



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

**OKSİJEN ENDÜKTE RETİNOPATİ İN VİVO FARE MODELİNDE
İNTRAVİTREAL ASTAKSANTİN ENJEKSİYONUNUN RETİNAL
ENDOTELYAL HÜCRE PROLİFERASYONUNA, RETİNA
MORFOLOJİSİNE VE APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. ALİ KÜÇÜKÖDÜK

ANKARA – 2015



T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

OKSİJEN ENDÜKTE RETİNOPATİ İN VİVO FARE MODELİNDE
İNTRAVİTREAL ASTAKSANTİN ENJEKSİYONUNUN RETİNAL
ENDOTELYAL HÜCRE PROLİFERASYONUNA, RETİNA
MORFOLOJİSİNE VE APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ALİ KÜÇÜKÖDÜK

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. İMREN AKKOYUN

ANKARA – 2015

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında klinik ve cerrahi tecrübelerini esirgmeden paylaşan, ufkumuzu genişleten ve bizlere örnek olan Anabilim Dalı Başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Gürsel Yılmaz'a, bütün çalışmalarımda bana koşulsuz destek olan ve motive eden değerli tez danışmanım Prof. Dr. İmren Akkoyun'a, mesleki ve insani olarak çok şey öğrendiğim 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; mesleğimin temellerini atan ve sonrasında hep yanımda olan değerli uzmanlarımız Uzm. Dr. Sirel Gür Güngör ve Uzm. Dr. Leyla Asena'ya, Konya Başkent Hastanesi'nde eğitimimize destek veren 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, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Gör. Dr. Fatma Helvacıoğlu'na, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden Vetr. Dr. Didem Bacanlı'ya tezime verdikleri destek için teşekkür ederim. Araştırma Laboratuvarı Teknisyenleri Adem Kurtcuoğlu ve Sezai Kölcük'e deneyler sürecindeki sabırlı desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince çok şey paylaştığım değerli dostlarım Dr. Mustafa Aksoy ve Dr. Almıla Sarıgül'e ve tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimizde çalışan hemşirelere ve personellerimize teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca attığım her adımda arkamda duran ve beni destekleyen babam Mustafa Küçüködük, annem Mine Küçüködük ve kardeşim Ömer Küçüködük'e; güvenini her zaman hissettiğim sevgili amcam İbrahim Küçüködük'e; hayatı paylaştığım sevgili eşim Cansu Küçüködük'e en derin sevgilerimi sunarım.

Dr. Ali Küçüködük

Temmuz 2015, Ankara

ÖZET

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

Çalışmada toplam 30 adet C57BLJ/6 ırkı fare kullanılmıştır. 20 adet C57BL/J6 fare postnatal 7-12. günler arasında %75 ± 2 oksijene tabi tutuldu. Fareler analiz için 6 gruba ayrıldı. Beş tane yaş uyumlu işlem görmemiş, oda ortamında tutulmuş fare (Grup-A) negatif kontrol grubunu oluşturdu. Grup-B kontrol grubunu, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmamış (n=5 göz); Grup-C kontrol grubunu, oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş (n=5 göz); Grup-D kontrol grubunu, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n=5 göz); Grup-E 10µg/ml intravitreal astaksantin enjeksiyonu (n=5 göz); Grup-F 100µg/ml intravitreal astaksantin enjeksiyonu (n=5 göz) oluşturdu. Onikinci gün 5 farenin bir gözüne (Grup-D) 1µl intravitreal steril DMSO, 5 farenin bir gözüne (Grup-E) 10 µg/ml intrvitreal astaksantin, 5 farenin sağ gözüne (Grup-F) 100 µg/ml intravitreal astaksantin enjekte edildi. . 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-A ve Grup-B karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p=0,9). Grup-C ve Grup-D karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p=0,3). Grup A ve C karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulundu (p<0.0001). Grup-B ve -D karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulundu (p<0.0001). Grup-D ile karşılaştırıldığında Grup-E'de endotelial hücre çekirdeği sayısının %77,49 ve Grup-F'de %76,61 azaldığı tespit edildi. Grup-E ve -F karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark

bulunmadı ($p=0,9$). Histolojik incelemede astaksantin enjekte edilmiş olan gözlerde kistik dejenerasyon, hücre kaybı tespit edilmedi.

Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler astaksantin enjekte edilen gruplarda (Grup-E, -F) Grup-C ve-D'ye göre daha az yoğun olarak tespit edildi. İncelemede negatif kontrol grubu (Grup-A) Grup-B ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=1.0$). Negatif kontrol grubu (Grup-A) ve Grup-B, -C ve -D karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). Grup-C ve -D, Grup-E ve -F ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). Grup-E ve -F arasında 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 ve -D'de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edildi. Grup A ($p=0.3, 0.5$) ve -B ($p=0.5, 0.7$), Grup-C ve -D ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. Grup-E ile -F ($p=0.3$) arasında anlamlı fark bulunmadı. Grup-E ile Grup-C ve -D arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.09, p=0.2$). Grup-F ile Grup-C ve -D arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.01, p=0.02$).

Sonuç olarak astaksantin OER modelinde neovaskülarizasyonu anlamlı oranda baskılamaktadır. Histolojik incelemede toksik etki izlenmemiş, ultrastrüktürel incelemede mitokondriler üzerine koruyucu etkileri olduğu ve TUNEL çalışmasında apoptotik aktiviteyi azalttığı tespit edilmiştir. Bununla ilgili ilaç etkisi ve doz etkisi ile ilgili prospektif randomize kliniğe yönelik deneysel çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: İn vivo OER fare modeli, intravitreal astaksantin, endotelial hücre proliferasyonu, elektron mikroskopisi, apoptozis

ABSTRACT

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

A total of 30 C57BLJ/6 mice were used in this study. Twenty C57BL/J6 mice were exposed to 75 ± 2 oxygen between postnatal 7-12 days. Mice were investigated in six groups. Group-A (n=5 eyes) contained negative control group, Group-B (n=5 eyes) contained control group without exposition to high oxygen and injection of 1 μ l intravitreal DMSO solution. Group-C (n=5 eyes) contained control group exposed to high oxygen without any injection. Group-D (n=5 eyes) contained control group exposed to high oxygen with injection of 1 μ l intravitreal DMSO solution (n= 5 göz), Group-E contained 10 μ g/ml intravitreal astaxanthin injected group and Group-F contained 100 μ g/ml intravitreal astaxanthin injected group. On postnatal day 12 1 μ l sterile DMSO solution was administered intravitreally to the right eye of 5 mice (Group-D), 10 μ g/ml to the right eye of 5 mice (Group-E) and 100 μ g/ml to the right eye of 5 mice (Group-F). Five 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. Neovascularization was 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 was not found statistically significant different between Group-A and -B (p=0,9). There was no statistically significant difference between Group-C and -D (p=0,3). There was significant difference between Group-A and Group-C and Group-B and -D (p<0.0001) (p<0,0001) . Compared with Group-D, the number of endothelial cell nuclei were decreased %77,49 in Group-E

and %76,61 in Group-F. The number of neovascular cell nuclei per histological section was not found statistically significant different between Group-E and -F ($p=0,9$). In all groups histologic evaluation revealed, no cystic degeneration or cell loss.

Compared with Group-C and -D, the number of atypical mitochondria detected by electron microscopy was lesser in astaxanthin injected groups (Group-E, -F). There was no significant difference between negative control group (Group-A) and Group-B. Statistically significant difference was seen when Group-A and Group-B compared with Group-C and -D ($p<0.0001$). There was also statistically significant difference when Group-C and -D compared with Group-E and -F ($p<0.0001$). No significant difference was detected between Group-E and-F.

Analysis of apoptosis by TUNEL technique showed that in Group-A and Group-B apoptotic TUNEL-positive cells were at similar levels in the outer nuclear layer and inner nuclear layer. Similar levels in apoptotic TUNEL-positive cells were also detected between Group-C and -D. Comparing with group-C and -D, Group-A ($p=0.3, 0.5$) and -B ($p=0.5, 0.7$) showed no significant difference. There was no significant difference between Group-E and -F ($p=0,3$). Also no significant difference was seen when Group-E compared with Group-C and -D ($p=0.09, p=0.2$). Statistically significant difference was found when Group-F was compared with Group-C and -D ($p=0.01, p=0.02$).

In conclusion astaxanthin supresses endothelial cell proliferationin in OIR mouse model. On morphological examination, astaxanthin did not show any toxic effect, on ultrastructural evaluation mitochondrial protective effect was observed and on TUNEL study antiapoptotic activity was seen. Further studies are needed to determine the safety and efficacy of astaxanthin in neovascular ocular diseases.

Key words: In vivo OIR mouse model, intravitreal astaxanthin, endothelial cell proliferation, electron microscopy, apoptosis

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMALAR	IX
RESİMLER ve DİYAGRAMLAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Normal retinal vasküler gelişim	3
2.2. Patolojik retinal vasküler gelişim ve prematüre retinopatisi patogenezi	4
2.2.1. Hipoksi indüklenebilir faktörler	5
2.2.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörleri	5
2.2.3. İnsülin benzeri büyüme faktörü	6
2.2.4. Plasental büyüme faktörü	7
2.2.5. Eritropoietin	8
2.2.6. Nitrik oksit	9
2.2.7. Adenozin	10
2.2.8. Apelin	11
2.2.9. β -Adrenerjik reseptörler	11
2.2.10. Oksidatif strese bağlı mediatörler	12
2.2.11. İmmün ve inflamatuvar mediatörler	13
2.3. Prematüre retinopatisi sınıflaması ve tedavisi	14
2.4. Oküler Anjiyogenez	17
2.4.1. Diyabetik retinopatide anjiyogenez	18
2.4.2. Koroidal neovaskülarizasyonda anjiyogenez	19
2.3.3. Retinal ven tıkanıklıklarında anjiyogenez	20
2.5. Güncel antianjiyogenik tedavi	21
2.5.1. Pegaptanib	21
2.5.2. Ranibizumab	21
2.5.3. Bevacizumab	21

2.5.4. Aflibercept	22
2.6. Araştırma aşamasındaki tedaviler	22
2.6.1. Small interfering RNA	22
2.6.2. Sfingozin-1-fosfat antikoru	23
2.6.3. Skualamin laktat	23
2.8.4. Kesintisiz anti-VEGF salınımı	23
2.6.5. DARPinler	23
2.6.6. Radyasyon tedavisi	24
2.6.7. Tirozin kinaz inhibitörleri	24
2.6.8. İntegrinler	24
2.6.9 Anti-PDGF ajanlar	24
2.7. Astaksantin	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Hayvan deneyi protokolü	27
3.2. Işık mikroskopik inceleme	28
3.3. Elektron mikroskopik inceleme	29
3.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick and labeling (TUNEL) technique	29
3.5. İstatistiksel analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. İn vivo oksijen endükte retinopati fare modelinde intravitreal astaksantin enjeksiyonunun farklı konsantrasyonlarda retinal endotel hücre proliferasyonuna etkisi	30
4.2. Işık Mikroskopi ile Morfolojik Analiz	30
4.3. Elektron Mikroskopi ile Ultrastrüktürel Analiz	31
4.4. TUNEL Tekniği ile Apoptozis Analizi	31
5. TARTIŞMA	32
6. REFERANSLAR	41
7. RESİMLER VE DİYAGRAMLAR	64

KISALTMALAR

AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
APJ	: Apelin Reseptörü
B-AR	: β -Adrenerjik Reseptör
BEAT-ROP	: Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity
BMDA	: Benzyldimethyl Amine
DARPin	: Designed Ankyrin Repeat Protein
DDSA	: 2-dodecennyl succinicanhydride
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EPA	: Eikozapentaeonik Asit
Epo	: Eritropoietin
EpoR	: Eritropoietin Reseptörü
ETROP	: Early Treatment for Retinopathy of Prematurity
FDA	: Food and Drug Administration
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GH	: Büyüme Hormonu
HIF-1α	: Hipoksi-İndüklenebilir Faktör 1 α
ICROP	: International Classification of Retinopathy of Prematurity
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL	: İnterlökin
ILM	: İnternal Limitan Membran
IVA	: İntravitreale Astaksantin
kDa	: Kilo Dalton
KNV	: Koroid Neovaskularizasyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MMP	: Matriks Metalloproteaz

m-RNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-B
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NV	: Neovaskularizasyon
OER	: Oksijen Endükte Retinopati
OIR	: Oxygen Induced Retinopathy
OsO₄	: Osmiumtetraoxide
PAS	: PeriodicAcid-Schiff
PDGF	: Platelet Derive Büyüme Faktörü
PDR	: Proliferatif Diyabetik Retinopati
PI3K	: İnozitol Trifosfat
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PR	: Prematüre Retinopatisi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPE	: Retina Pigment Epiteli
S1P	: Sfingozin-1-Fosfat
si-RNA	: small interfering RNA
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxy-UPT-Nickend Labeling
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
YBMD	: Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu

RESİMLER VE DİYAGRAMLAR DİZİNİ

Resim 1: Grup A-F: Işık Mikroskopi.

A ve B. Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (Grup-B) C57BL/J6 farenin retinasından ışık mikroskopi kesiti. **C ve D.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş grup (Grup-C) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup-D). Retinal ILM'nin vitreus tarafında endotel hücre çekirdekleri izlenmektedir (ok). **E ve F.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml astaksantin intravitreal enjekte edilmiş grup (Grup-E) ve 100 µg/ml astaksantin enjekte edilmiş grup (Grup-F). Orijinal büyütme 20x.

Resim 2: Grup A-F: Elektronmikroskopi.

A ve B. Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup-B) elektron mikroskopik incelemesinde fotosesepör iç segment bölümünde mitokondri yapılarında dismorfoloji izlenmedi. Mitokondrilerde tipik çift membranlı tübüler transvers düzenli mitokondrial kristalar görülmektedir. Orijinal büyütme 6000x (ok). **C ve D.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş grup (Grup-C) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş grup (Grup-D). Elektron mikroskopik incelemede fotosesepör iç segment bölümünde irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondriler gözlenmektedir (ok). **E ve F.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml astaksantin enjekte edilmiş grup (Grup-E) ve intravitreal 100 µg/ml enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup-F). Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler ve atipik mitokondri sayısı Grup-C ve -D'ye göre daha az olarak izlenmiştir. Orijinal büyütme 6000x.

Resim 3: Grup A-F: TUNEL tekniği ile apoptotik hücrelerin analizi.

A-D. C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesitinde oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (Grup-B); postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş (Grup-C) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş (Grup-D) gruplarda TUNEL tekniği ile dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada daha yoğun koyu renkli görülebilen benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir. **E.** Oksijene tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml enjekte edilen grupta (Grup-E), TUNEL tekniği ile Grup-A, -B, -C ve -D ile benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre görülmüştür. **F.** Oksijene tabi tutulan, intravitreal 100 µg/ml enjekte edilen grupta (Grup-F), TUNEL tekniği ile Grup-C ve -D'ye göre anlamlı olarak daha az sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir. Orijinal büyültme 100x, İmmersiyon yağı kullanılmıştır.

Diyagram 1: Grup-A-F'de ışık mikroskopi ile neovaskülarizasyonun kantifiye analizi.

Neovaskülarizasyon internal limitan membranın vitreusa bakan yüzeyindeki vasküler hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edilmiştir ve diyagramda gruplarda vasküler hücre çekirdeklerinin sayısının değeri ortalama ± standart deviasyonu olarak verilmiştir.

Diyagram 2: Grup-A-F'de elektron mikroskopi ile atipik mitokondri analizi.

Elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel mitokondriyal değışiklikler değerlendirilmiş ve diyagramda gruplardaki atipik mitokondri sayıları ortalama ± standart deviasyonu olarak verilmiştir.

Diyagram 3: Grup-A-F'de apoptotik hücre analizi.

TUNEL tekniği ile apoptotik aktivite analizi gerçekleştirilmiş ve diyagramda gruptaki apoptotik hücre sayıları ortalama \pm standart deviasyonu olarak verilmiştir.

1.GİRİŞ

Patolojik retinal anjiyogenez, örneğin prematüre retinopatisi (PR), diyabetik retinopati, yaşa bağlı makula dejeneresansı (YBMD) ve retinal ven tıkanıklığı gibi neovasküler oküler hastalıklarda görme kaybına neden olmaktadır [1]. Patolojik düzeyde düzensiz gelişen damarlar oksidatif stres, kronik inflamasyon, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin-like growth factor (IGF-1), büyüme hormonu (GH) ve sitokinler gibi faktörlerin desteği ile oluşurlar [2]. Bu faktörler makrofajlarda, retinal hücrelerde ve mikrovasküler endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Örneğin prematüre retinopatisi Faz-II gelişiminde inflamatuvar mediatörler önem kazanmıştır. Prematüre retinopatisi gelişen gözlerde postnatal 0-3. günde sistemik interlökin (IL)-6 ve C-reaktif protein seviyelerinin yüksek, nörotrofin-4 ve IL-17 seviyelerinin düşük seyrettiği, postnatal 7-21. gün IL-18 seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür [3]. PR olgularında intravitreal 27 sitokin seviyesi taranmış ve özellikle IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, eotaksin, FGF, granülosit koloni stimulan faktör, granülosit-makrofaj koloni-stimulan faktör, interferon- γ -inducible protein-10, COX gibi faktörlerin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca COX-2'nin iskemik retinopatide Prostaglandin-2 üzerinden preretinal neovaskülarizasyonun gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [4]. 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 [5, 6]. Bevacizumab, Ranibizumab, Deksametazon ve Aflibercept gibi anti-proliferatif, anti-anjiyogenik ve antiinflamatuvar etkili ajanlar yeni tedavi seçenekleri oluşturmakla birlikte bazen etkileri kısıtlı olmakta ve zaman zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle retinal neovasküler hastalıklarda antiproliferatif kalıcı, güvenilir etkili tedavi seçenekleri aranmaktadır. Çeşitli çalışmalarda karotenoid familyasından olan astaksantin anti-inflamatuvar, anti-oksidatif gibi biyolojik aktivitelerinin olduğu ve oküler dokularda özellikle retinal pigment epitel-koroid tabakalarında antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkili olduğu bildirilmiştir [7, 8].

Hedefimiz, etkili ve dokulara hasar vermeden oküler anjiyogenezi inhibe edebilme yöntemlerini araştırmak, görme kaybına hatta körlüğe neden olan intraoküler neovasküler hastalıklarda koruyucu tedavi yöntemleri geliştirmektir.

Çalışmamızın amacı Oksijen endükte retinopati (OER) In vivo fare modelinde C57BL/J6 ırkı fare kullanarak astaksantin intravitreal çeşitli dozlarda retinal endotel hücre proliferasyonuna, retina morfolojisine ve apoptotik etkisini araştırmaktır. Farede OER, insandakine benzer vasküler yapılanma göstermektedir, oluşan retinal neovaskülarizasyon tekrarlanabilir ve kantifiye edilebilir niteliktedir, retinal neovaskülarizasyonun patogenezi ve tedavi arayışlarına yönelik uygun bir model oluşturmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. NORMAL RETİNAL VASKÜLER GELİŞİM

İnsan retinası optik sinirden radyal şekilde perifere uzanan laminer ağlarla vaskülarize olur [9]. İç pleksus gestasyonel 14-16. haftalarda ortaya çıkar ve 36. haftada nazalde, 40. haftada ise temporalde ora serrataya ulaşır. Bu nedenle prematüre retinası tümüyle vaskülarize değildir. Derin vasküler pleksusun ortaya çıkışı ise 24.haftaya karşılık gelmektedir. Derin pleksus da aynı radyal gelişimi takip eder ve gelişimi doğum sonrası da devam eder.

İnsan retinasında 5 hücre tipi “vasküler kompleks”i oluşturur. Bunlar vasküler endotel hücre, astrosit, mikroglia, perisit ve amakrin benzeri hücrelerdir [10]. Fetal gelişim esnasında endotel hücreler proliferasyon olarak retinaya yayılırlar. Glial fibriller asidik protein (GFAP)-immünreaktif astrositler vaskülogenez süreciyle ilişkilidir. Bu astrositler hipoksiye yüksek sensitivite gösterir ve düşük oksijen saturasyonlarında VEGF salgırlar. Bu salınım da endotel hücre migrasyonu, diferansiasyonu ve proliferasyonunu stimüle eder [10].

Vasküler gelişim, vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır [11]. Vaskülogenez santral retinadaki endotel hücrelerden denovo kan damarı oluşumu ile karakterizedir. Vaskülojenik periyod esnasında 4 vasküler arkad oluşur. Anjiyogenez ise mevcut damarlar üzerinden yeni damar tomurcuklarının oluşması ile karakterizedir. Anjiyogenez aynı zamanda retinanın diğer vasküler bozukluklarının ve bazı tümörlerinin de altında yatan süreçtir.

Anjiyogenez süreci vasküler yoğunluğun artmasından, yüzeyel retinanın periferel vaskülarizasyonundan, dış pleksus ve radyal peripapiller kapiller oluşumundan sorumludur. Bu sistem düzenleyici faktörlerin aktivasyonu ve inhibisyonu arasında oluşan denge ile kontrol edilmektedir [12]. Fetal gelişim esnasında relatif hipoksi retinal vasküler gelişimi destekler [13]. Hipoksi aynı zamanda VEGF’i regüle eden bir nükleer transkripsiyon faktörü olan Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) üretimini stimüle eder. HIF-1 normoksi durumunda hızlıca yıkılır fakat fetal yaşam gibi orta düzeyde hipoksik

koşullarda yarı ömrü uzatarak nükleer birikimi artırır. HIF-1 stimülasyonu sonucu VEGF özellikle retinal astrositler ve Müller hücrelerinden salınarak anjiyogenezi uyarır.

2.2. PATOLOJİK RETİNAL VASKÜLER GELİŞİM VE PREMATÜRE RETİNOPATİSİ PATOGENEZİ

Prematüre retinopatisi (PR) ilk kez 1942 yılında Terry tarafından “retrolental fibroplazi” terimi ile tanımlanmıştır [14]. Oksijen desteği ve PR arasındaki ilişki 1950’lerden bu yana bildirilmektedir [15, 16]. PR’nin olası mekanizmalarının anlaşılması için birçok hayvan modeli çalışması yürütülmüştür. Ashton ve arkadaşları oksijen endükte retinopati modelinde oksijen toksisitesine bağlı damar kaybı (faz-1) ve takiben hipoksiye bağlı vazoproliferasyon (faz-2) mekanizmasını ortaya koymuştur [17].

İntrauterin yaşamın ikinci yarısındaki ortalama oksijen basıncı olan 30-35 mm Hg ile karşılaştırıldığında oda havası bebekler için hiperoksi ortamı oluşturabilmektedir [18]. Bu relatif hiperoksik ortamın serbest oksijen radikalleriyle indüklenen sitotoksikite, damar obliterasyonu ve endotel hücre apoptozuna sebep olduğu düşünülmektedir. Hiperoksi oksijen ilişkili anjiyogenik büyüme faktörlerini, eritropoetini [19, 20], VEGF’i [21] baskılayarak retinal damarlanmanın durmasına, hatta oluşmuş bazı damarların gerilemesine sebep olmaktadır [22]. Hiperoksi aynı zamanda peroksinitrit gibi reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumunu artırmaktadır. Peroksinitrit retinal endotel hücre apoptozunu tetikleyebilmektedir [23].

PR bifazik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. **Faz-1** preterm doğumla normal retinal gelişimin kesintiye uğramasıyla başlamaktadır. Retina gelişiminin fizyolojik hipoksiyle indüklendiği bu dönemde bebeğin hiperoksiye maruz kalması normal vasküler gelişimi durdurmaktadır. IGF-1, HIF-1 α ve VEGF düzeylerinde ani bir azalma görülür [24].

Faz-2 ise genellikle postmenstrüel 32-34. haftalarda başlar ve avasküler retinanın hipoksisi ile karakterizedir. Hipoksik stimülasyona sekonder gelişen vasküler obliterasyon VEGF ve eritropoetin artışı sonucu neovaskülarizasyonu tetikler [25]. IGF-1 de bu aşamada VEGF için güçlendirici etkiler göstererek neovaskülarizasyonu regüle eder [24]. Oluşan patolojik damarlar avasküler geçiş bölgesinin ötesine geçip avasküler retinayı besleyemez. Avasküler fazdan proliferatif faza geçişin sebebi gelişmekte olan retinanın metabolik

ihtiyaçlarının yetersiz kapiller dolaşımına sağlanamamasıdır. Uygun miktarda oksijenin dokulara ulaşması neovaskülarizasyonu geriletebilir. Neovaskülarizasyon ve sekonder skatrisyel fibrozis retina dekolmanı ve körlüğün sebebidir.

2.2.1. HİPOKSİ-İNDÜKLENEBİLİR FAKTÖRLER

Hipoksi ile indüklenebilen faktörler, DNA'ya bağlanarak hipoksiye cevap olarak üretilen mediatörlerin gen transkripsiyonunu artırır. Bunların arasında VEGF, anjiyopoetin ve eritropoetin gibi birçok mediatör bulunmaktadır. Normoksik şartlarda HIF-1 hidroksilazlar tarafından hidroksile tutulmaktadır. Hidroksilasyon HIF-1'in hızlı yıkımına yol açar. Hipoksi şartlarında ise hidroksilasyon veriminin düşmesi HIF-1'in akümülyasyonunu ve VEGF promotörüne bağlanmasını sağlar. Bu birikim VEGF ekspresyonunu artırır. HIF-1 α ekspresyonu normal retinal gelişim sürecinde indüklenir. Hiperoksi ile ekspresyon azalırken normoksik şartlara dönüş ile birlikte ekspresyon artar. Bu artış VEGF ekspresyonu ile korelasyon gösterir. Prematürenin doğumla birlikte uterus içindeki 30-35 mmHg'lik oksijen ortamından 50-80 mmHg'lik ekstrauterin ortama geçişi, hatta bu basıncın oksijen destek tedavileri ile daha da yükseltilmesi, HIF-1 düzeylerinin baskılanmasına ve buna bağlı olarak VEGF ekspresyonunda azalmaya ve retinal kapillerlerin obliterasyonuna sebep olmaktadır.

Böylece HIF-1'in azalması PR'nin ilk fazının başlaması ve ilerlemesi için gerekliken, artışı da ikinci faz için gereklidir. HIF-1'in aktivitesinin veya ekspresyonunun mutasyonlarla ve ilaçlarla azaltılması oksijenle indüklenen neovaskülarizasyonu azaltmaktadır [26, 27]. Sonuç olarak HIF-1'in pozitif ve negatif değişimi ROP gelişiminde önemli rol oynamaktadır.

2.2.2 VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRLERİ (VEGF' ler)

Vasküler büyüme faktörleri plasental büyüme faktörü (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve viral VEGF homologu VEGF-E den oluşan bir protein ailesidir [28-31]. VEGF'in anjiyogenezde anahtar rol oynadığı bilinmektedir [32, 33]. VEGF-A hipoksik ve inflamatuvar uyarıya cevap olarak farklı türde hücrelerden salgılanır (makrofajlar, T hücreleri, astrositler, perisitler, düz kas hücreleri ve retinada, retina pigment epitel hücreleri ve ganglion hücreleri) [34]. VEGF'in esas rolü endotel hücre proliferasyon,

migrasyon ve t p formasyonunu stimüle ederek damar gelişimi ve büyümesini kontrol etmektedir.

Retinal anjiyogenez modelleri fotoreseptör ve nöronların matürasyonunun retina içerisinde bir ‐fizyolojik hipoksi‐ ortamı oluşturduğunu ve bunun astrositlerden VEGF ekspresyonunu artırarak vasküler endotel proliferasyonunu sağladığını göstermiştir [25]. Gelişim esnasındaki hipoksik koşullarda VEGF’in ana kaynağı retinal gelişimin periferik ilerlemesini stimüle eden astrositlerdir [10]. Benzer şekilde Müller hücrelerinden eksprese olan VEGF’in derin vasküler pleksus gelişimini regüle ettiği d ş n lmektedir [35].

Vasküler endotelyal büyüme faktörleri PR gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. PR’nin ilk fazında hiperoksi ile azalan VEGF ekspresyonu vasküler gelişimin durmasına ve damarların obliterasyonuna sebep olurken ikinci fazda ise hipoksi ile ekspresyonu artmaktadır. PR’nin ikinci fazında görülen neovaskülarizasyon VEGF inhibitörlerinin kullanımıyla azaltılabilir. VEGF’i inhibe eden insan monoklonal antikoru bevacizumabın intravitreal kullanımının şiddetli PR gelişimini azalttığı ve kan damarlarının periferik büyümesini sağladığı gösterilmiştir [36, 37]. Daha yakın zamanda ranibizumabın daha kısa yarı ömürlü olduğu için öncelikli tercih olabileceği belirtilmiştir [38]. Bevacizumab serum VEGF seviyelerini haftalarca düşürürken [39, 40] ranibizumabın sadece birkaç hafta d ş rd ğu görülmüştür [38].

Çalışmamızda kullandığımız molekül olan astaksantin ile yapılan in vitro hücre kültürü çalışmalarında ve C57BL/J6 ırkı fareler üzerinde gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda astaksantin VEGF düzeyinde azalma sağladığı gösterilmiştir [41].

2.2.3 İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1)

IGF-1 anne kaynaklı bir büyüme faktörüdür [42]. Kan düzeyleri maternal serum ve fetusta özellikle 3.trimesterde yükselir. Doğum sonrası düşük IGF-1 düzeyleri PR gelişimi ile doğrudan alakalıdır ve infantın şiddetli PR gelişimi riskini öngörebilmek için aralarında IGF-1’in de bulunduğu bir klinik algoritma geliştirilmiştir (WINROP algoritması). Term infantlarda 1-15.gün arasında görülen hızlı IGF-1 artışı pretermelerde görülmemektedir. IGF-1’in hem faz 1 hem de faz 2’de kritik öneme sahip olduğu d ş n lmektedir [43]. Postnatal periyodun erken safhalarında IGF-1 yokluğu anormal retinal damarlanma ve PR

gelişimine yol açmaktadır. IGF-1 üretemeyen farelerde normal VEGF düzeylerine rağmen retinal gelişimin geciktiği izlenmiştir [43]. IGF-1 üretiminde genetik defekti olan hastalarda retinal vaskülarizasyonun azaldığı ve yalnızca VEGF verilmesi ile düzeltilemediği gösterilmiştir [44]. IGF-1 seviyesinin düşük kalmasının vaskülogenezi durdurduğu, böylece avasküler retinanın hipoksik kalıp vitreus içinde VEGF birikimine sebep olduğu düşünülmektedir. Normal VEGF ve IGF-1 konsantrasyonları Akt sinyal yolunu aktive ederek endotel hücre ömrünü uzatmaktadır. Hellström ve ark. VEGF ve IGF'nin ortamda birlikte bulunmalarının ayrı ayrı bulunmalarına göre 5 kat daha fazla Akt yolu aktivasyonu yaptıklarını göstermişlerdir. Bununla birlikte PR'nin ilk safhasında olduğu gibi IGF-1 düşükse VEGF kendi başına Akt yolunu aktive edememektedir. Bu durum normal VEGF düzeyleri olmasına rağmen apoptoziste artışa neden olmaktadır [43]. Tam tersine, ikinci safhada olduğu gibi yüksek IGF-1 düzeyleri endotel hücre apoptozunu bloke ederek neoanjiyogenezi Akt sinyal yolu üzerinden artırmaktadır.

VEGF ve IGF-1'in farklı zaman dönemlerindeki, PR fazları rolleri ve müdahale zamanı ve yaklaşımı hakkında fikir vermektedir. Örnek olarak ilk fazda VEGF ve IGF-1'in inhibisyonu normal vasküler gelişimi durdurabilirken ikinci fazda hastalığın gerilemesini sağlayabilmektedir [24]. Benzer şekilde PR'nin ilk fazında rekombinant insan IGF-1 (rhIGF-1) desteği neovaskülarizasyonu azaltırken ikinci fazda verilmesinin neovaskülarizasyonu artırdığı gösterilmiştir [24, 45].

2.2.4 PLASENTAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (PIGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörleri ve plasental büyüme faktörü (PIGF) bir çok biyokimyasal ve moleküler özelliği paylaşan büyük bir peptid ailesinin üyeleridir [46, 47]. Fakat PIGF anjiyogenez konusunda VEGF kadar detaylı araştırılmamıştır. Plasental büyüme faktörü monosit kemotaksisi, kollateral damar gelişimi, erişkin patofizyolojik damar gelişimi ve endotel hücre proliferasyon/migrasyonunda önemli rolleri olan bir homodimerik glikoproteindir [48]. Ayrıca retinal neovaskülarizasyon sürecinde VEGF'in aktivasyonunu ve ekspresyonunu artıran bir kofaktördür [49, 50]. VEGF ve PIGF birleşerek FLT-1'i bağlanarak aktive olmasını sağlayan bir heterodimer oluşturur. Bu heterodimer anjiyogenez oluşumuna yol açar [51, 52].

PIGF'nin PR patogenezindeki yeri henüz tam olarak açığa çıkmamıştır. VEGF üretimi olmayan farelerin yaşamın ilk 2 haftasında öldüğünü fakat PIGF üretemeyen farelerin normal şekilde geliştiğini göstermişlerdir [53]. Bu veriler PIGF'nin normal gelişim için şart olmadığını göstermektedir. Ayrıca PIGF kaybının patolojik anjiyogenezi, iskemide görülen vasküler sızıntıyı, kanser ve yara iyileşmesini inhibe ettiğini gözlemlenmiştir [51]. PIGF retinal endotel hücrelerde ve perisitlerde VEGF ile birlikte bulunabilir [54]. Oküler hastalıklar içerisinde diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi ve glokom cerrahisi sonrası yara iyileşmesinde PIGF'nin önemli rolü vardır. PIGF fonksiyonunun FLT-1 antagonistleri veya monoklonal FLT-1 antikoru ile baskılanması tümöral dokularda ve iskemik retinada neovaskularizasyonu suprese etmektedir [55].

2.2.5 ERİTROPOİETİN (Epo)

Eritropoetin erişkin böbrekten ve fetal karaciğerden salgılanan bir glikoproteindir [56]. Epo, Epo reseptörü (EpoR) adı verilen homodimerik reseptöre bağlanarak eritropoezi stimüle eder. Bunun yanında anjiyogenez ve retinopati gelişiminde VEGF'den bağımsız bir rolü olduğu düşünülmektedir [57]. EpoR endotel hücreleri, düz kas hücreleri, B hücreleri, kemirgen plasenta hücreleri, embriyonik kök hücreler, megakaryositler ve nöronal hücreler üzerinde bulunmaktadır [58-67].

Epo ve EpoR'nin retinada bulunması bu moleküllerin farklı rolleri olduğu hipotezini desteklemektedir [68]. Çeşitli çalışmalarda Epo'nun ışıkla indüklenen retinal dejenerasyon, iskemik reperfüzyon hasarı, nöronal hücre ölümü ve felç gibi patolojilerde koruyucu rollerinin olduğu gösterilmiştir [69-73].

Hipoksi Epo salınımını stimüle ederek eritrosit sayısını ve anjiyogenezi artırır. Hipoksik şartlarda Epo ve VEGF, HIF-1 tarafından stimüle edilir ve benzer karakteristik özellikler gösterir [74]. Epo, iskemik süreçte artış gösterirken, Epo inhibisyonu oksijen endükte anjiyogenezi azaltmaktadır [57]. Aynı çalışmada diyabetik hastalarda vitreus Epo düzeyinin sağlıklı insanlara göre daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir. Proliferatif retinopati fare modelinde büyüme fazında Epo inhibisyonunun neovaskularizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Chen ve ark. oksijen endükte retinopatinin bütün fazlarında Epo'nun rölünü araştırmışlardır [19]. Retinopatinin ilk fazında Epo yetmezliği hastalığın gelişimine katkıda bulunmuştur. Bu aşamada dışarıdan verilen Epo desteği damarların obliterasyonunu ve iskemiye önlemektedir. Bu veriler hastalığın erken döneminde Epo tedavisinin hasarı azaltabileceğini göstermektedir. Buna karşılık geç dönemde Epo tedavisi endotel hücre proliferasyonunu tetikleyerek hastalığı artırabilmektedir [19].

Son 20 yılda prematüre bakımında Epo tedavisi giderek daha önemli bir yer edinmiştir. Bazı çalışmalar Epo tedavisiyle retinopatide bir artış saptamazken [75, 76], bazı çalışmalarda rhEpo ile PR insindansında artış olduğu gözlemlenmiştir [77, 78]. Ohlsson ve Aher 'in yürüttükleri bir meta-analiz sonucunda rhEpo ile tedavi edilen bebeklerde şiddetli PR gelişimi diğer hastalardan daha yüksek bulunmuş, özellikle tedavi hayatın ilk 8 gününde başlamışsa tüm evrelerde anlamlı bir artış saptanmıştır [79, 80].

2.2.6 NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit (NO) nötotransmisyon, vazodilatasyon ve hücre savunması gibi temel fizyolojik olaylarda anahtar bir sinyal molekülüdür [81-83]. NO, aralarında VEGF'in de bulunduğu bir çok anjiyogenik, hücre migrasyonu ve proliferasyonunu artırıcı genin ekspresyonunu artırabilmektedir [84].

NO koroidal ve retinal kan akımının belirlenmesinde ana bileşenlerden biridir [85, 86]. Ayrıca retina ve beyindeki hipoksik iskemik hasarın patogenezi ile ilişkilidir [87, 88].

NO endotel hücre proliferasyon ve migrasyonunu stimüle etmektedir. VEGF uyarısından sonra hücre proliferasyonu NO ve cGMP birikimi sonucunda oluşmaktadır [89]. NO sentezinin inhibisyonu hücre proliferasyonu ve mitojenik aktiviteyi baskılamaktadır. Benzer şekilde VEGF tarafından indüklenen damar geçirgenliğinde artışın da NO aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir [90]. Endotelial nitrik oksit sentaz geninde defekt olan farelerde oksijen endükte retinopatinin daha hafif seyrettiği görülmüştür [91]. Ayrıca indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibisyonunun HIF-1 α ve VEGF düzeylerini azaltarak retinal anjiyogenezi baskıladığı bildirilmiştir [92].

Oksijen endükte retinopati modellerinde, NO üretiminin erken evrede oluşan vasküler obliterasyona yanıt olarak geliştiği düşünölmektedir. Bununla birlikte daha sonraki aşamalarda artmış NO üretimi neovaskularizasyonu şiddetlendirmektedir.

2.2.7 ADENOZİN

Adenozin endojen bir pürin nükleotidi olup enerji transferi (ATP), sinyal transdüksiyonu (cAMP) ve inhibitör nörotransmisyon gibi biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Artan doku aktivitesi, stresi ve hipoksisi adenozin düzeylerinde artışa sebep olur. Adenozin aktivitesi retina gibi oksijen ihtiyacının yüksek olduğu dokularda daha belirgindir. İlgili doku ve reseptörlere göre vazodilatör ve vazokonstriktör etki gösterebilir [93]. Ayrıca endotel hücrelerden büyük kan damarlarına kadar mitojenik, kemotaktik ve proliferatif etkileri de olduğu belirtilmektedir [94-96]. Adenozinin vazodilatör etkisi de NO üzerinden gerçekleşmektedir. Bunun ötesinde adenozin hipoksik koşullarda VEGF üretimini doğrudan stimüle edebilir [97-100]. Adenozin, immünohistokimyasal yöntemlerle retinada Müller hücrelerinin bazı kısımlarında lokalize olduğu gösterilmiştir [101] ve hücrelerarası iletişimde rolü olduğu düşünölmektedir.

Retinal gelişim sürecinde endotel hücreler ve anjiyoblastlar üzerindeki adenozin reseptörü sayısı artar. PR'nin hiperoksik fazı adenozin seviyelerinde azalma ile karakterizedir. Takip eden hipoksik vazoproliferatif faz anjiyogenez ve yüksek adenozin seviyeleri ile karakterizedir.

Adenozin reseptörleri retinal anjiyogenezi baskılamak için terapötik bir hedef olarak gözölmektedir. Fakat sistemik adenozin reseptör antagonistleri normal vaskülogenezi de baskılayabildikleri için lokal ve kısa süreli kullanım önerilmektedir [102].

2.2.8 APELİN

Apelin X kromozomu üzerinden transkrib edilen bir peptiddir. Apelin reseptörü (APJ) inhibitör G proteini ile birleşiktir. Apelin yolu çeşitli hücre, organ ve periferik dokularda aktiftir (akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, adipöz doku, barsak, beyin, endotelyum, meme bezleri ve plazma) ve kardiyovasküler aktivite, hücre büyümesi, apoptoz, metabolizma, sıvı homeostazı ve immün cevabı regüle eder. Apelinin in-vivo ve in-vitro vaskülogenez ve

anjyogenezi regüle ettiği düşünülmektedir [103, 104]. APJ/Apelin sinyal yolunun retinal endotel hücrelerde yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır [105]. Apelin uygulaması hücre göçü, proliferasyonu ve kapiller formasyonu artırmaktadır. Ayrıca APJ genleri embriyonik vaskülogenez ve postnatal retinal damar gelişiminde yüksek oranda eksprese olmaktadır [103]. Benzer şekilde tümöral dokuların yoğun neovaskülarizasyon alanlarında da apelin aktivitesi yüksek bulunmuştur [106].

Apelin OER fare modelinde hipoksik fazda anjyogenezi stimüle etmiştir. Bu stimülasyon büyüme faktörleri üzerinden olmayıp doğrudan APJ üzerinden gerçekleşmiştir [107]. Bu stimülasyonun nasıl gerçekleştiğine dair ayrıntılı mekanizma henüz bilinmemektedir. Hipoksi ve özellikle HIF-1 α 'nın apelin üretimini artıran genleri aktive ettiği düşünülmektedir [108]. Bir başka OER modelinde fibrovasküler membranlar üzerinde APJ ekspresyonunun arttığı ve bu artışın anti-VEGF uygulaması ile durdurulmadığı gözlenmiştir [109]. Umbilikal kord kanı örneklerinde apelin ve IGF-1 düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada artışların birbiriyle korele olduğu izlenmiştir [110].

Diyabetik retinopati ve retinal ven tıkanıklığı hastalarında da vitreal apelin konsantrasyonları VEGF ve plazma apelin konsantrasyonundan bağımsız olarak artış göstermektedir. Bu yüzden apelinin endotel hücrelerde lokal olarak üretilip otokrin etki gösterdiği düşünülmektedir [111].

Bu bilgiler ışığında Apelin/APJ yolağının normal ve patolojik retinal anjyogenezde önemli rol oynadığı görülmektedir.

2.2.9 β -ADRENERJİK RESEPTÖRLER (β -AR)

Adrenalin ve noradrenalin çeşitli fizyolojik olaylarda ve hastalıklarda rol alan katekolaminlerdir. Adrenerjik reseptörler metabotropik G protein-bağlı reseptörlerdir. Reseptörlerin uyarılmasıyla sempatik etki ortaya çıkar. Adrenerjik reseptörler α ve β olarak iki ana sınıfa ayrılır.

β -AR'ler vasküler endotel hücrelerde yaygın şekilde eksprese olmaktadır ve kronik iskemiye cevap olarak neoanjyogenezi düzenlemektedirler. Adrenerjik sistem ve anjyogenez arasındaki olası ilişki çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. Solid tümörlerde

noradrenalinin VEGF'i artırarak tümör progresyonunu artırdığını gösterilmiştir [112]. Bununla beraber umbilikal ven endotel hücrelerinde NA stimülasyonunun VEGF üretimini artırdığı gösterilmiştir [113].

Sempatik innervasyon oküler vasküler gelişimde önemli rol oynamaktadır. Bir β -adrenerjik agonist olan isoproterenolün insan koroidal endotel hücrelerinde büyüme faktörlerini artırdığı gösterilmiştir [114]. Bir başka çalışmada ise aynı molekülün diyabetik değişiklikleri azalttığı gözlemlenmiştir [115]. OER fare modelinde bir β -adrenerjik blokör olan propranololün sistemik yolla verilmesinin retinal VEGF ve IGF-1 ekspresyonunu, retinal neovaskülarizasyonu ve vasküler sızıntıyı azalttığı gösterilmiştir [116].

β -AR uyarılmasının VEGF artışına sebep olduğu ve PR'nin ikinci fazının artmış VEGF ile ilerlediği göz önünde tutulduğunda β -blokörlerin PR tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir [117]. Bu konuda yapılacak araştırmaların PR ve diğer proliferatif retinopatilerin tedavisinde yeni seçenekler sunabileceği düşünülmektedir.

2.2.10 OKSİDATİF STRESE BAĞLI MEDIATÖRLER

Retina reaktif oksijen türlerinin yarattığı oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Retina vücuttaki en yüksek oksijen tüketim oranına sahip dokudur. İnsan retinasının oksijen tüketimi birim dokuda böbrekten %50, serebral korteksten %300, kalp kasından ise %600 daha fazladır [118]. Sürekli ışık maruziyeti retinada foto-oksidasyona eğilim oluşturmaktadır. Retinal iskemik gibi patolojik durumlarda, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve endojen antioksidan sistemleri arasındaki denge bozulmaktadır. Bunun sonucunda reaktif oksijen türleri çeşitli sinyal yollarını tetikleyerek DNA ve hücre içi lipidleri etkiler, hücre içi kimyasal bağları bozar ve hücre ölümüne sebep olur. Antioksidanlar ise bu etkileri inhibe ederek retinal hücreleri iskemik hasara karşı korur.

Gestasyonun geç evrelerinde süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, vitamin C ve E gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların üretiminin dramatik şekilde arttığı gösterilmiştir [119]. Bu yüzden prematüre bebekler oksidatif strese karşı daha savunmasızdır ve yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kaldıkları yoğun bakım sürecinde antioksidan sentezleme yetenekleri yetersiz kalmaktadır [120]. Oksidatif stres indikatörü olan 8-hidroksil 2-deoksiguanozin düzeylerinin term bebeklere göre prematürelere anlamlı olarak yüksek bulunması da bu bilgileri destekler niteliktedir [121].

PR'nin fazları esnasında retinanın maruz kaldığı değişken oksijen düzeyleri retinal hipoksiye neden olarak reaktif oksijen türleri üretimini artırır ve bu artış NADPH oksidazı aktive ederek JAK/STAT sinyal yolu üzerinden intravitreal neovaskularizasyonu tetikler [122]. Omega-3-poliansatüre yağ asitleri ve vitamin E gibi antioksidanların damar obliterasyonunu azaltarak neovaskularizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [123]. Bütün bu kanıtlar PR patogenezinde oksidatif stresin önemini işaret etmektedir.

2.2.11 İMMÜN VE İNFLAMATUAR MEDIATÖRLER

Proliferatif retinopatilerde iskemik fazı inflamatuvar cevap takip eder. İnflamatuvar cevapta birçok sitokin üretilir ve bunlar vasküler geçirgenlik artışı, lökosit aktivasyon ve diferansiasyonu, apoptozis ve anjiyogenezi tetikler [124].

Omega-3-poliansatüre yağ asitlerinin TNF- α inhibisyonu üzerinden retina üzerinde protektif etkili olduğu bulunmuştur [123]. TNF- α 'nın inhibisyonu retinal gelişimi ve anjiyogenezi modüle etmektedir ve bu etkinin PR tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir. Retinada Omega-3-poliansatüre yağ asitlerinin artışı neovaskularizasyonu azaltmaktadır [123].

Kemokin ve hücre adezyon molekülleri hedef alınarak lökosit infiltrasyonunun inhibe edilmesi, retinal neovaskularizasyonu azaltabilmektedir. Hirano ve ark. ICAM-1 adezyon molekülünü [125], Dimaio ve ark. PECAM-1 adezyon molekülünü baskılayarak OER modelinde bu etkiyi gözlemlemişlerdir [126].

94 seçilmiş genin araştırıldığı bir OER modelinde inflamasyonla ilişkili genlerin hücre içi düzeyinde artış gözlenmiştir [127]. Aynı yazarların bir başka çalışmasında Evre 4 PR'de 27 sitokin vitreus düzeyleri incelenmiş ve IL-6-7-10-15, eotaksin, fibroblast büyüme faktörü, GCSF, Interferon Gama Inducible Protein-10, RANTES ve VEGF düzeylerinde anlamlı artış göstermişlerdir [4]. Ek olarak Sood ve ark. sistemik inflamasyonun PR patogenezinde rolü olduğunu göstermiş, postnatal ilk 3 haftada çeşitli sitokin seviyelerinde artış gözlemlemişlerdir [3].

Çalışmamızda kullandığımız molekül olan astaksantin, hücre zarına yerleşerek serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi, zincir reaksiyonların önlenmesi, lipid peroksidasyonunun inhibe edilerek membran yapısının korunması, immün yanıtın güçlendirilmesi gibi birçok antiinflamatuvar özellikler göstermektedir [128]. Bunun yanında nötrofillerden salınan TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri azalttığı

bildirilmiştir [129]. Astaksantin antiinflatuar etkileri NO, PGE-2, NF-κB inhibisyonu ve oksidatif DNA hasarının azaltılmasını da kapsamaktadır [7, 130].

2.3 PREMATÜRE RETİNOPATİSİ SINIFLAMASI VE TEDAVİSİ

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 güncellenmiş şekli yayınlanmıştır. ICROP'a göre hastalığın şiddetini 4 etken belirler [131].

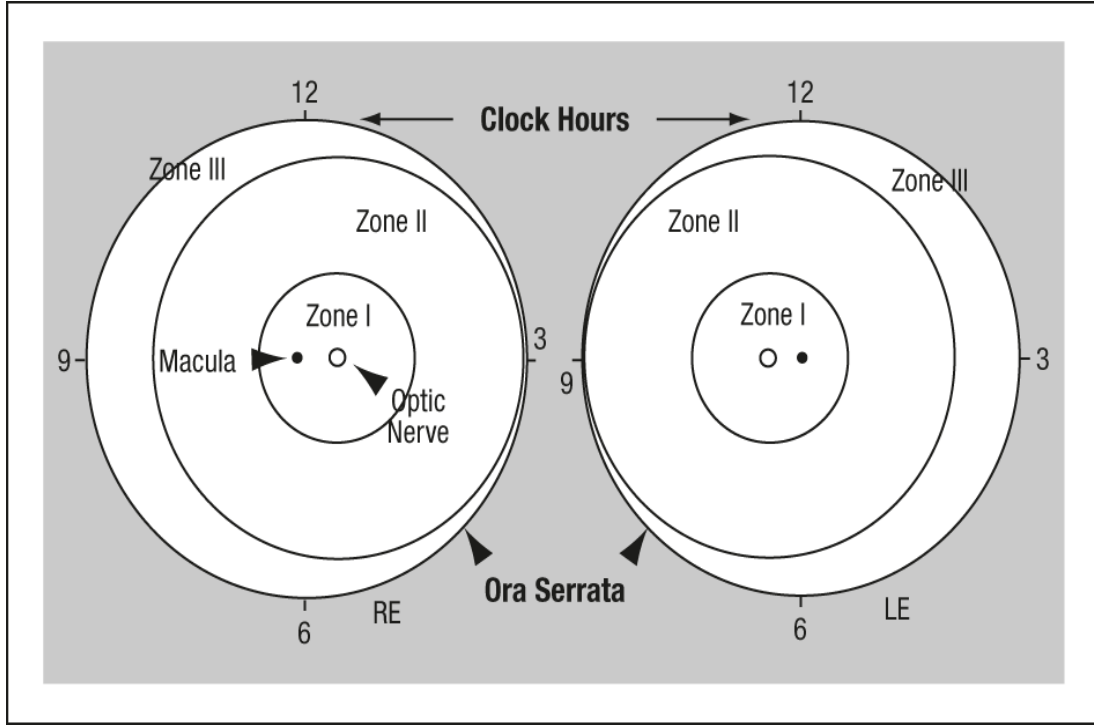
- Retina tutulumunun yerleşimi; zonlarla ifade edilir.
- Retina tutulumunun yaygınlığı; saat kadranı olarak ifade edilir.
- Retinopatinin ciddiyeti; evre olarak ifade edilir.
- Retina arka kutup damarlarında tortuosite ve dilatasyon varlığı (plus hastalık).

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 yarım ay 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 (açık huni/kapalı 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. Tedavisiz bırakıldığında genellikle kısa sürede Evre 5'e ilerler.

Tedavi

Hastalığın evresine göre farklı tedavi yöntemleri tek başına ve/veya kombine olarak uluslararası geçerli kriterlere göre uygulanmaktadır [132].

ETROP çalışması sonucu erken tedavi gerektiren yüksek riskli gözleri ve spontan gerileme eğilimi olan düşük riskli gözleri belirlemek için bir klinik algoritma geliştirilmiştir. Buna göre periferal retinal ablasyon gerektiren gözler Tip I PR olarak sınıflandırılmıştır.

Tip I PR:

- Zon 1'de Plus hastalığının olduğu bütün evreler
- Zon 1'de Evre 3 (Plus olabilir veya olmayabilir)
- Zon 2'de Plus hastalığı ile birlikte Evre 2 veya Evre 3

olarak tanımlanmıştır.

Algoritmaya göre lazer tedavisi gerektirmeyip yakın takip gerektiren gözler Tip II PR olarak sınıflandırılmıştır.

Tip II PR:

- Zon 1'de Plus hastalığının olmadığı Evre 1 veya 2
- Zon 2'de Plus hastalığının olmadığı Evre 3

olarak tanımlanmıştır.

BEAT-ROP çalışması anti-VEGF olan bevacizumabın Evre-3+ PR'de etkinliğini araştırmıştır [133]. Çalışma sonucunda Zon 1 Evre 3+ PR'li gözlerde bevacizumabın konvansiyonel lazerden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bevacizumab tedavisinden sonra retinal damarların vaskülarizasyonun kesildiği noktadan daha ileriye gittiği fakat perifer retinanın tam vaskülarize olmadığı görülmüştür. Bevacizumab monoterapisinin lazerin yan etkileri olan görme alanı kaybı ve miyopi indüklenmesi gibi durumlardan kaçınmayı sağladığı bildirilmiştir. Bevacizumabın hem yaygın Zon-1 Evre-3+, hem de agresif posterior PR tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin konvansiyonel lazer tedavisi ile azalmayan vitreus VEGF düzeylerinin intravitreal bevacizumab sonrası azalması olduğu düşünülmektedir.

Uygun tedaviye rağmen PR bazı gözlerde yapısal hasara ve vitreoretinal komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu durumlarda tedavide skleral çökertme veya vitrektomi uygulanmaktadır.

2.4. OKÜLER ANJİYOGENEZ

Vaskülojen ve anjiyogen süreçleri doku büyümesi ve iskemik hasarı takiben iyileşme için gerekli olmakla birlikte yaş tip YBMD, proliferatif diyabetik retinopati (PDR), retinal ven tıkanıklığı ve PR gibi hastalıklarda bu süreç dezorganize şekilde gelişir. Anormal anjiyogen hasarlı hücrelerden aşırı miktarda anjiyogenik faktörler salgılandığında oluşmaktadır. Bu yeni oluşan damarlar doku onarımı amacıyla meydana gelseler de, doku bütünlüğünü sağlayamazlar ve aksine görme kaybıyla ilişkili değişikliklere yol açarlar [134].

Anjiyogen süreci; büyüme faktörleri, vasküler endotel hücreleri, ekstraselüler matriks molekülleri, kemokin ve hücre sinyal molekülleri arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu meydana gelir. Bu süreçte vasküler endotel hücre aktivasyonu, proteolitik enzimlerle bazal membran yıkımı, ekstraselüler matriks degradasyonu, endotel hücre göçü, vasküler proliferasyon, hücreler arası sıkı bağlantıların (tight junction) oluşumu, perisit toplanması, yeni bazal membran sentezi ve yeni kollateral gelişimi gibi birçok yapısal değişiklik meydana gelir [134].

Oküler neovasküler hastalıkların anlaşılması, önlenmesi ve tedavisi için süren araştırmalar devam etmekte ve anjiyogenezi çeşitli basamaklarda durdurmaya yönelik tedavi arayışları sürmektedir [52, 55, 62, 135].

2.4.1. DİYABETİK RETİNOPATİDE ANJİYOGENEZ

Diyabetik retinopatide en erken histolojik değişiklikler bazal membran kalınlaşması, perisit ve endotel hücre kaybıdır. Perisit kaybı erken evrelerde mikroanevrizma oluşumuna yol açar. Kapiller vazooobliterasyon ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde neovaskülarizasyon oluşmaktadır. Kan retina bariyerinin hasarı ve buna bağlı vasküler sızıntı proliferatif retinopatide gelişen ana patolojik durumlardır.

Anjiyogenez oluşumunda birçok biyokimyasal mekanizma suçlanmaktadır. Kronik hiperglisemi oksidatif hasar, mikrotrombüs formasyonu, hücre adezyonu moleküllerinin aktivasyonu, lökosit birikimine yol açar. Buna bağlı oluşan iskemi büyüme faktörleri ve sitokinlerin ekspresyonunda artışa neden olur. Artan büyüme faktörleri arasında VEGF, IGF-1, Anjiyopoetin-1 ve 2, stromal kaynaklı faktör-1, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve tümör nekroz faktörü bulunur [136]. Aynı zamanda intraoküler antianjiyogenik faktörler olan PEDF, trombospondin, TGF- β ve somatostatin gibi maddeler diyabetik retinopatide azalmaktadır [137].

Hiperglisemiye ek olarak mitokondride üretilen yüksek miktardaki reaktif oksijen türleri ve ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products-AGE), heksozaminler ve artmış polyol üretimi retinal endotel hücre hasarına ve inflamatuvar cevaba neden olur. Bunun sonucunda vazoaktif komponentler, büyüme faktörleri ve adezyon molekülleri üretiminde artış olur ve anjiyogenez tetiklenir [138].

Konnektif doku büyüme faktörü (CTGF) fibroblast proliferasyonu ve ekstraselüler matriks oluşumunu artırmaktadır [139]. Bu faktörün artması fibrozisle sonuçlanan durumlarda anahtar rol oynamaktadır. Diyabetik hastalarda vitreus içindeki CTGF/VEGF oranı fibrozis ve anjiyogenez derecesini belirler. Anti-VEGF tedavi bu oranı artırarak fibrozise eğilim yaratır [140].

PDR'de önemli rol oynayan diğer faktörler arasında prostoglandinler, eritropoetin [141], anjiyopoetin-1 ve 2 [142], IFN- γ , IL-1, prolaktin ilişkili vazoinhibin [143], PEDF, NADPH oksidaz, NF- κ B sinyal yolu[144] bulunmaktadır. Bu faktörler arasındaki karmaşık ilişki nedeniyle tek büyüme faktörünü hedef alan tedaviler anjiyogenezi inhibe etmekte yetersiz kalmaktadır.

2.4.2 KOROIDAL NEOVASKÜLARİZASYONDA ANJİYOGENEZ

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 duyuusal retina arasında yer alırlar. YBMD en sık olmakla beraber, RPE, bruch membranı ve koryokapillaris kompleksini etkileyen pek çok hastalık KNV gelişimine neden olabilir. RPE ve bruch membranı arasında başta lipidler olmak üzere biriken depozitler koryokapillaristen RPE tabakasına oksijen ve besin maddesi geçişini kesintiye uğratar [145]. 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 incelmesine 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.

Koroidal neovaskülarizasyonda anjiyogenezi düzenleyen temel faktör VEGF'dir. VEGF endotel hücre proliferasyonunu, oküler inflamasyonu uyarır ve post kapiller venüllerde fenestrasyona yol açarak vasküler geçirgenliği artırır [146]. VEGF YBMD'de esas düzenleyici olsa da tek başında subretinal neovaskülarizasyon oluşturamaz. Koroidal neovaskülarizasyonun oluşabilmesi için anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki dengenin bozulması şarttır [147].

PEDF, VEGF'nin indüklediği kemotaktik endotel hücre göçü ve proliferasyonunu baskılayarak anti anjiyogenik özellikler gösterir [148]. Neovaskularizasyon bölgelerine yakın RPE'de yüksek oranda eksprese olduğu gösterilmiştir [149]. Bu anti anjiyogenik faktörün azalması KNV oluşumu ile ilişkilidir. Normal gözlerle kıyaslandığında KNV olan gözlerde FGF düzeyleri de yüksek bulunmuştur [150]. FGF üretimi melanositlerde, retina pigment epitel hücrelerinde ve koroid endotelinde gerçekleşmektedir. FGF ile birlikte CTGF ve TGF düzeylerinde de yükselme gösterilmiştir. Birçok çalışmada NO'nun VEGF ile birlikte anjiyogenezi düzenlediği gösterilmiştir [151]. YBMD'de indüklenebilir NOS düzeyleri yükselmektedir. Bunun yanında KNV'li gözlerde vitronektin, matriks metalloproteinazları ve kompleman bileşenlerinin artışı gösterilmiştir [152].

2.4.3. RETİNAL VEN TIKANIKLIKLARINDA ANJİYOGENEZ

Retinal ven dal tıkanıklıklarının patogenezinde hem retinal venin kompresyonu hem de trombüs oluşumuna yol açan damar duvarı hasarı olduğu düşünülmektedir [153]. Tıkanıklıklar hemen her zaman arter-ven çaprazlanma bölgelerinde oluşur [154]. Bu çaprazlama bölgelerinde damarların adventisyası birbiriyle bütünleşmiş durumdadır. Bu bölgede venin arter tarafından mekanik kompresyona uğraması ve ilişkili ateroskleroz ven dal tıkanıklığının patogenezinin oluşturur [155]. Çaprazlama bölgesindeki venöz incelmeye türbülant kan akımını indükleyerek endotel hasarı ve trombüs oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir [153].

Santral retinal ven tıkanıklıklarının patofizyolojisi daha az anlaşılmış olup, vasküler, anatomik ve inflamatuvar faktörlerin bir kombinasyonunun rol aldığı düşünülmektedir. Hipertansiyon ve ateroskleroz kaynaklı vasküler patolojiler [156], lamina kribroza konfigürasyonundaki anatomik varyasyonlar [157] ve lokal-sistemik inflamasyonun [158, 159] santral retinal ven tıkanıklığına yatkınlık oluşturabileceği belirtilmektedir.

Tıkanıklık oluştuktan sonra, tıkanıklığın posteriorundaki vasküler basınç artışı damar duvarından çevresindeki retinaya sıvı ve küçük moleküllerin sızmasına yol açar. Bunun yanında etkilenen vende oluşan vasküler endotel hasarı düşük dereceli kronik inflamasyonu indükleyerek inflamatuvar mediatörlerin up-regülasyonuna sebep olur. Bu faktörler arasında prostoglandinler, lökotrienler, ICAM-1, integrinler, TNF- α ve VEGF bulunmaktadır [160]. Bu sitokinler kan retina bariyerinin zayıflamasına yol açar. Ayrıca VEGF oküler

neovaskularizasyon gelişimine sebep olur. Bu faktörlerin hepsi ileride geliştirilecek tedaviler için birer hedef oluşturmaktadır [161].

2.5. GÜNCEL ANTIANGİYOGENİK TEDAVİ

2.5.1 PEGAPTANİB

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

Pegaptanib sodyum retinal neovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ilk anti-VEGF ajandır. Pegaptanib iki dala ayrılmış polietilen glikol parçalarına kovalent bağlanmış bir RNA aptamerinden oluşur. İnsan VEGF-165'e yüksek afinite gösterir [162]. Pegaptanibin etkinliği VISION çalışmalarıyla araştırılmıştır [163]. Bu araştırmaların sonucunda pegaptanibin etkinlik gösterdiği en düşük doz 0,3 mg olarak belirlenmiştir ve intravitreal enjeksiyonların 6 haftada bir tekrar edilmesi önerilmiştir.

2.5.2 RANİBİZUMAB

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

Ranibizumab insan VEGF-A'sının bütün izoformlarına yüksek afinite gösteren ve fare monoklonal antikörünün Fab kısmını içeren bir kimerik proteindir [164]. Ranibizumab Fc parçası içermediği için inflamatuvar cevaba daha az neden olduğu düşünülmektedir [165]. Aynı zamanda moleküler ağırlığı retinadan geçebilmesine izin verecek kadar düşük olduğu için subretinal aralığa yüksek konsantrasyonda ulaşabilir. Etkinliği bir çok klinik çalışma ile araştırılmıştır ve FDA onaylı olarak kullanılmaktadır.

2.5.3. BEVACİZUMAB

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

Bevacizumab insan VEGF-A'sının bütün izoformlarına yüksek afinite gösteren monoklonal antikördür. Antikor hem Fab hem de Fc parçalarını içerdiği için ranibizumaba göre serumda yarılanma ömrü daha uzundur. 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 farmokokinetiklerini araştıran bir çalışma, ikisinin vitredeki yarı ömürlerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir [166].

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 [167].

2.5.4 AFLİBERCEPT

(Eylea/VEGF Trap-Eye, Regeneron, Tarrytown, NY, USA)

Aflibercept FDA tarafından intraoküler kullanımı onaylanan bir moleküldür. İnsan VEGFR1 ve 2 için ekstraselüler ligand bağlama bölgelerinin, insan IgG1 Fc parçasına birleştirilmesi ile oluşturulmuş 115-kDa büyüklüğünde bir rekombinant füzyon proteindir. Bu tuzak molekülünün VEGF-A'ya bevacizumab ve ranibizumabdan daha yüksek afinitesi olduğu bildirilmektedir [168]. Molekül aynı zamanda VEGF-B ve plasental büyüme faktörünü de bağlamaktadır [169]. Bevacizumab ve ranibizumab tedavilerine yanıt vermeyen gözlerde aflibercept ile pigment epitel dekolmanlarında tama yakın rezolüsyon bildirilmiştir [170].

2.5 ARAŞTIRMA AŞAMASINDAKİ TEDAVİLER

2.5.1 SMALL INTERFERING RNA (siRNA)

siRNA, protein sentezini mRNA'nın yıkımını hızlandırarak durdurmaktadır. siRNA spesifik bir nükleotid sekansını hedefleyecek şekilde üretilmektedir [171]. VEGFR-1 ve hypoxia-induced gene yönelik siRNA'lar üretilmiştir.

2.5.2. SFİNGOZİN-1-FOSFAT (S1P) ANTİKORU

S1P retina pigment epitelinde üretilerek patolojik anjiogenez, vasküler geçirgenlik, fibrosis ve inflamatuvar cevap üzerinde etki gösteren bir biyoaktif lipiddir [172]. Sonepcizumab S1P'ye bağlanan monoklonal bir antikordur ve yapılan oksijen endükte retinopati çalışmalarında retinaya makrofaj göçünü ve neovaskülarizasyonu azalttığı gösterilmiştir [172]. iSONEP (Lpath,Inc.) sonepcizumabın intravitreal olarak üretilen formu olup klinik araştırmaları devam etmektedir.

2.5.3 SKUALAMİN LAKTAT

Skualamin laktat aminosterol grubu bir antianjiyogenik maddedir. Hücre fonksiyonlarının devamını sağlayan iyon taşıyıcılarını bloke eder. Kalmoduline bağlandığında VEGF ve integrin ekspresyonlarını inhibe ederek antianjiyogenik etki gösterir. Topikal formunun AMD hastalarında araştırılması için hasta toplaması devam etmektedir.

2.5.4. KESİNTİSİZ ANTI-VEGF SALINIMI

Günümüzde biyo-bozunabilir implantlar, mikrosferler, nanopartiküller ve lipozomlar, jel ve ön ilaç gibi birçok ilaç dağıtım yöntemi araştırılmaktadır. Bu yöntemlerin amacı daha az müdahale ile aynı etkiyi elde edebilmektir. Ranibizumab için kesintisiz salınım yapan bir intraoküler implant çalışmaları devam etmektedir. Bir başka strateji ise adeno-ilişkili viral vektörlerle göz içinde lokal ekspresyon sağlama yöntemidir. Bu yöntemin etkinliği oksijen endükte retinopati fare modeli ile gösterilmiştir [173].

2.5.5. DARPİnler

DARPİnler (Designed Ankyrin Repeat Proteins) antikor benzeri bağlanmayı taklit eden yeni bir tür bağlayıcı proteindir. İnsan VEGF proteinine çok yüksek afinite gösteren DARPİnler üretmek mümkündür [174]. Çeşitli deneysel çalışmalarla intravitreal enjeksiyon ve topikal damla şeklinde kullanımlarının etkililiği gösterilmiştir [174]. Onaylanması durumunda topikal olarak kullanılacak ilk anti-anjiyogenik ajan olacağı düşünülmektedir.

2.5.6. RADYASYON TEDAVİSİ

İyonizan radyasyon hücrelerde DNA hasarı oluşturarak antiproliferatif, antiinflamatuvar ve anti anjiyogenik etkiler gösterir. Radyasyon tedavisinin rektal kanser ve rabdomiyosarkom gibi solid tümörlerde anti-VEGF ile sinerjistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir [175]. AMD hastalarında uygulanan bir araştırmada epimaküler brakiterapi uygulamasının anti-VEGF tedavi ile sinerjistik etki gösterdiği ve intravitreal enjeksiyon gereksinimini azalttığı gösterilmiştir [176].

2.5.7. TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

VEGF reseptörleri VEGF molekülünün bağlanması ile aktive olan tirozin kinaz aktivitesine sahiptirler. Pazopanib, Vatalanib gibi çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri anti anjiyogenik tedavi açısından araştırılmaktadır. Pazopanibin VEGF, PDGF reseptörleri ve c-kit üzerinde aktivitesi olduğu bildirilmiştir [177]. Vatalanib ise PDGF ve c-kit üzerinde etki göstererek anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir [178].

2.5.8. İNTEGRİNLER

İntegrinler yeni kan damarı oluşumunda hücreler için gerekli olan hücre adezyon molekülleridir. ALG-1001 adlı peptid integrinlerle oluşan hücre adezyonunu inhibe etmektedir. AMD hastalarında yapılan bir çalışmada 3.2 mg ALG-1001 dozunun santral fovea kalınlığında anlamlı azalma sağladığı gösterilmiştir [179].

2.5.9. ANTİ-PDGF AJANLAR

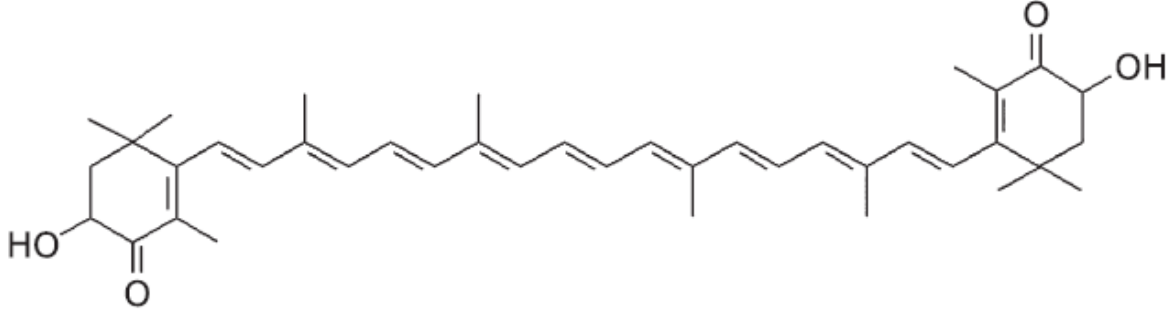
Endotel hücreleri perisitlerin çoğalmasını sağlayan PDGF salgılar. Perisitler KNV'nin olgunlaşmasında rol almaktadırlar ve yeni oluşan damarları stabilize ederler. Bu stabilizasyon sonucunda antikorların KNV dokusuna penetrasyonu azalır ve anti-VEGF tedavilere yanıtızlık ortaya çıkabilir [135]. Yeni bir anti-PDGF aptameri olan Fovista KNV'de anti-VEGF tedaviye adjuvan olarak araştırılmaktadır. Tek başına anti-VEGF uygulamasına göre kombine tedavinin daha etkin olduğu görülmüştür ve bu tedavinin anti-VEGF tedavisine dirençli olgularda kullanışlı olabileceği düşünülmektedir [135].

2.6. ASTAKSANTİN

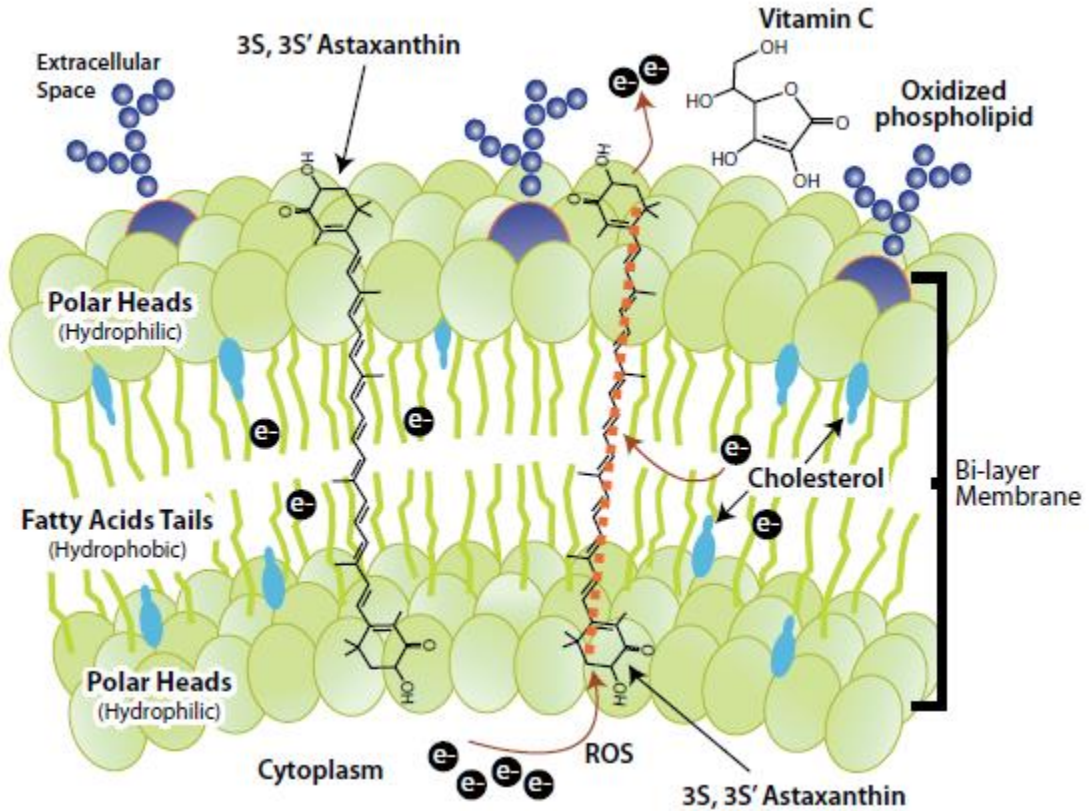
Karotenoidler temelde karotenler ve ksantofiller olarak iki ana gruba ayrılır. Molekül içerisinde oksijen atomu içeren karotenoidler ksantofil olarak adlandırılmaktadır. Bu grubun bilinen üyeleri arasında lutein, fukoksantin, astaksantin, tunaksantin ve zeaksantin bulunmaktadır. Astaksantin daha çok kabuklu deniz canlılarında bulunan kırmızı renkli bir pigmenttir. Özellikle yengeç, karides, somon, alabalık gibi canlılarda yüksek oranda bulunmaktadır. Doğada bilinen en güçlü antioksidan olduğu belirtilmektedir [180]. Moleküler yapısında bulunan iki hidrofilik uç ve hidrofobik gövdesi dolayısıyla hücre membranını boydan boya geçer ve stabilizasyonunu artırır [181] (şekil 1 ve 2). Gıda renklendirmede sıklıkla kullanılmakta olup sağlık açısından güvenilirliği araştırılmıştır [182]. Astaksantin geniş biyolojik aktiviteleri arasında antioksidatif, antitümör, anti-inflamatuar, antidiyabetik ve immünmodülatör etkileri bulunmaktadır. Astaksantin serbest formdayken lipofildir. Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonuna karşı güçlü inhibitör etkiler gösterdiği bilinmektedir. Ratlarda yapılan deneylerde kan beyin bariyerini geçip etkilerini beyinde de gösterebildiği belirtilmiştir [183]. Suda çözünen maddelerle kombine edildiğinde serbest oksijen radikalleri üzerinde direkt ve indirekt inhibe edici etkiler göstermektedir [184].

Astaksantin oküler dokular üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarla araştırılmaktadır. Oral alımla insan gözünde (6 mg/kg/gün) aköz içerisinde lipid peroksidasyonunu ve hidroperoksit düzeylerini azalttığı gösterilmiştir [185]. Lazerle indüklenmiş KNV fare modelinde intraperitoneal astaksantin enjeksiyonu ile KNV'de anlamlı azalma, KNV dokusuna göç eden makrofaj miktarında azalma ve RPE-koroid kompleksinde inflamasyonla ilişkili moleküllerde azalma gösterilmiştir. Ayrıca astaksantin ile in-vivo ve in-vitro NF-κB ve VEGF inhibisyonu saptanmıştır [41]. Bir başka çalışmada ise endotoksin ile indüklenmiş üveit rat modelinde astaksantin doza bağımlı şekilde NF-κB sinyal yolu üzerinden anti-inflamatuar etkiler gösterdiği bildirilmiştir [8]. Diyabetik fare modelinde retinal ganglion hücre apoptozu üzerinde inhibe edici etkileri gösterilmiştir [186]. Bir başka çalışmada ise astaksantin belirgin bir yan etkiye sebep olmadan koroidal kan akımını artırdığı belirtilmiştir. Otsuka ve ark. diyetle alınan astaksantin ışıkla indüklenen retinal hücre ölümünü azalttığını, retinitis pigmentosa ve kuru tip YBMD gibi hastalıkların ilerlemesini yavaşlatabileceğini bildirmişlerdir [187].

Biz çalışmamızda anti-VEGF ve antiinflamatuvar etkilerine bağlı olarak anti-anjiyojenik özelliğinden faydalanmak fikriyle oksijen endükte retinopati in vivo fare modelinde intravitreal astaksantin enjeksiyonun retina morfolojisine, neovaskularizasyona ve apoptotik hücre hareketine etkisini inceledik.



Şekil-1. Astaksantin kimyasal yapısı. İki uçta polar iyonon halkaları ve ortada non-polar konjuge karbon bağları bulunmaktadır.



Şekil-2. Astaksantin hücre zarındaki pozisyonu. Polar uç gruplar hücre zarının polar iç ve dış sınırlarıyla çakışırken non-polar orta kısım hücre zarının non-polar iç kısmında kalmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 HAYVAN DENEYİ PROTOKOLÜ

Tüm deneyler Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu Hayvan Hakları komitesinin onayı ve Etik Kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi (Proje No: DA13/52). Çalışmamız Türk Oftalmoloji Derneği orijinal nitelikteki laboratuvar ve deneysel araştırmalar için proje desteği ve Başkent Üniversitesi tarafından desteklenmiştir. Deneyler Smith ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdikleri in vivo oksijen endükte retinopati fare modeli C57BL/J6 kullanılarak gerçekleştirildi. Yeni doğan C57BL/J6 fareler anneleriyle birlikte postnatal 7. güne kadar oda ortamında yaşadıkdan sonra, postnatal 7. günden 12. güne kadar 75 ± 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 astaksantin (Sigma Aldrich Germany) orijinal toz astaksantinden elde edilen solüsyon kullanıldı. Toz astaksantin literatürde önerildiği gibi steril DMSO ile çözüldü.

Literatürde astaksantin için intraoküler ve/veya intravitreal enjeksiyonu içeren çalışmalar mevcut değildir. Çalışmamızda kullanılan C57BL/J6 farenin vücut ağırlığı enjeksiyon döneminde yaklaşık 5-7 g ve glob hacmi 5.3 µl olarak verilmektedir [188].

Orijinal sunulan toz astaksantinden elde ettiğimiz literatürde önerildiği koşullarda hazırlanan astaksantini iki farklı dozda intravitreal uyguladık. Çalışmamızda etki yan etki gözlemlerimizi güçlendirmek amaçlı 1 ve 10x doz miktarını belirledik (10 µg/ml ve 100 µg/ml intravitreal).

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan astaksantin dozu 50 ve 150 µM (mikromolar) olarak çalışılmıştır [41]. Biz çalışmamızda yüksek doz intravitreal enjeksiyonu 150 µM düzeyine karşılık gelen yaklaşık 100 µg/ml olarak uyguladık.

Analizler için fareler altı gruba ayrıldı.

Grup-A: Negatif kontrol grubu, oksijene tabi tutulmamış ve işlem görmemiş (n=5 göz)

Grup-B: Kontrol grubu, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmamış (n=5 göz)

Grup-C: Kontrol grubu, oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş (n= 5 göz)

Grup-D: Kontrol grubu, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n=5 göz)

Grup-E: 10 µg/ml intravitreal astaksantin enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n= 5 göz)

Grup-F: 100 µg/ml intravitreal astaksantin enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n= 5 göz)

1 µl intravitreal astaksantin enjeksiyonu farenin bir gözüne 32 gauge iğne ve Hamilton şırıngası ile stereoskopik mikroskop altında korneoskleral bölgede saat 6 hizasından enjekte edildi. 20 C57BL/J6 fare postnatal 7-12. günler arasında %75±2 oksijene tabi tutuldu. Onikinci gün 5 farenin sağ gözüne (Grup-D, n=5 göz) 1 µl intravitreal steril DMSO, 5 farenin sağ gözüne 10µg/ml intravitreal astaksantin (IVA) (Grup-E, n=5 göz), 5 farenin sağ gözüne 100 µg/ml (Grup-F, n=5 göz) IVA enjekte edildi. Kontrol grubundaki farelerin gözlerine 1µl steril DMSO solüsyon enjekte edildi (Grup-B, kontrol grubu, n=5 göz). 5 tane yaş uyumlu işlem görmemiş, oda ortamında tutulmuş fare (Grup-A, n= 5 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, E) 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 3 göz). TUNEL çalışması için ışık mikroskopide kullanıla parafin kesitlerinin 3. kesiti kullanıldı.

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 4µm 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)'in 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 (OsO₄) içinde fikse edildi. Alkolle 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 4µm kalınlığında optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde retinal kesitler alındı. Optik diskten sonra ikinci veya üçüncü kesit incelemeler için hematoksilen-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^R SPSS^R 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 [189].

4.BULGULAR

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

Hiperoksi endükte neovaskularizasyon gelişimi retinal parafin kesitlerinde internal limitan membranın vitreus tarafındaki endotelyal hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edildi. Negatif kontrol grubu (Grup-A) ve intravitreal DMSO uygulanan kontrol grubunda (Grup-B) retinal ILM'nin vitreus tarafında az sayıda endotel hücre çekirdeği gözlemlendi (Resim 1-A, -B). Grup-A ve Grup-B karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0.9$).

Oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-C) ve oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubunda (Grup-D) retinal ILM'nin vitreus tarafında $24,16\pm 3,8$ ve $22,66\pm 2,7$ endotel hücre çekirdeği gözlemlendi (Resim 1-C, -D, Diyagram-1). Grup-C ve Grup-D karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0,3$).

Grup A ve C karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). Grup-B ve -D karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$).

10 $\mu\text{g/ml}$ IVA enjekte edilen grupta (Grup-E) ve 100 $\mu\text{g/ml}$ IVA enjekte edilen grupta (Grup-F) retinal ILM'nin vitreus tarafında $5,1\pm 1,6$ ve $5,3\pm 1,5$ endotelyal hücre çekirdeği gözlemlendi (Resim 1-E, -F). Grup-E ve -F karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0,9$).

Grup-D ile karşılaştırıldığında Grup-E'de endotelyal hücre çekirdeği sayısının %77,49 ve Grup-F'de %76,61 azaldığı tespit edildi.

4. 2 Işık Mikroskopisi ile Morfolojik Analiz

Retina katmanlarının morfolojik analizinde negatif kontrol grubunda, intravitreal DMSO ve farklı konsantrasyonlarda astaksantin enjekte edilen gruplarda kistik dejenerasyon, hücre kaybı tespit edilmemiştir (Resim 1-A-F).

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) ve Grup-B’de mitokondriler dahil, belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı. (Resim 2-A, -B). Kontrol grubunda (Grup-C) ve Grup-D’de fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptandı (Resim 2-C, -D).

Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler astaksantin enjekte edilen gruplarda (Grup-E,-F) Grup-C ve -D’ye göre daha az yoğun olarak tespit edildi (Resim 2-E, -F, Diyagram-2). Mitokondriyal dismorfolojiyi kantifiye edebilmek için atipik mitokondri (yoğun litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde olan mitokondri=atipik mitokondri) belirlendi. Tüm gruplarda 6000x büyütme ile seçilmiş bir görüş alanında bulunan atipik mitokondri sayısı belirlendi.

Negatif kontrol grubu (Grup-A), Grup-B ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=1.0$).

Negatif kontrol grubu (Grup-A) ve Grup-B, -C ve -D karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$).

Grup-C ve -D, Grup-E ve -F ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$).

Grup-E ve -F arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

4. 4 TUNEL Tekniği ile Apoptozis Analizi

Negatif kontrol grubunda (Grup-A) ve Grup-B’de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edildi (Resim 3-A, -B). Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi.

Grup-C ve -D’de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edildi (Resim 2-C, -D, Diyagram-3). Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi ($p=0.7$).

Grup A ($p=0.3, 0.5$) ve -B ($p=0.5, 0.7$), Grup-C ve -D ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi.

Grup-E ile -F ($p=0.3$) arasında anlamlı fark bulunmadı. (Resim 2-E, -F)

Grup-E ile Grup-C ve -D arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.09$, $p=0.2$).

Grup-F ile Grup-C ve -D arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.01$, $p=0.02$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda oksijen endükte retinopati in vivo fare modelinde C57BL/J6 ırkı fare kullanarak intravitreal enjekte edilen astaksantin retinal endotel hücre proliferasyonuna, retinal morfolojik yapıya ve apoptozise olan etkisini inceledik.

İntravitreal olarak enjekte edilen astaksantin kullandığımız düşük ve yüksek dozda, doza bağlı olmaksızın retinal endotel hücre çekirdeği sayısını %%77,49 ve %76,61 azalttığı tespit edildi. Bu bulgu astaksantin retinal endotel hücre proliferasyonuna anti-anjiyogenik etkili olduğunu yansıtmaktadır. Bulgumuz literatürde astaksantin antianjiyogenik etkilerini bildiren çalışmaları destekler niteliktedir [41, 190]. İzumi-Nagai ve ark. C57BL/J6 ırkı fareler üzerinde lazerle indüklenmiş koroidal neovaskülarizasyon (KNV) modeli üzerindeki çalışmalarında astaksantin KNV üzerinde belirgin supresyon gösterdiğini, KNV bölgesine makrofaj infiltrasyonunu azalttığını ve RPE-koroid kompleksinden inflamasyonla ilişkili moleküllerin salınımını azalttığını göstermişlerdir [41]. Aynı çalışmanın hücre kültürü incelemelerinde ise kültürdeki makrofaj, RPE hücreleri ve mikrovasküler endotel hücrelerinden de inflamatuvar molekül salınımının azaldığı görülmüştür. Buna ek olarak astaksantin tedavisinin nükleer faktör κ -B aktivasyonunun da in vivo ve in vitro olarak inhibe edildiği gösterilmiştir. KNV induksiyonu sonrasında up-regüle olan inflamasyon ilişkili maddeler olan VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, IL-6, ICAM-1 e MCP-1 astaksantin ile suprese edilmiştir. Sun ve ark. insan retina pigment epitel kökenli ARPE-19 hücre kültürü çalışmalarında astaksantin, lutein ve eikozapentaeonik asit (EPA) ileri glikasyon son ürünlerine (AGE), VEGF mRNA up-regülasyonuna ve matriks metalloproteinazlarına karşı inhibe edici etkinlikleri oluştunu ortaya koymuşlardır [190]. Bu basamakların diyabetik retinopati patogeneğinde önemli rolleri bulunmaktadır. Çalışmamızda gözlemlediğimiz antiproliferatif etkide astaksantin VEGF üzerindeki baskılayıcı etkisinin rolü olduğunu düşünmekteyiz.

Astaksantin oküler dokular ve diğer sistemler üzerindeki biyolojik aktiviteleri arasında antiinflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik ve antikarsinojenik, antianjiyogenik, nöroprotektif, immün modülatör, antidiyabet ve antiobezite etkileri olduğu literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [191-193].

Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, oküler neovaskülarizasyon oluşumunda birbiriyle iç içe geçmiş birçok mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmaların önemli bir basamağını oksidatif strese bağlı mediatörlerin hücrenin çeşitli yapıları üzerinde yarattığı hasar oluşturmaktadır. Astaksantin antioksidan etkileri üzerine yapılan araştırmalar incelendiğinde, diğer karotenoidlerle yapılan kıyaslamada lutein, kantaksantin ve β -karotenden 10, α -tokoferolden 100 kat fazla antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmektedir [194]. Serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyerek çeşitli hücre tiplerini oksidatif hasardan koruduğu bildirilmektedir [41, 195, 196]. Bu etkiyi gerçekleştiren yapı asktaksantin molekülünün her iki ucundaki fonksiyonel okso gruplarıdır. Molekülün hücre zarındaki özel pozisyonu hücre membranını stabilize ederken, aynı zamanda hücre içi ve hücre dışında fonksiyon gösterebilmesini sağlamaktadır (Şekil-2). Bu özel pozisyon, β -karoten ve Vitamin C gibi çift katlı lipid tabaka arasında kalan antioksidanlara göre astaksantin daha güçlü etkinlik göstermesini açıklamaktadır. Hücre zarına yerleşen astaksantin, serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi, zincir reaksiyonların önlenmesi, lipid peroksidasyonunun inhibe edilerek membran yapısının korunması, immün yanıtın güçlendirilmesi ve çeşitli gen ekspresyonlarının regülasyonu gibi görevleri gerçekleştirir [128]. Diyetine astaksantin eklenen ratlarda katalaz, süperoksid dismutaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin plazma ve karaciğer düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir [197]. Astaksantin antioksidan etkileri aynı zamanda DNA hasarını azaltıcı özellikler göstermektedir. Guanozin en kolay okside olan nükleoziddir ve bu nedenle guanozine elektron transferi gerçekleştiğinde hızlı bir şekilde guanozin radikalleri birikerek nükleozid oksidasyonuna sebep olur [130]. Astaksantin okside guanozin miktarını azaltarak ve oluşumunu engelleyerek DNA hasarını azaltmaktadır.

Çalışmamızda astaksantin uygulanan gruplarda antiproliferatif etkilerin yanı sıra, elektron mikroskopide mitokondrilerin oksijene tabi tutulan diğer gruplara göre daha az hasarlandığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra apoptotik hareket yüksek doz astaksantin uyguladığımız grupta daha düşük saptanmıştır. Bu bulgular astaksantin antioksidatif etkilerini ve bunun sonucu olarak gelişen anti apoptotik ve sitoprotektif etkilerini destekler niteliktedir.

Anjiyogenezi ve apoptozu tetikleyen önemli faktörlerden biri de inflamatuvar süreç ve bu süreçte üretilen çeşitli sitokinlerdir. Astaksantin çeşitli mekanizmalar üzerinden antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bilinmektedir. Astaksantin lipopolisakkarid (LPS) ile stimüle edilmiş RAW264.7 hücrelerinde (makrofaj orijinli hücreler) ve primer

makrofajlarda, nükleer faktör- κ B (indüklenebilir nitrik oksid sentaz için önemli bir transkripsiyon faktörü) supresyonu yaparak inflamatuvar mediatör ve sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [198]. Choi ve ark. astaksantin LPS ile stimüle edilmiş BV2 mikroglial hücrelerde indüklenebilir nitrik oksid sentaz ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir [199]. Astaksantin nitrik oksid üzerindeki bu baskılayıcı etkisi, nitrik okside bağlı inflamasyonun ön planda olduğu sepsis, romatoid artrit, ateroskleroz gibi hastalıklarda önemli uygulamaları olabileceğini işaret etmektedir.

Bolin ve ark. yürüttükleri çalışmada astaksantin insan lenfositleri üzerinde ilginç antiinflamatuvar özellikler gösterdiğini izlemişlerdir [200]. Astaksantin lenfositlerin redoks-duyarlı ve fonksiyonel yapılarını etkilemeden süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini azaltmış, ayrıca süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini artırarak lipid ve proteinlerdeki oksidatif hasarı azaltmıştır. Macedo ve ark. ise astaksantin nötrofillerden salınan TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri azalttığını, nötrofillerin fagositik ve mikrobisidal aktivitelerini artırdığını göstermişlerdir [129]. Prematüre retinopatisi Faz-II gelişiminde inflamatuvar mediatörler önem kazanmıştır. Prematüre retinopatisi (PR) gelişen gözlerde postnatal 0-3. günde sistemik interlökin (IL)-6 ve C-reaktif protein seviyelerinin yüksek, nörotrofin-4 ve IL-17 seviyelerinin düşük seyrettiği, postnatal 7-21. gün IL-18 seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür [3]. PR olgularında intravitreal 27 sitokin seviyesi taranmış ve özellikle IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, eotaksin, FBGF, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interferon- γ -inducible protein-10, COX gibi faktörlerin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca COX-2'nin iskemik retinopatide Prostoglandin-2 üzerinden preretinal neovaskülarizasyonun gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [4]. Prematüre bebeklerde sistemik veya intraoküler astaksantin tedavisinin antiinflamatuvar ve/veya antiproliferatif etkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda OER in vivo fare modelinde intravitreal astaksantin uyguladığımız gruplarda ışık mikroskopide hücresel hasarın izlenmemesi ve apoptotik harekette azalma literatür verilerini desteklemektedir.

Astaksantin oküler dokular üzerinde çeşitli olumlu etkiler göstermektedir. Ohgami ve ark. endotoksinle indüklenmiş üveit modelinde astaksantin doza bağımlı antiinflamatuvar etki gösterdiğini belirtmişlerdir [7]. Bu antiinflamatuvar etki NO, PGE-2 ve TNF- α supresyonu ile gerçekleşmiştir. Ayrıca yazarlar 100 mg/kg dozundaki astaksantin 10 mg/kg prednisolon kadar güçlü etkinlik gösterdiğini saptamışlardır. Bunu takip eden çalışmalarında ise Suzuki ve ark. yine endotoksinle indüklenmiş üveit modelinde

astaksantinin proinflamatuvar faktörleri down-regüle ederek ve NF- κ B sinyal yolunu inhibe ederek oküler inflamasyonu azalttığını göstermişlerdir [8]. Astaksantin triptofan rezidüleri ve β -kristalin üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu bulunmuştur [201]. Lens kristalinlerini oksidatif hasara ve kalsiyumla indüklenen kalpainle oluşan degradasyona karşı koruduğu belirtilmektedir. Buna ek olarak Liao ve ark. astaksantin, lenste birikimi direkt olarak katarakt oluşumuna yol açan selenitle interaksiyona girdiğini ve ratlarda selenitle ilişkili kataraktogeneze karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir [202]. Nakajima ve ark. astaksantin retinal ganglion hücreleri üzerindeki oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkileri olduğunu belirtmektedirler [203]. Dong ve ark. diyabetik retinopati fare modelinde astaksantin rat retinal ganglion hücre kültüründe H₂O₂ ile indüklenen apoptozu inhibe ettiğini ve oksidatif stres kaynaklı hücresel disfonksiyonu azalttığını göstermişlerdir [186]. Bununla birlikte Çört ve ark. reaktif oksijen türlerinin apoptotik hücre ölümüne etkisini vurgulayarak, astaksantin okside edici ajanlarla indüklenen retina hasarı üzerinde koruyucu etkinliği olduğu sonucuna ulaşmışlardır [204]. Çalışmamızda da benzer şekilde astaksantin uygulanan grupta gözlenen antiapoptotik etkinin molekülün antioksidatif özelliklerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda OER modelinde C57BL/J6 fare ırkında astaksantin ile retinal endotelial hücre proliferasyonunun 10 μ g/ml IVA ile %77,49 ve 100 μ g/ml IVA ile %76,61 baskılandığı gösterilmiştir. Önceki çalışmalarımızda retinal endotelial hücre proliferasyonunun baskınma oranı 0.625 μ g intravitreal bevacizumab (IVB) ile %67, 20 μ g intravitreal triamsinolon (IVTA) ile %92, 1.25 μ g IVB ile %93, 2.5 μ g IVB ile %97 ve 40 μ g IVTA ile %95 olarak saptanmıştır [205, 206]. Sunulan çalışmada astaksantin molekülünün VEGF üzerindeki inhibe edici etkisinin yanı sıra yukarıda bahsedilen anjiyogenez sürecinde rol alan birçok sinyal yolu üzerinde gösterdiği etkilerinin de rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, pigmente dokuya sahip olan C57BL/J6 fare ırkında OER modelinde 10 ve 100 μ g/ml IV astaksantin ışık mikroskopik incelemede retina katmanlarında histolojik kesitlerde morfolojik hasar yaratmadığı ve hücre bütünlüğünü bozmadığı görülmüştür. Bu bulgunun astaksantin hücre zarı üzerinde stabilize edici, antiinflamatuvar ve sitoprotektif etkilerinden kaynaklanabileceği akla gelmektedir. Düşük ve yüksek doz uygulanan gruplar arasında morfolojik hasar açısından anlamlı fark izlenmemiştir. Literatürde henüz yeterli sayıda oküler veya intravitreal astaksantin uygulaması ile in vivo ve/veya in vitro çalışmalar mevcut değildir. Biz intravitreal uygulama dozunu hesaplarken İzumi-Nagai ve

ark. hücre kültürü çalışmalarında kullandıkları 150 mikromolar (100 µg/ml) dozunu yüksek doz olarak belirledik [41]. Ancak etkin doz ve yan etki profili analizi için prospektif intravitreal astaksantin uygulamasını içeren farmakokinetiğe yönelik çalışmalarda dozların incelenmesi gerekmektedir.

Oksijen endükte retinopati modelinde hiperoksi deprivasyonu dokuda relatif hipoksiye neden olmakta ve oluşan hipoksi mitokondrilerde şişme, krista fragmantasyonu, matriks kondansasyonu, iç/dış membran ayrılmasına neden olmaktadır [189]. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak oksijen endükte retinopati grubunu oluşturan kontrol grubunda (Grup-C ve -D) elektron mikroskopik ultrastrüktürel morfolojik incelemede fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde 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. Mitokondrilerin iç yapısı fizyolojik aktiviteleri gereği veya stres sinyallerine, örneğin hipoksi, hiperoksi, tedavi amaçlı kullanılan ajanlar gibi, cevap olarak değişkenlik gösterir [207]. Oluşan stres seviyesi mitokondride morfolojik ve fonksiyonel değişikliği belirlemektedir. Oluşan değişiklikler hücrenin kurtulmasına veya apoptozise neden olur [208]. Yapılan çeşitli hücre kültürü çalışmalarında astaksantin oksidatif stres durumunda hücre sağkalımını artırdığı gösterilmiştir [196]. Yazarlar hücre kültürü ortamına eklenen Antimycin A molekülü ile mitokondriyal serbest oksijen radikali üretimi artırıldıktan sonra astaksantin eklenmesinin mitokondride endojen oksijen radikali üretimini azalttığı ve mitokondrinin membran fonksiyonunu koruduğunu belirtmişlerdir. Astaksantin etkileri bunun da ötesine geçerek mitokondride serbest oksijen radikali oluşumunu artırmadan oksijen tüketimini artırarak mitokondriyal aktiviteyi arttırmıştır. Bu in vitro etkileri sağlayan doz (100-800 nM/L) insanlarda diyet desteği ile sağlanabilmektedir. Çalışmamızda IVA uygulanan grupta oksijene tabi tutulan kontrol gruplarına göre mitokondriyal değişikliklerin daha az yoğunlukta izlenmesi, astaksantin mitokondriler üzerindeki koruyucu etkisini in vivo olarak da göstermesi açısından literatüre katkı sunacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda apoptotik hücre ölümünü incelemek için TUNEL-çalışması uygulanmıştır. Negatif kontrol grubunda ve oksijene tabi tutulmuş kontrol gruplarında apoptozis görülmemiştir. Diğer taraftan, yüksek doz astaksantin uygulanan grupta apoptotik aktivitede oksijene tabi tutulmuş kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde azalma dikkat çekicidir. Önceki çalışmamızda intravitreal bevacizumab sonrası apoptotik aktivite, oksijene tabi

tutulan gruplar ve bevacizumab enjeksiyonu yapılan gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir [205]. Bu bulgu astaksantin anti proliferatif etkisinin yanı sıra anti apoptotik etkisini göstermesi açısından önem arz etmektedir.

Apoptosis genetik ağdan oluşan koordine programlı hücre ölümü olarak tarif edilmektedir. Yeni geliştirilen antianjiyogenik ve kanser tedavileri kapsamında önemli yer almaktadır. Apoptosis 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 [209]. Astaksantin mitokondriyal yoldan ve oksidatif hasara bağlı oluşan apoptoz ve nekroptoz üzerinde inhibe edici özellikleri literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [186, 210].

Yüksek doz IVA enjeksiyonu uyguladığımız grupta apoptotik hücre ölümünün diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. IVA enjeksiyonu uygulanan gruplarda apoptozis ile mitokondriyal dismorfolojinin kontrol grubuna göre daha az yoğunlukta olduğu 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 [205]. Çalışmamızda negatif kontrol grubunda ve kontrol grubunda TUNEL çalışması ile fizyolojik apoptozis gözlemlenmiştir.

Astaksantin etkisine bağlı apoptotik harekette artış izlenmemiştir. Bunun ötesinde, yüksek doz astaksantin uyguladığımız grupta oksijene tabi tutulan kontrol gruplarına göre apoptozis anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Literatürde astaksantin antiapoptotik etkileri tarandığında, insan alveolar epitel hücre kültürü üzerinde yapılan bir araştırmada astaksantin hidrojen peroksite bağlı apoptozu bloke ettiği, mitokondriyal ve hücre morfolojiyi koruduğu gösterilmiştir [209]. Ayrıca astaksantin apoptotik proteinlerin translokasyonunu ve sitokrom c salınımını inhibe etmiştir. Bunun yanında kaspaz-9, kaspaz-3, Nrf-2 düzeylerini düşürdüğü ve başka sitoprotektif genleri de aktive ettiği gösterilmiş, sonuç olarak reaktif oksijen metabolitlerine bağlı mitokondriyal sinyal yolunu etkili şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir. Anti-apoptotik protein olan Bcl-2 dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü sağlayarak sitokrom c salınımını engeller. Pro-apoptotik proteinler olan Bax ve Bad ise sitokrom c salınımını sağlar. Astaksantin etkisini Bax ve Bad'nin sitozolden mitokondriye geçişini, Bcl-2'nin de mitokondriden sitozole geçişini bloke ederek göstermektedir. Li ve ark. hepatik iskemi-reperfüzyon ilişkili apoptozis çalışmalarında

astaksantinin apoptozis ve otofajiyi inhibe ettiklerinin göstermişlerdir [210]. Astaksantin anti-apoptotik etkisini reaktif oksijen metabolitlerini ve TNF- α 'yı azaltıp P38 MAPK (mitojen aktive protein kinaz) yolunu inhibe ederek gösterdiğini gözlemlemişlerdir. P38 fosforile olduğunda kaspaz-8 aktivasyonu ve Bax aktivasyonu yaparak mitokondriyal permeabiliteyi artırarak sitokrom C salınımına ve apoptoz tetiklenmesine neden olmaktadır. Bu aktivasyonu sağlayan oksidatif stres faktörleri azaldığında ise Bcl-2'nin sitoprotektif etkisi artmaktadır. Bir başka çalışmada astaksantin nöröal progenitör hücreler üzerindeki antiapoptotik etkiler araştırılmış ve kısa vadede anti-apoptotik etkilerinin olduğu vurgulanmıştır [211]. Astaksantin kaspaz-3 ve 9 aktivitelerinde inhibisyon, P38 ve Bax gibi apoptotik markırlarda azalma ve hücrenin ATP sentezinde artış sağlamıştır. Guo ve ark. ratlarda ciddi yanık sonrasında astaksantin akut böbrek hasarı ve mitokondri ilişkili apoptoz üzerine etkilerini incelemişlerdir [212]. Çalışmalarında astaksantin dozunu artırdıkça apoptotik renal hücrelerin sayısında azalma ve tübüler apoptozda azalma gözlemlemişlerdir. Bu etkinin PI3K/Akt sinyal yolu üzerinden mitokondriyal sinyal mekanizmalarının inhibisyonu ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Astaksantin Akt ve Bad fosforilasyonunu artırdığını, bunun da sitokrom C ve kaspaz-3 ve 9 düzeylerinde azalma sağladığını göstermişlerdir. Ayrıca TUNEL tekniği ile yanık ilişkili akut böbrek hasarını mitokondri ilişkili apoptozu regüle ederek azalttığı gösterilmiştir [212]. Çalışmamızda uyguladığımız TUNEL tekniği ile apoptozis analizinde yüksek doz intravitreal astaksantin uyguladığımız grupta oksijene tabi tutulan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında azalmış apoptotik aktivite görülmüştür. Bu bulgu literatür bilgileri ile uyumluluk göstermektedir.

Astaksantin oküler dokular üzerindeki antiapoptotik etkileri incelendiğinde retinal gangliyon hücreleri ve retina pigment epitel hücreleri üzerinde antiapoptotik etkileri olduğu görülmektedir. Yamagishi ve ark. ganglion hücre kültüründe apoptoz ve nekrozu tetikleyen 3 stres faktörü uygulamışlardır: glutamatla indüklenen nörotoksisite, hipoksik ve oksidatif stres. 100 nM astaksantin bu üç stresöre karşı retina ganglion hücrelerinin sağkalımını anlamlı ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Bu stresörlerin aynı zamanda glokom ve nörodejeneratif süreçlerde rol aldığı hatırlatılmıştır. Bir başka çalışmada ışıkla indüklenen retinal hasara karşı astaksantin etkileri incelenmiş ve fotoreseptörler üzerindeki oksidatif stresi azaltarak antiapoptotik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Buradan yola çıkarak retinitis pigmentosa ve kuru tip yaşa bağlı maküla dejenerasyonunda etkili olabileceği vurgulanmıştır [187]. Dong ve ark. Tip-2 diyabet fare modeli üzerinde astaksantin retinal ganglion hücreleri üzerinde oksidatif strese bağlı apoptozu azalttığını bildirmişlerdir [186].

Çalışmada astaksantin osilatuar potansiyellerde artış sağladığı gösterilmiştir. Oksidatif stresin Bcl-2, Bad ve kaspaz-3 düzeyleri üzerindeki etkilerinin astaksantin ile geri döndürülebildiği izlenmiştir ve diyabetik retinopati tedavisinde yeri olabileceğini belirtmişlerdir. Bir başka araştırmada ise astaksantin ARPE-19 hücre kültüründe hidrojen peroksit ile indüklenen hücre hasara karşı antioksidatif ve antiapoptotik etkileri gösterilmiştir [210]. Bu etkiyi birden fazla yol üzerinden sağladığını belirtmektedirler (ERK, NF-κB, PI3K/Akt).

Çalışmamızda astaksantin 100 µg/ml intravitreal olarak uyguladığımız gruptaki azalmış apoptotik etki, astaksantin yukarıda bahsedilen antiapoptotik etkilerine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan hiperoksi ile oluşan mitokondriyal hasarın, intravitreal astaksantin enjekte edilen gruplarda dozdan bağımsız olarak azalması, astaksantin mitokondriyal protektif etkisinin in vivo olarak gösterilmesi bağlamında önemli bir sonuç oluşturmaktadır. Modelimizde hiperoksi ve hiperoksi deprivasyonu ile oluşturulan hücre stres özellikle mitokondriler üzerinde ROS aracılığı ile oksidatif stres cevabına ve dismorfolojik bulgulara yol açmaktadır [207]. Astaksantin antioksidatif ve antiinflamatuvar etkilerinin çeşitli mekanizmalarla hücre ve mitokondriyal stresi azaltarak bu dismorfolojik bulguların önüne geçtiği görülmektedir. Bulgularımız astaksantin oksidatif yollardan ve mitokondriyal yollardan uyarılan apoptozis üzerindeki inhibe edici etkisini doğrulamaktadır. Bu etkileşim kültür bazında endotelial hücreler üzerinde prospektif incelenmelidir.

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 [213]. 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 saliverilmesi yoluyla da gerçekleşir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden saliverilen granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktiveştirmesidir [214, 215].

Bu bilgiler doğrultusunda OER fare modelinde neovaskularizasyonun anlamlı düzeyde baskılanması büyüme faktörünün astaksantin tarafından çeşitli mekanizmalarla baskılanması nedeni ile olmakla birlikte astaksantin anti-apoptotik, antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkisinden kaynaklanabilmektedir.

Sonuç olarak astaksantin OER fare modelinde neovaskularizasyonu anlamlı düzeyde baskılamaktadır. Morfolojik incelemede hücresel bazda toksik etkisinin olmadığı, ultrastrüktürel incelemede mitokondriler üzerine koruyucu etkileri olduğu ve TUNEL çalışmasında apoptozisi azalttığı tespit edilmiştir. Farklı dozlarda ve dokularda ilaç etkisi, doz etkisi ve farmakokinetik analiz için prospektif randomize kliniğe yönelik deneysel çalışmalar gerekmektedir.

6. REFERANSLAR

1. Andreoli, C.M. and J.W. Miller, Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol*, 2007. 18(6): p. 502-8.
2. Sennlaub, F., et al., Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation*, 2003. 108(2): p. 198-204.
3. Sood, B.G., et al., Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res*, 2010. 67(4): p. 394-400.
4. Sato, T., et al., Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*, 2009. 116(11): p. 2165-9.
5. Schlingemann, R.O. and A.N. Witmer, Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Prog Brain Res*, 2009. 175: p. 253-67.
6. Gariano, R.F. and T.W. Gardner, Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, 2005. 438(7070): p. 960-6.
7. Ohgami, K., et al., Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. 44(6): p. 2694-701.
8. Suzuki, Y., et al., Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Exp Eye Res*, 2006. 82(2): p. 275-81.

9. Gariano, R.F., M.L. Iruela-Arispe, and A.E. Hendrickson, Vascular development in primate retina: comparison of laminar plexus formation in monkey and human. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. 35(9): p. 3442-55.
10. Provis, J.M., Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res*, 2001. 20(6): p. 799-821.
11. Hughes, S., H. Yang, and T. Chan-Ling, Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. 41(5): p. 1217-28.
12. Carmeliet, P. and R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 249-57.
13. Chen, J. and L.E. Smith, Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*, 2007. 10(2): p. 133-40.
14. Terry, T.L., Extreme Prematurity and Fibroblastic Overgrowth of Persistent Vascular Sheath Behind Each Crystalline Lens*. *American Journal of Ophthalmology*. 25(2): p. 203-204.
15. Campbell, K., Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia; a clinical approach. *Med J Aust*, 1951. 2(2): p. 48-50.
16. Patz, A. and A.B. Eastham, Oxygen studies in retrolental fibroplasia. VI. The effect of concentration and duration of exposure to oxygen on the immature mouse eye. *Am J Ophthalmol*, 1957. 44(4 Pt 2): p. 110-5; discussion 115-8.
17. Ashton, N., B. Ward, and G. Serpell, Role of oxygen in the genesis of retrolental fibroplasia; a preliminary report. *Br J Ophthalmol*, 1953. 37(9): p. 513-20.
18. Nicolaidis, K.H., D.L. Economides, and P.W. Soothill, Blood gases, pH, and lactate in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*, 1989. 161(4): p. 996-1001.

19. Chen, J., et al., Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 526-33.
20. Chen, J., et al., Suppression of retinal neovascularization by erythropoietin siRNA in a mouse model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(3): p. 1329-35.
21. Pierce, E.A., et al., Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(3): p. 905-9.
22. Pierce, E.A., E.D. Foley, and L.E. Smith, Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*, 1996. 114(10): p. 1219-28.
23. Gu, X., et al., Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 285(3): p. C546-54.
24. Smith, L.E., Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res*, 2004. 14 Suppl A: p. S140-4.
25. Chan-Ling, T., B. Gock, and J. Stone, The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. 36(7): p. 1201-14.
26. Kim, J.H., et al., Deguelin inhibits retinal neovascularization by down-regulation of HIF-1alpha in oxygen-induced retinopathy. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(6A): p. 2407-15.
27. Brafman, A., et al., Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP801-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. 45(10): p. 3796-805.
28. Olofsson, B., et al., Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(20): p. 11709-14.

29. Eriksson, U. and K. Alitalo, Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999. 237: p. 41-57.
30. Ferrara, N., Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)*, 1999. 77(7): p. 527-43.
31. Persico, M.G., V. Vincenti, and T. DiPalma, Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999. 237: p. 31-40.
32. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997. 18(1): p. 4-25.
33. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999. 237: p. 1-30.
34. Qazi, Y., S. Maddula, and B.K. Ambati, Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet*, 2009. 88(4): p. 495-515.
35. Stone, J. and J. Maslim, Mechanisms of retinal angiogenesis. *Progress in Retinal and Eye Research*, 1997. 16(2): p. 157-181.
36. Wu, W.C., et al., Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in taiwan. *Ophthalmology*, 2011. 118(1): p. 176-83.
37. Spandau, U., et al., Time to consider a new treatment protocol for aggressive posterior retinopathy of prematurity? *Acta Ophthalmol*, 2013. 91(2): p. 170-5.
38. Hoerster, R., et al., Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in an infant treated with ranibizumab for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol*, 2013. 91(1): p. e74-5.

39. Matsuyama, K., et al., Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Br J Ophthalmol*, 2010. 94(9): p. 1215-8.
40. Sato, T., et al., Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol*, 2012. 153(2): p. 327-333 e1.
41. Izumi-Nagai, K., et al., Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaxanthin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(4): p. 1679-85.
42. Langford, K., K. Nicolaides, and J.P. Miell, Maternal and fetal insulin-like growth factors and their binding proteins in the second and third trimesters of human pregnancy. *Hum Reprod*, 1998. 13(5): p. 1389-93.
43. Hellstrom, A., et al., Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(10): p. 5804-8.
44. Hellstrom, A., et al., IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(7): p. 3413-6.
45. Vanhaesebrouck, S., et al., Oxygen-induced retinopathy in mice: amplification by neonatal IGF-I deficit and attenuation by IGF-I administration. *Pediatr Res*, 2009. 65(3): p. 307-10.
46. Olofsson, B., et al., Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem*, 1996. 271(32): p. 19310-7.
47. Nicosia, R.F., What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol*, 1998. 153(1): p. 11-6.

48. Rakic, J.M., et al., Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. 44(7): p. 3186-93.
49. Lutun, A., M. Tjwa, and P. Carmeliet, Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 979: p. 80-93.
50. Nagy, J.A., A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 2003. 13(5): p. 169-75.
51. Michels, S., U. Schmidt-Erfurth, and P.J. Rosenfeld, Promising new treatments for neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006. 15(7): p. 779-93.
52. Cao, Y., Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci Signal*, 2009. 2(59): p. re1.
53. Adini, A., et al., Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*, 2002. 62(10): p. 2749-52.
54. Yonekura, H., et al., Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem*, 1999. 274(49): p. 35172-8.
55. Bae, D.G., et al., Anti-flt1 peptide, a vascular endothelial growth factor receptor 1-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(7): p. 2651-61.
56. Jacobson, L.O., et al., Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, 1957. 179(4560): p. 633-4.
57. Watanabe, D., et al., Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 2005. 353(8): p. 782-92.

58. Ishibashi, T., J.A. Koziol, and S.A. Burstein, Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro. *J Clin Invest*, 1987. 79(1): p. 286-9.
59. Sawyer, S.T., S.B. Krantz, and K. Sawada, Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood*, 1989. 74(1): p. 103-9.
60. Anagnostou, A., et al., Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(15): p. 5978-82.
61. Carlini, R.G., et al., Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int*, 1993. 43(5): p. 1010-4.
62. Carlini, R.G., A.A. Reyes, and M. Rothstein, Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int*, 1995. 47(3): p. 740-5.
63. Digicaylioglu, M., et al., Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(9): p. 3717-20.
64. Gogusev, J., et al., Effect of erythropoietin on DNA synthesis, proto-oncogene expression and phospholipase C activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 199(2): p. 977-83.
65. Heberlein, C., et al., The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonal stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol Cell Biol*, 1992. 12(4): p. 1815-26.
66. Kimata, H., et al., Human recombinant erythropoietin directly stimulates B cell immunoglobulin production and proliferation in serum-free medium. *Clin Exp Immunol*, 1991. 85(1): p. 151-6.

67. Masuda, S., et al., Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem*, 1993. 268(15): p. 11208-16.
68. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, 1990. 248(4953): p. 378-81.
69. Grimm, C., et al., HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*, 2002. 8(7): p. 718-24.
70. Junk, A.K., et al., Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(16): p. 10659-64.
71. Konishi, Y., et al., Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res*, 1993. 609(1-2): p. 29-35.
72. Sakanaka, M., et al., In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(8): p. 4635-40.
73. Siren, A.L., et al., Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(7): p. 4044-9.
74. Krantz, S.B., Erythropoietin. *Blood*, 1991. 77(3): p. 419-34.
75. Shannon, K.M., et al., Recombinant human erythropoietin in the anemia of prematurity: results of a placebo-controlled pilot study. *J Pediatr*, 1991. 118(6): p. 949-55.
76. Gumy-Pause, F., et al., Stepping up versus standard doses of erythropoietin in preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatr Hematol Oncol*, 2005. 22(8): p. 667-78.

77. Brown, M.S., et al., Association between higher cumulative doses of recombinant erythropoietin and risk for retinopathy of prematurity. *J AAPOS*, 2006. 10(2): p. 143-9.
78. Shah, N., et al., The effect of recombinant human erythropoietin on the development of retinopathy of prematurity. *Am J Perinatol*, 2010. 27(1): p. 67-71.
79. Aher, S.M. and A. Ohlsson, Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(3): p. CD004865.
80. Ohlsson, A. and S.M. Aher, Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(3): p. CD004863.
81. Christopherson, K.S. and D.S. Bredt, Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*, 1997. 100(10): p. 2424-9.
82. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 323-50.
83. Nathan, C., Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*, 1997. 100(10): p. 2417-23.
84. Kermorvant-Duchemin, E., et al., Understanding ischemic retinopathies: emerging concepts from oxygen-induced retinopathy. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 51-60.
85. Granstam, E. and S.O. Granstam, Regulation of uveal and retinal blood flow in STZ-diabetic and non-diabetic rats; involvement of nitric oxide. *Curr Eye Res*, 1999. 19(4): p. 330-7.
86. Schmetterer, L. and K. Polak, Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res*, 2001. 20(6): p. 823-47.

87. Dawson, T.M., et al., Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(17): p. 7797-801.
88. Iadecola, C., Nitric oxide participates in the cerebrovasodilation elicited from cerebellar fastigial nucleus. *Am J Physiol*, 1992. 263(5 Pt 2): p. R1156-61.
89. Morbidelli, L., et al., Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*, 1996. 270(1 Pt 2): p. H411-5.
90. Wu, H.M., et al., VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol*, 1996. 271(6 Pt 2): p. H2735-9.
91. Brooks, S.E., et al., Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(1): p. 222-8.
92. He, T., et al., Inducible nitric oxide synthase mediates hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1 alpha activation and vascular endothelial growth factor expression in oxygen-induced retinopathy. *Pathobiology*, 2007. 74(6): p. 336-43.
93. Tabrizchi, R. and S. Bedi, Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther*, 2001. 91(2): p. 133-47.
94. Dusseau, J.W. and P.M. Hutchins, Hypoxia-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membranes: a role for adenosine. *Respir Physiol*, 1988. 71(1): p. 33-44.
95. Grant, M.B., et al., Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res*, 1999. 85(8): p. 699-706.
96. Luty, G.A., C. Merges, and D.S. McLeod, 5' nucleotidase and adenosine during retinal vasculogenesis and oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. 41(1): p. 218-29.

97. Fischer, S., et al., Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. 28(1): p. 141-8.
98. Grant, M.B., et al., Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(9): p. 2068-73.
99. Takagi, H., et al., Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. 37(7): p. 1311-21.
100. Takagi, H., et al., Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. 37(11): p. 2165-76.
101. Kreutzberg, G.W. and S.T. Hussain, Cytochemical heterogeneity of the glial plasma membrane: 5'-nucleotidase in retinal Muller cells. *J Neurocytol*, 1982. 11(1): p. 53-64.
102. Luty, G.A. and D.S. McLeod, Retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy: a role for adenosine. *Prog Retin Eye Res*, 2003. 22(1): p. 95-111.
103. Devic, E., et al., Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev*, 1999. 84(1-2): p. 199-203.
104. Cox, C.M., et al., Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol*, 2006. 296(1): p. 177-89.
105. Kasai, A., et al., Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 325(2): p. 395-400.

106. Sorli, S.C., et al., Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*, 2007. 26(55): p. 7692-9.
107. Kasai, A., et al., Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(11): p. 2182-7.
108. Eyries, M., et al., Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*, 2008. 103(4): p. 432-40.
109. Zhang, Y., et al., Apelin in epiretinal fibrovascular membranes of patients with retinopathy of prematurity and the changes after intravitreal bevacizumab. *Retina*, 2013. 33(3): p. 613-20.
110. Cekmez, F., et al., Correlation between cord blood apelin and IGF-1 levels in retinopathy of prematurity. *Biomark Med*, 2012. 6(6): p. 821-5.
111. Tao, Y., et al., Apelin in plasma and vitreous and in fibrovascular retinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(8): p. 4237-42.
112. Guo, K., et al., Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol Rep*, 2009. 22(4): p. 825-30.
113. Weil, J., et al., Norepinephrine upregulates vascular endothelial growth factor in rat cardiac myocytes by a paracrine mechanism. *Angiogenesis*, 2003. 6(4): p. 303-9.
114. Steinle, J.J., F.C. Cappocia, Jr., and Y. Jiang, Beta-adrenergic receptor regulation of growth factor protein levels in human choroidal endothelial cells. *Growth Factors*, 2008. 26(6): p. 325-30.
115. Jiang, Y., et al., Application of isoproterenol inhibits diabetic-like changes in the rat retina. *Exp Eye Res*, 2010. 91(2): p. 171-9.

116. Ristori, C., et al., Role of the adrenergic system in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: antiangiogenic effects of beta-adrenoreceptor blockade. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. 52(1): p. 155-70.
117. Praveen, V., et al., Infantile hemangiomas and retinopathy of prematurity: possible association. *Pediatrics*, 2009. 123(3): p. e484-9.
118. Sickel, W., Electrical and metabolic manifestations of receptor and higher-order neuron activity in vertebrate retina. *Adv Exp Med Biol*, 1972. 24(0): p. 101-18.
119. Qanungo, S. and M. Mukherjea, Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem*, 2000. 215(1-2): p. 11-9.
120. Rivera, J.C., et al., Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis. *Neonatology*, 2011. 100(4): p. 343-53.
121. Ates, O., et al., Oxidative DNA damage in retinopathy of prematurity. *Eur J Ophthalmol*, 2009. 19(1): p. 80-5.
122. Hartnett, M.E., The effects of oxygen stresses on the development of features of severe retinopathy of prematurity: knowledge from the 50/10 OIR model. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 25-39.
123. Connor, K.M., et al., Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med*, 2007. 13(7): p. 868-73.
124. Bernatchez, P.N., S. Soker, and M.G. Sirois, Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem*, 1999. 274(43): p. 31047-54.
125. Hirano, Y., et al., Suppression of ICAM-1 in retinal and choroidal endothelial cells by plasmid small-interfering RNAs in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(1): p. 508-15.

126. Dimaio, T.A., et al., Attenuation of retinal vascular development and neovascularization in PECAM-1-deficient mice. *Dev Biol*, 2008. 315(1): p. 72-88.
127. Sato, T., et al., Comprehensive gene-expression profile in murine oxygen-induced retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 2009. 93(1): p. 96-103.
128. Ambati, R.R., et al., Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Mar Drugs*, 2014. 12(1): p. 128-52.
129. Macedo, R.C., et al., Astaxanthin addition improves human neutrophils function: in vitro study. *Eur J Nutr*, 2010. 49(8): p. 447-57.
130. Edge, R., et al., Reduction of oxidized guanosine by dietary carotenoids: a pulse radiolysis study. *Arch Biochem Biophys*, 2010. 504(1): p. 100-3.
131. International Committee for the Classification of Retinopathy of, P., The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*, 2005. 123(7): p. 991-9.
132. Fierson, W.M., et al., Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics*, 2013. 131(1): p. 189-95.
133. Mintz-Hittner, H.A., et al., Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*, 2011. 364(7): p. 603-15.
134. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 653-60.
135. Bergers, G., et al., Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 2003. 111(9): p. 1287-95.
136. Grant, M.B., et al., The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs*, 2004. 13(10): p. 1275-93.

137. Simo, R., et al., Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*, 2006. 2(1): p. 71-98.
138. Pelikanova, T., [Pathogenesis of diabetic retinopathy]. *Vnitr Lek*, 2007. 53(5): p. 498-505.
139. Moussad, E.E. and D.R. Brigstock, Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab*, 2000. 71(1-2): p. 276-92.
140. Kuiper, E.J., et al., The angio-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One*, 2008. 3(7): p. e2675.
141. Bikfalvi, A. and Z.C. Han, Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia*, 1994. 8(3): p. 523-9.
142. Patel, J.I., et al., Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 2005. 89(4): p. 480-3.
143. Triebel, J., M. Huefner, and G. Ramadori, Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*, 2009. 161(2): p. 345-53.
144. Tawfik, A., et al., Suppression of retinal peroxisome proliferator-activated receptor gamma in experimental diabetes and oxygen-induced retinopathy: role of NADPH oxidase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(2): p. 878-84.
145. Starita, C., et al., Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997. 38(3): p. 762-7.
146. Roberts, W.G. and G.E. Palade, Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 6): p. 2369-79.

147. Schwesinger, C., et al., Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol*, 2001. 158(3): p. 1161-72.
148. Mori, K., et al., Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*, 2001. 188(2): p. 253-63.
149. Ogata, N., et al., Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*, 2002. 133(6): p. 851-2.
150. Amin, R., J.E. Puklin, and R.N. Frank, Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. 35(8): p. 3178-88.
151. Papapetropoulos, A., et al., Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1997. 100(12): p. 3131-9.
152. Lommatzsch, A., et al., Are low inflammatory reactions involved in exudative age-related macular degeneration? Morphological and immunohistochemical analysis of AMD associated with basal deposits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008. 246(6): p. 803-10.
153. Rehak, J. and M. Rehak, Branch retinal vein occlusion: pathogenesis, visual prognosis, and treatment modalities. *Curr Eye Res*, 2008. 33(2): p. 111-31.
154. Takahashi, K., et al., Formation of retinochoroidal collaterals in central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*, 1998. 126(1): p. 91-9.
155. Zhao, J., et al., Arteriovenous crossing patterns in branch retinal vein occlusion. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Ophthalmology*, 1993. 100(3): p. 423-8.

156. Green, W.R., et al., Central retinal vein occlusion: a prospective histopathologic study of 29 eyes in 28 cases. *Retina*, 1981. 1(1): p. 27-55.
157. Risk factors for central retinal vein occlusion. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Arch Ophthalmol*, 1996. 114(5): p. 545-54.
158. Prisco, D. and R. Marcucci, Retinal vein thrombosis: risk factors, pathogenesis and therapeutic approach. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002. 32(5-6): p. 308-11.
159. Lee, H.B., et al., Role of inflammation in retinal vein occlusion. *Can J Ophthalmol*, 2007. 42(1): p. 131-3.
160. Funk, M., et al., Intraocular concentrations of growth factors and cytokines in retinal vein occlusion and the effect of therapy with bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(3): p. 1025-32.
161. Ehlers, J.P. and S. Fekrat, Retinal vein occlusion: beyond the acute event. *Surv Ophthalmol*, 2011. 56(4): p. 281-99.
162. Green, L.S., et al., Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol*, 1995. 2(10): p. 683-95.
163. Gragoudas, E.S., et al., Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 2004. 351(27): p. 2805-16.
164. Krzystolik, M.G., et al., Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol*, 2002. 120(3): p. 338-46.
165. Rosenfeld, P.J., et al., Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2005. 112(6): p. 1048-53.

166. Bakri, S.J., et al., Six-month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina*, 2006. 26(5): p. 519-22.
167. Wu, L., et al., 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(1): p. 81-7.
168. Konner, J. and J. Dupont, Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer*, 2004. 4 Suppl 2: p. S81-5.
169. Papadopoulos, N., et al., Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*, 2012. 15(2): p. 171-85.
170. Stewart, M.W., Clinical and differential utility of VEGF inhibitors in wet age-related macular degeneration: focus on aflibercept. *Clin Ophthalmol*, 2012. 6: p. 1175-86.
171. Barik, S., Development of gene-specific double-stranded RNA drugs. *Ann Med*, 2004. 36(7): p. 540-51.
172. Sabbadini, R.A., Sphingosine-1-phosphate antibodies as potential agents in the treatment of cancer and age-related macular degeneration. *Br J Pharmacol*, 2011. 162(6): p. 1225-38.
173. Pechan, P., et al., Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene Ther*, 2009. 16(1): p. 10-6.
174. Stahl, A., et al., Highly potent VEGF-A-antagonistic DARPins as anti-angiogenic agents for topical and intravitreal applications. *Angiogenesis*, 2013. 16(1): p. 101-11.

175. Krishnan, L., E.C. Krishnan, and W.R. Jewell, Immediate effect of irradiation on microvasculature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1988. 15(1): p. 147-50.
176. Dugel, P.U., et al., Macular epiretinal brachytherapy in treated age-related macular degeneration: MERITAGE study: twelve-month safety and efficacy results. *Ophthalmology*, 2012. 119(7): p. 1425-31.
177. Sonpavde, G., T.E. Hutson, and C.N. Sternberg, Pazopanib, a potent orally administered small-molecule multitargeted tyrosine kinase inhibitor for renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008. 17(2): p. 253-61.
178. Kaiser, P.K., Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol*, 2006. 142(4): p. 660-8.
179. Luna, J., et al., Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab Invest*, 1996. 75(4): p. 563-73.
180. Choi, H.D., et al., Effects of astaxanthin on oxidative stress in overweight and obese adults. *Phytother Res*, 2011. 25(12): p. 1813-8.
181. Yuan, J.P., et al., Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res*, 2011. 55(1): p. 150-65.
182. Takahashi, K., et al., Uptake and distribution of astaxanthin in several tissues and plasma lipoproteins in male broiler chickens fed a yeast (*Phaffia rhodozyma*) with a high concentration of astaxanthin. *Br Poult Sci*, 2004. 45(1): p. 133-8.
183. Nishigaki, I., et al., Suppressive effect of astaxanthin on lipid-peroxidation induced in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 1994. 16(3): p. 161-166.
184. Zsila, F., et al., In vitro plasma protein binding and aqueous aggregation behavior of astaxanthin dilysinate tetrahydrochloride. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. 14(21): p. 5357-66.

185. Hashimoto, H., et al., Effects of astaxanthin on antioxidation in human aqueous humor. *J Clin Biochem Nutr*, 2013. 53(1): p. 1-7.
186. Dong, L.Y., et al., Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress. *Mar Drugs*, 2013. 11(3): p. 960-74.
187. Otsuka, T., et al., Protective effects of a dietary carotenoid, astaxanthin, against light-induced retinal damage. *J Pharmacol Sci*, 2013. 123(3): p. 209-18.
188. Remtulla, S. and P.E. Hallett, A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat. *Vision Res*, 1985. 25(1): p. 21-31.
189. Chantelau, E., A. Volaco, and R. Meyer-Schwickerath, New insights into the pathogenesis of diabetic retinopathy--hormonal rather than metabolic factors are important. *Vasa*, 2004. 33(4): p. 205-10.
190. Sun, Z., et al., Protective actions of microalgae against endogenous and exogenous advanced glycation endproducts (AGEs) in human retinal pigment epithelial cells. *Food Funct*, 2011. 2(5): p. 251-8.
191. Hussein, G., et al., Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull*, 2005. 28(1): p. 47-52.
192. Ikeuchi, M., et al., Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007. 71(4): p. 893-9.
193. Naito, Y., et al., Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors*, 2004. 20(1): p. 49-59.
194. Naguib, Y.M., Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem*, 2000. 48(4): p. 1150-4.

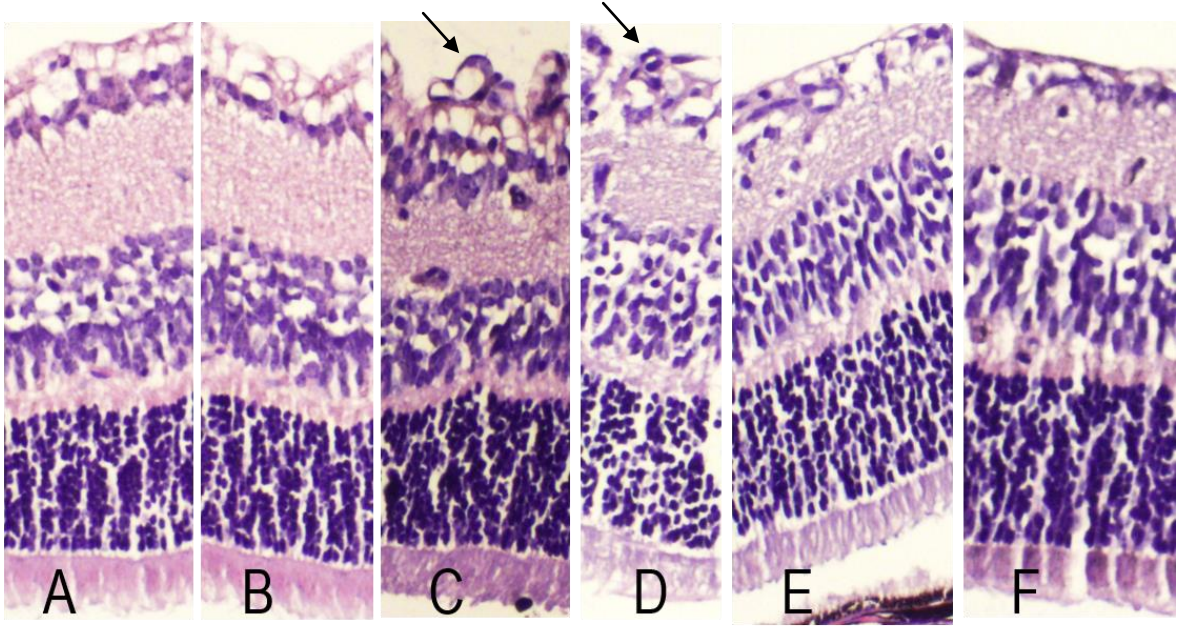
195. Lee, D.H., C.S. Kim, and Y.J. Lee, Astaxanthin protects against MPTP/MPP+-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol*, 2011. 49(1): p. 271-80.
196. Wolf, A.M., et al., Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J Nutr Biochem*, 2010. 21(5): p. 381-9.
197. Ranga Rao, A., et al., Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(15): p. 8553-9.
198. Lee, S.J., et al., Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells*, 2003. 16(1): p. 97-105.
199. Choi, S.K., et al., Effects of astaxanthin on the production of NO and the expression of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *J Microbiol Biotechnol*, 2008. 18(12): p. 1990-6.
200. Bolin, A.P., et al., Astaxanthin prevents in vitro auto-oxidative injury in human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol*, 2010. 26(5): p. 457-67.
201. Wu, T.H., et al., Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. *J Agric Food Chem*, 2006. 54(6): p. 2418-23.
202. Liao, J.H., et al., Astaxanthin interacts with selenite and attenuates selenite-induced cataractogenesis. *Chem Res Toxicol*, 2009. 22(3): p. 518-25.
203. Nakajima, Y., et al., Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress in-vitro and in mice in-vivo. *J Pharm Pharmacol*, 2008. 60(10): p. 1365-74.
204. Cort, A., et al., Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010. 58(1): p. 121-30.

205. Akkoyun, I., et al., Structural consequences after intravitreal bevacizumab injection without increasing apoptotic cell death in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol*, 2012. 90(6): p. 564-70.
206. Akkoyun, I., et al., Impact of triamcinolone acetonide on retinal endothelial cells in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol Scand*, 2007. 85(7): p. 791-4.
207. Natoli, R., et al., Expression and role of the early-response gene *Oxr1* in the hyperoxia-challenged mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(10): p. 4561-7.
208. Benitez-Bribiesca, L., et al., Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 926: p. 165-79.
209. Song, X., et al., Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway. *J Cell Mol Med*, 2014. 18(11): p. 2198-212.
210. Li, Z., et al., Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol Vis*, 2013. 19: p. 1656-66.
211. Kim, J.H., et al., Astaxanthin inhibits H₂O₂-mediated apoptotic cell death in mouse neural progenitor cells via modulation of P38 and MEK signaling pathways. *J Microbiol Biotechnol*, 2009. 19(11): p. 1355-63.
212. Guo, S.X., et al., Astaxanthin attenuates early acute kidney injury following severe burns in rats by ameliorating oxidative stress and mitochondrial-related apoptosis. *Mar Drugs*, 2015. 13(4): p. 2105-23.

213. Bender, L.M., et al., The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ*, 2005. 12(5): p. 473-81.
214. Piret, J.P., et al., Caspase activation precedes PTP opening in TNF-alpha-induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion*, 2004. 3(5): p. 261-78.
215. Piret, J.P., et al., Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2005. 280(10): p. 9336-44.

7. RESİMLER ve DİYAGRAMLAR

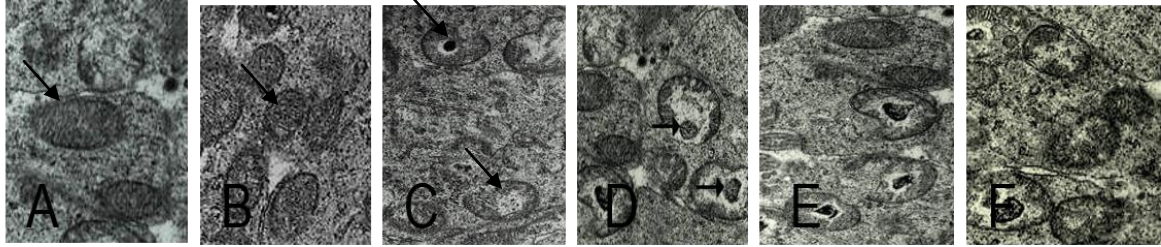
Resim 1



Resim 1: Grup A-F: Işık Mikroskopi.

A ve B. Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (Grup-B) C57BL/J6 farenin retinasından ışık mikroskopi kesiti. **C ve D.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş grup (Grup-C) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup-D). Retinal ILM'nin vitreus tarafında endotel hücre çekirdekleri izlenmektedir (ok). **E ve F.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml astaksantin intravitreal enjekte edilmiş grup (Grup-E) ve 100 µg/ml astaksantin enjekte edilmiş grup (Grup-F). Orijinal büyültme 20x.

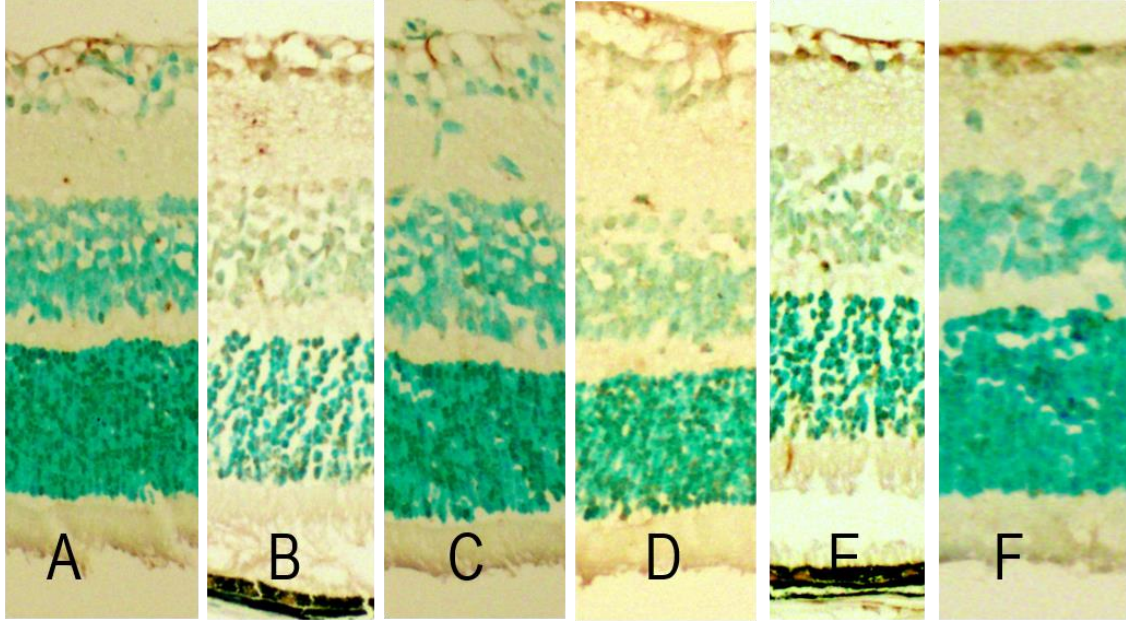
Resim 2



Resim 2: Grup A-F: Elektronmikroskopi.

A ve B. Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup-B) elektron mikroskopik incelemesinde fotosesepör iç segment bölümünde mitokondri yapılarında dismorfoloji izlenmedi. Mitokondrilerde tipik çift membranlı tübüler transvers düzenli mitokondrial kristalar görülmektedir. Orijinal büyütme 6000x (ok). **C ve D.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş grup (Grup-C) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş grup (Grup-D). Elektron mikroskopik incelemede fotoreseptör iç segment bölümünde irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondriler gözlenmektedir (ok). **E ve F.** Postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml astaksantin enjekte edilmiş grup (Grup-E) ve intravitreal 100 µg/ml enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup-F). Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler ve atipik mitokondri sayısı Grup-C ve -D'ye göre daha az olarak izlenmiştir. Orijinal büyütme 6000x.

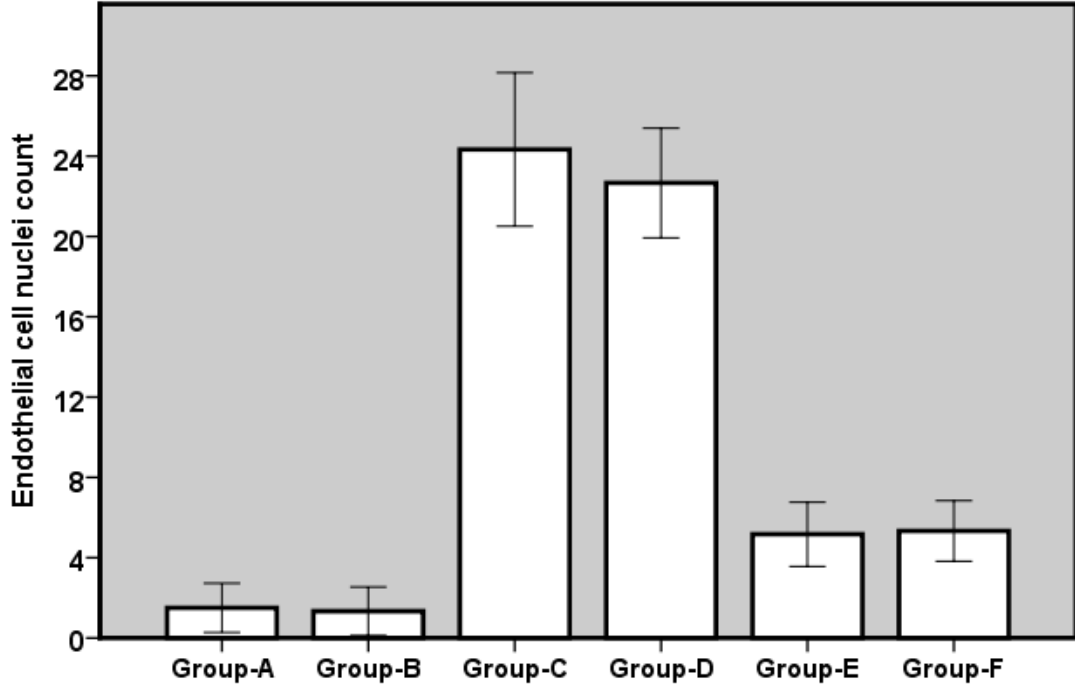
Resim 3



Resim 3: Grup A-F: TUNEL tekniği ile apoptotik hücrelerin analizi.

A-D. C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesitinde oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (Grup-B); postnatal 7-12 günlerinde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş (Grup-C) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş (Grup-D) gruplarda TUNEL tekniği ile dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada daha yoğun koyu renkli görülebilen benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir. **E.** Oksijene tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml enjekte edilen grupta (Grup-E), TUNEL tekniği ile Grup-A, -B, -C ve -D ile benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre görülmüştür. **F.** Oksijene tabi tutulan, intravitreal 100 µg/ml enjekte edilen grupta (Grup-F), TUNEL tekniği ile Grup-C ve -D'ye göre anlamlı olarak daha az sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir. Orijinal büyültme 100x, İmmersiyon yağı kullanılmıştır.

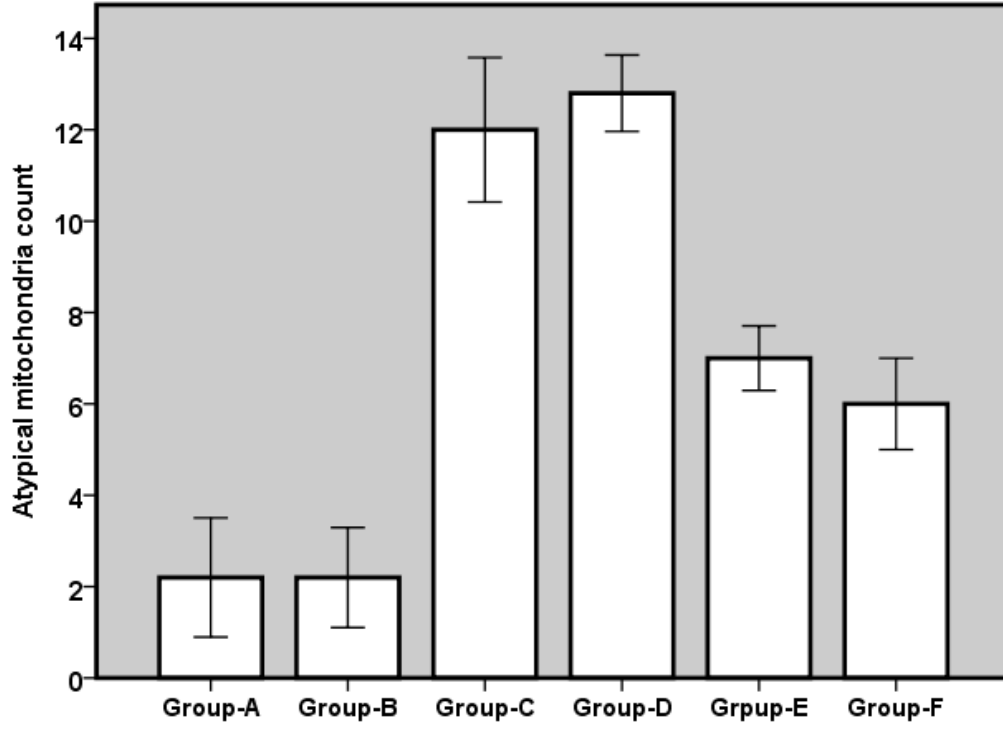
Diyagram 1



Diyagram 1: Grup-A-F’de ışık mikroskopi ile neovaskülarizasyonun kantifiye analizi.

Neovaskülarizasyon internal limitan membranın vitreusa bakan yüzeyindeki vasküler hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edilmiştir ve diyagramda gruplarda vasküler hücre çekirdeklerinin sayısının değeri ortalama \pm standart deviasyonu olarak verilmiştir.

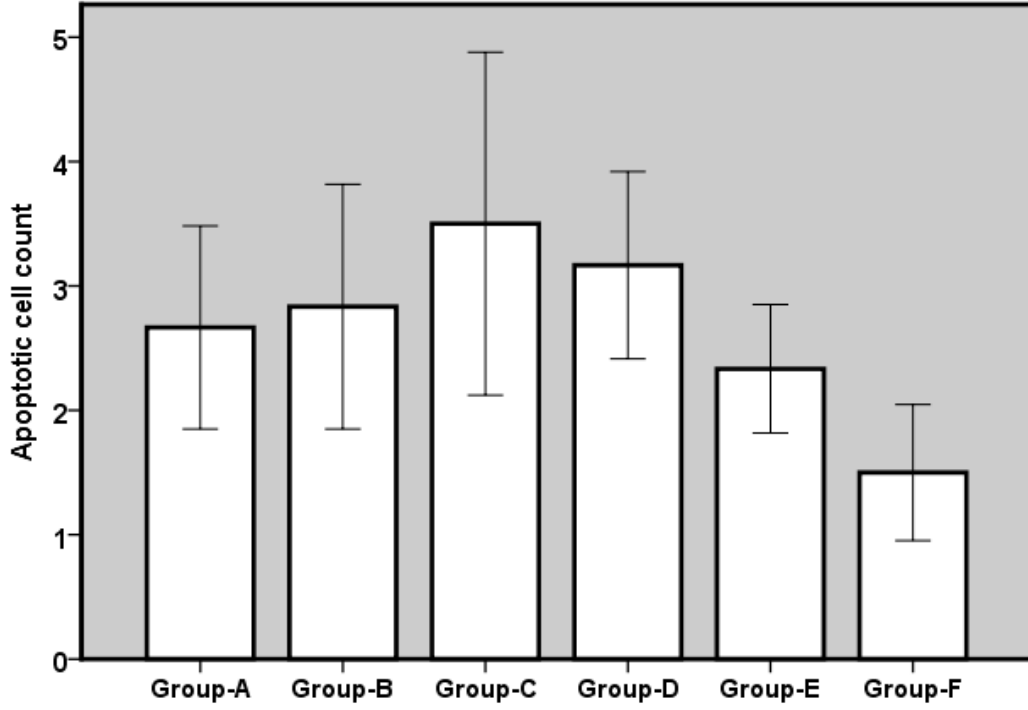
Diyagram 2



Diyagram 2: Grup-A-F’de elektron mikroskopi ile atipik mitokondri analizi.

Elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler değerlendirilmiş ve diyagramda gruptaki atipik mitokondri sayıları ortalama \pm standart deviasyonu olarak verilmiştir.

Diyagram 3



Diyagram 3: Grup-A-F'de apototik hücre analizi.

TUNEL tekniği ile apototik aktivite analizi gerçekleştirilmiş ve diyagramda gruplardaki apototik hücre sayıları ortalama \pm standart deviasyonu olarak verilmiştir.