

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, fikir ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum Anabilim Dalı Başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Gürsel Yılmaz'a, tez danışmanım Doç. Dr. İmren Akkoyun'a, eğitimimde büyük katkıları olan desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Sibel Oto'ya, Prof. Dr. Ahmet Akman'a, Prof. Dr. Dilek Dursun Altınörs'e, Doç. Dr. Yonca Özkan Arat'a, Yrd. Doç. Dr. Sezin Akça Bayar'a; her zaman ilgisini ve yardımını gördüğüm Uzm. Dr. Sirel Gür Güngör ve diğer tüm hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nihan Haberal'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Attila Dağdeviren'e, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden Vetr. Dr. Didem Bacanlı'ya tezime verdikleri destek için ayrıca teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca beraber pek çok şey paylaştığımız, birlikte uzmanlık eğitimi yapmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimizde çalışan hemşirelere ve personellerimize teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca en büyük destekçilerim olan babam Ali Kemal Çelebi, annem Fatma Çelebi, kardeşlerim Zuhale Çelebi Tuluk, Nihal Çelebi Öğretmen, Nuray Çelebi ve Songül Çelebi'ye sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Nilay Çelebi

Temmuz 2013, Ankara

ÖZET

Bu çalışmada in vivo oksijen endükte retinopati fare modelinde intravitreal matrine enjeksiyonunun farklı konsantrasyonlarda retinal endotelial hücre proliferasyonuna, retina morfolojisine ve apoptotik hücre ölümüne etkisi incelendi.

Onsekiz adet C57BL/J6 fare postnatal 7-12. günler arasında %75 ± 2 oksijene tabi tutuldu. Fareler 4 gruba ayrıldı. Grup-A negatif kontrol grubu (n: 10 göz), Grup-B kontrol grubunu (n:18 göz), Grup-C 0.78 µg intravitreal matrine enjeksiyonunu (n: 9 göz), Grup-D 6.25 µg intravitreal matrine enjeksiyonunu (n: 9 göz) oluşturdu. Onikinci gün 9 farenin bir gözüne (Grup-C) 0.78 µg intravitreal matrine (IVM), 9 farenin bir gözüne (Grup-D) 6.25 µg IVM enjekte edildi. Farelerin diğer gözlerine 1µl steril izotonik solüsyon enjekte edildi (Grup-B). Beş tane yaş uyumlu işlem görmemiş, oda ortamında tutulmuş fare (Grup-A) negatif kontrol grubunu oluşturdu. Postnatal 17. gün fareler sakrifiye edildi ve gözler preretinal neovaskülarizasyonun kantitatif analizi, apoptotik hücre ölümü ve morfolojik yapı incelenmesi için enükle edildi. Neovaskülarizasyon internal limitan membranın vitreosa bakan yüzeyindeki vasküler hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edildi. Histolojik ve ultrastrüktürel bulgular ışık ve elektron mikroskopi, apoptotik aktivite terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UPT-nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile incelendi.

Grup-C (p<0.0001) ve -D'de (p<0.0001) bir histolojik kesitte tespit edilen neovasküler hücre çekirdeği sayısı Grup-B ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulundu. Grup-C ve -D arasında anlamlı fark (p=0.9) tespit edilmedi. Grup-A, Grup-B (p<0.0001) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görüldü. Grup-B ile karşılaştırıldığında Grup-C'de endotelial hücre çekirdeği sayısının %95 ve Grup-D'de %100 azaldığı tespit edildi. Histolojik incelemede matrine enjekte edilmiş olan gözlerde retinanın tüm katmanlarında hücre kaybı ve tabakaların incelenmesi, tüm kesitlerde doku bütünlüğünün bozulduğu görüldü.

Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler matrine enjekte edilen gruplarda (Grup-C, -D) yoğun olarak tespit edildi. İncelemede Grup-B'de tespit edilen atipik mitokondri sayısı Grup-C (p=0.01) ve -D (p=0.01) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. Grup-A,

Grup-B, -C, ve -D ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). Grup-C ve -D arasında ($p=0.4$) anlamlı fark tespit edilmedi.

TUNEL tekniği ile apoptozis analizinde Grup-A ve Grup-B'de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edildi. Grup-C ($p=0.9$) ve -D ($p=0.9$) Grup-A ve Grup-B ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görüldü. Grup-C ile -D ($p=0.7$) arasında anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç olarak matrine oksijen endükte retinopati modelinde neovaskularizasyonu güçlü baskılmaktadır. Histolojik incelemede toksik etki, TUNEL çalışmasında artmış apoptotik aktivite tespit edildi. Bununla ilgili ilaç etkisi ve doz etkisi ile ilgili prospektif randomize kliniğe yönelik deneysel çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: İn vivo fare modeli, intravitreal matrine, endotelial hücre proliferasyonu, elektron mikroskopi, apoptozis, TUNEL

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effects of matrine, at different concentrations, on retinal endothelial cell proliferation, retinal morphological structure and apoptotic cell death in an in vivo oxygen-induced retinopathy mouse model.

Eighteen C57BL/J6 mice were exposed to 75 ± 2 oxygen between postnatal 7-12 days. Mice were divided into four groups. Group-A (n: 10 eyes) constitutes negative control group, group-B (n: 18 eyes) constitutes control group, group-C (n: 9 eyes) constitutes 0.78 μ g intravitreal matrine injected group, group-D (n: 9 eyes) constitutes 6.25 μ g intravitreal matrine injected group. On postnatal day 12 0.78 μ g matrine was administered intravitreally to one eye of 9 mice (Group-C), 6.25 μ g matrine to one eye of 9 mice (Group-D) and contralateral eyes (Group-B, n=18 eyes) received 1 μ g isotonic saline intravitreally. Ten mice of the same age that had been kept in room air without any exposition to high oxygen were used as negative control group (Group-A). On day 17, mice were sacrificed and eyes enucleated for quantitative analysis of preretinal neovascularization, apoptotic cell death and morphological structure analyses. Neovascularizations were quantified by counting the endothelial cell nuclei on the vitreal side of the inner limiting membrane of the retina. Histological and ultrastructural changes were examined by using light and electron microscopy. Apoptotic activity was analysed by using terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UPT-nick end labeling (TUNEL) technique.

The number of neovascular cell nuclei per histological section found in group-B was statistically significant different compared with group-C ($p < 0,0001$) and -D ($p < 0,0001$). Group-C and -D were not significant different ($p = 0,9$). When group-A and group-B compared significant difference ($p = 0,0001$) was seen. Compared with group-B, the number of endothelial cell nuclei, were decreased %95 in group-C and %100 in group-D.

Compared with group-B, the number of atypical mitochondria detected by electron microscopy, group-C ($P = 0,01$) and -D ($P = 0,01$) showed significant difference. Compared with group-A, group-B, -C and -D showed significant difference ($p < 0,0001$). No significant difference was detected between group-C and -D ($p = 0,4$).

Analysis of apoptosis by TUNEL technique showed in group-A and group-B apoptotic TUNEL-positive cells were detected at similar levels in the outer nuclear layer and inner nuclear layer. Comparing with group-C ($p=0,9$) and -D ($p=0,9$), group-A and -B showed significant difference. There were not significant different between group-C and -D ($p=0,7$).

In conclusion matrine supresses endothelial cell proliferationin an in vivo oxygen-induced retinopathy mouse model. Toxic effects were identified on morphological examination. Further studies are needed to determine the safety and efficacy of matrine in neovascular ocular diseases.

Key words: In vivo mouse model, intravitreal matrine, endothelial cell proliferation, electron microscopy, apoptosis, TUNEL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMALAR	X
RESİMLER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Anjiyojenez ve anjiyojenezde etkili olan faktörler	3
2.1.1. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	3
2.2. Retinal vasküler hastalıklar	4
2.3. Preamatüre retinopatisi	4
2.3.1. Prematüre Retinopatisi Patogenezi	4
2.3.2. Evreleme	5
2.3.3. Tedavi	7
2.4. Diyabetik retinopati	7
2.4.1. Diyabetik Retinopatinin Patogenezi	8
2.4.2. Patofizyolojik Mekanizmalar	8
2.4.3. Diyabetik Retinopatide Sınıflandırma	9
2.4.4. Tedavi	10
2.5. Koroidal neovaskülarizasyon	10
2.5.1. Koroidal neovaskülarizasyon oluşturan nedenler	10
2.5.2. Koroidal neovaskülarizasyonda klinik semptomlar	11
2.5.3. Koroidal neovaskülarizasyonda patofizyoloji	11
2.5.4. Tedavi	12
2.6. Retinal ven tıkanıklıkları	12
2.6.1. Santral retinal ven tıkanıklığı	12
2.6.2. Retinal ven dal tıkanıklığı	13
2.7. Periferik retinal neovaskülarizasyon yapan hastalıklar	15
2.7.1. Orak hücreli anemi	15
2.7.2. Eales hastalığı	15
2.7.3. Oküler iskemik sendrom	16

2.7.4. Multiple skleroz	16
2.7.5. Behçet hastalığı	16
2.7.6. Sarkoidoz	16
2.7.7. Sistemik lupus eritematozus	16
2.7.8. Birdshot retinokoroidopati	16
2.7.9. Toksoplazma koryoretiniti	16
2.7.10. Akut retinal nekroz	16
2.7.11. İnkontinentia pigmenti	16
2.7.12. Kronik retina dekolmanı	16
2.7.13. Koroid melanomu	16
2.7.14. Retinitis pigmentoza	16
2.7.15. Retinoskizis	16
2.7.16. Radyasyon retinopatisi	16
2.8. Antianjiyojenik ajanlar	17
2.8.1. Pegaptanib sodyum	17
2.8.2. Ranibizumab	18
2.8.3. Bevacizumab	18
2.8.4. Protein Kinaz C inhibitörleri	19
2.8.5. Steroid Olmayan Antienflamatuarlar	19
2.8.6. Triamsinolon asetonit	19
2.8.7. Anekortav asetat	19
2.9. Matrine	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Hayvan deneyi protokolü	21
3.2. Işık mikroskopik inceleme	22
3.3. Elektron mikroskopik inceleme	23
3.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick and labeling (TUNEL) technique	23
3.5. İstatistiksel analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. İn vivo oksijen endükte retinopati fare modelinde intravitreal matrine enjeksiyonunun farklı konsantrasyonlarda retinal endotelyal hücre proliferasyonuna etkisi	24
4.2. Işık Mikroskopi ile Morfolojik Analiz	24
4.3. Elektron Mikroskopi ile Ultrastrüktürel Analiz	24

4.4. TUNEL Tekniği ile Apoptosis Analizi	25
TARTIŞMA	26
SONUÇ	30
REFERANSLAR	31
RESİMLER	44

KISALTMALAR

VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
GH	: Büyüme Hormonu
YBMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
RVT	: Retinal Ven Tıkanıklığı
SRVT	: Santral Retinal Ven Tıkanıklığı
RVDT	: Retinal Ven Dal Tıkanıklığı
PDR	: Proliferatif Diyabetik Retinopati
VEGF A	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A
VEGF B	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü B
VEGF C	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü C
VEGF D	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü D
VEGF E	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü E
VEGF F	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü F
VEGF 121	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 121
VEGF 145	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 145
VEGF 148	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 148
VEGF 162	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 162
VEGF 165	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 165
VEGF 165b	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 165b
VEGF 183	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 183
VEGF 189	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 189
VEGF 206	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 206
VEGFR 1	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 1
VEGFR 2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
VEGFR 3	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 3
PR	: Prematüre Retinopatisi
kDa	: Kilo Dalton
m-RNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
ICROP	: International Classification of Retinopathy of Prematurity
NPDR	: Non Proliferatif Diyabetik Retinopati

DRS	: Diabetic Rethinopathy Study
ETDRS	: Early Treatment Diabetic Rethinopathy Study
DRVS	: Diabetic Rethinopathy Vitrectomy Study
MA	: Mikroanevrizma
İRMA	: İntraretinal Mikrovasküler Anomali
NV	: Neovaskularizasyon
NVD	: Optik Disk Neovaskularizasyonu
KNV	: Koroid Neovaskularizasyonu
RPE	: Retina Pigment Epiteli
OKT	: Optik Koherens Tomografi
FDA	: Food and Drug Administration
FDT	: Fotodinamik Tedavi
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
IVM	: İntravitreal Matrine
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxy-UPT-Nick end Labeling
PAS	: Periodic Acid-Schiff
ILM	: İnternal Limitan Membran
OsO₄	: Osmium tetraoxide
DDSA	: 2-dodecennyl succinic anhydride
BMDA	: Benzylidimethyl Amine
MMP 9	: Matriks Metalloproteaz 9
MMP 2	: Matriks Metalloproteaz 2
OER	: Oksijen Endükte Prematüre Retinopatisi

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: 17. günde C57BL/J6 Fare

Resim 2: Oda ortamında tutulmuş C57BL/J6 farenin retinasından ışık mikroskopi kesiti. Grup-A=Negatif kontrol grubu. Negatif kontrol grubunda histolojik kesitlerde retinada internal limitan membranın vitreusa bakan yüzünde endotelial hücre çekirdeği görülmedi. Orijinal büyültme 20x

Resim 3: C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, postnatal 12. gün intravitreal izotonik solüsyon enjekte edilmiş grup, Grup-B=Kontrol grubu. Ok kontrol grubunda retinada internal limitan membranın vitreusa bakan yüzünde endotelial hücre çekirdeğini göstermekte. Orijinal büyültme 20x

Resim 4: C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, postnatal 12. gün intravitreal 0.78 µg matrine enjekte edilen grup, Grup-C.

Resim 5: C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, postnatal 12. gün intravitreal 6.25 µg matrine enjekte edilen grup, Grup-D.

Resim 6: Negatif kontrol grubunun (Grup-A) elektron mikroskopik incelemesinde fotosesepör iç segment bölümünde mitokondri yapılarında dismorfoloji izlenmedi. Mitokondrilerde tipik çift membranlı tübüler transvers düzenli mitokondrial kristalar görülmektedir (Ok). Orijinal büyültme 3250x.

Resim 7: Kontrol grubunun (Grup-B) elektron mikroskopik incelemesinde fotosesepör iç segment bölümünde irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondriler gözlenmektedir (Ok). Orijinal büyültme 3250x.

Resim 8: Elektron mikroskopik incelemede (Grup-C) intravitreal 0.78 µg matrine enjeksiyon grubunda fotosesepör iç segment bölümünde çok sayıda irregüler mitokondri,

litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondri gözlenmektedir (yıldız). Orijinal büyültme 3250x.

Resim 9: C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. Negatif kontrol grubunda (Grup-A) ve kontrol grubunda (Grup-B) TUNEL tekniği ile dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada daha yoğun koyu renkli görülebilen apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir (Ok). Orijinal büyültme 100x. İmmersiyon yağı kullanılmıştır.

Resim 10: C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. 0.78 µg intravitreal matrine enjeksiyon grubunda (Grup-C) TUNEL tekniği ile retina tabakalarında yaygın, yoğun koyu renkli görülebilen apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir (Ok). Orijinal büyültme 100x. İmmersiyon yağı kullanılmıştır.

Resim 11: C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. 6.25 µg intravitreal matrine enjeksiyon grubunda (Grup-D) TUNEL tekniği ile retina tabakalarında yaygın, yoğun koyu renkli görülebilen apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir (Ok). Orijinal büyültme 100x. İmmersiyon yağı kullanılmıştır.