diğer gözde vitreus bevasizumab konsantrasyonlarının, enjeksiyon yapılan göze oranla çok düşük olarak bildirilmekle birlikte [189,195,197] enjeksiyon yapılmayan gözde de bevasizumaba bağlı etkilerin geliştiğini bildiren çalışmalar vardır [205-208].

Charbel Issa ve ark [205] tip 2 idiyopatik maküler telenjiyektazi tanısı ile intravitreal bevasizumab tedavisi uyguladıkları 5 olgunun 18 aylık takibini değerlendirdikleri çalışmada, intravitreal enjeksiyon uygulanmayan gözlerdeki lezyonlarda da düzelme izlendiğini bildirmişlerdir.

Mennel ve ark [206] yaş tip AMD tanısı olan bir olguda 4 ay boyunca 5 kez intravitreal bevasizumab enjeksiyonu uygulaması yaptıklarını ve bu sürede tedavi uygulanmayan gözde retina pigment epitel yırtığı geliştiğini rapor etmişlerdir.

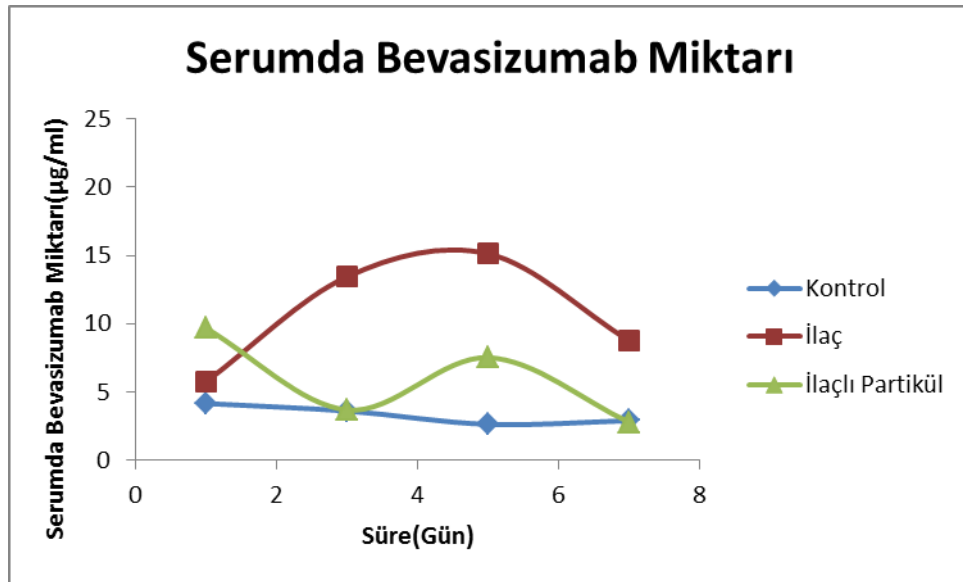
1.25 mg intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrasında tavşanlarda enjeksiyon yapılmayan gözlerde ölçülen en yüksek bevasizumab konsantrasyonları Bakri ve ark çalışmasında 11.17 ng/ml, Nomoto ve ark çalışmasında 6.7 ng/mL, Synopsis'in çalışmasında ise 0.335ng/ml olarak bildirilmiştir.

Bevasizumab uygulamalarında, başlangıçta elde edilen yüksek maksimum düzeyler, terapotik etkinin sağlanmasından çok, geleneksel yöntemlerle uygulanan serbest ilaç moleküllerinin vitreusta kalış süresini uzatmaktır [201].

Saati ve ark. tavşan retinal koroid neovaskülarizasyon modelinde tek doz bevasizumabın

intravitreal enjeksiyon olarak uygulanması ile aynı miktarın küçük dozlara bölünerek tekrarlayan enjeksiyonlar şeklinde uygulanması sonucunda elde edilen cevabı karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, gruplar arasında gerek retina kalınlığı, gerekse VEGF tarafından indüklenmiş vasküler değişiklikler açısından herhangi bir fark bulmadıklarını, VEGF tarafından indüklenmiş vasküler değişikliklerin tedavisinde tekrarlayan küçük doz uygulamasının, toplam dozun bir defada uygulanması kadar etkin olduğunu göstermişlerdir [209].

Yukarıda ifade edilen belirsizliğin giderilebilmesi için yapılan çalışmaların hastalık modeli oluşturulmuş hayvanlarda tekrarlanması konuya çözüm getirecektir.



Şekil.4.8.ELISA testi ile belirlenen serumdaki bevasizumab miktarı.

Serbest bevasizumab uygulanan oldulara serum bevasizumab düzeyi enjeksiyondan 3 gün sonra 13 µg/ml, 7 gün sonra ise 8 µg/ml olarak ölçülürken, nanopartiküle yüklü bevasizumab uygulanan gözlede elde edilen serum bevasizumab düzeyi enjeksiyondan 3 gün sonra 3 µg/ml, 7 gün sonra ise 2 µg/ml olarak ölçülmüştür. Bevasizumabın serumdaki maksimum seviyeleri incelendiğinde ise serbest bevasizumab enjekte edilen olgularda maksimum konsantrasyonun 5. günde 15 µg/ml düzeyinde izlenirken bevasizumab yüklü nanopartikül enjekte edilen olgularda ise serumdaki maksimum bevasizumab düzeyi 5. günde 7 µg/ml düzeyinde izlenmiştir (şekil 4.8). Yukarıda da ifade edildiği gibi serbest

bevasizumab uygulanan olgularda verilen toplam bevasizumab konsantrasyonu nanopartiküle yüklü bevasizumab verilen olgulara göre üç kat daha fazladır. Bu fark göz önüne alındığında, serum düzeyleri arasındaki fark, başlangıç ilaç dozlarından kaynaklanmaktadır, serum düzeyleri arasında iki grup arasında daha yüksek bir fark izlenmemiştir.

Bakri ve ark çalışmasında 1.25 mg intravitreal bevasizumab enjeksiyonu sonrasında serumda ölçülen maksimum bevasizumab düzeyi enjeksiyondan 8 gün sonra elde edilen 3.3 µg/ml olarak bildirilirken bevasizumabın serumda yarı ömrü 6.86 gün olarak bildirilmiştir. Synopsis'in çalışmasında ise maksimum serum bevasizumab konsantrasyonu yine enjeksiyondan 8 gün sonra elde edilen 0.413 µg/ml olurken, bevasizumabın serumda yarı ömrü 5.87 gün olarak bildirilmiştir.

Nomoto ve ark çalışmasında[189] 1.25 mg subkonjoktival bevasizumab enjeksiyonundan 1 hafta sonra serumda ölçülen maksimum bevasizumab düzeyi 3733.1 ng/mL olarak ölçülürken, bevasizumabın vitreustaki yarılanma ömrü 1.75 hafta olarak ölçülmüştür. Subkonjoktival ve intravitreal uygulanan bevasizumabın sistemik dolaşıma katılma özellikleri benzerdir [189].Sunulan çalışma kapsamında elde edilen serum bevasizumab düzeyleri literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışma kapsamında kullanılan yüksek dozlar dikkate alındığında elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Burada önemli olan sonuç, nanopartiküle yüklenmiş bevasizumab enjeksiyonu sonrasında, vitreusta hedeflenen terapötik bevasizumab dozunun sağlanması için serbest bevasizumaba oranla çok daha az ilaç kullanılacaktır dolayısıyla seruma geçen ilaç dozu da daha düşük olacaktır. Böylece bevasizumabın istenmeyen sistemik yan etkilerinin gelişme riski azaltılacaktır.

Literatürde intravitreal enjeksiyon sonrasında gelişen pek çok sistemik bevasizumab yan etkisi bildirilmiştir [107-108]. Bu yan etkiler hipertansiyon, tromboembolik olay ve ölüm gibi bevasizumabın sistemik olarak kullanıldığı kanser tedavisinde kullanımında görülenlere benzer yan etkilerdir. Nanopartiküle yüklü bevasizumab kullanımı ile hedeflenen dozun daha az sistemik ilaç düzeyi ile sağlanabilmesi yan etki sıklığının azalması açısından da önemli bir bulgudur.

Tavşan modeli, göze uygulanan ilaçların farmakokinetik incelemelerinin çalışılması için uygun bir modeldir [190].Tavşan sklerası insan sklerasına oranla daha incedir koroidal akım daha yüksektir [210].Tavşan modelinin insan modelinden diğer farkları da, tavşan retinasının insan retinasından daha az vasküler olması [211] hacim dağılımının insan

modelinden farklı olması ve lensin insan lensine oranla daha büyük olmasıdır. Bu farklılıklar insan gözü ile karşılaştırıldığında farmakokinetik değişikliklere neden olabilir. İnsanlarda vitreus hacmi ortalama 4.5 ml iken tavşanlarda 1.5 ml kadardır. Serum hacmi de insanlarda tavşanlardan çok daha fazla olduğundan, sistemik dolaşımdaki konsantrasyon insanlarda daha düşüktür. Tüm bu farklılıklarına rağmen göziçinde kullanılan ilaçların farmakokinetiğinin değerlendirilmesinde tavşan modeli literatürde en sıklıkla tercih edilen modellerden biridir [190]. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar direk olarak insanlar için kullanılamasa da, insan uygulamalarının geliştirilmesi konusunda çok önemli katkılar sağlayacaktır.

SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde:

1. 80-380 nm aralığında kitosan nanopartiküller sentezlenmiş ve bu nanopartiküllere bevasizumab yüklenmiştir. İlaç yükleme verimi 38 ± 22 olarak hesaplanmıştır. Sentezlenen bu nanopartiküllerin AFM ve zeta sizer ölçümleri alınarak karakterizasyonları yapılmıştır.
2. Sentezlenen bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerden ilaç yükleme dozuna bağlı olarak farklı salım profilleri elde edilmiştir. 12.5 mg bevasizumab yüklenen kitosan nanopartiküllerden ilk beş günde anlamlı oranda ilaç salımı olmazken, beşinci günden itibaren bir hafta süre ile yüksek miktarda ilaç salımı gerçekleşmiş ve bu salım azalmakla birlikte izlem yapılan 3 hafta boyunca sürmüştür.
3. Enjeksiyon sonrası yapılan kontrol muayenelerinde hiçbir gözde inflamatuvar veya alerjik bir reaksiyon gelişmemiştir.
4. Göz dokularından alınan örneklerin imünohistokmyasal incelemelerinde, bevasizumab yüklü kitosan nanopartikül verilen olgulardan özellikle enjeksiyondan 3 gün sonra alınan kesitlerde, skleranın yapısı ile uyumlu, bant şeklinde ışımalar izlenmiş ve bu ışımalar nanopartiküllerin sklerada bir miktar ilerlediklerinin göstergesi olarak yorumlanmıştır.
5. Eliza ölçümlerinde subtenon serbest bevasizumab enjekte edilen olgularda enjeksiyondan 1 gün sonra vitreustaki bevasizumab konsantrasyonu $8 \mu\text{g/ml}$ olarak ölçülürken, vitreustaki bevasizumab düzeyinin zirve değeri olan $21 \mu\text{g/ml}$ düzeyine enjeksiyondan 5 gün sonra ulaşıldığı izlenmiş, enjeksiyondan 7 gün sonra ise vitreustaki bevasizumab düzeyinin $4 \mu\text{g/ml}$ düzeyine düştüğü izlenmiştir.
6. Nanopartiküle yüklü bevasizumab enjekte edilen olgularda vitreusta elde edilen bevasizumab düzeyleri incelendiğinde, maksimum vitreus bevasizumab düzeyinin enjeksiyondan 3 gün sonra $18 \mu\text{g/ml}$ olarak elde edildiği ve enjeksiyondan 7 gün sonra dahi vitreusta $6 \mu\text{g/ml}$ düzeyini koruduğu izlenmektedir.
7. Yüzdece vitreusta bulunan bevasizumab miktarlarını incelendiğinde, vitreusta bulunan bevasizumab miktarının başlangıçta uygulanan bevasizumab miktarına oranının nanopartiküle yüklü bevasizumab enjeksiyonu yapılan olgularda serbest bevasizumab enjekte edilen olgulara oranla daha yüksek olduğu izlenmektedir.

Enjeksiyondan sonra örnek alınan tüm günler için bu durumun geçerli olduğu tespit edilmiştir.

8. Serbest bevasizumab uygulanan oldular da serum bevasizumab düzeyi enjeksiyondan 3 gün sonra 13 µg/ml, 7 gün sonra ise 8 µg/ml olarak ölçülürken, maksimum serum bevasizumab konsantrasyonun 5. günde 15 µg/ml düzeyinde izlenmiştir.
9. Nanopartiküle yüklü bevasizumab uygulanan gözlede elde edilen serum bevasizumab düzeyleri enjeksiyondan 3 gün sonra 3 µg/ml, 7 gün sonra ise 2 µg/ml olarak ölçülürken serumdaki maksimum bevasizumab düzeyi 5. günde 7 µg/ml düzeyinde izlenmiştir.
10. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sentezlenen nanopartiküllerin subtenon uygulama için güvenli olduğu ve herhangi bir reaksiyona sebep olmadığı izlenmektedir. İmmunohistokimyasal incelemeler ve vitreus ve serum bevasizumab düzeyleri incelendiğinde sentezlenen bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküllerin transskleral geçişe katkıda bulunduğu ve ilacın vitreusta kalım süresini arttırdığı görülmektedir. Bu veriler ışığında, bevasizumab yüklü kitosan nanopartiküller, arka segment hastalıklarının tedavisinde daha az invaziv bir yolla terapötik konsantrasyonu sağlayabilme konusunda umut verici olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sentezlenen nanopartiküllerin subtenon uygulama için güvenli olduğu ve herhangi bir reaksiyona sebep olmadığı izlenmektedir. İmmunohistokimyasal incelemeler ve vitreus ve serum bevasizumab düzeyleri incelendiğinde elde edilen bevasizumab yüklü nanopartiküllerin transskleral geçişe katkıda bulunduğu ve ilacın vitreusta kalım süresini arttırdığı görülmektedir. Bu konuda yeni çalışmaların özellikle hastalık oluşturmuş hayvan gözlerinde de yapılması konunun daha geliştirilmesine fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Eye Institute Of The Laurentians. Gözün Tabakaları, <Http://www.Institutdeloeil.com> (Mart, 2013)
2. Bird A., Age-Related Macular Disease, *British Journal of Ophthalmology*, 80, 2–3, 1996.
3. Ciulla, T.A., Amador, A.G., Zinman, B., Diabetic Retinopathy And Diabetic Macular Edema: Pathophysiology, Screening, And Novel Therapies, *Diabetes Care*, 26, 2653–2664, 2003.
4. Cugati, S., Wang, J.J., Rochtchina, E., Mitchell, P., Ten-Year Incidence of Retinal Vein Occlusion In an Older Population: The Blue Mountains Eye Study, *Archives of Ophthalmology*, 124, 726-732, 2006.
5. Chakravarthy, U., Augood, C., Bentham, G.C., Et Al. Cigarette Smoking and Age-Related Macular Degeneration In The EUREYE Study, *Ophthalmology*, 114, 1157-1163, 2007.
6. Campochiaro, P.A., Soloway, P., Ryan, S.J., Miller, J.W., The Pathogenesis of Choroidal Neovascularization in Patients with Age-Related Macular Degeneration, *Molecular Vision*, 5, 34, 1999.
7. Green, W.R., Wilson, D.J., Choroidal Neovascularization. *Ophthalmology*, 93, 1169–1176, 1986.
8. Ryan, J.S., Retina, 2. Cilt, 4. Baskı, Saunders, 2005.
9. Vision And Eye Health, KNVM'nın Göz Kesitlerinde Görünümü, <Http://Www.Vision-And-Eye-Health.Com/Macular-Degeneration-Types.Html> (Mart 2013)
10. Kwak, N., Okamoto, N., Wood, J.M., Campochiaro, P.A., VEGF Is Major Stimulator in Model Of Choroidal Neovascularization, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3158–3164, 2000.
11. Green, W.R., Enger, C., Age-Related Macular Degeneration Histopathologic Studies, *Ophthalmology*, 100, 1519–1535, 1993.
12. Grossniklaus, H.E., Hutchinson, A.K., Capone, A. J., Clinicopathologic Features of Surgically-Excised Choroidal Neovascular Membranes, *Ophthalmology*, 101, 1099–1111, 1994.

13. Grossniklaus, H.E., Green, W.R., For The Submacular Surgery Trials Research Group, Histopathologic and Ultrastructural Findings Of Surgically-Excised Choroidal Neovascularization, *Archives of Ophthalmology*, 116, 745–749, 1998.
14. Folkman, J., Clinical Applications Of Research On Angiogenesis, *The New England Journal of Medicine*, 333,1757–1763, 1999.
15. Ohno-Matsui, K., Morita, I., Tombran-Tink, J., Novel Mechanism For Age-Related Macular Degeneration: An Equilibrium Shift Between the Angiogenesis Factors VEGF And PEDF, *Journal of Cellular Physiology*, 189, 323–333, 2001.
16. Martin, G., Schlunck, G., Hansen, L.L., Agostini, H.T., Differential Expression of Angioregulatory Factors In Normal And CNV-Derived Human Retinal Pigment Epithelium, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 242:321–326, 2004.
17. Qazi, Y., Maddula, S., Ambati, B.K.J., Mediators of Ocular Angiogenesis, *Genetics*, 88, 495–515, 2009.
18. Tong, J.P., Yao, Y.F., Contribution of VEGF And PEDF to Choroidal Angiogenesis: A Need For Balanced Expressions, *Clinical Biochemistry* , 39, 267-276, 2006.
19. Gao, G., Li, Y., Zhang, D., Unbalanced Expression of VEGF and PEDF in Ischemia-Induced Retinal Neovascularization, *FEBS Letters*, 489,270–276, 2001.
20. Witmer, A.N., Vrensen, G.F., Van Noorden, C.J., Schlingemann, R.O., Vascular Endothelial Growth Factors And Angiogenesis in Eye Disease, *Progress in Retinal and Eye Research*, 22, 1-29, 2003.
21. Tawara, A., Kubota, T., Hata, Y., Neovascularization in The Anterior Segment of the Rabbit Eye by Experimental Anterior Ischemia, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 240, 144–153, 2002.
22. Krzystolik, M.G., Afshari, M.A., Adamis, A.P., Prevention Of Experimental Choroidal Neovascularization With intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Fragment, *Archives of Ophthalmology*, 120, 338–346, 2002.
23. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology Of Vascular Endothelial Growth Factor, *Endocrine Reviews*, 18:4–25, 1997.
24. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Vascular Endothelial Growth Factor is a Secreted Angiogenic Mitogen, *Science*, 246,1306–1309,1989
25. Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi ,C.A., Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation Of Ascites Fluid, *Science*, 25, 219, 983-985, 1983.

26. Ferrara, N., Henzel, W.J., Pituitary Follicular Cells Secrete A Novel Heparin-Binding Growth Factor Specific For Vascular Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989. Commun, 31;425, 540-547, 2012.
27. Carmeliet, P., Jain, R.K., Angiogenesis in Cancer and other Diseases, *Nature*, 407, 249–257, 2000.
28. Eriksson, U., Alitalo, K., Structure, Expression And Receptor-Binding Properties Of Novel Vascular Endothelial Growth Factors, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 237,41–57, 1999
29. Breen, E.C., VEGF in Biological Control, *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 1358-1367, 2007.
30. Ferrara, N., Gerber, H.P., Lecouter, J., The Biology of VEGF and Its Receptors, *Nature Medicine*, 9, 669–676, 2003.
31. Ferrara, N., Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science And Clinical Progress, *Endocrine Reviews*, 25,581–611, 2004.
32. Rahimi, N., Vascular Endothelial Growth Factor Receptors: Molecular Mechanisms of Activation and Therapeutic Potentials, *Experimental Eye Research*, 83, 1005-1016, 2006.
33. Robinson, C.J., Stringer, S.E., The Splice Variants Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And Their Receptors, *Journal of Cell Science*, 114, 853-865, 2001.
34. Macular Photocoagulation Study Group. Argon Laser Photocoagulation For Idiopathic Neovascularization: Results Of A Randomized Clinical Trial, *Archives of Ophthalmology*, 101:1358-1361, 1983.
35. Treatment Of Age-Related Macular Degeneration Using Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic Therapy of Subfoveal Choroidal Neovascularization in Agerelated Macular Degeneration With Verteporfin: One-Year Results Of 2 Randomized Clinical Trials. TAP Report 1, *Archives of Ophthalmology*, 117,1329–1345, 1999.
36. Bhisitkul, R.B.,Vascular Endothelial Growth Factor Biology: Clinical Implications for Ocular Treatments, *British Journal of Ophthalmology*, 90, 1542–1547, 2006.
37. Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham E.T., VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group, Pegaptanib For Neovascular Age-Related Macular Degeneration, *The New England Journal of Medicine*, 351, 2805–2816, 2004.

38. Bashshur, Z.F., Haddad, Z.A., Schakal, A., Intravitreal Bevacizumab For Treatment Of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A One-Year Prospective Study, *American Journal of Ophthalmology*, 145, 249–256, 2008.
39. Weigert, G., Michels, S., Sacu, S., Intravitreal Bevacizumab (Avastin) Therapy Versus Photodynamic Therapy Plus Intravitreal Triamcinolone For Neovascular Age-Related Macular Degeneration: 6-Month Results Of A Prospective, Randomised, Controlled Clinical Study, *British Journal of Ophthalmology*, 92, 356–360, 2008.
40. Mekjavic, P.J., Kraut, A., Urbancic, M., Lenassi, E., Hawlina, M., Efficacy Of 12-Month Treatment Of Neovascular Age-Related Macular Degeneration With Intravitreal Bevacizumab Based On Individually Determined Injection Strategies after three Consecutive Monthly Injections, *Acta Ophthalmologica*, 89, 647-653, 2011.
41. Avastinin Üç Boyutlu Yapısı. [[Http://Www.Avastin.Net/Vegf-And-Moa/Avastin-Vegf-A](http://www.avastin.net/vegf-and-moa/avastin-vegf-a)], (Mart 2013).
42. Ferrara, N., Hillan, K.J., Nowotny, W., Bevacizumab, Avastin A Humanized Anti-VEGF Monoclonal Antibody For Cancer Therapy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333, 328-335, 2005.
43. Brown, D.M., Kaiser, P.K., Michels, M., Soubrane, G., ANCHOR Study Group. Ranibizumab Versus Verteporfin For Neovascular Age-Related Macular Degeneration, *The New England Journal of Medicine*, 5, 355, 1432-1444, 2006 .
44. Rosenfeld,P.J., Brown D.M., Heier J.S., Ranibizumab For Neovascular Age-Related Macular Degeneration, *The New England Journal of Medicine*, 355,1419–1431, 2006.
45. Mitra R.A., Pollack J.S., Preferences and Trends Survey. Poster Presented At: 24th Annual ASRS Meeting And The 6th Annual EVRS Meeting, September 9–13, 2006, Cannes, France.
46. Michels, P.J. Rosenfeld And C.A., Systemic Bevacizumab (Avastin) Therapy For Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Twelveweek Results Of An Uncontrolled Open-Label Clinical Study, *Ophthalmology* , 112, 1035–1047, 2005.
47. Moshfeghi A.A., Rosenfeld P.J. And Puliafito C.A. Et Al., Systemic Bevacizumab (Avastin) Therapy For Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Twenty-Four-Week Results of an Uncontrolled Open-Label Clinical Study, *Ophthalmology* 113, 2002–2011, 2006.

48. Pitlick, J.M., Vecera, K.F., Barnes, K.N., Reski, J.W., Forinash, A.B., Bevacizumab For The Treatment Of Neovascular Age-Related Macular Degeneration, *The Annals of Pharmacotherapy*, 46, 290-296, 2012.
49. Spaide, R.F., Laud, K., Fine, H.F., Intravitreal Bevacizumab Treatment Of Choroidal Neovascularization Secondary To Age-Related Macular Degeneration, *Retina*, 26, 383–390, 2006.
50. Yoganathan, P., Deramo, V.A., Lai, J.C., Visual Improvement Following Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in Exudative Age-Related Macular Degeneration, *Retina*, 26, 994–998, 2006.
51. Gunther, J.B., Altaweel, M.M., Bevacizumab (Avastin) for The Treatment of Ocular Disease, *Survey of Ophthalmology*, 54, 372-400, 2009.
52. Hosseini, H., Nowroozadeh, M.H., Salouti, R., Nejabat, M., Anti-VEGF Therapy With Bevacizumab For Anterior Segment Eye Disease, *Cornea*, 31, 322-334, 2012.
53. Del Amo, E.M., Urtti, A., Current And Future Ophthalmic Drug Delivery Systems. A Shift To The Posterior Segment, *Drug Discovery Today*, 13, 135–143, 2008.
54. Geroski D.H., Edelhauser H.F., Drug Delivery For Posterior Segment Eye Disease, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 961–964, 2000.
55. Hughes P.M., Olejnik O., Chang-Lin J.E., Topical And Systemic Drug Delivery To The Posterior Segments, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 2010–2032, 2005.
56. Raghava S., Hammond M., Kompella U.B., Periocular Routes For Retinal Drug Delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 1, 99–114, 2004.
57. Urtti, A., Challenges And Obstacles Of Ocular Pharmacokinetics And Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1131–1135, 2006.
58. Nagarwal, R.C., Kant, S., Singh, P.N., Maiti, P., Pandit, J.K., Polymeric Nanoparticulate System: A Potential Approach For Ocular Drug Delivery, *Journal of Controlled Release*, 21;136, 2-13, 2009.
59. Lang, J.C., Ocular Drug Delivery: Conventional Ocular Formulations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 39–43, 1995.
60. Bonini-Filho M.A., Jorge R., Barbosa J.C., Intravitreal injection Versus Sub-Tenon's infusion of Triamcinolone Acetonide for Refractory Diabetic Macular Edema: A Randomized Clinical Trial, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 3845–3849, 2005.
61. Cardillo J.A., Melo L.A Jr, Costa RA, Skaf M, Belfort R Jr, Souza-Filho AA, Farah ME, Kuppermann BD: Comparison of Intravitreal Versus Posterior Sub-Tenon's

- Capsule Injection of Triamcinolone Acetonide for Diffuse Diabetic Macular Edema, *Ophthalmology*, 112: 1557–1563, 2005.
62. Das, S., Preeti, K., Suresh, K., Drug Delivery To Eye: Special Reference To Nanoparticles, *International Journal of Drug Delivery*, 2, 12-21, 2010.
 63. Yasukawa, T., Ogura, Y., Tabata, Y., Drug Delivery Systems For Vitreoretinal Diseases, *Progress in Retinal and Eye Research*, 23, 253-281, 2004.
 64. Zhang, K., Zhang, L., Weinreb, Rn., Ophthalmic Drug Discovery: Novel Targets And Mechanisms For Retinal Diseases And Glaucoma, *Nature Reviews Drug Discovery*, 15,11, 541-559, 2012 .
 65. Lee, Ss., Robinson, Mr., Novel Drug Delivery Systems For Retinal Diseases, *Ophthalmic Research*, 41, 124-135, 2009.
 66. Kralinger, M.T., Kieselbach, G.F., Voigt, M., Experimental Model for Proliferative Vitreoretinopathy by Intravitreal Dispase: Limited By Zonulolysis And Cataract. *Ophthalmologica*, 220, 211–216, 2006.
 67. Ozkiris, A., Erkilic, K.,Complications Of Intravitreal Injection Of Triamcinolone Acetonide, *Canadian Journal of Ophthalmology*, 40, 63–68, 2005.
 68. Nelson, M.L., Tennant, M.T., Sivalingam, A., Regillo, C.D., Belmont JB, Martidis A: Infectious And Presumed Noninfectious Endophthalmitis After intravitreal Triamcinolone Acetonide injection, *Retina*, 23, 686–691, 2003.
 69. Roth, D.B., Chieh, J., Spirn, M.J., Noninfectious Endophthalmitis Associated With Intravitreal Triamcinolone injection, *Archives of Ophthalmology* , 121, 1279–1282, 2003.
 70. Transskleral Geçişteki Tabakalar: [Http://Www.Stlukeseye.Com/Popups/Sclera.Htm](http://www.stlukeseye.com/popup/sclera.htm) (Mart 2013)
 71. Raviola, G., The Structural Basis Of The Blod-Ocular Barriers, *Experimental Eye Research* 25, 27, 1977.
 72. Chastain Je. General Considerations In Ocular Drug Delivery. In: Mitra AK, Editor. Ophthalmic Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2003. P. 59–107.
 73. Ayasomayajua S.P., Kompella U.B., Retinal Delivery Of Celecoxib is Several-Fold Higher Following Subconjunctival Administration Compared to Systemic Administration, *Pharmaceutical Research* , 21, 1797–1804, 2004.

74. Lee T.W.Y., Robinson J.R., Drug Delivery To The Posterior Segment Of The Eye: Some Insights on The Penetration Pathways after Subconjunctival Injection, *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, 17, 565–572, 2001.
75. Tsuji, Tamai I., Sasaki K., Intraocular Penetration Kinetics of Prednisolone after Subconjunctival Injection In Rabbits, *Ophthalmic Research*, 20, 31–43, 1988.
76. Ranta V.P., Urtti A., Transscleral Drug Delivery To The Posterior Eye: Prospects of Pharmacokinetic Modeling, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1164–81, 2006.
77. Eljarrat-Binstock E, Pe'er J, Domb AJ. New Techniques For Drug Delivery To The Posterior Eye Segment, *Archives of Pharmacological Research*, 27,4, 530-43, 2010.
78. Transskleral Geçişteki Statik Bariyerler (Sklera, Koroid, Retina Pigment Epiteli) [Http://Www.Scienceofamd.Org/Learn](http://www.scienceofamd.org/learn) (Mart 2013)
79. Keeley, F.W., Morin, J.D., Vesely, S., Characterization of Collagen From Normal Human Sclera, *Experimental Eye Research*, 39, 533–42, (1984).
80. Shuttleworth, C.A., Type V_{III} Collagen, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 1145–8, 1997.
81. Kimura, S., Kobayashi, M., Nakamura, M., Immunoelectron Microscopic Localization Of Decorin in Aged Human Corneal And Scleral Stroma, *Journal of Electron Microscopy*, 44, 445–459, 1995.
82. Wessel H., Anderson, S., Fite, D., Type X_{II} Collagen Contributes To Diversities In Human Corneal And Limbal Extracellular Matrices, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 2408–2422, 1997.
83. White, J., Werkmeister, J.A., Ramshaw, J.A., Organization Of Fibrillar Collagen In The Human And Bovine Cornea: Collagen Types V And III, *Connective Tissue Research*, 36, 165–174. 1997.
84. Marshall G.E., Konstas, A.G., Lee, W.R., Collagens in The Aged Human Macular Sclera, *Current Eye Research*, 12, 143–153, 1993.
85. Thale, A., Tillmann, B., Rochels, R., Scanning Electronmicroscopic Studies of The Collagen Architecture Of The Human Sclera Normal And Pathological Findings. *Ophthalmologica*, 210, 137–141, 1996.
86. Olsen T.W., Edelhauser H.F., Lim J.I., Geroski D.H., Human Scleral Permeability: Effects Of Age, Cryotherapy, Transscleral Diode Laser, And Surgical Thinning, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 1893–903, 1995.

87. Prausnitz M.R., Noonan J.S, Permeability Of Cornea, Sclera, and Conjunctiva: A Literature Analysis For Drug Delivery To The Eye, *Journal of Pharmaceutical Sciences* , 87, 1479–88, 1998 .
88. Ambati J., Canakis C.S., Miller J.W., Gragoudas E.S., Edwards A., Weissgold D.J., Kim I., Delori F.C., Adamis A.P., Diffusion of High Molecular Weight Compounds Through Sclera, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* , 41, 1181–1185, 2000.
89. Boubriak O.A., Urban J.P., Akhtar S., The Effect Of Hydration and Matrix Composition on Solute Diffusion in Rabbit sclera, *Experimental Eye Research* , 71, 503–14, 2000.
90. Cruysberg L.P., Nuijts R.M., Geroski D.H., Koole L.H., Hendrikse F., Edelhauser H.F., In Vitro Human Scleral Permeability Of Fluorescein, Dexamethasone-Fluorescein, Methotrexate- Fluorescein And Rhodamine 6G And The Use Of A Coated Coil As A New Drug Delivery System, *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, 18, 559– 569, 2002.
91. Moore D.J., Hussain A.A., Marshall J. Age-Related Variation in the Hydraulic Conductivity of Bruch's Membrane, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 1290–1297, 1995.
92. Amaral J., Fariss R.N., Campos M.M., Robison W.G., Kim H., Lutz R., Becerra S.P., Transscleral- Rpe Permeability Of Pedf And Ovalbumin Proteins: Implications for Subconjunctival Protein Delivery, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 4383–4892, 2005.
93. Pitkänen L., Ranta V.P., Moilanen H., Urtti A., Permeability of Retinal Pigment Epithelium: Effects of Permeant Molecular Weight And Lipophilicity, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 641–646, 2005.
94. Lyda W., Eriksen N., Krishna N., Studies Of Bruch's Membrane; Flow And Permeability Studies in A Bruch's Membrane-Choroid Preparation, *American Journal of Ophthalmology* , 44, 362– 369, 369–70, 1957.
95. Robinson M.R., Lee S.S., Kim H., Kim S., Lutz R.J., Galban C., Bungay P.M., Yuan P., Wang N.S., Kim J., Csaky K.G., A Rabbit Model For Assessing The Ocular Barriers To The Transscleral Delivery of Triamcinolone Acetonide, *Experimental Eye Research* , 82, 479-487, 2006.

96. Kim, S.H., Lutz, R.J., Wang, N.S., Robinson, M.R., Transport Barriers in Transscleral Drug Delivery For Retinal Diseases, *Ophthalmic Research*, 39, 244-54, 2007.
97. Bill, A., A Method To Determine Osmotically Effective Albumin And Gammaglobulin Concentrations in Tissue Fluids, its Application To Uvea And A Note On Effects Of Capillary 'Leaks' On Tissue Fluid Dynamics, *Acta Physiologica Scandinavica* , 73, 511–522, 1968.
98. Cellini, M., Pazzaglia, A., Zamparini, E., Intravitreal Vs. Subtenon Triamcinolone Acetonide for the Treatment of Diabetic Cystoid Macular Edema, *BMC Ophthalmology* , 17, 8, 5, 2008.
99. Choudhry, S., Ghosh, S., Intravitreal And Posterior Subtenon Triamcinolone Acetonide in Idiopathic Bilateral Uveitic Macular Oedema, *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 35, 713-718, 2007.
100. Qi, H., Bi, S., Wei, S., Cui, H., Intravitreal Versus Subtenon Triamcinolone Acetonide Injection for Diabetic Macular Edema: A Systematic Review And Meta-Analysis, *Current Eye Research*, 37, 12, 1136-1147, 2012.
101. Shen, L., You, Y., Sun, .S, Chen, Y., Intraocular and Systemic Pharmacokinetics of Triamcinolone Acetonide after a Single 40-Mg Posterior Subtenon Application, *Ophthalmology*, 117, 2365-2371, 2010.
102. Van, Quill K., Dioguardi, P., Tong, C., Gilbert, J., , Subconjunctival Carboplatin in Fibrin Sealant in The Treatment Of Transgenic Murine Retinoblastoma, *Ophthalmology*, 112,1151–1158, 2005.
103. Murray, T., Cicciarelli, N., O'brien, J., Subconjunctival Carboplatin Therapy And Cryotherapy in The Treatment Of Transgenic Murine Retinoblastoma, *Archives of Ophthalmology*, 115,1286–1290, 1997.
104. Simpson, A., Gilbert ,J., Rudnick, D., Geroski, D., Transscleral Diffusion of Carboplatin: An In vitro And in Vivo Study, *Archives of Ophthalmology*, 120, 1069–1074, 2002.
105. Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Nanotechnology in Therapeutics: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System, *Nanomedicine*, 8, 1253-1271, 2012.
106. Petkar, K., Chavhan, S., Agatonovik-Kustrin, S., Sawant, K., Nanostructured Materials in Drug and Gene Delivery: A Review Of The State Of The Art, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* , 28, 101-164, 2011.

107. Intravitreal enjeksiyonun şematik çizimi <http://jirehdesign.com/eye-illustrations/eye-surgery-illustrations/suvr0018.html> (Mart 2013)
108. Fung, A.E., Rosenfeld, P.J., Reichel, E., The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey: Using The internet To Assess Drug Safety Worldwide, *British Journal of Ophthalmology*, 90, 1344–9, 2006.
109. Sahoo, S.K. And Labhasetwar, V., Nanotech Approaches To Drug Delivery and Imaging, *Drug Discovery Today* 8, 1112–1120, 2003.
110. Diebold, Y, Calonge, M., Applications Of Nanoparticles in Ophthalmology, *Progress in Retinal and Eye Research*, 29, 596-609, 2010.
111. Sahoo, S.K., Dilnawaz, F., Krishnakumar, S., Nanotechnology in Ocular Drug Delivery, *Drug Discovery Today*, 144e151, 2008.
112. Yih, T.C., Al-Fandi, M., Engineered Nanoparticles As Precise Drug Delivery Systems, *Journal of Cellular Biochemistry*, 97, 1184–1190, 2006.
113. Sultana, Y., Maurya, D.P., Iqbal, Z., Aqil, M., Nanotechnology in Ocular Delivery: Current And Future Directions, *Drugs Today*, 47, 441-455, 2011.
114. Zarbin, M.A., Montemagno, C., Leary, J.F., Ritch, R., Nanotechnology in Ophthalmology, *Canadian Journal of Ophthalmology*, 45, 457-476, 2010.
115. Diepold, R.W., Kreuter, J., Himber, J., Gurny, R., Lee, V.H.L., Robinson, J.R., Comparison of Different Models for the testing of Pilocarpine Eyedrops Using Conventional Eyedrops as a Novel Depot Formulation (Nanoparticles), *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 227,188–193, 1989.
116. Gurny, R., Boye, T., Ibrahim, H., Ocular Therapy With Nanoparticulate Systems For Controlled Drug Delivery, *Journal of Controlled Release*, 2, 353–361, 1985.
117. Losa S., Calvo, P., Castro, E., Vilajato, J.L., Alonso M.J., Improvement Of Ocular Penetration of Amikacin Sulfate by Associatioto Poly(Butylcyanoacrylate) Nanoparticles, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43,548–552, 1991.
118. Merodio, M., Irache, J.M., Valamanesh, F., Mirshahi, M., Ocular Disposition And Tolerance Of Ganciclovir-Loaded Albumin Nanoparticles After Intravitreal Injection in Rats, *Biomaterials*, 23, 1587–1594, 2002.
119. Bucolo, C., Maltese, A., Maugeri, F., Busa, B., Puglisi, G., Pignatello, R., Eudragit R1100 Nanoparticle System for the Ophthalmic Delivery Of Cloricromene, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 841–846, 2004.

120. Calvo P., Alonso M.J., Vila-Jato J.L., Robinson J.R., Improved Ocular Bioavailability Of Indomethacin by Novel Ocular Drug Carriers, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48,1147–1152, 1996.
121. Baldrick, P., The Safety of Chitosan as A Pharmaceutical Excipient, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 56, 290-299, 2010.
122. Hu, Y-L., Qi, W., Han, F., Toxicity Evaluation Of Biodegradable Chitosan Nanoparticles Using A Zebrafish Embryo Model, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3351-3359, 2011.
123. De La Fuente, M., Raviña, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Chitosan-Based Nanostructures: A Delivery Platform for Ocular Therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 100-117, 2010.
124. Raymond, C.R., Paul, J.S., Marian, E.Q.. Chitosan. In: Rowe Rc, Sheskey Pj, Quinn Me, Editors, *Pharmaceutical Excipients*, Rps Publishing; Usa: 2009. P. 159-161
125. Guibal, E., Heterogeneous Catalysis on Chitosan-Based Materials: A Review. *Progress Polymer Science*, 30, 71-109, 2005.
126. Araujo, J., Gonzalez, E., Egea, M., Nanomedicines For Ocular NSAIDs: Safety on Drug Delivery, *Nanomedicine & Nanotechnology*, 5, 394-401, 2009.
127. Yenilmez, E., Basaran, E., Yazan, Y., Release Characteristics of Vitamin E Incorporated Chitosan Microspheres and In Vitro–In Vivo Evaluation for Topical Application, *Carbohydrate Polymers*, 84,807-811,2011.
128. Gong, K., Darr, J., Rehman, I. Supercritical Fluid Assisted Impregnation Of indomethacin into Chitosan Thermosets For Controlled Release Applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 315, 93-98, 2006.
129. De, Campos A., Sanchez ,A., Alonso, M. Chitosan Nanoparticles: A New Vehicle For The Improvement Of The Delivery Of Drugs To The Ocular Surface. Application To Cyclosporin A, *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 159-168, 2001.
130. Dodane, V., Vilivalam, V. Pharmaceutical Applications of Chitosan. *Pstt* 6,:246-253, 1998.
131. Agnihotri, S., Mallikarjuna, N., Aminabhavi, T. Recent Advances On Chitosan-Based Micro- And Nanoparticles in Drug Delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28, 2004.

132. Ludwig, A., The Use Of Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1595-1639, 2005.
133. FDA GRAS Claim Notification Of Chitosan. Available From: [Http://Www.Accessdata.Fda.Gov/Scripts/Fcn/Gras_Notices/Grn000073.Pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000073.pdf) (Mart 2013)
134. FDA Chitosan GRAS Notice. Available From: [Http://Www.Accessdata.Fda.Gov/Scripts/Fcn/Gras_Notices/GRN000397.Pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000397.pdf) (Mart 2013)
135. Alonso, M.J., Sánchez, A., The potential of chitosan in ocular drug delivery, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55,1451-1463, 2003.
136. Başaran, E., Yazan, Y., Ocular Application Of Chitosan, *Expert Opinion On Drug Delivery*, 9, 6, 701-712, 2012.
137. Pahuja, P., Arora, S., Pawar, P., Ocular Drug Delivery System: A Reference To Natural Polymers, *Expert Opinion On Drug Delivery*, 9, 837-861, 2012.
138. Wang, J., Zeng, Z., Xiao, R., Recent Advances Of Chitosan Nanoparticles as Drug Carriers, *Internationa Journal of Nanomedicine*, 6,765-774, 2011.
139. Paolicelli, P., De La Fuente, M., Sánchez, A., Chitosan Nanoparticles For Drug Delivery To The Eye, *Expert Opinion On Drug Delivery*, 6, 239-253, 2009.
140. Badawi, A., El-Laithy, H., El Qidra, R., El Mofty, H., El Dally, M., Chitosan Based Nanocarriers For Indomethacin Ocular Delivery, *Archives of Pharmacological Research*, 31, 8, 1040-1049, 2008.
141. Wadhwa, S., Paliwal, R., Paliwal, S., Vyas, S., Chitosan And its Role in Ocular Therapeutics, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 1639-1647, 2009.
142. Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Structure and Interactions in Covalently And Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels For Biomedical Applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57,19-34, 2004.
143. Zhang, J., Wang, S., Topical Use Of Coenzyme Q10-Loaded Liposomes Coated With Trimethyl Chitosan: Tolerance, Precorneal Retention And Anti-Cataract Effect, *International Journal of Pharmaceutics*, 372, 66-75, 2009.
144. Diebold, Y., Jarrin, M., Saez, V., Ocular Drug Delivery By Liposome–Chitosan Nanoparticle Complexes (Lcs-Np), *Biomaterials*, 28,1553-1564, 2007.
145. Rodrigues, L., Leite, H., Yoshida, M., In Vitro Release and Characterization of Chitosan Films as Dexamethasone Carrier, *International Journal of Pharmaceutics*, 368,1-6, 2006.

146. Contreras-Ruiz, L., De La Fuente, M., García-Vázquez, C., Ocular Tolerance To A Topical Formulation Of Hyaluronic Acid And Chitosan-Based Nanoparticles, *Cornea*, 29, 550-558, 2010.
147. Friedman, A., Phan, J., Schairer, D., Antimicrobial And Anti-Inflammatory Activity Of Chitosan-Alginate Nanoparticles: A Targeted Therapy For Cutaneous Pathogens, *Journal of Investigative Dermatology*, doi: 10.1038/jid.2012.399, 2012.
148. Di Colo, G., Zambito, Y., Buralassi, S., Effect Of Chitosan And Of N-Carboxymethylchitosan on Intraocular Penetration of Topically Applied Ofloxacin, *International Journal of Pharmaceutics*, 273, 37-44, 2004.
149. Gratieri, T., Gelfuso, G, Rocha, E., A Poloxamer/Chitosan In Situ Forming Gel With Prolonged Retention Time For Ocular Delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, 186-193, 2010.
150. Li, N., Zhuang, C., Wang, M., Liposome Coated With Low Molecular Weight Chitosan And its Potential Use in Ocular Drug Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 379, 131-138, 2009.
151. Tamilvanan, S., Benita, S. The Potential Of Lipid Emulsion For Ocular Delivery Of Lipophilic Drugs, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 357-356 2004.
152. Hagigit T, Abdulrazik M, Orucov F, Topical And intravitreal Administration Of Cationic Nanoemulsions to Deliver Antisense Oligonucleotides Directed Towards Vegf Kdr Receptors To The Eye, *Journal of Controlled Release*, 145, 297-305, 2010.
153. Mahmoud Aa, El-Feky Gs, Kamel R, Chitosan/Sulfobutylether–Cyclodextrin Nanoparticles as A Potential Approach For Ocular Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 413, 229-236, 2011
154. Akhter, S., Talegaonkar, S., Khan, ZI., Jain, Gk., Khar, R., Ahmad, F.J. Assessment Of Ocular Pharmacokinetics and Safety Of Ganciclovir Loaded Nanoformulations. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7, 144-145, 2011.
155. Nagarwal, R.C., Kumar. R., Pandit, J.K., Chitosan Coated Sodium Alginate-Chitosan Nanoparticles Loaded With 5-FU For Ocular Delivery: In Vitro Characterization And in Vivo Study in Rabbit Eye, *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 20, 47, 678-85, 2012 .
156. De Campos Am, Sánchez A, Alonso Mj. Chitosan Nanoparticles: A New Vehicle For The improvement Of The Delivery Of Drugs To The Ocular Surface.

- Application To Cyclosporin A, *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 159-168, 2001.
157. Sahoo, S.K., Parveen, S., Panda, J.J., The Present And Future of Nanotechnology in Human Health Care. *Nanomedicine*, 3, 20e31, 2007.
 158. Vision and Health Care :Subtenon enjeksiyon uygulamasının şematik gösterilmesi www.vision-and-eye-health.com (Mart 2013).
 159. Leung K., Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Poly(lactic Acid-Polyethylene Glycol)-Poly-L-Lys/Gadolinium-Diethylenetriamine Pentaacetic Acid Nanoparticles, Molecular Imaging And Contrast Agent Database (MICAD) [Internet], Bethesda (MD): National Center For Biotechnology Information (US); 2004-2013.
 160. Abrishami, M., Zarei-Ghanavati, S., Soroush, D., Rouhbakhsh, M., Preparation, Characterization, And In Vivo Evaluation Of Nanoliposomes-Encapsulated Bevacizumab (Avastin) For intravitreal Administration, *Retina*, 29, 699-703, 2009.
 161. Li, F., Hurley, B., Liu, Y., Leonard, B., Griffith, M., Controlled Release Of Bevacizumab Through Nanospheres For Extended Treatment Of Age-Related Macular Degeneration, *Open Ophthalmology Journal*, 6, 54-58, 2012 .
 162. Hao, Y., Patel, A., Liu, W., Krishna, R., Ppreparation and Characterization Of Bevacizumab (Avastin) Nanoparticles For The Treatment Of Age Related Macular Degeneration. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting And Exposition, Los Angeles, California, U.S.A. 2009. [Http://Www.Aapsj.Org/Abstracts/AM_2009/AAPS2009-002539.PDF](http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2009/AAPS2009-002539.pdf) .
 163. Araújo J., Vega E., Lopes C., Egea M.A., Effect Of Polymer Viscosity On Physicochemical Properties And Ocular Tolerance Of FB-Loaded PLGA Nanosphere, *Colloids Surface B: Biointerfaces*, 1, 72, 48-56, 2009.
 164. Badawi, A.A., El-Laithy, H.M., El Qidra, R.K., Chitosan Based Nanocarriers For Indomethacin Ocular Delivery, *Pharmaceutical Research*, 31, 1040-1049, 2008.
 165. Gupta, H., Aqil, M., Khar, R.K., Ali, A., Sparfloxacin-Loaded PLGA Nanoparticles For Sustained Ocular Drug Delivery, *Nanomedicine*, 6, 324-333, 2010.
 166. Yoeruek, E., Spitzer, M.S., Tatar, O., Safety Profile of Bevacizumab on Cultured Human Corneal Cells, *Cornea* 26, 8, 977-982, 2007.
 167. Kernt, M., Welge-Lüssen, U., Y.A., Neubauer, A.S., Kampik, A., Bevacizumab is Not Toxic To Human Anterior- And Posterior-Segment Cultured Cells, *Ophthalmologie*, 104, 11, 965-971, 2007 .

168. Thaler, S., Fiedorowicz, M., Choragiewicz, T.J., Toxicity Testing Of The VEGF Inhibitors Bevacizumab, Ranibizumab And Pegaptanib in Rats Both with And without Prior Retinal Ganglion Cell Damage, *Acta Ophthalmologica Scandinavya*, 88, E170-6, 2010.
169. Hoffart, L., Matonti, F., Conrath, J., Inhibition of Corneal Neovascularization after Alkali Burn: Comparison of Different Doses of Bevacizumab in Monotherapy or Associated With Dexamethasone, *Clinical and Experiment Ophthalmology*, 38, 4, 346-352, 2010.
170. Sakurai, K., Akiyama, H., Shimoda, Y., Effect Of Intravitreal Injection Of High-Dose Bevacizumab in Monkey Eyes, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 4905-4916, 2009.
171. Pan, C.K., Durairaj, C., Kompella, U.B., Agwu, O., Oliver, S.C., Comparison Of Long-Acting Bevacizumab Formulations in The Treatment of Choroidal Neovascularization in a Rat Model, *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 2011 27, 3, 219-224, 2011.
172. Nagarwal, R.C., Kumar R, Pandit JK. Chitosan Coated Sodium Alginate-Chitosan Nanoparticles Loaded With 5-FU For Ocular Delivery: In Vitro Characterization And in Vivo Study in Rabbit Eye, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 47, 678-685, 2012 .
173. Jin, J., Zhou, K.K., Park, K., Hu, Y., Xu, X. Anti-Inflammatory And Antiangiogenic Effects Of Nanoparticle-Mediated Delivery Of A Natural Angiogenic inhibitor, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 5, 52, 6230-62377, 2011 .
174. Yang, H., Wang, R., Gu, Q., Zhang, X. Feasibility Study Of Chitosan As Intravitreal Tamponade Material, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246, 8, 1097-1105, 2008.
175. Amrite, A.C., Edelhauser, H.F., Singh, S.R., Kompella, U.B., Effect Of Circulation on The Disposition and Ocular Tissue Distribution of 20 Nm Nanoparticles after Periocular Administration, *Molecular Vision*, 14, 150-60, 2008.
176. Amrite, A.C., Kompella, U.B., Size-Dependent Disposition of Nanoparticles and Microparticles Following Subconjunctival Administration, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, 1555-1563, 2005.
177. Bourges, J.L., Gautier, S.E., Delie, F., Bejjani, R.A., Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 3562-3569, 2003.

178. Bejjani, R.A., Benezra, D., CoheN, H., Rieger, J., Nanoparticles For Gene Delivery To Retinal Pigment Epithelial Cells, *Molecular Vision*, 11, 124-132, 2005.
179. Suen, W.L., Chau, Y., Specific Uptake Of Folate-Decorated Triamcinolone-Encapsulating Nanoparticles By Retinal Pigment Epithelium Cells Enhances And Prolongs Antiangiogenic Activity, *Journal of Controlled Release*, 10, 167, 21-28, 2013.
180. Kang, S.J., Durairaj, C, Kompella, UB, O'Brien, JM, Grossniklaus, HE. Subconjunctival Nanoparticle Carboplatin in The Treatment Of Murine Retinoblastoma, *Archives of Ophthalmology*, 127:1043-1047, 2009.
181. Shome, D., Poddar, N., Sharma, V., Sheorey, U., Does A Nanomolecule Of Carboplatin Injected Periocularly Help in Attaining Higher intravitreal Concentrations? *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 5896-5900, 2009.
182. Kim, E.S., Durairaj, C., Kadam, R.S., Human Scleral Diffusion Of Anticancer Drugs From Solution And Nanoparticle Formulation, *Pharmacological Research*, 26, 1155-1561, 2009.
183. Wen, H., Hao, J., Li, S.K. Characterization Of Human Sclera Barrier Properties For Transscleral Delivery Of Bevacizumab And Ranibizumab, *Journal of Pharmaceutical Science*, 102, 3, 892-903, 2011 .
184. Chopra, P., Hao, J., Li, S.K., Iontophoretic Transport Of Charged Macromolecules Across Human Sclera, *International Journal of Pharmaceutics*, 388, 107–113, 2010.
185. Pescina, S., Ferrari, G., Govoni, P., Macaluso, C., In-Vitro Permeation Of Bevacizumab Through Human Sclera: Effect Of Iontophoresis Application, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 1189–1194, 2010.
186. Heiduschka, P., Fietz, H., Hofmeister, S., Schultheiss, S., Tübingen Bevacizumab Study Group. Penetration Of Bevacizumab Through The Retina After Intravitreal Injection in The Monkey, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 2814-2823, 2007.
187. Shahar, J., Avery, R.L., Heilweil, G., Barak, A., Electrophysiologic And Retinal Penetration Studies Following Intravitreal Injection Of Bevacizumab (Avastin), *Retina*, 26, 3, 262-269, 2006.
188. Mordenti, J., Cuthbertson, R.A., Ferrar,a N., Comparisons Of The intraocular Tissue Distribution, Pharmacokinetics, And Safety Of 125-Labeled Full Length and

- Fab Antibodies in Rhesus Monkeys Following Intravitreal Administration, *Toxicologic Pathology*, 27, 536–544, 1999.
189. Olsen, T.W., Feng, X., Wabner, K., Csaky, K., Pharmacokinetics of Pars Plana Intravitreal Injections Versus Microcannula Suprachoroidal Injections Of Bevacizumab in A Porcine Model, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1; 52, 7, 4749-4756, 2011.
190. Nomoto, H., Shiraga, F., Kuno, N., Pharmacokinetics Of Bevacizumab After Topical, Sub Conjunctival, and Intravitreal Administration in Rabbits, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50,4807–4813, 2009.
191. Robinson, M.R, Lee, S.S., Kim, H., Kim, S., Lutz, R.J., Galban, C., Bungay, P.M.,A Rabbit Model For Assessing The Ocular Barriers To The Transscleral Delivery of Triamcinolone Acetonide, *Experimental Eye Research*, 82, 3, 479-487, 2006.
192. Robinson, M.R., Kim, H., Gravlin, L., Tansey, G., Grimes, G., Potti, G., Yuan, P., Csaky, K.G, Preclinical evaluation of a triamcinolone acetonide preservative-free (TAC-PF) formulation for intravitreal injection, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45. [ARVO E-Abstract 5058], 2004.
193. Inoue, M., Takeda, K., Morita, K., Yamada, M.,Concentrations of Triamcinolone Acetonide in Human Eyes after Intravitreal or Subtenon Injection, *American Journal of Ophthalmology*, 138, 1046–1048, 2004.
194. Thomas, E., Hainsworth D.P. Intravitreal Concentration of Subtenon’s Injected Triamcinolone Acetonide, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46. [ARVO E-Abstract 5394], 2005.
195. Hyndiuk, R.A., Radioactive Depot-Corticosteroid Penetration into Monkey Ocular Tissue. II. Subconjunctival Administration, *Archives of Ophthalmology*, 82, 259–263, 1969.
196. Bakri, S.J., Snyder, M.R., Reid, J.M., Pulido, J.S., Singh, R.J., Pharmacokinetics of Intravitreal Bevacizumab (Avastin), *Ophthalmology*, 114, 855–859, 2007.
197. ZHU, Q.I., Focke, Z, Sigrid, F.H., Vitreous Levels Of Bevacizumab And Vascular Endothelial Growth Factor-A in Patients with Choroidal Neovascularization, *Ophthalmology*, 115, 1750–5, 2008.
198. Sinapis, C.I., Routsias, J.G., Sinapis, A.I., Sinapis., D.I., Agrogiannis, G.D. Pharmacokinetics Of intravitreal Bevacizumab (Avastin®) in Rabbits, *Clinical Ophthalmology*, 5,697-704, 2011.

199. Csaky K.G., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2007;48:ARVO E-Abstract 4936), 2007.
200. Meyer, C.H., Krohne, T.U., Holz, F.G. Intraocular Pharmacokinetics after a Single intravitreal injection Of 1.5 Mg Versus 3.0 Mg Of Bevacizumab in Humans, *Retina*, 31, 1877-1884, 2011 .
201. Rodrigues, E.B., Farah, M.E., Maia, M., Penh,a F.M., Therapeutic Monoclonal Antibodies in Ophthalmology, *Progress in Retinal and Eye Research*, 28, 117-144, 2009.
202. Klettner, A., Roider J. Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib in Vitro: Efficiency And Possible Additional Pathways, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 10, 4523-4527, 2008.
203. Thomas, E.L. Microdose Intravenous Bevacizumab For Treating Retinal Vascular Disease (Abstract). Presented At The 7th International Symposium On Ocular Pharmacology and Therapeutics, A-32, 2008.
204. Avery, R.L., Pearlman, J., Pieramici, D.J., Rabena, M.D., Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in The Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy, *Ophthalmology*, 113,10, 1695.E1-15, 2006.
205. Charbel Issa, P., Finger, R.P., Holz, F.G., Scholl, H.P. Eighteen-Month Follow-Up Of intravitreal Bevacizumab in Type 2 Idiopathic Macular Telangiectasia, *British Journal of Ophthalmology*, 92, 941–945, 2008.
206. Mennel, S., Callizo, J., Schmidt, J.C., Meyer, C.H. Acute Retinal Pigment Epithelial Tear in The Untreated Fellow Eye Following Repeated Bevacizumab (Avastin) Injections, *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 85,689–691, 2007.
207. Yoon, Y.H., Kim, J.G., Chung, H., Lee, S.Y. Rapid Progression Of Subclinical Age-Related Macular Degeneration in The Untreated Fellow Eye After intravitreal Bevacizumab, *Acta Ophthalmologica*, Published Online, 2008.
208. Sawada, O., Kawamura, H., Kakinoki, M., Ohji, M. Vascular Endothelial Growth Factor in Fellow Eyes Of Eyes injected with intravitreal Bevacizumab, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2008;246:1379–1381, 2008.
209. Saati, S., Agrawal, R.N., Louie, S., Chader, G.J., Humayun, M.S., Effect Of Multiple injections Of Small Divided Doses vs Single injection Of intravitreal Bevacizumab On Retinal Neovascular Model in Rabbits, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 248, 457-466, 2010.

210. Alm A., Bill, A., 1973. Ocular And Optic Nerve Flow At Normal And Bincreased Intraocular Pressures in Monkeys (Macaca Irus); A Study With Radioactively Labelled Microspheres including Flow Determinations in Brain and some other Tissues, *Experimental Eye Research*, 15, 15–29, 1973.
211. Prince J.H., Diesem, C.D., Eglitis, I., Ruskell, G.L., Anatomy And Histology of The Eye And Orbit in Domestic Animals, 268, Charles C. Thomas, Springfield, 1960.

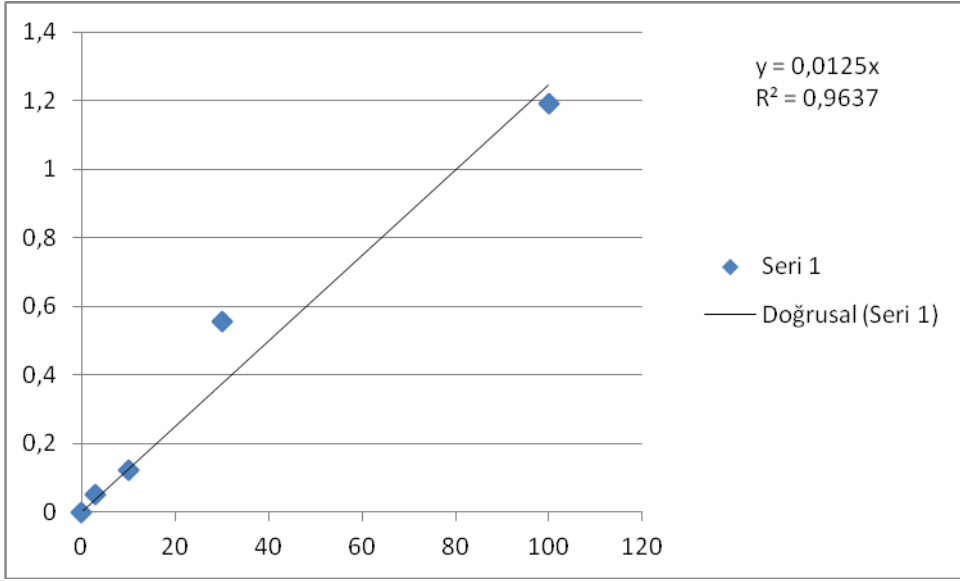
EK 1:APANDIX

	Kontrol Grubu	İlaç Grubu	Nanopartikül Grubu
Gün 1	0,172	0,207	0,291
	0,173	0,199	0,196
		0,173	0,202
Gün 3	0,173	0,301	0,344
	0,171	0,254	0,557
		0,211	0,132
Gün 5	0,139	0,435	0,321
	0,141	0,23	0,106
		0,549	0,226
Gün 7	0,087	0,08	0,218
	0,089	0,097	0,122
		0,156	0,111

Vitreus örnekleri için Eliza absorbans sonuçları

	Kontrol Grubu	İlaç Grubu	Nanopartikül Grubu
Gün 1	0,173	0,139	0,118
	0,153	0,098	0,171
		0,128	0,224
Gün 3	0,082	0,321	0,074
	0,058	0,209	0,072
		0,124	0,142
Gün 5	0,069	0,215	0,137
	0,057	0,284	0,216
		0,218	0,079
Gün 7	0,093	0,238	0,068
	0,057	0,129	0,107
		0,11	0,079

Serum örnekleri için Eliza absorbans sonuçları



ELISA standart kalibrasyon grafiği (Y=Absorbans X=konsantrasyon)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Nagihan Uğurlu (12-10-1974)

Doğum Yeri: Hayrabolu, Tekirdağ

Medeni Hali: Evli, üç çocuk annesi

e-posta:drnagihanu@gmail.com

Adresi:48. Cadde, 1474. Sokak, 3/10, pembeköşk apr. Çukurambar Ankara

Eğitim

Lise: Bursa İH Kız Lisesi, 1992

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1999

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1999

Tıpta Uzmanlık Eğitimi: Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları bölümü, 2004.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi derecede

İş deneyimi

Araştırma Görevlisi: Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi (2000-2004)

Uzman Doktor: Kelkit Devlet Hastanesi (2004-2004)

Başasistan: Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Kliniği (2004-2008)

Uzman Doktor: Özel Yeni Hayat Göz Merkezi (2004-2008)

Başasistan: Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Kliniği (2010-2013)

Deneyim Alanları

Uvea, Medikal retina.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi:

Etken madde yüklü nanopartiküllerin subtenon enjeksiyon sonrası Güvenlik ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi, 111S292 No'lu Tübitak 1002 Hızlı Destek Projesi,

Bütçesi:23.880 YTL.

Tezden Üretilmiş Serbest bildiri:

“Bevasizumab Loaded Chitosan Nanoparticles for Ocular Uses”

Nagihan Uğurlu, Sema Tuncer, Mehmet Doğan Aşık, Mustafa Türk, Emir Baki Denkbaş
VIII. Türkiye Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, [A1-Nanoparticles] [OP-027],
Ankara, 2012.