

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**Proliferatif Diyabetik Retinopatiye Bağlı İntraokuler Hemorajisi ve veya
Traksiyonel Retina Dekolmanı Olan Hastalarda anti-VEGF Uygulamasının
Vitreus Proteomiks Değişikliğine Etkisinin İncelenmesi**

Dr.Fevzi ÖZER

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

2021

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**Proliferatif Diyabetik Retinopatiye Bağlı İntroakuler Hemorajisi ve veya
Traksiyonel Retina Dekolmanı Olan Hastalarda anti-VEGF Uygulamasının
Vitreus Proteomiks Değişikliğine Etkisinin İncelenmesi**

Dr.Fevzi ÖZER

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof.Dr. V.Levent KARABAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Etik Kurul Onayı: Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

KAEK 10.2

2021

İÇİNDEKİLER

| | |
|----------------------------|-----------|
| ÖNSÖZ | 4 |
| KISALTMALAR LİSTESİ | 5 |
| 1. GİRİŞ | 8 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 9 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 46 |
| 4. BULGULAR | 54 |
| 5. TARTIŞMA | 63 |
| 6. SONUÇ | 75 |
| 7.ÖZETLER | 76 |
| 8. KAYNAKÇA | 78 |

ÖNSÖZ

Kliniğimiz ve üniversitemiz kurucularından, uzmanlık eğitimim sürecinde tanımaktan onur duyduğum değerli hocam Prof.Dr. Yusuf Çağlar'a teşekkür ederim.

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanısaygıdeğer hocam Prof.Dr. Nurşen Yüksel'e uzmanlık eğitimime sağladığı katkıdan, gösterdiği sevgi ve ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Tez konumun seçiminde, proje aşamasında ve yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen; hasta yaklaşımı, cerrahi deneyimi, disiplini, yaptığı işe duyduğu tutkuyla beni kendine hayran bırakan, her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum, uzmanlık eğitim sürecimde benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Prof.Dr. Levent Karabaş'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi sürecimde cerrahi ve klinik deneyimiyle bana her zaman destek olan kıymetli hocam Dr.Öğr.Üyesi Dilara Pirhan'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde desteğini hep hissettiren, ihtiyaç duyduğumda yardımını esirgemeyen sevgili hocalarım Dr.Öğr.Üyesi Sevgi Subaşı'na ve Dr.Öğr.Üyesi Büşra Yılmaz Tuğan'a teşekkür ederim.

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım, Prof.Dr. Murat Kasap ve Doç.Dr. Gürler Akpınar'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde beraber çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim. Eğitimim süresince uyum içinde çalıştığım klinik hemşirelerine, sekreterlerine ve personeline de teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde şüphesiz en büyük emeğe sahip olan başta sevgili annem ve babam olmak üzere her zaman bana inanan, anlayışlı, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Asistanlık sürecimin en yakın şahidi, her zaman yanımda olan, en büyük destekçim yol arkadaşım İnci Şule Özer'e teşekkür ederim.

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|--------------------------------|---|
| ACE | : Anjiyotensin dönüştürücü enzim |
| Ang-1 | : Angiogenin 1 |
| CCL | : Kemokin ligand |
| CNS | : Merkezi sinir sistemi |
| CTGF | : Bağ dokusu büyüme faktörü |
| DM | : Diyabetes mellitus |
| DME | : Diyabetik makula ödemi |
| DRP | : Diyabetik retinopati |
| ECM | : Ekstraselüler matriks |
| EGF | : Epidermal growth faktör |
| EH | : El hareketi |
| ETDRS | : Erken Tedavi Diyabetik Retinopati Çalışma Grubu |
| FFA | : Fundus floresein anjiografi |
| FGF | : Fibroblast growth faktör |
| GFAP | : Glial fibriler asidik protein |
| HGF | : Hepatosit büyüme faktörü |
| HIF | : Hipoksi ile indüklenebilir faktör |
| HUVEC | : Human umbilikal kord venöz endotelial hücreleri |
| IGF | : İnsulin-like growth faktör |
| IL | : İnterlökin |
| INF-γ | : İnterferon gama |
| IRMA | : İnterretinal mikrovasküler anormallik |
| IOH | : İnterokuler hemoraji |

| | |
|-----------------|---|
| IVB | : İntravitreal bevacizumab |
| IVI | : İntravitreal anti-VEGF enjeksiyonu |
| KAMÖ | : Klinik anlamlı makula ödemi |
| KGF | : Keratinosit büyüme faktörü |
| KRB | : Kan retina bariyeri |
| MAPK | : Mitojen aktive edici protein kinaz |
| MCP-1 | : Monosit kemotaktik protein-1 |
| NADPH | : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat |
| NPDR | : Non proliferatif Diyabetik Retinopati |
| NO | : Nitrik oksit |
| NP | : Neuroplin |
| NV | : Neovaskülarizasyon |
| PDR | : Proliferatif diyabetik retinopati |
| PDGF | : Platelet kökenli büyüme faktörü |
| PEDF | : Pigment epitel kaynaklı faktör |
| PIGF | : Plasental büyüme faktörü |
| PK | : Protein kinaz |
| PPV | : Pars plana vitrektomi |
| PRP | : panretinal fotokoagülasyon |
| PVR | : Proliferatif vitreoretinopati |
| RRD | : Regmatojen retina dekolmanı |
| RPE | : Retina pigment epiteli |
| SDS-PAGE | : SDS poliakrilamid jel elektroforezi |
| SRA | : Santral retinal arter |
| SRF | : Subretinal fibrozis |
| TRD | : Traksiyonel retina dekolmanı |

| | |
|--------------------------------|---|
| TGF-β | : Transforming growth factor beta |
| TGF-α | : Transforming growth factor alfa |
| TNF-α | : Tumor nekrotizan faktör alfa |
| TLR | : Toll like reseptör |
| TP | : Timidin fosforilaz |
| TXNIP | : Tioredoksinle etkileşime giren proteinin |
| VE-cadherin | : Vasküler entotelyal cadherin |
| VEGF | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü |
| VEGFR | : Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü |
| VHL | : Von Hippel-Lindau |
| YBMD | : Yaşa bağlı makula dejenerasyonu |

1.GİRİŞ

Giriş veAmaç

Diyabetik retinopati (DRP), sanayileşmiş ülkelerde erişkinlerde körlüğün önde gelen nedenlerinden biridir. Tedavi edilmediğinde, neovaskularizasyon ve fibrozis ve nihayetinde traksiyonel retina dekolmanı (TRD) nedeniyle görme kaybına neden olmaktadır. DRP tedavisinde ilk aşamada intravitreal Anti-VEGF, panretinal fotokoagülasyon yapılır. Tedaviye yanıt vermeyen veya ileri evre DRP nedeni ile TRD ve intraokuler hemoraji (IOH) gelişen hastalarda pars plana vitrektomi (PPV) operasyonu uygulanır. DRP tedavisinde kullanılan intravitreal vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) inhibitörleri olarak kullanılan ilaçlar ranibizumab, bevacizumab ve afliberceptir (1).İntravitreal uygulanan anti-VEGF ilaçlar, iris ve retinadaki neovaskularizasyonu azaltabilir ve diyabetik maküler ödemli gözlerde ödemi azaltarak görme keskinliğini artırabilir. Son yıllarda, proliferatif diyabetik retinopatisi (PDR) olan hastalarda intravitreal anti-VEGF enjeksiyonu (IVI), vitreoretinal cerrahiye yardımcı olarak uygulanmıştır. IVI, intraoperatif TRD'li hastalarda traksiyona neden olan fibrovasküler membranları soyarken yeni damar oluşumunu engelleyerek kanamayı minimize ederek, ameliyatı kolaylaştırır. Bu nedenle PPV'den 3-7 gün öncesinde IVI yapılmaktadır. IVI ayrıca postoperatif erken vitreus kanamasını azalttığı gösterilmiştir(2).

IVI'nin bu faydalarına rağmen, proliferatif vitreoretinopati (PVR) veya eksüdatif yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) olan hastalarda fibrozisin ciddiyetini arttırdığı ve böylece görme keskinliğini bozduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir(3).IVI ile fibrozisin tetiklenmesini açıklayacak moleküler mekanizmalar halen belirlenememiştir. Vitreus VEGF karşıtı ilaçların biyolojik etkilerini ortaya çıkardığı gözdeki ilk bölgedir. Buna göre, vitreus proteomikslerindeki değişiklikler IVI'nin oküler etkilerini gösterebilir. Birçok çalışma, proteomiks analizinin, vitreustaki proteinleri tespit edebildiğini, farklı hücre ve doku tipleri arasında protein ekspresyon profillerinin kapsamlı bir şekilde karşılaştırılmasına izin verdiğini göstermiştir. Bu nedenle, DRP'ye bağlı TRD veya IOH gelişen hastalarda PPV öncesi IVI uygulanması rutin tedavide uygulanan bir işlemdir. Bu tedaviyi alması gereken hastalarda IVI öncesi vitreus örneği alınması ve PPV öncesinde vitre örneği alınması ve her iki örnekte proteomiks analizi yapılması planlanmıştır.IVI için Bevacizumab etken maddeli Altuzan ilacı kullanılmıştır.Bu sayedeBevacizumab ilacının neden

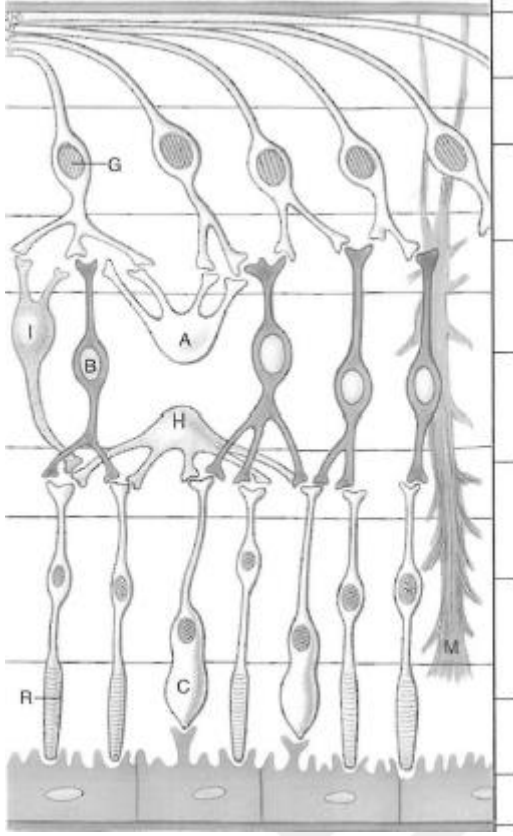
olduğu ileri sürülen fibroziste rol alan vitreus proteinlerinin proteomiks yöntemi ile ortaya konması amaçlanmıştır. Bu proteinler saptandığında Bevacizumabın neden olduğu fibrozisi engelleyici tedavilerin gelişmesinde yol gösterici olması ön görülmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

RETİNA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Retina nöroektoderm kökenli, ışık sinyallerinin sinirsel iletiye dönüştürüldüğü, ince, şeffaf yapıda bir dokudur. Kalınlığı 100 ile 300 mikron arasında değişen retina içten (vitreus tarafından), dışa doğru (koroid tarafına) şu tabakalardan oluşur (Şekil 1):

- 1) İç limitan membran (Müller Hücreleri terminal uzantıları ve bazal membran)
- 2) Sinir lifi tabakası (ganglion hücre aksonları)
- 3) Ganglion hücre tabakası (ganglion hücre çekirdekleri)
- 4) İç pleksiform tabaka (bipolar, amakrin, ganglion hücreleri sinaptik bağlantıları)
- 5) İç nükleer tabaka (bipolar, horizontal, amakrin ve Müller hücre çekirdekleri)
- 6) Dış pleksiform tabaka (Fotoreseptör, bipolar, horizontal hücrelerin sinaptik bağlantıları, Henle lif tabakası)
- 7) Dış nükleer tabaka (fotoreseptör çekirdekleri, kon nükleusları dış grupta, rod nükleusları daha çok iç grupta)
- 8) Dış limitan membran
- 9) Fotoreseptör tabakası



| |
|-------------------------|
| İç limitan membran |
| Sinir lifi tabakası |
| Ganglion hücre tabakası |
| İç pleksiform tabaka |
| İç nükleer tabaka |
| Dış pleksiform tabaka |
| Dış nükleer tabaka |
| Dış limitan membran |
| Retina pigment epiteli |
| Bruch membranı |

Şekil 1. Retinanın histolojik kesiti: R: Rod fotoreseptör, C: Kon fotoreseptör, B: Bipolar hücre, H: Horizontal hücre, A: Amakrin hücre, G: Ganglion hücre, M: Müller hücre

Duyusal retina;

Fotoreseptörler: Koni ve basil (rod) olarak adlandırılan, retina pigment epiteli (RPE) ile dış limitan membran arasında yer alan iki tip fotoreseptör bulunmaktadır. Her bir fotoreseptörün iç ve dış olmak üzere iki segmenti vardır (4). Basiller alaca karanlıkta ve gece görmeden (skotopik görme) sorumlu olup, foveada hiç bulunmaz ve periferde doğru sayıları hızla artar, uç periferde hafifçe azalır (5).

Koniler ise parlak ışıktaki görme (fotopik görme), renkli görme ve keskin görmeden sorumludurlar. En çok foveada bulunurlar.

Bipolar Hücreler: Radyal yerleşimli olan bu hücrelerin, dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basiller ile sinaps yapar, aksonları ise iç pleksiform tabakada gangliyon ve amakrin hücrelerle sinaps yapar (5). Görevleri fotoreseptörlerden gelen sinyali gangliyon hücrelere aktarmaktır.

Gangliyon hücreler: Retinanın iç kısmında bulunurlar. Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir, dendritleri bipolar hücreler aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar(5). Optik sinir gangliyon hücre aksonlarının birleşmesiyle oluşur(6).

Horizontal hücreler: Horizontal hücreler basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınlarında yer alan multipolar hücrelerdir. Fotoresptörleri inhibe eden antagonistik internöronlardır (6).

Amakrin Hücreler: Çoğunlukla inhibitör internöronlardır. Bol sitoplazmalı, parçalı nükleuslu ve çok sayıda dendritleri olan aksonsuz hücrelerdir.

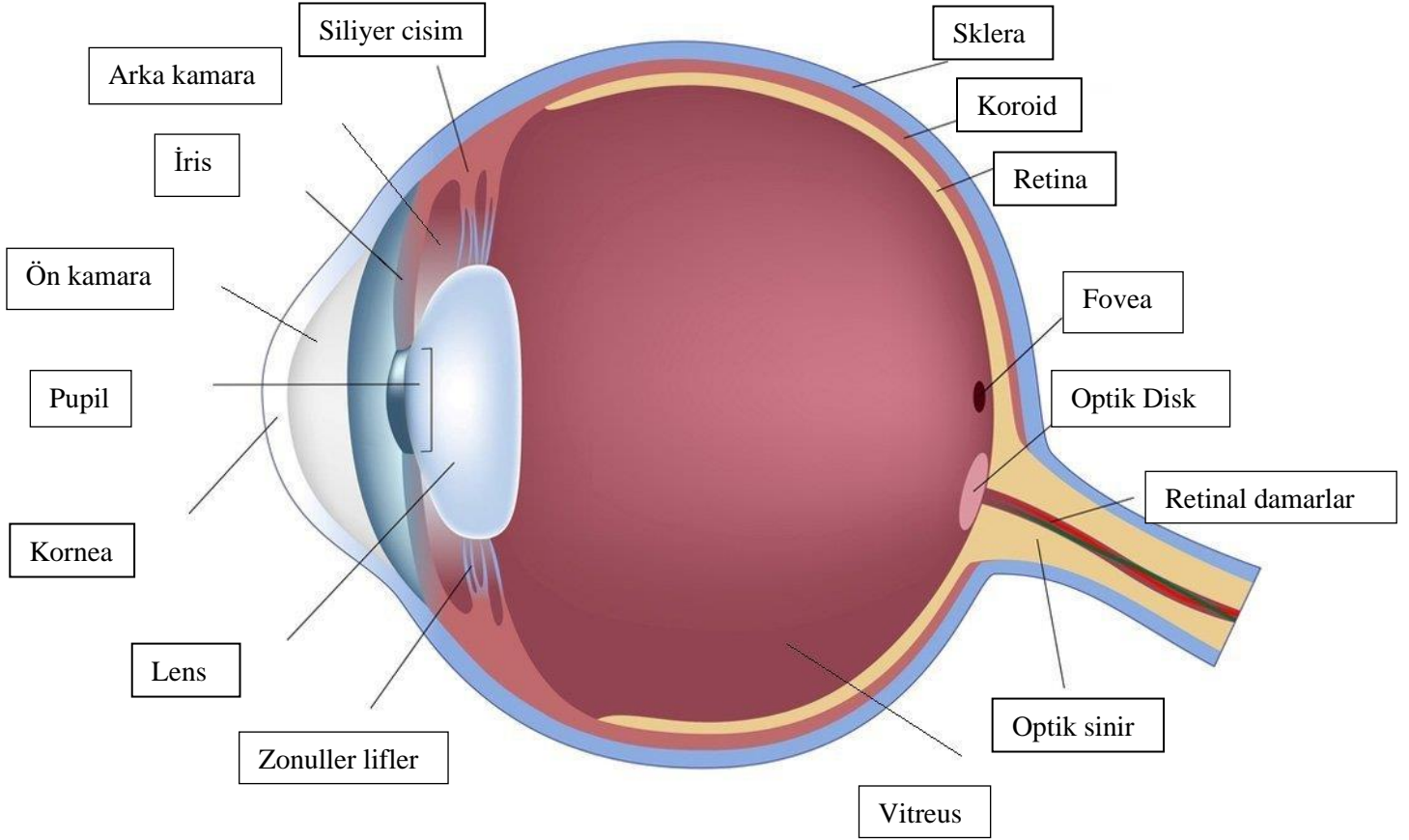
Müller Hücreleri: Retinanın glial hücre yapısını oluşturan en önemli hücrelerdir. Retinada mikroglia ve makroglia (Müller hücreleri, astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücreleri) olmak üzere iki tip nöronal olmayan hücre grubu bulunur. Mikroglial hücreler yardımcı immün hücreler, makroglialar ise retinal nöronların fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerdir

(6). Retinanın destek yapısını oluşturan Müller hücreleri, dış limitan membrandan iç limitan membrana kadar uzanmaktadır. Proliferatif vitreoretinopati (PVR) patogenezinde Müller hücrelerinden köken alan retinadaki glial hücreler, çoğalarak iç ve dış limitan membranların içinden geçebilirler. Böylece epiretinal ve subretinal membranları oluşturabilirler (7).

Retina pigment epiteli;

Nöral retina ve koroid arasında uzanarak sıralı, pigmente, hegzagonal bir hücre tabakası olup, ön tarafta silyer epitelin pigmentli katı olarak devam eder. Erişkin insan gözünde yaklaşık 3,5 milyon Retina Pigment Epiteli (RPE) bulunmaktadır. RPE yoğunluğu foveal alanda en fazla olup, periferde doğru azalır (6). Hücrelerin tepe kısımları hem zonula okludens hem de zonula adherenslerle birbirlerine sıkıca bağlıdır ve dış kan retina bariyerinin oluşumuna katkıda bulunur (7). RPE'nin görevleri; fotoresptör dış segment fagositozu, A vitamini metabolizmasını düzenlemek, rodopsin sentezini düzenlemek, vizuel pigment yenilenmesi, sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanması, oksidatif stresten korunma, avasküler dış retinanın sağlanması, immünitenin sağlanması, dış kan retina bariyerinin (KRB) oluşturulması ve devamlılığının sağlanması, subretinal alandaki sıvı ve besin kontrolünü ve retinal yapışıklığın sağlanmasıdır (5). PVR patogenezinde RPE hücreleri kritik role sahiptir. Çeşitli nedenlerle kan retina bariyeri bozulduğunda vitreus boşluğuna geçen RPE hücreleri patolojik olarak çoğalarak kontraktıl membranyapıları oluştururlar. Bunun sonucunda atraksiyonel (fibrotik) retina dekolmanı gelişmesine neden olurlar(7,8).

İçten vitreusla dıştan koroid ile komşu olan retina iki bölümde incelenebilir (Şekil 2). Bunlar retina vorteks venlerinin skleraya girdikleri yerlerin arka kenarından geçtiği düşünülen kesit ile ayrılan santral(posterior) ve periferik (anterior) retinadır.



Şekil 2.Göz anatomisi

Retina KanDolaşımı

Retina birim ağırlık başına oksijen tüketiminin yüksek olduğu bir dokudur. Optik diskin yakınındaki büyük dallar dışında gerçek arter ve ven içermemektedir. Retina arterleri anatomik olarak uç-arter olup arteriovenöz anastomoz göstermemektedirler (5).

Arterler: Santral retinal arter (SRA); internal karotid arterden ayrılan oftalmik arterin dalıdır. Retinal kan dolaşımı retinal ve üveal (koroidal) olmak üzere iki ayrı kaynaktan gelir. Dış pleksiform ve dış nükleer tabakalar, fotoreseptörler ve pigment epitelinden oluşan retinanın 1/3 dış kısmı koroid dolaşımından, 2/3 iç kısmı ise santral retinal arterden beslenir.

Oftalmik arterin,SRA dan sonraki dalları olan kısa ve uzun arka siliyer arterler globa optik sinir etrafından girerler. Posterior koryokapillaris kısaarka siliyer arterlerden, anterior koryokapillaris ise uzun arka siliyer arterlerden ve ön siliyer arterlerden beslenmektedir(5).

Venler: Ora serratada venler, arterlerin sonlandığı yerin daha periferinden başlarlar. Ekvatordan itibaren ise arterlerle birlikte seyrederek ve papillada toplanarak santral retinal veni oluştururlar. Santral retinal ven ya superior oftalmik ven yolu ile veya direkt olarak kavernoöz sinüse drene olur(5,6).

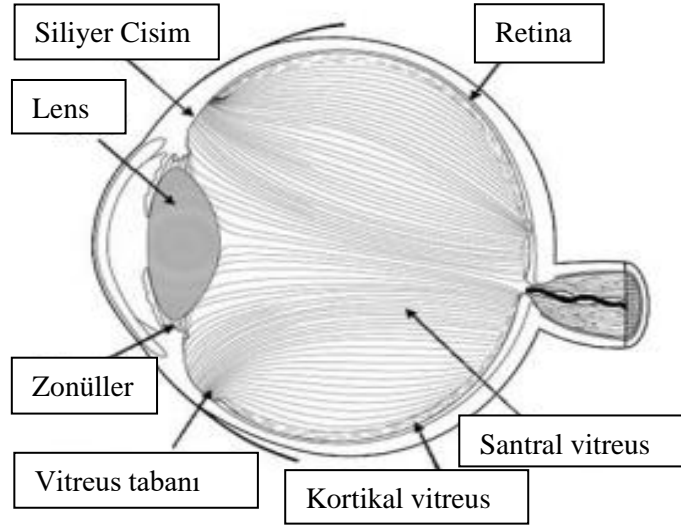
Kapillerler: Retina arteriyolları ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Retina kapillerleri çoklu arteriyoller bağlantılar içermektedir. Böylelikle bir besleyici damarın kapanması ile kapiller yatakta dolaşım durmaz. Koryokapillerlerin duvarlarında geniş pencerelemeler bulunmasına ve geçirgen olmalarına karşılık, retina kapillerlerinin duvarları geçirgen değildir. Retina kapillerleri yüzeysel ve derin olmak üzere iki ağ şeklinde mevcuttur. Retinada kapillerlerin olmadığı üç bölge mevcuttur: Ora serratadan 1,5 mm gerisine kadar olan bölge, fovea santralinde ortalama 0,5 mm'lik bölge (foveal avasküler zon) ve büyük arterlere ya da daha az oranda venlere komşu bölgeler (5,6).

Kan-Retina Bariyeri (KRB)

Dış KRB, komşu RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri olan zonula oklüdens ve zonula adherensler aracılığı ile oluşturulmaktadır. İç KRB ise non-fenestre retinal vasküler endotel hücreleri ve bunların arasındaki sıkı bağlantılar tarafından oluşturulmaktadır.

VİTREUSANATOMİSİ

Vitreus; lens, arka kamara, silier cisim ve retina arasında yerleşen, gözküresi hacminin yaklaşık %80'ini oluşturan, gözün en büyük içyapısal elemanıdır. Vitreus, vitreus tabanı, kortikal vitreus ve kor vitreus gibi farklı bölümlerden meydana gelir. Erişkinde ortalama 4 mm³ olup, ağırlığı ise yaklaşık 4 gr'dır(5). Vitreus yapısal olarak sıvı içeriği fazla hyaluronik asit matriks ve kollajen fibril ağından ibarettir ve %99'u su olmasına rağmen viskozitesi suyunkinin yaklaşık iki katı kadardır. Geriye kalan %1'lik kısım ise düşük molekül ağırlıklı yağlar ve inorganik tuzlardan, çözülebilen ve çözilemeyen proteinlerden ve hyaluronik asitten oluşur(6). Vitreusta bulunan serbest amino asitler serumdaki miktarının beşte biri kadardır. Vitreusta hücresel eleman olarak en sık hyalosit olarak bilinen mononükleer fagositler olmakla beraber daha az sayıda fibroblast ve glial hücreler sayılabilir. Vitreusun en önemli protein içeriğini kollajen oluşturur(Şekil 3).



Şekil 3: Vitreustaki kollajen fibrilerin dağılımı

Vitreustaki kollajen, fibroblastlar tarafından üretilen tip-II kollajendir. Polisakkarit bileşiminde bir glikozaminoglikan olan, hyalositlerce sentezlenen hyaluronik asit en yoğun kortikal vitreusta en az kor vitreusun ön kısmında bulunur. Tüm yaşam süresince ön kortikal vitreustan arka kamaraya geçer. Hyaluronik asit vitreusun stabilizasyonunun, saydamlığını ve viskoelastik yapısını güçlendirir. Genç vitreus %80 jel iken, yaş ile beraber likefiye olmaya başlar ve 70-80 yaşlarında vitreusun yarısı likefiye olur (5,6). Vitreus ile retinanın komşuluklarını kalıcı kılan bağlantılar vitre tabanı ve optik sinir başında güçlüdür. Bu bağlantılar daha zayıf olmak üzere, lensin gerisindeki hyaloid fossa periferinde, pars plana silier epiteli yüzeyinde, retina damarları ve makula düzleminde de gözlenmektedir(9).

Vitreus tabanı ora serratanın 1,5-2,0 mm önünde, nazalde 3mm, temporalde ise 1,8 mm arkasına ve birkaç mm vitreus içine doğru yükselen üç boyutlu bir yapıdır.

Kortikal vitreus, vitreusun periferde retinaya komşu 100-300 mikron kalınlıktaki dış kısmıdır. Vitreus tabanı önündeki fibrillerin öne ve içe doğru yönelmesi ile ön kortikal vitreus, arkasından içe ve arkaya doğru yönelmesi ile arka kortikal vitreus oluşmaktadır(7,9). Müller hücrelerinin bazal membranı olan iç limitan membran ile kortikal vitreustaki fibriller sayesinde retina-vitreus bağlantıları sağlanmaktadır(9). Kor vitreus kortikal vitreusun çevrelediği, merkezdeki bölümdür. Daha az yoğun bir yapı olup daha az kollejen fibril içerir(9).

VitreusFizyopatolojisi

Vitreusun optik özellikleri: Vitreusun kırıcılık katsayısı aköz hümöre benzer ve 1,3349'dur.

Vitreusun mekanik özellikleri: Ani göz hareketlerinde vitreus diğer dokulara mekanik destek görevi yapmaktadır.

Vitreusun immünolojik özellikleri: Hyaluronik asit-kollajen çatının vitritiste antijen deposu gibi davranarak kronik ve\veya tekrarlayan enflamasyonlara neden olduğu bilinmektedir.

Vitreustaki yabancı hücreler ve membranlar:PVR da retina kan-retina ve aköz bariyer yıkımı ile vitreusa salınan fibrin ve mitojenler membran gelişimini sağlayarak anormal yara iyileşmesi ile traksiyonel membranlar oluşturarak sonlanabilmektedir (9–11).

DIABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus (DM), dünya genelinde milyonlarca insanın hayatını etkileyen epidemik bir sağlık sorunudur. Yapılan çalışmalarda 2011 yılında 366 milyon üzerinde kişinin diyabet hastası olduğu bildirilmiştir (12). Diyabest hastalığının görülme sıklığı artmakta ve 2050 yılında her üç kişiden birinde görülmesi beklenmektedir. Bu nedenle fiziksel, psikososyal ve finansal bir sorun haline gelmiştir.

Diabetes Mellitus endojen insülinin yokluğu, eksikliği veya dokulardaki etkisinin azalması sonucu ortaya çıkan kronik hiperglisemiyle seyreden progresif bir multisistem hastalığıdır. Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozulmayla seyreder. Diyabet hastalarının %85-90'ını insuline bağımlı olmayan tip 2 grubu oluşturur. %10-15'i insuline bağımlı tip 1 grubundadır. Tip 1 diyabet genellikle 40 yaş altında tanı alır, ancak yaşlı hastalar da zamanla insüline bağımlı hale gelebilir.

Hastalığın seyri sırasında mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar gelişebilmektedir. Başlıca komplikasyonları damar endotelini direkt olarak etkilemesi ile böbrek, göz ve kalp üzerinedir. Diyabet komplikasyonları hastaların morbiditesinden ve erken ölümlerinden sorumludur. Akut komplikasyonları diyabetik ketoasidoz, nonketotik hiperosmolar koma, hipoglisemik koma ve laktik asidozdur. Kronik komplikasyonları ise mikrovasküler ve makrovasküler olarak incelenebilir. Diyabetik retinopati, nefropati, periferik simetrik polinöropati, otonom nöropatiler, mononöropatiler gibi nöropatiler mikrovasküler komplikasyonlar iken, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, diyabetik ayak ve enfeksiyonlar makrovasküler komplikasyonlar

olarak sıralanabilir.

Diyabetin neden olabildiği oküler komplikasyonlar; azalmış gözyaşı üretimi, üçüncü, dördüncü, altıncı kraniyal sinir paralizileri, korneada iyileşmeyen punktat epitelyopati, rubeosis iridis, neovasküler glokom, katarakt oluşumu, proliferatif retinopati, optik nöropati ve refraksiyon değişiklikleridir.

DİYABETİK RETİNOPATİ(DRP)

DRP, hiperglisemi ya da insülin yetersizliği sonucu ortaya çıkan, retinada kapillerlerin, venüllerin ve arteriyollerin ututulduğu spesifik bir anjiyopati ve buna eşlik eden bir nöropati olarak tanımlanabilir (13).

İnsülin, 1922 yılında Frederick Grant Banting ile Charles Herbert Best tarafından bulundu ve ilk kez 1925'te Best tarafından kullanıldı. İnsülini izleyen diğer antidiyabetik ilaçların keşfi, diyabet hastalarının ömürlerinde belirgin bir uzamaya neden oldu. Bu uzama sonucu, diğer komplikasyonlarla birlikte diyabetin majör komplikasyonlarından olan DRP'nin görülme sıklığında da büyük bir artış ortaya çıktı. Günümüzde, gelişmiş batılı ülkelerdeki 40- 65 yaş grubunda, DRP en sık körlük nedenidir (14,15).

DRP 'nin ileri evreleri iskemiye sekonder retinada anormal yeni damar oluşumuyla karakterizedir. Yeni damar oluşumuna hipoksik retina dokusundan salınan büyüme faktörleri neden olur. DRP sürecinin herhangi bir aşamasında diyabet hastalarında maküla bölgesindeki kalınlaşmayla karakterize maküla ödemi de gelişebilir. Diyabetik maküler ödem (DMÖ) geçirgenliği artmış dilate kapillerler ve mikroanevrizmalardan kaynaklanan sızıntılarla kan- retina bariyerinin bozulmasının sonucu olarak ortaya çıkar. DRP'nin ve DMÖ'nün kontrolü için geçerli olan strateji bu bozuklukların erken teşhisine ve kan şekeri düzeyinin sıkı kontrolüne dayanır.

DRP'de Epidemiyoloji

Toplumlara göre değişmekle birlikte ortalama %1-2 sıklıkta görülmektedir. Diyabet hastalarının büyük çoğunluğu insuline bağımlı olmayan tip (DM tip II) olup popülasyonun%85-90'ını, diğer %10-15'ini de insuline bağımlı tip (DM tip I) olan az bir kısmı oluşturur. DM tip I'e genellikle 40 yaş altında tanı konur. Bu popülasyon daha ciddi oküler komplikasyon geliştirme eğilimindedir. Her ne kadar DM tip II' li hastalar komplikasyon açısından şanslı olsalar da uzun süreli hastalık, komplikasyonu kaçınılmaz kılmaktadır. Klinik tedaviler, ciddi görme kayıplarını minimize etmeyi, hastaların

yaşam kalitelerini korumalarını sağlamayı amaçlamaktadır.

DRP'nin ortaya çıkmasında en önemli faktör hastalığın süresidir (16). Hastalık ortaya çıktıktan 20 yıl sonra tip 1 DM'li hastaların hemen hemen tamamında, tip 2 DM'li hastaların ise %60'ından fazlasında DRP bulgularına rastlanmaktadır. Günümüzde DRP'nin tam anlamıyla tedavisi olmamakla birlikte, mevcut tedavi yöntemleriyle hastalarda ortaya çıkabilecek görme kayıplarının mümkün olduğunca engellenmesi ya da en aza indirgenmesi amaçlanmaktadır. Dünyada DM insidansı %1.5-2.5 oranında bildirilmektedir (17). Diyabetik popülasyonun yaklaşık %25'inde herhangi bir seviyede DRP vardır ve bunun %5'i proliferatif diyabetik retinopatidir (PDR). Amerika Birleşik Devletleri'nde Framingham grubu tarafından yapılan çalışmada herhangi bir düzeyde retinopati; 5 yıldan kısa süreli diyabetiklerde %5, 5-9 yıl arasındakilerde %30, 10-14 yıl arasındakilerde %45 ve 15 yıldan uzun süreli hastalarda %62 olarak bildirilmiştir (17). Wisconsin grubunun yaptığı epidemiyolojik 10 çalışmada ise hastalar 30 yaş altı ve üstü diyabetikler olarak iki grupta incelenmiştir. Otuz yaş altındaki diyabetiklerde, hastalık süresi 5 yıldan az olanlarda retinopati %17, 15 yıl üstünde ise %98 bulunmuştur. Otuz yaş üstünde DM tanısı konulan grupta insülin kullanmayanlarda, 5 yıldan az diyabetik olanlarda retinopati %17-29, 15 yıl üstünde ise %50-63 olarak saptanmıştır. İnsuline bağımlı grupta 5 yıl altında retinopati oranı %40 iken, 15 yıl üstünde %85'tir (17).

Diyabete bağlı göz komplikasyonları gelişmiş ülkelerde körlüğün en önemli sebebidir. Diyabetik retinopati (DRP), sanayileşmiş ülkelerde 20-74 yaşları arasındaki hastalarda körlüğün önde gelen nedenidir (18,19). Dünya genelinde 93 milyon insanın DR olduğu ve bu hastaların yaklaşık üçte birinde diyabetik maküler ödeme (DME) bağlı görme kaybı olduğu bilinmektedir. DME, DR ile ilişkili görme kaybının %75'inden sorumludur, ancak lazer fotokoagülasyon (20) ve intravitreal farmakoterapi, özellikle kortikosteroidler (21) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) inhibitörleri (22-24) hastaların çoğunda retinopatiyi stabilize etmek, maküler ödemi azaltmak ve görme keskinliğini iyileştirmek için kullanılmaktadır.

DR'li hastaların %25'inde görme kaybı proliferatif diyabetik retinopatinin (PDR) komplikasyonlarından kaynaklanmaktadır. Dünya genelinde yaklaşık 17 milyon hastada PDR vardır (25). Erken Tedavi Diyabetik Retinopati Çalışma Grubu'nun (ETDRS) geliştirdiği sınıflandırma sistemine göre yüksek riskli PDR hastalarının yarısından fazlası 5 yıl içinde kör olacaktır (26). Retinanın panretinal fotokoagülasyonu (PRP), şiddetli PDR

ile ilişkili komplikasyonların [vitreus kanaması ve traksiyon retina dekolmanı (TRD)] gelişmeden önce yapıldığında, ciddi görme kaybı insidansı yaklaşık% 50 azaltır (27).Erken Tedavi Retinopati Çalışma Grubu (ETDRS), PDR'li hastaların% 5'inin yeterli PRP tedavisi yapılmasına rağmen vitreus cerrahisine ihtiyaç duyacağını göstermiştir (28).

DRP'de Patogenez

DM, insülin yokluğu veya periferik duyarsızlığı ile karakterize, hümorale ve dokusal sonuçları olan, karbonhidrat, protein, lipid metabolizma bozukluklarını da içeren bir multisistem hastalığıdır.

Diyabetes mellitusun oluşturduğu oküler komplikasyonlar şu şekilde özetlenebilir: Azalmış gözyaşı üretimi, üçüncü, dördüncü, altıncı sinir paralizileri, korneada iyileşmeyen punktat epitelopati, rubeozis iridis, katarakt oluşumu, proliferatif retinopati, optik nöropati, refraksiyon değişiklikleri, glokom insidansında artış.

DRP'ye neden olan metabolik süreç hala tam olarak anlaşılammıştır. Aldoz redüktaz, vazoproliferatif faktörler, büyüme hormonu, trombositler ve kan viskozitesi ile retinopatide ilişkilendiren birkaç teori mevcuttur.

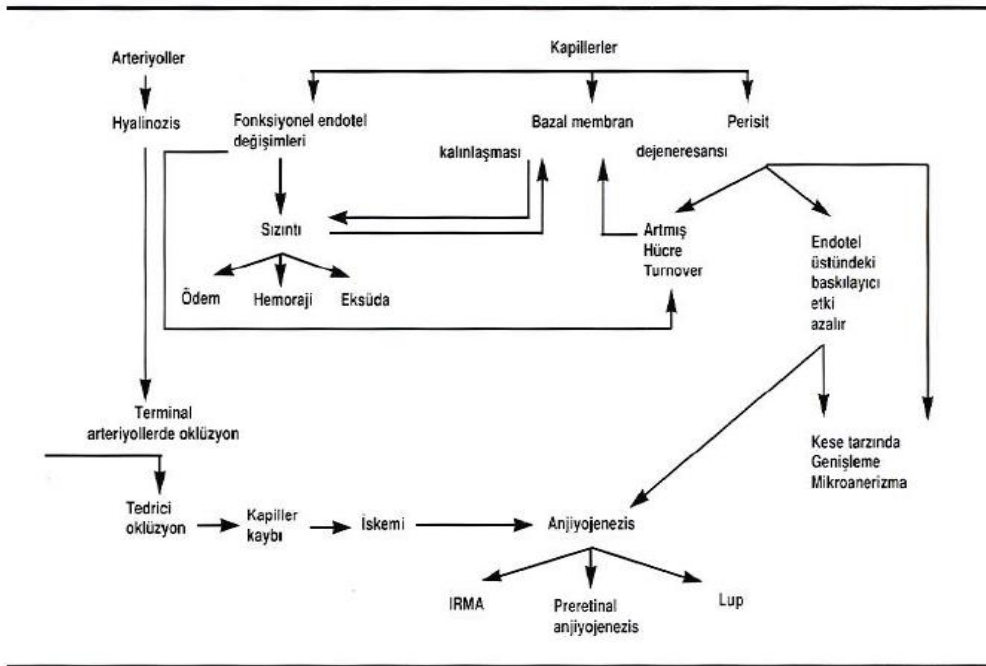
Diyabetik retinopati; damar duvarlarına lökosit adezyonunda artış, kan akımında dalgalanmalar, perisitlerin ölümü ve vasküler bazal membranda kalınlaşmanın görüldüğü patolojik değişiklikleri kapsar. Endotel hücreleri arasındaki bağlantıların zayıflaması vasküler permeabilitenin artmasına neden olur. Retinal kapillerlerin blokajı ise hipoksi ve anjiojenik faktörlerin üretiminde artış ile sonuçlanır. Vasküler permeabilite artışı ve büyüme faktörü salınımı; retinal neovaskülarizasyon için zemin hazırlar. Diyabetik retinopatide görülen vasküler değişikliklerden sorumlu olan primer mediatörün VEGF olduğu düşünülmektedir.

İlk kez 1994 yılında Arjamaa ve arkadaşları(29)VEGF'in iskemik retinadan salınarak intraoküler neovaskülarizasyona neden olduğunu bildirmişlerdir. Maier ve arkadaşları(30)yapmış oldukları bir çalışmada diyabetik hasta vitreuslarında artmış VEGF düzeylerini göstermişlerdir. VEGF'in salınımı hipoksi tarafından indüklenmektedir. VEGF retinada, retinal nöron, glial hücre, vasküler endotel hücresi, retina pigment epiteli ve retinaya göç etmiş lökositler tarafından salınmaktadır (31).VEGF, retinal adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmak suretiyle de lökosit adezyonunu artırarak inflamasyonu kısır bir döngü haline getirmektedir (32). İskemik retina, retina ve iriste endotel hücre proliferasyonu ve yeni damar oluşumu ile

sonuçlanacak anjiojenik bir faktör ya da faktörlerin kaynağı olabilir. Aktif PDR'li hastalardaki VEGF düzeyleri nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR) ve diyabeti olmayan hastalardan yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, retinal iskemi sonucunda görülen neovaskülarizasyonlarda VEGF'in rolü olduğunu göstermektedir.

Diyabetik retinopatiye ilişkin patolojik değişimlerin ortaya çıkmasında rol oynayan başlıca patolojik biyokimyasal mekanizmalar non-enzimatik glikozilasyon, oksidatif stres ve sorbitol yolu başlıkları altında açıklanmaktadır.

Diabetik retinopatinin histopatolojisi



Şekil-4: DRP histopatolojisi

Non-enzimatik glikozilasyon

Uzun süreli hiperglisemide glikoz, proteinlere kimyasal bakımdan non-enzimatik olarak yapışır ve en iyi örneği HbA1c olan, bozulmaya dayanıklı bir takım maddelerin ortaya çıkmasına yol açar. Ketamin ve amadori adı verilen proteinler, bir dizi reaksiyona uğrayarak ileri glikozilasyon ürünleri denilen AGE (Advanced Glycosylation Endproducts) ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Parçalanmaya dirençli AGE ürünleri bazal membranda albümin ve IgG birikimine neden olurlar. Non-enzimatik glikozilasyon hipergliseminin yüksekliğine ve devam süresine bağlı olarak gelişen yavaş bir reaksiyondur. Ara ürün olarak AGE ürünleri, sonuçta ise yarı ömrü uzun makro moleküller ortaya çıkar. Serbest radikal (kollajen DNA) oluşumunu arttırırlar (33).

Oksidatif stres

DRP etiopatogenezinde ileri sürülen ikinci teori oksidatif stres teorisidir. Bu teoriye göre oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller, proteinlerin çapraz bağlantılarını etkiler ve farklı aminoasit kalıntılarının ortaya çıkmasına neden olur.

Proteinlerin Non-enzimatik glikozilasyonu, artmış serbest radikal hassasiyeti ile birleşince protein davranışlarında farklılıklar oluşur. Bunun sonucunda kanın şekilli elemanlarının aglütinasyon ve agregasyonlarında artış meydana gelir. Bu artış mikrotromboz gelişimlerine yol açar (33).

Serbest radikallerin hücrelerdeki zararlı etkileri:

a. Plazma lipoproteinleri, hücre membranı lipoproteinleri ve kollajen, laminin gibi proteinler oksidasyona uğrar. Serbest radikal düzeyindeki artış, antioksidanların kan ve doku düzeyinde düşme oluşturur.

b. Proteinlerin oksidasyonu

Oksidatif stres, çeşitli kemokinlerin ve sitokinlerin sentezini düzenleyen pro-inflamatuar bir durum yaratır. Bu moleküller, kan - retinal bariyerini parçalayarak DME gelişimini ve pre-retinal proliferatif dokunun büyümesini uyararak PDR gelişimini destekler.

Oksidatif stres ve retinal iskemi anjiyojenik faktörlerin, özellikle VEGF'nin ve çeşitli kemokinlerin üretimini düzenler (34). Regmatojen retina dekolmanı (RRD) ve Traksiyonel retina dekolmanı (TRD) olan gözlerin vitrözünde artmış nitrik oksit (NO) yolu metabolitleri (sitrulin ve arginin) bulunmuştur(35)ve aşırı NO, mitokondriyal fonksiyonu inhibe edebilen ve DNA'ya zarar vererek hücre ölümüne neden olabilecek toksik serbest radikaller oluşturur (36).PDR'li gözlerde bulunan diğer proenflamatuar ve büyüme faktörü molekülleri şunları içerir: kemokin ligand 2 [CCL2; monosit kemotaksis proteini (MCP)-1], CCL4, CCL11, CCL17, CCL19, CXCL9, CXCL10, TGF- β 1,2,3,(37) interlökin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, eritropoietin, adiponektin, sICAM-1 ve sVCAM-1.

Sorbitol yolu

Vücutta glukoz, aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole dönüşür. Sorbitol ise sorbitol dehidrogenaz yardımıyla fruktoza dönüşür. Glukoz sorbitole dönüşürken Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) kullanılır. Fazla glukoz varlığında NADPH fazla tüketilir ve myoinositol ortaya çıkar.

Miyoinositol ise vasküler disfonksiyona neden olur. Fazla miktarda glukoz alındığında NADPH fazla miktarda tüketilir ve aşırı sorbitol ortaya çıkar. NADPH'ın aşırı tüketimi ve sorbitol birikimi, sorbitol dehidrogenazı etkisizleştirerek işlemin ikinci kısmını bloke eder ve fruktoza dönüşümü engellenir. Bunun sonucunda sorbitol daha da artar ve kısır bir döngü ortaya çıkar. Bu kısır döngünün sonucu aşırı sorbitol ve myoinositol birikimi ve NADPH tüketimi aracılığıyla yaygın vasküler disfonksiyon oluşur.

DRP'de Patogenezinde İnflamasyon Kanıtları

İnflamasyonun makroskopik olarak beş tane temel belirtisi vardır. Bunlar, ağrı (dolor), hiperemi (rubor), ödem (tumor), ısı artışı (calor), ve fonksiyon kaybıdır (functio laesa)(27).Bu belirtilerden ödem ve fonksiyon kaybı dışındaki hiçbir makroskopik bulgu, diyabetik retinopatide gözlenen bulgular ile uyum sağlamamaktadır. Bununla birlikte mikroskopik düzeyde incelendiğinde inflamasyonda, damar dilatasyonu ve azalmış kan akımı, damar dışına plazma ve proteinlerinin sızıntısı, lökosit göçü ve birikiminin olduğu görülmektedir. Bu bulgular diyabetik retinopati patogenezinde, retinada gözlenen değişiklikler ile bire bir örtüşmektedir (27).

Diyabetik Retinopatideki İnflamatuar Kanıtlar:

1. Vasküler akımın ve permeabilitenin artması,
2. Maküla ödemi,
3. Neovaskülarizasyon,
4. İnflamatuar moleküllerin ekspresyonunun artması,
5. Retinal nöral ve endotelyal hücre ölümü,
6. Makrofaj infiltrasyonu,
7. Mikroglial hücre aktivasyonu,
8. Lökosit adezyonunu artması,
9. Kompleman aktivasyonu,
10. Akut faz reaktanlarının artması.

DRP'de Sınıflandırma

Erken Tedavi Retinopati Çalışma Grubu'na (ETDRS) göre diyabetik retinopatinin sınıflandırılması şöyledir:(38)

A. Hafif ve Orta Non-Proliferatif DRP (Zemin DRP): 4 kadrandan daha az alanda görülen mikro anevrizmalar, nokta veya çizgi şeklindeki intraretinal hemorajiler ve sert eksudalar.

B. Ciddi Non-Proliferatif DRP (Preproliferatif DRP): 4 kadranda görülen yaygın hemoraji ve mikroanevrizma, 2 veya daha fazla kadranda görülen venöz boncuklanma, 1 veya daha fazla kadranda görülen intraretinal mikrovasküler anomali (İRMA).

C. Proliferatif DRP (PDR): Diskte Neovaskülarizasyon, Retinal Neovaskülarizasyon, preretinal veya vitreus içi hemoraji, fibrovasküler proliferasyon, iris ve iridokorneal açıda Neovaskülarizasyon

Nonproliferatif Diyabetik Retinopati (NPDR)

Hafif-orta (background) Diyabetik Retinopati

Retinopatinin başlangıç dönemidir. Mikroanevrizmalar, az sayıda ufak retinal hemorajiler görülür. Bir yıl içinde PDR gelişme riski %5, beş yıl içinde yüksek riskli PDR gelişme riski%15'tir. Diyabetik retinopatide mikroanevrizmalar oftalmoskopik olarak saptanabilen ilk değişikliklerdir. Ve orta retina katmanlarında yerleşmiş küçük kırmızı noktalar olarak görülürler. Kapiller veya mikroanevrizma duvarları zayıflayıp rüptüre olduklarında intraretinal dot- blot hemorajilere neden olurlar.

Maküler ödem; nonproliferatif diyabetik retinopatinin önemli bir belirtisidir ve diyabetik hastalarda körlük nedenlerinin başında gelir. İntersellüler sıvı; sızıntı yapan mikroanevrizmalardan veya kapillerlerden gelir. Ödem; Retinal hücreler tarafından ayrılmış, çok sayıdaki retinal ara yüzeyden ışığın saçılmasına neden olur. Bu durum retinayı bulanıklaştırır. Sonuçta, dış pleksiform tabakadaki sıvı cepleri yeteri kadar genişse kistoid maküler ödem olarak görülebilir. Kistoid maküler ödem genellikle çok sayıda hemorajileri ve eksudaları bulunan, ciddi nonproliferatif diyabetik retinopati bulguları olan gözlerde görülür. Eğer sıvı sızıntısı yeterince fazla ise, retinada lipid birikebilir. Bu durumdan ilk olarak dışpleksiform tabaka etkilenir. Bazı olgularda lipid makulada dağınık olarak yerleşirken, diğer bir grup olgularda ise sızıntı yapan veya bir kapiller nonperfüzyon alanını çevreleyen mikroanevrizmaların çevresinde bir halka şeklinde toplanabilir. Bu paterne sirsine retinopati denir.

Orta-şiddetli (Preproliferatif) Diyabetik Retinopati

Multiple Retinal hemorajiler, cotton-wool spotlar, venöz boncuklanma ve luplar,

İRMA gibi iç retina tabakalarındaki hipoksinin belirtileri görülmeye başlar. Bir yıl içinde PDR gelişme riski %12-27, 5 yıl içinde yüksek riskli PDR riski %33' dür. Fluorescein anjiyografide geniş kapiller nonperfüzyon alanları görülür. Cotton-wool spotlar, prekapiller arteriollerin tıkanması ile oluşan sinir lifi tabakasındaki infarktlardır. Venöz boncuklanma retina kan dolaşımında yavaşlamanın önemli bir belirtisidir. Venöz luplar ise hemen her zaman kapiller nonperfüzyon alanlarının komşuluğunda yerleşirler. Lupların oluşumuna fokal vitreus traksiyonu katkıda bulunabilir. İRMA kollateral kanallar gibi fonksiyon gören dilate kapillerlerdir. Çoğunlukla retina neovaskülarizasyonlarından ayrımları güçtür. ETDRS'ye göre; İRMA, multipl retinal hemorajiler, venöz boncuklanma ve lup, kapiller nonperfüzyon, geniş kapiller nonperfüzyon alanı, fluorescein anjiyografide geniş sızıntı; PDR gelişimi için önemli risk faktörleridir.

Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR)

Başlıca belirtisi neovaskülarizasyondur. Bunlar retina ve optik diskten gelişen, retina yüzeyi veya vitreus içine doğru ilerleyen yeni damarlardır. Neovaskülarizasyonların özelliği, büzüşme yeteneği olan fibröz doku ile çevrili olmasıdır. PDR tanısı koyabilmek için retina yüzeyinde ve/veya optik disk üzerinde yeni damar oluşumunun ve birlikte fibröz doku proliferasyonunun olması şarttır. PDR diyabetik popülasyonunun yaklaşık % 5-10'unda görülür. Otuz yıllık diyabetik olguların yaklaşık %60'ında PDR mevcuttur. Ağır NPDR' si olan olgular PDR gelişme riski en yüksek olgulardır.

Klinik olarak iki dönemde incelenir

- 1- **Erken PDR:** Retinal neovaskülarizasyonlar ve minimal fibröz doku proliferasyonu ile karakterizedir.
- 2- **Yüksek Riskli PDR:** Neovaskülarizasyonlar vitreusa doğru ilerlemiş ve beraberindeki fibröz doku belirginleşmiştir. Bunlara preretinal ve vitre içi hemorajiler eşlik eder.

Neovaskülarizasyon: Non-proliferatif değişiklikler, arteriollerde nonperfüzyon ve anormal geçirgenlikle birlikte proliferatif retinopatiye dönüşür. Neovaskülarizasyon en sık orta periferik kapiller non-perfüzyon bölgesi ile bağlantılıdır ve en çok optik diskin 45 derece çevresinde, optik diskin üstünde görülür. Neovaskülarizasyon, disk üstünde veya optik diskin bir disk çapı içinde yerleşen yeni damarlardır. Retina kapillerinin tıkanıklığına bağlı olarak iç retina katlarının iskemisi sonucunda gelişir. İskemik retina

dokusunun yeni damar oluşumuna stimüle eden anjiogenik bir madde salınımına yol açtığı ileri sürülmektedir. Başlangıçta endotelyal proliferasyonlar olarak ortaya çıkar, daha sonra internal limitan membrandaki defektlerden geçerek retina ile posterior vitreus korteksi arasındaki potansiyel düzleme uzanırlar. Beraberinde fibröz proliferasyon bulunduğu traksiyonel retina dekolmanı gelişme riski taşırlar.

Hemoraji: DR’de hemoraji neovasküler dokudan kaynaklanır. İki tip hemoraji görülür. Retina önü hemoraji, mevcut vitreus dekolmanı boyunca dekole vitreus ile retina yüzeyi arasında yerleşim gösterir. Rezorbe olabileceği gibi, vitreusun içine de yayılabilir. Vitre içi kanama, ağır görme kaybına yol açar. Vitreus içine doğru büyüyen NV’a ya da oluşmuş retina önü kanamanın yayılmasına bağlı olarak gelişir. İlk vitreus kanamalarında olgunun durumuna göre ilk üç aylık sürede kendiliğinden rezorpsiyon beklenir. Laser tedavisinin uygulanmamış olması, kanama ile birlikte traksiyonel dekolmanın varlığı ve olgunun özel durumu (tek göz olması, genç olması) erken vitreoretinal cerrahi gerektirir.

Traksiyonel Retina Dekolmanı (TRD): Optik diskteki neovaskülarizasyon veya retinanın diğer alanlarındaki neovaskülarizasyon ilerledikçe, yeni damarlara karışan fibröz proliferasyon meydana gelir ve arka vitreus yüzüne yapışır. Proliferasyonun artmasıyla fibrovasküler kompleks diskten, özellikle temporal yöne doğru arkadlar boyunca ilerler; diski, üst ve alt arkadlar birleştirir. Eğer bu fibrovasküler kitle büzülürse ve en gergin vitreoretinal yapışıklıklar disk üstünde ise maküla diske doğru çekilir ve maküla dekolmanı gelişir. Fibrovasküler kitlenin proliferasyonu ve büzülmesi ile birlikte vitreus jelinin de büzülmesi, arka vitreus dekolmanında ilerlemeyle birlikte traksiyonel retina dekolmanına yol açar. Bu dekolman en sık maküla dışı bölgelerde görülür.

TRD’de ilk aşama, bir veya daha fazla anjiyojenik faktörün üretilmesine yol açan retinal iskemi gibi görünmektedir (39). Diyabetik retinopatide ve diğer retinal vasküler hastalıklarda neovaskülarizasyon gelişimine birkaç mitojenik peptit (büyüme faktörü) neden olmaktadır. Retinal ve iris neovaskülarizasyonunda yer alan büyüme faktörleri arasında insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve en önemlisi vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) bulunmaktadır (34,40–43). Çalışmaların çoğu VEGF’yi en güçlü şekilde içermektedir. VEGF sentezi hipoksi ile artırılmış ve moleküler biyolojik teknikler kullanılarak VEGF mRNA ekspresyonu gösterilmiştir (44–48). VEGF protein ekspresyonu ve lokalizasyonu bölgeleri arasında retinanın glial hücreleri (Müller hücreleri) ve ön optik sinir, retina astrositleri, retinal

pigment epitel hücreleri, retina vasküler endotel hücreleri ve retinal ganglion hücreleri bulunur (46,49,50). Bu alanda önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına rağmen, VEGF üretimi ve diğer büyüme faktörlerinin üretimi belirsizliğini korumaktadır (51).

İskeminin büyüme faktörü üretimine yol açtığı kesin mekanizmadan bağımsız olarak, artmış büyüme faktörleri seviyeleri retinal anjiyogenezi de tetikler. Bu durum retina kan damarlarından da neovasküler tomurcukların gelişimine neden olur. Bu neovasküler doku retina ve posterior hyaloid yüz arasındaki potansiyel boşlukta çoğalır. Sonunda bu dokunun sürekli büyümesi, kortikal vitreusun posterior duvarında birikmesine yol açarak çok sıkı bir yapışıklığa neden olur(52,53). Bu fibrovasküler kompleksin fibröz elemanı büzülerek vitreus üzerindeki neovasküler dokunun gerilmesine ve retinada traksiyon yapmasına neden olabilir. Bu durum daha fazla ilerlerse traksiyon retina dekolmanına ve vitreus kanamasına neden olabilir. Vitreoretinal kavşaktaki adezyonlardan neovaskülarizasyon üzerine önemli çekiş gücü uygulanırsa, retina yırtılması oluşabilir. Bu nedenle, kombine bir traksiyon / yırtıklı retina dekolmanı oluşabilir. Bu yırtılma sıklıkla fibrovasküler proliferatif adezyonların yakınında bulunur (51). Temel patofizyoloji genellikle vitreoretinal adezyonları içerdiğinden, proliferatif diyabetik retinopati için vitrektomi posterior vitreusu ayırmanın değerlendirilmesini gerektirir (54).

Diyabetik Makülopati

Diyabetik retinopatinin her döneminde gelişebilir. Nonproliferatif evrede görme kayıplarının %80'inden sorumludur. Maküla ödemi ve iskemik makülopati şeklinde izlenebilir ve bu bulguların ayrımı fundus flöresein anjiyografi (FFA) tetkikiyle yapılır.

Diyabetik maküla ödeminin prevalansı %10'dur; diyabetin süresiyle, şiddetiyle ve yaşla orantılı olarak artış gösterir. DMÖ; fokal, diffüz veya mikst tip ödem şeklinde görülebilir.

Maküla merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki (1500 µ) retinal alanlarda, retina kalınlaşması veya sert eksuda varlığı fokal diyabetik maküla ödemi olarak tanımlanır. ETDRS tarafından klinik uygulamada fokal bir ödemin şiddet ve seviyesini belirlemek ve tedavi kriterlerini saptamak için klinik olarak anlamlı maküla ödemi (KAMÖ) tanımı belirlenmiş ve retinal kalınlaşma esas alınmıştır. Buna göre fokal bir maküla ödeminin KAMÖ kabul edilebilmesi için;

1. Maküla merkezinde veya merkezin 500 µ çevresinde retina kalınlaşması,

2.Maküla merkezinde veya merkezin 500 µ çevresinde, bitişiğindeki retinanın kalınlaşmasıyla birlikte olan sert eksudaların varlığı,

3.Herhangi bir bölümü maküla merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki (1500 µ) bir alanda yerleşmiş, bir disk çapı veya daha büyük retinal kalınlaşma bölgesinin varlığı gereklidir (55).

Maküla merkezini de içine alan iki ya da daha fazla disk çapı büyüklüğündeki retina kalınlaşmaları diffüz diyabetik maküla ödemi olarak isimlendirilir. Fokal ödemden farklı olarak diffüz tipte kan-retina bariyeri büyük moleküllerin geçişine engel olduğu için sert eksuda plakları nadiren görülür. Diffüz tipte makulada kistoid değişiklikler izlenir, FFA'da çiçek paterni izlenebilir, ayrıca erken fazda retinal kapiller yatağın görünürlüğü artmıştır. Optik kohorens tomografi'de (OCT) retinal kalınlaşma düzeyi ve kistoid değişiklikler ayrıntılı olarak değerlendirilebilir.

Diyabetik Retinopati Tedavisi

Günümüzde DR'nin gelişimi ve progresyonu tam anlamıyla ortadan kaldırılamamakla birlikte, mevcut tedavi yöntemleriyle hastalarda ortaya çıkabilecek görme kayıplarının engellenmesi veya en aza indirgenmesi amaçlanmaktadır. DR ve DMÖ'de erken teşhis ve tedaviyle görme keskinliğinde artış veya stabilizasyon sağlanabilir. Tedavi, diyabetin ve varsa hipertansiyonun regülasyonu ile başlar. HbA1c'nin % 6,5, açlık kan glikoz düzeyinin 110 mg/dl, kan basıncı düzeyinin 130/85 mmHg değerlerinin altında olması önerilmektedir. Kan lipid profilinin de takibi önerilir. ETDRS çalışmasında total kolesterol seviyesi 240 mg/dl üzerinde olan hastalarda sert eksuda görülme olasılığı, 200 mg/dl 'nin altında total kolesterol düzeyi olan hastalara göre 2 kat daha fazla saptanmıştır(55).

Laser fotokoagülasyon tedavisi, santral tutulumu olmayan ödem veya görme azalması yapmayan erken ödem tedavisinde standarttır. KAMÖ varlığında fokal ödem için uygulanan laser tedavisi, maküladaki ödemi azaltmayı ve sert eksudaların rezorbsiyonunu hızlandırmayı amaçlar. Panretinal fotokoagülasyonda amaç, neovaskülarizasyon ve fibröz doku gelişiminin engellenmesi, durdurulması ve gerilemesinin sağlanmasıdır. Panretinal laser fotokoagülasyonun PDR'de 5 yıl içinde ağır görme kaybı gelişme olasılığını %50 azalttığı gösterilmiştir(56).

Laser fotokoagülasyon sonrası; görmede geçici bulanıklık, baş ağrısı, korneal abrazyon ve yanıklar, iris yanıkları, lens opasiteleri, ön kamarada sığlaşma, göz içi

basıncı artışı, fovea ve optik sinir hasarı, iskemik papillopati, maküler ödem, Bruch membranında rüptür, koroidal kanama ve neovaskülarizasyon, subretinal neovaskülarizasyon, görme alanında skotomlar, epiretinal membran oluşumu, vitreus hemorajisi, retinal yanık alanlarında genişleme gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir.

Diffüz ödemin tedavisinde laserin etkisi sınırlıdır ve farmakoterapi üstünlük kazanmıştır. intravitreal olarak kortikosteroidler ve Vasküler endotelial büyüme faktörü blokörleri (anti-VEGF ajanlar) uygulanmaktadır. Bu tedavilerle enflamatuvar mediatörlerin ve vasküler permeabilite artışına neden olan faktörlerin salınımının engellenmesi hedeflenmektedir.

Triamsinolon asetonid, fluosinolon asetonid, deksametazon, intravitreal olarak uygulanan steroid yapısındaki ajanlardır. Enflamasyonu baskılamakla birlikte VEGF düzeyini azaltırlar. Kortikosteroidlerin glokom, arka subkapsüler katarakt, pitozis, midriyazis, skleral incelme, göz kapağı cildinde atrofi, bağışıklık mekanizmalarının baskılanması sonucu enfeksiyonlara yatkınlık gibi yan etkileri vardır. Ayrıca intravitreal uygulamaya bağlı endoftalmi ve retina dekolmanı riski mevcuttur.

Ranibizumab ve aflibercept DMÖ tedavisinde onaylı anti-VEGF ajanlardır. Aflibercept, VEGF-A dışında plasental büyüme faktörünü (PIGF) de bloke etmektedir. Pegaptanib sodyum ve bevacizumab da bu gruptaki diğer ajanlardır. Antianjiyogenetik ilaçların etkisi geçici olduğundan laser tedavisiyle kombine edildiğinde etkinliğinin arttığı düşünülmektedir. Bu ilaçların miyokard enfarktüsü, serebral enfarktüs, hipertansiyon, menstrüel düzensizlikler gibi sistemik yan etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

Kalıcı vitreus hemorajileri, premaküler hemoraji, traksiyonel retina dekolmanı, vitreomaküler traksiyon, aktif fibrovasküler proliferasyon gelişiminde uygulanan vitreoretinal cerrahi ile komplikasyonların önlenmesi ve ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır.

Diyabetik retinopatinin medikal tedavisinde; antioksidanlar (E vitamini, C vitamini), aldoz redüktaz inhibitörleri (Sorbiniol, Ponalrestat), ileri glikolizasyon son ürün inhibitörleri (Aminoguanidin, Pimagedin), PKC inhibitörleri (Reboksitaurin, PKC-412), büyüme hormonu inhibitörleri, somatostatin analogları (Octreotid) gibi diğer ajanlar çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır(57).Medikal tedavideki gelişmelerle DR gelişimi, progresyonu ve komplikasyonlarının önlenmesi, laser fotokoagülasyon ve vitreoretinal cerrahiye gereksinimin azaltılması hedeflenmektedir.

Preoperatif İntravitreale Bevacizumab Enjeksiyonu:

Ciddi proliferatif diyabetik retinopati vakalarında vitrektomiye kolaylaştırmak için preoperatif intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun kullanılmasını öneren çalışmalar vardır(58). Bevacizumab, VEGF70'in tüm izoformlarını bağlayan ve intravenöz kullanım için ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanan insancıl bir rekombinant antikordur. VEGF'nin aracılık ettiği çeşitli anjiyojenik retina hastalıklarında intravitreal olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tipik doz 1.25 mg'dır, ancak 6.2 mcg kadar düşük ve 2.5 mg kadar yüksek dozlar kullanılmıştır. Özellikle aktif neovaskülarizasyon olan vakalarda bevacizumab kullanımını intraoperatif kanama riskini azaltarak fibrovasküler membranların çıkarılmasını kolaylaştırır. Vitreus kanaması nedeniyle preoperatif panretinal fotokoagülasyon yapılmadığında bu özellikle yararlıdır. Genellikle vitrektomi ameliyatı intravitreal bevacizumab enjeksiyonundan sonraki bir hafta içinde yapılır. Bu, vitrektomi yapıldığında neovasküler dokunun bir miktar gerilemesini sağlar; bununla birlikte, belirgin bir dezavantaj neovasküler dokunun fibrozisi sonucu traksiyonel retina dekolmanının ilerlemesine neden olabilmesidir(59). Bu nedenle ciddi sistemik komplikasyonları olan hastalarda dikkatli olunmalıdır, hastanın ameliyatı geciktikçe fibrozis ilerleyebilir. Ek bir endişe, bir VEGF antagonistine sistemik maruziyettir. İntravitreale 1.25 mg bevacizumab enjeksiyonu yapılan diyabetik hastalarda hem neovaskülarizasyon hem de maküler ödem'e karşı göz çalışmaları vardır(60,61). Ancak uzak etkilerinin araştırıldığı henüz bir çalışma yoktur bu nedenle sistemik yan etkileri bilinmemektedir.

Farmakolojik Vitreolizis

Proliferatif diyabetik retinopatide neovasküler doku sıklıkla fibröz bir bileşen geliştirir ve fibrovasküler kompleksinilerlemesi retina traksiyonuna ve dekolmanına yol açabilir. Şu anda, vitreoretinal adezyon sadece vitrektomi yapılarak mekanik olarak ayrılabilir. Farmakolojik vitreolizis yapabilmeyen ilaç henüz yoktur. İlaç çalışmaları başarılı olursa, seçilmiş hastalarda vitrektomi cerrahisini potansiyel olarak kolaylaştırabilir hatta ortadan kaldırabilir.

1999 yılında, doku plazminojen aktivatörü kullanılarak vitreusun retinadan ayrılmasına yardımcı olmak için ameliyat öncesi bir girişim gerçekleştirildi. Bu çok merkezli çalışmada, diyabetik vitrektomiden 15 dakika önce intravitreal enjeksiyonla 25 mcg doku plazminojen aktivatörü kullanıldı ancak vitreoretinal ayrılmaya yardımcı

olmadı (62).

İleri proliferatif diyabetik retinopatili gözlerde vitreus cerrahisine ek olarak otolog plazmin enziminin kullanımının posterior hiyaloidin çıkarılmasını kolaylaştırmakta yararlı olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (63). Bu şu anda çok merkezli, randomize bir klinik çalışmada araştırılmaktadır.

RETİNAL FİBROZİS

Fibrozis, akut veya kronik yaralanmaya yanıt olarak gelişen karmaşık, onarıcı bir süreçtir. Fibrozisin hasarlı dokuyu onarmadaki başarısı, ekstracellüler matriksin (ECM) uygun şekilde yeniden yapılandırılmasına bağlıdır, bunun içinde normal bir vasküler kanlanma gerektirir. Hasarla indüklenen kemotaktik ajanların salınmasından sonra, vasküler sistem uygun enflamatuar hücreleri hasarlı dokuya taşır ve yeni ECM sentezini ve yapılanmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte, eğer yeni ECM birikimi hatalı olursa tehlikeli bir fibrotik sürece katkıda bulunabilir. Ek olarak, onarıcı işlemin başarısı hasarlı dokunun yerine bağlıdır (64).Örneğin retinada hasarlı alanın yeri foveaya yakınsa görme keskinliğini derinden etkileyebilir.

Fibrotik sürece fibroblastların katılımı iyi bilinmektedir. Fibroblastlar, tüm vücutta bağ dokusu olan her yerde bulunurlar, sadece merkezi sinir sisteminde (CNS) bulunmazlar. Fibroblastların birincil işlevi, kollajenler, elastik lifler, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler dahil olmak üzere çeşitli ECM bileşenlerini sentezleyerek yaralanmaya yanıt vermektir. Glial hücreler, özellikle Müller hücreleri, dokulardaki fibroblastlara benzer şekilde retinadaki doku iyileşme yanıtına aracılık eder. Proliferatif diyabetik retinopatinin (PDR) gelişiminde ve ilerlemesinde hücre proliferasyonu, ECM çoğalması ve neovaskülarizasyon kilit basamaklardır(65). Bu olaylar tipik olarak hipoksi ve inflamasyona yanıt olarak büyüme faktörü tarafından yönlendirilir ve retina yüzeyinde veya vitreus boşluğunda fibrotik doku oluşumunu teşvik ederler(65,66).Sonuçta, neovaskülarizasyon sırasında fibrotik süreç tarafından üretilen çekme kuvvetleri, iç nörosensory retinanın dış retinal pigment epitelinden (RPE) ayrılmasını ve retina dekolmanı ile sonuçlanmasını sağlar (67).Hangi hücre tiplerinin PDR'de retina dekolmanına neden olan çekiş kuvveti oluşturmaya katkısı belirsiz olsa da, Müller hücrelerinin retina dekolman işlemine mekanik güç sağlamada etkili stres lifleri ürettiği bilinmektedir(68).İki tip fibrotik doku, fibrovasküler proliferatif doku ve avasküler proliferatif doku, PDR hastalarında gelişebilir ve retina dekolmanına katkıda bulunur(69).

Fibrovasküler proliferatif doku, retina yüzeyinde PDR sırasında anormal yeni damarlar büyüdüğünde oluşur. Avasküler proliferatif doku daha az yaygındır ve amorf avasküler membranlardan oluşur. Üç retina dekolmanı tipi vardır, regmatojen, traksiyonel ve eksüdatif. PDR en

sık traksiyonel retina dekolmanı ile ilişkilidir. Traksiyonel retina dekolmanı sırasında retina yüzeyindeki skar dokusu retinayı çeker, onu alt tabakadan ayırır (70).

Retinal Fibrozisin Histopatolojisi

PDR'nin histopatolojik çalışmaları, fibrovasküler proliferatif doku ve avasküler proliferatif dokunun PDR gelişimi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Fibrovasküler proliferatif doku ile ilgili histolojik çalışmalar retinadaki yüzeysel pleksus veya kılcal damarlardan çıkan yeni damarların sıklıkla fibröz ağ içinde geliştiğini göstermektedir (69). Retinal fibrozisin erken evrelerinde, anormal yeni damarlar fibrotik dokudan yoksun olarak çoğalır, ardından ara aşamada yarı saydam fibrotik bağ dokusunun damarlar arası boşlukları kademeli olarak doldurduğu görülür, geç aşamada yoğun, beyaz, avasküler skar oluşur. Fibrovasküler proliferatif doku, fibrozisin kökeninden periferik olarak genişlerken, avasküler proliferatif doku, tipik olarak fibrovasküler proliferasyonun kenarlarından uzanan ince bir zar şeklindedir. Fibrotik doku ayrıca tipik olarak fotokoagülasyon gibi terapötik tedavi bölgelerinde, özellikle düz neovaskülarizasyon alanlarında, iyatrojenik müdahaleye sekonder gelişebilir.

Retinal Fibroziste Müller Hücreleri

Retinal Müller hücreleri, retinal homeostazın korunmasına katılarak retinal fibroziste önemli bir rol oynar (71–74). Bununla birlikte, retina yaralanmasının ardından, bozulmuş homeostatik denge müller hücrelerini aktive eder, bu hücre çoğalması, hücresel şekil değişimi ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üretimi ile sonuçlanır (70,75–78). Müller hücrelerinin, retinada muhtemelen bulunmayan fibroblastların rolünü üstlendiği bildirilmektedir (66).

Müller hücreleri, astrositler ve mikroglia vasküler hücreler ile birlikte fibrotik sürece katılır (64,66,74,79). Bir çalışmada, fare retinasında astrositlerin, retinal vasküler sistemde proanjyogenik bir hücre tipi olarak etki ettiklerini, çünkü bunlar VEGF ve fibronektin üretebildiklerini ve retinal fibroziste retina anjiyogenezine katkıda bulunduğunu göstermektedir (80). Ek olarak, Müller hücreleri gibi astrositler, yaralanmaya yanıt olarak glial fibril asit proteinini (GFAP) de eksprese eder (81). Başka bir çalışma, insan diyabetik retinasındaki mikroglia'nın ECM formasyonunu, fibrozisi ve anjiyogenezini destekleyen bağ dokusu büyüme faktörünü (CTGF) eksprese ettiğini bildirmiştir (82).

Her ne kadar Müller hücreleri aracılı fibrozis retina onarımı için gerekli olsa da, bu işlem diyabetik retinopatinin ilerlemesine de katkıda bulunabilir (49,66,78,83,84).

PDR'de, artan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a (HIF-1a) 'yı artırır (42,85–89).Hipoksik Müller hücreleri, HIF-1'in stabilitesini artırır ve nükleer lokalizasyonunu indükler (90), VEGF'nin aşırı ekspresyonuna yol açar (91).HIF-2 [a], Müller hücrelerinin aktivasyonunda ve bunların hipoksiye cevaplarında da rol oynamıştır (92).Bu nedenle, HIF faktörleri Müller hücre aktivasyonuna aracılık eder. Müller hücreleri hipoksiye artmış VEGF seviyeleri ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ile cevap verir(85,90,91,93), ve retinal neovaskülarizasyonu da teşvik eder (94).Retina yüzeyinde neovaskülarizasyonun büyümesi, retinal gliosisin artmasına ve traksiyonel kuvvetlerin artmasına neden olur (66,79,95).

Müller hücre aktivasyonu, diyabetik retinopatinin patogeneğinde en erken adımlardan birini temsil eder (49,96,97). Müller hücre aktivasyonunun modülatörleri olan siklin D ve p27Kip1'in hedeflenmesi diyabetik retinopatide fibrozisin ilerlemesini düzenleyebilir, çünkü Müller hücrelerinin aktivasyonu her iki proseste de erken bir adımdır (78).Strese kronik veya şiddetli maruz kalma durumlarında, Müller hücreleri masif gliozise giderler. Hücre proliferasyonunun yerini retina, subretina ve epiretinal yüzeylerde gliotik skar alır(74,79).Diyabetik retinopati uzun vadeli bir komplikasyon olduğundan, kronik hiperglisemiye bağlı masif glioz olasılığı artabilir(49,98).

Retinal Fibroziste İnflamasyon

Enflamasyon, öncelikle anjiyogenez sürecine katkıda bulunarak fibrovasküler skar oluşumunu destekler. İnterlökin-8 (IL-8) ve tümör nekrozis faktör (TNF- α), anjiyogenik enflamatuar sitokinler, endotelyal hücre proliferasyonunu artırır ve ardından diyabetle ilişkili retinal fibrozise katkıda bulunan anjiyogenezi teşvik eder(66).Bir çalışma, bir proinflamatuvar ve proapoptotik protein olan tioredoksinle etkileşime giren proteinin (TXNIP) yeniden düzenlenmesinin, diyabetik retinada retina hasarını arttırmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Sonuçlar, retinal anjiyogenez ve fibrozu kolaylaştıran sklerotik fibronektinin indüksiyonu ile koreledir. Ayrıca, TXNIP'in blokajı diyabetik sıçanlarda retina fibrozisini iyileştirmiştir(99).İlginçtir ki, doğal immün sistemin bir parçası olan Toll like reseptör (TLR) 2 ve 4, subretinal fibroz oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (64).Bir anti-enflamatuar sitokin olan IL-10'un, subretinal fibrozisin azaltılmasında rol oynadığı gösterilmiştir, böylece fibrozisin altında yatan neden ile enfeksiyon ilişkilendirilmiştir (64).

Retinal Fibroziste Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF)

PDR hastalarında aşırı CTGF ekspresyonu olduğu ve vitreus örneklerinde CTGF'nin yüksek bulunduğu bildirilmiştir (100–103).CTGF, transforming büyüme faktörü-β'nin (TGF-β) salınımını azaltır bu da profibrotik etkileri destekler. PDR'de, hem VEGF hem de CTGF, neovaskülarizasyonu ve ardından fibrozu teşvik etmeye katılır; ancak, bu süreçlerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. VEGF'nin CTGF'yi arttırdığı ve CTGF'nin VEGF üretimini inhibe ettiği bu iki faktör arasında negatif bir geri besleme mekanizması tanımlanmıştır (104).Bu negatif geri besleme, iki büyüme faktörü arasında bir dengeye izin verir ve “anjyofibrotik geçiş” olarak bilinen bir işlem olan anjiyogenik fazdan fibrotik faza geçişi sağlar (104). Bu iki faz arasındaki denge, anti-VEGF ajanının (bevacizumab) hem neovaskülarizasyonu azaltmasınınve hemde fibrozisi artırmasının anlaşılmasında kritik öneme sahiptir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular VEGF ve CTGF'nin PDR'de retina fibrozunu kolaylaştırmak için birlikte çalıştığını göstermektedir (104).

Benzer şekilde, bir başka VEGF karşıtı ajan olan ranibizumab, VEGF seviyesini düşürür fakat aynı zamanda CTGF seviyesini yükseltir (103). Bir çalışmada CTGF siRNA ile ranibizumab kullanılarak diyabetik sıçan retinasındaki VEGF ve CTGF'ye karşı ikili tedavi yaklaşımı test edilmiş, bunun hem hedefleri normalleştirdiği bulunmuş hem de retinal mikrodamarların üst yapısını belirgin şekilde geliştirdiği bulunmuş (103).

VEGF ve CTGF'nin işlevleri bütünleşik görünmekle birlikte, her birinin kendine özgü eylemleri vardır (101).Çalışmalar, vitreoretinal bozukluklardaki fibrozis derecesinin, CTGF aktivitesine bağlı olduğunu gösterir; bu, CTGF'yi PDR'de vitreoretinal skar oluşumunu ve fibrozisin ilerlemesini önlemek için potansiyel bir terapötik hedef yapmaktadır (101,104,105).Başka bir çalışmada bu hedefe yönelik yeni bir anjiyogenik inhibitör bulunmuş, bunun insan endotel hücrelerinde CTGF aktivitesinin azaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (106).

Diyabetik Retinopati Tedavisine İkincil Retina Fibrozu

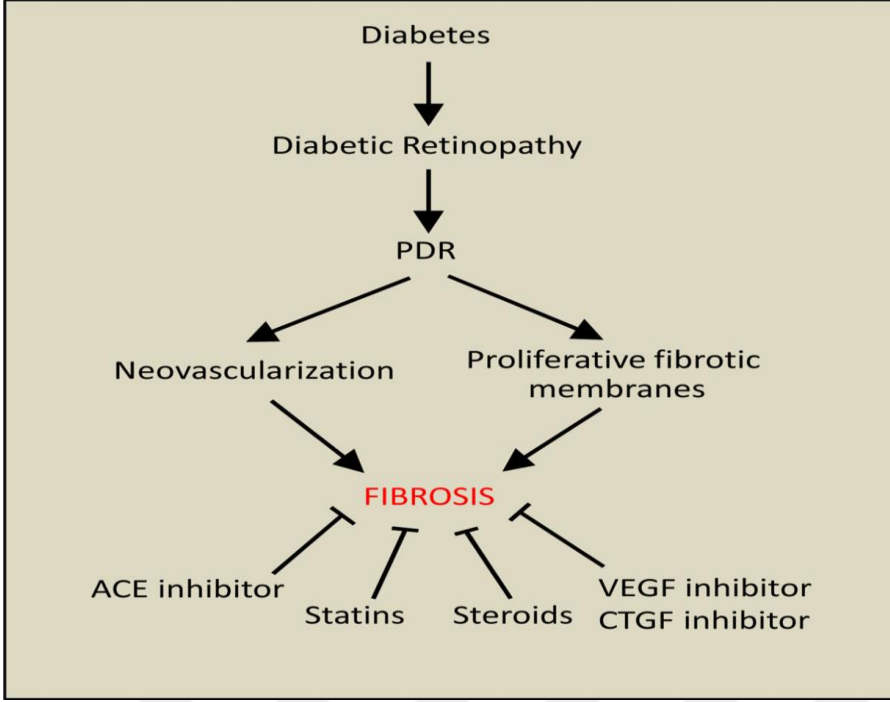
Panretinal fotokoagülasyon (PRP) ve anti-VEGF intravitreal enjeksiyonları, diyabetik retinopatinin vasküler komplikasyonlarını azaltmak uygulanır. Çok sayıda çalışma, diyabetik maküler ödem (DME) veya diyabetik retinopatili hastalarda bu müdahalelerin kısa ve uzun vadeli yararlı etkilerini analiz etmiştir (66,107–115). PRP ve VEGF karşıtı tedavilerin artmasıyla birlikte, iyatrojenik subretinal fibrozis (SRF) önemli bir endişe kaynağı olarak ortaya çıkmıştır (116,117). SRF, DME hastalarının retinalarının lazer

tedavisini takiben gelişir(116,118). İlginç bir şekilde, uzun süredir diabetik retinopatiden kaynaklanan ciddi sert eksüda hastalarının PRP'yi takiben SRF geliştirmeye daha duyarlı oldukları bulunmuştur. Her ne kadar PRP nedeniyle yan etkiler görünse de, bu zararlı etkilerin önemi belirsizliğini korumaktadır.

Retinal Fibroziste Tedavi

PDR'de retinal fibrozun önlenmesi için potansiyel inhibe edici stratejiler; statinlerin, steroidlerin ve VEGF, CTGF ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin kullanımını içerir (Şekil 1). Pro-anjiyojenik VEGF ve CTGF'nin ikili olarak baskılanması, diyabetik sıçan retinasında retina vaskülaritesinin bütünlüğünü artırır ve fibroziste bir azalma sağlar (103).Ek olarak, CTGF inhibitörü SERPINA3K, diyabetik sıçan retinasında Wnt / β -katenin yoluyla retinal ECM üretimini, fibrojenik aktiviteyi ve anjiyogenezi azaltır (119).Ayrıca, CTGF-siRNA, diyabetik sıçan retinasında ECM bileşenlerini, laminin β ve kollajen IVa3 mRNA'yı düşürmüştür (120).

ACE inhibitörü perindopril, diyabetik sıçan retinasında VEGF ekspresyonunu azaltır ve neovaskülarizasyon aracılı fibrozisi doğrudan inhibe eder. Ek olarak, ACE inhibitörleri, proliferasyonu, enflamasyonu ve fibrozisi teşvik ettiği bilinen renin-anjiyotensin sistemini bloke edebilir (121,122).Benzer şekilde, statinler veya HMG Co-A redüktaz inhibitörleri, anti-VEGF ve anti-enflamatuar özelliklere sahiptir ve anti-fibrotik etki gösterebilir (123).Ayrıca, diyabetik retinadaki VEGF'nin neden olduğu ICAM-1 ekspresyonunu baskılayarak kan retinal bariyer yıkımını azaltan simvastatin, anti-fibrotik özelliğe sahiptir (124,125).Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar birçok tedavi stratejisinin şu anda retinal fibrozise karşı test edildiğini ve yeni bir ilacın yakında keşfedilebileceğini göstermektedir.



Şekil-5: Diyabetik retinopatide retinal fibroz gelişimini ve PDR ile ilişkili proliferatif fibrotik membranların önlenmesi için potansiyel inhibitör stratejilerini gösteren diyagram.

GÖZDE SİTOKİNLER

İnterlökin-1 beta (IL-1 β), interlökin-2R (IL-2R), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF- α) ve diğer sitokinler, immünitinin düzenlenmesinde, inflamasyonda ve konağın hasara karşı cevabında rol alan peptid yapısında mediatörlerdir(126).Bu sitokinler göz dışı dokularda sinerjistikler ve birbirlerinin aktivitelerini artırırlar. Araştırmalar göstermiştir ki sitokinler retina pigment epiteli, Müller hücresi, kornea epitel ve stroma hücreleri, lens epitel hücresi ve silier cisim epitel hücresi tarafından üretilirler (127–129).IL-2 ve interferon- γ (IFN- γ)'nın göz inflamasyonlarında etkili oldukları saptanmıştır(129).IL-2'nin bilinen fizyolojik etkisi T lenfositleri için büyüme faktörü olduğudur. İnterlökin-4 (IL-4) mast hücrelerinin büyüme faktörüdür. IgE ve eosinofil aracılığıyla gelişen inflamatuvar reaksiyonlarda kritik rol oynar.

IL-6 da proinflamatuvar sitokin olarak bilinir ve IL-1 ve TNF'ün etkisiyle monosit, makrofaj, keratosit, endotelial hücreler ve fibroblastlar gibi değişik hücreler tarafından salınır (130–132).Araştırmacılar göz ön kamara sıvısında IL-6 seviyesini düşük olarak bulmuşlardır. Bu tespit IL- 6'nın gözde lokal üretimi mevcut olduğu göstermektedir(132).

Interlökin-8 (IL-8), proinflamatuvar bir mediatör kabul edilen ve nötrofiller için kemotaktik etkiye sahip bir moleküldür. Sentezi IL-1 ve TNF gibi sitokinler tarafından hızla başlatılabilir(133).

Sitokin Reseptörleri

Sitokinler tüm hücreler arasındaki iletişimi sağlayan küçük proteinlerdir. Üretilmelerinden hemen sonra salınırlar ve daha sonra aynı hücrede, komşu hücrede ve aktif transport sonrası lenfatik sistem veya kan dolaşım yolu ile uzak mesafelerde spesifik membran reseptörlerine bağlı olarak etkilerini oluştururlar. İnflamasyon, anjiyogenez, hücre büyümesi, hücre iyileşmesi gibi bağışıklık ve inflamatuvar olaylarını düzenlerler. Sitokinler farklı gruplara bölünmüştür bunlar interlokinler, interferonlar, kemokinler, koloni stimule edici faktörlerdir. İnflamasyonun fizyopatolojisinde başlıca önemli rol oynayanlar IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 ve TNF'dir. Gözde sitokinler retina pigment epiteli, Muller hücreleri, kornea epitelyum ve stroma hücreleri, lens epitel hücresi ve silyer cisim epitel hücreleri tarafından üretilirler(134).

IL-1 katarakt ameliyatı sonrası oluşan inflamasyonda anahtar rol alır. PGE2 sentezini arttırarak kan aköz bariyerini bozarlar. IL-8 idyopatik anterior uveitli hastaların kanında yüksek seviyede bulunmuştur. IL-8 uyarımı ile notrofillerin, endotel hücrelerine yapışmaları ve $\beta 2$ integrin ekspresyonunun arttırılması ile parankim içine geçmeleri sağlanır. Behçet hastalığında oral aftlar ve norolojik bulguların olduğu dönemde serum IL-8 seviyesinin artması nedeniyle bu sitokinin aktivite markırı olabileceği saptanmıştır.

Otoimmün korioretinitlerde CCL-2, CCL-3 ve CCL-5 reseptörleri retinal dokuda fazla miktarda bulunur. Retina pigment epiteli doğal kemokin reseptör antagonistleri özellikle IL-1a üreterek arka segment enflamasyonlarını ve kan retina bariyerinin devamlılığını sağlarlar.

Kortikosteroidler sitokinlerin oluşturduğu inflamasyonun güçlü inhibitörleri olup, uzun süre kullanımında glokom ve katarakt gibi önemli yan etkiler görülebilmektedir. Bundan dolayı inflamasyonda rolü olan sitokinlerin inhibisyonu araştırma konusu olmuştur.

Korneal stromada görülen Herpes simpleks virus infeksiyonlarında CXCL-10 kemokininin kullanımı inflamatuvar kemokin yapımını, mononukleer hücre infiltrasyonunu ve virüsün korneadan retinaya geçişi azaltmıştır(127). Doku tiplemesinde, immunsupresif tedavide ve cerrahi metodlardaki gelişmelere rağmen rejeksiyon kornea

transplantasyonunda greft yetmezliği nedenlerinin başında gelmektedir. Allogreft rejeksiyonu CCL-2, CCL-3, CCL-4 ve CCL-5 kemokin ekspresyonunun artmasıyla güçlü bir birliktelik gösterir. CCL-2 nin blokajı ile greft ömründe uzama bildirilmiştir(135).

ANJİYOGENEZİS

Angiogenez, önceden mevcut bulunan kan damarlarından yeni kan damarlarının köken aldığı karmaşık bir süreçtir. Kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonundan, migrasyonundan ve dokuya infiltre olmalarından önce extrasellüler matriksin (ECM'nin) lokal bir şekilde yıkılması (parçalanması) söz konusu olmaktadır. Zaman içinde bu hücreler tekrar kapiller strüktürlere re-modeling gösterirler ve yeni bir ECM birikimi olur. Angiogenez, embriyonik gelişimde ve yara iyileşmesinde olduğu kadar ayrıca kadın üreme sisteminde ve kemiğınoluşumunda, şekillenmesinde ve büyümesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Ancak angiogenezin disregulasyonu yani iyi bir şekilde regüle edilememesi çeşitli patolojik süreçlere katkıda bulunur; örneğın diabetik retinopati, romatoid artrit ve solid tümörlerin gelişimi gibi.

Normal sessiz (inaktif, istirahat halindeki) vaskulatürün angiogenez haline geçmesi, esas olarak çevrede bulunan perisitlerden ve lenfositlerden salgılanan faktörler tarafından indüklenmektedir. Bu tür angiogenik faktörler arasında direkt olarak angiogenik etki gösteren asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve timidin fosforilaz (TP) ve ayrıca indirekt şekilde etki eden transforme edici büyüme faktörü-b (TGF-b) ve TNF- α gibi faktörler bulunmaktadır. Ancak, hemen hemen sadece angiogenez yerlerinde bulunan ve düzeyleri (konsantrasyonları) kan damarlarının büyümesi ile en yakın spatial ve temporal (zamansal ve mekânsal) korelasyon gösteren tek büyüme faktörü VEGF.

VEGF-A, endotelial hücrelerde anti-apoptotiksinyaller oluşturarak hücrelerin bütünlüğünü sürdürür. Apoptozis inhibisyonunu, fosfatidil inositol-3 kinaz gibi antiapoptotik kinazların yapımının artırılması ve anti-apoptotik proteinler olan bcl-2 ve A1 ekspresyonunu artırarak sağlar. Retina pigment epitel hücreleri VEGF-A'yı membranlarının bazal (koryokapillaris) yüzlerine doğru sekrete ederler. Koryokapillarisin retina pigment epitel hücrelerine komşu endotel hücreleri her üç VEGF reseptörünü eksprese eder. Bu nedenle retina pigment epitelinin herhangi bir nedenle zarar gördüğü durumlarda koryokapillaris atrofi izlenir. Pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF) kornea ve vitreusun avaskuler kalmasında önemli faktördür. PEDF hiperoksi durumlarında

artarken hipoksi durumunda diğerk anjiyostatik maddeler olan anjiyostatin ve endostatin miktarında azalma izlenir. PEDF ekspresyonundaki artış neovasküler lezyonlardaki hücrelerde apoptozis oluşturarak regresyon sağlar. Diabetik retinopati, PVR ve yaşa bağılı makula dejerenesansında düşük vitreus PEDF seviyeleri izlenir. Anjiyogenez oluşumunda tek başına VEGF yükselmesi değil beraberinde PEDF miktarında azalma ile anjiyojenik ve anjiyostatik faktörlerin dengesinin kaybı izlenir. Neovaskularizasyon tedavisinde VEGF antagonizması ile PEDF agonizması sinerjik etki gösterir.

Anjiyogenez; kan damarlarının morfogenezisini tanımlayan fizyolojik, vasküler gelişim modelidir. Fizyolojik anjiyogenez erişkinde travma, iskemi, inflamasyon gibi patolojilerde doku iyileşme sürecinin bir bölümünü oluştururken, en güzel örneğini retinada görmek mümkündür. Retinanın temporal bölge ora-serrata civarındaki vaskularizasyonu doğumdan sonra devam eden bir süreçtir.

Fizyolojik anjiyogenezlerde vaskulogenez çok sıkı kontrol altındadır. Anjiyojenik süreç bu süreci başlatan ve devam ettiren anjiyojenik mediatorlerle devamlılık gösterir. Yeterli vaskulogenez sağlandığında anjiyojenik mediator baskılanırken lokal inhibitörler aktive olarak bu süreci sonlandıran bir denge içerisine girerler.

Anjiyogenezin normalde uyarıcı ve sonlandırıcı faktörlerin dinamik dengesinde, anjiyogenez uyarıcı faktörlerinin hâkimiyeti halinde patolojik bir süreç olan neovaskularizasyona dönüşebilir. Anjiyogenezin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması ve özellikle bu süreçte rol alan mediyatörler ve fonksiyonlarının saptanması anjiyogenezin dolayısıyla onun kontrolsüz klinik formu olan neovaskularizasyonun (NV) önlenmesi için yeni tedavi alternatifleri geliştirilmiştir. Birçok hastalığın kliniğini oluşturan NV için bugün hemen tek tedavi yaklaşımını lazer fotokoagulasyon oluşturmaktadır. Lazer fotokoagulasyon ile NV'nu uyaran faktörlerin salınımından sorumlu iskemik retina dokusu ablasyonu oluşturulur.

Anjiyogenez stimulatorleri;

- 1- VEGF-A
- 2- FGF
- 3- Anjiyopoetinler
- 4- TGF-alfa, TGF-beta
- 5- Hepatosit buyume faktörü (HGF)

6- IL-8

7- TNF-alfa

Anjiyogenez inhibitörleri;

1- Trombospondin,

2- Anjiyostatin,

3- Endostatin

4- Pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF)'dir.

VEGF-A anjiyogenezisin primer regülatörüdür.

VASKÜLER ENDOTELYAL GROWTH FAKTÖR (VEGF)

Tüm büyüme faktörleri içerisinde üzerinde en çok çalışılan faktördür. Vasküler permeabilite faktörü ya da vaskulotropin olarak bilinir. Beş izoformu tanımlanmıştır. Bunlar VEGF-A, B, C, D, E'dir. VEGF-A'nın iki tip reseptörü vardır; VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (kinase insert domain-containing receptor; KDR). VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-3 (Flt-4) reseptörü üzerinden etkilidir. VEGF-B sadece VEGFR-1 reseptörüne yüksek affinite gösterirken, VEGF-E sadece VEGFR-2 reseptörüne bağlanır. Ayrıca yeni izole edilen neuropilin-1 (NP-1) VEGF için koreseptör olup VEGF-A'nın VEGFR-2 reseptörüne bağlanmasını artırır (136).

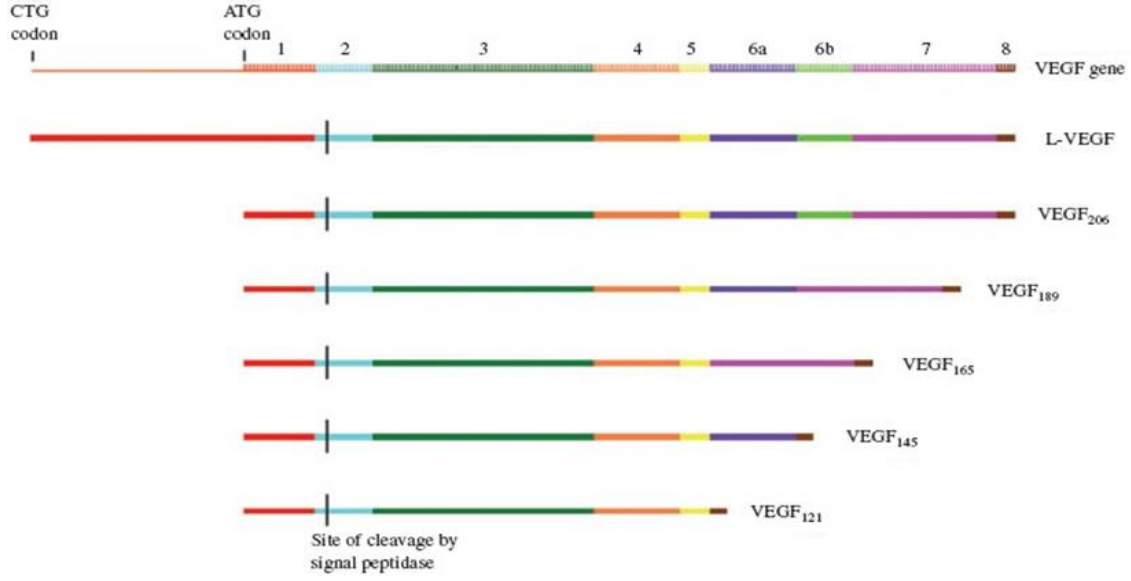
VEGF-A endotelial hücreleri ve monositleri uyararak doku faktörü (TF) yapımını artırır böylece koagülasyon zincirini aktifler. VEGFR-1'lere karşı geliştirilen antikorlar retinal ve tumoral anjiyogenezisi inhibe eder. VEGF vasküler gelişim, ovülasyon ve tumor anjiyogenezisinde rol alır. Hipoksi VEGF ekspresyonu için major regülatördür. VEGF reseptörüne bağlandığında spesifik proteinkinaz C izoformunu ($\beta 2$) aktive ederek ödem ve neovaskularizasyon oluşturur. Diabetik makula ödem tedavisinde kullanılmak üzere üretilen bir proteinkinaz C inhibitörü (LY333531) faz 3 klinik araştırma seviyesindedir(137).

VEGF geni - protein yapısı ve sekresyonu

İnsanlardaki VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yerleşmiştir. Kodlayıcı bölge ~14 kb'lik bir alan kaplamaktadır ve 8 exon'dan oluşmaktadır.(Şekil 2) Tek bir pre-mRNA'nın alternatif splicing'i (birleştirilmesi) çok sayıda farklı VEGF türünü oluşturur(138).

Bir VEGF fragmanının X-ışını kristalografisi VEGF'nin, dimerik sistein-boğumlu (ilmekli) büyüme faktörü süper ailesine mensup olduğunu göstermektedir. Her bir monomer, dört-zincirli bir beta tabakasının bir ucunda yer alan zincir-içi disülfid bağlı boğumlu bir motif ile karakterizedir. Bu super-aile, alt bölümlere ayrılmaktadır. VEGF, bu alt bölümlerden platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ailesine mensuptur. Bu alt-ailede yer alan monomerler, “yan- yana” bir oryantasyonla bir arada tutulmaktadırlar. 2 beta tabakası, 2 kıvrımlı simetriye dik olacak bir şekilde uzanmaktadır. Tüm VEGF isoformları, kovalent bağlı homodimerler şeklinde sekrete edilir. Monomerler başlangıçta, hidrofobik bağlantılarla bir arada bulunurlar ve daha sonra, bir zincirin Cys51'i ile diğer zincirdeki Cys61 arasında oluşan disülfid bağları ile stabilize edilirler. Amfipatik bir alfa heliksini içeren sinyal peptidi, bu dimerizasyon için esansiyeldir ve sekresyon sırasında klevaja uğrayarak parçalanmaktadır.(posttranslasyonel modifikasyon). Asn74 noktasında, VEGF fonksiyonları üzerinde bir etkisi yok gibi görünen ancak etkin bir sekresyon için gerekli olan potansiyel bir N-glikozilasyon yeri mevcuttur.

Exon 3'de üç asidik rezidünün olduğunu ve exon 4'de üç bazik rezidünün bulunduğu gösterilmiştir. Bu rezidüler, sırasıyla VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanmak için esansiyeldir. Dimer ara biriminde VEGF'nin her bir kutbunda son derece fleksibl üç loop kümelenmektedir. Bunlardan loop-2, VEGFR-1 bağlanma determinantları içerir ve VEGFR-2'ye bağlanan karşı monomerin loop-3'üne yakın bir şekilde uzanır. VEGF'nin her bir kutbunda bu reseptör-bağlanma ara birimlerinin pozisyonlandırılması; transfosforilasyon ve sinyalleme için esansiyel olan reseptör dimerizasyonunu kolaylaştırıyor gibi görünmektedir çünkü sadece tek bir reseptör bağlanma yerinin bulunduğu mutant dimerler VEGF aktivitesini antagonize etmektedir(139).



Şekil 6. VEGF geni exon ve intronları

VEGF ekspresyonu

Pek çok sitokin ve büyüme faktörü, VEGF mRNA'sını upregüle etmekte yada VEGF salgısını indüklemektedir. Bunlar arasında PDGF, TNF-alfa, TGF-beta, FGF-4, Keratinosit büyüme faktörü (KGF/FGF-7), Epidermal büyüme faktörü (EGF), IL-1 alfa, IL-1beta, IL-6 ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) bulunmaktadır. Bunların çoğu direkt bir angiogenik etkiden yoksundur ancak VEGF ve bFGF üzerinde angiogenik aktivite sergilerler. Koagülasyon faktörlerinden factor VII/VIIa'nın bir reseptörü olan doku faktörünün sitoplazmik kuyruğu da VEGF üretimini regüle eder ve yara iyileşme yerlerinde önem taşıyabilir.

Hipoksi, VEGF mRNA düzeylerinde hızlı ve güçlü bir artışı indüklemektedir. Bu durum özellikle, tümörlerin nekrotik alanları etrafında daha belirgin bir şekilde görülmektedir. İlginç bir şekilde, VEGF ailesinin diğer üyeleri ve bFGF hipoksi tarafından indüklenmemektedir. Bu nedenle VEGF, hipoksi ile indüklenmiş NV esas, en önemli mediatörü olmalıdır. Hipoksik hücrelerden salgılanan adenosin, adenosin A₂ reseptörlerine bağlanır ve c-AMP bağımlı protein kinaz-A (PKA) yolu üzerinde VEGF'yi upregüle eder (140).

Hipoksi yanıt elemanı (HRE), VEGF geninin üst basamaklarında yer alan bir VEGF artırımı ile ilgili bir gen bölgesidir. Bu HRE hipoksi ile indüklenbilir faktör I (HIF-1) için bir bağlanma yeri içerir. Düşük oksijen basıncı HIF-1 düzeylerini post-transkripsiyonel düzeyde artırır ve ayrıca HIF-1'in DNA-bağlayabilme kapasitesini de artırır.

Von Hippel-Lindau tümör supresörü (VHL) VEGF de dahil olmak üzere hipoksi ile indüklenen genleri negatif bir şekilde regüle etmektedir. VHL Protein kinaz-C(PKC) yi sekestre ederek hücre membranına transloke olmalarını ve buna bağlı olarak MAPK aktivasyonunu ve

VEGF'nin indüklenmesini önler. Diferansiyasyon yoluyla hücre sinyalleşmesinde görülen değişiklikler de VEGF ekspresyonunu PKC ve cAMP/PKA yolları üzerinden etkileyebilmektedir. VEGF promotör'ü, PKC ve PKA'nın gen ekspresyonunu etkilemelerine aracılık eden Sp1, AP-1 ve AP-2 gibi transkripsiyon faktörleri için çeşitli potansiyel bağlanma yerleri içermektedir.

Translasyona uğramayan 5' ve 3' gen bölgesinin içindeki 3 sinerjik sekans elemanının varlığına bağlı olarak yapısal açıdan labil olan VEGF mRNA'sının yarı ömrü hipoksi etkisiyle uzamaktadır (141). Hipoksi-ile indüklenmiş stabilite faktörünün (HuR) bağlanması bu mRNA'nın yarı ömrünü 3 – 8 kat uzatmaktadır. Alternatif bir transkripsiyon başlama yeri sürecin aşağı basamaklarında yer alan ribozomal bir giriş yerinden VEGF mRNA transkripsiyonuna izin, imkan vermektedir. Bu durum, cap-dependent translasyon inhibe edilebildiği hipoksik stres durumlarında avantaj sağlayabilmektedir.

VHL geninin inaktivasyonu, aktivatör p53 mutasyonları ve RAS'ın onkojenik mutasyonu yada amplifikasyonu gibi çeşitli spesifik transformasyon olayları da VEGF ekspresyonunu indükleyebilmektedir.

VEGF Reseptörleri ve Benzeri Etkili Reseptörler

VEGFR-1 esas olarak perisit hücrelerinde bulunmakla birlikte reseptör ligand birleşmesi ile tirozin kinaz enzimi aktive olur. Tirozin kinaz stoplazmik sinyal moleküllerinin fosforilasyonunu sağlayarak hücre içi etkileri oluşturur. Endotelial VEGFR-1, VEGFR-2 reseptörlerinin negatif regülatörüdür. VEGFR-1'in çözünür formu olan sVEGFR, VEGF'in oluşturduğu endotelial hücre proliferasyon ve migrasyonunu inhibe etmektedir. sVEGFR insan plasenta dokusunda yüksek derecede eksprese edilir ve VEGF-A etkisini regüle eder (142). sVEGFR ve VEGF-A arasındaki dengesizlik preeklamsi, intrauterin büyüme geriliği gibi vasküler problemlerin on planda olduğu durumlarda önemlidir. VEGFR-2 endotel hücrelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Tirozin kinaz aktivitesi VEGFR-1'den daha fazladır. VEGF-A'nın VEGFR-2'ye bağlanması ile endotel hücrelerinde yapısal nitrik oksid sentaz (eNOS) enzimi aktive olur. NO endotel hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve aktin sitoskeletonda reorganizasyona neden olur. Hücre içi mitojen aktive edici protein (MAP) aktivasyonu ile endotel hücre proliferasyonu gerçekleştirilir (143).

VEGFR-3 embriyonik gelişimin erken dönemlerinde venöz endotelde saptanmıştır. Daha sonra gelişimin geç safhalarında yeni gelişmekte olan lenf damarlarında izlenir. İnsanda sadece lenfatik endotelde ve bazı yüksek endotelial venüllerin VEGFR-3 eksprese ettiği saptanmıştır (144). Daha sonraki çalışmalar VEGFR-3'un epitele komşu, istirahat halindeki kan damarları endotelinde bulunduğunu epitel hücreleri ve endotel hücreleri arasında

kompleksparakrin ilişki olduğunu göstermiştir(145).

VEGF Reseptör 1 (VEGFR-1)

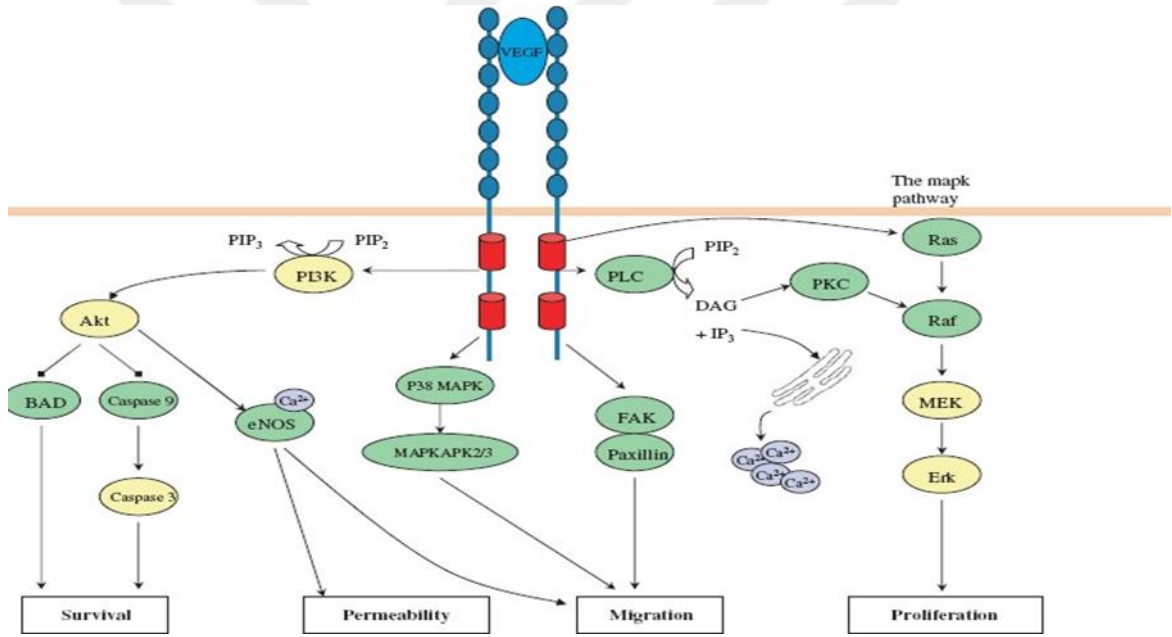
VEGFR-1 ve VEGFR-2, yüksek affiniteli VEGF reseptörleridir ve VEGFR-3 ile birlikte reseptör tirozin kinazların flt alt-ailesini oluştururlar. Bu reseptörler, 7 adet ekstrasellüler immunglobulin (Ig)-benzeri domain ve bu domainleri izleyen membran-katedici bir bölge ve korunmuş bir intrasellüler tirozin kinaz domain'i ile bu domain'in arasına giren bir kinaz insert sekansı ile karakterizedir. 68~180 kDa'luk bir glikoprotein olan VEGFR-1 tanımlanan ilk VEGFR'dir ve VEGF'ye karşı en yüksek affiniteye sahiptir (143). VEGFR-1, VEGF dışında PlGF ve VEGF-B gibi benzer büyüme faktörleri tarafından da paylaşılmaktadır. Farelerdeki ekspresyonu erişkinlerde ve embriyolarda endotel hücrelerine sınırlıdır. Bunun dışında ayrıca iyileşmekte olan cilt yaralarındaki neovaskularizasyonda da eksprese edilmektedir. Sessiz (inaktif durumdaki) endotel hücrelerinde olduğu kadar proliferen endotel hücrelerinde de VEGFR-1 mRNA'sının bulunması, bu reseptörün endotelin sürdürülmesinde sürekli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. VEGFR-1 vaskulogenez süresince esansiyeldir: VEGFR-1 oluşturamayan fareler embriyonik dönemde 8,5.nci günde ölmektedir. Bu farelerde hem embriyonik hem de embriyo dışı yerlerde endotel hücreleri normal bir şekilde formelene olabilmekte ancak doğru bir şekilde bir araya gelerek kan damarları halinde organize olamamaktadırlar. Bu defekt, mezenkimal hücrelerin hemangioblast haline gelebilmek için VEGFR-1'in gerekli olduğunu göstermektedir.

VEGFR-1'in VEGF stimülasyonuna yanıt olarak gerçekleşen tirozin fosforilasyonunun tespit edilmesi zordur ve endotel hücrelerinde bu reseptör aracılığıyla düzenlenen belirgin, görünür direkt proliferatif, migratuar ya da sitoskeletal etki söz konusu değildir. Ancak VEGFR-1, endotel hücrelerinde doku faktörünün, uPA'nın ve plasminogen aktivatör inhibitörü-1'in (PAI-1'in) upregüle edilmiş ekspresyonundan da sorumlu tutulmuştur. VEGFR-1'in diğer hücre tiplerinde monositlerde doku faktörünün indüklenmesi ve kemotaksis ve vasküler düz kas hücrelerinde matris metalloproteinaz ekspresyonunun arttırılması gibi rolleri olabilir;

VEGF Reseptör 2 (VEGFR-2)

VEGFR-2 (kinaz-insert-domaini-içeren reseptör; KDR olarak da bilinmektedir) 200 – 230 kDa'luk yüksek affiniteli bir VEGF reseptörüdür(146,147). Ayrıca VEGF-C ve VEGF-D için de reseptör görevi yapabilmektedir. İnsanlarda, tirozin

kinazreseptörleri için yapılan endotelial cDNA taramaları sırasında tanımlanan bu reseptör, daha önceden keşfedilmiş olan fare fetal karaciğer kinazı-I (flk-1) ile %85 oranında ortak bir sekans kimliğine sahiptir. VEGFR-2 oluşturamayan fareler, endotelial ve hematopietik prekursorlerin gelişiminde çeşitli defektler göstererek embriyoda 9,5.nci günde ölmektedir. Bu tür prekursor hücrelerde olduğu kadar endotel hücrelerinde, başlangıç aşamalarında bulunan hematopietik stem cell'lerde ve umbilikal kordun stromasında normalde VEGFR-2 reseptörleri eksprese edilmektedir. Ancak inaktif durumda bulunan erişkin vaskulatüründe VEGFR-2 mRNA'sı down-regüle edilmiş gibi görünmektedir. VEGFR-1 her ne kadar VEGF için daha yüksek bir affiniteye sahip olsa da, VEGFR-2 ligandla bağlandıktan sonra tirozinle çok daha etkin bir şekilde fosforile edilir. Sonrasında intraselüler pek çok yolak aktive olur ve endotel hücrelerinde mitogeneze, kemotaksise ve morfolojik değişikliklere yol açar. (Şekil 3)



Şekil 7. VEGF intraselüler etki mekanizmaları

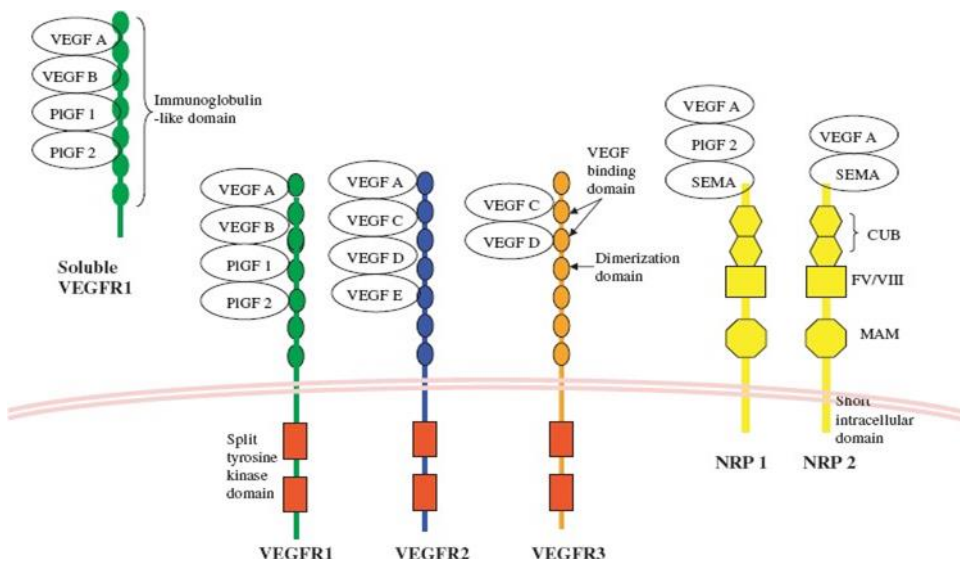
Ig-Benzeri domain'lerin VEGFR fonksiyonlarındaki spesifik rollerini tek tek ortaya çıkartmak için yeni bir çalışma başlatılmıştır. Her 2 reseptörün 2.ci ve 3.cü Ig-benzeri domain'i yüksek affiniteli ligand bağlanması için gerekli gibi gözükmektedir. VEGFR-1'de 2.ci Ig-benzeri domain'in delesyonu ligand bağlanmasını ortadan kaldırırken VEGFR-2'de 3.cü domain'in kaybı en kritik öneme sahip değişiklik gibi görünmektedir. Ig-benzeri 4.cü domain'in VEGFR-1'de reseptör dimerizasyonuna aracılık ettiği sanılmaktadır. Bu durum, VEGFR-2 için de geçerli olabilir. VEGFR-2'nin 5 ve 6.cı Ig-benzeri domain'leri, ligandla bağlanma sonrasında VEGF retansiyonu için gerekli gibi

görülmektedir. Birinci Ig-benzeri domain ise ligand bağlanmasına aracılık etmektedir çünkü bu domain'in çıkarılması VEGF ilişkisini arttırmaktadır. Her 2 VEGFreseptörü de glikozillenmiştir; bu, VEGFR-1 ligand bağlanması için esansiyel bir durum değildir ancak VEGFR-2'nin sadece matür glikozillenmiş şekli etkin bir şekilde otofosforile olabilmektedir.

HUVEC(umbilikal kord venöz endotelyal hücreleri) cDNA kitaplığından VEGFR-1'in sadece ilk 6 Ig-benzeri domain'ini içeren dallanmış solübl bir formu (sFlt-1) klonlanmıştır. sFlt-1 VEGF'ye, tam-uzunluktaki VEGFR-1 kadar güçlü bir şekilde bağlanır ve VEGF'yi sinyalleme reseptörlerinden uzaklaştırarak VEGFR-2 ile sinyalleme yapmayan heterodimerler oluştur ve VEGF aktivitesini inhibe eder. Özellikle plasentada yüksek düzeylerde sFlt-1 meydana gelmektedir. sFlt-1 plasentada, gebeliğin belirli dönemlerinde VEGF aktivitesini kontrol ediyor olabilir. VEGFR-2'nin kinaz domain'inin c-terminal yarısını içermeyen dallanmış bir formu bu hücrelerde tam uzunluktaki VEGFR-2'den daha düşük düzeylerde eksprese edilir ama VEGF tarafından en azından etkin bir şekilde aktive edilebiliyor gibi görünmektedir.

VEGF Reseptör 3 (VEGFR-3)

VEGFR-3 (Flt-4) de reseptör tirozin kinazların flt alt-ailesinin bir üyesidir. Ancak bu reseptörün ekspresyonu esas olarak, erişkin dokuların lenfatik endoteline sınırlı gibi görülmektedir. VEGFR-3, VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlar ancak VEGF'yi bağlamaz. Bu reseptörün lenfangiogenezi kontrol ettiği düşünülmektedir.



Şekil 8. VEGFR-1,2,3 ve Nörofilin reseptörüne bağlanabilen moleküller gösterilmiştir.

VEGF reseptör uyarımı sonrası sinyal iletimi

VEGF reseptörleri dimerlerden oluşmaktadır. Dimer ara biriminde VEGF'in her bir kutbunda, birbirinden ayrı olan ancak iç-içe geçen, örtüşen VEGFR-1 ve VEGFR-2 bağlanma yerleri mevcuttur. VEGF üzerindeki bu yerlerde bulunan reseptör monomerlerinin etkileşimi reseptör dimerizasyonunu ve buna bağlı olarak transfosforilasyon yoluyla aktivasyonu indüklemektedir. Yani VEGF reseptöre bağlanınca monomerler dimerize olmaktadır ve intraselüler aktivasyon başlamaktadır. VEGFR-1 ve VEGFR-2 ve aynı zamanda oluşan homodimerler de heterodimerize olabilmektedir. sFlt-1 (erimiş haldeki VEGFR1) ve VEGFR-2 sinyalleme yapmayan kompleksler oluşturabilir. İn vivo koşullarda endotel hücreleri için mitogenik ve kemotaktik etkili olan PlGF-VEGF heterodimerleri de mevcuttur.

VEGFR-2, endotel hücrelerinin VEGF'ye karşı verdiği hemen hemen bütün cevaplara aracılık ediyor gibi görünmektedir. Tam tersine, VEGFR-1 her ne kadar monosit migrasyonunu indükleyebilse de VEGFR-1'e yanıt olarak ortaya çıkan endotel hücre migrasyonu kesin bir şekilde gösterilememiştir. VEGFR-1 stimülasyonuna karşı belirgin endotel hücre yanıtlarının olmaması bazı kimselerin, VEGFR-1'in esas rolünün VEGFR-2 aracılığıyla oluşan sinyallemeyi engelleyerek VEGF'i sekestre eden yalancı bir reseptör olduğu spekülasyonun öne sürülmesine yol açmıştır. Gerçekten de, tirozin kinaz domain'i bulunmayan VEGFR-1 ekspresyon eden fare embriyoları normal bir gelişim ve angiogenezi sergilerler. Bu farelerde sadece, VEGF-aracılı makrofaj migrasyonu etkilenmektedir. VEGFR-1 baskın olarak ligand-bağlayıcı bir molekül şeklinde etki ediyorsa PlGF ve VEGF-B esas olarak VEGF ve VEGFR-2 bağlanmasını sağlamak için mevcut bulunuyor olabilir. Bu tür bir rekabet (yarışma) PlGF'nin düşük konsantrasyonlardaki VEGF'nin bioaktivitesini potansiyalize edebilmesini açıklamaktadır. Ortamdaki PlGF VEGFR1'e bağlanarak mevcut bulunan VEGF'i indirekt bir yol ile VEGFR2'ye yönlendirmektedir.

VEGF ile ilişkili sinyal transdüksiyon olaylarının ortaya çıkartılması VEGFR'lerin ekspresyonundaki ve sinyal iletimindeki hücrelere spesifik ve dokulara spesifik farklılıklardan dolayı kolay olmamıştır. HSPG'ler ve neurophilinler gibi potansiyel olarak modulator grupların varlığı tabloyu daha da karmaşıktır. VEGF sinyalleme ile ilgili mevcut güncel bilgiler hala tam anlamıyla ortaya konamamıştır

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Hastaların Seçimi

Çalışmaya Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Retina departmanına Aralık 2019 – Mart 2020 ayları arasında başvuran proliferatif diyabetik retinopati tanısıyla intraokuler hemoraji ve veya traksiyonel retina dekolmanı olup pars plana vitrektomi ameliyatı ve ameliyat öncesinde intravitreal bevacizumab enjeksiyonu planlanan 23 hasta alındı. Proliferatif diyabetik retinopati tanısı fundus muayenesi, OKT ve FFA ile desteklenerek konuldu.

Çalışmaya alınma kriterleri; proliferatif diyabetik retinopatiye bağlı komplikasyonlar nedeniyle ameliyat planlanan hastalar, ameliyat öncesinde intravitreal bevacizumab yapılması planlanan hastalar ve 18 yaşından büyük hastalar çalışmaya alındı.

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri; çalışmaya alınmayan gözde görme keskinliğinin el hareketi (EH) veya EH düzeyinin altında olan, TRD ile beraber regmatojen retina dekolmanı olan, son anti-VEGF tedavisi üzerinden 6 aydan kısa süre geçmiş olan hastalar çalışmaya alınmadı.

Çalışma Deseni

Hastalardan ilk vitreus örneği bevacizumab enjeksiyonu öncesinde ikinci vitreus örneği ise pars plana vitrektomi (PPV) ameliyatı öncesinde alınmıştır.

Hastalardan vitreustan örnek alma biçimi, intravitreal enjeksiyonların ve PPV ameliyatının uygulanış biçimi, beklenen etkisi ve olası komplikasyonları hakkında bilgilendirildi ve işlemin gerçekleştirilmesi için bilgilendirilmiş onam formları alındı

Hastaların enjeksiyon öncesindeki sistemik ve oftalmolojik hikayeleri kaydedilip, enjeksiyon öncesinde ve pars plana vitrektomi ameliyatı sonrası 1. gün, 3. gün, 1. hafta, ve aylık kontrollerinde oftalmolojik muayeneleri yapıldı. Snellen eşeli kullanılarak en iyi düzeltilmiş görme keskinliği ve yarıklı ışık biomikroskopisi ile muayeneleri yapılarak ön segment bulguları değerlendirildi. Goldmann applanasyon tonometresi ile göz içi basınçları ölçüldü. Tropikamid ve fenilefrin damla ile pupiller dilatasyonun ardından 90 D lens ile detaylı fundus muayeneleri yapıldı.

Örnek Alınma Biçimi ve Enjeksiyon Tekniği

Tüm müdahaleler ameliyathane koşullarında yapıldı. İntravitreal bevacizumab enjeksiyonu öncesi 1cc(lidokain+bupivakain karışımı) peribulber anesteziden sonra göz

kapakları ve çevresi %10' luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Steril kapak ekartörü yerleştirildikten sonra fakik gözlerde limbustan 4 mm, pseudofakik gözlerde limbustan 3.5 mm uzaklık pergelle işaretlendi ve transkonjuktival 23 gauge sklerotomi açılarak, okutomun aspirasyon ucuna enjektör takılmış bir vaziyette 0,5 mL vitreus örneği alındı. Bu işlemlerin hiç birinde ön kamara koruyucu ve infuzyon kullanılmadı. Örnek alındıktan sonra sklerotomi girişinden vitreus içine 0.5 mg bevacizumab enjekte edildi. Göz hipotonisini engellemek için gözün tonusu digital olarak kontrol edilerek vitreus içine sıvı enjekte edildi. Hastaların ışık hissini olup olmadığı sorgulandı. Tüm hastaların gözü antibiyotikli pomad ile kapatıldı ve 1 hafta kullanmak üzere antibiyotikli damla verildi. Ani görme azalması, ağrı, kızarıklık gibi şikayetlerinin olması durumunda acile başvurmaları konusunda uyarıldı. Hastalar ertesi gün kontrole çağrılarak biomikroskopik muayene ile enfeksiyon açısından ve ani göz içi basınç artışı açısından muayene edildi.

Alınmış örnekler steril endorf tüplerine yerleştirildikten sonra, -80 derecelik sıvı azot tankında dondurulup, -80 derecede buzdolabında bekletildi. Örnekler hep aynı cerrah tarafından alındı. Hiçbir operasyonda komplikasyon gelişmedi.

Pars plana vitrektomi ameliyatı öncesi retrobulber anesteziden sonra göz kapakları ve çevresi %10' luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Steril kapak ekartörü yerleştirildikten sonra fakik gözlerde limbustan 4 mm, pseudofakik gözlerde limbustan 3.5 mm uzaklık pergelle işaretlendi ve transkonjuktival 23 gauge sklerotomi açılarak, okutomun aspirasyon ucuna enjektör takılmış bir vaziyette 0,5 mL vitreus örneği alındı. Sonrasında rutin PPV cerrahi prosedüre devam edildi. Ameliyat sonrası hastalar göz servisinde takip edildi.

Alınmış örnekler steril endorf tüplerine yerleştirildikten sonra, -80 derecelik sıvı azot tankında dondurulup, -80 derecede buzdolabında bekletildi. Örnekler hep aynı cerrah tarafından alındı. Hiçbir operasyonda komplikasyon gelişmedi.

Proteomiks Analizi

Proteomiks genomun tüm protein komplementlerini (proteom) çalışan bir bilim dalıdır. Proteomiks ve proteom terimleri Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1990'larda türetilmiştir. Bu kelimeler tüm bir organizmadaki tüm genlerin koleksiyonlarını ifade eden genomiks ve genom kelimelerinin yansımalarıdır. Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade

bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır(148).Hücrede gerçekleşen posttranslasyonel modifikasyonlar normal ve patolojik dokulardaki farklılıkları belirler ve proteinde görülen post-modifikasyonların tümünün bilgisini protein kodlayan bölgelerdeki genomik bilgi tek başına veremez. Bu nedenlerle, genomik çalışmalar her zaman nihai protein ekspresyonu hakkında doğru bilgiler sağlayamaz iken yapılan proteom çalışmaları, hastalık patolojisini ve fenotipini genomik çalışmalardan farklı yollarla ortaya çıkarabilmektedir.

Hastalıkların erken tanısı, risklerin veya tedavi yanıtlarının izlenebilmesi için biyobelirteçlerin keşfi; klinik sonuçları düzeltebilecek yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için protein hedeflerinin tespit edilebilmesi klinik proteomiksin temel amaçlarındandır.

Biyobelirteçler

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür(149).Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesi bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesiyle mümkün olabilmektedir. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır. Biyobelirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metodlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde biyobelirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir biyobelirteçle ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir.

Tampon Çözeltilerin Hazırlanması:

Tampon çözeltiler tablo-1 'de verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo:1 DeneyledeKullanılan Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

| Tampon Çözelti Adı | Konsantrasyonu ve Miktarı | Hazırlanışı |
|-------------------------------------|---|---|
| Tris.HCl pH 8.8 | 1.5 M, 100 ml | 18.15 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 8.8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı. |
| Tris.HCl pH 6.8 | 0.5 M, 100 ml | 6 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 6.8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı. |
| SDS | % 10, 10 ml | 1 g SDS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı. |
| Amonyum Persülfat (APS) | % 10, 10 ml | 1 g APS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı. |
| 6X Yükleme boyası (6 X Loading Dye) | 0.5MTris-HClpH 6.8,Glycerol(%99.7) ,%10SDS,β-Mercaptoethanol, %0.5(w/v) Bromphenol blue | 1ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8 ,2ml Glycerol (%99.7),1.6ml%10SDS,0.4ml β-Mercaptoethanol, 0.4ml %0.5 (w/v) Bromphenol blue 2.6ml distile su ilave edildi. |
| Akrilamid/Bisakrilamid | % 30, 100 ml | 29.2 g Akrilamid, 0.8 g Bisakrilamid tartılıp 100 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı. |
| SDS-PAGE Yürütme Tamponu | 5X, 300 ml | 4.5 g Tris, 21.6 g Glisin ve 1.5 g SDS distile suda çözülerek 5X tampon 1X 'e seyreltildi. |

| | | |
|---|--|--|
| SDS-PAGE Sabitleştirici Solüsyon (Fiksatif) | % 40 Metanol, % 10 Asetik asit, 100 ml | 40 ml Metanol ve 10 ml Asetik Asit karıştırılarak distile su ile 100 |
|---|--|--|

| | | |
|---------------------------------|---|--|
| | | ml'ye tamamlandı |
| Western Blot Transfer Tamponu | 100 ml | 0.58 gr Tris, 0.29 gr Glisin, 0.025gr SDS (0.375 ml %10 SDS'den) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. |
| TBS-T pH 7.6 | 25 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 % 0.1 Tween 20, 1L | 2.42gr Tris, 8gr NaCl, 1ml Tween 20 900 ml distile suda çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlandı. 1ml Tween20 eklendi. |
| Bloklama Tamponu (Western Blot) | % 5, 10 ml | 5 g süt tozu (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, ABD)), 10 mL TBST içinde çözüldü ve filtre kâğıdından geçirilerek kullanıldı. |
| HyperFilm Developer Solüsyonu | Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika) | Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml distile su, 50 ml solüsyon A, 2 ml solüsyon B ve 2 ml solüsyon C ile karıştırılarak kullanıldı. |
| HyperFilm Fiksleme Solüsyonu | Kodak RP X-OMAT LO (Carestream Health, Belçika) | Üreticinin tavsiye ettiği şekilde hazırlandı. 140 ml distile su, 50 ml solüsyon A ve 10 ml solüsyon B ile karıştırılarak kullanıldı. |
| 2DE-Rehidrasyon Örnek Tamponu | 8 M Üre, 50 mM DTT, % 2 (w/v) CHAPS, % 0.2 (w/v) Amfolit pH 3-10, % 0.001 Bromofenol mavisi 50 ml | 24 gr Üre, 1 gr CHAPS, 0.385 gr DTT, 250 µl Amfolit (% 40) ve 0.5 mg Bromofenol mavisi karıştırılıp distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. |

Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi:

Protein miktarlarını ölçmek için Bradford Assay (Bradford, 1976) yöntemi kullanıldı. Ölçülecek protein özütünden 1 µl alınarak 19 µl standart tamponu ile karıştırıldı. Karışım üzerine 1ml 1X Bradford Reagent (Bio-Rad, ABD) eklenerek vortexlendi ve karanlıkta 5

dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnekler Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile 595nm’de ölçüldü. Örneklerin ölçülen protein konsantrasyonları daha önce 595 nm’ye göre hazırlanmış BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler 3 defa tekrarlandı ve bu tekrarların ortalamalarından elde edilen sonuçlar protein örneklerinin konsantrasyonları olarak kabul edildi.

Proteinlerin çöktürülmesi:

Protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jellerde daha iyi ayırma tabi tutulabilmesi için tuzlardan, lipidlerden, deterjanlardan, nukleik asitlerden ve fenolik birleşikler gibi kirleticilerden temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaç için “BioRad ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit” i (Bio-Rad, ABD) kullanılarak proteinler çöktürüldü. Çöktürme işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi, protokol şu şekilde özetlenebilir. Konsantrasyonu 1-500µg arasında, final hacmi 100µl olan protein örneğinin her biri 1.5 ml lik mikro santrifüj tüpe aktarıldı. Protein örneğine 300µl çöktürme solüsyonu 1 eklendi, iyice vorteks yaparak 15 dk buzda bekletildi. Karışımın üzerine 300 µl çöktürme solüsyonu 2 eklendi, iyice vorteks yaparak 15 dk buzda bekletildi. Sıkı bir pellet oluşturma amacıyla yüksek hızda (> 12,000 x g) 5 dk +4°C’de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda pelletler dağılmadan hemen buz üzerine aktarıldı. Çöken proteinlerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrıldı. Ardından pelletin üstüne 40 µl yıkama reaksiyon solüsyonu 1 ekleyip yüksek hızda (> 12,000 x g) 5 dk +4°C da santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yıkama reaksiyon solüsyonu pipetle uzaklaştırıldı. Pellet üstüne 25µl ReadyPrep proteomik ultura saf su ekleyip , 10–20 saniye vorteks edildi. Ardından 1 ml yıkama reaksiyon solüsyonu 2 (önceden -20°C’de bir saat bekletiliyor) ve 5 µl katkı solüsyonu eklenip, 1 dakika vorteks edildi. Tüpler -20°C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 10 dakikadan bir 30 saniye vorteks yapıldı. İnkübasyon bitikten sonra, tüpler yüksek hızda 5dakika santrifüj edildi. Sıvı kısmı dikkatli şekilde uzaklaştırıldı. Tüplerin kapağını 5 dk oda sıcaklığında açık bekleterek kurutuldu. Pellete 2-D rehidrasyon tamponu içerisinde çözülerek yüksek hızda oda sıcaklığında 5dk santrifüj edildi. Son olarak protein örnekleri temizlendikten sonra yeni tüpe aktarılıp kullanma amacıyla -80°C da dondurup kaldırılırdı.

SDS-PAGE Protein Jel Elektrofrezisi:

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kesintili SDS poliakrilamid jel elektrofrezisi(SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. Örneklerin çöktürme çncesi ve sonrası karşılaştırmalarının yapıldığı jeller %12’lik, western blot çalışmalarımın yapıldığı jeller ise %15’lik hazırlandı. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Tablo-2’de verilen kimyasallar kullanılarak hazırlandı. Tablo-2’de verilenden farklı jel

yüzdesi kullanılacak ise bu konsantrasyonların hesaplanması için <http://www.changbioscience.com/calculator/sdspd.htm> web adresinden faydalanıldı.

Tablo 2: SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları

| Kullanılan Kimyasallar | Ayırma Jeli (% 12) | Ayırma Jeli (% 15) | Yükleme Jeli (% 4) |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| dd H ₂ O | 3.3 ml | 2.3 ml | 3 ml |
| 1.5 M Tris, pH 8.8 | 2.5 ml | 2.5 ml | - |
| 0.5 M Tris pH 6.8 | - | - | 1.25 ml |
| % 10 SDS | 100 µl | 100 µl | 50 µl |
| % 30 Akrilamit/BisAk | 4ml | 5ml | 670 µl |
| % 10 APS | 100 µl | 100 µl | 50 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| Toplam | 10 ml | 10 ml | 5 ml |

Ayırma jeli 50 ml'lik Falcon tüp içerisinde hazırlandıktan sonra kendinden 1mm aralıklı (spacer) kalın ve ince camlar arasında döküldü ve üzerine nazikçe izopropanol (300 µl) konularak jelinyüzeyinin düzleşmesi sağlandı ayrıca hava ile olan teması da engellendi. Bu şekilde polimerizasyon hızlandırıldı ve aynı zamanda pürüzsüz bir yüzey elde edildi. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra izopropanol döküldü ve jelin yüzeyi saf su ile yıkandı. Jel üzerinde cam plakalar arasında kalan su kurutma kağıdı yardımıyla tamamen uzaklaştırıldı. Yükleme jeli hazırlanarak polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine döküldü ve cam plakalara uygun 1mm genişliğindeki teflon tarak yerleştirildi. Yükleme jeli de polimerize olduktan jeller ya hemen kullanıldı ya da daha ileride kullanılmak üzere nemli kurutma kağıdı ile sarılarak +4°C'de saklandı.

SDS jeller yürütüleceği zaman cam plakalar elektrotların bulunduğu Tetracell elektroforez (BioRad, USA) tanklarına yerleştirildi. Elektroforez tankları uygun seviyeye kadar 1X SDS-PGE yürütme tamponu konularak yürümeye hazır hale getirildi. Yüklenecek istenen protein özütlerinin üzerlerine 6X yükleme tamponundan (0.5M Tris-HCl pH 6.8, Glycerol (%99.7), %10 SDS, β-Mercaptoethanol, %0.5(w/v) Bromphenol blue, dH₂O) 1X olacak şekilde eklenerek 95 °C'deki su banyosunda 4 dakika kaynatılarak proteinlerin ileri denatürasyonları sağlandı. Kaynatma süresi sonunda örnekler buza alındı ve kısa bir santrifüj sonrası mikropipet yardımıyla jel içerisindeki kuyucuklara yüklendi. Jel, 180V akım verilerek 60 dakika boyunca yürütüldü. Yürütmesi tamamlanan jel camlar arasından çıkarılarak yapılacak çalışmaya göre ya % 40 metanol % 10 asetik asit fiksasyonu ardından boyandı ya da western blot için kullanıldı.

Western Blotlama:

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı ve nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef protene özgü antikorlarla analiz edildi. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponun içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi. Bekleme esnasında nitroselüloz membran ve Whatman kağıtları da transfer tamponunda ıslatıldı. Süre sonunda transfer cihazının demir levhaları arasına alttan üste doğru sırasıyla 2 kat Whatman kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 2 kat Whatman kağıdı olmak üzere (-) ve (+) kutuplara dikkat edilerek katmanlar halinde yerleştirildi. Katlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek 25 V sabit akımda 30 dakika boyunca transfer gerçekleştirildi. Transferin ardından membran proteinleri boyayan Ponceau S boyası ile boyanarak western transferinin kalitesi kontrol edildi. Protein bantları gözlemlendikten sonra boya saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve membran % 5 NFD/MS-T bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılarak sırasıyla 15, 5, 5 dakika olmak üzere 3 kez MS-T ile yıkandı. Üreticinin tavsiye ettiği dilüsyonda birincil (Tablo-3) antikor MS-T içerisinde hazırlandı ve membran bu tampon içerisinde +4 °C'de gece boyu nazikçe çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün önceki yapılan MS-T ile yıkama işlemi tekrarlandı ve üreticinin tavsiye ettiği ikincil antikor MS-T içerisinde seyreltildi ve membran bu tampon içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Görüntüleme yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans (Biorad, ABD) kullanıldı. Kemilüminesans görüntüleme için Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak membran yüzeyine konuldu ve yüzeyin tamamının çözelti karışımı ile temas etmesi sağlandı. Membran streç film arasına alınarak fazla sıvı peçete yardımı ile uzaklaştırıldı. Görüntüleme için hazırlanan membran Hypercasette (Amersham, Biosciences) içerisine sabitlendi. Karanlık odada membran üzerinde oluşan ışınmayı algılayabilecek yüksek duyarlılık bir X-Ray filmi yerleştirildi. Sinyalin filmi yakması için 1-3 dakika beklendi. Bekleme süresi sonunda film membran üzerinden alınarak HyperFilm developer solüsyonunda 1 dakika yıkanarak oluşan bantlar izlendi. Ardından saf su ile yıkandı ve HyperFilm fiksasyon solüsyonunda 1 dakika bekletilerek görüntü sabitlendi. Fiksasyon sonrası film saf su ile yıkanarak gözlenen bantlar analiz edildi.

Tablo-3: Western Blot analizinde kullanılan primer (1°) ve sekonder (2°) antikorların listesi ile antikor dilüsyon oranları.

| 1° Antikor | 2° Antikor |
|---|---|
| IGF-I (SC-74116, Santa Cruz, ABD) (1:300) | Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Biorad, ABD) (1:10000) |
| PIGF (SC-518003, Santa Cruz, ABD) (1:300) | |
| VEGF (SC-7269, Santa Cruz, ABD) (1:300) | |
| VE-cadherin (SC-52751, Santa Cruz, ABD) (1:300) | |
| ANG I (SC-74528, Santa Cruz, ABD) (1:300) | |
| Fibulin-1 (SC-55470, Santa Cruz, ABD) (1:300) | |

Analizlerde Kullanılan Yazılım:

Quantity One Programı (Bio-Rad, ABD)

Bu yazılım sayesinde jellerin ve western blot filmlerinin görüntüleri alınmıştır. Ayrıca yine bu program sayesinde western blot görüntülerine ait bant intensiteleri hesaplanarak analiz edilmiştir.

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ve Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun izni ile gerçekleştirildi. (Etik No: KAEK 10.2)

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama±standart sapma, kategorik değişkenler ise frekans (yüzde) olarak verilmiştir. Bağımlı iki grup arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için bağımlı gruplarda t testi ile belirlenmiştir. İki yönlü hipotezlerin testinde $p < 0.05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edilmiştir.

0,05 hata payı, 0,98 etki büyüklüğü ve 23 kişi ile ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulabilmek için yapılan çalışmanın gücü 0,99' dur.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 11 kadın 12 erkek toplam 23 hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 59,3 idi. Hastaların ortalama diyabet hastalık yılı 13,4 idi. İntravitreal bevacizumab (IVB) enjeksiyonu ile PPV arasındaki süre 3 hastada 4 gün, 2 hastada 10 gün diğer hastalarda 7 gündü.

Demografik veriler tablo-1 de gösterilmiştir.

Tablo-4: Demografik veriler

| | |
|---|------------|
| Yaş | 59,39±9,94 |
| Diyabet hastalık yılı | 13,96±8,13 |
| Traksiyonel retina dekolmanı (TRD) hasta sayısı | 6 |
| İntraokuler hemoraji (IOH) hasta sayısı | 9 |
| TRD ve IOH hasta sayısı | 8 |
| IVB ile vitrektomi arasındaki süre | 6,87±1,42 |

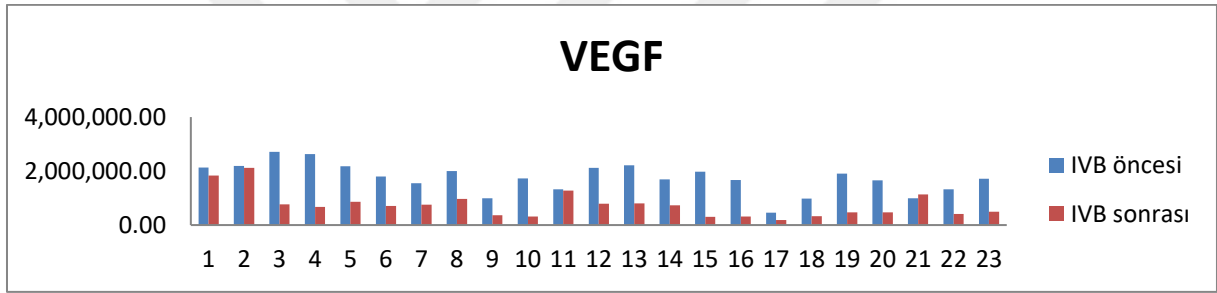
Çalışmamızda intravitresl bevacizumab (IVB) öncesinde ve sonrasında alınan örneklerden 6 adet protein, proteomiks analizi ile incelenmiştir. Analiz için seçilen sitokinler, vasküler endotelyal growth faktör (VEGF), insülin growth faktör 1 (IGF-1), plasental growth faktör (PIGF), Angiogenin (Ang-1), Vasküler endotelyal cadherin (VE-cadherin), Fibulin-1 idi. VEGF düzeyi İVB öncesi ortalama $1.736.734,55 \pm 545.847.959$ iken PPV öncesi $742.532,93 \pm 480.965.121$ idi ($p=0,000$). İVB öncesi ve sonrası aldığımız örneklerde VEGF düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı.

Tablo-5 : VEGF, IVB öncesi ve sonrası değerler

| Örnekler | VEGF | |
|----------|--------------|--------------|
| | IVB Öncesi | IVB Sonrası |
| 1 | 2.131.261,04 | 1.835.340,16 |
| 2 | 2.193.914,07 | 2.114.268,45 |
| 3 | 2.710.442,00 | 766.449,49 |
| 4 | 2.632.475,91 | 673.750,53 |
| 5 | 2.182.476,18 | 860.618,34 |
| 6 | 1.793.475,91 | 702.952,32 |
| 7 | 1.553.914,07 | 757.619,72 |
| 8 | 1.996.538,65 | 962.576,02 |
| 9 | 994.708,76 | 363.023,08 |
| 10 | 1.726.496,86 | 311.920,35 |
| 11 | 1.324.748,82 | 1.275.829,19 |
| 12 | 2.122.585,80 | 788.648,79 |
| 13 | 2.210.552,63 | 801.137,94 |
| 14 | 1.696.308,63 | 732.998,99 |

| | | |
|-----------------|---------------|---------------|
| 15 | 1.980.129,53 | 309.182,41 |
| 16 | 1.669.458,91 | 318.219,35 |
| 17 | 455.475,91 | 186.916,59 |
| 18 | 974.623,53 | 325.310,54 |
| 19 | 1.901.901,52 | 465.229,11 |
| 20 | 1.660.334,94 | 473.612,12 |
| 21 | 991.261,04 | 1.139.616,42 |
| 22 | 1.329.495,47 | 416.347,60 |
| 23 | 1.712.314,43 | 496.689,77 |
| TOPLAM | 39.944.894,61 | 17.078.257,28 |
| ORTALAMA | 1.736.734,55 | 742.532,93 |

Grafik-1: VEGF, İVB öncesi ve sonrası değerler



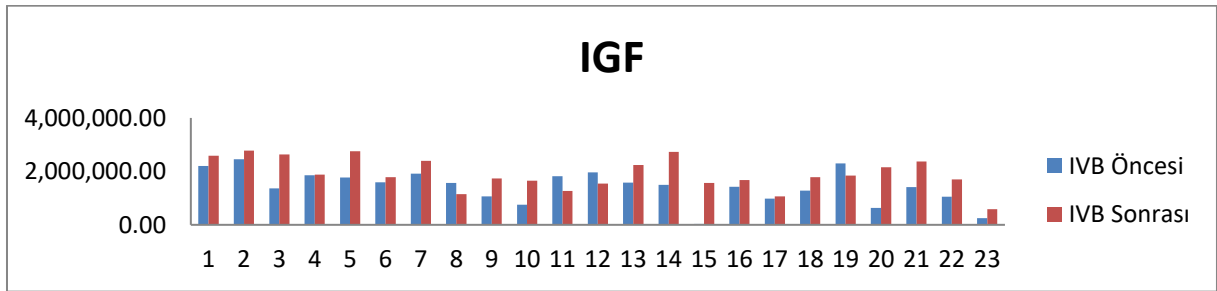
IGF düzeyi İVB öncesi ortalama $1.423.568,363 \pm 616.444,361$ iken PPV öncesi $1.908.845,519 \pm 589.582,374$ idi ($p=0,001$). İVB öncesi ve sonrası aldığımız örneklerde IGF düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı.

Tablo-6 : IGF, İVB öncesi ve sonrası değerler

| Örnekler | IGF | |
|----------|--------------|--------------|
| | İVB Öncesi | İVB Sonrası |
| 1 | 2.200.106,16 | 2.591.387,79 |
| 2 | 2.452.338,58 | 2.773.624,05 |
| 3 | 1.361.612,03 | 2.636.821,56 |
| 4 | 1.850.124,40 | 1.880.689,65 |
| 5 | 1.770.627,35 | 2.755.446,78 |
| 6 | 1.586.561,39 | 1.788.520,45 |
| 7 | 1.910.221,09 | 2.394.987,23 |

| | | |
|-----------------|----------------------|----------------------|
| 8 | 1.571.240,17 | 1.153.851,23 |
| 9 | 1.059.452,44 | 1.734.967,41 |
| 10 | 751.813,92 | 1.653.851,23 |
| 11 | 1.822.923,18 | 1.273.851,23 |
| 12 | 1.961.872,93 | 1.538.520,45 |
| 13 | 1.581.375,17 | 2.236.821,56 |
| 14 | 1.495.605,48 | 2.726.821,56 |
| 15 | 37.576,34 | 1.569.689,65 |
| 16 | 1.421.515,21 | 1.675.689,65 |
| 17 | 980.694,05 | 1.069.992,58 |
| 18 | 1.277.728,52 | 1.788.520,45 |
| 19 | 2.299.194,43 | 1.839.359,69 |
| 20 | 632.275,12 | 2.159.403,45 |
| 21 | 1.414.872,28 | 2.370.291,88 |
| 22 | 1.050.891,83 | 1.701.316,07 |
| 23 | 251.450,30 | 589.021,32 |
| TOPLAM | 32.742.072,36 | 43.903.446,94 |
| ORTALAMA | 1.423.568,36 | 1.908.845,52 |

Grafik-2: IGF, IVB öncesi ve sonrası değerler



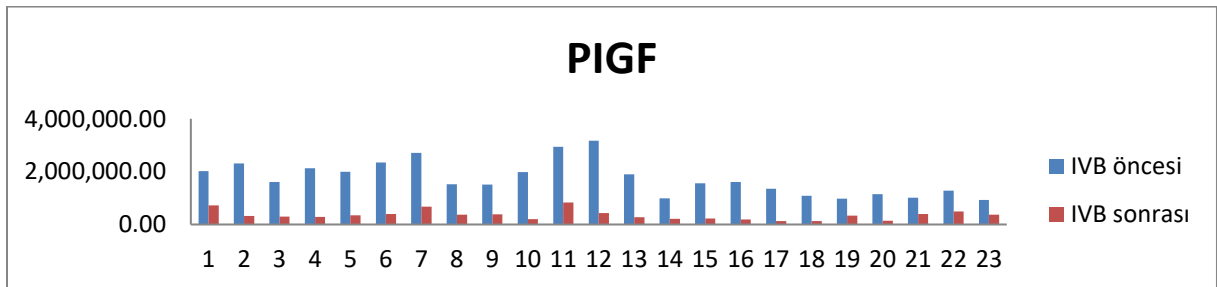
PIGF düzeyi İVB öncesi ortalama $1.741.969,02 \pm 645.335.673$ iken PPV öncesi $354.720,45 \pm 184.082,736$ idi ($p=0,000$). İVB öncesi ve sonrası aldığımız örneklerde PIGF düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı.

Tablo-7 : PIGF, IVB öncesi ve sonrası değerler

| | PIGF | |
|----------|------------|-------------|
| Örnekler | IVB Öncesi | IVB Sonrası |
| | | |

| | | |
|-----------------|---------------|--------------|
| 1 | 2.014.255,96 | 722.169,98 |
| 2 | 2.306.595,14 | 319.230,77 |
| 3 | 1.604.880,78 | 296.820,94 |
| 4 | 2.134.050,26 | 282.255,40 |
| 5 | 1.993.217,30 | 346.255,27 |
| 6 | 2.349.410,53 | 390.795,41 |
| 7 | 2.709.746,02 | 668.728,52 |
| 8 | 1.520.578,82 | 373.355,91 |
| 9 | 1.508.707,72 | 385.455,70 |
| 10 | 1.984.689,11 | 206.222,56 |
| 11 | 2.942.614,45 | 836.280,64 |
| 12 | 3.170.961,49 | 429.368,86 |
| 13 | 1.901.213,67 | 273.369,13 |
| 14 | 984.317,12 | 208.525,27 |
| 15 | 1.555.392,27 | 222.690,80 |
| 16 | 1.603.431,41 | 184.373,09 |
| 17 | 1.350.214,66 | 135.279,72 |
| 18 | 1.086.135,40 | 130.386,98 |
| 19 | 980.383,88 | 338.970,24 |
| 20 | 1.144.403,88 | 144.303,32 |
| 21 | 1.010.286,37 | 390.763,98 |
| 22 | 1.279.327,77 | 498.594,79 |
| 23 | 930.473,45 | 374.373,09 |
| TOPLAM | 40.065.287,45 | 8.158.570,37 |
| ORTALAMA | 1.741.969,02 | 354.720,45 |

Grafik-3: PIGF, IVB öncesi ve sonrası değerler

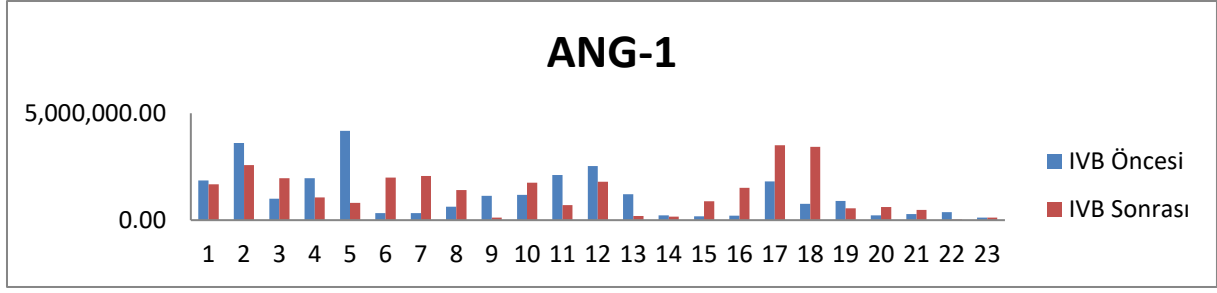


Ang-1 düzeyi İVB öncesi ortalama $1.183.092,853 \pm 1.115.715,465$ iken PPV öncesi $1.277.901,293 \pm 1.012.844,516$ idi ($p=0,732$). İVB öncesi ve sonrası aldığımız örneklerde Ang-1 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Tablo-8 : Ang-1, İVB öncesi ve sonrası değerler

| Örnekler | ANG-1 | |
|-----------------|---------------|---------------|
| | İVB Öncesi | İVB Sonrası |
| 1 | 1.855.304,36 | 1.672.806,96 |
| 2 | 3.613.133,45 | 2.579.448,86 |
| 3 | 1.001.213,48 | 1.954.313,03 |
| 4 | 1.959.867,93 | 1.066.173,60 |
| 5 | 4.178.113,58 | 809.526,60 |
| 6 | 335.284,45 | 1.992.443,13 |
| 7 | 334.622,76 | 2.062.394,19 |
| 8 | 628.284,89 | 1.410.864,57 |
| 9 | 1.138.429,45 | 116.576,69 |
| 10 | 1.189.443,60 | 1.757.936,19 |
| 11 | 2.111.119,94 | 704.903,82 |
| 12 | 2.530.598,88 | 1.793.849,33 |
| 13 | 1.218.326,53 | 188.833,32 |
| 14 | 229.092,53 | 163.554,79 |
| 15 | 180.158,50 | 888.039,40 |
| 16 | 216.094,32 | 1.516.180,77 |
| 17 | 1.810.766,35 | 3.496.188,83 |
| 18 | 766.877,27 | 3.424.897,47 |
| 19 | 904.226,33 | 553.694,22 |
| 20 | 227.390,25 | 619.679,11 |
| 21 | 288.161,48 | 474.237,07 |
| 22 | 377.729,11 | 30.042,88 |
| 23 | 116.896,19 | 115.144,92 |
| TOPLAM | 27.211.135,64 | 29.391.729,75 |
| ORTALAMA | 1.183.092,85 | 1.277.901,29 |

Grafik-4: Ang-1, İVB öncesi ve sonrası değerler



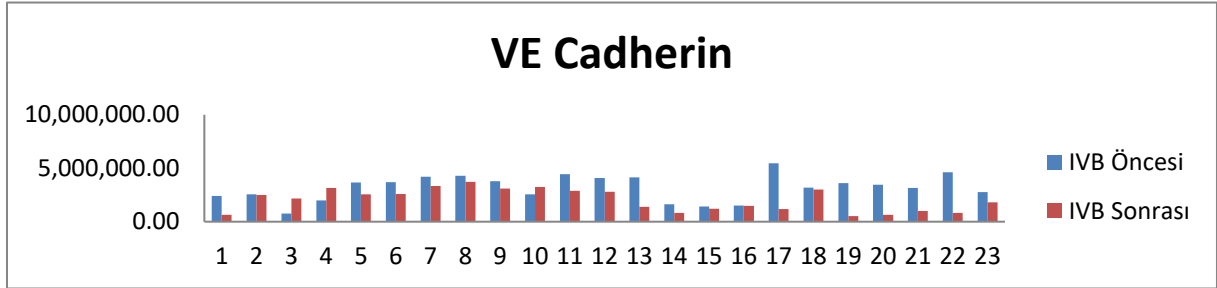
VE-cadherin düzeyi İVB öncesi ortalama $3.189.859,434 \pm 1.191.314,814$ iken PPV öncesi $2.023.450,150 \pm 1.040.776,215$ idi ($p=0,001$). İVB öncesi ve sonrası aldığımız örneklerde VE-cadherin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı.

Tablo-9 : VE-cadherin, İVB öncesi ve sonrası değerler

| Örnekler | VE Cadherin | |
|----------|--------------|--------------|
| | IVB Öncesi | IVB Sonrası |
| 1 | 2.396.790,36 | 648.584,67 |
| 2 | 2.548.979,61 | 2.496.042,07 |
| 3 | 746.081,96 | 2.174.213,66 |
| 4 | 1.993.495,85 | 3.154.927,25 |
| 5 | 3.662.840,83 | 2.546.183,77 |
| 6 | 3.704.069,59 | 2.583.846,29 |
| 7 | 4.202.718,25 | 3.343.920,24 |
| 8 | 4.295.590,07 | 3.735.281,46 |
| 9 | 3.782.375,12 | 3.082.941,90 |
| 10 | 2.548.960,98 | 3.241.106,24 |
| 11 | 4.428.879,44 | 2.877.198,23 |
| 12 | 4.097.382,69 | 2.803.690,58 |
| 13 | 4.132.087,88 | 1.378.427,60 |
| 14 | 1.618.110,99 | 823.358,69 |
| 15 | 1.428.338,65 | 1.215.488,14 |
| 16 | 1.523.808,45 | 1.483.035,89 |
| 17 | 5.467.037,35 | 1.170.159,39 |
| 18 | 3.175.365,88 | 2.994.945,06 |
| 19 | 3.600.489,97 | 517.348,87 |
| 20 | 3.458.513,15 | 637.850,52 |

| | | |
|-----------------|---------------|---------------|
| 21 | 3.157.333,49 | 995.083,69 |
| 22 | 4.631.602,29 | 820.124,57 |
| 23 | 2.765.914,12 | 1.815.594,66 |
| TOPLAM | 73.366.766,99 | 46.539.353,45 |
| ORTALAMA | 3.189.859,43 | 2.023.450,15 |

Grafik-5: VE-cadherin,IVB öncesi ve sonrası değerler



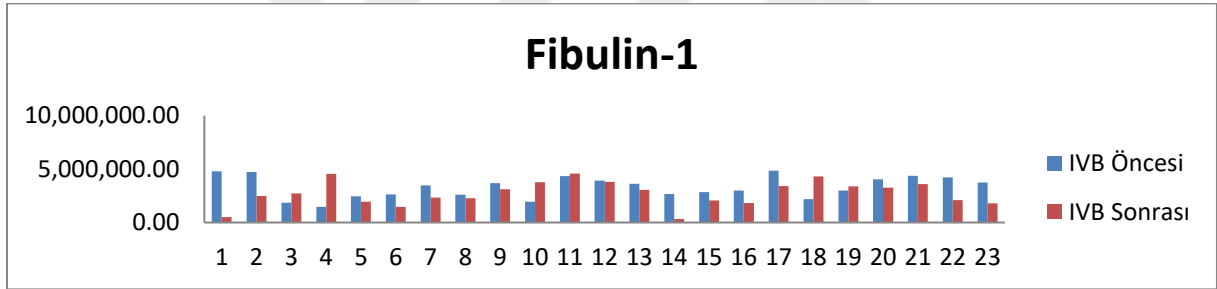
Fibulin-1 düzeyi İVB öncesi ortalama $3.320.953,726 \pm 1.003.017,391$ iken PPV öncesi $2.726.059,607 \pm 1.158.595,451$ idi ($p=0,088$). İVB öncesi ve sonrası aldığımız örneklerde Fibulin-1 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Tablo-10 : Fibulin-1, IVB öncesi ve sonrası değerler

| Örnekler | Fibulin | |
|-----------|--------------|--------------|
| | IVB Öncesi | IVB Sonrası |
| 1 | 4.784.841,74 | 511.026,32 |
| 2 | 4.727.608,75 | 2.489.759,73 |
| 3 | 1.848.842,83 | 2.720.574,55 |
| 4 | 1.462.167,40 | 4.538.674,70 |
| 5 | 2.451.428,97 | 1.931.688,42 |
| 6 | 2.626.050,76 | 1.469.958,52 |
| 7 | 3.457.554,71 | 2.346.285,23 |
| 8 | 2.590.762,03 | 2.264.116,85 |
| 9 | 3.687.921,09 | 3.127.162,40 |
| 10 | 1.940.874,93 | 3.785.796,75 |
| 11 | 4.353.032,58 | 4.577.825,53 |
| 12 | 3.913.912,49 | 3.811.557,03 |
| 13 | 3.625.251,21 | 3.057.139,02 |

| | | |
|-----------------|---------------|---------------|
| 14 | 2.674.284,59 | 325.594,38 |
| 15 | 2.831.420,81 | 2.071.342,39 |
| 16 | 3.000.455,42 | 1.831.216,00 |
| 17 | 4.841.795,75 | 3.405.741,29 |
| 18 | 2.195.866,80 | 4.320.018,36 |
| 19 | 2.993.038,15 | 3.385.477,97 |
| 20 | 4.043.325,21 | 3.262.161,88 |
| 21 | 4.370.238,20 | 3.577.218,05 |
| 22 | 4.214.761,36 | 2.108.523,93 |
| 23 | 3.746.499,94 | 1.780.511,67 |
| TOPLAM | 76.381.935,72 | 62.699.370,98 |
| ORTALAMA | 3.320.953,73 | 2.726.059,61 |

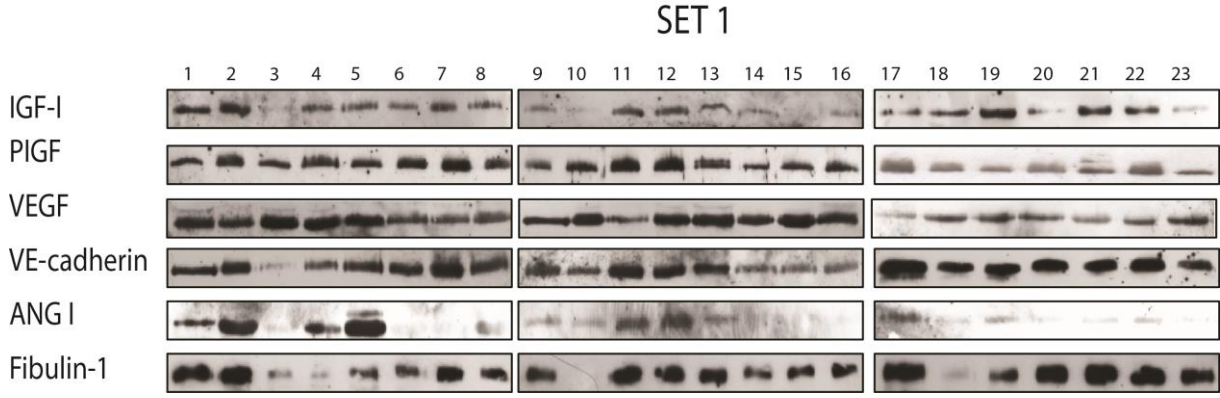
Grafik-6: Fibulin-1, IVB öncesi ve sonrası değerler



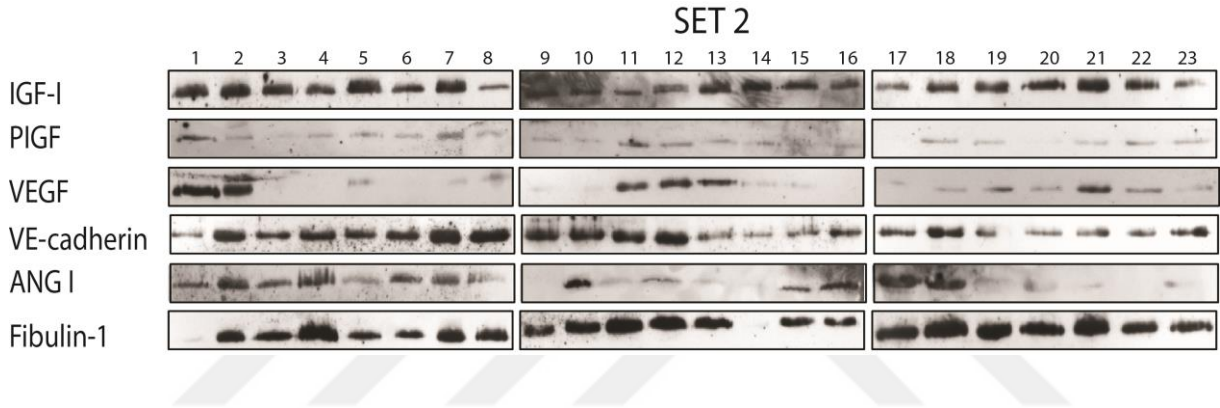
Tablo-11: Sitokinlerin Ortalama, Standart sapma ve p değerleri,

| | IVB öncesi Ortalama-standart sapma | IVB sonrası Ortalama-standart sapma | p değeri |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| VEGF | 1.449.778,026 ± 669.703,350 | 876.050,599 ± 358.496,479 | p=0,000 |
| IGF-1 | 1.423.568,363 ± 616.444,361 | 1.908.845,519 ± 589.582,374 | p=0,001 |
| PIGF | 1.733.708,149 ± 403.044,151 | 3.102.546,538 ± 576.989,658 | p=0,000 |
| Angiogenin | 1.183.092,853 ± 1.115.715,465 | 1.277.901,293 ± 1.012.844,516 | p=0,732 |
| VE-cadherin | 3.189.859,434 ± 1.191.314,814 | 2.023.450,150 ± 1.040.776,215 | p=0,001 |
| Fibulin | 3.320.953,726 ± 1.003.017,391 | 2.726.059,607 ± 1.158.595,451 | p=0,088 |

Tablo-12: Sitokinlerin IVB öncesi Western Blot Yöntemi ile jel elektroforez sonuçları



Tablo-13: Sitokinlerin IVB sonrası Western Blot Yöntemi ile jel elektroforez sonuçları



5. TARTIŞMA

DRP tedavisinde kullanılan anti-VEGF ilaçlar, iris ve retinadaki neovaskülarizasyonu azaltabilir ve diyabetik maküler ödemli gözlerde ödemi azaltarak görme keskinliğini artırabilir. Son yıllarda, PDR olan hastalarda intravitreal bevacizumab enjeksiyonu (IVB), vitreoretinal cerrahiye yardımcı olarak uygulanmıştır. IVB, intraoperatif TRD'li hastalarda traksiyona neden olan fibrovasküler membranları soyarken yeni damar oluşumunu engelleyerek kanamayı minimize eder ve ameliyatı kolaylaştırır. Bu nedenle PPV'den 7 gün öncesinde IVB yapılmaktadır. IVB ayrıca postoperatif erken vitreus kanamasını azalttığı gösterilmiştir.(18)

IVB'nin bu faydalarına rağmen, proliferatif vitreoretinopati veya eksüdatif yaşa bağlı makuladejenerasyonu olan hastalarda fibrozisin ciddiyetini arttırdığı ve böylece görme keskinliğini bozduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.(19) IVB ile fibrozisin tetiklenmesini açıklayacak moleküler mekanizmalar halen belirlenememiştir. Vitreus VEGF karşıtı ilaçların biyolojik etkilerini ortaya çıkardığı gözdeki ilk bölgedir. Buna göre, Vitreus proteomikslerindeki değişiklikler IVB'nin oküler etkilerini gösterebilir.

Bizim çalışmamızda da beklenildiği gibi IVB sonrasında VEGF düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. IVB'nin VEGF düzeylerini azaltması ilaç etki mekanizması dolayısıyla beklenen bir durumdur, IVB'nin göz içi diğer sitokinlere etkisi çalışmamızda incelenmiştir.

Plasental Growth Faktör (PIGF)

Anjiogenez, mevcut damarlardan yeni damarların büyümesi olarak tanımlanır(150). Fizyolojik olarak ; fetal gelişim(151) korpus luteum oluşumu, kalp ve iskelet kaslarının fiziksel egzersize verdiği yanıt (152) ve yara iyileşmesi (153) gibi durumlarda oluşur. Anormal anjiyogenez ise, kanser, obezite (154), romatoid artrit (155) ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) ve diyabetik retinopati (DRP) (156) gibi hastalıklarda meydana gelir. Anjiyogenez süreci karmaşıktır ve çok aşamalı bir moleküler ve hücrel olayları içerir (157). Kısaca, yeni damarların filizlenmesi, venüllerden hareketsiz endotel hücrelerinin büyüme faktörleri, delta benzeri ligand 4 tarafından düzenlenen endotelial uç hücrelerin seçimi, çoklu Notch reseptörleri ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörlerinin (VEGFR'ler) aktivasyonu ile başlar. Bu hücre seçimini takiben, diğer ligand / reseptör etkileşimleri (VEGF / VEGFR - 2; semaforin / nöropilin / pleksin; netrin / UNC5B, SLIT / ROBO4) vasküler filizin uzamasına ve büyümesine rehberlik eder. İntegrinler, Rho GTPase CDC42 ve Rac1'in yanı sıra basınca bağlı ters membran kabarması, filiz füzyonu ve lümen oluşumunda rol oynar (158). Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, EGFL7 ve perisitlerin aracılık ettiği vasküler olgunlaşma, daha sonra neovasküler ağın ve perfüzyonun dominant anjioinhibitör fenotipinin restorasyonu ile birlikte meydana gelir (157).

Vasküler regülasyonda tanımlanan birçok anjiyojenik faktör arasında, VEGF süper ailesi ve VEGFR'ler hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenezde ve özellikle vasküler geçirgenlikte belirleyici bir rol oynar(159). VEGF büyüme faktörleri ailesi birkaç homologdan oluşur. Bunlar; VEGF - A, VEGF - B, VEGF - C, VEGF - D, VEGF - E ve plasental büyüme faktörüdür (PIGF).

VEGF ailesinin tanımlanacak ilk üyesi olan VEGF - A'nın (genellikle VEGF olarak anılır) görevleri; anjiogeneze katkıda bulunduğu iyi bilinir, hareketsiz endotel hücrelerini aktive eder ve VEGFR-1 (Flt1 olarak da bilinir) bağlanması yoluyla vasküler geçirgenliği teşvik eder ve VEGFR-2 (Flk1 olarak da bilinir) bağlanması yoluyla hücre proliferasyonunu uyarır (157,160,161), endotelial progenitör hücrelerin neovaskülarizasyon ve doku rejenerasyonu bölgelerine mobilize edilmesinde ve görevlendirilmesinde rol oynar (162).

VEGF-A'ya homolog bir faktör olan plasental büyüme faktörü (PIGF), işlevi daha az anlaşılmiş olmasına rağmen, özellikle retina bozukluklarında patolojik anjiyogenezde de rol

oyunar. Hayvan modelleri, PIGF'nin fizyolojik anjiyogenez için gerekli olmadığını, ancak patolojik anjiyojenik koşullarda rol oynadığını öne sürmüşlerdir (152,154,156,160,163–165). VEGF ailesinin tüm üyeleri, sistein düğüm motifleriyle karakterize edilir ve PIGF'nin üç boyutlu yapısı, VEGF-A'ninkine çarpıcı bir şekilde benzer, ancak iki protein yalnızca% 42 amino asit sekans özdeşliği paylaşır (152,161,165). Alternatif ekleme, boyut olarak farklı olan dört izoform oluşturur (PIGF-1,2,3 ve 4). PIGF-1 ve PIGF-2, sırasıyla 131 ve 152 amino asit kalıntısından oluşan başlıca izoformlardır. PIGF, monomerleri disülfid bağları ile bir arada tutulan dimerik bir proteindir. Aynı hücre tarafından ifade edilirse, PIGF ve VEGF-A bir heterodimer oluşturabilir (161,164–166). Plasental büyüme faktörü (PIGF) spesifik olarak reseptör VEGFR-1'e bağlanır, ancak VEGFR-2'ye bağlanmaz(151,152,160,161,164–166). Ek olarak, heparin bağlayıcı alan taşıyan izoformlar nöropiline bağlanır(152,164–166). Çalışmalar, nöropilin-1'in hayvan modellerinde(167) ve ayrıca insanlarda (168) anjiyojenik damarlarda ifade edildiğini göstermiştir. Yenidoğan fare retinalarını kullanarak yaptıkları araştırmaya dayanarak, Pan ve ark. Nöropilin-1'i bloke etmenin vasküler yeniden şekillenmeyi engellediğini ve böylece damarları anti-VEGF ajanlarıyla tedaviye daha duyarlı hale getirdiğini varsaymaktadır (169). PIGF / VEGF-A heterodimer, VEGFR-1'e bağlanır veya VEGFR-1 / VEGFR-2 dimerizasyonunu indükler (170).

Plasental büyüme faktörü (PIGF), VEGFR-1 yoluyla endotel hücre göçünü uyarır ve VEGFR-1 yoluyla anjiyogenezde aktif rol oynayan hücreleri (örn. Monosit makrofajlar, düz kas hücreleri ve perisitler) toplar (165,171). PIGF, VEGFR-1'e bağlanarak ve dolayısıyla VEGFR-2'yi aktive etmek için daha fazla VEGF-A serbest bırakarak dolaylı olarak anjiyogenezi uyarabilir veya endotel hücrelerinin doğrudan VEGFR-1 bağlanması yoluyla anjiyogeneze girmesini işaret edebilir (160,161,165). Ek olarak, lökosit infiltrasyonu anjiyogenez ile bağlantılıdır. VEGFR-1 ligandları monosit çekicidir ve lökositlerin toplanmasına katkıda bulunur. Bu toplanmış lökositler, proanjiyojenik faktörlerin salgılanması yoluyla dolaylı (VEGF'den bağımsız) bir anjiyogenez yolu sağlar (172).

PIGF'nin diyabette, retina aşırı geçirgenliği, retinal kapiller dejenerasyon ve perisit kaybı gibi DRP'nin ayırt edici özelliklerinin önemli aracı olabileceğini düşündürmektedir(173). PIGF'nin yanı sıra VEGF'nin ve bunların ortak reseptörleri VEGFR-1 ve NP-1'in, her iki faktörün de ifade edildiği retina ve koroidal vasküler hastalıklar için potansiyel hedefler olduğunu göstermektedir(171,173). DRP'li gözlerin vitreus ve retina dokusunda yüksek PIGF seviyeleri ölçülmüştür (156,174).

Ortaya çıkan araştırmalara rağmen, PIGF'nin insanlarda patolojik oküler neovaskülarizasyondaki kesin katkısı tam olarak aydınlatılmamıştır. Tek başına VEGF - A'yı

inhibe eden ranibizumab, VEGF-A, VEGF-B ve PIGF'yi inhibe eden aflibercept ve tüm VEGF alt tiplerini inhibe eden bevacizumab, Protokol-T çalışması ile etkinlik ve güvenilirlik açısından karşılaştırılmıştır. PIGF'nin DMO'daki rolü hakkında birçok cevaplanmamış soru olmasına rağmen, bu çalışmanın sonuçları intravitreal aflibercept ile tedavi edilen gözlerde önemli ölçüde daha fazla görsel iyileşme elde etmiştir. Aflibercept'in VEGF'ye ek olarak PIGF'yi bağlama kabiliyeti aflibercept'i daha etkili hale getirebileceği spekülasyonlarına yol açar (175,176). VEGF'e ek olarak PIGF'yi de inhibe etmek DMO tedavisinde daha etkili olabilir. Bizim çalışmamızda da VEGF'te olduğu gibi PIGF'te de istatistiksel anlamlı düşüş olmuştur. Bevacizumabında aflibercept gibi PIGF'i inhibe ettiği düşünülebilir ancak afliberceptin daha etkili bulunması farklı proteinler üzerinden etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Forooghian ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada IVB'den önce ve sonra alınan humör aköz örneklerinde PIGF seviyelerinde azalma gözlenmiş ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (177), bunun nedeni, vitreus örneği alınmamış olması olabilir. PIGF, patojenik anjiyogenezde hayati bir rol oynar ve PIGF'yi hedefleyen antikorların, hayvan modellerinde tümör gerilemesine neden olduğu gösterilmiştir(163,178). Bizim çalışmamızda vitreus örneği alınmıştır ve IVB sonrası PIGF seviyesi anlamlı düşük bulunmuştur.

Kahtani ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada aktif PDR hastalarında IVB yapılan ve yapılmayan hastalardan alınan vitreus örneklerinde, IVB yapılan grupta PIGF düzeyi düşük bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı değilmiş (179). Bu çalışmada PIGF ve VEGF seviyeleri elisa yöntemi ile tespit edilmiş. Biz çalışmamızda Western-Blot yöntemini kullandık. Bizim sonuçlarımız önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-1)

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-1), tirozin kinaz reseptör süper ailesine ait olan ve endokrin ve otokrin / parakrin aracılı mekanizmalar aracılığıyla normal gelişimsel büyümeyi düzenleyen IGF-1 reseptörünün (IGF-1R) ligandıdır (180).

IGF-1'in retina immün modülasyonunda çeşitli etkileri açıklanmıştır. IGF-1 ayrıca birçok doku için güçlü bir hayatta kalma faktörüdür(181). IGF-1, sinaptik plastisiteyi teşvik eden, sinir büyümesini arttıran ve antiapoptotik aracılı sinyalleme kaskadlarını tetikleyen nörotrofik bir peptittir(182). Tüm bu IGF-1 işlevleri, sinir hücrelerinin nörodejeneratif süreçlere karşı korunması için kritik öneme sahiptir (183). Birçok çalışma, insülin ve IGF'lerin, retina hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması arasındaki dengeyi modüle etme ile ilgili bir rol oynadığını göstermiştir (184–186). Yakın zamanda incelendiği gibi IGF-1, mikroglia için mitojenik bir faktördür ve mikroglial hücrelerden gelen nöroinflamatuvar tepkileri modüle eder

(187).

IGF-I'in diyabetik retinopatideki rolü, birkaç farklı model sistemi kullanılarak incelenmiştir. IGF-I, insan retina endotel hücrelerini apoptozdan korur ve in vitro proliferasyonu artırır(188,189). Hayvan modellerinde yapılan çok sayıda çalışma, artmış IGF-I üretiminin retinopatiyi hızlandırdığı ve retinadaki IGF-I artışlarının proliferatif DR gelişimi için plazma IGF-I konsantrasyonlarındaki sistemik değişikliklerden daha önemli olduğu sonucunu desteklemektedir (79,190,191).

Somatostatin analoglarının diyabetik farelere uygulanmasının ardından retinal IGF-I sentezinin inhibisyonu, retinal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği ve IGF-I enjeksiyonunun, bu etkiyi tersine çevirdiği daha önceki bir çalışmada gösterilmiştir.(189). Farelerde vasküler endotel hücrelerinde insülin ve IGF-I reseptörlerinin yok edilmesi hipoksiye bağlı retinal neovaskülarizasyona karşı koruma sağladı (192).

Transgenik fare modelinde, retinada IGF-I'i aşırı eksprese eden fareler üretilmiş. Kapiller sızıntıda artış, retina kalınlaşması, perisit kaybı, hücrese olmayan kılcal damarların gelişimi ve proliferatif retinopati dahil olmak üzere diyabetik retinopati ile tutarlı çok sayıda değişiklik gösterdiği bulunmuştur. (193).

İnsanlarda yapılan çalışmalar, proliferatif retinopatili hastalardan alınan vitröz örneklerdeki IGF-I konsantrasyonlarının, diyabetik olmayanlardan 2,5-3 kat daha yüksek olduğunu ve proliferatif değişikliklerin ciddiyeti ile IGF-I yükselme derecesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (190,194,195). Daha yüksek IGF-I düzeylerine sahip denekler, hemoglobin A1c'den bağımsız olarak retinopati progresyonu için iki kat daha fazla olasılığa sahiptir (196). İnsan çalışmaları, serum IGF-I düzeylerini artıran çoklu CA tekrarları içeren polimorfizmlerin, tip 2 diyabetiklerde proliferatif retinopati riskinde 2.8 kat artışla ilişkili olduğunu göstermiştir (197).

Ayrıca normal retinal vasküler gelişim için IGF-I gereklidir ve büyüme hormonu reseptöründe veya IGF-I geninde mutasyonları olan insanlar, referans kontrollere kıyasla daha düşük vasküler dallanma noktalarına sahiptir(198).

IGF-I ve VEGF, retinal kan damarı gelişimini düzenlemek için birlikte işlev görür ve IGF-I olmayan fareler, normal VEGF seviyeleri mevcut olsa bile normal damar gelişimine sahip değildir (199). Bu farelere IGF-I'in uygulanması damar büyümesini eski haline getirdiği görülmüştür.

Çok sayıda çalışma, IGF-I'in retinadaki VEGF ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Punglia ve arkadaşları IGF-I'in Muller hücreleri tarafından VEGF ekspresyonunu uyardığını ve bunun NF-kappa B ve HIF-1 α indüksiyonuna bağlı olduğunu gösterdi(200). Ek çalışmalar,

VEGF ekspresyonunun IGF-I tarafından düzenlendiğini ve IGF-I reseptörünün bir anti-reseptör antikoru ile bloke edilmesinin VEGF inhibisyonunu arttığını göstermiştir(199).

Yaşlanma sırasında, biyoaktif IGF-1 dolaşım seviyeleri azalır (191). Diyabeti daha ileri yaşta başlayan hastalar, daha genç yaşta başlayan hastalara göre daha düşük PDR prevalansına sahiptir; bu, yaşlı hastalarda tespit edilen daha düşük serum IGF-1 seviyeleri ile ilişkili olabilir (201).

Nöroinflamasyonun birçok nörodejeneratif bozukluğun patofizyolojisinde başlangıç aşamasında rol aldığı kabul edilmektedir, proinflamatuvar uyarıların sürekli varlığı hastalığın erken aşamalarında dokuları korumadaki temel rolüne rağmen, ilerleyen dönemde hücre hasarı indükler (202–204).

Son zamanlarda, PDR'nin sadece fibrovasküler değil, aynı zamanda nöroglial patoloji ile de ilgili olduğu düşünülmektedir (205,206). Daha önce PDR'de retinanın nöronlarının çoğalamadığı ve toplam nöral hücre hacminin ya statik kaldığı ya da diyabetik hasarı takiben apoptoz nedeniyle azaldığı varsayılmıştı (205). Ancak son zamanlarda, PDR ile ilişkili fibrovasküler membranların (FVM), özel bir retinal glia hücresi türü olan Müller hücreleri ile birlikte büyüyen nörit uzantıları içerdiği gösterilmiştir. Bu nöritler, çubuk fotoreseptörlerinden ve çeşitli retina ganglion hücre popülasyonlarından kaynaklanmaktadır. Yeni damar büyümesi, nöronlardan ve Müller hücrelerinden türetilen kemoatraktan ve trofik faktörlerle düzenlenir (79,207). Müller hücreleri ayrıca yeni vaskülatür için bir iskele görevi görür. Bu koşullar altında, retinal glial hücreler, makrofajlar, monositler, hiyalositler (vitrozde yerleşik hücreler), fibroblastlar, perisitler ve vasküler endotel hücreleri vitroz gövdeye göç edecek ve çoğalacak ve böylece FVM'ler oluşturacaktır. Retinanın ana glial hücrelerinden olan müller hücrelerinin proliferatif diyabetik retinopate fibroblast benzeri aktivite gösterdiği ve fibrovasküler skar oluşumuna neden olduğuna dair pek çok çalışma bulunmaktadır(194,206,208). Müller hücrelerinin traksiyonel kuvvet oluşumunda IGF dahil olmak üzere bir çok büyüme faktörü tarafından uyarıldığı in vitro çalışmalarla desteklenmiştir (205,206). Jeffery L. King ve arkadaşlarının doku kültürü modeli üzerinde çalıştığı araştırmada PDR'de Müller hücresi traksiyonel kuvvet üretiminin vitroz IGF aktivitesi tarafından yönlendirildiği belirtilmiştir(207). Tüm bu bulguların ışığında diyabette vitreusta artan traksiyonel kuvvetlerin IGF ile yakın ilişkili olduğunu belirten güçlü kanıtlar mevcuttur. Özetlenecek olursa IGF'in etkileri apoptozu önleyerek proliferasyona katkıda bulunma, neovaskülarizasyonu sürdürmeye katkı, mikrogliaların aktivasyonunu artırarak fibrozisi uyarmaktır.

Bir çalışmada 6 PDR hastası, ameliyattan 3 gün önce intravitroz bevacizumab ile tedavi

edilmiş. Bevacizumab kullanımının VEGF dışındaki protein konsantrasyonları üzerinde etkisi olup olmadığını araştırılmış. VEGF konsantrasyonları bevacizumab tarafından neredeyse tamamen azalırken, IGF1 konsantrasyonları, bevacizumab ile tedavi edilen gözlerde anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş.IGF-1'in VEGF sentezini indüklediği bilindiğinden, IGF-1 artması VEGF yokluğuna bir reaksiyon olabilir(209).

Bizim çalışmamızda IVB sonrası IGF-1 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu durum VEGF azalmasına yanıt olarak oluşmuş olabilir. IGF-1 artışı mikrogliaların aktivasyonunda artışa neden olarak fibrozisi tetikleyebilir.

Biz çalışmamızda IVBenjeksiyonu sonrası, öncesi ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış IGF-1 düzeyleri olduğunu gördük. IGF-1, traksiyonel kuvvetleri arttıran etkisi düşünüldüğünde IVBenjeksiyonu sonrası arttığı bilinen traksiyonel kuvvetlerin moleküler belirtilerinden biri olabilir.

Vasküler Endotelial Spesifik Cadherin (VE-Cadherin)

Diyabetik retinopati patolojisinin ana bileşenlerinden biri normalde geçirgen olmayan ve oldukça seçici olan kan-retina bariyerinin (KRB) bozulmasıdır (210). İç bariyerin bütünlüğü, adherens ve sıkı kavşaklarla birbirine bağlanan ve perisitlerle çevrili kılcal endotelial hücrelerden oluşan retinal vasküler üniteye bağlıdır (210). Bu ünite astrosit ve Müller glial hücreleri tarafından desteklenir. KRB'nin bozulması, diyabetik maküler ödem (DMO), intraretinal kanamalar ve sert eksüdaların gelişmesiyle sonuçlanan plazma sızıntısına neden olur.

Diyabetik retinopatinin diğer özellikleri arasında kalın bazal membrandan göç veya perisit kaybından kaynaklanan aselüler kılcal damarların oluşumu yer alır (211). Retina içinde kılcal damar kaybı, kan perfüzyonunu azaltır ve iskemik / hipoksik durumlar yaratır. Sürekli hiperglisemi ve hipoksi, diyabetli kişilerde hem neovaskülarizasyonun hem de vasküler kaçığın güçlü bir uyarıcısı olan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) indüklenmesine yol açar (34). VEGF / VEGF reseptörü 2 (VEGFR2) sinyali,VE-cadherinin fosforilasyonu ve internalizasyonu ile sonuçlanır ve vasküler geçirgenliği indükler (212,213). VE-cadherin, endotelial adherens bağlantılarının başlıca transmembran adhezyon molekülüdür (214).VE-cadherin, endotel hücre bariyerinin bütünlüğünü korumada kritik öneme sahiptir (213). VE-cadherinin kaybı endotelial kavşakların zayıflamasına neden olur(215,216).

Bazı araştırmacılar VE-cadherinin, VEGF sinyalini zayıflatıp anjiyogenezisınırladığını (217) ileri sürerken diğerleri anjiyogenezisi gösteren bir belirteç olabileceğini iddia etmişlerdir (218,219).

VE-cadherinin vitreustaki düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, diyabetik retinopatisi olan hastalarda diyabetik olmayanlara göre VE-cadherin anlamlı olarak daha fazla bulunmuş. (218). Başka bir çalışmada diyabetli bireylerden ölüm sonrası elde edilen insan retinasında VE-cadherin seviyelerinde belirgin bir azalma görülmüş (220). Bir diğer çalışmada tip 2 diyabetli bireylerde VE-cadherinin plazma seviyelerinde artış gözlenmiştir (221). Diyabetik kemirgenlerde VE-cadherin'in fosforilasyon ve degradasyonunun yüksekliği ile artmış vasküler sızıntı gözlenmiştir (216,222,223).

Doku gereksinimleri veya patolojileri, endotel hücrelerinin mezenkimal hücrelere farklılaşmasına neden olabilir. Bu durum, endotelden mezenkime geçiş (EndMT) olarak bilinir. Bu süreçte endotel hücreleri VE-cadherin gibi spesifik endotel belirteçlerini kaybederler bunun yerine mezankimal hücre belirteçleri kazanırlar. Endotelden mezenkime geçiş, VE-cadherin, PECAM1 ve VEGFR2 ekspresyonunu inhibe eder ve ayrıca endotel hücrelerinin ayrılmasına yol açar (224). Bu sürecin artık pulmoner, kardiyak ve böbrek fibrozunun patogenezinde önemli bir mekanizma olduğu kabul edilmektedir(225). Çalışmalar, endotelden mezenkime geçişin diyabetik nefropati, diyabetik renal fibroz ve kardiyak fibrozun ilerlemesine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (226).

Endotelden mezenkime geçişini indükleyen etkenler araştırıldığında; Chun-Hong Yu ve arkadaşları in vitro insan umbilikal ven endotel hücrelerini glikoza maruz bıraktıklarında endotelden mezenkime geçişini indüklediğini ve TGF- β 1 seviyesinin arttığını bulmuşlardır. 7 gün boyunca yüksek glikozdaki hücreler, CD31 ve VE-cadherin mRNA ekspresyonunda önemli bir azalma ve α -SMA ve kolajen I'de anlamlı bir artış göstermişlerdir. Buna göre yüksek glikoz, endotelden mezenkime geçişini tetikleyen etmenlerden biri olabilir. Çalışmacılar ayrıca, ERK sinyal yolu bloke edici PD98059'un , ERK1 / 2 fosforilasyon seviyesindeki yüksek glikoz kaynaklı artışı ve TGF-21 ekspresyonunu önemli ölçüde zayıflattığını ve böylece endotelden mezenkime geçişin protein sentezini inhibe ettiğini bulmuşlardır(227).

Rossato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada primer insan retina endotel hücrelerinde, VEGFR2'nin inhibisyonunun endotelden mezenkime geçişini şiddetlendirdiği bulunmuştur. Ayrıca endotelden mezenkime geçiş / fibrosis inhibitörü SB203580, fare modelinde koroidal neovaskülarizasyon (KNV) için VEGFR2 antagonizminin terapötik etkinliğini arttırdığını göstermişlerdir(228).

Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonun'da (YBMD) anti-VEGF tedavisine direnç geliştiği bilinmektedir. Çalışmacılar bu durumun anti-VEGF tedavisinden kaynaklanan endotelden mezenkime geçişine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. İleri YBMD'de, fibrotik diskiform

skar oluşumu, anti-VEGF tedavisine direnç ile ilişkilidir ve genellikle hastalığın tedavi edilemez son aşaması olarak kabul edilir. Çalışmacılar endotelden mezankime geçişin inhibisyonunun bu son aşamanın gelişimini baskılayabileceğini ve belki de gelecekte YBMD hastaları için anti-VEGF tedavisinin terapötik penceresini genişletebileceği hipotezini öne sürmüşlerdir(228).

Ting ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VE-cadherini regüle eden, oligonükleotid temelli bir ilaç olan CD5-2 kullanmışlardır. CD5-2, VE-cadherin transkripsiyonunda miR-27a aracılı azalmayı önleyerek endotel hücrelerde endojen proteinin ekspresyonunda ve VE-cadherinde artışa neden olur. Üç fare modeli kullanılmıştır; koşullu Müller hücresi azalması, streptozotosin kaynaklı diyabet ve oksijene bağlı retinopati. Her üç modelde de, CD5-2 ile vasküler sızıntıda önemli azalma ve VE-cadherin seviyelerinde önemli artış olduğu gösterilmiştir (229).

Anti-VEGF tedavisi, diyabetik retinopati ve DMO'da patolojik anjiyogenez ve vasküler sızıntıya karşı bir atılım olmuştur. Bununla birlikte, anti-VEGF tedavisinin sınırlamaları vardır: tüm bireyler anti-VEGF tedavisine cevap vermez ve tedaviye direnç gelişebilir(230). Gerçekten de, diyabetik retinopatinin patogenezinde rol oynayan başka sinyal yolları vardır (230). Son olarak, anti-VEGF ajanlarının ana hedefi, çeşitli izoformlara sahip olan ve oküler homeostazda önemli rol oynayan heterojen aktivitelere sahip olduğu bilinen VEGF-A'dır (231). Anti-VEGF tedaviler VEGF dışında göz içi sitokinlere etki edebilir.

Bizim çalışmamızda VE-cadherin seviyesi bevacizumab enjeksiyonundan sonra anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum endotelden mezankimal hücreye geçiş ve nihayetinde fibrozise gidecek olan sürecin kanıtı olabilir. Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi anti-VEGF tedavisi endotelden mezankimal hücreye geçişi tetiklemiş olabilir(229). Bevacizumab enjeksiyonu sonrası VE-cadherindeki bu azalma ilerleyen dönemlerde VE-cadherini arttırıcı moleküllerin, anti VEGF ilaçlarla kombinasyonunun PDR tedavisinde etkili olabileceğini göstermektedir. IVB güçlü bir anjiogenez inhibitörüdür, neovaskülerizasyondaki gerilemeler VE-cadherin seviyesindeki azalma ile açıklanabilir.

Fibulin-1

Fibulin-1, dolaşımda yüksek oranda eksprese edilen ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerinden biridir. Fibulin-1, fibronektin, elastin ve bazal membranlar gibi diğer ECM ailesi üyeleriyle etkileşime girer (232). Son zamanlarda, fibulin-1'in anjiyogenezi inhibe ettiği ve tümör büyümesini baskıladığı bulundu (233). Bu etkisini ADAMTS-1 üzerinden gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir. ADAMTS-1, anjiyogenezin inhibisyonunda rol oynayan bir metaloproteazdır. Lee ve arkadaşları, fibulin-1'in ADAMTS-1 aktivitesini teşvik ederek

anjyogenezi inhibe edebileceğini göstermişlerdir (234). Ayrıca fibulin-1 aşırı ekspresyonunun, mesane kanseri ve renal hücreli karsinomda tümör büyümesinin baskılanmasına, tümör hücresi apoptozisine neden olduğu ve anjyogenezi inhibe ettiği bulunmuştur(235,236).

Diyabet ile fibulin-1 ilişkisi incelendiğinde; diyabetik hastalar, diyabetik olmayan hastalara kıyasla daha yüksek serum fibulin-1 konsantrasyonlarına sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak, plazma fibulin-1 konsantrasyonlarının glikolize hemoglobin ile pozitif korelasyonlu olduğu gösterilmiştir(237,238). Ayrıca, diyabetli hastalardan alınan arter özütlelerinde kontrollere göre daha yüksek fibulin-1 protein konsantrasyonları bulunmuştur. Erektile disfonksiyonu olan diyabetik katılımcılarda, erektil disfonksiyonu olmayanlara göre artmış plazma fibulin-1 konsantrasyonları bulundu(239). Son çalışmalar fibulin-1'in diyabetin durumunu değerlendirmek için bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir(237,240,241). Ayrıca plazma fibulin-1 konsantrasyonunun diyabetik hastalarda kardiyovasküler mortaliteyi öngördüğü bulunmuştur(237). Başka bir çalışma, diyabetik hastalarda plazma fibulin-1 konsantrasyonları ile kardiyovasküler risk belirteçleri arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir(238).

Diyabetik retinopatilerde vitreusta fibulin-1'in incelendiği bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada diyabeti olan ancak retinopatisi olmayan, nonproliferatif diyabetik retinopatisi olan, proliferatif retinopatisi olan üç hasta grubu ve DRP olmayan kontrol grubu alınmıştır. Çalışmaya toplam 204 katılımcı alınmıştır. Vitreus örneklerinde ve serumda diyabeti olan grupta fibulin-1 anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Diyabeti olan hasta grubunun içinde bakıldığında ise proliferatif DRP olan grupta fibulin-1 anlamlı olarak fazla bulunmuştur(242).

Anjyogenez, DRP'nin potansiyel bir mekanizmasıdır. Ancak fibulin-1'in bir anjyogenez inhibitörü olarak hizmet ettiği bulunmuştur(233). Diyabetik hastalarda yüksek konsantrasyonda fibulin-1 bulunması çelişkili görünmektedir. Fibulin-1, DRP gelişimi sürecinde antiinflamatuvar bir rol üstlenip anjyogenezi inhibe ediyor olabilir.

Diğer yandan, bir çalışmada fibulin-7 C-terminal parçası ve aktif sentetik peptidinin, koroidal ve retinal neovaskülarizasyonu baskıladığı iskemik retinopati ve koroidal neovaskülarizasyon fare modelinde gösterilmiştir(243).

Diyabetik retinopatide bevacizumab enjeksiyonu sonrasında fibulin düzeylerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda bevacizumab enjeksiyonu sonrasında fibulin-1 düzeyleri azalmıştır ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.

Anjiyojenin-1

Angiojenin, yerleşik bir insan adenokarsinom hücre hattının serumsuz süpernatantlarından saflaştırılmış tek zincirli bir 14 kDa proteindir(244). Sıçan beyinde, anjiyojenin ekspresyonunun, iskemiden 1, 3 ve 7 gün sonra önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir(245). Angiogenin, damar endotelyal ve düz kas hücrelerini aktive ederek ve migrasyon, invazyon, proliferasyon ve tübüler yapıların oluşumu dahil olmak üzere bir dizi biyolojik süreci tetikleyerek anjiyogenezi indükler (246).Anjiyojenin, bazal membran bozulmasını indüklemek için membran aktinine bağlanır (246). Bir çalışma, anjiyojenin insan koroid ve retina tarafından sentezlendiğini göstermiştir(247).

Anjiyojenik faktörlerden VEGF ile anjiyojenin karşılaştırıldığında; önceki çalışmalar VEGF'nin fonksiyonel olarak bozulmuş kan damarlarının oluşumunu arttırdığını göstermiştir (248,249). VEGF, ağırlıklı olarak hipoksik ve proenflamatuar koşullarda etki gösterirken(250), anjiyojen fizyolojik olarak ortaya çıkan proanjiyojenik bir faktördür, anti-enflamatuar özelliklere sahiptir (251). Ek olarak nöronlar üzerinde koruyucu etkisi vardır (252)ve prostasiklin ve NO sentezini uyarır (253,254). Tüm bu anjiyojen etkileri, retinanın düzgün çalışması için yeterli değildir. Ancak özellikle anti-enflamatuar etki, diyabetik hastalar için yararlı gibi görünmektedir, çünkü inflamasyon DR patogenezinde yer alan ana faktördür (31). Angiogenin'in nöroprotektif potansiyeli, anjiyopatinin erken evrelerinde gözlenen retinal glial hücrelerin apoptozu açısından da yararlı olabilir (255). Ek olarak, anjiyogeninin vazodilatör potansiyeli (prostasiklin ve NO sentezi), endotelin 1'in vazokonstriktif etkisine karşı bir denge olabilir.

Kishimoto ve arkadaşları VEGF, bFGF ve anjiyojenin arasındaki etkileşimi tanımlamışlardır. Bu durum anjiyogenin'in VEGF ve bFGF ile indüklenen anjiyogeneze aracılık etmede oynadığı önemli rolü göstermektedir. (256).

DRP'de anjiyojeninin incelendiği çalışmalar ele alındığında; Merek ve arkadaşları DRP olmayan diyabet hastalarında, DRP olan diyabet hastalarında ve kontrol grubunda angiogenin ve VEGF düzeylerini kandan, DRP olan ve olmayan diyabetik hastalarda ek olarak vitreustan örnek alarak incelemişler. DRP'ye bağlı kanamaları olan hastalar çalışmadan dışlanmış. Sonuçta DRP olan hastalarda vitreusta ve serumda angiogenin düşük, VEGF ise yüksek bulunmuş. Bu durumu DRP patogenezinde enflamasyon sonucunda VEGF'nin artmasına karşın koruyucu özellikleri olan anjiyojeninin azalması ile açıklamışlardır. Gelecekte angiogenin ile anti-VEGF ilaçlarının birlikte uygulanmasının mümkün olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Anjiyojenin sadece patolojik anjiyogenezi inhibe etmekle kalmayacağını, aynı zamanda retinanın fizyolojik vaskülatürünü koruyacağını ve böylece sadece anti-VEGF ajanlarının uygulanmasıyla ilişkili iskemiye önleyeceğini ileri sürmüşlerdir(257).

DRP olup bevacizumab kullanan hastalarda angiojenin ölçümünün yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak YBMD ile ilişkili bir çalışmada; YBMD’de vitreusta agiojeninin arttığı gösterilmiştir. YBMD olanlara IVB yapılmadan önce ve yapıldıktan 2 gün sonra alınmış vitreus örneklerinde angiojenin arasında fark görülmemiştir (258). Retina pigment epiteliyle yapılan bir çalışmada bevacizumabın VEGF’yi azaltırken anjiojenini arttırdığını göstermiştir(259).

Bizim çalışmamızda IVB öncesi ve sonrası vitreus örneklerinde anjiojenin düzeylerinde artış olduğu görüldü ama istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durumda IVB’nin anjiojenin düzeyini etkilemediği sonucuna ulaşılabilir. DRP’de inflamasyonun ön planda olduğu görülmektedir. Anjiojeninin ise antiinflamatuvar etkisi ile DRP’de angiogenezde esas etkili belirteçlerden biri olmadığını düşünmekteyiz.



6. SONUÇ

DRP hastalarında intravitreal bevacizumab (IVB) enjeksiyonu, cerrahi sırasında retinal fibrovasküler membranların diseksiyonunu kolaylaştırmak, postoperatif kanama insidansını azaltmak ve inatçı neovaskülarizasyonları ortadan kaldırmak için sıklıkla uygulanır. Ancak IVB fibrozisin ciddiyetini arttırdığı ve böylece görme keskinliğini bozduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle bevacizumabın preoperatif ve postoperatif yararları olmakla birlikte makulayı tehdit eden traksiyon durumunda dikkatli kullanılması gerektiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda fibroziste etkili olabileceği düşünülen VEGF, PIGF, IGF-1, Angiogenin-1, VE-cadherin ve Fibulin-1 proteinleri, IVB enjeksiyonu öncesi ve sonrası alınan vitreus örneklerinden proteomiks analizi ile incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlarda VEGF, PIGF ve VE-cadherin düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak azalırken, IGF-1 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak arttı. Fibulin-1 ve Angiogenin-1 düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

IVB'nin VEGF düzeylerini azaltması ilaç etki mekanizması dolayısıyla beklenen bir durumdur, IVB'nin göz içi diğer sitokinlere etkisi çalışmamızda incelenmiştir. VEGF-A'ya homolog bir faktör olan PIGF VEGF ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle IVB sonrası PIGF seviyelerindeki anlamlı düşüş önceki çalışmalarla benzer bulunmuştur. PIGF'nin insanlarda patolojik oküler neovaskülarizasyondaki kesin katkısı tam olarak aydınlatılmamıştır, PIGF'deki azalma fibrozise geçişte etkili olan bir sitokin olabilir.

IGF-1'in VEGF sentezini indüklediği bilinmektedir, IGF-1 artması VEGF yokluğuna bir reaksiyon olabilir. IGF-1 artışı mikrogliaların aktivasyonunda artışa neden olarak fibrozisi tetikleyebilir.

VE-cadherin seviyesi IVBenjeksiyonundan sonra anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum endotelden mezankimal hücreye geçiş ve nihayetinde fibrozise gidecek olan sürecin kanıtı olabilir.

IVB'nin sadece VEGF düzeyi üzerine değil göz içi diğer sitokinlere etkili olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Diğer sitokinlere olan etkileri IBV'nin istenmeyen yan etkilerinin sebebi olabilir. Bu yan etkilerin azaltılması için PIGF, IGF-1 ve VE-cadherinin etkilerini optimize eden ilaçlar DRP tedavisinde faydalı olabilir. IVB öncesi ve sonrası vitreus örneği ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır, bu etkileri göstermek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. ÖZETLER

Proliferatif Diyabetik Retinopatiye Bağlı İntraokuler Hemorajisi ve veya Traksiyonel Retina Dekolmanı Olan Hastalarda anti-VEGF Uygulamasının Vitreus Proteomiks Değişikliğine Etkisinin İncelenmesi

Giriş

Diyabetik retinopati hastalarında intravitreal bevacizumab (IVB) enjeksiyonu, cerrahi sırasında retinal fibrovasküler membranların diseksiyonunu kolaylaştırmak, postoperatif kanama insidansını azaltmak ve inatçı neovaskülarizasyonları ortadan kaldırmak için sıklıkla uygulanır. Ancak IVB fibrozisin ciddiyetini arttırdığı ve böylece görme keskinliğini bozduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda bu fibroziste etkili olabilecek sitokinleri incelemeyi amaçladık.

Method

Çalışmaya proliferatif diyabetik retinopati tanısıyla intraokuler hemoraji ve veya traksiyonel retina dekolmanı olup pars plana vitrektomi ameliyatı ve ameliyat öncesinde intravitreal bevacizumab enjeksiyonu planlanan 23 hasta alındı. Hastalardan ilk vitreus örneği bevacizumab enjeksiyonu öncesinde ikinci vitreus örneği ise pars plana vitrektomi (PPV) ameliyatı öncesinde alındı. Vitreus örneklerinde proteomiks analiziyle vasküler endotelial growth faktör (VEGF), insülin growth faktör 1 (IGF-1), plasental growth faktör (PIGF), Angiogenin (Ang-1), Vasküler endotelial cadherin (VE-cadherin), Fibulin-1 incelendi.

Bulgular

Elde edilen sonuçlarda VEGF, PIGF ve VE-cadherin düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak azalırken ($p=0,000, p=0,000, p=0,001$), IGF-1 düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak arttı ($p=0,001$). Fibulin-1 ve Angiogenin-1 düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,088, p=0,732$).

Sonuç

IVB'nin sadece VEGF düzeyi üzerine değil göz içi diğer sitokinlere etkili olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Diğer sitokinlere olan etkileri IBV'nin fibrozis gibi istenmeyen yan etkilerinin sebebi olabilir. Bu yan etkilerin azaltılması için PIGF, IGF-1 ve VE-cadherinin etkilerini optimize eden ilaçlar DRP tedavisinde faydalı olabilir.

Investigation of the Effect of Anti-VEGF Application on Vitreous Proteomics in Patients with Intraocular Hemorrhage and Tractional Retinal Detachment Due to Proliferative Diabetic Retinopathy

Introduction

Intravitreal bevacizumab (IVB) injection is frequently used in diabetic retinopathy patients to facilitate the dissection of retinal fibrovascular membranes during surgery, to reduce the incidence of postoperative bleeding and to eliminate persistent neovascularization. However, it has been shown in previous studies that IVB increases the severity of fibrosis and thus impairs visual acuity. In our study, we aimed to examine the cytokines that may be effective in this fibrosis.

Method

Twenty-three patients with proliferative diabetic retinopathy with intraocular hemorrhage and or tractional retinal detachment scheduled for pars plana vitrectomy and preoperative intravitreal bevacizumab injection were included in the study. The first vitreous sample was taken from the patients before bevacizumab injection and the second vitreous sample was taken before pars plana vitrectomy (PPV) surgery. Vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin growth factor 1 (IGF-1), placental growth factor (PIGF), Angiogenin (Ang-1), Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), and Fibulin-1 were analyzed in vitreous samples by proteomics analysis.

Results

In the results obtained, while VEGF, PIGF and VE-cadherin levels decreased statistically significantly ($p = 0.000$, $p = 0.000$, $p = 0.001$), IGF-1 levels increased statistically ($p = 0.001$). There was no statistically significant difference in Fibulin-1 and Angiogenin-1 levels ($p = 0.088$, $p = 0.732$).

Result

In our study, it has been shown that IVB is effective not only on VEGF level but also on other intraocular cytokines. Its effects on other cytokines may be the cause of undesirable side effects of IBV such as fibrosis. Drugs that optimize the effects of PIGF, IGF-1 and VE-cadherin to reduce these side effects may be useful in the treatment of DRP.

8. KAYNAKÇA

1. Elman MJ, Aiello LP, Beck RW, Bressler NM, Bressler SB, Edwards AR, et al. Randomized Trial Evaluating Ranibizumab Plus Prompt or Deferred Laser or Triamcinolone Plus Prompt Laser for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* [Internet]. 2010;117(6):1064-1077.e35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.02.031>
2. El-Sabagh HA, Abdelghaffar W, Labib AM, Mateo C, Hashem TM, Al-Tamimi DM, et al. Preoperative intravitreal bevacizumab use as an adjuvant to diabetic vitrectomy: Histopathologic findings and clinical implications. *Ophthalmology* [Internet]. 2011;118(4):636–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.08.038>
3. Van Der Reis MI, La Heij EC, De Jong-Hesse Y, Ringens PJ, Hendrikse F, Schouten JSAG. A systematic review of the adverse events of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections. *Retina*. 2011;31(8):1449–69.
4. Snell RS LM. *Clinical Anatomy of the Eye*. 2nd ed: Blackwell Science Ltd.; 2013. 2nd ed.
5. Tripathi R WM. *Basic and Clinical Science Course Section 2: Fundamentals and Principles of Ophthalmology*. 2014.
6. Özdemir H, Arf S KM. Maküla Hastalıklarında Optik Koherens Tomografi. 2015. 3-21. p.
7. Aydın P AY. *Temel Göz Hastalıkları*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001.
8. AH. D. Why Proliferative Vitreoretinopathy Occurs. *Retina Vitreus*. 2013. 21(3):155-159.
9. Le Goff MM BP. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye*. Oct. 2008. 22(10):1214-1222.
10. Wiedemann P, Yandiev Y HY-N. *Ryan's Retina*. 3rd ed: Elsevier; 2018.
11. Constable IJ NM. *Ryan's Retina*. 3rd ed: Elsevier; 2018.
12. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2011;94(3):311–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>
13. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: The rochester diabetic neuropathy study. *Neurology*. 1993;43(4):817–24.
14. Klein R, Klein BE, Moss SE CK. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1994;Eyl:112(9):1217–28.
15. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA ve diğ. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol*. 1980;Haz:24(Suppl):335–610.
16. Klein R, Klein BE MS. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1992;Ara:15(12):1875–91.
17. Hiller R, Sperduto RD, Podgor MJ, Ferris FL 3rd WP. Diabetic retinopathy and cardiovascular disease in type II diabetics. The Framingham Heart Study and the Framingham Eye Study. *Am J Epidemiol*. 1988;Ağu:128(2):402–9.
18. Roy MS, Klein R, O'Colmain BJ, Klein BEK, Moss SE, Kempen JH. The Prevalence of Diabetic Retinopathy among Adult Type 1 Diabetic Persons in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):546–51.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Blindness caused by diabetes – massachusetts, 1987-1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1996;45:937-41.
20. Aiello LM, Ferris FL. Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. *Arch Ophthalmol*. 1987;105(9):1163.
21. Boyer DS, Yoon YH, Belfort R, Bandello F, Maturi RK, Augustin AJ, et al. Three-year, randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with

- diabetic macular edema. *Ophthalmology* [Internet]. 2014;121(10):1904–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.04.024>
22. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Elman MJ, Aiello LP, Beck RW, Bressler NM, Bressler SB, et al. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2010;117:1064-77.e35.
 23. Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: Results from 2 phase iii randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*. 2012;119(4):789–801.
 24. Korobelnik JF, Do D V., Schmidt-Erfurth U, Boyer DS, Holz FG, Heier JS, et al. Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2014;121(11):2247–54.
 25. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35(3):556–64.
 26. Ferris FL 3rd. Results of 20 years of research on the treatment of diabetic retinopathy. *Prev Med*. 1994;23:740-2.
 27. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: The second report of diabetic retinopathy study findings. *Ophthalmology*. 1978;85:82-106.
 28. Flynn HW Jr., Chew EY, Simons BD, Barton FB, Remaley NA, Ferris FL 3rd et al. Pars plana vitrectomy in the early treatment diabetic retinopathy study. ETDRS report number 17. The early treatment diabetic retinopathy study research group. *Ophthalmology*. 1992;99:1351-7.
 29. Arjamaa O NM. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia- inducible factors. *Exp Eye Res*. 2006;Eyl;83(3):473–83.
 30. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El-Shabrawi Y, Wedrich A, Theisl A, et al. Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis*. 2008;14(December 2007):637–43.
 31. Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:95103.
 32. Waltenberger J, Lange J, Kranz A. Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation*. 2000;102(2):185–90.
 33. Akagi Y, Terubayashi H, Ikebe H, Kador PF KJ. Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries by aldose reductase inhibitor in galactose-fed dogs with diabetic retinopathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1988;Eyl;92(9):1479–84.
 34. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994;331:1480-7.
 35. Diederer RMH, La Heij EC, Deutz NEP, Kessels AGH, van Eijk HMH, Hendrikse F. Increased nitric oxide (NO) pathway metabolites in the vitreous fluid of patients with rhegmatogenous retinal detachment or diabetic traction retinal detachment. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(6):683–8.
 36. Dawson VL DT. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat*. 1996;10:179-90.
 37. Dai Y, Wu Z, Wang F, Zhang Z, Yu M. Identification of chemokines and growth factors in proliferative diabetic retinopathy vitreous. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 38. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1991;May;98(5 Suppl):786–806.
 39. P. H. Ocular neovascularization. The Krill memorial lecture. *Am J Ophthalmol*. 1978;85:287–301.
 40. Frank RN, Amin RH, Elliott D et al. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol*. 1996;122:393–403.
 41. Frank RN, Amin R, Kennedy A et al. An aldose reductase inhibitor and aminoguanidine prevent vascular endothelial growth factor expression in rats with long-term galactosemia. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:1036–1047.
 42. Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WF, Freyberger H, Klein M, Losche C, et al.

- Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. *Studies in nondiabetic and diabetic subjects. J Clin Invest.* 1993;92(6):2620–5.
43. Sivalingam A, Kenney J, Brown GC et al. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:869–872.
 44. Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:1476–1482.
 45. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D’Amore PA, Moulton RS, O’Reilly MS, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol.* 1994;145(3):574–84.
 46. Pe’er I, Shweiki D, Itin A et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) by retinal cells is a common factor in neovascularization. *Lab Invest.* 1995;72:638–645.
 47. Pierce IA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH. 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):905–9.
 48. Schweiki D, Itin A, Soffer D et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843–845.
 49. Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(1):36–47.
 50. Murata T, Nakagawa K, Khalil A et al. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest.* 1996;74:819–825.
 51. Elliott D, Lee MS AG. Proliferative diabetic retinopathy: principles and techniques of surgical treatment. In: Ryan SJ, ed. *Retina.* 4th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc; 2006;2413–2449.
 52. Davis MD. Vitreous contraction in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1965;74:741.
 53. Faulborn J BS. Microproliferations in proliferative diabetic retinopathy and their relationship to the vitreous: corresponding light and microscopic studies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1985;223:130.
 54. Elliott D. Vitreoretinal attachments in proliferative diabetic retinopathy: effect on outcome. *Vail Vitr Meet Vail, CO.* 2004;
 55. Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: ETDRS report no:19. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Arch Oph.* 2015;(113: 1144-1155.).
 56. Diabetic T, Study R. Preliminary Report on Effects of Photocoagulation Therapy. *Am J Ophthalmol [Internet].* 1976;81(4):383–96. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9394\(76\)90292-0](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9394(76)90292-0)
 57. Lu L, Jiang Y, Jaganathan R, Hao Y. Review Article Current Advances in Pharmacotherapy and Technology for Diabetic Retinopathy : A Systematic Review. 2018;2018.
 58. Silva R, Ms C, Inhoffen W, Tatar O. Neovascular Growth Following Photodynamic Therapy For Neovascular Regression After Intravitreal Injection Of. 2004;
 59. Arevalo JF, Maia M, Jr HWF, Saravia M, Avery RL, Wu L, et al. Tractional retinal detachment following intravitreal bevacizumab (Avastin) in patients with severe proliferative diabetic retinopathy. 2008;213–6.
 60. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD. in the Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy. 2006;(January).
 61. Scartozzi R, Chao JR, Walsh AC, Elliott D. Bilateral improvement of persistent diffuse diabetic macular oedema after unilateral intravitreal bevacizumab (Avastin) injection. 2009;(June 2008):2009.
 62. Le Mer Y, Korobelnik JF, Morel C et al. TPA-assisted vitrectomy for proliferative diabetic

- retinopathy: results of a double-masked, multicenter trial. *Retina*. 1999;(19): 378–382.).
63. Williams JG, Trese MT, Williams GA, Hartzler MK. Autologous Plasmin Enzyme in the Surgical Management of Diabetic Retinopathy. 2001;1902–5.
 64. Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda K, Ishibashi T. IL-10 Is Significantly Involved in HSP70-Regulation of Experimental Subretinal Fibrosis. 2013;8(12):1–10.
 65. Twigg SM. Fibrosis in diabetes complications : Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. 2008;4(3):575–96.
 66. Friedlander M, Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye Find the latest version : Review series Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest*. 2007;117(3):576–86.
 67. Yang C, Su P, Yeh P, Chen M. Combined rhegmatogenous and traction retinal detachment in proliferative diabetic retinopathy : *Can J Ophthalmol* [Internet]. 2008;43(2):192–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3129/i08-007>
 68. Guidry C, Bradley KM, King JL. Tractional Force Generation by Human Müller Cells : Growth Factor Responsiveness and Integrin Receptor Involvement. 2003;44(3).
 69. Mcmeel BYJW. Diabetic Retinopathy : Fibrotic Proliferation And Retinal Detachment. 1971;69.
 70. Humphrey MF, Constable IJ, Chu Y, Wiffen AWDS. A Quantitative Study of the Lateral Spread of Müller Cell Responses to Retinal Lesions in the Rabbit. 1993;558.
 71. Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D HL. What do retinal müller (glial) cells do for their neuronal ‘small siblings’? *J Chem Neuroanat*. 1993. 6(4):201–213.
 72. Newman E. The Müller cell : a functional element of the retina. :307–12.
 73. Mizutani M, Gerhardinger C LM. Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1998. 47(3):445–449.
 74. [Frontiers in Bioscience 6, e77-92, October 1, 2001] Role Of Müller Cells In Retinal Degenerations Andreas Bringmann and Andreas Reichenbach. 2001;77–92.
 75. Maclaren RE. Development and role of retinal glia in regeneration of ganglion cells following retinal injury. 1996;458–64.
 76. Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW. Vascular Endothelial Growth Factor Is Present in Glial Cells of the Retina and Optic Nerve of Human Subjects With Nonproliferative Diabetic Retinopathy. 1997;38(1).
 77. Reichenbach A, Faude F, Enzmann V, Bringmann A, Pannicke T, Francke M, Biedermann B, Kuhrt H, Stolzenburg JU, Skatchkov SN, Heinemann U, Wiedemann P RW. The Müller (glial) cell in normal and diseased retina: a case for single-cell electrophysiology. *Ophthalmic Res*. 1997;(29(5):326–340.).
 78. Dyer MA, Cepko CL. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. 2000;873–80.
 79. Å CG. The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders. 2005;24:75–86.
 80. Uemura A, Kusuhara S, Wiegand SJ, Yu RT, Nishikawa S. Tlx acts as a proangiogenic switch by regulating extracellular assembly of fibronectin matrices in retinal astrocytes. 2006;116(2).
 81. Lewis GP, Fisher SK. Up-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Response to Retinal Injury : Its Potential Role in Glial Remodeling and a Comparison to Vimentin Expression. 2003;230.
 82. Report S. Differential expression of connective tissue growth factor in microglia and pericytes in the human diabetic retina. 2004;1082–7.
 83. Lieth E, Barber AJ, Xu B, Dice C, Ratz MJ, Tanase D SJ. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*. 1998;(47(5):815–820.).
 84. Bringmann A, Eichler W. Basic Fibroblast Growth Factor Contributes to a Shift in the Angioregulatory Activity of Retinal Glial (Müller) Cells. 2013;8(7).
 85. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M GJ. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia*. 1993;(36(4):282–291.).
 86. Boulton M, Gregor Z, Mcleod D, Charteris D, Jarvis-evans J, Moriarty P, et al. Intravitreal growth factors in proliferative diabetic retinopathy : correlation with neovascular activity and glycaemic management. 1997;228–33.

87. Poulaki V, Jousseaume AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF, Adamis AP. Insulin-Like Growth Factor-I Plays a Pathogenetic Role in Diabetic Retinopathy. 2004;165(2):457–69.
88. Jiang F, Tang Y, Guo L, Jiao X. The Role of Insulin-Like Growth Factor I and Hypoxia Inducible Factor 1 α in Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Type 2 Diabetes. 2013;43(1).
89. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. 2013;2013.
90. Xin X, Rodrigues M, Umapathi M, Kashiwabuchi F, Ma T. Hypoxic retinal Müller cells promote vascular permeability by HIF-1 – dependent up-regulation. 2013;
91. Rodrigues M, Xin X, Jee K, Babapoor-farrokhran S, Kashiwabuchi F, Ma T, et al. VEGF Secreted by Hypoxic Müller Cells Induces MMP-2 Expression and Activity in Endothelial Cells to Promote Retinal Neovascularization in Proliferative Diabetic Retinopathy. 2013;62(November):3863–73.
92. Mowat FM, Luhmann UFO, Smith AJ, Lange C, Duran Y, Shukla D, et al. HIF-1 α and HIF-2 α Are Differentially Activated in Distinct Cell Populations in Retinal Ischaemia. 2010;5(6):1–9.
93. Ai J, Liu YAO, Sun J. Advanced glycation end-products stimulate basic fibroblast growth factor expression in cultured Müller cells. 2013;16–20.
94. Cheng T, Cao W, Wen R, Steinberg RH, Lavail MM. Prostaglandin E 2 Induces Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor mRNA Expression in Cultured Rat Muller Cells. :581–91.
95. States U, States U, States U. Etiology and natural history of diabetic retinopathy : An overview. 2007;64:3–7.
96. Michael T, Ingolf H. Proliferative Diabetic Retinopathy. 2015;
97. Kinoshita JINH. Diabetes-related Histopathologies of the Rat Retina With an Aldose Reductase Inhibitor. 1990;355–66.
98. Sueishi K, Hata Y, Murata T, Nakagawa K, Ishibashi T IH. Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol.* 1996;(48(3):307–316.).
99. Perrone L, Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. *Cell Death Dis* [Internet]. 2010;1(8):e65-11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2010.42>
100. Tikellis C, Cooper ME, Twigg SM, Burns WC, Tolcos M. Connective Tissue Growth Factor Is Up-Regulated in the Diabetic Retina : Amelioration by Angiotensin-Converting. 2004;145(2):860–6.
101. Kuiper EJ, Roostenberg P, Ehlken C, Lambert V, Groot HBVT, Lyons KM, et al. Angiogenesis Is Not Impaired in Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Knock-out Mice *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2007;55(11):1139–47.
102. El-asrar AMA, Nawaz MI, Kangave D, Siddiquei MM, Geboes K. Osteopontin and Other Regulators of Angiogenesis and Fibrogenesis in the Vitreous from Patients with Proliferative Vitreoretinal Disorders. 2012;2012.
103. Hu B, Zhang Y, Zeng Q, Han Q, Zhang L, Liu M, et al. Intravitreal Injection of Ranibizumab and CTGF shRNA Improves Retinal Gene Expression and Microvessel Ultrastructure in a Rodent Model of Diabetes. 2014;1606–24.
104. Kuiper EJ, Nieuwenhoven FA Van, Smet MD De, Meurs JC Van, Tanck MW, Oliver N, et al. The Angio-Fibrotic Switch of VEGF and CTGF in Proliferative Diabetic Retinopathy. 2008;3(7):1–7.
105. Kuiper EJ, de Smet MD, van Meurs JC, Tan HS, Tanck MW, Oliver N, van Nieuwenhoven FA, Goldschmeding R SR. Association of Connective Tissue Growth Factor With Fibrosis in Vitreoretinal Disorders in the Human Eye. 2006;124.
106. Kondo S, Tanaka N, Kubota S, Mukudai Y, Yosimichi G, Sugahara T, et al. Novel angiogenic inhibitor DN-9693 that inhibits post- transcriptional induction of connective tissue growth factor (CTGF / CCN2) by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. 2006;5(January):81–6.

107. Sinawat S, Rattanapakorn T, Sanguansak T, Yospaiboon Y, Sinawat S. Intravitreal bevacizumab for proliferative diabetic retinopathy with new dense vitreous hemorrhage after full panretinal photocoagulation. *Eye* [Internet]. 2013;27(12):1391–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2013.200>
108. Alasil T, Waheed NK. Pan retinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy : pattern scan laser versus argon laser. 2014;25(3):164–70.
109. Chhablani J, Mathai A, Rani P, Gupta V, Arevalo JF, Kozak I. Comparison of Conventional Pattern and Novel Navigated Panretinal Photocoagulation in Proliferative Diabetic Retinopathy. 2014;
110. Ferencak K, Duval R, Cohen JA, Maccumber MW. Intravitreal Bevacizumab For Postoperative Recurrent Vitreous Hemorrhage After Vitrectomy For Proliferative Diabetic Retinopathy. :8–10.
111. Press D. The effect of intravitreal bevacizumab on ocular blood flow in diabetic retinopathy and branch retinal vein occlusion as measured by laser speckle flowgraphy. 2014;1119–27.
112. Oh J, Kim S, Kwon S. The change of macular thickness following single-session pattern scan laser panretinal photocoagulation for diabetic retinopathy. 2015;57–63.
113. Parikh R, Shah RJ, Vanhouten JP, Cherney EF. Ocular Findings At Initial Pan Retinal Photocoagulation For Proliferative Diabetic Retinopathy Predict The Need For. 1997;
114. Malcolm W, Allen F, Wright J, Bezlyak V. Efficacy of Anti-VEGF and Laser Photocoagulation in the Treatment of Visual Impairment due to Diabetic Macular Edema : A Systematic Review and Network Meta-Analysis. 2014;9(7).
115. Stefanini FR, Badaró E, Falabella P, Koss M, Farah ME, Maia M. Anti-VEGF for the Management of Diabetic Macular Edema. 2014;2014.
116. Guyer DR. Subretinal Fibrosis After Laser Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. 1992;400:652–6.
117. Batman C OY. The relation between bevacizumab injection and the formation of subretinal fibrosis in diabetic patients with panretinal photocoagulation. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010;(41(2):190–195.).
118. Han DP, Mieler WF, Burton TC. Submacular Fibrosis After Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1992;113(5):513–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)74722-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(14)74722-1)
119. Zhang B, Zhou KK. Overexpression in Diabetic Retinopathy by SERPINA3K via Blocking the WNT / β -Catenin Pathway. 2010;59(July):1809–16.
120. Winkler JL, Kedees MH, Guz Y, Teitelman G. Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering ribonucleic acid prevents increase in extracellular matrix molecules in a rodent model of diabetic retinopathy. 2012;(April):874–86.
121. Gilbert RE, Kelly DJ, Cox AJ, Rumble JR, Osicka T, Panagiotopoulos S, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces retinal overexpression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes. 2000;1360–7.
122. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension , diabetes and CV disease – moving from macrovascular to microvascular targets. 2009;23:693–703.
123. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins Have Biphasic Effects on Angiogenesis. 2002;739–45.
124. Miyahara S, Kiryu J. Simvastatin Inhibits Leukocyte Accumulation and Vascular Permeability in the Retinas of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. 2004;164(5):1697–706.
125. Fernandes R, Bento CF, Matafome P, Sena CM, Seica RM, Pereira P. Atorvastatin-mediated protection of the retina in a model of diabetes with hyperlipidemia. 2014;1043(October):1037–43.
126. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI E. *Basic Human Immunology*. East Norwalk, CT, Appleton & Lange,. 1991. 7:78-100.
127. Kijlstra A. Editorials The role of cytokines in ocular inflammation Thromboxane in ocular pathophysiology. 1994;885–6.
128. Nishi O, Nishi K, Ohmoto Y. Effect of interleukin 1 receptor antagonist on the blood-aqueous

- barrier after intraocular lens. 1994;917–20.
129. Samples JR, Boney RS, Rosenbaum JT. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected interleukin-2. 1993;12(7):649–54.
 130. Hooks JJ, Chon CC, Derrickf B. Identification of the Lymphokines , Inferferon-gamma and Interleukin-2 , in Inflammatory Eye Diseases. 1988;29(9):1444–51.
 131. Wong GG, Clark SC. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. 1988;9(5):137–9.
 132. Response I. Role of Interleukin 6 in the Cataract Surgery. 2015;
 133. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AL E. Basic and Clinical Immunology. 1993. 11:571-611.
 134. Chiou GCY. Review : Effects of Nitric Oxide on Eye Diseases and Their Treatment. 2001;17(2):189–98.
 135. Carr DJJ, Chodosh J, Ash J, Lane TE, Al CET. Effect of Anti-CXCL10 Monoclonal Antibody on Herpes Simplex Virus Type 1 Keratitis and Retinal Infection. 2003;77(18):10037–46.
 136. Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO, Hughes H. Extensive Vasculogenesis, Angiogenesis, and Organogenesis Precede Lethality in Mice Lacking All av Integrins. 1998;95:507–19.
 137. Reynolds LE et al. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking $\beta 3$ integrin or $\beta 3$ and $\beta 5$ integrins. 2002;27–34.
 138. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M and PG. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3 Circulation. 1996;(93):1493-95).
 139. Siemeister G, Marme D, Martiny-baron G. The alfa-Helical Domain Near the Amino Terminus Is Essential for Dimerization of Vascular Endothelial Growth Factor. 1998;273(18):11115–20.
 140. Takagi H, King GL, Robinson GS, Ferrara N, Paul L. Adenosine Mediates Hypoxic Induction of Vascular Endothelial Growth Factor in Retinal Pericytes and Endothelial Cells. 1996;199.
 141. Dibbens JA, Miller DL, Damert A, Risau W, Vadas MA, Goodall GJ. Hypoxic Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability Requires the Cooperation of Multiple RNA Elements. 1999;10(April):907–19.
 142. Jimenez B et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. 2000;6(1):41–8.
 143. Maeshima Y, Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, et al. Tumstatin , an Endothelial Cell – Specific Inhibitor of Protein Synthesis. 2014;140(2002).
 144. Brooks PC, Silletti S, Schalscha TL Von, Friedlander M, Cheresch DA. Disruption of Angiogenesis by PEX , a Noncatalytic Metalloproteinase Fragment with Integrin Binding Activity. 1998;92:391–400.
 145. H. RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. 2002;8(9):1–4.
 146. J BIT, Dougher-vermazem M, Carrion ME, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bghlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor . Biochem Biophys.Res Commun. 1992;187(3).
 147. Soker S., Takashima S., Miao H., Neufeld G. and KM. Neurophilin -1 is expressed by endothelial and tumor cells and an isoform-specific reseptor for vascular endothelial growth factor. Cell. 1998. 92:735-45.
 148. K. C. The ProteinChip Biomarker System from CIPHERGEN Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. Biochem Soc Trans. 2002;(30(2):82-87.).
 149. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, et al. The case for early detection. 2003;3(April):1–10.
 150. Cao Y, Arbiser J, D’Amato RJ, D’Amore PA, Ingber DE, Kerbel R, et al. Forty-year journey of angiogenesis translational research. Sci Transl Med. 2011;3(114).
 151. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. Blood Cells, Mol Dis. 2007;38(3):258–68.
 152. De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor. Trends Cardiovasc Med. 2002;12(6):241–6.
 153. Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. Prog Retin Eye Res. 2003;22(1):1–29.

154. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: Drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):942–56.
155. Yoo SA, Yoon HJ, Kim HS, Chae CB, De Falco S, Cho CS, et al. Role of placenta growth factor and its receptor flt-1 in rheumatoid inflammation: A link between angiogenesis and inflammation. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):345–54.
156. Kowalczyk L, Touchard E, Omri S, Jonet L, Klein C, Valamanes F, et al. Placental growth factor contributes to micro-vascular abnormalization and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2011;6(3).
157. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):464–78.
158. Gebala V, Collins R, Geudens I, Phng LK, Gerhardt H. Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nat Cell Biol*. 2016;18(4):443–50.
159. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109–19.
160. PETER C, LIEVE M, AERNOU L, VALERIA V, VEERLE C, MARIA DM, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7(5):575–83.
161. Autiero M, Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: Novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1356–70.
162. Beaudry P, Hida Y, Udagawa T, Alwayn IP, Greene AK, Arsenault D, et al. Endothelial progenitor cells contribute to accelerated liver regeneration. *J Pediatr Surg*. 2007;42(7):1190–8.
163. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PlGF Inhibits Growth of VEGF(R)-Inhibitor-Resistant Tumors without Affecting Healthy Vessels. *Cell*. 2007;131(3):463–75.
164. Tarallo V, Tudisco L, De Falco S. A placenta growth factor 2 variant acts as dominant negative of vascular endothelial growth factor A by heterodimerization mechanism. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2011;1(2):265–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969185> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3180054>
165. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med*. 2012;44(1):1–9.
166. Tarallo V, Bogdanovich S, Hirano Y, Tudisco L, Zentilin L, Giacca M, et al. Inhibition of choroidal and corneal pathologic neovascularization by plgf1-de gene transfer. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(13):7989–96.
167. Gelfand M V., Hagan N, Tata A, Oh WJ, Lacoste B, Kang KT, et al. Neuropilin-1 functions as a VEGFR2 co-receptor to guide developmental angiogenesis independent of ligand binding. *Elife*. 2014;3:e03720.
168. Cui JZ, Hinz BJ, Greve MDJ, Potter MJ, Hornan D, Samad A, et al. Expression of neuropilin-1 in choroidal neovascular membranes. *Can J Ophthalmol*. 2003;38(1):41–5.
169. Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, et al. Blocking Neuropilin-1 Function Has an Additive Effect with Anti-VEGF to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Cell*. 2007;11(1):53–67.
170. Tarallo V, Vesci L, Capasso O, Esposito MT, Riccioni T, Pastore L, et al. A placental growth factor variant unable to recognize Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) receptor-1 inhibits VEGF-dependent tumor angiogenesis via heterodimerization. *Cancer Res*. 2010;70(5):1804–13.
171. Cicatiello V, Apicella I, Tudisco L, Tarallo V, Formisano L, Sandomenico A, et al. Powerful anti-tumor and anti-angiogenic activity of a new anti-vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide in colorectal cancer models. *Oncotarget*. 2015;6(12):10563–76.
172. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436–44.
173. Huang H, He J, Johnson D, Wei Y, Liu Y, Wang S, et al. Deletion of placental growth factor

- prevents diabetic retinopathy and is associated with akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition. *Diabetes*. 2015;64(1):200–12.
174. Chen X, Li J, Li M, Zeng M, Li T, Xiao W, et al. KH902 suppresses high glucose-induced migration and sprouting of human retinal endothelial cells by blocking VEGF and PlGF. *Diabetes, Obes Metab*. 2013;15(3):224–33.
 175. Stewart MW, Gripon S, Kirkpatrick P. Fresh from the pipeline: Aflibercept. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(4):269–70.
 176. Moradi A. Vascular endothelial growth factor trap-eye (Aflibercept) for the management of diabetic macular edema. *World J Diabetes*. 2013;4(6):303.
 177. Forooghian F, Kertes PJ, Eng KT, Agrón E, Chew EY. Alterations in the intraocular cytokine milieu after intravitreal bevacizumab. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(5):2388–92.
 178. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: A historical review. *Angiogenesis*. 2008;11(3):215–21.
 179. Al Kahtani E, Xu Z, Al Rashaed S, Wu L, Mahale A, Tian J, et al. Vitreous levels of placental growth factor correlate with activity of proliferative diabetic retinopathy and are not influenced by bevacizumab treatment. *Eye*. 2017;31(4):529–36.
 180. Bates AS, Evans AJ, Jones P, Clayton RN. Assessment of GH status in acromegaly using serum growth hormone, serum insulin-like growth factor-I and urinary growth hormone excretion. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995;42(4):417–23.
 181. Heemskerk VH, Daemen MARC, Buurman WA. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999;10(1):5–14.
 182. Torres-aleman I. Brain Repair and Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I. *Eva Carro*, 1 Jose Luis Trejo, 1 Angel Núñez, 2. *Mol Neurobiol*. 2003;27(2):153–62.
 183. Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Application of insulin-like growth factor I in the treatment of inner ear disorders. *Front Pharmacol*. 2014;5 AUG(September):1–8.
 184. Hernández-Sánchez C, López-Carranza A, Alarcón C, De La Rosa EJ, De Pablo F. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: Local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9834–8.
 185. Frade JM, Martí E, Bovolenta P, Ángeles Rodríguez-Peña M, Pérez-García D, Rohrer H, et al. Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the $\alpha 6$ integrin subunit. *Development*. 1996;122(8):2497–506.
 186. Alarcón C, Morales A V., Pimentel B, Serna J, De Pablo F. (Pro)insulin and insulin-like growth factor I complementary expression and roles in early development. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 1998;121(1):13–7.
 187. Labandeira-García JL, Costa-Besada MA, Labandeira CM, Villar-Cheda B, Rodríguez-Perez AI. Insulin-like growth factor-1 and neuroinflammation. *Front Aging Neurosci*. 2017;9(NOV):1–9.
 188. Miller EC, Capps BE, Sanghani RR, Clemmons DR, Maile LA. Regulation of IGF-I signaling in retinal endothelial cells by hyperglycemia. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(8):3878–87.
 189. Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective β -isoform-selective inhibitor. *Diabetes*. 1997;46(9):1473–80.
 190. Grant MB, Schmetz I, Russell B, Harwood HJ, Silverstein J, Merimee TJ. Changes in insulin-like growth factors I and II and their binding protein after a single intramuscular injection of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(4):981–4.
 191. Vestergaard PF, Hansen M, Frystyk J, Espelund U, Christiansen JS, Jørgensen JOL, et al. Serum levels of bioactive IGF1 and physiological markers of ageing in healthy adults. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(2):229–36.
 192. Kondo T, Vicent D, Suzuma K, Yanagisawa M, King GL, Holzenberger M, et al. Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1835–42.
 193. Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, Carretero A, Nacher V, Haurigot V, et al. Increased ocular

- levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *J Clin Invest*. 2004;113(8):1149–57.
194. Guidry C, Feist R, Morris R, Hardwick CW. Changes in IGF activities in human diabetic vitreous. *Diabetes*. 2004;53(9):2428–35.
 195. Burgos R, Mateo C, Cantón A, Hernández C, Mesa J, Simó R. Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: A case-control study. *Diabetes Care*. 2000;23(1):80–3.
 196. Ringholm L, Vestgaard M, Laugesen CS, Juul A, Damm P, Mathiesen ER. Pregnancy-induced increase in circulating IGF-I is associated with progression of diabetic retinopathy in women with type 1 diabetes. *Growth Horm IGF Res [Internet]*. 2011;21(1):25–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2010.12.001>
 197. S. G. Schwartz, M. A. Brantley and HWF. Genetics and diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(1):86–92.
 198. Hellström A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, De Lacerda L, et al. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(7):3413–6.
 199. Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engström E, Hård AL, Liu JL, 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):5804–8.
 200. Punglia RS, Lu M, Hsu J, Kuroki M, Tolentino MJ, Keough K, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin- like growth factor I. *Diabetes*. 1997;46(10):1619–26.
 201. Zhang S, Wang J, Song C, Zhu L, Yu Y. Lower prevalence of proliferative diabetic retinopathy in elderly onset patients with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract [Internet]*. 2017;125:47–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2016.09.009>
 202. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. 2010;140(6):918–34.
 203. Arroba AI, Alcalde-Estevez E, García-Ramírez M, Cazzoni D, de la Villa P, Sánchez-Fernández EM, et al. Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]*. 2016;1862(9):1663–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.024>
 204. Arroba AI, Valverde ÁM. Modulation of microglia in the retina: new insights into diabetic retinopathy. *Acta Diabetol*. 2017;54(6):527–33.
 205. Guidry C. Tractional force generation by porcine Muller cells: Development and differential stimulation by growth factors. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(2):456–68.
 206. Guidry C, Bradley KM, King JL. Tractional force generation by human Müller cells: Growth factor responsiveness and integrin receptor involvement. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(3):1355–63.
 207. King JL, Mason JO, Cartner SC, Guidry C. The influence of alloxan-induced diabetes on Müller cell contraction-promoting activities in vitreous. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(10):7485–91.
 208. Sramek SJ, Wallow IH, Stevens TS, Nork TM. Immunostaining of Preretinal Membranes for Actin, Fibronectin, and Glial Fibrillary Acidic Protein. *Ophthalmology [Internet]*. 1989;96(6):835–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(89\)32817-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(89)32817-X)
 209. Klaassen I, De Vries EW, Vogels IMC, Van Kampen AHC, Bosscha MI, Steel DHW, et al. Identification of proteins associated with clinical and pathological features of proliferative diabetic retinopathy in vitreous and fibrovascular membranes. *PLoS One*. 2017;12(11):1–21.
 210. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21(SUPPL.6):3–9.
 211. Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2010;35(12):1045–56.
 212. Gavard J, Gutkind JS. VEGF Controls endothelial-cell permeability promoting β -arrestin-dependent Endocytosis VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11):1223–34.
 213. Sidibé A, Imhof BA. VE-cadherin phosphorylation decides: Vascular permeability or diapedesis. *Nat Immunol [Internet]*. 2014;15(3):215–7. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2825>
214. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N. Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J Biochem.* 2017;162(1):55–62.
 215. Leal EC, Martins J, Voabil P, Liberal J, Chiavaroli C, Bauer J, et al. Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes. *Diabetes.* 2010;59(10):2637–45.
 216. Navaratna D, Mcguire PG, Menicucci G, Das A. Blood-Retinal Barrier in Diabetes. 2007;56(September).
 217. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.* 2006;174(4):593–604.
 218. Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, De Hertogh G, Al-Kharashi AS, Van Den Eynde K, Mohammad G, et al. The angiogenic biomarker endocan is upregulated in proliferative diabetic retinopathy and correlates with vascular endothelial growth factor. *Curr Eye Res.* 2015;40(3):321–31.
 219. Shih SC, Robinson GS, Perruzzi CA, Calvo A, Desai K, Green JE, et al. Molecular profiling of angiogenesis markers. *Am J Pathol.* 2002;161(1):35–41.
 220. Davidson MK, Russ PK, Glick GG, Hoffman LH, Chang MS, Haselton FR. Reduced expression of the adherens junction protein cadherin-5 in a diabetic retina. *Am J Ophthalmol.* 2000;129(2):267–9.
 221. Yan Y, Chang Q, Li Q, Li L, Wang S, Du R, et al. Identification of plasma vascular endothelial-cadherin as a biomarker for coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):19466–70.
 222. Lee CS, Kim YG, Cho HJ, Park J, Jeong H, Lee SE, et al. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Increases Vascular Leakage in Retina through VE-cadherin Phosphorylation. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(June):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep29393>
 223. He J, Wang H, Liu Y, Li W, Kim D, Huang H. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor 1 prevents inflammation and vascular leakage in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol.* 2015;2015.
 224. Weinstein N, Mendoza L, Álvarez-Buylla ER. A Computational Model of the Endothelial to Mesenchymal Transition. *Front Genet.* 2020;11(March).
 225. Píera-Velázquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1074–80.
 226. Widyanoro B, Emoto N, Nakayama K, Anggrahini DW, Adiarto S, Iwasa N, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation.* 2010;121(22):2407–18.
 227. Yu CH, Suriguga, Gong M, Liu WJ, Cui NX, Wang Y, et al. High glucose induced endothelial to mesenchymal transition in human umbilical vein endothelial cell. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2017;102(3):377–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.03.007>
 228. Rossato FA, Su Y, Mackey A, Ng YSE. Fibrotic Changes and Endothelial-to-Mesenchymal Transition Promoted by VEGFR2 Antagonism Alter the Therapeutic Effects of VEGFA Pathway Blockage in a Mouse Model of Choroidal Neovascularization. *Cells.* 2020;9(9).
 229. Ting KK, Zhao Y, Shen W, Coleman P, Yam M, Chan-Ling T, et al. Therapeutic regulation of VE-cadherin with a novel oligonucleotide drug for diabetic eye complications using retinopathy mouse models. *Diabetologia.* 2019;62(2):322–34.
 230. Das A, Stroud S, Mehta A, Rangasamy S. New treatments for diabetic retinopathy. *Diabetes, Obes Metab.* 2015;17(3):219–30.
 231. Amadio M, Govoni S, Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016;103:253–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.11.027>
 232. Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM. Fibulins: Physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* 2003;4(12):1127–31.
 233. Xie L, Palmsten K, MacDonald B, Kieran MW, Potenta S, Vong S, et al. Basement membrane

- derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth. *Exp Biol Med.* 2008;233(2):155–62.
234. Lee N V., Rodriguez-Manzaneque JC, Thai SNM, Twal WO, Luque A, Lyons KM, et al. Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1. *J Biol Chem.* 2005;280(41):34796–804.
235. Xiao W, Wang J, Li H, Xia D, Yu G, Yao W, et al. Fibulin-1 is epigenetically down-regulated and related with bladder cancer recurrence. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1–12.
236. Xiao W, Wang J, Li H, Guan W, Xia D, Yu G, et al. Fibulin-1 is down-regulated through promoter hypermethylation and suppresses renal cell carcinoma progression. *J Urol.* 2013;190(1):291–301.
237. Cangemi C, Skov V, Poulsen MK, Funder J, Twal WO, Gall MA, et al. Fibulin-1 is a marker for arterial extracellular matrix alterations in type 2 diabetes. *Clin Chem.* 2011;57(11):1556–65.
238. Scholze A, Bladbjerg EM, Sidelmann JJ, Diederichsen ACP, Mickley H, Nybo M, et al. Plasma concentrations of extracellular matrix protein fibulin-1 are related to cardiovascular risk markers in chronic kidney disease and diabetes. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2013;12(1):1. Available from: *Cardiovascular Diabetology*
239. Oxlund CS, Cangemi C, Henriksen JE, Jacobsen IA, Gram J, Schousboe K, et al. Low-dose spironolactone reduces plasma fibulin-1 levels in patients with type 2 diabetes and resistant hypertension. *J Hum Hypertens.* 2015;29(1):28–32.
240. Hansen ML, Rasmussen LM. Associations between plasma fibulin-1, pulse wave velocity and diabetes in patients with coronary heart disease. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2015;29(3):362–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.01.003>
241. Skov V, Cangemi C, Gram J, Christensen MM, Grodum E, Sørensen D, et al. Metformin, but not rosiglitazone, attenuates the increasing plasma levels of a new cardiovascular marker, Fibulin-1, in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(3):760–6.
242. Tian M, Wang J, Wei Y, Lu Q, Huang B. Serum and vitreous fibulin-1 concentrations in patients with diabetic retinopathy. *J Investig Med.* 2016;64(7):1209–12.
243. Ikeuchi T, Kanan Y, Long D, de Vega S, Hozumi K, Nomizu M, et al. Fibulin-7 C-terminal fragment and its active synthetic peptide suppress choroidal and retinal neovascularization. *Microvasc Res* [Internet]. 2020;129(February):103986. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.103986>
244. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, et al. Isolation and Characterization of Angiogenin, an Angiogenic Protein from Human Carcinoma Cells. *Biochemistry.* 1985;24(20):5480–6.
245. Huang L, Huang Y, Guo H. Dominant expression of angiogenin in NeuN positive cells in the focal ischemic rat brain. *J Neurol Sci* [Internet]. 2009;285(1–2):220–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2009.07.005>
246. Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(7):619–24.
247. Skeie JM, Zeng S, Faidley EA, Mullins RF. Angiogenin in age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2011;17(August 2010):576–82.
248. Jousen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, Mitsiades N, Wiegand SJ, et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol.* 2002;160(2):501–9.
249. Kinoshita Y, Kasaoka S, Fujita M, Oshima C, Kawamura Y, Tsuruta R, et al. Synchronized changes in serum vascular endothelial growth factor during the clinical course of chronic systemic capillary leak syndrome. *Intern Med.* 2010;49(8):791–4.
250. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-Inflammation Cross-Talk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. *J Immunol.* 2004;172(7):4618–23.
251. Tschesche H, Kopp C, Hörl WH, Hempelmann U. Inhibition of degranulation of polymorphonuclear leukocytes by angiogenin and its tryptic fragment. *J Biol Chem.* 1994;269(48):30274–80.

252. Subramanian V, Crabtree B, Acharya KR. Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of motor neurons. *Hum Mol Genet.* 2008;17(1):130–49.
253. Bicknell R, Vallee BL. Angiogenin stimulates endothelial cell prostacyclin secretion by activation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(5):1573–7.
254. Trouillon R, Kang DK, Park H, Chang SI, Ohare D. Angiogenin induces nitric oxide synthesis in endothelial cells through PI-3 and akt kinases. *Biochemistry.* 2010;49(15):3282–8.
255. Yong PH, Zong H, Medina RJ, Limb GA, Uchida K, Stitt AW, et al. Evidence supporting a role for N ϵ -(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine accumulation in Müller glia dysfunction and death in diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2010;16(June):2524–38.
256. Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene.* 2005;24(3):445–56.
257. Marek N, Raczyńska K, Siebert J, Myśliwiec M, Zorena K, Myśliwska J, et al. Decreased angiogenin concentration in vitreous and serum in proliferative diabetic retinopathy. *Microvasc Res.* 2011;82(1):1–5.
258. Agawa T, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Juan M, Umazume K, Kezuka T, et al. Profile of intraocular immune mediators in patients with age-related macular degeneration and the effect of intravitreal bevacizumab injection. *Retina.* 2014;34(9):1811–8.
259. Vilà N, Coblenz J, Moreira-Neto C, Bravo-Filho V, Zoroquiain P, Burnier MN. Pretreatment of RPE Cells with Lutein Can Mitigate Bevacizumab-Induced Increases in Angiogenin and bFGF. *Ophthalmic Res.* 2016;57(1):48–53.