

# 1. GİRİŞ

Patolojik retinal anjiyojenez, örneğin prematüre retinopatisi (PR), diyabetik retinopati , yaşa bağlı makula dejeneresansı ve ven tıkanıklığına sekonder retinal neovaskülarizasyon gibi neovasküler oküler hastalıklarda görme kaybına neden olmaktadır.<sup>1,2</sup> Patolojik düzeyde düzensiz gelişen damarlar vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), büyüme hormonu (GH) ve sitokinler gibi faktörlerin desteği ile oluşurlar. Bu faktörler retinal hücrelerde ve mikrovasküler endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda vasküler yatak ve dokuda yayılım tarzı farklılık göstermekle beraber, patolojik düzeyde oluşan damarsal yapılar tüm oküler neovasküler hastalıklarda benzer özellikleri taşımaktadır.<sup>2,3</sup>

İskemi ve/veya hipoksi patolojik düzeyde düzensiz gelişen retinal neovaskülarizasyonun çeşitli hastalıklarda ortak bir özelliğidir.<sup>4,5,6</sup> VEGF iskemi ve/veya hipoksiye bağlı artmakla birlikte fizyolojik ve patolojik anjiyojenezde temel düzenleyicidir.

İlk olarak 1994 yılında proliferatif diyabetik retinopatisi olan hastalarda aközde ve vitreusda VEGF seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır.<sup>7,8</sup> VEGF kan retina bariyerinin bozulmasına, damar geçirgenliğini arttırarak retina ödeme, endotel hücre proliferasyonuna ve neovaskülarizasyon oluşumuna yol açmaktadır.<sup>9,10,11</sup> VEGF, endotel hücre mitozunu ve damar geçirgenliğini arttırır. Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Hipoksi varlığında VEGF'nün m-RNA sentezi 30 katına çıkar. Hipoksiye bağlı stimülasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF ve diğer büyüme faktörleri, artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur. Bu bilgiye dayanılarak yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD), santral retinal ven tıkanıklığı (SRVT), retinal ven dal tıkanıklığı (RVDT), proliferatif diyabetik retinopati (PDR), diyabetik maküla ödemi, psödo fakik kistoid maküla ödemi gibi kan-retina bariyerinin yıkıldığı, vasküler geçirgenliğin arttığı ve göziçi neovaskülarizasyonun görüldüğü göz hastalıkları için farmakolojik olarak VEGF inhibisyonu yeni bir tedavi stratejisi olmuştur. VEGF'nün endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek VEGF'nün etkinliği önlenmektedir.<sup>12</sup> Bu mekanizmaların başlıcaları VEGF ile uyumlu spesifik ardışık oligonükleotidler (aptamer), VEGF alt grubuna etkili monoklonal antikolar, VEGF reseptör blokerleridir.

Lucentis (Ranibizumab), Avastin (Bevacizumab), Ozurdex (Deksametazon) gibi anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik etkili ajanlar yeni tedavi seçenekleri oluşturmakla birlikte bu ajanların etkilerinin kısıtlı olduğu ve zaman zaman yetersiz olduğu görülmektedir.<sup>13,14,15</sup> Bu nedenle retinal neovasküler hastalıklarda antiproliferatif kalıcı, güvenilir etkili tedavi seçenekleri aranmaktadır.

Saphora flavescens'den elde edilmiş olan alkaloid matrine anti-proliferatif, anti-anjiyogenik pro-apoptotik etkili ve VEGF proliferasyonunu baskılayıcı etkisi olan bir ajandır. Hedefimiz, etkili ve dokulara hasar vermeden oküler anjiyogenezi inhibe edebilme yöntemlerini araştırmak, görme kaybına hatta körlüğe neden olan intraoküler neovasküler hastalıklarda koruyucu tedavi yöntemlerini incelemektir.

Çalışmamızın amacı oksijen endükte retinopati (OER) In vivo fare modelinde C57BL/J6 ırkı fare kullanarak matrine'nin çeşitli dozlarda retinal endotel hücre proliferasyonuna, retina morfolojisine ve apoptotik hücre ölümüne etkisini araştırmaktır. Farede OER modelinde vasküler özellikler, insandakine benzer vasküler yapılanma göstermektedir. Oluşan retinal neovaskülarizasyon tekrarlanabilir ve kantifiye edilebilir niteliktedir. Retinal neovaskülarizasyonun patogeneze ve tedavi arayışlarına yönelik uygun bir model oluşturmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 ANJİOJENEZ VE ANJİYOJENEZDE ETKİLİ OLAN FAKTÖRLER

Vaskülojenez embriyonik dönemde endotel hücre öncülerinin farklılaşması ile damar oluşumudur. Anjiojenez ise oluşmuş olan damarlardan yeni damarların gelişmesidir. Erişkinlerde fizyolojik anjiojenez örneğin menstrüel siklus boyunca endometriyumda, kıl büyümesinde, yara iyileşmesinde, egzersiz bağımlı kas remodelizasyonunda, doku onarımı ve gelişimi sırasında görülmektedir. Patolojik anjiyojenez ise kalp hastalıkları, kanser, periferik vasküler hastalıklar, psöriyazis, romatoid artrit, serebrovasküler olayda görülebilir. Retinal neovasküler hastalıklarda örneğin diyabetik retinopati, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, prematüre retinopatisi, retinal ven tıkanıklığı gibi hastalıklarda görülmektedir.<sup>16</sup>

Anjiyojenezde başlangıçta vasküler permeabilitede artış görülmektedir ve bu artış patolojik anjiyojenez için kardinal bir bulgudur. Hücre dışı matriks yıkımı, endotel hücrelerinin kemotaktik göçü ve çoğalmasını takiben hücre çoğalması durur ve lümen oluşumu ile yeni damarlar oluşur. Yeni oluşan bu damarlar zayıf ve sızdıran damarlardır. Bu geçirgenlik artışı sonucunda ödem meydana gelmektedir. İskemik dokuya besin taşınmasını arttırmak ve oluşan atıkları uzaklaştırmak amacıyla yeni damarlar oluşur. VEGF fizyolojik ve patolojik bütün anjiyojenezlerde artan ve anjiyojenezi direk uyaran moleküldür.<sup>17</sup> Ayrıca anjiyojenezi uyaran faktörler içinde hem anjiyojenik etki gösteren hem de damar geçirgenliğini arttıran önemli faktör VEGF'dür.<sup>18</sup>

#### 2.1.1 VEGF

VEGF 40 kDa ağırlığında endotelial hücre büyümesi, neovaskularizasyon ve damar geçirgenliğini arttıran potent bir dimerik glikoproteindir. VEGF anjiyojenezin en önemli merkezi mediatörü olarak tanımlanmıştır ve anjiyojenezde anahtar bir rol oynamaktadır. VEGF geni 8 ekzon ve 7 introndan oluşmaktadır.<sup>19,20</sup> Gen 14kb'lık kodlama bölgesini kapsamış olup 6. kromozom (6p21.3) üzerinde bulunur.<sup>21</sup> VEGF gen ailesi VEGF-A, B, C, D, E, F ve plasental büyüme faktörü olmak üzere toplam 7 alt gruptan oluşmaktadır.<sup>22</sup> Anjiyojenezde en güçlü ilişkisi olan VEGF-A, anti-VEGF tedavisinin hedefidir.<sup>23</sup> VEGF-A'nın içerdiği aminoasit sayılarına göre adlandırılan VEGF 121, VEGF 145, VEGF 148,

VEGF 162, VEGF 165, VEGF 165b, VEGF 183, VEGF 189, VEGF 206 olmak üzere 9 izoformu bulunmaktadır.<sup>24,25</sup> İnsan gözünde güçlü patolojik formu VEGF 165'dir.<sup>26</sup>

VEGF damar geçirgenliğinde artış sağlayan, anjiojenik, mitojenik, nöroprotektif, kemotaktik bir faktördür. VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR 1 (flt-1), VEGFR 2 (flk-1/KDR) ve VEGFR 3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGFR 1 ve VEGFR 2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGFR 3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır.<sup>27</sup> VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar.

## **2. 2 RETİNAL VASKÜLER HASTALIKLAR**

### **2. 3 PREMATÜRE RETİNOPATİSİ**

Prematüre retinopatisi (PR) retinanın damarsal bozukluğu sonucu yenidoğan bebeklerde oluşan proliferatif vitreoretinopatidir. Hastalık ilk defa 1942 yılında, prematüre bebeklerde lens arkasındaki fibroblastik kitlenin varlığını fark eden ve bunu düşük doğum haftası ve oksijen kullanımıyla ilişkilendiren Terry tarafından 'retrolental fibroplazi' olarak adlandırılmıştır.<sup>28</sup> PR gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hastalığın geç evresindeki güncel tedavi yaklaşımlarına rağmen çocuklarda körlüğün yaygın bir nedenidir. PR multifaktöriyel bir hastalıktır. Düşük doğum ağırlığı, düşük doğum haftası, sepsis, oksijen tedavisi, solunum sıkıntısı sendromu ve kan transfüzyonu PR gelişiminde risk faktörleridir.<sup>29</sup> Ancak son yıllarda yapılan birçok çalışmada majör risk faktörlerinin düşük doğum haftası ve düşük doğum ağırlığı olduğu gösterilmiştir.<sup>30</sup> Özellikle çok düşük doğum ağırlığı , düşük doğum haftası ve oksijen tedavisi esas risk faktörleridir.<sup>31</sup> Son yıllarda yenidoğan bakım ünitesindeki gelişmeler prematüre infantların sağ kalım oranını arttırmıştır.<sup>32</sup> Ekstrem küçük prematüre bebeklerin sağ kalım oranına paralel olarak agresif PR olgularında artış görülmüştür.<sup>33</sup> Ayrıca ekstrem prematüre bebeklerde görülen PR bulgularının gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklı seyrettiği bildirilmiştir.<sup>34</sup>

#### **2. 3. 1 Prematüre Retinopatisi Patogenezi**

Fetusta retinal damarların gelişimi gestasyonun 16. haftasında başlar. Damarlar periferde doğru ilerleyerek optik diskten ora serrataya doğru göç ederler.<sup>35</sup> Temporal ora serrataya gestasyonun 40. haftasında ulaşırlar. Bu nedenle prematüre bebeklerde doğumda retina tam

vaskularize olmayıp, bu bebeklerde doğumdaki gestasyon haftasına göre genişliği değişen periferik avasküler zon mevcuttur. Prematüre retinopatisi faz 1 ve faz 2 olmak üzere iki fazdan oluşan bir hastalıktır. Faz 1 hiperoksiye bağlı olarak retinal vaskularizasyonun inhibisyonunu, faz 2 ise kan damarlarının anormal proliferasyonunu içerir.

#### Faz 1 :

Doğum ile postmenstrual 30-32. gestasyonel haftalarda görülür. PR'nin ilk fazında intrauterin ortamda başlamış olan retinal vaskularizasyonda prematüre bebeğin doğum sonrası maruz kaldığı hiperoksi nedeni ile duraklama, damarlarda vazobliterasyon ve kayıp görülür. Faz-I de vasküler yapılanma duraksamaktadır.<sup>36,37</sup> Oksijen endükte retinopati (OER) C57BL/J6 fare modelinde hiperoksik ortamda PR'nin Faz-I dönemi detaylı ve güvenilir incelenmiştir ve vazokonstriksiyon ve vazobliterasyon ile birlikte vasküler yapılanmanın duraksadığı gösterilmiştir.<sup>38</sup>

#### Faz 2:

Postmenstrual 32-34. haftalarda görülür. Hipoksinin indüklediği retinal neovaskularizasyon fazıdır. VEGF salınımı hiperoksiye bağlı olarak PR'nin ilk fazında baskılanırken, hastalığın 2. fazında retinal hipoksiye bağlı olarak sentezi artar ve retinal neovaskularizasyon oluşur. Prematüre bebeğin maruz kaldığı hiperoksi VEGF m-RNA sentezinin inhibisyonuna ve VEGF salınımının azalmasına yol açarak normal vasküler gelişimi bloke eder ve immatür retinal kan damarlarında vazobliterasyon ve kayıp görülür.<sup>39</sup>

### **2. 2. 2 Evreleme**

Hastalığın son sınıflandırılması 1984 yılında kabul edilen ve 1987 yılında geliştirilen ICROP'a (International Classification of Retinopathy of Prematurity) göre yapılmaya başlanmıştır. 2005 yılında uluslararası sınıflandırmanın düzeltilmiş şekli yayınlanmıştır. ICROP'a göre hastalığın şiddetini 4 etken belirler.<sup>40</sup>

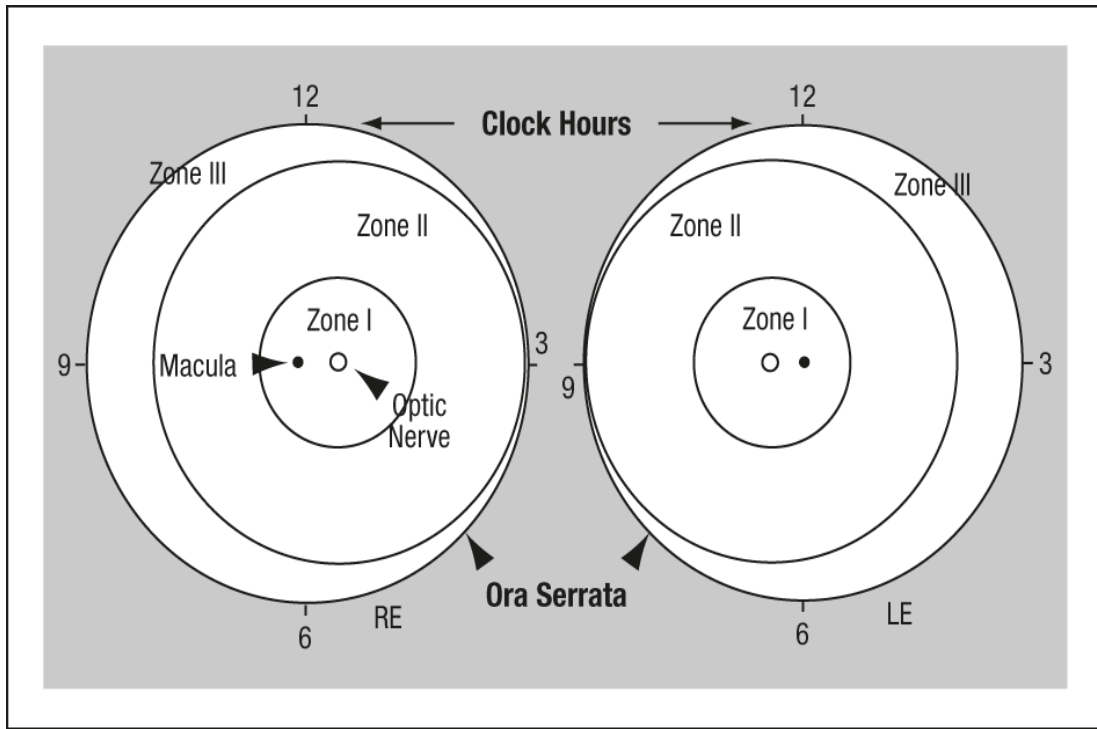
- Retina tutulumunun yerleşimi; zonlarla ifade edilir.
- Retina tutulumunun yaygınlığı; saat kadranı olarak ifade edilir.
- Retinopatinin ciddiyeti; evre olarak ifade edilir.
- Retina arka kutup damarlarında tortuosite ve dilatasyon varlığı (plus hastalık).

## Zon tanımı

Zon 1: Merkezi optik disk olan, yarıçapı disk makula mesafesinin 2 katı olan dairesel alandır.

Zon 2: Zon 1 sınırından başlayan, nazalde ora serrataya temporalde anatomik ekvatora uzanan dairesel alandır.

Zon 3: Temporalde ora serratada sonlanan yarımay şeklindeki alandır.



## EVRELEME

Evre 1 (Demarkasyon hattı): Öndeki avasküler retina ile arkadaki vasküler retinayı ayıran ince beyaz bir çizgidir.

Evre 2 (Ridge): Demarkasyon hattının yükseklik, genişlik ve hacim kazanmasıyla karakterizedir.

Evre 3 (Ekstraretinal fibrovasküler proliferasyon): Ridge posteriorundan uzanan fibrovasküler dokunun vitreusa doğru ilerlemesi ile karakterizedir. Vitreusa uzanan

ekstraretinal fibrovasküler dokunun yaygınlığına göre bu evre hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3'e ayrılır.

Evre 4 (Kısmi retina dekolmanı):

Evre 4A: Ekstrafoveal

Evre 4B: Foveal

Evre 5 (Total retina dekolmanı) : Retina dekolmanı sıklıkla traksiyona bağlı olmakla birlikte eksudatif de olabilmektedir ve sıklıkla huni şeklindedir.

Plus Hastalık: Arka kutup damarlarında arterlerde tortuosite artışı ve venlerde dilatasyon olması, vitreus hemorajisi ve bulanıklığı, iris damarlarında genişleme ve kıvrımlanma artışı, pupil dilatasyonunda azalma (rijid pupil) plus hastalık olarak ifade edilir. Herhangi bir evrede plus hastalığı görülebilir. Evrenin yanına + veya – işareti konularak gösterilir. Plus hastalık mevcudiyetinde PR progresyonu hızlı olur.

Agresif Posterior PR: Nadir görülen hızlı ilerleyen ciddi bir durumdur, klasik evreleri geçirmez.

### **2. 3. 3 Tedavi**

Hastalığın evresine göre farklı tedavi yöntemleri tek başına ve/veya kombine olarak uluslararası geçerli kriterlere göre uygulanmaktadır.<sup>41</sup>

Tedavi seçenekleri:

I. Lazer fotokoagülasyon

II. İntravitreal anti-VEGF

III. Vitrektomi veya serklaj cerrahisi

### **2. 4 DİYABETİK RETİNOPATİ**

Diyabetik retinopati gelişmiş ülkelerde 40-65 yaş grubunda önde gelen körlük sebebidir.<sup>42</sup> Diyabetik hastalardaki görme kaybının başlıca nedeni maküla ödemidir.<sup>43</sup> Retinopatinin ciddiyetine bağlı olarak maküla ödemi sıklığı da artmaktadır. Hafif nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)'de % 3, orta-ciddi NPDR'de % 38, proliferatif diyabetik retinopati (PDR)'de % 71 oranında maküla ödemi bildirilmiştir.<sup>44</sup>

## 2. 4. 1 Diyabetik Retinopatinin Patogenezi

Diyabetik retinopati retinada kapillerlerin, venüllerin ve prekapiller arteriyollerin tutulduğu spesifik bir anjiopati ve buna eşlik eden bir nöropati olarak tanımlanabilir.<sup>45</sup>

Diabetik retinopatiye ilişkin patolojik değişiklikler sorbitol yolu, non-enzimatik glikozilasyon, oksidatif stres, nitrik oksit artışı ve protein kinaz C aktivasyonu gibi biyokimyasal mekanizmalar yoluyla meydana gelmektedir.

## 2.4.2 Patofizyolojik Mekanizmalar

Mikropanjiopati ve diyabetik maküler ödem gelişimindeki patofizyolojik olaylar sırasıyla;

- \* Perisit kaybı
- \* Mikroanevrizma oluşumu
- \* Bazal membran kalınlaşması
- \* Kapiller yatakta kapanma
- \* Kan-retina bariyer yıkımı
- \* Vasküler permeabilite artışıdır.<sup>46,47</sup>

Biyokimyasal değişimler ve buna bağlı hücre değişimleri sonucunda vasküler yatakta iki farklı cevap gelişir:

- Kapiller endotel hücrelerinin ve ona destek veren perisitlerin sayılarında azalma; kapillerlerin geçirgenliğinde artışa neden olur. Bu durum klinikte kendini retina içi hemoraji, sert eksüda, retina ödemi şeklinde gösterir.
- Kapillerlerin bazal membranlarının kalınlaşması, endotel hücre hasarının gelişmesi, trombosit agregasyonunda artma; kapillerlerin arteriol bölümlerinde tıkanmaya dolayısıyla retina hipoksisine neden olur. Bu durum arteriovenöz şantların, neovaskülarizasyonların, yumuşak eksudaların (sinir lifi infarktı) gelişmesiyle kendini gösterir.<sup>48</sup> Vasküler endotelin proliferasyonunu inhibe ve aktive eden maddeler normalde bir dengede bulunurlar. Bu denge, diyabette proliferatif olanların lehine bozulur. VEGF, endotel hücre mitozunu ve damar geçirgenliğini artırır. Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Hipoksi varlığında VEGF m-RNA sentezi 30 katına çıkar. Hipoksiye bağlı stimülasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF ve diğer büyüme faktörleri, artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur.<sup>49,50</sup>



### 2. 4. 3 Diyabetik Retinopatide Sınıflandırma

Diabetik retinopatinin sınıflandırılması, takip ve uygun tedavi yönteminin şekli ve zamanlaması, Diabetic Retinopathy Study (DRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study (DRVS) çalışmaları ile büyük oranda aydınlatılmıştır.<sup>51</sup> Diyabetik retinopati iki ana grup altında sınıflandırılır:

1-Nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)

2-Proliferatif diyabetik retinopati (PDR)

Diabetik maküler ödem NPDR yada PDR ile beraber bulunabilir.

**1. Hafif NPDR:** Seyrek mikroanevrizma (MA) ve/veya mikrohemoraji

**2. Orta NPDR:** Yaygın retinal hemorajiler ve/veya MA, 2 kadrandan az venöz boncuklanma, yumuşak eksuda, hafif intraretinal mikrovasküler anomali (İRMA)

**3. İleri NPDR:**

**a) Şiddetli NPDR**

4-2-1 kuralı: Aşağıdaki özelliklerden herhangi birinin olması:

\*4 kadranda yoğun retinal hemoraji ve MA

\*2 veya daha fazla kadranda venöz boncuklanma

\*1 veya daha fazla kadranda İRMA

**b) Çok şiddetli NPDR**

Bu özelliklerin birden fazlasının olmasıdır.

**4. PDR:**

**a) Erken PDR**

Aşağıdaki özelliklerden herhangi birinin olması:

\*Retinal neovaskülarizasyon (NV)

\*1/4 -1/3 disk çapından küçük veya eşit optik disk neovaskülarizasyonu (NVD)

**b) Yüksek riskli PDR**

Aşağıdaki özelliklerden herhangi birinin olması:

\*1/4-1/3 disk çapından daha büyük NVD

\*1/4-1/3 disk çapına eşit veya küçük NVD ile birlikte preretinal hemoraji veya vitreus hemorajisi

\*Retinal NV ile birlikte preretinal veya vitreus hemorajisi

#### **2. 4. 4 Tedavi**

Tedavi seçenekleri tek ve/veya kombine uluslararası belirlenmiş kriterlere göre uygulanmaktadır.<sup>52</sup>

Tedavi seçenekleri:

- I. Lazer Fotokoagulasyonu
- II. Göziçi steroid uygulaması
- III. Anti-VEGF Tedavisi
- IV. Vitreoretinal cerrahi

#### **2. 5 KOROIDAL NEOVASKÜLARİZASYON**

Koroid neovaskülarizasyonu (KNV), koroidden kaynaklanan yeni damarların bruch membranını geçerek retina altına ve iç katmanlara doğru büyümesi sonucu oluşur. Yeni damarlar koroid ve retina pigment epiteli (RPE) arasında veya RPE ile duyuşal retina arasında yer alırlar. YBMD en sık olmakla beraber, RPE, bruch membranı ve koryokapillaris kompleksini etkileyen pek çok hastalık KNV gelişimine neden olabilir.<sup>53</sup> KNV oluşmasında en sık rastlanan ikinci etyolojik etken patolojik miyopidir.<sup>54</sup> Etiyoloji farklı olsa da, teşhis için kullanılan teknikler ve tedavi yöntemleri genellikle aynıdır. Termal lazer fotokoagulasyon, sistemik ilaçlar, çeşitli cerrahi yöntemler, verteporfin ile yapılan fotodinamik tedavi ve intravitreal ilaç uygulamaları şimdiye kadar uygulanan tedavi yöntemleridir. Verteporfin kullanılarak yapılan fotodinamik tedavi ve intravitreal olarak uygulanan VEGF inhibitörleri ile tedavi; neovasküler tip YBMD'de etkinlikleri çok merkezli kontrollü çalışmalarla kanıtlanmış en önemli tedavi seçenekleridir.<sup>55</sup>

##### **2. 5. 1 Koroidal Neovaskülarizasyon Oluşturan Nedenler**

- Yaşa bağılı makula dejeneresansı
- Patolojik miyopi
- İdiopatik
- Anjioid streaks
- Oküler histoplazmozis sendromu
- Serpijinöz veya coğrafik koroidit
- Toksoplazmik retinokoroidit

- Optik disk drusenleri, optik sinir başı pitleri
- Koroid osteomu, nevüsü, malign melanom
- Travmatik koroid rüptürü
- Lazer fotokoagülasyon
- Retinal anjiomatöz proliferasyon
- Punktat iç korioretinopati
- Akut multifokal plakoid pigment epitelyopati
- Harada hastalığı
- RPE hamartomları
- Sarkoidoz ve Behçet hastalığı

### **2. 5. 2 Koroidal Neovaskülarizasyonda Klinik Semptomlar**

Sıklıkla makula hasarına bağlı olarak bulanık görme ve metamorfopsi görülür. Maküla altındaki sıvının en erken karşılaşılan bulgusu bulanık ve çarpık görmedir ve yakın görme testleri ile daha iyi tespit edilebilmektedir. Bu amaçla hastaların kendi görmelerini kontrol etmeleri için Amsler grid kartı testi kullanılması önerilir.<sup>56</sup> Amsler grid ile saptanan önemli bulgular; dalgalı ve çarpık görme, düz ancak donuk çizgiler, hat distorsiyonu, boş veya kararmış spotlar, santral skotom ve çizgilerde grileşmedir.

### **2. 5. 3 Koroidal Neovaskülarizasyonda Patofizyoloji**

RPE ve bruch membranı arasında başta lipidler olmak üzere biriken depozitler koryokapillaristen RPE tabakasına oksijen ve besin maddesi geçişini kesintiye uğratar.<sup>57</sup> Oluşan hipoksi başta VEGF olmak üzere, anjiyojenik maddelerin ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırmakta ve bruch membranında lenfosit, fibroblast ve makrofaj birikimine neden olmaktadır. RPE, koroid kökenli endotel hücreleri ve makrofajlardan salınan doku metalloproteinazları bruch membranının proteolizine ve incelmeye neden olur ve membran üzerinde çatlakların oluşmasına yol açar. Anjiyojenik faktörlerin uyardığı koroid endotel hücreleri de bu çatlaklardan geçerek RPE altı alana yerleşir. Yeni damar endotelinin bariyer fonksiyonu gelişmediğinden, retina içi tabakalara sıvı, protein ve lipid sızdırırlar ve damar yapısının kolay kırılğan olmasından dolayı kanama eğilimleri fazladır.

Oluşan kanamanın organize olması ile birlikte fibröz doku gelişimi tetiklenir. Sonuçta fibrovasküler skar dokusu oluşur.

#### **2. 5. 4 Tedavi**

Uluslararası prospektif randomize yürütülmüş çalışmalar sonucunda belirli kriterlere dayalı çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır.<sup>58,59</sup>

##### Tedavi seçenekleri:

- I. Fotodinamik tedavi
- II. İntravitreal anti-VEGF uygulamaları
- III. İntravitreal steroid enjeksiyonu
- IV. Kombine tedavi

#### **2.6 RETİNAL VEN TIKANIKLIKLARI**

Retina ven tıkanıklığı oldukça sık görülen görmeyi tehdit eden bir göz hastalığıdır. Sıklıkla ileri yaşlarda görülmektedir.<sup>60</sup>

Retinal ven tıkanıklıkları iki şekilde karşımıza çıkabilir.

1. Santral retinal ven tıkanıklığı
2. Retinal ven dal tıkanıklığı

##### **2.6.1 Santral Retinal Ven Tıkanıklığı**

Santral retinal ven tıkanıklığı klinik olarak üç gruba ayrılır:

- 1- İskemik olmayan SRVT
- 2- İskemik SRVT
- 3- Papilloflebit

Olguların %81'i iskemik olmayan tiptir. Makula ödemi iskemik tipte daha sık ve şiddetli görülür. Makula ödemeine bağlı görme keskinliği oldukça düşüktür. Afferent pupil defekti mevcuttur. Floresein anjiyografide 10 disk çapından fazla perfüze olmayan alanın bulunması iskemik tip için belirleyici olarak kabul edilir.<sup>61</sup> Papilloflebit sıklıkla 20-30 yaş

grubunda görülmekte, optik disk ödemi belirgin olup tabloya enflamatuvar ve tıkaçıcı mekanizmalar katılmaktadır.<sup>62</sup>

## **2. 6. 2 Retinal Ven Dal Tıkanıklığı**

Retinal ven tıkanıklığı diyabetik retinopatiden sonra ikinci sıklıkta görülen retina damar hastalığıdır.<sup>63</sup> RVDT, SRVT'dan 3 kat daha sık görülür.<sup>64</sup> 60-70 yaşlar arasında, erkekler ve kadınlarda eşit sıklıkta görülür. Ven tıkanıklıkları arter ve venin ortak bir adventisya kılıfını paylaştığı arteriyovenöz çaprazlaşma bölgesinde oluşur.<sup>65</sup> Histolojik olarak retinal arteriyollerdeki arteriyosklerotik değişikliklere bağlı olduğu görülmüştür.<sup>66</sup> Diyabetes mellitus, hipertansiyon, hiperlipidemi ve arteriyoskleroz yapan diğer nedenlere bağlı görülmektedir.<sup>67</sup> Ven dal tıkanıklıklarının %98'i temporal kadranda, bunların % 63'ü ise arteriyovenöz çaprazlaşmalarının sık görüldüğü üst temporal kadranda oluşur. Diğer olgularda alt temporal ven dalları etkilenir. Bütün ven dal tıkanıklıklarının yaklaşık % 17'si makülayı drene eden küçük damarların tıkanıklıkları ile oluşur. Nazal kadrandaki ven dal tıkanıklıkların klinik bulgu vermemesinden dolayı az oranda (% 1-9) görüldüğü tahmin edilmektedir. Olguların % 5-10'unda diğer gözde ven dal tıkanıklığı gelişir.<sup>67</sup>

### **Retina Ven Dal Tıkanıklıklarında Klinik Bulgular ve Teşhis**

Genellikle bulanık görme ve görme alanı defekti görülür. Eğer makula etkilenmezse asemptomatik olabilir. Akut RVDT teşhisi klinik muayenede oftalmoskopik olarak tıkanan bir retina ven dal bölgesinde retina hemorajilerinin ve/veya maküla ödeminin görülmesi ile konur. Arteriyovenöz çaprazlaşma bölgesinin üzerinde venöz dilatasyon ve kıvrım artışı, retinada venin dağılımına sınırlı alev şekilli ve nokta-benek hemorajiler, retinal eksudalar, ve etkilenen retina bölümünde maküla ödemi RVDT için karakteristiktir. Teşhis ve tedaviyi yönlendirmek için akut fazda çekilen floresein anjiyografide hemoraji alanında dolum defekti, etkilenen damarda venöz dolumda gecikme izlenir. Hemoraji ve kapiller perfüzyon yokluğu nedeniyle hipoflöresans yaygın bulgulardır ve genişlemiş, kıvrımları artmış kapiller damarlar görülür.<sup>68</sup> Maküla etkilenmişse kapiller perfüzyon yokluğu ve maküla ödemi görülür.

Optik koherens tomografi (OKT)'de RVDT'nin akut fazında kistik değişikliklerin olduğu maküla ödemi görülür. Fovea santralinden geçen vertikal OKT kesitinde ödemli ve normal

retina arasında horizontal demarkasyon hattının izlenmesi ven dal tıkanıklığı için patognomoniktir.<sup>69,70</sup>

### **Retina Ven Dal Tıkanıklığı Patogenezi**

Arteriyovenöz çaprazlaşma bölgesinde kalınlaşmış arterin ven üzerine bası yapması ve tromboz oluşumu ile ven tıkanıklığının oluştuğu öne sürülmektedir. Adventisyel kılıfın kontraksiyonu ve sertleşen arterin retinal vene bası yapması kan akımında türbülansa ve endotel hasarına yol açıp tromboz oluşturması sonucu damar tıkanıklığı gelişir.<sup>71</sup> Retinal ven tıkanıklığı göziçi VEGF düzeyinde artışa neden olmaktadır.<sup>72</sup> Vasküler permeabilitede artış ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Yeni oluşan bu damarlar zayıf ve sızdıran damarlardır. Bu geçirgenlik artışı sonucunda ödem meydana gelmektedir.

### **Retina Ven Dal Tıkanıklığının Risk Faktörleri**

Yapılan çalışmalarda retina ven dal tıkanıklığının gelişmesinde sistemik hipertansiyonun en önemli risk faktörü olduğu gösterilmiştir.<sup>73</sup> Diyabet, hiperlipidemi, glokom, sigara kullanımı, atheroskleroz, kardiyovasküler hastalık ve artmış vücut kitle indeksi (>24 kg/m<sup>2</sup>) diğer risk faktörleridir. Glokom santral retinal ven tıkanıklığının gelişmesinde ven dal tıkanıklığına göre daha fazla risk oluşturmaktadır. Periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, tiroid ve gastrointestinal hastalıklar ven dal tıkanıklığı ile ilişkili bulunmuştur. Koagülasyon hastalıklarından faktör XII eksikliği, faktör VII ve aktive olmuş protein C resistans/faktör V Leiden yüksekliği ven dal tıkanıklığı ile ilişkilendirilmiştir.

### **Retina Ven Dal Tıkanıklığı Tedavisi**

Tedavide sistemik etkili ve/veya göze direk uygulanan seçenekler bulunmaktadır. Özellikle direk göze uygulanan teknikler Uluslararası prospektif randomize yürütülmüş çalışmalar sonucunda belirli kriterlere dayalı çeşitli tedavi seçeneklerini oluşturmaktadır.<sup>74</sup>

#### **Tedavi seçenekleri:**

- I. Antikoagulasyon
- II. Hemodilüsyon

III. Doku plazminojen aktivatörü ile tromboliz

IV. Lazer Fotokoagulasyonu

V. Göziçi steroid uygulaması

- Triamsinolon asetonid
- Uzun salınımlı intravitreal steroid

VI. Anti-VEGF Tedavisi

VII. Lazer ile koryoretinal venöz anastomoz oluşturulması

VIII. Cerrahi Tedavi

- Vitreomaküler ayrıştırma ile birlikte vitrektomi
- Arteriyovenöz şitotomi ile birlikte vitrektomi

## **2. 7 PERİFERİK RETİNAL NEOVASKÜLARİZASYON İLE SEYREDEN HASTALIKLAR**

### **2. 7. 1 Orak Hücreli Anemi**

Hemoglobin beta zincirinde 6. aminoasit olan glutamik asitin yerine valinin gelmesiyle oluşmaktadır.<sup>75</sup> Orak hücreli anemide periferik retinada kapiller nonperfüzyon ve deniz yelpazesi şeklinde neovaskülarizasyon gelişir. Hastalığa bağlı retinopatinin 5 evresi vardır.

Evre 1: Periferik damar tıkanıklığı

Evre 2: Arteriyovenöz anastomozlar

Evre 3: Retina neovaskülarizasyonu

Evre 4: Vitreus hemorajisi

Evre 5: Retina dekolmanı

### **2. 7. 2 Eales Hastalığı**

Tüm yaş gruplarında, genellikle iki taraflı ve erkeklerde daha sık görülen periferik neovaskülarizasyon yapan bir hastalıktır. Tüberkülin veya diğer antijenlere duyarlı olgularda periferik venlerin duvarında lokal hipersensivite sonucu geliştiği düşünülmektedir.<sup>76</sup> Normal ve iskemik retina sınırında deniz yelpazesi şeklinde neovaskülarizasyon görülür.<sup>77</sup>

### **2. 7. 3 Oküler İskemik Sendrom**

Karotis tıkanıklığı sonucu gelişir. Nedenleri arasında Takayashu arteriti, atheroskleroz, sifiliz, karotis arter diseksiyonu vardır. Yaygın oküler iskemiye bağlı olarak neovaskülarizasyon gelişmektedir.

### **2. 7. 4 Multiple Skleroz**

Merkezi sinir sisteminde beyaz cevherde demiyelinizasyonla seyreden hastalıktır. Periferik retina iskemisi nadir görülmekle beraber, normal-iskemik retina sınırında neovaskülarizasyon görülebilir.<sup>78</sup>

### **2. 7. 5 Behçet Hastalığı**

Tekrarlayıcı oral aft, genital ülser ve hipopiyonlu akut iritis yapan kronik tekrarlayıcı hastalıktır. Erkeklerde daha sık görülür. Arka segmentte tıkaçıcı retinal vaskülit, intraretinal hemorajiler, maküler ödem, fokal retinal nekroz alanları, iskemik optik nöropati, vitritis, tekrarlayan vaskülit ataklarına bağlı iskemi ve neovaskülarizasyon görülür.

### **2. 7. 6 Sarkoidoz**

### **2. 7. 7 Sistemik Lupus Eritematozus**

### **2. 7. 8 Birdshot Retinokoroidopati**

### **2. 7. 9 Toksoplazma Koryoretiniti**

### **2. 7. 10 Akut Retinal Nekroz**

### **2. 7. 11 İnkontinentia Pigmenti**

### **2. 7. 12 Kronik Retina Dekolmanı**

### **2. 7. 13 Koroid Melanomu**

### **2. 7. 14 Retinitis Pigmentoza**

### **2. 7. 15 Retinoskizis**

### **2. 7. 16 Radyasyon Retinopatisi**



## 2.8 ANTİANJİYOJENİK AJANLAR

Anjiyojenezin en önemli uyararı olan VEGF patolojik anjiyojenez ve embriyonik vaskülojenezde rol oynamaktadır. Esas patolojik formu VEGF 165'dir. İlk olarak 1994 yılında proliferatif diyabetik retinopatili insan gözlerinde aköz ve vitreus VEGF seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır.<sup>79,80</sup> VEGF kan-retina bariyerinin bozulmasına, damar geçirgenliği arttırarak retina ödeme, endotel hücre proliferasyonuna ve neovaskülarizasyon oluşumuna yol açmaktadır.<sup>81,82,83</sup> Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Deneysel çalışmalarda hipoksiye bağlı retinal iskeminin VEGF sentezini arttırdığı bulunmuştur.<sup>84,85</sup> Hipoksi varlığında VEGF'in m-RNA sentezi 30 katına çıkar. Hipoksiye bağlı stimülasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur. Retinal/subretinal neovaskülarizasyon, diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı, iris neovaskülarizasyonu, retina dekolmanı, prematüre retinopatisi, yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan gözlerde aşırı VEGF-A salınımı izlenmiştir.<sup>7,86,87</sup>

Neovaskülarizasyonun görüldüğü göz hastalıkları için farmokolojik olarak VEGF inhibisyonu yeni bir tedavi seçeneği olmuştur. VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede inhibe edilerek VEGF'in etkinliği önlenmektedir.<sup>88</sup> Güncel yaklaşımlar rekombinan monoklonal antikor (bevacizumab), antikorun yüksek afiniteli fab parçası (ranibizumab) ve aptameri (pegaptanib sodyum) içermektedir.

### 2. 8. 1 Pegaptanib Sodyum

( Macugen; Eyetech Pharmaceuticals Inc, New York and Pfizer Inc, New York, US)

Klinik uygulamaya ilk olarak giren anti-VEGF ajandır. 28 baz ribonükleik asitin iki dal halinde 20 kDa polietilen glikol parçalarına bağlanmasından oluşan ve VEGF 165'e bağlanabilme özelliği olan bir aptamerdir.<sup>89</sup> Pegaptanib vitre içine enjekte edilmeli ve enjeksiyonlar 6 haftada bir tekrarlanmalıdır. Pegaptanibin en düşük etkili dozunun 0,3 mg olduğu ve bu ilacın görme keskinliğinde artış, santral retina kalınlığında azalma, lazer fotokoagülasyon ihtiyacında azalma, retinal neovaskülarizasyonda belirgin azalma sağladığı faz II çalışma ile saptanmıştır.<sup>90</sup>

### **2. 8. 2 Ranibizumab**

(Lucentis; Genentech Inc, South San Francisco, CA, US)

Lucentis, VEGF'in bütün izoformları için spesifik bir rekombinan insan monoklonal antikor fragmanıdır. Ranibizumab monoklonal antikorun Fab kısmından oluşmuş ve bevacizumab gibi VEGF-A izoformlarını nötralize eden bir antikor parçasıdır. Bevacizumabın büyük molekül ağırlığı, 140 kDa, nedeniyle antikorun antijen bağlayan kısmının pepsin ayırma yöntemiyle ayrılması sonucu elde edilen monoklonal antikor parçasının intravitreal uygulanmasının daha etkili olacağı düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkılarak insan VEGF'ine karşı elde edilen monoklonal antikorun antijen bağlayan parçasının çeşitli işlemlerden geçirilmesi ile ranibizumab elde edilmiştir. Retina içine penetrasyonu arttırmak amacıyla bütün antikor olarak değil, antikor parçası olarak üretilmiştir.<sup>91</sup> Ranibizumab RVT ve YBMD'da FDA (Food and Drug Administration) onaylı olarak kullanılmaktadır.

### **2. 8. 3 Bevacizumab**

(Avastin; Genentech, South San Francisco, California, US)

VEGF'e spesifik olarak bağlanan ve VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize eden rekombinan insan monoklonal antikorudur. Bevacizumab, VEGF'in endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasına engel olarak endotel hücrelerinin proliferasyonunu engellemektedir. İki adet antijen bağlanma bölgesine sahip 140 kDa ağırlığında bir moleküldür. Vitreus içine verilen bevacizumabın büyük molekül ağırlığı retinaya geçişi zorlaştırmakla beraber yapılan deneysel çalışmalar ve uygulama sonrası alınan hızlı cevap bu monoklonal antikorun retinayı geçebildiğini göstermiştir. Ranibizumaba göre molekül ağırlığı daha fazla olduğundan ve yarı ömrü daha uzun olduğundan daha az sayıda enjeksiyona ihtiyaç duyulabileceği düşünülmüştür. Ancak tavşanlardaki farmokinetiklerini araştıran bir çalışma, ikisinin vitredeki yarı ömürlerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir.<sup>92</sup>

Oküler komplikasyonlar ilacın farmakolojisiyle ilgili değil uygulama işlemi ile ilgili bulunmuştur. Oküler komplikasyonlar olarak bakteriyel endoftalmi, traksiyonel retina dekolmanı, üveit, yırtıklı retina dekolmanı ve vitre içi hemoraji bildirilmiştir.<sup>93</sup>

#### **2. 8. 4 Protein Kinaz C İnhibitörleri**

Protein kinaz C'nin hiperglisemide özellikle vasküler dokularda aktive edildiği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda VEGF ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Ruboksistaurin mesylate protein kinaz beta izoformunun yüksek seçicilik gösteren bir inhibitördür. Bu nedenle yan etkisi azdır.<sup>94</sup> Yapılan faz 1 çalışmalarda diyabetik retinopatinin progresyonunu yavaşlatmada ve retinal vasküler sızıntıyı azaltmada etkili olabileceği bildirilmiştir.<sup>95,96</sup>

#### **2. 8. 5 Steroid Olmayan Antiinflamatuvarlar**

Prostaglandin E<sub>2</sub> retinadaki esas prostaglandindir ve VEGF m-RNA ekspresyonunu uyarır. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar, hem siklooksijenaz hem de lipooksijenaz yolunu inhibe eder. Diklofenak diyabetik maküler ödem tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır. Baska bir inflamatuvar ilaç olan siklooksijenaz 2 inhibitörü celecoxibin de yararlı olduğu bildirilmiştir.<sup>94</sup>

#### **2. 8. 6 Triamsinolon Asetonit**

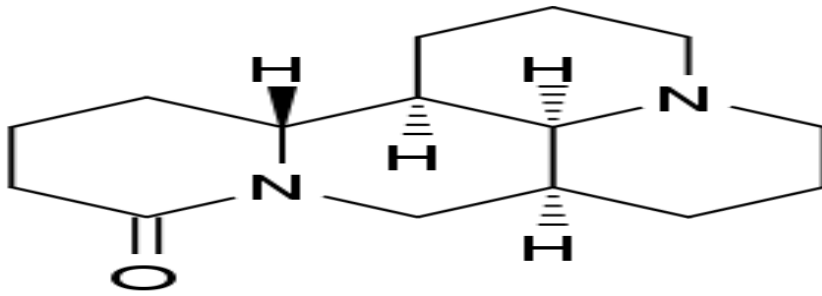
Antiinflamatuvar ve anjiostatik etkili steroiddir. PR fare modelinde in vivo koşullarda neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir.<sup>97</sup>

#### **2. 8. 7 Anekortav Asetat**

Anekortav asetat anti-anjiyojenik etki gösteren bir steroiddir.<sup>98</sup> Anekortav asetatin etkisini ve güvenilirliğini araştırmak için baskın klasik KNV'li olgulara üç ayrı dozda (30mg, 15mg ve 3mg) uygulanmış ve kontrol grubu ile bir yıllık takip sonuçları karşılaştırılmıştır. Onikinci ayın sonunda gerek ortalama görme düzeylerindeki değişiklik, gerekse görmenin stabilitesi ve şiddetli görme kaybının önlenmesi açısından 15 mg anekortav asetatin kontrol grubuna üstünlüğü gözlenmiştir.<sup>99,100</sup> Faz III çalışmasında ise, klasik tip KNV'li YBMD olgularında 15 mg anekortav asetat uygulananı ile fotodinamik tedavi (FDT) arasındaki fark araştırılmıştır. Bu çalışmanın bir yıllık takibinin sonucunda FDT uygulanan olgular ile anekortav asetat uygulanan olgular arasında görme düzeyinin korunması açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.<sup>100,101</sup>

## 2. 9 MATRİNE

Matrine ( $C_{15}H_{24}N_2O$ ), molekül ağırlığı 248.363860 g/mol, Çin’de yetişen bir bitki olan *Sophora flavescens* köklerinden elde edilen; çeşitli kanser türlerine karşı anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiye sahip olan bir alkaloiddir. Tianyou Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma matrine’nin in vitro ve in vivo olarak pankreatik kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir.<sup>102</sup> Cheng Zhen Liang ve arkadaşları in vitro ve in vivo ortamda matrine’nin osteosarkom hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve apoptozisi uyardığını göstermişlerdir. Matrine bu etkilerini caspaz 3-8-9 aktivasyonunu uyararak, pro-apoptotik faktör olan Bax ve Fas/FasL up regülasyonu, anti-apoptotik faktör olan Bcl-2 down regülasyonu ile yapmaktadır.<sup>103</sup> Pengfei Yu ve arkadaşları matrine’nin meme kanser hücre proliferasyonu ve invazyonu üzerine etkilerini incelemiş ve matrine’nin metastatik insan meme kanseri üzerinde baskılayıcı etkisini göstermişlerdir. Matrine’nin EGF/VEGF-VEGFR 1 üzerinden kanser hücre proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca matrine kanser hücrelerinde Bcl-2/Bax protein oranını ve m-RNA seviyelerini azaltarak apoptozisi uyandır.<sup>104</sup> Pengfei Yu ve arkadaşları matrine’nin meme kanser hücrelerinde, Ying Zhang ve arkadaşları küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde VEGF-A sekresyonunu azalttığını göstermişlerdir.<sup>105</sup> Oftalmolojide deneysel çalışmalar matrine’nin pterjiyumda rekürrens oranını ve proliferatif vitreoretinopatiyi önleyici anti-inflamatuar etkilerini göstermiştir. Bu çalışmalarda yüksek dozda verilmediği takdirde tavşanlara intravitreal olarak enjekte edilen matrineye bağlı inflamatuvar ve diğer yan etkiler görülmemiştir.<sup>106</sup> Biz çalışmamızda VEGF-VEGFR 1 sekresyonunu azaltıcı etkisine bağlı olarak anti-anjiyojenik özelliğinden faydalanmak fikriyle oksijen endükte retinopati in vivo fare modelinde intravitreal matrine enjeksiyonun retina morfolojisine, neovaskülarizasyona ve apoptotik hücre hareketine etkisini inceledik.



Matrine’nin kimyasal yapısı

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 HAYVAN DENEYİ PROTOKOLÜ

Tüm deneyler Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu Hayvan Hakları komitesinin onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi (Proje No: DA12/23). Deneyler Smith ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdikleri in vivo oksijen endükte retinopati fare modeli C57BL/J6 kullanılarak gerçekleştirildi (Resim-1). Yeni doğan C57BL/J6 fareler anneleriyle birlikte postnatal 7. güne kadar oda ortamında yaşatıldıktan sonra, postnatal 7. günden 12. güne kadar  $75 \pm 2$  oksijene tabi tutuldu. Postnatal 12. günde fareler tekrar oda ortamına (%21 oksijen) alındı. Aynı gün fareler tartılarak ketamin hidroklorür (40mg/kg) ve Xylazine hidroklorür (5mg/ml) intraperitoneal enjeksiyonu ile derin anestezi yapıldı. İntravitreal enjeksiyon için matrine (Sigma Aldrich Germany) orjinal 100mg toz matrineden eldilen solüsyon kullanıldı. Toz matrine literatürde önerildiği gibi steril izotonik solüsyon ile çözüldü.<sup>107</sup>

Literatürde matrine için intraoküler ve/veya intravitreal enjeksiyonu içeren çalışmalar mevcut değildir. Hücre kültürü çalışmalarında ve sistemik kullanımda kullanılan matrine dozu ve matrine farmakokinetiği hakkında kesinleşmiş bilgiler kısıtlıdır.<sup>108,103</sup>

Çalışmalarda kullanılan dozlar çeşitli hücre kültürlerinde 0.2-3 mg/ml arasında verilirken, örneğin rat çalışmasında sistemik kullanılan doz 15 mg/kg olarak verilmektedir. Çalışmamızda kullanılan C57BL/J6 farenin vücut ağırlığı enjeksiyon döneminde yaklaşık 5 g ve glob hacmi 5.3 µl olarak verilmektedir.<sup>109</sup>

Biz çalışmamızda orijinal sunulan toz matrineden elde ettiğimiz literatürde önerildiği koşullarda hazırlanan matrineyi iki farklı dozda intravitreal uyguladık. Etki yan etki gözlemlerimizi güçlendirmek amaçlı 1 ve yaklaşık 10x doz miktarını tercih ettik (0.78µg ve 6.25µg).

Analizler için fareler dört gruba ayrıldı.

Grup-A: Negatif kontrol grubu, oksijene tabi tutulmamış ve işlem görmemiş (n=10 göz)

Grup-B: Kontrol grubu, 1µl intravitreal steril izotonik solüsyon enjeksiyonu (n=18 göz)

Grup-C: 0.78 µg intravitreal matrine enjeksiyonu (n= 9 göz)

Grup-D: 6.25 µg intravitreal matrine enjeksiyonu (n= 9 göz)

1 µl intravitreal matrine enjeksiyonu farenin bir gözüne 32 gauge iğne ve Hamilton şırıngası ile stereoskopik mikroskop altında korneoskleral bölgede saat 6 hizasından yapıldı. Onsekiz C57BL/J6 fare postnatal 7-12. günler arasında  $75 \pm 2$  oksijene tabi tutuldu. Onikinci gün 9 farenin bir gözüne (Grup-C, n=9 göz) 0.78µg intravitreal matrine (IVM), 9 farenin bir gözüne 6.25µg IVM (Grup-D, n=9 göz) enjekte edildi. Farelerin diğer gözlerine 1µl steril izotonik solüsyon enjekte edildi (Grup-B, kontrol grubu, n:=18 göz). Beş tane yaş uyumlu işlem görmemiş, oda ortamında tutulmuş fare ( Grup-A, negatif kontrol grubu, n= 10 göz) negatif kontrol grubunu oluşturdu.

Fareler postnatal 12-17. günlerinde oda ortamında tutuldu ve postnatal 17. gün intraperitoneal ketamin hidroklorür (100mg/kg) ve Xylazine hidroklorür (5mg/ml) enjeksiyonunu takiben sakrifiye edildi ve gözler enükle edildi. Enükle edilmiş gözlerde histolojik/morfolojik inceleme ışık mikroskopi (Grup A, B, C, D 7, 13, 6, 6 tane göz) ve ultrastrüktürel inceleme elektron mikroskopi (her grupta 3 göz) ile gerçekleştirildi. Apoptotik aktivite terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UPT-nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile incelendi. TUNEL çalışması, ışık mikroskopi için hazırlanmış olan parafin kesitlerinde yapıldı (her grupta 6 göz).

### **3. 2 IŞIK MİKROSKOPİK İNCELEME**

Işık mikroskop incelemesi için gözler enükleasyon sonrası %4 paraformaldehid çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan 6 µm kalınlığında optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde retinal kesitler alındı. Optik sinirden sonra ikinci veya üçüncü kesitler incelemeler için kullanıldı. Kesitlere, retinal neovaskülarizasyonun kantitatif analizi ve morfolojik inceleme için periodic acid-schiff (PAS) ve hematoksilen-eosin boyama uygulandı. Neovaskülarizasyon internal limitan membran (ILM)'ın vitreus tarafındaki endotelial hücre proliferasyonunun bir kesitteki sayımı ile kantifiye edildi. Morfolojik incelemede retinanın çeşitli katmanları kistik dejenerasyon, hücre kaybı ve nükleer tabaka incilmesi açısından değerlendirildi. Kesitler ışık mikroskopi (OLYMPUS BX51, Germany) kullanılarak analiz edildi. Retinal neovaskülarizasyonun değerlendirilmesinde sonuçlar endotelial hücre çekirdek sayısı ortalaması  $\pm$  standart deviasyon olarak verildi.

### **3. 3 ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME**

Elektron mikroskopi incelemesi için retinal doku %2,5 gluteraldehide içeren fosfat tampon çözeltisinde 2-3 saat bekletildikten sonra %1 osmium tetraoxide (OsO<sub>4</sub>) içinde fikse edildi. Alkole seri olarak muamele edilerek dehidre edildi. Propilen oksite geçtikten sonra örnekler Araldyte CY 212, DDSA (2-dodecennyl succinic anhydride), BDMA (benzyl dimethyl amine) dedibutylpytalate içinde bekletildi. Semi-ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopi ile incelendi. Ultra-ince kesit alınarak, uranyl, acetat ve lead sitrat ile boyanarak LEO 90 EM transmisyon elektron mikroskopu ile incelendi.

### **3. 4 TERMINAL DEOXYNUCLEOTİDYL TRANSFERASE-MEDIATED NICK AND LABELING (TUNEL) TECHNIQUE**

Gözler enükleasyon sonrası %4 paraformaldehid çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan 6 µm kalınlığında optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde retinal kesitler alındı. Optik diskten sonra ikinci veya üçüncü kesit incelemeler için hematoksilin-eosin ile boyandı. Her gözden bir kesit analiz edildi. TUNEL çalışması İn Situ Cell Death Detection Kit, AP, ROCHE Diagnostics GmbH, Mannheim ile gerçekleştirildi. TUNEL pozitif hücreler her kesit üzerinde randomize seçilmiş alanlarda 100x büyütme (immersiyon yağı) ile tarandı. Apoptotik TUNEL-pozitif hücreler 10 randomize seçilmiş alanda sayıldı. TUNEL incelemesi iki bağımsız araştırmacı tarafından çift kör olarak yapıldı.

### **3. 5 İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel analizler için IBM<sup>R</sup> SPSS<sup>R</sup> Statistics 19.0 (SPSS Inc, Chicago IL, USA) kullanıldı. Gruplar arası analizler one-way ANOVA ile yapıldı ve anlamlı değerlerde (p<0.05) post-hoc analiz yapıldı ve gruplar aralarında karşılaştırıldı.

Gruplardaki hayvan sayısı literatürde yapılmış ön çalışmalarda verilen önerilere göre belirlendi.<sup>110</sup>

## **4. BULGULAR**

### **4. 1 İn vivo Oksijen Endükte Retinopati Fare Modelinde İntravitreal Matrine Enjeksiyonunun Farklı Konsantrasyonlarda Retinal Endotelyal Hücre Proliferasyonuna Etkisi**

Hiperoksi endükte neovaskülarizasyon gelişimi retinal parafin kesitlerinde internal limitan membranın vitreus tarafındaki endotelyal hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edildi. Negatif kontrol grubunda (Grup-A) retinal ILM'in vitreus tarafında endotelyal hücre çekirdeği gözlenmedi (Resim-2). Kontrol grubunda (Grup-B) retinada vitreusa bakan endotelyal hücrelerden oluşan çok sayıda neovasküler kümeler izlendi (Resim-3). Kontrol grubunda histolojik kesit başına ILM' in vitreusa bakan tarafında  $21.0 \pm 1.6$  endotelyal hücre çekirdeği sayıldı. Grup-C'de ( $0.78 \mu\text{g}$  matrine)  $1 \pm 1$  (Resim-4), Grup-D'de ( $6.25 \mu\text{g}$  matrine)  $0 \pm 0$  endotelyal hücre çekirdeği sayıldı (Resim-5). Grup-C ( $p < 0.0001$ ) ve -D'de ( $p < 0.0001$ ) bir histolojik kesitte tespit edilen neovasküler hücre çekirdeği sayısı kontrol grubu (Grup-B) ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulundu. Grup-C ve -D arasında anlamlı fark ( $p = 0.9$ ) tespit edilmedi. Grup-A (negatif kontrol grubu), Grup-B ( $p < 0.0001$ ) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görüldü. Kontrol grubu (Grup-B) ile karşılaştırıldığında Grup-C'de endotelyal hücre çekirdeği sayısının %95 ve Grup-D'de %100 azaldığı tespit edildi.

### **4. 2 Işık Mikroskopi ile Morfolojik Analiz**

Retina katmanlarının morfolojik analizinde negatif kontrol grubunda (Resim-2) ve kontrol grubunda (Resim-3) kistik dejenerasyon, hücre kaybı tespit edilmemiştir. Matrine enjekte edilmiş olan gözlerde retinanın tüm katmanlarında hücre kaybı ve tabakaların incilmesi, tüm kesitlerde doku bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiştir (Resim-4, Resim-5).

### **4. 3 Elektron Mikroskopi ile Ultrastrüktürel Analiz**

Elektron mikroskopik incelemede utrastrüktürel morfolojik değişiklikler ve özellikle iç ve dış fotoreseptör bölgesinde mitokondriler değerlendirildi. Negatif kontrol grubunda (Grup-A), mitokondriler dahil, belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı. (Resim-6). Kontrol grubunda (Grup-B) fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptandı (Resim-7). Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler matrine enjekte edilen gruplarda (Grup-C, -D) yoğun olarak tespit edildi (Resim-8). Mitokondriyal



dismorfolojiyi kantifiye edebilmek için atipik mitokondri (yoğun litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde olan mitokondri=atipik mitokondri) belirlendi. Tüm gruplarda 3250x büyütme ile seçilmiş bir görüş alanında bulunan atipik mitokondri sayısı belirlendi . Kontrol grubunda (Grup-B) tespit edilen atipik mitokondri sayısı Grup-C ( $p=0.01$ ) ve -D ( $p=0.01$ ) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. Negatif kontrol grubu (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.

#### **4. 4 TUNEL Tekniği ile Apoptosis Analizi**

Negatif kontrol grubunda (Grup-A) ve kontrol grubunda (Grup-B) dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edildi (Resim-9-A-B). Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi. Grup-C ve -D'de ışık mikroskopide tespit edilen hücre kaybı ve nükleer tabaka incilmesi olan tüm alanlarda yoğun apoptotik hücre toplulukları tespit edildi (Resim-10, Resim-11). Grup-C ( $p=0.9$ ) ve -D ( $p=0.9$ ) negatif kontrol grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görüldü. Grup-C ile -D ( $p=0.7$ ) arasında anlamlı fark bulunmadı.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda oksijen endükte retinopati (OER) fare modelinde C57BL/J6 ırkı fare kullanarak intravitreal enjekte edilen matrine'nin retinal endotelyal hücre proliferasyonuna, retinal morfolojik yapıya ve apoptozise olan etkisini inceledik.

İntravitreal enjekte edilen matrine'nin doza bağlı olmaksızın retinal endotelyal hücre çekirdeği sayısını azalttığı tespit edildi. Bu bulgu matrine'nin retinal endotelyal hücre proliferasyonuna anti-anjiyojenik etkili olduğunu yansıtmaktadır. Pankreatik kanser hücrelerinde matrine'nin in vitro ve in vivo olarak proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>102</sup> Matrine'nin proliferatif vitreoretinopati ve pterjiyum rekürrens oranında azalma sağladığını gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur.<sup>106</sup> Matrine'nin kanser hücrelerinde EGF, VEGF, VEGFR 1, MMP-9, MMP-2 ile invazyon, anjiyojenez, proliferasyon, hücre migrasyonu ve metastazda önemli rol oynadığı ve kanser hücrelerinde anjojenez EGF/VEGF-VEGFR1-Akt-NF-sinyal yolu ile baskıladığı gösterilmiştir.<sup>104</sup>

Matrine hepatoma hücrelerinde in vitro ve in vivo olarak tümör büyümesini inhibe eder (Ma et al. 2008). Ayrıca insan malign melanom hücrelerinde metastaz ve invazyonu inhibe edici etkisi bildirilmiştir. (Liu et al. 2008).<sup>105</sup>

Bizim çalışmamızda OER modelinde C57BL/J6 fare ırkında matrine ile retinal endotelyal hücre proliferasyonunun 0.78µg IVM ile %95, 6.25µg IVM ile %100 baskılandığı gösterilmiştir. Matrine molekülünün in vitro çalışmalarda anti-anjiyojenik olması, anti-anjiyojenik terapötik etki göstermesi etkisinin birçok sinyal yolunu içermekle birlikte direk dokuda bulunan VEGF 1 reseptörleri üzerinden de gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz intravitreal matrine enjeksiyon sonrası retinal endotelyal hücre proliferasyonu üzerinde %95-100 supresyon etkisinin VEGF reseptörlerine olan etkiden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Akciğer kanser hücreleri 50-500 µg konsantrasyonlarında matrine ile 24 saat tedavi edildikten sonra ELISA testi ile matrinenin doz bağımlı olarak VEGF-A sekresyonunu azalttığı görülmüştür.<sup>105</sup>

Çalışmamızda, pigmente dokuya sahip olan C57BL/J6 fare ırkında OER modelinde 0.78µg ve 6.25µg IV matrine'nin ışık mikroskopik incelemede retina katmanlarında histolojik kesitlerde morfolojik hasar yarattığı ve hücre bütünlüğünü bozduğu tespit edilmiştir. Bu etki retina dokusuna olan toksik etkiden kaynaklanabilir. Bunun yanında hasar yaratan etki doza bağlı olabilir. Biz çalışmamızda iki doz IVM uyguladık. Literatürde henüz yeterli

sayıda oküler veya intravitreal matrine uygulaması ile in vivo ve/veya in vitro çalışmalar mevcut değildir. Ancak etkin doz ve yan etki profili analizi için prospektif intravitreal matrine uygulamasını içeren farmakokinetiğe yönelik çalışmalar da dozların incelenmesi gerekmektedir.

Oksijen endükte retinopati modelinde hiperoksi deprivasyonu dokuda relatif hipoksiye neden olmakta ve oluşan hipoksi mitokondrielerde şişme, krista fragmantasyonu, matriks kondansasyonu, iç/dış membran ayrılmasına neden olmaktadır.<sup>110,111</sup> Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak oksijen endükte retinopati grubunu oluşturan kontrol grubunda (Grup-B) elektron mikroskopik ultrastrüktürel morfolojik incelemede fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrielerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptandı. Hiperoksiye maruz kalan grupta tespit edilen bulgular C57BL/J6 ırkı farenin retinal hiperoksi endükte mitokondriyal vulnerabilitesi olduğunu göstermektedir. Mitokondrielerin iç yapısı fizyolojik aktiviteleri gereği veya stres sinyallerine, örneğin hipoksi, hiperoksi, tedavi amaçlı kullanılan ajanlar gibi, cevap olarak değişiklik gösterir.<sup>112</sup> Oluşan stres seviyesi mitokondride morfolojik ve fonksiyonel değişikliği belirlemektedir. Oluşan değişiklikler hücrenin kurtulmasına veya apoptozise neden olur.<sup>113</sup> Çalışmamızda apoptotik hücre ölümünü incelemek için TUNEL-çalışması uygulanmıştır. Negatif kontrol grubunda ve kontrol grubunda, daha önce yapmış olduğumuz çalışmada olduğu gibi, apoptozis görülmüştür.<sup>114</sup>

Apoptozis genetik ağıdan oluşan koordine programlı hücre ölümü olarak tarif edilmektedir. Yeni geliştirilen antianjiyojenik ve kanser tedavileri kapsamında önemli yer almaktadır. Apoptozis ana hatları ile kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız olmak üzere iki sinyal yoldan aktive edilmektedir. Her iki sinyal yolunda da mitokondri ve Bcl-2 protein ailesi bulunmaktadır.<sup>115</sup> Matrine'nin tümör büyümesini, TGF'nü, apoptozis, anjiyojenezis ve/veya proliferasyonu regüle eden genleri ve proteinleri modüle ederek etkili olduğu bildirilmektedir.<sup>102,103</sup>

Matrine'nin osteosarkom hücrelerinde proliferasyonu inhibe ederken bax up regülasyonu ve bcl-2 down regülasyonu ile in vitro ve in vivo olarak apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir.<sup>103</sup> Matrine'nin apoptozisi indüklediği ve telomeraz aktivitesini regüle ederek retinoblastom hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>116</sup>

IVM enjeksiyonu uyguladığımız gruplarda apoptotik hücre ölümünün yoğun artış gösterdiği tespit edilmiştir. IVM enjeksiyonu uygulanan gruplarda apoptozis ile mitokondriyal dismorfolojinin arttığı görülmektedir. Doğal olarak birçok fizyolojik olayda zararlı veya gereksiz hücrelerin eliminasyonu için apoptozise ihtiyaç duyulmaktadır. Apoptozise bağlı hücre ölümü patolojik düzeyde, örneğin hipoksik veya sitotoksik ajan ortamında gözlenebilir.<sup>117</sup> Çalışmamızda negatif kontrol grubunda ve kontrol grubunda TUNEL çalışması ile fizyolojik apoptozis gözlemlenmiştir.

Matrine'nin etkisine bağlı artmış apoptotik hareket görülmüştür. Matrine'nin meme kanser hücrelerinde 25-250 µg konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak S fazında hücre bölünmesini durdurduğu flowsitometrik analizlerle gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde bcl-2 down regülasyonu ve bax upregülasyonu ile anti-proliferatif ve pro-apoptotik etki göstermektedir.<sup>104</sup> Anti-apoptotik protein olan bcl-2 dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü sağlayarak sitokrom c salınımını engeller. Pro-apoptotik protein olan bax ise sitokrom c salınımını sağlar. Matrine'nin mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırarak apoptozisi uyardığı bildirilmiştir.<sup>106</sup> Matrine 0.78 µg ve 6.25 µg intravitreal olarak uyguladığımız gruplarda yoğun apoptotik etki yaratmış olabilir. Burada apoptozis yoğunluğu daha çok matrine'nin toksik etkisini düşündürmektedir. Ancak C57BL/J6 fare doku yapısında mitokondriyal membran geçirgenliğini fizyolojik olarak arttırmış olabilir. Bu etkileşim kültür bazında endotelial hücreler üzerinde prospektif incelenmelidir.

Sonuç olarak apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. P53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir.<sup>118</sup> Apoptozis büyüme faktörlerinin ortamdaki eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığına maruz bırakılırlarsa apoptozis nedeniyle ölürlür. Ayrıca bir proapoptotik (apoptozisi uyarıcı) bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması yoluyla da gerçekleşir.

Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktifleştirmesidir.<sup>119,120,121</sup>

Bu bilgiler doğrultusunda OER fare modelinde neovaskülarizasyonun güçlü baskılanması büyüme faktörünün matrine tarafından baskılanması nedeni ile olmakla birlikte matrine'nin yine güçlü apoptotik antiproliferatif etkisinden kaynaklanabilmektedir.

Sonuç olarak matrine OER fare modelinde neovaskülarizasyonu güçlü şekilde baskılamaktadır. Ancak morfolojik incelemede hücresel bazda toksik etki ve TUNEL çalışmasında artmış apoptotik etki tespit edilmiştir. Bu amaçla ilaç etkisi, doz etkisi ve farmakokinetik analiz için prospektif randomize kliniğe yönelik deneysel çalışmalar ile apoptozisin çeşitli aşamalarını ve etkili proteinlerinin analizini içeren deneysel çalışmalar gerekmektedir

## 6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmanın sonucunda C57BL/J6 oksijen endükte retinopati in vivo fare modelinde intravitreal yolla uygulanan matrine'nin vasküler endotel üzerine anti-proliferatif olduğunu gözlemledik. Farklı iki doz arasında yapılan karşılaştırmada anti-proliferatif etki açısından Grup-C ve -D arasında anlamlı fark ( $p=0.9$ ) tespit edilmedi. Işık mikroskopu ile yapılan incelemelerde matrine enjekte edilmiş olan gözlerde retinanın tüm katmanlarında hücre kaybı ve tabakaların inceldiği, tüm kesitlerde doku bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiştir. Elektron mikroskopik incelemelerde negatif kontrol grubunda (Grup-A), mitokondriler dahil, belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı. Kontrol grubunda (Grup-B) tespit edilen atipik mitokondri sayısı Grup-C ( $p=0.01$ ) ve -D ( $p=0.01$ ) ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. Negatif kontrol grubu (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. Sonuç olarak matrine OER fare modelinde neovaskülarizasyonu güçlü baskılamaktadır. Ancak morfolojik incelemede hücre bazda toksik etki ve TUNEL çalışmasında artmış apoptotik etki tespit edilmiştir. Bu amaçla ilaç etkisi, doz etkisi ve farmakokinetik analizi için prospektif randomize kliniğe yönelik deneysel çalışmalar ile apoptozisin çeşitli aşamalarını ve etkili proteinlerinin analizini içeren deneysel çalışmalar gerekmektedir.

## 7. REFERANSLAR

1. Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007;18:502-8.
2. Schlingemann RO, Witmer AN. Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Prog Brain Res*. 2009;175:253-67.
3. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*. 2005;438: 960-66.
4. Michaelson I. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK*. 1948;68:137–180.
5. Ashton N. Retinal vascularization in health and disease. *Am J Ophthalmol*. 1957;44:7–17.
6. Shimizu K, Kobayashi Y, Muraoka K. Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1981;88:601–612.
7. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-7.
8. Malecaze F, Clemens S, Simorer-Pinotel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor mRNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1476-1482.
9. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
10. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2155-2162.

11. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50: 1774-1778.
12. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, et al. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in nude mice model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-1140.
13. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1419–31.
14. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 331-335.
15. Schmitz K, Maier M, Clemens CR. Reliability and safety of intravitreal Ozurdex injections : The ZERO study. *Ophthalmologie*. 2013 Apr 6.
16. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-794.
17. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*. 2002 Jun;200(6):581-97.
18. Kaiser PK.: Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:660-668.
19. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.



20. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
21. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al.: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93:1493-1495.
22. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-794.
23. Bhisitkul RB.: Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1542-1547.
24. Kaiser PK.: Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:660-668.
25. Shams N, Ianchulev T.: Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin N Am*. 2006;19:335-344.
26. Usui T, Ishida S, Yamashiro K. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Feb;45(2):368-74.
27. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUMB Life* 2001; 52: 61-66.
28. Terry T.L. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. *Am. J. Ophthalmol* 1942; 25:203-204.
29. Fortes JB, Barros CK, Lermann VL. Prevention of blindness due to retinopathy of prematurity at hospital de clinicas de porto alegre, Brazil: Incidence, risk factors, laser treatment and outcomes from 2002 to 2006. *Acta medica Lituanica*. 2006;13:130–6.

30. Kim T, Sohn J, Yoon YH. Postnatal risk factors of retinopathy of prematurity. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2004;18:130–4.
31. Quinn GE, Gilbert C, Darlow BA, Zin A. Retinopathy of prematurity: An epidemic in the making. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:2929–37.
32. Dominico R, Davis K, Davis O. Documenting the NICU design dilemma: Comparative patient progress in open-ward and single family room units. *J Perinatol.* 2011;31:281–8.
33. Mayer UM, Hornung D. Evaluation of a prospective card for prematures: retro- and prospective evaluation of 2393 histories *Klin Monbl Augenheilkd.* 2003 Jan-Feb;220(1-2):44-50.
34. Incidence of type-1 retinopathy of prematurity in premature babies born small for gestational age. Akkoyun İ, İnce Deniz A, Yılmaz G; *TJO-71473* 2013.
35. Ashton N. Retinal angiogenesis in the human embryo. *Br. Med Bull.*1970;26:103-6.
36. Lofqvist C, Chen J, Connor KM, et al. IGFBP3 suppresses retinopathy through suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:10589-94.
37. Hou X, Gobeil F Jr, Peri K, et al. Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F(2alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke.* 2000;31:516-24.
38. Stahl A, Connor KM, Sapielha P, et al . The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2813-26.
39. Pathophysiology of Retinopathy of Prematurity. *Turk J Ophthalmol* 2012; 42: Ozel Sayı 63-7.

40. International Committee for the Classification of Retinopathy Of Prematurity. The International Classification Of Retinopathy Of Prematurity revisited. Arch. Ophthalmol. 2005;123:991-999.
41. Fierson WM; American Academy of Pediatrics Section on Ophthalmology; American Academy of Ophthalmology; American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus; American Association of Certified Orthoptists. Pediatrics. 2013;131:189-95.
42. Kim JW, Ai E: Diabetic retinopathy. In: Regillo CD, Brown GC, Flynn Jr HW (Eds), Vitreoretinal disease, The Essentials, Thime, New York 1999:133-59.
43. Klein R, Klein BE, Moss SE. Visual impairment in diabetes. Ophthalmology 1984; 91:1-9.
44. Hikichi T, Fujio N, Akiba Y, et al. Association between the short-term natural history of diabetic macular edema and the vitreomacular relationship. Ophthalmology 1997; 104:473-8.
45. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, et al. The prevalance by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population based colrapt. Neurology 1992:817-824.
46. Ashton N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies. Br J Ophthalmol 1963; 47:521-38.
47. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. Arch Ophthalmol 1961; 66:100-12.
48. Solmaz A, Akyol S. Retina Embriyogenezi-Fizyolojisi, Muiyane Yöntemleri, Retina Dejeneresansları: O'Dwyer PA, Akova YA. 2. Baskı, Ankara, Günes Kitabevi 2010:513-38.

49. Bayraktar MZ, Ergin MM, Or M, Subaşı M, Menteş J, Ozkan SS, Muftuoğlu G, Akar S. Diyabetik Makulopati ve Tedavisi. Diyabetik retinopati. Ozkan Ş, Akar S. İstanbul. Dilek Ofset. 2000:23-36.
50. Allen C, Clermont MS, Lloyd LP, et al. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: A potential role for VEGF in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1997;124:433-446.
51. Early Treatment Diabetic Retinopathy Research Group. Report no:10. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs-an extension of the modified Airlie House classification. *Ophthalmol* 1991;98:786-806.
52. The ETDRS Group:Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiography and other retinal characteristic at baseline. Report no:19 *Arch. Ophthalmol.* 1995 Sep.13 (9):1144-55.
53. Gass JD. Stereoscopic Atlas of Macular Disease: Diagnosis and Treatment, 4th Ed. St Louis: Mosby; 1997:70-72.
54. Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res* 1997; 29: 354-362.
55. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol* 2005;123:1570-4.
56. Fine SL, The Macular Photocoagulation Study Group. Early detection of extrafoveal neovascular membranes by daily field evaluation. *Ophthalmology* 1985; 92: 603-609.
57. Starita C, Hussain AA, Patmore A et al. Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 762-767.

58. Brown DM, Kaiser PK, Michels M. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1432-44.
59. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1419-31.
60. Karia N. Retinal vein occlusion: pathophysiology and treatment options. *Clin Ophthalmol*. 2010 Jul 30;4:809-16.
61. Sharma A, D'Amico DJ. Medical and surgical management of central retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol Clin* 2004; 1: 1-16.
62. Martin TJ, Corbett JJ. *Neuro-Ophthalmology*. Saint Louis: Mosby Company, 2000;4: 67-68.
63. Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1984; 98: 271-282.
64. Duker JS: *Retina and Vitreous*. Yanoff M, Duker JS (eds): *Ophthalmology*. Mosby, 2004: 8.
65. Zhao J, Sastry SM, Sperduto RD, et al. Arteriovenous crossing patterns in branch retinal vein occlusion. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Ophthalmology* 1993; 100: 423-428.
66. Risk factors for branch retinal vein occlusion. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Am J Ophthalmol* 1993; 116: 286-96.
67. Joffe L, Goldberg RE, Magargal LE, et al. Macular branch vein occlusion. *Ophthalmology* 1980; 87: 91-98.

68. Duker JS: Retina and Vitreous. Yanoff M, Duker JS (eds): Ophthalmology. Mosby, 2004: 8.
69. Lerche RC, Schaudig U, Scholz F, et al. Structural changes of the retina in retinal vein occlusion-imaging and quantification with optical coherence tomography. Ophthalm Surg Lasers 2001; 32: 272-280.
70. Spaide RF, Lee JK, Klancnik JK Jr, et al. Optical coherence tomography of branch retinal vein occlusion. Retina 2003; 23: 343-347.
71. Christoffersen NL, Larsen M. Pathophysiology and hemodynamics of branch retinal vein occlusion. Ophthalmology 1999; 106; 2054-2062.
72. Boyd SR, Zachary I, Chakravarthy U, et al. Correlation of increased vascular endothelial growth factor with neovascularization and permeability in ischemic central retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol 2002; 120: 1644-1645.
73. The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for branch retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol. 1993; 116: 286-296.
74. Lattanzio R, Torres Gimeno A, Battaglia Parodi M, Bandello F. Retinal vein occlusion: current treatment. Ophthalmologica. 2011;225(3):135-43. doi: 10.1159/000314718. Epub 2010 Apr 8.
75. Ryan SJ, editor. Retina Vol 2. St Louis: The CV Mosby, 1989.
76. L'Esperance FA: Ophthalmic Lasers. St Louis: The CV Mosby, 1989.
77. Jampol LM, Ebroon DA, Goldbaum MH: Peripheral proliferative retinopathies: an update on angiogenesis, etiologies and management. Surv Ophthalmol 1994; 38: 519-40.
78. Guigui A, Brezin A. Gaudric A et al: Hemorragie vitreenne et proliferation neovasculaire au cours d'une sclerose en plaques. Bull. Soc. Opth. France, 1989; 4: 501-5.

79. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-7.
80. Malecaze F, Clemens S, Simorer-Pinotel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor mRNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1476-1482.
81. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2155-2162.
82. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50: 1774-1778.
83. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
84. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994; 145: 574-584.
85. Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1219-1228.
86. Malecaze F, Clemens S, Simorer-Pinotel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor mRNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1476-1482.
87. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, et al.: Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol*. 1997;81:154-162.

88. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, et al. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in nude mice model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-1140.
89. Bell C, Cynam E, Landfair DJ, et al. Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; 35: 533-542.
90. Cunningham ET, Jr. Adamis AP, Altaweel M, et al. A phase II randomized doublemasked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2005; 112:1747-57.
91. Özdemir H, Sentürk F. Ranibizumab. *Göz Hastalıkları ve anti-VEGF Tedavi*. Karaçorlu M, Karaçorlu SA, Özdemir H. İstanbul 2010:23-37.
92. Bakri SJ, Snyder MR, Pulido JS, et al. Abstract of Papers, Combined Meeting of Club Jules Gonin and The Retina Society, Cape Town, South Africa, October 15–20, 2006.
93. Wu L, Martinez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H, et al. Pan American Collobarative Retina Group (PACORES) Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246:81-7.
94. Öztürk B. Diabetik makula ödemi medikal tedavisi. *Ret-Vit* 2010;18:Özel Sayı:82-9.
95. Danis RP, Sheetz MJ.: Ruboxitaurin: PKC-beta inhibition for complications of diabetes. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10:2913-25.
96. Aiello LP.: The potential role of PKC-B in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol*. 2002;47:263-9.
97. Impact of triamcinolone acetone on retinal endothelial cells in a retinopathy of prematurity mouse model. Akkoyun I, Yilmaz G, Oto S, Kahraman B, Haberal N, Akova YA. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007 Nov;85(7):791-4.



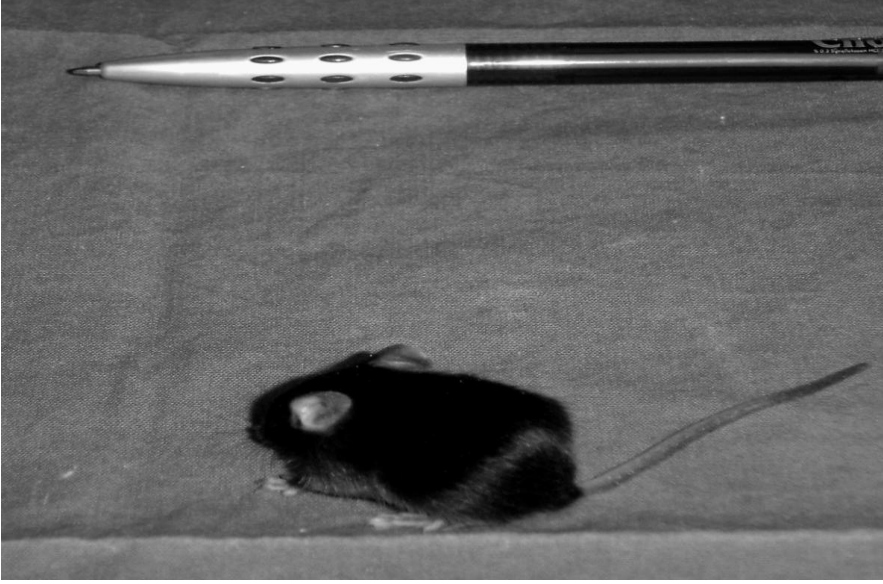
98. Gitter KA. Age-related macular degeneration. In: Yannuzzi LA eds. Chibret International Journal of Ophthalmology. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989: 15-25.
99. D'Amico DJ, Goldberg MF, Hudson H, Jerdan JA, Krueger DS, Luna SP, Robertson SM, Russell S, Singerman L, Slakter JS, Yannuzzi L, Zilliox P; Anecortave Acetate Clinical Study Group. Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology* 2003; 110(12).
100. Sönmez K, Atmaca LS. Yaşa bağlı maküla dejeneresansının tedavisinde yenilikler. *T Klin Oftalmoloji* 2006;2:38-47.
101. Müftüoğlu G. Yaşa bağlı maküla dejeneresansının cerrahi tedavisi. *T Klin Oftalmoloji* 2006;2:60-64.
102. Liu T, Song Y, Chen H, Pan S, Sun X. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells *In vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(10):1740-5.
103. Liang CZ, Zhang JK, Shi Z. Matrine induces caspase dependent apoptosis in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Feb;69(2):317-31. doi: 10.1007/s00280-011-1699-4. Epub 2011 Jun 30.
104. Yu P, Liu Q, Liu K. Matrine suppresses breast cancer cell proliferation and invasion via VEGF-Akt-NF-kappaB signaling. *Cytotechnology.* 2009 Apr;59(3):219-29. doi: 10.1007/s10616-009-9225-9. Epub 2009 Sep 17.
105. Zhang Y, Zhang H, Yu P, Liu Q, Liu K, Duan H, Luan G, Yagasaki K, Zhang G. Effects of matrine against the growth of human lung cancer and hepatoma cells as well as lung cancer cell migration. *Cytotechnology.* 2009 Apr;59(3):191-200. doi: 10.1007/s10616-009-9211-2. Epub 2009 Aug 2.

106. Zhao B, Li B, Bai S, Shen L, Ren R, Jonas JB, Xu X, Lu Q, Liu Q. Effects of matrine on proliferation and apoptosis of cultured retinoblastoma cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012 Jun;250(6):897-905. doi: 10.1007/s00417-011-1751-4. Epub 2011 Aug 25.
107. Gao G, Law FC. Physiologically based pharmacokinetics of matrine in the rat after oral administration of pure chemical and ACAPHA. *Drug Metab Dispos*. 2009 Apr;37(4):884-91. doi: 10.1124/dmd.108.023788. Epub 2009 Jan 8.
108. Gao G, Law FC. Physiologically based pharmacokinetics of matrine in the rat after oral administration of pure chemical and ACAPHA. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012 Feb;69(2):317-31. doi: 10.1007/s00280-011-1699-4. Epub 2011 Jun 30.
109. Remtulla S & Hallet PE (1985): A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat. *Vision Res* 25: 21–31.
110. Chantelau E, Volaco A, Meyer-Schwickerath R. New insights into the pathogenesis of diabetic retinopathy-hormonal rather than metabolic factors are important, *VASA*, 33, 205-10 (2004).
111. Benninghof A, Dreckhahn D. *Anatomie 1*. München :Urban&Fischer, 2008.
112. Natoli R, Provis J, Valter K, Stone J. Expression and role of the early-response gene *Oxr1* in the hyperoxia-challenged mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49: 4561–7.
113. Benítez-Bribiesca L, Gómez-Camarillo M, Castellanos-Juárez E, Mravko E, Sánchez-Suárez P. Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 926: 165-79.

114. Detmer SA, Chan DC N. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 870-9.
115. Benninghof A & Dreckhahn D (2008): *Anatomie 1.* München: Urban & Fischer, 61–81.
116. Yu W, Li B, Ren RJ, Gao F. The effects of matrine on cell proliferation and telomerase activity in retinoblastoma cells in vitro. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2006 Jul;42(7):594-9.
117. Akkoyun I, Karabay G, Haberal N et al. Structural consequences after intravitreal bevacizumab injection without increasing apoptotic cell death in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol.* 2010 Jul 30.
118. Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ.* 2005 May;12(5):473-81.
119. Öniz H (2004): Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi,* 14(1).
120. Piret JP, Arnould T, Fuks B. Caspase activation precedes PTP opening in TNF-alpha-induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion.* 2004 Apr;3(5):261-78.
121. Piret JP, Minet E, Cosse JP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005 Mar 11;280(10):9336-44. Epub 2004 Dec 17.

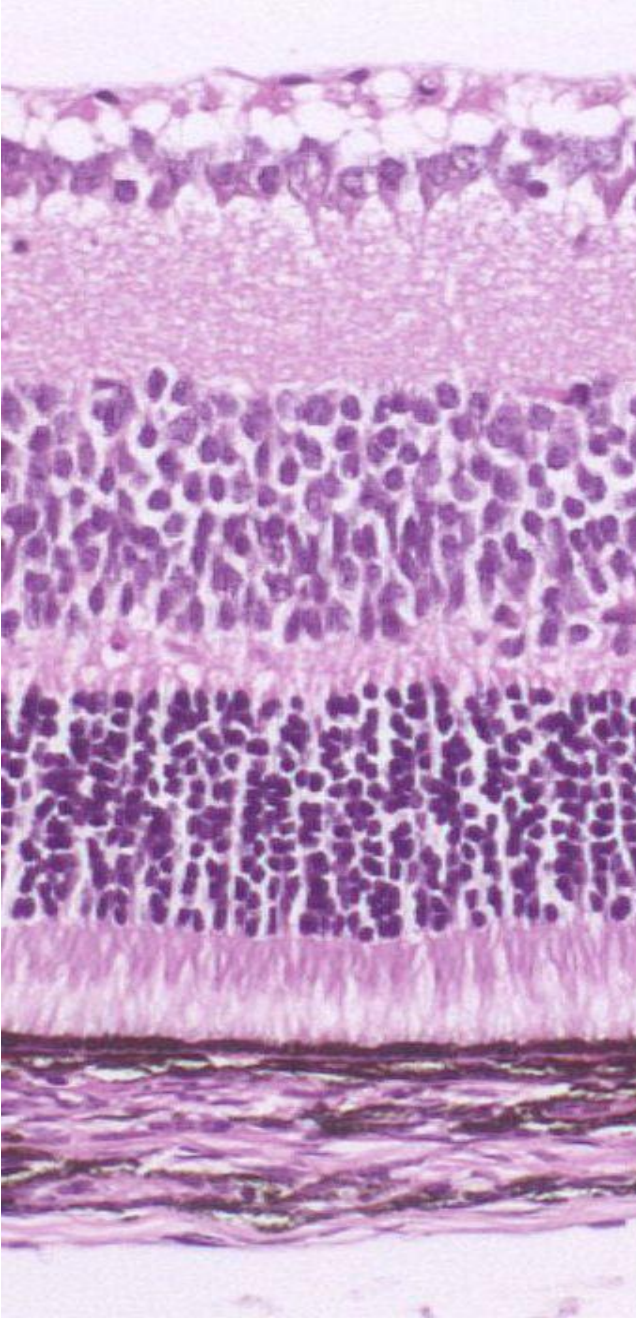
## 8. RESİMLER

### Resim 1



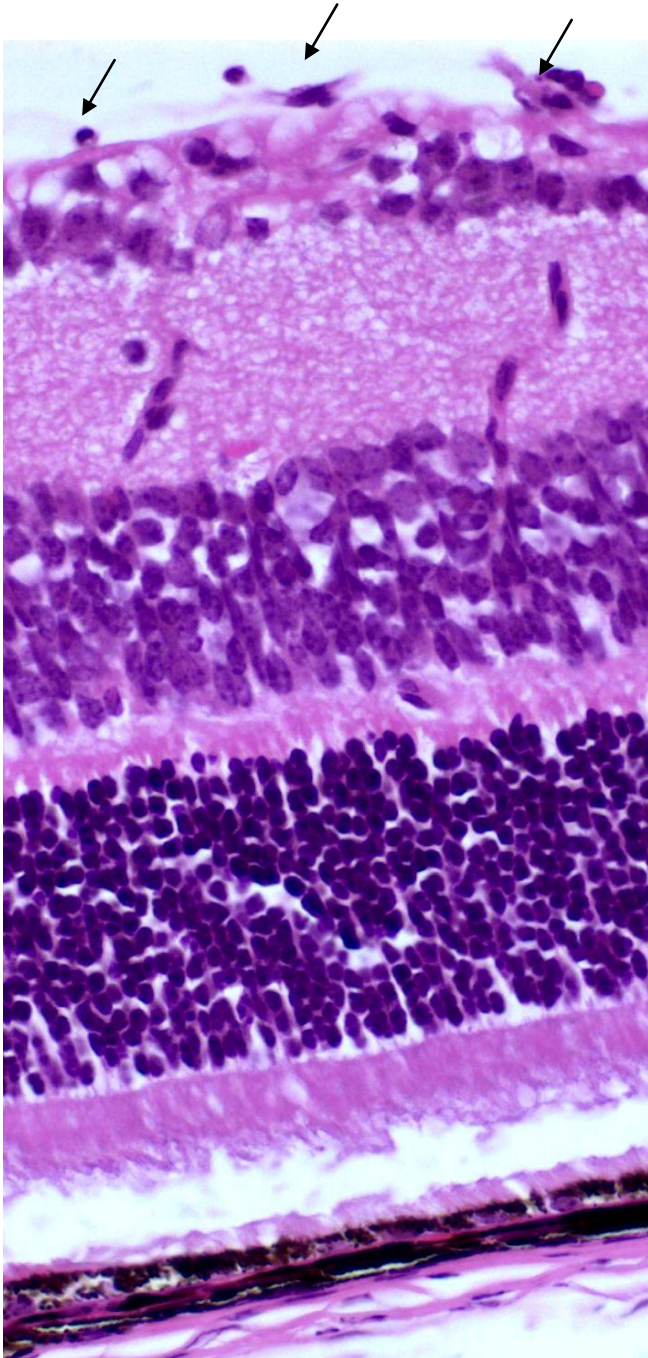
Postnatal 17. günde C57BL/J6 Fare

## Resim 2



Oda ortamında tutulmuş C57BL/6 farenin retinasından ışık mikroskopi kesiti. Grup-A=Negatif kontrol grubu. Neovasküler hücre çekirdeği görülmemektedir. Orijinal büyültme 20x.

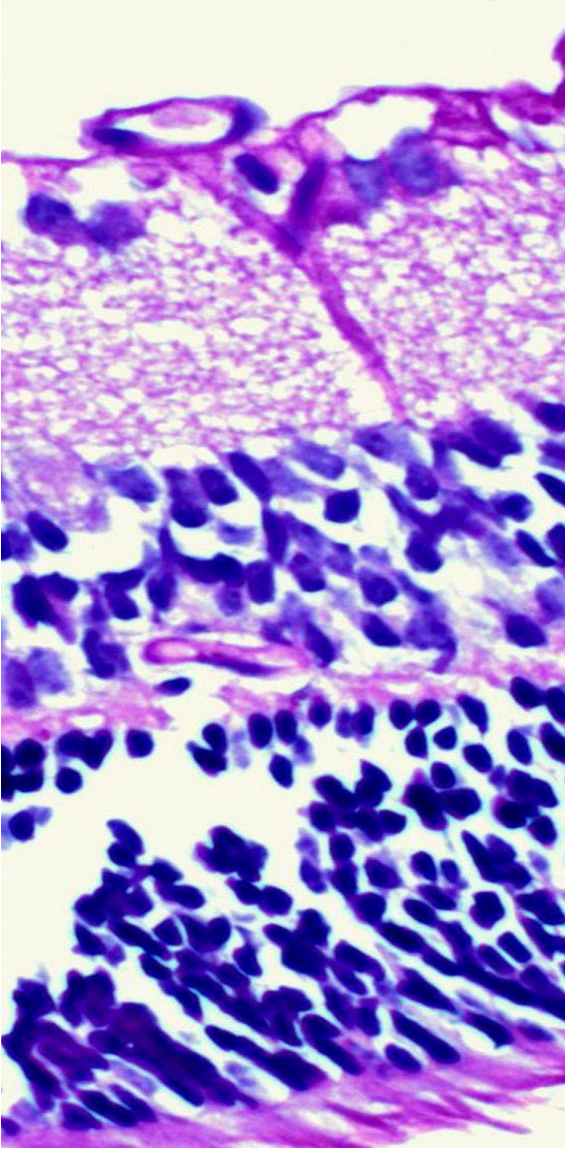
**Resim 3**



C57BL/6 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 vitreusa bakan neovasküler hücre çekirdeğini göstermektedir. Orijinal büyültme 20x.

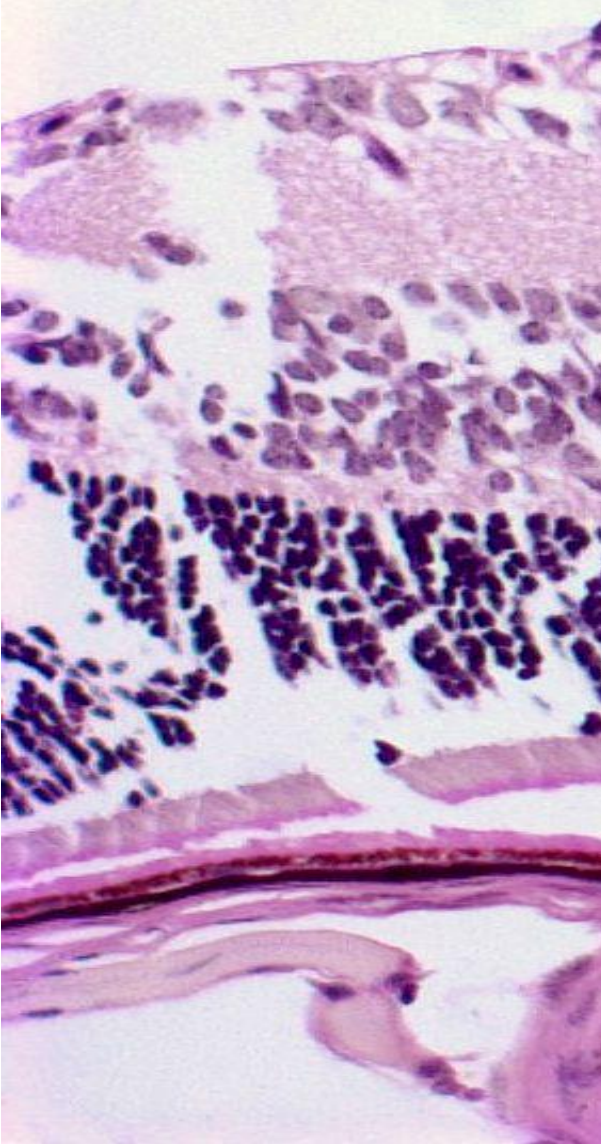


#### Resim 4



C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, postnatal 12. gün intravitreal 0.78  $\mu\text{g}$  matrine enjekte edilen grup, Grup-C. Orijinal büyültme 20x.

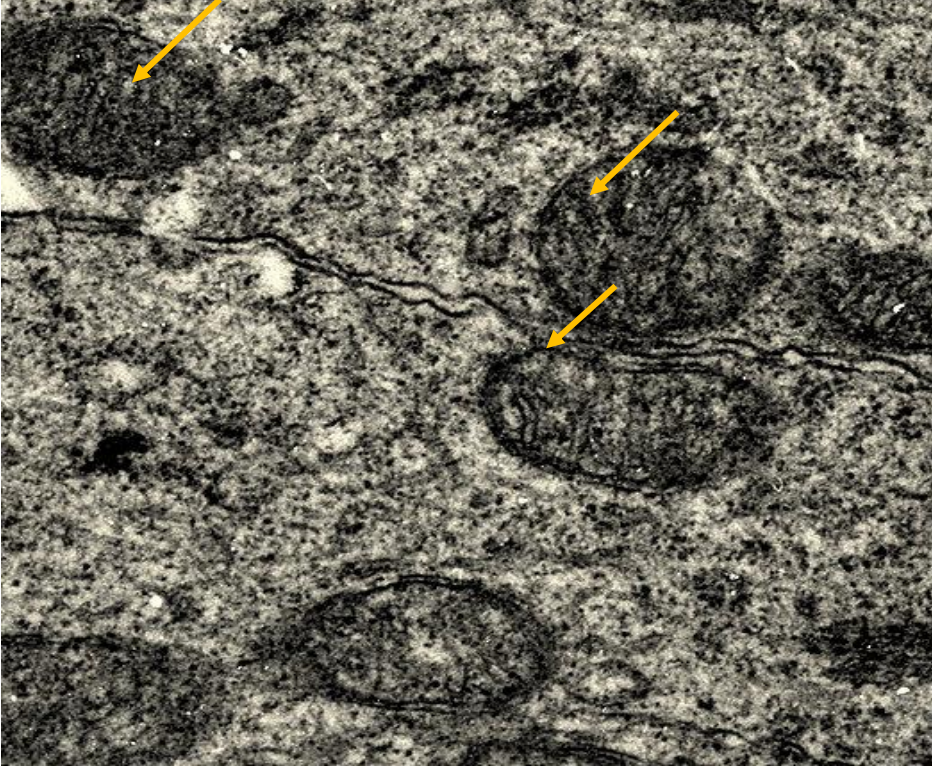
## Resim 5



C57BL/6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti. Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, postnatal 12. gün intravitreal 6.25  $\mu$ g matrine enjekte edilen grup, Grup-D. Orijinal büyültme 20x.

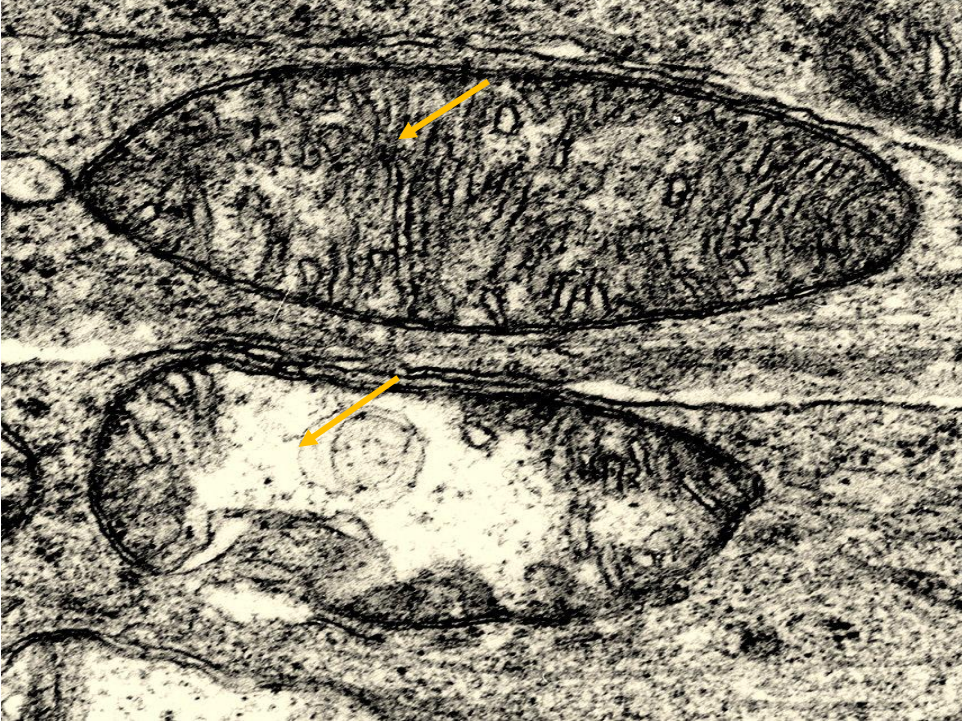


## Resim 6



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

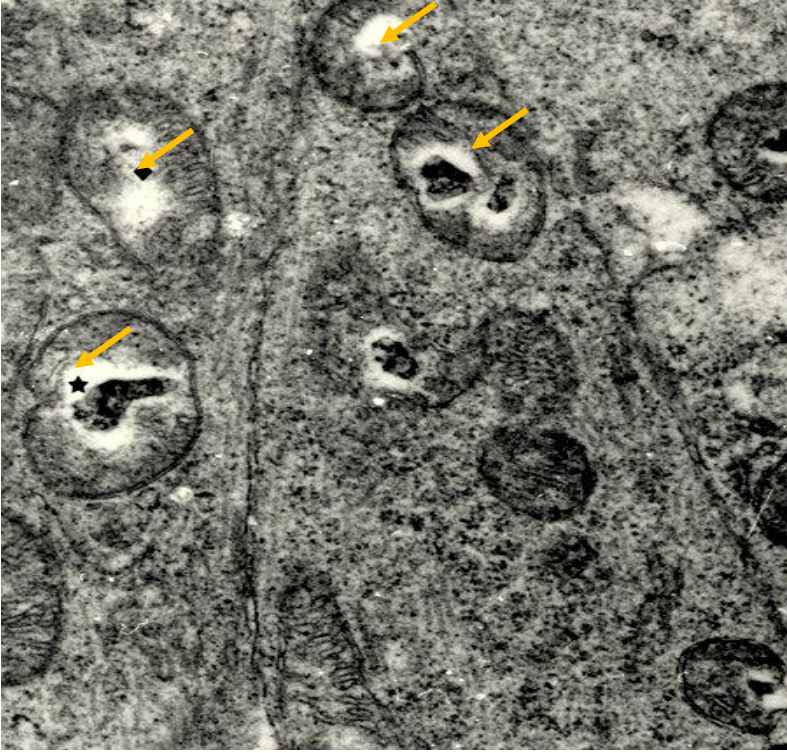
## Resim 7



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

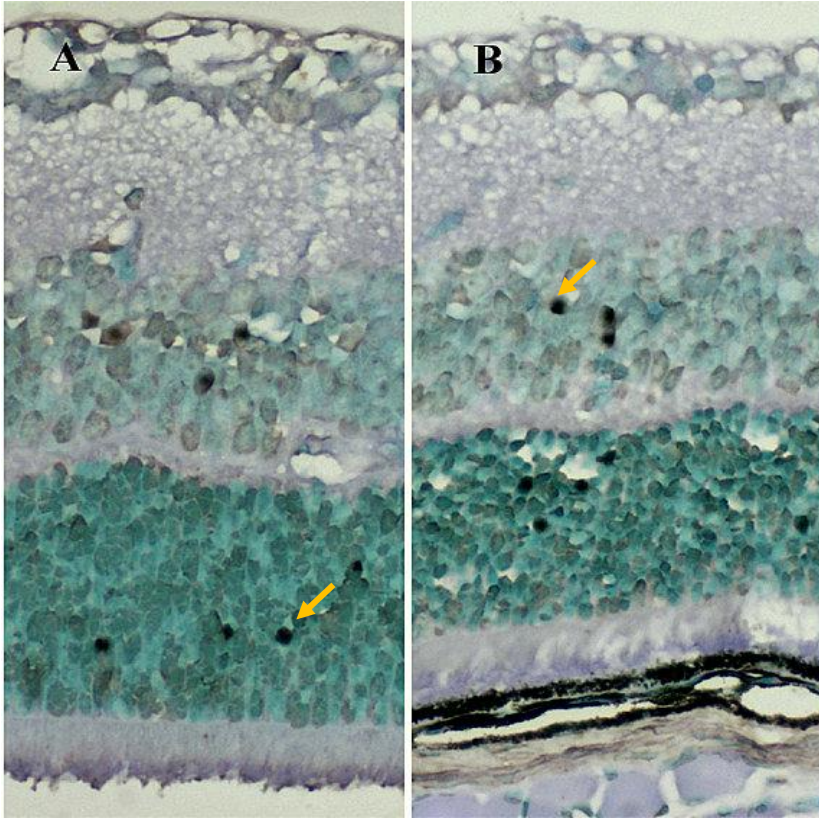


## Resim 8



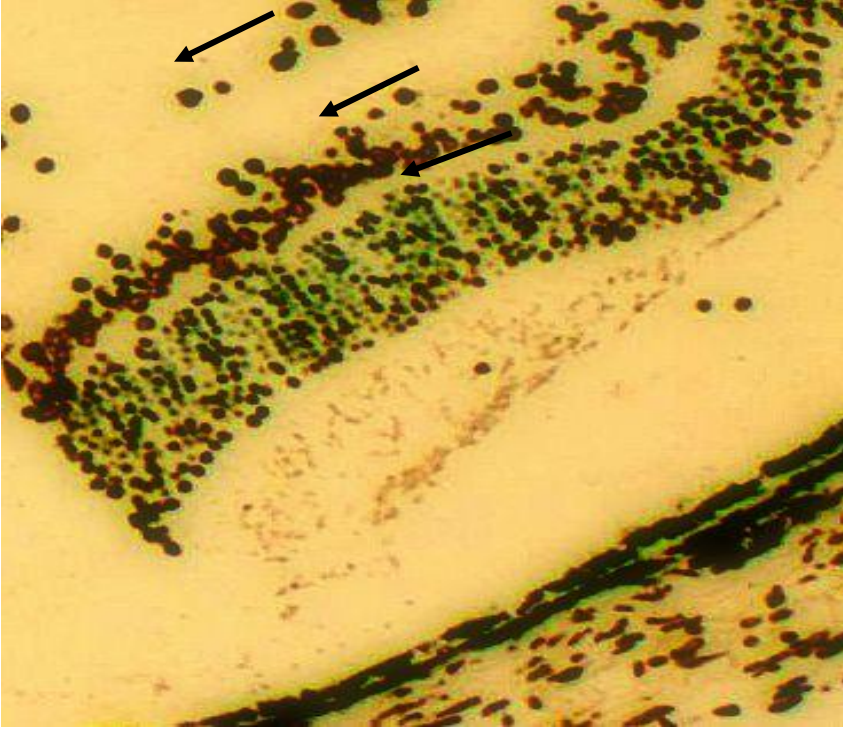
Elektron mikroskopik incelemede (Grup-C) intravitreal 0.78  $\mu\text{g}$  matrine enjeksiyon grubunda fotoreseptör iç segment bölümünde çok sayıda irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondri gözlenmektedir (Ok). Orijinal büyültme 3250x.

**Resim 9 A-B**



C57BL/6 fare retinasından ışık mikroskopi kesitinde 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.

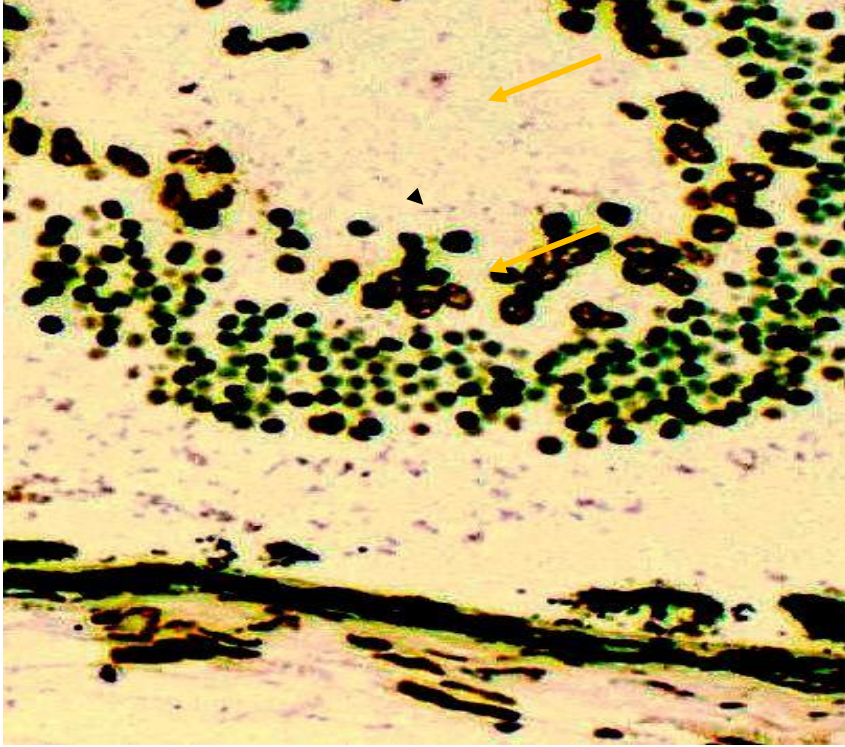
**Resim 10**



C57BL/6 fare retinasından ışık mikroskopi kesiti 0.78  $\mu\text{g}$  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  $\mu$ g 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.

