

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ASETİL L KARNİTİN'İN İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTELİ (ARPE-19)  
HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN HİPOKSİ MODELİNDE VEGF VE  
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Ali DAL**

**TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğr. Üyesi Onur ÇATAK**

**ELAZIĞ  
2020**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Mehmet YALNIZ

### DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Fatma Ülkü ÇELİKER

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Onur ÇATAK \_\_\_\_\_ Danışman

### Uzmanlık Tezi Değerlendirme Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

## İTHAF

*Canım kızım ve oğluma....*



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana desteğini esirgemeyen, cerrahi olarak yetişmemdeki büyük katkılarından, içten ve sevgiyle gösterdiği yakınlıktan dolayı, değerli tez hocam Sayın Dr. Öğr. Grv. Onur ÇATAK'a,

Asistanlık sürem boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, eğitimime ve yetişmeme olan katkılarından dolayı çok kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Prof. Dr. Tamer DEMİR, Prof. Dr. Burak TURGUT, Dr. Öğr. Grv. Mehmet BALBABA ve Uzm. Dr. Hakan YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması sürecinde hücre kültürü çalışmasının planlanması ve verilerin analizi konusunda özveriyle çalışan Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma; servis, poliklinik ve ameliyathanede beraber çalıştığım tüm hemşire, teknisyen, sekreter ve yardımcı personele destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

**Dr. Ali DAL**

**Elazığ – 2020**

## ÖZET

Yaşlılığa bağlı maküler dejenerasyon (YBMD), ortalama insanömrünün artması ile birlikte özellikle de gelişmiş ülkelerde sıklığı artan önemli bir görme kaybı nedenidir. YBMD'nin yaş tipinde anti VEGF ilaçlar kullanılmakla birlikte progresyonunu engelleyen kesin tedavisi halen yoktur. YBMD patofizyolojisinde inflamasyon ve oksidatif stresin rol oynadığının anlaşılması ile birlikte yeni tedavi arayışları hız kazanmıştır.

Asetil L-Karnitin (ALKAR)'ın uzun yıllar bilinen ve çeşitli patolojilerde supplement olarak kullanılan bir ajandır. ALKAR'ın daha önceki çalışmalarda, antiinflamatuvar etkinliği ve antioksidan etkinliği birçok defa gösterilmiş olup son yıllarda in vivo çalışmada kanser hücrelerinde anti-VEGF özelliği de gösterilmiştir.

Bizde ARPE-19 hücrelerinde CoCl<sub>2</sub> kullanılarak oluşturulan hipoksi modelinde ALKAR'ın retina pigment epitelinde anti-VEGF ve antioksidan özelliklerini göstermeyi amaçladık. Öncelikle hipoksi modelini oluşturmak için CoCl<sub>2</sub>'ün doz çalışmasını yapılarak 800 µM CoCl<sub>2</sub> ile hipoksi modelinin oluştuğu görüldü. ALKAR doz çalışmasında ise 10 µM'ün etkin doz olduğunu görüldü. ARPE-19 hücrelerindeki hipoksi modelinde hücre canlılık oranları ALKAR verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü (p<0.05). Işık mikroskopuyla yapılan ARPE-19 hücrelerinin morfolojik değerlendirmesinde de ALKAR'ın hipoksiye karşı protektif etki gösterdiği görüldü. Ayrıca Bevacizumab'ın hücre canlılığını azalttığı ve ALKAR ile birlikte verildiğinde ise ALKAR'ın protektif etki gösterdiği görüldü. ALKAR'ın CXCR-4 ve HIF-1α azaltarak anti VEGF özelliği gösterdiği görüldü. ALKAR'ın anti oksidan özelliğinin tespiti için Total Antioksidan Kapasite (TAK) bakılmış olup ALKAR verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05).

Uzun zamandab beri kullanılan ALKAR'ın yeni tespit edilen anti-VEGF özelliği, hipoksinin patofizyolojide yer aldığı retinal hastalıklarda, özellikle de YBMD'de faydalı olacağını düşündürmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** ALKAR, ARPE-19, VEGF,

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ACETYL CARNITE ON VEGF AND OXIDATIVE STRESS IN THE HYPOXY MODEL CREATED IN HUMAN PIGMENT EPITEL (ARPE-19) CELLS

Age-related macular degeneration (AMD) is an important cause of vision loss, with an increase in average human life, especially with increased frequency of developed features. There is still no definitive treatment that prevents the progression of YBMD with age-type anti VEGF drug treatment. With the understanding that inflammation and oxidative stress play a role in the pathophysiology of AMD, the search for new treatments has accelerated.

Acetyl L-Carnitine (ALKAR) is an agent known for many years and used as a supplement in various pathologies. In previous studies of ALKAR, many defaults have been shown for anti-inflammatory activity and antioxidant activity, and finally there is also anti-VEGF feature in in vivo effective cancer cells.

We chose anti-VEGF and antioxidant in ALKAR's retinal pigment epithelium to show them. It was seen to create hypoxia model with 800  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  to form hypoxia model with 800  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . In the ALKAR dose study, it was observed that 10  $\mu\text{M}$  was the effective dose. It was seen that the ALKAR group was statistically significantly increased ( $p < 0.05$ ). ALKAR performed with light microscopy was also shown to have a protective effect on the morphological evaluation of ARPE-19 cells against hypoxia. In addition, Bevacizumab reduced cell viability and ALKAR was shown to have a protective effect when ALKAR was used together. ALKAR was shown to show anti VEGF by reducing CXCR-4 and HIF-1 $\alpha$ . Total Antioxidant Capacity (TAK) was examined and a statistically significant difference was found in the group given ALKAR ( $p > 0.05$ ).

The newly detected anti-VEGF feature of ALKAR, which has been used for a long time, suggests that hypoxia is beneficial in pathophysiology use of space retinal diseases, especially AMD.

**Keywords:** ALCAR, ARPE-19, VEGF

## İÇİNDEKİLER

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| <b>BAŞLIK SAYFASI</b>                                        | i   |
| <b>DEKANLIK ONAYI</b>                                        | ii  |
| <b>İTHAF</b>                                                 | iii |
| <b>TEŞEKKÜR</b>                                              | iv  |
| <b>ÖZET</b>                                                  | v   |
| <b>ABSTRACT</b>                                              | vi  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                           | vii |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>                                      | ix  |
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>                                   | x   |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                              | 1   |
| 1.1. Genel Bilgiler                                          | 3   |
| 1.1.1. Retina Anatomisi                                      | 3   |
| 1.1.1.1. Makula                                              | 3   |
| 1.1.1.2. Ekvator                                             | 5   |
| 1.1.1.3. Ora Serrata                                         | 5   |
| 1.1.2. Retinanın Tabakaları                                  | 5   |
| 1.1.3. Retina Pigment Epiteli Özellikleri                    | 9   |
| 1.1.3.1. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport:    | 9   |
| 1.1.3.2. Görsel Döngü ve Vitamin A Metabolizması             | 10  |
| 1.1.3.3. Fotoresptör Dış Segmentlerin Fagositozu             | 10  |
| 1.1.3.4. Fotooksidasyona Karşı Koruma                        | 10  |
| 1.1.3.5. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler                     | 11  |
| 1.1.4. ARPE -19 (İnsan Retina Pigment Epiteli) Hücre Kültürü | 11  |
| 1.1.5. Hipoksi Ve İskemik Retinopati                         | 12  |
| 1.1.6 VEGF                                                   | 12  |
| 1.1.6.1. Anti VEGF Ajanlar                                   | 13  |
| 1.1.7. Total Antioksidan Kapasite (TAK)                      | 14  |
| 1.1.8. HIF -1 $\alpha$ (Hipoksi –Inducible Factor 1)         | 15  |
| 1.1.9. CXCR 4                                                | 17  |
| 1.1.12. Karnitin                                             | 17  |

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.12.1. Karnitin ve Asetil L-Karnitinin Biyosentezi, Fizyolojisi ve Metabolizması                                 | 17 |
| 1.1.12.2. Karnitinin Özellikleri                                                                                    | 18 |
| 1.1.12.3. Asetil-L-Karnitin (ALKAR):                                                                                | 19 |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>                                                                                        | 22 |
| 2.1. Hücre Kültürü                                                                                                  | 22 |
| 2.2.1. ARPE-19 Hücre Hatlarının Hücre Canlılığı Analizi                                                             | 22 |
| 2.2.2. ARPE-19 Hücrelerinde Hipoksi Modeli                                                                          | 24 |
| 2.3. Gruplar                                                                                                        | 24 |
| 2.4. Total Antioksidan Kapasite Çalışılması                                                                         | 25 |
| 2.5. ELİSA ile VEGF, CXCR4, HIF1 Alfa Düzeyi Belirlenmesi                                                           | 26 |
| 2.6. İstatistiksel Analiz                                                                                           | 26 |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                  | 27 |
| 3.1. ARPE-19 Hücrelerinde Hipoksi Modeli Oluşturulmak İçin Verilen CoCl <sub>2</sub> ' nin Hücre Canlılığına Etkisi | 27 |
| 3.2. ARPE-19 Hücrelerinde ALKAR'ın Hücre Canlılığı Düzeylerine Etkisi                                               | 28 |
| 3.3. ARPE-19 Hücrelerinde ALKAR'ın ve CoCl <sub>2</sub> ' nin Hücre Morfolojisine Etkisi                            | 29 |
| 3.4. ALKAR'ın ARPE-19 Hücrelerindeki Antitoksik Etkisi                                                              | 30 |
| 3.5. ARPE-19 Hücrelerinde VEGF Düzeyleri                                                                            | 31 |
| 3.6. ARPE-19 Hücrelerinde CXCR4 Düzeyleri                                                                           | 32 |
| 3.7. ARPE-19 Hücrelerinde HIF-1 Alfa Düzeyleri                                                                      | 33 |
| 3.8. ARPE-19 Hücrelerinde TAK Düzeyleri                                                                             | 34 |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                                                  | 35 |
| <b>5. KAYNAKLAR</b>                                                                                                 | 40 |
| <b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                  | 52 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                  |                                                                                                                                     |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b>  | Makülanın Anatomik Kesiti                                                                                                           | 4  |
| <b>Şekil 2.</b>  | Retinanın histolojik kesiti                                                                                                         | 5  |
| <b>Şekil 3.</b>  | ARPE-19 Hücrelerinin Elektron Mikroskopik Görünümü.                                                                                 | 7  |
| <b>Şekil 4.</b>  | ALKAR ile anjiyogenezin inhibisyonu mekanizmaları                                                                                   | 21 |
| <b>Şekil 5.</b>  | 24 saat boyunca kontrol ve sırasıyla (200µM, 400µM, 600µM, 800µM)<br>CoCl <sub>2</sub> maruziyeti sonrası hücre canlılık analizleri | 27 |
| <b>Şekil 6.</b>  | ARPE hipoksi modelinde ALKAR'ın hücre canlılık üzerine etkileri                                                                     | 28 |
| <b>Şekil 7.</b>  | ALKAR'ın hipoksi modelinde hücre morfolojisine etkisi                                                                               | 29 |
| <b>Şekil 9.</b>  | Bevacizumabın ARPE 19 hücrelerine toksik etkisine karşı ALKAR'ın etkisi                                                             | 30 |
| <b>Şekil 10.</b> | ARPE hücrelerinde ALKAR'ın VEGF üzerine etkisi                                                                                      | 31 |
| <b>Şekil 11.</b> | ARPE hücrelerinde ALKAR'ın CXCR4 üzerine etkisi                                                                                     | 32 |
| <b>Şekil 12.</b> | ARPE hücrelerinde ALKAR'ın HIF-1α üzerine etkisi                                                                                    | 33 |
| <b>Şekil 13.</b> | ARPE hücrelerinde ALKAR'ın TAK üzerine etkisi                                                                                       | 34 |

## KISALTMALAR LİSTESİ

|               |                                                                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ApoA1</b>  | : Apolipoprotein A-1                                                                                        |
| <b>DMEM</b>   | : Dulbecco's minimum essential medium                                                                       |
| <b>DMÖ</b>    | : Diabetik Maküler Ödem                                                                                     |
| <b>DMSA</b>   | : Dimetilsülfoksit                                                                                          |
| <b>DR</b>     | : Diabetik retinopati                                                                                       |
| <b>ELM</b>    | : Eksternal limitan membran                                                                                 |
| <b>FBS</b>    | : Fetal bovine serum                                                                                        |
| <b>FDA</b>    | : Food and drug administration                                                                              |
| <b>FDT</b>    | : Fotodinamik tedavi                                                                                        |
| <b>FGFR1</b>  | : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1                                                                     |
| <b>GAG</b>    | : Glukozaminoglikanlar                                                                                      |
| <b>GİB</b>    | : Göz içi basıncı                                                                                           |
| <b>HIF-1</b>  | : Hipoksinin indüklediği faktör                                                                             |
| <b>ILM</b>    | : İnternal limitan membran                                                                                  |
| <b>IL-8</b>   | : İnterlökin 8                                                                                              |
| <b>IRBP</b>   | : İnterfotoresptör retinal bağlayıcı protein                                                                |
| <b>KNV</b>    | : Koroidal neovaskülerizasyon                                                                               |
| <b>MARINA</b> | : Minimal classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab<br>in the Treatment of Neovascular AMD |
| <b>MTT</b>    | : Methyl Thiazol Tetrazolium                                                                                |
| <b>N-CAM</b>  | : Nöral Hücre Adezyon Molekülü                                                                              |
| <b>NVG</b>    | : Neovasküler glokom                                                                                        |
| <b>OKT</b>    | : Optik kohorens tomografi                                                                                  |
| <b>PBS</b>    | : Fosfat tamponlanmış serum                                                                                 |
| <b>PDRP</b>   | : Proliferatif diabetik retinopati                                                                          |
| <b>PDGR-B</b> | : Platelet-derived Büyüme Faktörü B                                                                         |
| <b>PFA</b>    | : Paraformaldehit                                                                                           |
| <b>PR</b>     | : Prematüre retinopatisi                                                                                    |
| <b>ROS</b>    | : Reactive Oxygen Species                                                                                   |
| <b>RPE</b>    | : Retina pigment epiteli                                                                                    |
| <b>RVT</b>    | : Retinal ven tıkanıklığı                                                                                   |

**SDF-1** : Stromal cell-derived factor 1  
**TİE-2** : Tyrosin Protein Kinaz Reseptör 2  
**VEGF** : Vasküler endotelyal büyüme faktörü  
**VEGFR-1** : Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 1  
**VEGFR-2** : Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 2  
**YBMD** : Yaşa bağlı makula dejenerasyonu



## 1. GİRİŞ

Retina hücrelerinin uzun süre iskemiye ve oksidatif strese maruziyeti, irreversible hücre kayıpları ile sonuçlanan bir dizi patolojik süreci başlatır. Retinal Ven Tıkanıklığı (RVT), Diyabetik Retinopati (DRP), Prematüre Retinopatisi (PR), ve Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyonu (YBMD) hastalıklarının retinal iskemi önemli rol oynar.

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu santral retinal bölgenin dejenerasyonudur. Amerika ve Avrupa'da tüm körlüklerin %54'ü ve tüm dünyadaki körlüklerin ise %5'i YBMD ile ilişkilidir. YBMD prevalansı Dünya Sağlık Örgütü tarafından %6,5 olarak tahmin edilmektedir (1). Şu anki insidansı 11 milyon olan bu hastalığın ABD'ye yıllık maliyeti 1 milyar doların üzerindedir ve bu oranın 2050 yılında iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (1). YBMD'nin erken ve geç dönem olmak üzere iki tipi vardır. Erken tip subretinal depozitler (druzen) ve pigment epitel değişiklikler ile karakterize iken geç tip coğrafik atrofi (CA) ve yaş tip (neovasküler) YBMD olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Anti-VEGF ajanlar günümüzde YBMD'nin yaş tipinde kullanılmaktadır. Anti -VEGF ilaçların uzun süreli kullanımı bir dizi sorunlar içermektedir (2). CA için henüz kabul edilmiş tedavisi yoktur. YBMD'nin önlenmesi ve ilerlemenin yavaşlatılabilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü, neovaskülarizasyondan primer sorumlu tutulan proanjyogenik bir sitokindir (2). DRP, neovasküler YBMD ve RVT gibi oküler iskemiye neden olan durumlarda patolojik anjiyogenezisin gelişmesinde rol oynamaktadır. Patolojik süreci başlatan VEGF aynı zamanda koriokapiller damar fenestrasyonunu sağlayarak retina pigment epiteline (RPE) ve fotoreseptörlere yeterli kan akımının oluşmasını da sağlamaktadır. VEGF, embriyolojik gelişimde retinal vaskülarizasyonun tamamlanması ve enflamasyon gibi durumlarda fizyolojik anjiyogenezisi sağlar. Retinal iskemik durumların tedavilerinde halen anti-VEGF'ler altın standart olmakla birlikte VEGF'in fizyolojik süreçlerde önemli rolü olduğu ve uzun süre anti VEGF kullanımının geri dönüşsüz zararlara yol açabileceği bildirilmiştir (3).

Kronik oksidatif stres moleküler ve hücresel hasar sonucu RPE hücrelerinin kaybına ve YBMD'ye neden olabilir (4). Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan

bileşiklerdir. Bunun önemli bir kısmını oluşturan reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikallerin dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron bulunduran oksijen atomu ile karakterizedir. İnsanlar; ultraviyole, radyasyon, mikroplar, alerjenler, artan ozon, artmış parsiyel oksijen basıncı, inflamasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve yaşlanma gibi vücutta ROS üretimini artıran çok çeşitli çevresel faktörler ile birlikte yaşar (5). Retinada fotoreseptör hasarı, fotooksidasyon ve lipid peroksidasyonu ile açığa çıkan serbest radikaller oluşabilir. Okside maddelerin sağlıklı dokularda birikmesi sonucu hücre ölümüne, RPE fonksiyon bozukluğuna ve sonuçta maküler dejenerasyona neden olur (6). Antioksidanlar bu zararlı maddelerin oluşumunu engeller, azaltır veya kompanze ederler. Retinanın oksidatif strese karşı savunma sistemlerini, endojen anti oksidan enzimler ve diyet kaynaklı nonenzimatik eksojen antioksidanlar oluşturmaktadır. İleri yaş gurubunda beslenme ile ilgili eksojen antioksidan maddelerin alımı yetersizliği %18-40 oranında görülmüştür (7). Bu durumda beslenme ve antioksidanlar içeren nutrisyonel tedaviler ön plana çıkmaktadır. *The Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) çalışması beta karoten, vitamin C, vitamin E ve çinko alınmasının kuru Tip YBMD'nin progresyonunu azalttığı, yaş tipe dönüşümünü yavaşlattığını göstermiştir (6). AREDS 2 çalışmasında ise lütein ve zeaksantin eklenmesinin YBMD'nin ilerlemesini yavaşlattığı bildirilmiştir (8).

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu genetiğinin ve patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasından sonra yeni tedavi geliştirilmesine odaklanılmıştır. Bunların arasında antiinflamatuvar ve immunomodülatör ilaçlar, nöroprotektif etkili ilaçlar yer almaktadır (9, 10).

L-karnitin mitokondri fonksiyonlarında önemli bir rol oynayan, nöroprotektif, yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişinde ve bunların transformasyonunda rol alan önemli bir ajandır. Ayrıca L-karnitin oksidatif stres ve reaktif oksijen radikalleri üzerinde de önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Asetil L-karnitin (ALKAR) ise kısa zincirli ester türevi olup L-karnitin fizyolojik özellikleri yanı sıra yüksek enerji metabolizması ve anabolik reaksiyonlar sırasında önemli bir asetil grubu donörü olarak mitokondrial fonksiyonlarda stratejik rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak ALKAR'ın inflamatuvar kaynaklı anjiyogenezi inhibe ettiği de gösterilmiştir (11).

Bu çalışmamızda antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif etkinlikleri bilinen son olarak da antianjiojenik özelliği de gösterilen ALKAR'ın; retina pigment epiteli hücrelerinde Kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ ) ile oluşturduğumuz hipoksi modelinde VEGF üzerine etkisini, etki mekanizmasını ve oksidatif strese etkisini değerlendirdik. Retinal hipoksi oluşturan hastalıklarda, özellikle de oksidatif stresin ve inflamasyonun da patofizyolojide rol oynadığı YBMD'nin tedavisinde ALKAR'ın etkisini göstermeyi amaçladık.

## **1.1. Genel Bilgiler**

### **1.1.1. Retina Anatomisi**

Retina, gözde ince transparan bir dokusu olup nöroektodermden gelişir. Retina kalınlığı ora serratada 0.1 mm, ekvator da 0.2 mm, optik sinir yakınında 0.56 mm'dir. Retinanın iç yüzeyi vitreus ile temas etmekteyken dış yüzeyi retina pigment epitelinin (RPE) potansiyel bir boşluk ile ayrılmıştır ve anatomik bağ yoktur. Retina, retina pigment epiteline sadece ora serrata ve optik disk alanında sıkı yapışıktır. Retina dekolmanında sensöriyel retina RPE'den ayrılır (12). Periferde sensöriyel retina ora serrataya uzanıp pars plananın nonpigmente siliyer epiteli olarak devam eder. Sinir lifi tabakası dışındaki diğer retina tabakaları optik sinir başında sonlanır.

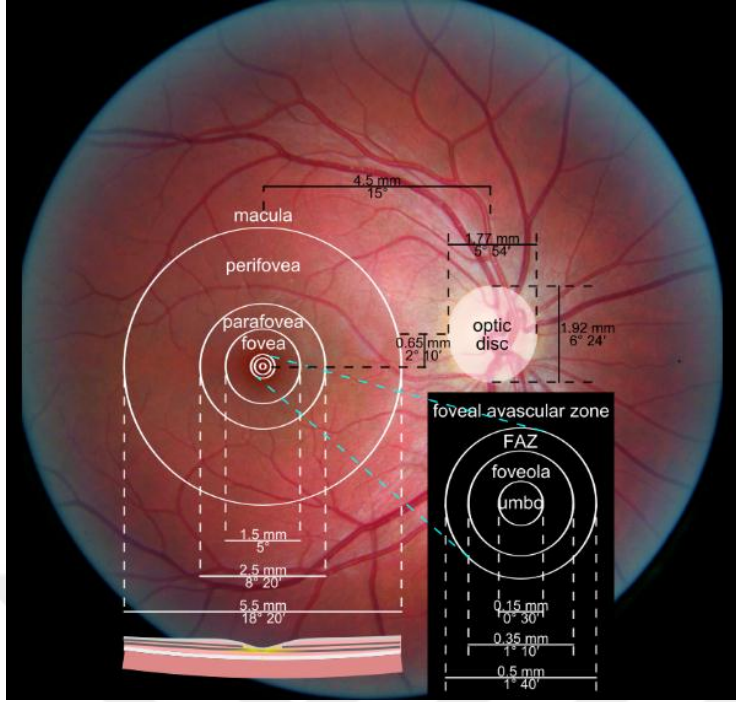
Retina oftalmoskopik olarak 3 bölgeye ayrılır.

- a. Makula
- b. Ekvator
- c. Ora serrata

#### **1.1.1.1. Makula**

Makula lutea olarak da adlandırılan bölge retinanın arka kısmında ksantofil pigmentinin toplandığı kısımdır. Santral makulanın sarı renkte olması lutein ve zeoksantinden oluşan kerotenoidlerin bu bölgede yoğun bulunmasındandır (13). Makulanın yaklaşık çapı 5,5 mm olup merkezi optik diskin 4 mm temporalinde ve 0.8 mm inferiorunda yer alır.

Makula topografik olarak klinik öneme sahip 4 konsantrik zona ayrılır (Şekil 1)



**Şekil 1.** Makülanın Anatomik Kesiti

**Fovea:** Santral retinanın iç yüzeyinde çöküklük oluşturmuş, kalınlığı 0.55 mm ve çapı 1.5 mm (1500  $\mu$ m) olan alandır. Foveada sinir lifi, ganglion hücre ve iç pleksiform tabakaları bulunmamaktadır. Santral foveadaki 0,57mm çapındaki bölgede yalnızca koniler bulunur.

**Foveola:** 350  $\mu$ m çapında, 150  $\mu$ m kalınlığında, gangliyon hücresi içermeyen, retinanın en yüksek kon fotoreseptör yoğunluğuna sahip koroidden beslenen retinanın en ince yeridir (14). İç nükleer tabaka seviyesindeki kapillerin oluşturduğu bir halka ile sınırları belirlenen 250-600  $\mu$ m genişliğindeki foveolar avasküler zon (FAZ) bu bölgededir. Foveanın merkezinde 150 mikron genişliğinde keskin görmeyi sağlayan ‘umbo’ yer alır.

**Parafovea:** Fovea etrafında 0.5 mm genişliğindeki bölgedir. Bu alan ganglion hücre tabakası, iç nükleer tabaka ve dış pleksiform tabakanın en kalın olduğu alandır (12).

**Perifovea:** Parafoveayı çevreleyen 1,5mm genişliğindeki periferik zondur. 6 kat bipolar hücre tabakası ve çok sayıda ganglion hücre tabakası içerir.

### 1.1.1.2. Ekvator

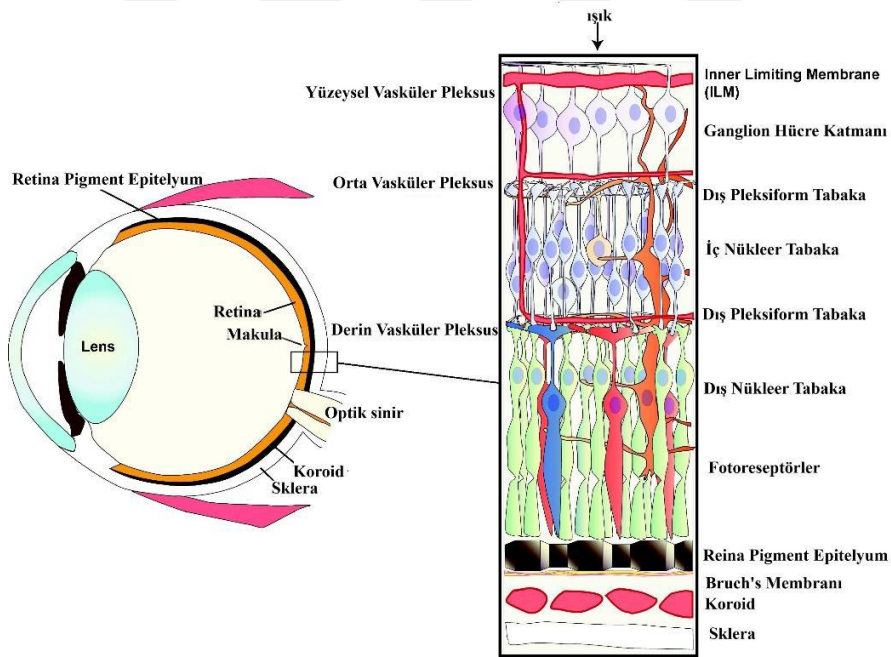
Ekvator ora serratanın 6-8 mm posteriorunda, makulanın 18-20 mm anteriorundaki basillerin çoğunlukta olduğu retinanın bölümüdür.

### 1.1.1.3. Ora Serrata

Ora serrata retina ve silyer cisim arasında yer alan dişli görünümde alan olup nazalde 0.7-0.8 mm, temporalde ise 2.1 mm genişliğindedir. Ora serratanın optik sinire olan ortalama uzaklığı üst ve altta 31 mm nazalde 27 mm, temporalde 32.5 mm'dir (12). Fotoresptörler ora serratada yoktur (13).

### 1.1.2. Retinanın Tabakaları

Retina histolojik olarak incelendiğinde dışta koroidden içte vitreusa kadar on tabakadan oluşur (Şekil 2).



Şekil 2. Retinanın histolojik kesiti

- Retina pigment epiteli (RPE)
- Fotoresptör tabakası
- Dış limitan membran
- Dış nükleer tabaka
- Dış pleksiform tabaka
- İç nükleer tabaka



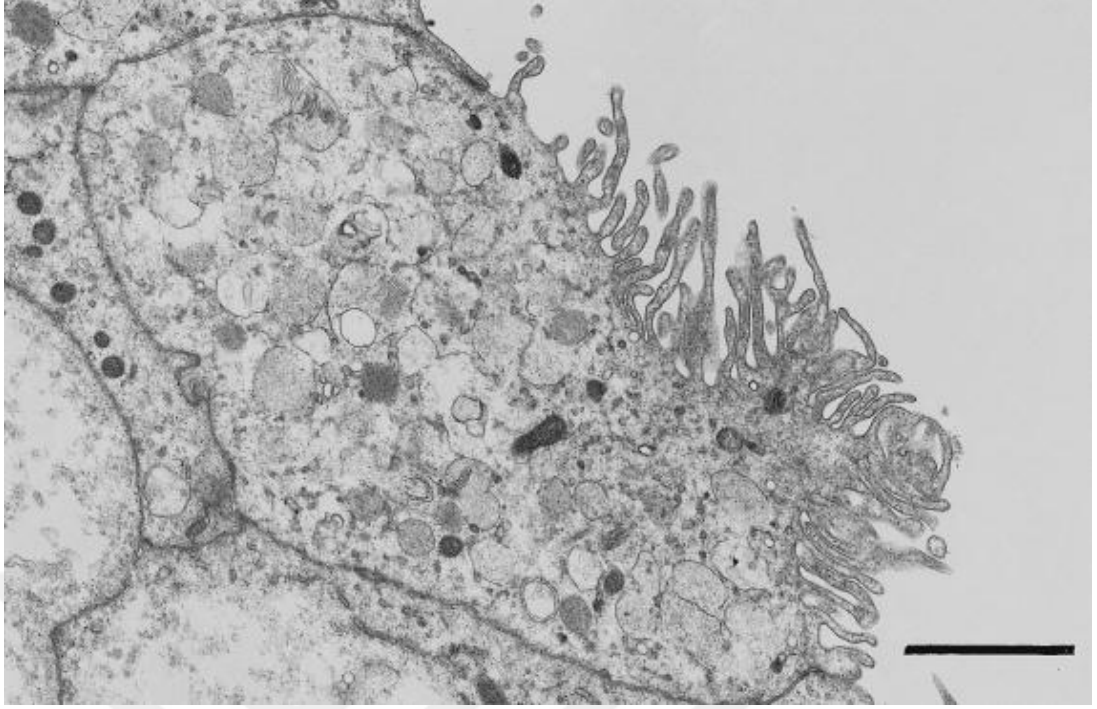
- g. İç pleksiform tabaka
- h. Ganglion hücreleri tabakası
- i. Sinir lifleri tabakası
- j. İç limitan membran

#### **a. Retina Pigment Epiteli**

Retina Pigment Epiteli (Retina Piment Epiteli) hücreleri nöral ektodermden gelişerek, kaldırım taşı manzarası şeklinde tek sıralı kuboidal 4-8 köşeli hekzagonal hücrelerden oluşur. Bruch membranı ve duysal retina arasına yerleşen RPE optik sinir başından başlayarak ora serrataya kadar uzanır ve silyer cisim pigment epiteline kadar devam eder. RPE hücrelerinin yaklaşık sayısı 5 milyon olup büyüklüğü 10 µm ile 60 µm arasında değişir. Mitotik aktiviteye sahip olmadığından yaş arttıkça sayısında önemli değişiklik olmaz.

Retina Pigment Epiteli yoğunluğu fovea merkezinden periferik retinaya doğru azalır (15). RPE apeksi fotoreseptörlerin dış segmentleri ile çok sayıda villuslar oluştururken RPE bazal membranları ile Bruch membranları arasında sıkı yapışıklıklar vardır (13). Retina ve RPE subretinal potansiyel boşlukla ayrılmışlardır ve patolojik durumlarda kolayca ayrılabilir. Hücre membranlarının apikal yüzeyleri fotoreseptörlerin dış segmentleri ile bağlantılar sağlayan 3-7 µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillüsler ile kaplıdır. Her RPE hücresi yaklaşık 45 fotoreseptör hücresiyle temas halindedir.

Retina Pigment Epiteli hücreleri; fotoreseptörlerin dökülmüş olan dış segmentlerinin fagositozunu yüzeyindeki mikrovillusları sayesinde sağlayarak yeniler (Şekil 3). Hücre içine fagosit edilen dökülmüş dış segmentlere lizozomlar yapışır ve fagolizosom oluşturur. Fagolizosomlara hapsedilmiş dış segmentler, bir kısmı hidrolize edilerek küçük moleküllere dönüştürülerek tekrar hücre içine dağılarak kullanılır. Sindirilemeyen segmentler ise hücre içinde birikerek lipofussin granüllerini oluşturur. Yaş ile birlikte lipofussin granüllerinin birikimi artar, RPE hücrelerinin sayısı azalır ve kalan RPE hücrelerinin hacmi artar. YBMD ile lipofussin granüllerinin miktarının aşırı artışı arasında ilişkili olduğu düşünülmektedir. Artan lipofussin birikimi RPE hücre metabolizmasının bozulmasına yol açar (16).



Apikal Mikrovilluslar. (Dunn, K.C et al. 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Çalışmasından alınmıştır.)

### Şekil 3. ARPE-19 Hücrelerinin Elektron Mikroskopik Görünümü.

Retina Pigment Epiteli hücreleri birbiriyle sıkıca yapışırlar Bu bağlantılarda zonula okludens ve zonula adherensler rol alır ve dış kan retina bariyerinin oluşumunu sağlar ve koryokapillaristen subretinal aralığa ekstraselüler sıvı sızıntısını önler (13). Zonula okludens ve zonula adherensler içeren RPE hücreleri makromoleküllerin koryokapillaristen subretinal boşluğa geçişlerini kapatan membran görevi görür ve Verhoeff membranı olarak adlandırılır. Bu membran eksternal limitan membranla beraber dış kan-retina bariyerinin oluşmasında önemli rol oynar (17, 18).

Apikal membranda yerleşen  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase pompa sistemi RPE tarafından koroide aktif sodyum akımında kritik rol oynar ve subretinal boşluktan su ve elektrolitleri aktif olarak dışarı pompalayarak  $\text{HCO}_3^-$  transport sistemi ile birlikte retinanın yatışıklığını sağlar. RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM) salgınır. N-CAM, RPE ve retina arasındaki bağlantının devamına katkıda bulunur (13).

Retina Pigment Epiteli vitamin A metabolizmasını, transportunu, depolanmasını sağlar, içerdikleri melanin granülleri sayesinde ışık saçılmalarını önler, tehlikeli mavi ışığı absorbe eder, lipid peroksidasyonunu önleyerek hücrelerin metabolik aktivitesini korur.

RPE’de lipid membran hasarını önleyen enzimatik antioksidan (glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi) ve enzimatik olmayan antioksidanlar (lütein, zeaksantin, askorbat, karotenoidler, alfa tokoferol, beta karoten gibi) bulunur. RPE hücreleri PDGF, PEDF, VEGF, FGF, TGF gibi birçok büyüme faktörü sentezler (13).

**İnterfotoreseptör matriks:** İnterfotoreseptör matriks RPE ve retina hücreleri arasında bulunur. Dış kısımda RPE hücrelerinin zonula okludenslerce oluşturulan dış retina kan bariyeri, iç kısımda ise Müller hücreleri apikal uzantıları ve fotoreseptörlerin iç segmentleri arasında bulunan intermediyer bağlantılardan (zonula adherens) oluşan eksternal limitan membranı ile sınırlandırılmaktadır. İnterfotoreseptör matriks çeşitli enzimler ve protein içermektedir. Bunlardan biri RPE hücresi ile fotoreseptörler arasında vitamin A türevlerinin transportunu sağladığı gösterilen İnterfotoreseptör Retinoid Bağlayıcı Proteindir (IRBP). Matrik içerisinde glukozaminoglikanlardan (GAG) ve glukoproteinlerden oluşan rod ve konların dış segmentlerini sararak fotoreseptörleri birbirinden izole eden matriks kılıfları olduğu bulunmuştur.

#### **b. Fotoreseptör Tabakası:**

Fotoreseptör hücreleri gözün kırıcı ortamı tarafından yönlendirilen görüntüyü nöral sinyallere çevirerek görme olayını başlatan özelleşmiş hücrelerdir. Retinada koniler ve basiller olmak üzere iki tip fotoreseptör hücresi vardır. Konilerin sayısında merkezden perifer doğru hızlı bir düşüş gözlenir

#### **c. Dış Limitan Membran:**

Fotoreseptörlerin iç segmentleriyle Müller destek hücrelerinin dış uzantılarının aralarındaki bağdan oluşmuştur. Gerçek bir membran değildir. Koni ve basillerin dış ve iç segmentlerinin arasından geçer.

#### **d. Dış Nükleer Tabaka:**

Fotoreseptörlerin çekirdek ve sitoplazmalarının bulunduğu bölgedir.

#### **e. Dış Pleksiform Tabaka:**

Birinci nöron fotoreseptörler ile bipolar ve horizontal hücrelerin arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir.

#### **f. İç Nükleer Tabaka:**

İkinci nöron bipolar hücreleri, bağlantı hücreleri, amakrin ve yatay hücreler ile destek hücreleri Müller hücrelerinin çekirdeklerinin bulunduğu bölgedir.

#### **g. İç Pleksiform Tabaka:**

İkinci nöron bipolarlar ile üçüncü nöron gangliyonlar ve amakrin hücreleri arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir. Foveolada bulunmaz

#### **h. Gangliyon Hücre Tabakası:**

Üçüncü nöron olan gangliyon hücreleri katıdır. Gangliyonlar iki çeşittirler. Periferdekiler daha büyüktürler ve birkaç bipolarla sinaps yaparlar. Merkezdekiler küçüktür ve dendritleri konilerle sinaps yapan bir bipolar hücreyle sinaps yapar.

#### **i. Sinir Lifi Tabakası:**

Korpus genikulatum lateralede sonlanan 1,2 milyon dolayındaki gangliyon hücresi aksonları, sinir lifleri tabakasını oluşturur. Bu tabakada astrositler, mikrogliyal hücreler, retina arter ve venleri ile oligodendrositler de vardır.

#### **j. İç Limitans Membranı**

Retinanın en iç katı olup retinayı vitreustan ayırır. Vitreus ile temas halinde olan iç yüzeyi düzgün olmakla birlikte dış yüzeyi Müller hücrelerinin uçlarından ötürü pürüzlüdür.

### **1.1.3. Retina Pigment Epiteli Özellikleri**

#### **1.1.3.1. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport:**

RPE hücreleri dış retina katları ile koryokapillaris arasındaki molekül ve sıvı transferini düzenleyerek dış retina kan bariyeri oluşumuna katkı sağlar. Bu durum RPE membran proteinlerinin polarize dağılımı ve hücreler arasındaki sıkı kavşak-bağlantı kompleksleri sayesinde olur. Kavşak bağlantıları, zonula okludens, zonula adherens ve gap kavşaklarından meydana gelmektedir. Sıkı bağlantılar sayesinde hücreler arasındaki sıvı transfüzyonu engellenir. RPE hücrelerinin gövdeleri moleküler transfüzyonu sağlar. RPE hücrelerinin tabanlarındaki plazma membran katlantıları ve mikrovilluslar hücre yüzey alanını artırarak katabolitlerin ve besinlerin değişiminde önemli rol oynar (19, 20).

Retinanın yatışık kalmasında RPE hücrelerinin subretinal boşluktaki sıvıyı çekmesiyle ortaya çıkan emme mekanizması rol oynamaktadır. Su ve elektrolitlerin

subretinal aralıktan dışarıya aktif olarak pompalanmasını  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase pompa sistemi ve  $\text{HCO}_3$  transport sistemi sağlar. Bu sistemler aynı zamanda fotoreseptörler arasındaki iyonların dengede kalmasını ve membran oluşumunu sağlar (21).

#### **1.1.3.2. Görsel Döngü ve Vitamin A Metabolizması**

A vitaminin alınması, taşınması ve saklanması RPE büyük rol oynar. Görme, fotoreseptör dış segmentlerin disk membranlarında bulunan ışığa duyarlı pigmentlerin fotolizi ile başlar. Görmenin devamı için dış segmentlerin rejenerasyonu gerekmektedir. Dış segmentlerin fotoliz ve rejenerasyonunda gerekli döngü süreci RPE ile fotoreseptörler arasında retinoidlerin yer değiştirmesi ile sağlanır.

#### **1.1.3.3. Fotoreseptör Dış Segmentlerin Fagositozu**

Retina Pigment Epiteli hücrelerinin fagositozunda, hem yabancı maddelerin fagositozundaki non spesifik yavaş yöntem; hem de dökülmüş dış segmentlerin reseptör aracılı hızlı yöntem mevcuttur. Dış segment hücre içine alındıktan sonra lizozomlar ile birleşerek fagolizozomları oluşturur. Fagolizozomlara hapsedilmiş dış segmentler, bir kısmı hidrolize edilerek küçük moleküllere dönüştürülerek tekrar hücre içine dağılarak kullanılır. Sindirilemeyen segmentler ise hücre içinde birikerek lipofussin granüllerini oluşturur. Yaş ile birlikte lipofussin granüllerinin birikimi artar, RPE hücrelerinin sayısı azalır ve kalan RPE hücrelerinin hacmi artar. YBMD ile lipofussin granüllerinin miktarının aşırı artışı arasında ilişkili olduğu düşünülmektedir. Artan lipofussin birikimi RPE hücre metabolizmasının bozulmasına yol açar. Bu degranülasyon sürecinde meydana gelen reaktif oksijen radikalleri ara ürünlerinin etkilerinin bloke edilmesinde bir grup anti oksidan enzimler görev almaktadır (22).

#### **1.1.3.4. Fotooksidasyona Karşı Koruma**

Fotoooksidasyon sürecinde meydana gelen yüksek oksidatif stresin dengelenmesinde RPE önemli bir role sahiptir. RPE’de lipid membran hasarını önleyen enzimatik antioksidan (glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi) ve enzimatik olmayan antioksidanlar (lütein, zeaksantin, askorbat, karotenoidler, alfa tokoferol, beta karoten gibi) bulunur. Melanin ve lipofussin gibi pigmentler farklı dalga boylarında ışınların yarattığı risklere karşı özelleşmiş antioksidan elemanlardır.

Retina Pigment Epiteli hücrelerinin pasif bariyeri etkisi ile birlikte enflamatuvar mediatörlerin faaliyetlerinin engellemesi retinanın immun sistemden korunmasında önemlidir. Bu açıdan Transforming growth faktör-beta (TGF- $\beta$ ) gibi immunsupresif sitokinleri ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) reseptör aktif salgılanması ile etkilidir. Gözün immun ayrıcalıklı alan olarak kalmasında tüm mekanizmalar bilinmese de RPE hücrelerinin önemli rolü vardır (19).

#### **1.1.3.5. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler**

Retina Pigment Epiteli hücreleri PDGF, PEDF, VEGF, FGF, TGF gibi birçok büyüme faktörlerini ve bu faktörlere karşılık gelen reseptörleri sentezler. Tüm retina katlarındaki Apolipoprotein A-1 (ApoA1)'in ana kaynağı RPE olduğu düşünülmektedir. ApoA1 retinayı oksidatif stresten korur (23).

#### **1.1.4. ARPE -19 (İnsan Retina Pigment Epiteli) Hücre Kültürü**

ARPE-19 (a human RPE cell line, ATCC, Manassas, VA) ilk kez 1986'da Amy Aotaki Keen tarafından motor trafik kazasında ölen, göz açısından sağlıklı 19 yaşında erkek donörün globundan hazırlanmıştır (Lions Göz ve Doku Bankası, CA, ABD). İlk ARPE-19 hücre hattının yapışkan, fibroblastik özellikte olup, normal insan karyotipi gibi 46 kromozom, X ve Y kromozomları içererek normal diploid yapıda olduğu izlenmiştir. Hücrelerin 8. kromozomunun ve 19. kromozomunun uzun kolunda kısa ve küçük delesyonlar olduğu görülmüştür. Normal diploid karyotipte olması hücrelerin hızlı bölünüp pasajlanmasını kolaylaştıran faktör olarak bildirilmiştir. ARPE-19 primer insan RPE hücrelerinin özelliklerini taşımakla beraber hızlı proliferasyon özelliği ile diğer RPE hücre kültürlerinden farklılık göstermektedir. ARPE-19 hücreleri RPE hücrelerine spesifik CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein) ve RPE-65 proteini içermektedir. Hücrelerin bölünmesi yaklaşık 24 saat olarak hesaplanmıştır. Elektron mikroskopik olarak ultrastrüktür analizi yapıldığında kuboidal, kolumnar yapılı, apikal mikrovillus içeren, hücreler arası sıkı adezyon bağlantılarına ve birçok organele sahip hücreler izlenmiştir (24).

Hipoksinin indüklediği faktör -1 $\alpha$  (*Hipoksi İnduced Faktöt*) bir hipoksi markırı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Hipoksi sırasında, HIF-1 $\alpha$  bozulmasından sorumlu enzimlerin aktivasyonu azaldıkça HIF-1 $\alpha$  hızlı bir şekilde birikir. Kobalt

Klorür (CoCl<sub>2</sub>), HIF-1 $\alpha$  bozulmasının iyi bilinen bir kimyasal inhibitörüdür (25). Hücre kültüründe de CoCl<sub>2</sub> kullanılarak hiposik model tanımlanmıştır (26).

#### 1.1.5. Hipoksi Ve İskemik Retinopati

Renal kan akışının herhangi bir nedenle engellenmesi retinal iskekiye neden olarak enerji üretiminin azalmasına bu da apoptoz ve nekroza neden olur. Santral Retinal Ven Tıkanıklığı (SRVT), Yaşlılığa Bağlı Maküler Dejenerasyon (YBMD), Diyabetik Reinopati (DRP) ve Perematür Retinopatisi (RP) gibi patolojilerde retinal iskekiye görülür ve tedavi edilmedikleri takdirde kalıcı görme kayıplarına neden olurlar.

Retina pigment epiteli hücreleri koroidal kapillere yakın yerleşimi sayesinde koroidal kapillerden beslenir ve hipoksik durumdan hemen etkilenir. RPE hücreleri; VEGF ve PDEF (*Platelet Derived Growth Factor*) gibi anjiojenik ve anti-anjiojenik faktörlerin ana kaynağıdır (27).

#### 1.1.6 VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü; DRP, ROP, YBMD ve SRVT gibi retinal iskekiye neden olan patolojilerde neovaskülarizasyon gelişiminde önemli rol oynayan anjiojenik bir faktördür (28). İleri glikasyon son ürünleri, reaktif oksijen ara ürünleri ve hipoksi, RPE'den VEGF salınımını arttıran güçlü uyarıcılardır (29). VEGF-A gen ekspresyonunda ana düzenleyici, hipoksinin indüklediği faktör-1'dir (HIF-1) (30,31). Diğer büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü  $\alpha$  ve  $\beta$ , keratinosit büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü), hipofiz hormonları, nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler (İnterlökin-1 $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) ve onkogenik mutasyonlarla da VEGF ekspresyonu düzenlenir (29, 32, 33). VEGF; endotel hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak yeni damar gelişimini uyarırken diğer hücrelerde mitojenik etkisinin olduğu gösterilmiştir. VEGF bu etkilerinin yanında damar geçirgenliğinde artış sağlayan, nöroprotektif, kemotaktik etkilere sahiptir. VEGF biyolojik aktivitesini üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR 1 (flt-1), VEGFR 2 (flk-1/KDR) ve VEGFR 3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGFR 1 ve VEGFR 2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGFR 3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (34). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal

iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar

Son çalışmalar VEGF'in; RPE hücrelerinin apikal yüzeylerinde bulunan VEGF R2 reseptörlerine bağlanarak retina bariyerindeki geçirgenliği artırdığı ve böylece maküler ödem ve subretinal sıvıya neden olduğu görülmüştür (35).

Vasküler endotelial büyüme faktörünün RPE hücreleri tarafından ekspresyonu, RPE hücre kültürlerinde incelenmiştir ve sonuçlar, RPE hücrelerinin retinokoroidal hastalıkların patofizyolojisine nasıl dahil olduğuna dair anlayışa katkıda bulunmuştur (36).

#### **1.1.6.1. Anti VEGF Ajanlar**

Vasküler endotelial büyüme faktörü kan-retina bariyerinin bozulmasına, damar geçirgenliği arttırarak retina ödemine, endotel hücre proliferasyonuna ve neovaskülarizasyon oluşumuna yol açmaktadır (37) . Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Deneysel çalışmalarda hipoksiye bağlı retinal iskeminin VEGF sentezini arttırdığı bulunmuştur (38). Hipoksi varlığında VEGF'in m-RNA sentezi 30 katına çıkar. Hipoksiye bağlı stimülasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur. Retinal/subretinal neovaskülarizasyon, diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı, iris neovaskülarizasyonu, retina dekolmanı, prematüre retinopatisi, yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan gözlerde aşırı VEGF-A salınımı izlenmiştir (37, 39, 40).

**Bevacizumab** (Avastin; Genentech, South San Francisco, CA) Şubat 2004'de FDA tarafından metastatik kolorektal kanserlerin tedavisi için onaylanan, tam uzunlukta monoklonal antikordur. Son zamanlarda YBMD'de ruhsat dışı (off-label) intravitreal ve intravenöz kullanımı tariflenmiştir. Bevacizumab VEGF'ye spesifik olarak bağlanan ve VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize eden rekombinant insan monoklonal antikorudur. Bevacizumab, fare epitoplarının insanlara uygulanması ile fareden VEGF'ye karşı elde edilmiş ve insan bağışıklık sistemine uygun hale getirilmiştir. Aminoasit diziliminin % 93'ü insan ve % 7'si fare kökenlidir. Klinik uygulamalarda bevacizumabın 1.25 mg dozunun yeterli olabileceği düşünülmüş ve bu



da birçok klinik çalışma ile desteklenmiştir. Tekrar enjeksiyonun süresinin ise ilacın biyolojik aktivitesi göz önüne alınarak 4-5 hafta olduğu bildirilmiştir (20).

**Ranibizumab** (Lucentis, Novartis Pharma AG, Basel, İsviçre and Genentech, San Francisco, California, ABD) VEGF'e bağlanan, rekombinant teknolojisi ile üretilmiş insanlaştırılmış antikordur (Fab). Pegaptanibten farklı olarak, VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanarak biyolojik aktiviteyi sonlandırır.

**Aflibercept** (EYLEA® 2mg/0.05 ml, Regeneron Pharmaceuticals, New York, USA) VEGF'lere bağlanır ve VEGFR-1-VEGFR-2 etkinleşmesini bloke eder.

**Pegaptanib** (Macugen; Eyetech Pharmaceuticals; Pfizer Inc, New York, ABD) VEGF165'e yüksek afinitesi ve özgüllüğü olan RNA oligonükleotid ligandır. Diğer anti-VEGF tedavilerden farklı olarak tüm izoformların yerine VEGF165'in ve diğer büyük VEGF moleküllerinin, heparin bağlayıcı kısımlarına bağlanarak, VEGF reseptörlerine bağlanmasını engeller.

#### 1.1.7. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Oksidatif stres; vücutta antioksidan-oksidan dengesinin oksidanlar yönünde bozulması sonucu ortaya çıkan durumdur. Antioksidanlar; reaktif oksijen türleri, reaktif azot türleri ve serbest radikallerle reaksiyona girerek oluşabilecek hasarları engelleyen yararlı bileşiklerdir. Antioksidanlar enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılır.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon S-transferazlar (GST), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), hidroperoksidaz hücre içi ortamda aktif enzimatik antioksidanlar sınıfında yer alır. Miyogloblin, laktoferrin, C ve E vitaminleri, ferritin, sistein, melatonin, seruloplazmin, transferrin, hemoglobin, bilirubin, glutatyon, metiyonin, albümin ise enzimatik olmayan, genelde hücre dışı ortamda yer alan, endojen antioksidanlar olarak bilinir. Hücre membranlarındaki lipid peroksit zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlar olan C ve E vitaminleri hücre içinde de aktivite gösterir (41). Vitamin E, karnitin, omega-3-poliansatüre yağ asitleri gibi antioksidanlar, neovaskülarizasyonu damar obliterasyonunu azaltarak inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (42). Plazma, serum, idrar ve diğer biyolojik örneklerde antioksidanlar bulunur, onların tek başına ölçümü pratik değildir. Total antioksidan kapasite birçok değişik bileşik ve

sistemik metabolik tepkimenin total sonucunu, biyosistemlerdeki toplam antioksidan durumu tek başına ölçmekte çok yararlı olabilir. Plazmadaki antioksidan moleküller antioksidan kapasiteye büyük katkıda bulunur. Serum örneklerinde TAK ölçme yöntemi 2004’de Erel tarafından geliştirilmiş olup kalibratör olarak stabil antioksidan standart solüsyon, ticari ismiyle Trolox kullanılır. Trolox E vitamininin suda çözünür bir analogudur. Kit’in ölçüm birimi olarak mmol Trolox Equiv./L kullanılır. Ölçüm lacivert yeşil renkli ABTS (Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit) radikalini renksiz ABTS formuna indirgermesinin 660 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değışiklik örneği ile elde edilir (43). Oksidatif stres indeksi (OSİ) oksidatif stresin bir belirteci olup TAK ve vücuttaki oksidan maddelerin toplam etkisini yansıtan total oksidatif stres (TOS) değerlerinin (µmol’la hesaplanan) oranını yüzde olarak belirler. TOS’un TAS’a bölünmesiyle elde edilen OSİ’nin birimi Arbitrary Units (AU)’ dir.

$$OSİ = TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L}) / TAS (\text{mmol trolox Equiv. / L}) \times 100$$

#### **1.1.8. HIF -1 α (Hipoksi –Inducible Factor 1)**

Hipoksinin indüklediği faktör-1α ilk olarak hipoksiye yanıt olarak eritropoetin (EPO) artışına neden olan transkripsiyonel kompleks olarak tanımlanmıştır. Semenza ve Wang 1992 ‘de EPO’nun 3’ Hipoksi Response Element (HRE) ile oksijene bağımlı şekilde etkileştiği bir faktörü keşfetmişler, bu DNA bağlayan kompleksi HIF-1 olarak adlandırmışlardır. Daha sonraki çalışmalarda EPO üretmeyen hücre serilerinde de bu aktivitenin olduğunu gösterilmişir. Kimyasal saflaştırılma kullanarak Wang ve Semenza 120 kDa α- alt ünitesi ve 91-94 kDa β-alt ünitesini içeren heterodimerik faktör gösterilmiştir (44). HIF-1 proteini, hücrede sürekli olarak eksprese edilen HIF-1 β altünitesi ile HIF-1 α altünitesinin bir araya gelmesi ile oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 α altünitesi, ortamda oksijen konsantrasyonunun azalmasına bağımlı olarak aktive olmaktadır. HIF-1 transkripsiyon faktörünün işlevinin düzenlenmesinde rol oynayan iki temel unsur, HIF-1 α’nın hipoksik koşullarda stabilizasyonu ve normoksik koşullarda degradasyonudur (45). Hipoksik koşullar altında, HIF-1 α alt ünitesi sitoplazmadan çekirdeğe yer değıştirerek HIF-1 beta ile dimer oluşturur. Çekirdekdeki diğer kofaktörlerin de bağlanması ile aktive olan HIF-1, DNA üzerinde “hipoksi cevap elemanı” olarak tanımlanan özgül diziye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu

tetikler. Normoksik koşullar altında ise, HIF-1  $\alpha$  alt ünitesi ubiquitinasyon yolu ile proteozomda degrade olur (46). Hipoksiye ek olarak, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler de HIF ifadesini tetikleyebilir (47). Hipoksiye hızlı bir şekilde cevap verebilmek için hücreler HIF-1 $\alpha$  proteinini düzenli ve devamlı olarak hipoksik olmayan koşullarda da sentez ve elimine ederler (48). HIF-1 $\alpha$  alt ünitesi normoksik koşullarda kararsızdır ve sonraki degradasyonlar için E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir parçası olan VHL proteininin hedefidir. Hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  proteazomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir, kararlı hale gelir, fosforillenir ve nükleusa geçerek HIF-1 $\beta$  ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hipoksiyle indüklenebilen genlerin güçlendirici ya da promotörüne bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi cevap elementleri ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonlarını başlatır (49, 50).

Hipoksi; oksijen bağımlı bir transkripsiyon faktörü olan HIF ile regüle olur. HIF-1 $\alpha$  proteini hücrede O<sub>2</sub> %1 olunca ortaya çıkar. O<sub>2</sub> %20'ye çıkınca kaybolur. HIF-1 $\alpha$  yarılanma ömrü 1-5 dakikadır. Hücre hipoksi/anoksiye maruz kalınca 2 dakika içinde çekirdekte HIF-1 $\alpha$  birikmeye başlar. VEGF mRNA salınımını, hipoksi HIF-1 $\alpha$  aracılığı ile stimule eder. HIF-1 $\alpha$  hipoksi veya anoksinin daha yoğun (<0.1 O<sub>2</sub>) ve akut dönemde (2-24 saat) etkinlik gösterirken; HIF-2 $\alpha$  ise orta derecede hipoksik (<5O<sub>2</sub>) ve kronik koşullarda (48-72 saat) ortaya çıkar (51).

Rigiracciolo ve ark. (52), hipoksi koşul altında HIF-1 $\alpha$  'nın VEGF geninin transkripsiyon aktivasyonunu düzenlediğini gösterdi. Yenidoğan retinopatisi ile ilgili bir çalışmada, hipoksinin HIF-1  $\alpha$  'nın yukarı regülasyonunu indüklediğini ve VEGF ekspresyonunu daha da artırdığını, novaskülerizasyonu kolaylaştırdığı, böylece hastalığın başlangıcını ve ilerlemesini hızlandırdığı gösterilmiştir (53). Son yıllarda yapılan çalışmalarda retina anjiyogenezi ve hipoksi sürecinde HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı vitreusda HIF-1 $\alpha$ 'nın azalması VEGF ekspresyonunu azalttığı gösterildi (54). HIF-1 inhibitörü akriflavinin, proliferatif diyabetik retinopati ve diğer iskemik retinopatiler ile ilişkili retinal neovaskülerizasyonu baskıladığını gösterdi (55).

#### **1.1.9. CXCR 4**

CXCR4, membran yerleşimli bir reseptördür. CXCR4, CXCL12 için spesifik bir alfa-kemokin reseptörüdür. Hematopoeziste ve kardiyak ventriküler septum oluşumunda rol oynar. Ayrıca, endotelial hücrelerde vasküler dallanma ve/veya yeniden şekillenme süreçlerini düzenleyerek, gastrointestinal sistemin vaskülarizasyonunda önemli bir rol oynar (56).

#### **1.1.12. Karnitin**

Karnitin hücrenin enerji üretimi için beta oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişinde görev alan, antioksidan özelliği kanıtlanmış, asetillenmiş koenzim A (CoA) miktarını düzenleyen ve diğer hücresel metabolik olaylarda yer alan vitamin benzeri bir bileşiktir. Vücutta L izoformunda bulunan karnitinin L-karnitin (LCAR), propiyonil L-karnitin ve asetil L-karnitin (ALKAR) türevleri bulunmaktadır.

##### **1.1.12.1. Karnitin ve Asetil L-Karnitinın Biyosentezi, Fizyolojisi ve Metabolizması**

Esansiyel bir vitamin olduğu düşünülen karnitin daha sonra karaciğer, böbrek ve beyinde aminoasit öncüllerinden sentezlendiği gösterilmiştir (57). Karnitin sentezinde esansiyel aminoasitler olan lizin ve metiyonin görev alır. Sentezin ilk basamağı L-lizin aminoasidinin S adenozilmetiyonin (SAM) ile metilasyonudur. C vitamini, demir, magnezyum, B3 ve B6 vitaminleri, alfa ketoglutarat ve SAM sentezi için gerekli olan kofaktörler (metiyonin, folik asit, B12 vitamini, betain) endojen karnitin sentezinde rol oynamaktadır (57). İnsanlarda karnitinin %25'i ise endojen olarak sentezlenirken %75'i diyetten sağlanır (58). Karnitin kaynakları çoğunlukla et, süt gibi hayvansal ürünlerdir. Pişirilmeye ve hazırlamaya bağlı diyetteki karnitin içeriği değişebilir. Endojen olarak sentezlenen ve dışarıdan alınan karnitin L izoformundadır (57). L-karnitin aktif transport ve pasif difüzyon yolları ile barsaklardan emilir. 15 saatlik bir yarı ömrü vardır ve oral alımdan üç buçuk saat sonra maksimum kan konsantrasyonuna ulaşılır. Karnitin ağırlıklı olarak kalp ve iskelet kasında depolanır. Karnitin vücuttan atılımı esasen böbrekler yolu ile olur (57).

Karnitin hücrel enerji metabolizmasında serbest uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonunun sağlanması için esansiyel bir kofaktör olarak rol alır. L-karnitin beta oksidasyonu hızlandırarak asetil CoA miktarını artırır, potansiyel toksik asetil CoA metabolitlerini tamponlar ve asetil CoA/CoA oranını düzenler. Bu oran glukoneogenez, üre siklusu, sitrik asit siklusu ve yağ asit oksidasyonunda görev alan birçok mitokondriyal enzim aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir (57, 59, 60).

#### 1.1.12.2. Karnitinin Özellikleri

**Antioksidan ve Antiapoptotik:** L-karnitin serbest uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyona gidebilmek üzere mitokondri matriksine geçişinde rol alır. Beta oksidasyon sonucu asetil CoA oluşur. Asetil CoA çok miktarda oksijenin tüketilip ATP üretildiği trikarboksilik asit siklusüne girer. Böylelikle bu siklus sonunda H<sub>2</sub>O'ya indirgenen oksijenin konsantrasyonu azalır ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu azalmış olur (61). Hücre içi oksidatif hasar lipid peroksidasyonuna, fosfolipid yıkımına ve bu yolla serbest yağ asidi miktarının artmasına neden olur (62, 63).

Serbest uzun zincirli yağ asitleri hidrofobik anyonlar olup; mitokondri dahil olmak üzere hücre membran yapılarında ve fonksiyonlarında değişikliğe yol açar (63, 64). Aynı zamanda mitokondrilerdeki voltaj bağımlı kanallarla etkileşimde bulunup membran geçirgenliğinde değişikliğe ve sitokrom c salınımına ve apoptoza yol açarlar (64–66). Karnitinin, farklı hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda, serbest yağ asitlerinin neden olduğu hücre membran geçirgenliğindeki değişiklikleri, apoptozu, mitokondriyal disfonksiyonu ve lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde engellediğini göstermiştir (67, 68). L-karnitin antioksidatif savunma mekanizmasındaki üç enzimin -glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz-peroksidatif hasardan korunmasında ve dolayısıyla serbest radikallerin neden olduğu yaşla meydana gelen değişikliklerin giderilmesinde önemli bir ajandır (69, 70). Bir çalışmada L-karnitin,  $\alpha$ - tokoferol ve troloks gibi referans antioksidanlarla karşılaştırılmış, lipid peroksidasyonunu önleyici etkisi ve antiradikal özellikleri gösterilmiştir (70).

**İmmünmodülatör:** Karnitinin antiinflamatuvar etkinliğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. L-karnitinin kardiyoprotektif etkisinde inflamatuvar sitokinlerin

rolünün çalışıldığı bir hayvan deneyinde; L-karnitin uygulamasının interlökin-1 $\beta$ , interlökin 6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerini önemli oranda azaltarak inflamatuvar süreci azalttığı gösterilmiştir (71). Sıçanlarda oluşturulan artrit modellerinde L-karnitin ile beraber  $\alpha$ -lipoik asit uygulamasının TNF- $\alpha$  seviyelerini anlamlı oranda düşürdüğü gösterilmiştir (72). Kronik hemodiyaliz hastalarında yapılan bir çalışmada da intravenöz L-karnitin uygulamasının serum C-reaktif protein (CRP) düzeyini anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir (73).

#### **1.1.12.3. Asetil-L-Karnitin (ALKAR):**

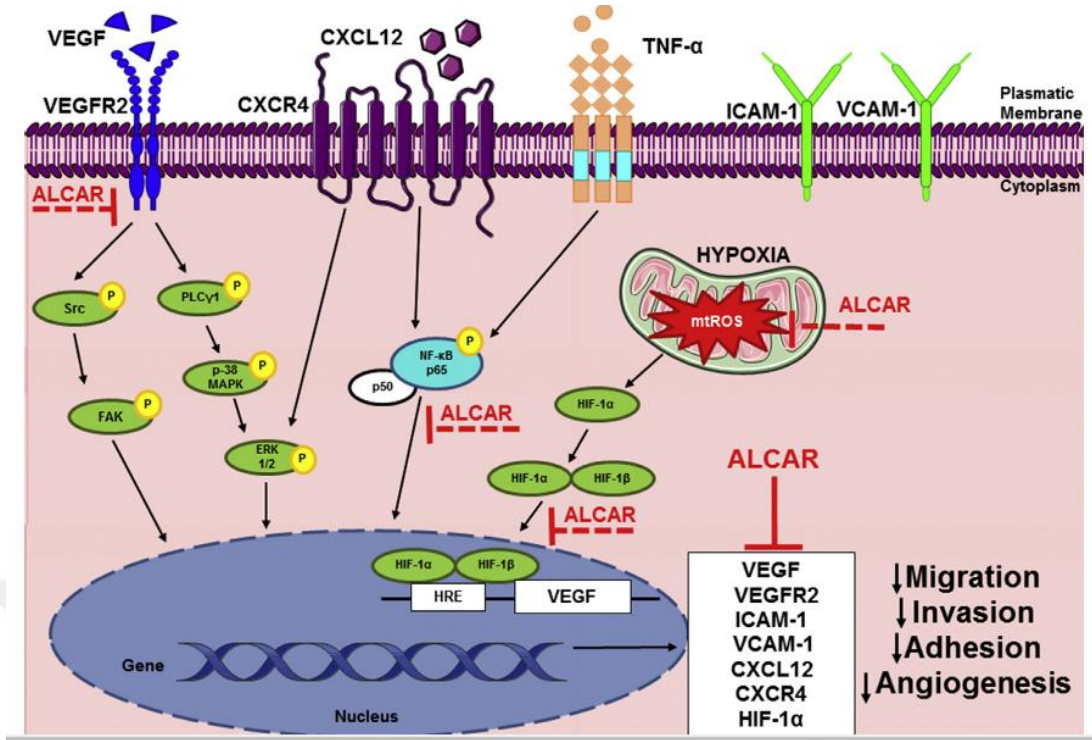
Asetil-L-Karnitin kısa zincirli ester türevi olup vücutta en çok bulunan açıl karnitin türüdür. ALKAR; karnitin ve türevlerinin etkilerinin yanında, güçlü nöroprotektif ve antiapoptotik özellikleri kanıtlanmıştır. Nöroprotektif özelliklerini; antioksidan, antiapoptotik aktivite, intraselüler membranların stabilizasyonu ve kolinerjik nörotransmisyon yolu ile sağlamaktadır (74). Son yıllardaki çalışmalarda asetil L-karnitin apoptotik yollarda kaspaz 3 ve 9'u engelleyerek apoptozu etkin bir şekilde önlediği gösterilmiştir (21, 75).

Asetil-L-Karnitin, glutasyonu artırıp, MDA'nın konsantrasyonunu düşürerek nöroprotektif etki yapar (76). Ayrıca sinir büyüme faktör reseptör sentezini başlatır ve hipokampüste seviyesini artırır (77). ALKAR'ın, nöropatik ağrıyı belirgin ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Nöropatik ağrı, spontan ağrı ve hiperaljezi ile karakterizedir. ALKAR ile intramüsküler (i.m.) kronik tedavi, nöropati veya radikulopatilerin ağrılarını iyileştirir (78). ALKAR'ın bir etkisi de semptomatik diabetik nöropati tedavisinde kaydedilmiştir (79). ALKAR, L-karnitin kas dokusu üzerinde bilinen etkilerine sahip bir bileşiktir. Mitokondrilerde ATP üretimi için uzun zincirli yağ asitlerinin taşınmasında görev alır. ALKAR'ın iskelet ve kalp kasındaki etkileri ise, lipid peroksidasyonunu azaltarak çalışan kas dokusu üzerindeki serbest radikal hasarını önleyen antioksidan etkilerini içermektedir (80). Sisplatine bağlı nefrotoksisite oluşturulan sıçanlarda asetil L-karnitin kullanımının böbrek fonksiyonlarında düzelme sağladığı ve doku düzeyinde böbreği koruyucu ve apoptozu önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (81). Başka bir çalışmada sisplatin ile ALKAR uygulamasının sisplatinin neden olduğu işitme bozukluğunu, kohlea ve beyin harabiyetini azaltabildiği gösterilmiştir (82).

Oftalmolojide ALKAR birçok hastalıkta denenmiştir. Uzun zincirli yağ asidi oksidasyonu gibi metabolik yolların kolaylaştırılmasıyla ve metabolik aktivite ve substrat kullanımının artması sayesinde kolinerjik nöronlarda sinaptik modülasyona neden olabilen görsel uyarılmış potansiyelleri arttırdığı gösterilmiştir (83). Streptozotosin ile oluşturulan diyabetli sıçanlarda, ALKAR'ın elektroretinografik (ERG) anormallikleri b-dalgası genliği önemli ölçüde iyileştirerek düzelttiği gösterilmiştir (84). Sağlıklı gönüllülerde ALKAR 'ın patern uyarılmış ERG'lerin Fourier analizinde önemli ölçüde ( $p < 0.05$ ) genliği arttırdığı ve fazını kısalttığı gösterilmiştir (85).

Asetil-L-Karnitin gıda takviyesi, yukarıda bahsedilen farmakotobolik etkileri ile, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, katarakt, glokom ve kuru göz sendromu; sistemik hastalığa sekonder göz bozuklukları (diyabetik retinopati, nörotrofik veya büllöz keratopati); ve kalıtsal oküler durumlar (retinitis pigmentosa, keratokonus) çok çeşitli oküler patolojilerde ayrıntılı olarak tartışılmıştır (86). L-karnitin, eritritol ve betain, hiperosmotik strese maruz kalan insan kornea epitel hücrelerinde enflamatuvar yanıtları baskılayan ozmoprotektanlar olarak işlev gördüğü ve kuru göz tedavisinde terapötik etkisinin olduğu L-karnitinin üçü arasında en büyük ozmoprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (87). ALKAR'ın yüksek glikoz kaynaklı oksidatif stres oluşturulan retinal ganglion hücrelerinde antioksidatif etkileri gösterilmiştir (88). Karnitin glokom modelinde, mitokondriyal performansı artırarak, genel homeostatik yanıtı iyileştirdiği ve apoptotik olayları sınırladığı gösterilmiştir (89).

Yukarda belirtilen etkinlerine ek olarak ALKAR'ın oksidatif stresle indüklenen patolojik anjiyogenez üzerine muhtemelen antioksidan yeteneği ve mitokondri üzerindeki stabilize edici etkileri nedeniyle inflamatuvar kaynaklı anjiyogenezini inhibe ettiğini gösterilmiştir (11). ALKAR'ın etkileri Şekil 3'te özet olarak gösterilmiştir.



(Baci ve arkadaşları Acetyl-L-carnitine is an anti-angiogenic agent targeting the VEGFR2 and CXCR4 pathways 2018 çalışmasından alınmıştır.)

#### Şekil 4. ALKAR ile anjiyogenezin inhibisyonu mekanizmaları

##### ALKAR'ın anti-VEGF etkisini;

- i) VEGF / VEGFR2 aracılı sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla;
- ii) HIF-1  $\alpha$  ve VEGF'nin down regülasyonu
- iii) NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunun bloke edilmesi ve ICAM'ın down regülasyonu yoluyla;
- iv) CXCR4'ün down regülasyonu ile Mekanizmaları ile gösterdiği belirtilmiştir (11).



## 2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

### 2.1. Hücre Kültürü

ARPE-19 hücreleri American Type Cell Culture (ATCC)'den temin edilerek steril hücre kültürü inkübatöründe 24-48 saat inkübasyon ile hazırlandı. Bu hücrelerin besiyeri olarak kullanılan %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ile takviye edilmiş Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) ortamında, %1 L-glutamin ve %1 penisilin ve besi yeri 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> nemlendirilmiş bir atmosferde inkübasyonu edildi (90, 91). Hücrelerin kontrolleri her gün inverted mikroskopta gözlemlendi ve hücreler yaklaşık %70-80 konfluent olduklarında yeni pasajlar yapıldı. Besiyeri her 2-3 günde bir değiştirildi (92). Dondurulmuş ARPE-19 hücre hatlarının çözülmesi için krioviyal tüpler içerisinde %5 DMSO (dimetil sülfoksit) ile dondurulmuş olan ARPE-19 hücre hatları, -80°C'lik derin dondurucu cihazından alınarak 37°C'de çözüldü. 4°C'nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterdiğinden dolayı 37°C'de hücreleri çözündürürken hızlı bir şekilde çalışıldı. Falcon tüplere yaklaşık 15 ml yeni besiyeri ilave edilerek 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkon tüplerin içerisinde bulunan süpernatant kısım aspire edildi ve hücre pelletleri üzerine tekrar (~15ml) besiyeri eklenerek ikinci kez santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek uzaklaştırıldı ve çöken ARPE-19 hücrelerinin üzerine sırası ile DMEM/F12 besi yerlerinden 1 ml eklenerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Ardından hücrelerin üzerine 9 ml besiyeri daha ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu 75cm<sup>2</sup>'lik flasklara aktarıldı. Flasklar, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

#### 2.2.1. ARPE-19 Hücre Hatlarının Hücre Canlılığı Analizi

Hücrelerin canlılıklarının ve sayılarının belirlenmesinde, membran bütünlüğünü ölçmeye dayalı test olan %0,5'lik tripan mavisi boyası testi kullanıldı. Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi yapabildiklerinden dolayı hücre membranından giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz

görülür ve ölü hücreler mitokondri organelinde metabolik enerji ihtiyacını yerine getirememekte hücre membranından geçen boya maddesini absorblar, hücre dışına çıkartamaz aktif taşıma için enerji ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından mavi renkte görülür. ARPE-19 hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl %0,5 tripan mavisi boyası ilave edilerek iyice karışması sağlandı. ARPE-19 hücre hattında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10µl örnek alındı, distile su ile temizlenen Neubauer hemositometresinin lamındaki sayım odacığına konuldu. Işık mikroskopunda 20X oküler kullanılarak dört karede hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı metabolize edip parlak görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi. Hücre canlılığı aktivitesini değerlendirmek için Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) testi kullanıldı. Bu çalışmada, ARPE-19 üzerindeki hücre canlılığı etkisini değerlendirmek için kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır ve hayatta kalan hücrelerin yüzdesini belirlenebilmek için kullanıldı. MTT testi, MTT'nin sarı tuzunu suda çözünmeyen mor formazan kristaline dönüştürmek için mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesi saptandı. Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülür ve üretilen renk ELISA okuyucusu kullanılarak belirtilen dalga boyunda ölçüldü (93). Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır. MTT analizi yöntemi 96'lık plak kuyucuklarında bulunan 100µl medyum ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış tiazolil mavi tetrazolium bromid solüsyonundan 25µl ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plak inkübatöre alınarak 4 saat bekletildi. Dört saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100µl ilave edildi ve 20 dk. daha inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikrolak okuyucu spektrofotometre ile 570 nm absorbans değerinde ölçümler kaydedildi. Bu amaçla hücreler 96-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde DMEM/F12 besiyeri ortamında ekilmiş ve 20 saat sonra ALKAR uygulanmıştır ve CoCl<sub>2</sub> uygulamaları yapılmıştır. Deney süresinin dolmasıyla hücrelere MTT çözeltisi eklenip 4 saat inkübe edilecek ve 4 saatlik süre

sonunda 570nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikroparka okuyucu ile saptanmıştır.

### 2.2.2. ARPE-19 Hücrelerinde Hipoksi Modeli

KNVM kan damarları esas olarak retinal pigment epitel hücresinden gelir, bu nedenle bu çalışmada araştırma nesnesi olarak insan retinal pigment epitel hücreleri hattı ARPE-19 hücreleri kullanılmaktadır (3). CoCl<sub>2</sub>'nin O<sub>2</sub> ile düşük bir afinitesi vardır ve O<sub>2</sub> konsantrasyonunu düzenleme etkisi yoktur. Bununla birlikte, Co<sub>2</sub>, hücrelerin hipoksiyi algılama yeteneğini tahrip eden ve böylece hipoksik mikro ortamı taklit eden Fe<sub>2</sub> ve hemoglobin şelasyonunun yerini alabilir (94). Aynı zamanda CoCl<sub>2</sub>'nin anti-apoptoz yolakları yoluyla hücreleri koruyabildiğini ve yöntemin basit, kararlı ve kontrolünün kolay olduğunu bildirilmiştir (95). Bu nedenle, bu çalışmada in vitro bir kimyasal hipoksi mikro ortamını simüle etmek için sırasıyla 200 mol/L, 400 mol/L, 600 mol/L ve 800 mol/L CoCl<sub>2</sub> T25 flaskda her sütunda 6 adet kuyucuk olan gruplar oluşturuldu(96). Bu grupların MTT analizleri ile hücre canlılık oranlarına bakılarak hipoksi modeli gelişip gelişmediği değerlendirildi.

### 2.3. Gruplar

**Grup I(Kontrol):** Bu gruptaki hücrelere herhangi bir ilave uygulama yapılmadı.

**Grup II(Sham) :** Bu gruptaki hücreler 24 saat boyunca 800 mikroM CoCl<sub>2</sub> ile inkübe edildi.

**Grup III (AK 10):** 24 saat boyunca 10 mikroM Asetil L Karnitin ile sonrasında 24 saat boyunca 800 mikroM CoCl<sub>2</sub> ile inkübe edildi

**Grup IV (BEV):** 24 saat boyunca 10 mikroM 0,3125mg/ml Bevacizumab ile inkübe edildi, akabinde 24 saat boyunca 800 mikroM CoCl<sub>2</sub> ile inkübe edildi

**Grup V (BEV+AK10):** Bu gruptaki hücreler önce 24 saat boyunca 10 mikroM Asetil L Karnitin ve 0,3125mg/ml Bevacizumab ile inkübe edildi, akabinde sonrasında 24 saat boyunca 800 mikroMol CoCl ile inkübe edildi

şu anda piyasada bulunan Karnitin takviyeleri 2 g / gün dozunu kapsamaktadır. Bu doz da baz alınarak 1mM, 10mM ve 100mM olarak önce ARPE hücreleri üzerine etkileri değerlendirildi.

#### 2.4. Total Antioksidan Kapasite Çalışılması

Reaktif 1 (30mlx1), Reaktif 2- Fotokromogen ABTS solüsyonu (8mlx1), Kalibratör 1 (3mlx1), Kalibratör 2 (3mlx1), QC Level 1 (3ml x 1), QC Level 2 (3mlx1)'den oluşan TAK kitinin (Real Assay Diagnostics) çalışma prensipi koyu mavi-yeşil renkli 2-21-Azino-bis [3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt (ABTS) radikal solüsyonunu, renksiz ABTS formuna çevirmesiyle, 660 nm absorbandsındaki değişim miktarıyla alakalıdır. E vitaminin suda çözünür analogu olan Trolox Equivalent adı verilen stabil antioksidan standardı ile kalibrasyon yapıldı. Sonuçlar mmol trolox Equiv./L ile değerlendirildi.

İlk olarak 24 adet T25 flaska her birinde 1000000 sayıda ARPE-19 hücresi olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübatörde kendi haline bırakıldı. 24 saat sonra flaskların mediumları tazelenerek aşağıda listelenen gruplar oluşturuldu.

Gruplarda belirtilen şekilde her birinden 6 adet T25 flask her birinde totalde 5 ml olmakla; yaklaşık 1000000 sayıda ARPE19+hücre kültürü mediumu ile birlikte hazırlandı. Flasklardaki hücrelerin 24 saat belirtilen dozlarda maruziyeti sonrası medium aspire edilerek uzaklaştırıldı ve tripsin-EDTA ile kaldırılmadan önce Ph 7.4, 100 ml PBS ile 1 defa yıkandı. Flaska tutunan hücreleri kaldırmak için flask içerisine %0.05 Tripsin içeren Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 ml eklendi. Tripsin aktivitesinin artması için flask inkübatöre yerleştirildi. 5 dakika sonra hücreler flasktan ayrıldı. Tripsinin inhibisyonu için 6 ml full besiyeri (%10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-Glutamin içeren DMEM) flask içerisine eklendi. Sonra bu karışım flakona atılarak 1800 rpm 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alttaki pellet bozulmayacak şekilde süpernatanın hepsi atıldı. Son aşamada eşit sayıda hücre içeren pelletlerden hücre lizatı elde edildi. Bu işlem pellet her tüp için eşit miktarda PBS tampon ile sulandırıldı. -80 °C derin dondurucuya konularak donduruldu. İşlem birkaç defa tekrarlanarak hücrelerin lizise uğraması sağlandı. Daha sonra lizisi tamamlamak için ultrasonik homojenizatörde işlem yapıldı. Elde edilen hücre lizatları 15 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernataları ölçümler için kullanıma hazır hale getirildi. Bu süpernatalarda TAK kiti kullanım kılavuzuna göre ölçümler yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplandı:

A1- Reaktif 1'den aldığımız değer; A2- Reaktif 2'den aldığımız değer

$A2-A1 = \Delta \text{ Abs (standart; numune veya H}_2\text{O)}$

$$\frac{\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs numune}}{\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs standart}} = \text{Sonuçlar}$$

## **2.5. ELİSA ile VEGF, CXCR4, HİF1 Alfa Düzeyi Belirlenmesi**

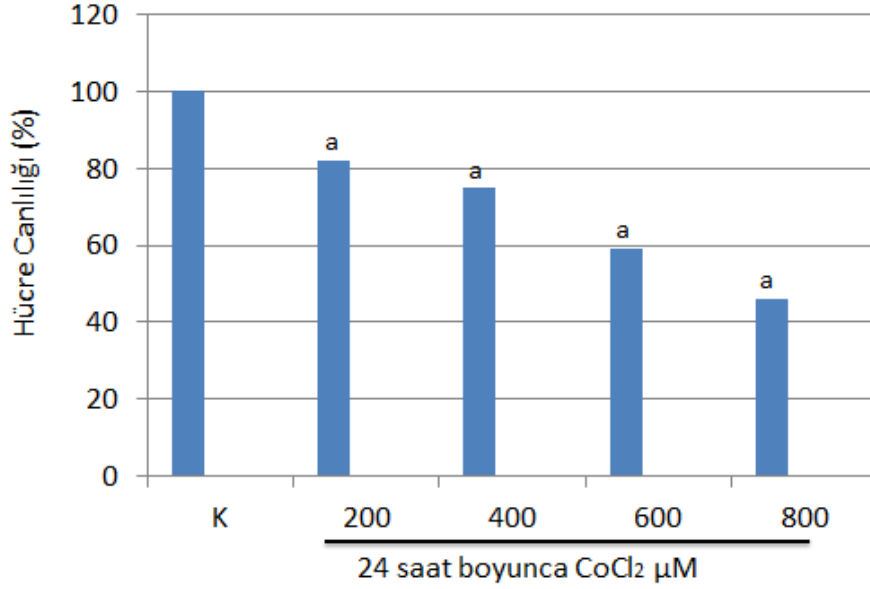
T25 flaskda her sütunda 6 adet kuyucuk olan gruplar oluşturuldu. Hücre kültürü ortamının 0,1ml'sindeki ARPE-19 hücreleri kuyucuklara yerleştirilerek inkübe edildikten sonra üretici firmanın protokollerine uyularak seviyeleri belirlenmesi için ELİSA yöntemi ile tabaka okuyucularda değerlendirildiler.

## **2.6. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 21 (Statistical Package for Social Sciences) for Windows lisanslı paket programında yapıldı. Değerlendirmelerde; kontrol, sham ve tedavi gruplarının karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi ve Bonferroni testi kullanıldı. Tanımlayıcı değer olarak aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri verildi. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. ARPE-19 Hücrelerinde Hipoksi Modeli Oluşturulmak İçin Verilen CoCl<sub>2</sub>' nin Hücre Canlılığına Etkisi

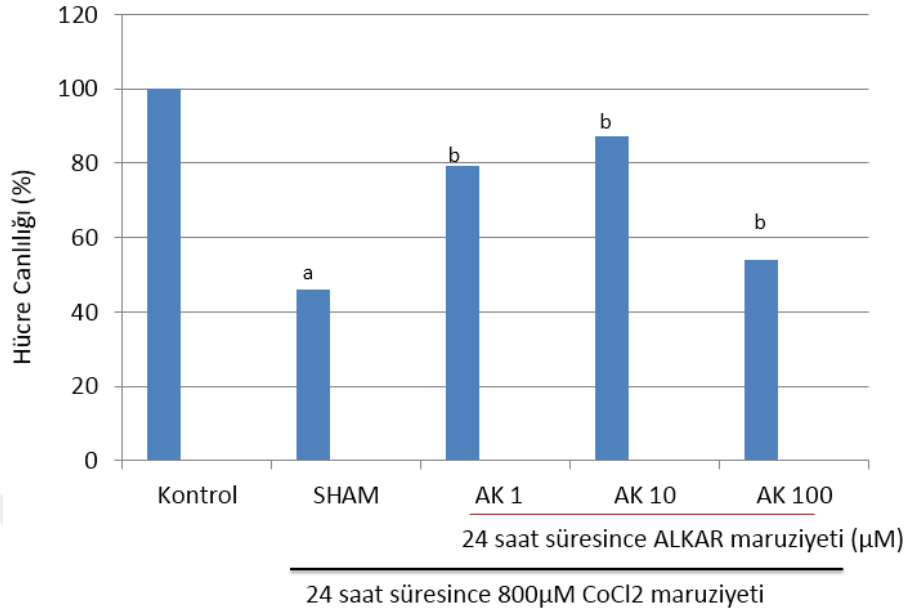


a: p<0.05 vs. Kontrol

**Şekil 5.** 24 saat boyunca kontrol ve sırasıyla (200µM, 400µM, 600µM, 800µM) CoCl<sub>2</sub> maruziyeti sonrası hücre canlılık analizleri

T25 flaskın her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu ARPE-19 hücreleri CoCl<sub>2</sub> sırasıyla 200 µM, 400 µM, 600 µM, 800 µM dozlarında 24 saat maruziyetinden sonra hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil-5’de gösterilmiştir. Sonuçları anlamsız ve uyumsuz çıkan 1 adet Kontrol, 2 adet 200 µM, 1 adet 400 µM, 2 adet 600 µM, 1 adet 800 µM CoCl<sub>2</sub> gruplarından olan kuyucuk çalışmadan çıkarıldı. CoCl<sub>2</sub>'nin etkisi doza bağımlıydı. Hücre canlılık oranları ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla; 100±0,00, 82.31±7.09, 75.21 ±4.63, 54.44 ±2.21, 46±2,69 olduğu görüldü (Şekil 5). Kontrol grubu ile tüm dozlar arasında anlamlı fark saptandı (p<0,05). 800 mM CoCl<sub>2</sub>, RPE hücresi canlılığında % 46’lık bir azalmaya neden oldu ve bu konsantrasyon, sonraki deneylerde ARPE-19 hücre hipoksi modelinde kullanıldı.

### 3.2. ARPE-19 Hücrelerinde ALKAR'ın Hücre Canlılığı Düzeylerine Etkisi



a: p<0.05 vs. Kontrol

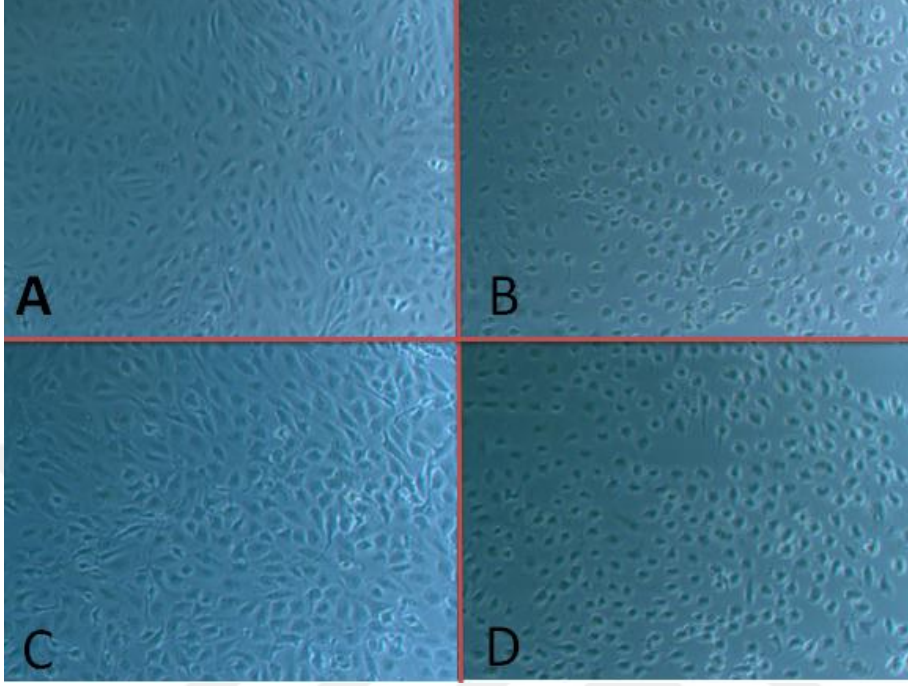
b: p<0.05 vs. SHAM

(AK 1: 1 µM ALKAR AK 10: 10 µM ALKAR AK 100: 100 µM ALKAR)

#### Şekil 6. ARPE hipoksi modelinde ALKAR'ın hücre canlılık üzerine etkileri

T25 flasks her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu. ARPE-19 hücrelerini sırasıyla 1 µM, 10 µM ve 100 µM dozlarında 24 saatlik ALKAR maruziyetinden sonra ilaçların hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 6'da gösterilmiştir. Pipetleme hatasından dolayı MTT sonuçları anlamsız olan 1 adet 1 AK, 1 adet 10 AK, 2 adet 100 AK kuyucuğunun sonucu çalışmadan çıkarıldı. Hücre canlılık oranları ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla; 100±0,00, 46±2,69, 79.13±3,49, 87.34±4,62, 54.51±3,12 olduğu görüldü (Şekil 6). Sham grubu ile kıyaslandığında 1 µM ve 10 µM ALKAR gruplarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0.05). 100 µM ALKAR grubunda ise sham grubuna göre artış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p: 0.09).

### 3.3. ARPE-19 Hücrelerinde ALKAR'ın ve CoCl<sub>2</sub>'nin Hücre Morfolojisine Etkisi



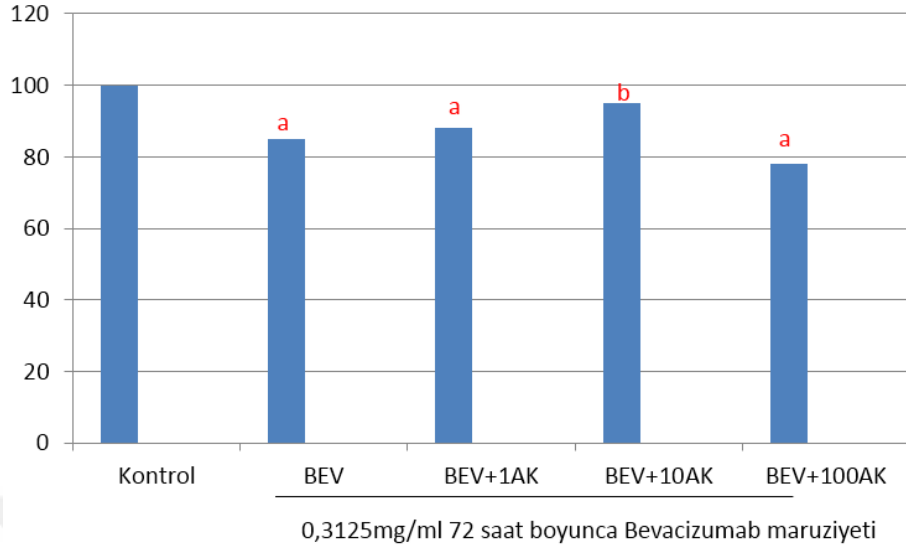
A: Kontrol grubu herhangi bir uygulama yapılmadı. B: 24 saat 800μM CoCl<sub>2</sub> maruziyeti, C: 24 saat 800μM CoCl<sub>2</sub> ve 10 μM ALKAR maruziyeti, D: 24 saat 800μM CoCl<sub>2</sub> ve 100 μM ALKAR maruziyeti (X10)

#### Şekil 7. ALKAR'ın hipoksi modelinde hücre morfolojisine etkisi

Giemsa boyamasından sonra kültürdeki ARPE-19 hücreleri; veziküler ve büyük çekirdekli olup iyi sınırlı ve yer yer küçük vakuoller mevcuttur (Şekil 7A). ARPE hücreleri 800 μM CoCl<sub>2</sub> ile maruziyeti sonrası; hücrel canlılığında % 50 oranında azalma olduğu ve normal morfolojisini kaybederek daha yuvarlak ve şişmiş halde olduğu görüldü (Şekil 7B). 10 μM ALKAR, CoCl<sub>2</sub>'nin neden olduğu değişikliklere karşı RPE morfolojisinde belirgin bir koruma sağladı (Şekil 7C). Aynı protektif etki 100μM ALKAR'da saptanmadı (Şekil 7D).



### 3.4. ALKAR'ın ARPE-19 Hücrelerindeki Antitoksik Etkisi



a:  $p < 0.05$  vs. Kontrol

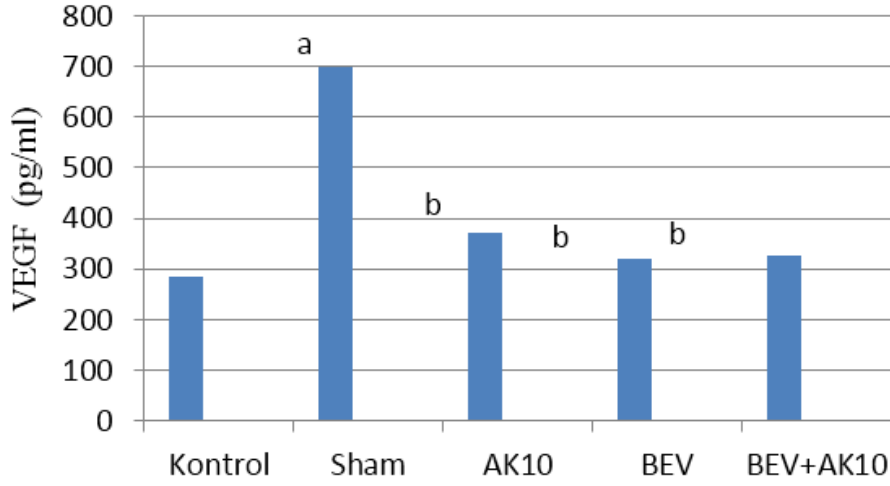
b:  $p < 0.05$  vs. Bevacizumab

(BEV: Bevacizumab, 1AK: 1  $\mu$ M ALKAR 10AK: 10  $\mu$ M ALKAR 100AK: 100  $\mu$ M ALKAR)

#### Şekil 9. Bevacizumabın ARPE 19 hücrelerine toksik etkisine karşı ALKAR'ın etkisi

T25 flaşın her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu. Bevacizumab ARPE 19 hücrelerinde 72 saat sonra toksik etki göstererek hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ( $p < 0.05$ ) azalma görülmüştür. Hücre canlılık oranları ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla;  $100 \pm 0,00$ ,  $85 \pm 4,43$ ,  $88.19 \pm 4.51$ ,  $95.24 \pm 4,62$ ,  $78.22 \pm 3,17$  olduğu görüldü (Şekil 9). Bevacizumab, 10  $\mu$ M ALKAR ile birlikte kullanıldığında hücre canlılığı oranında BEV grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ( $p < 0.05$ ) artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu grup ile kontrol grubu arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p$ : 0.71). 1  $\mu$ M ALKAR ve 100  $\mu$ M ALKAR gruplarında ise hücre canlılıkları üzerine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmadı (sırasıyla  $p$ : 0.12,  $p$ : 0.81).

### 3.5. ARPE-19 Hücrelerinde VEGF Düzeyleri



24 saat boyunca 800µM CoCl<sub>2</sub> maruziyeti

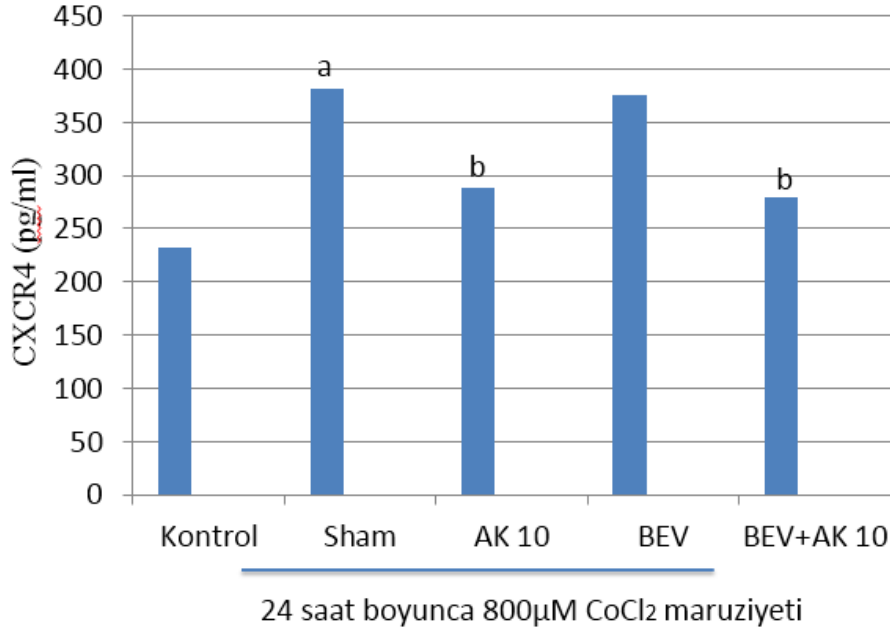
a: p<0.05 vs. Kontrol

b: p<0.05 vs. Sham

#### Şekil 10. ARPE hücrelerinde ALKAR'ın VEGF üzerine etkisi

T25 flaskın her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu. Grupların VEGF değerleri ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla; 285±35,40, 702±71,93, 370.52±48.51, 320.29±44,62, 325.72±46,97 pg/ml olduğu görüldü (Şekil 10). Sham grubundaki VEGF değerinin kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü (p<0.05). AK 10, BEV ve BEV+ AK10 grubunda ise Sham grubuna göre VEGF düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede (p<0.05) azaldığı görüldü. BEV grubunda AK 10 grubuyla VEGF düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p: 0,24). Aynı şekilde BEV grubu ile BEV+10AK grupları arasında da anlamlı fark saptanmadı (p<0,05).

### 3.6. ARPE-19 Hücrelerinde CXCR4 Düzeyleri



a:  $p < 0.05$  vs. Kontrol

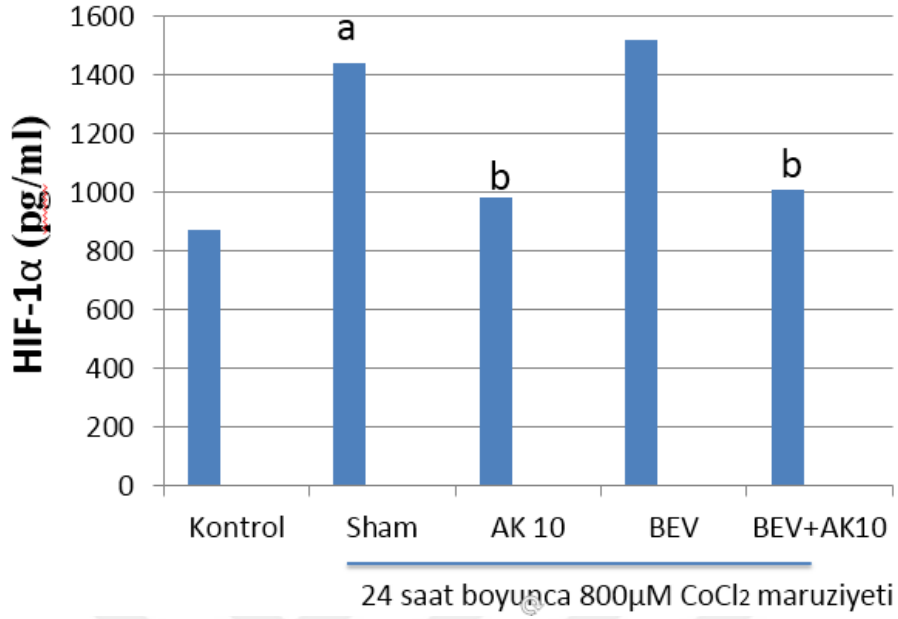
b:  $p < 0.05$  vs. Sham

(AK 10: 10 µM ALKAR, BEV: Bevacizumab, BEV+10AK: Bevacizumab+10 µM ALKAR)

#### Şekil 11. ARPE hücrelerinde ALKAR'ın CXCR4 üzerine etkisi

T25 flaskın her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu. Grupların CXCR4 değerleri ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla; 237.20±20.40, 382.41±34.73, 289.12±37.27, 375.41± 41.86, 280.12±31,87 pg/ml olduğu görüldü (Şekil 11). Sham grubundaki CXCR 4 değerinin kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p < 0.05$ ) arttığı görüldü. AK 10 ve BEV+AK10 grubunda ise Sham grubuna göre CXCR 4 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p < 0.05$ ) azaldığı görüldü. BEV grubunda Sham grubuyla CXCR 4 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p: 0,12$ ).

### 3.7. ARPE-19 Hücrelerinde HIF-1 Alfa Düzeyleri



a:  $p < 0.05$  vs. Kontrol

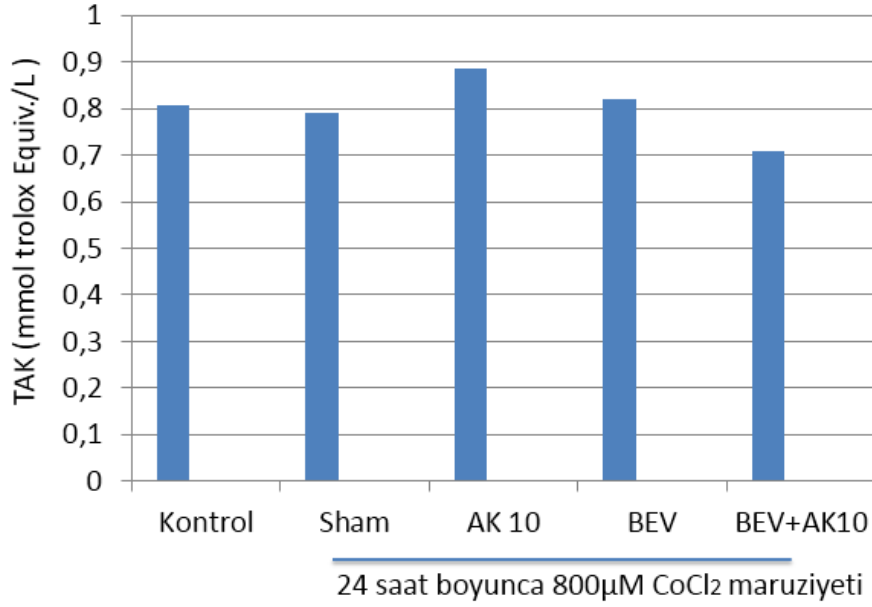
b:  $p < 0.05$  vs. Sham

(AK 10: 10 μM ALKAR, BEV: Bevacizumab, BEV+10AK: Bevacizumab+10 μM ALKAR)

#### Şekil 12. ARPE hücrelerinde ALKAR'ın HIF-1α üzerine etkisi

T25 flaskın her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu. Grupların HIF-1α değerleri ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla; 870.45±97.56, 1439.40±142.93, 982.45±91.17, 1520.61±139.77, 1010.32±95.49 pg/ml olduğu görüldü (Şekil 12). Sham grubundaki HIF-1α değerinin kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p < 0.05$ ) arttığı görüldü. AK 10, ve BEV+ AK10 grubunda ise Sham grubuna göre HIF-1α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p < 0.05$ ) azaldığı görüldü. BEV grubunda Sham grubuyla HIF-1α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p: 0.34$ ).

### 3.8. ARPE-19 Hücrelerinde TAK Düzeyleri



TAK: Total Antioksidan Kapasite

(AK 10: 10 µM ALKAR, BEV: Bevacizumab, BEV+10AK: Bevacizumab+10 µM ALKAR)

#### Şekil 13. ARPE hücrelerinde ALKAR'ın TAK üzerine etkisi

T25 flaskın her sütununda 6 adet kuyucuk düzenlenerek, gruplar oluşturuldu. Grupların TAK değerleri ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla;  $0,808\pm0,064$ ,  $0,79\pm0,041$ ,  $0,886\pm0,052$ ,  $0,820\pm0,067$ ,  $0,71\pm0,049$  pg/ml olduğu görüldü (Şekil 13). Total antioksidan kapasite değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

#### 4. TARTIŞMA

Yaşa bağı makula dejenerasyonu patogeneğinde hipoksi, oksidatif hasar, lipofuskin birikimi, kronik inflamasyon ve apoptozis ile ilişkili kompleman sistemindeki mutasyonlar önemli yer tutar. Hastalığın progresyonunda büyüme faktörleri özellikle de VEGF önemlidir. VEGF salınımı hipoksi ile düzenlenir. VEGF başlıca RPE ve fotoreseptörler tarafından salınır. Yaş Tip YBMD tedavisinde intravitreal anti VEGF uygulamaları altın standart haline gelmiştir (97). Ancak multifaktöriyel bir hastalık olan YBMD'nin sadece anti-VEGF ile tedavisi yetersiz kalabilmektedir. Uzun süreli anti-VEGF kullanılmış olgularda geç evrede Coğrafik Atrofi (CA) oluşup oluşmadığı, CA geliyor ise, kullanılan anti-VEGF ajanların rolünün olup olmadığı birçok araştırmanın konusu olmuştur. CATT, IVAN ve HARBOR çalışmalarının analizlerinde, yaş tip YBMD hastalarında uygulanan uzun süreli intravitreal anti-VEGF tedavilerinin (Bevacizumab ve Ranibizumab) olgularda CA'yı arttırdığı tespit edilmiştir. İstenmeyen etkileri bilinmekle birlikte gerek tedavisiz hastalarda progresyonların çok daha hızlı olduğunun bilinmesi gerekse anti VEGF ajanlara alternatif oluşturabilecek bir tedavi yönteminin henüz olmaması nedeniyle uzun süreli anti VEGF kullanımı halen ilk tercih olarak önerilmektedir (98, 99). Bu yüzden yeni tedavi modaliteleri ihtiyaç duyulmaktadır.

Yeni tedavi modaliteleri arasında anti VEGF özelliği olan ve kullanımı kolay ajanlar önemli yer tutmaktadır. Bunlardan bir tanesi tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanib; göz damlası formatında geliştirilmiş ve VEGF 1/3 Platelet-Derived Büyüme Faktörü (PDGR-B) ve Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1(FGFR1) gibi birçok anjiojenik faktörlere karşı etkilidir (100). PAN-90806 küçük bir molekül olup VEGFR-2, FGF1-3, Tyrosin Protein Kinaz Reseptör 2(TİE-2) gibi anjiojenik faktörler üzerine topikal olarak kullanılmakta olup faz 1 çalışması devam etmektedir (101). Ek besin ürünlerinin de VEGF üzerine etki ederek YBMD'de fayda sağlayabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Güçlü bir antioksidan olan ve özellikle üzümde bol bulunan Resveratrol; CXCR4'ü hedefleyerek retinal neovaskülarizasyonu baskılamak için terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur (102). Kabuklu deniz ürünleri ve sebzelerde bolca bulunan Astaxanthin; VEGF düzeylerini azalttığı ve YBMD de kullanılabileceğini gösteren çalışmalar vardır (103). Bizim çalışmamızda ALKAR'ın ARPE 19 hücrelerinin hipoksi modelinde

resveratrolde olduğu gibi HIF 1 ve CXR4'ü azaltarak VEGF salınımını baskıladığı görüldü. Bu sonuçlar ışığında YBMD hastalarında ALKAR kullanımının progresyonu azaltabileceğini düşünmekteyiz.

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu patofizyolojisinde oksidatif stres yer almaktadır ve antioksidan kullanımı da YBMD progresyonunu azaltabileceği belirtilmiştir (104).  $\alpha$ -Lipoik Asit mitokondrial enzimlerden pürivat dehidrogenaz ve  $\alpha$ -ketoglurat dehidrogenaz gibi enzimlerin esansiyel kofaktörü olan biyolojik bir antioksidandır. Kuru Tip YBMD'li hastalarda günlük 0,2 gr oral  $\alpha$ -Lipoik Asit tedavisinin görme ile ilişkili hayat kalitesini artırdığı bildirilmiştir (104). ALKAR güçlü bir antioksidandır. ALKAR'ın yüksek glikoz kaynaklı oksidatif stres oluşturulan retinal ganglion hücrelerinde antioksidatif etkileri gösterilmiştir (88). Wu ve ark. (105) çalışmasında ARPE-19 hücreleri ve retinal perisitlerin invitro hiperglisemi ortamında kontrol normoglisemi ortamıyla kıyasla aşırı *Reactive Oxygen Species* (ROS) ürettiğini saptamıştır. Yokoi ve ark. (106) oksidatif stres belirteci olarak bilinen VEGF ile diyabetik hastalarda vitreusta TAS, ileri glikasyon son ürünleri (AGE) arasındaki ilişkisini araştırmış, aralarında anlamlı negatif korelasyon saptamıştır. L-Karnitinin RPE hücre kültüründe yapılan çalışmada glutasyon aktivitesi ve süperoksit dismutaz aktiviteleri değerlendirilerek antioksidan özelliği gösterilmiştir (107).

Antioksidanların tek tek ölçümü zor olduğundan, her antioksidanın farklı hastalarda hastalığın evresine ve antioksidanın kimyasal yapısına göre değişiklik göstereceğinden bütün antioksidan kapasitenin düzeyini ölçen TAK ölçüm yöntemi geliştirilmiştir (108). Çalışmamızda ALKAR verilen tedavi grubu ile tedavi verilmeyen grup kıyaslandığında TAK miktarında istatistiksel olarak anlamlı derecede değişiklik saptanmamıştır. TAK miktarında değişiklik olmamasını; hücre kültürü çalışmasının kısa süreli olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Uzun süredir antioksidan özelliği bilinen madde olan ALKAR'ın her ne kadar TAK ile gösteremesek de antioksidatif özelliğinin YBMD'deki rolü ile ilgili daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Inan ve ark. (109) tavşan gözlerinde intravitreal 1.25 mg ve 3.0 mg dozlarında bevacizumab enjeksiyonunun oküler toksisitesinin değerlendirildiği çalışmada klinik, elektrofizyolojik ve ışık mikroskopik değerlendirmelerle göz içi yapılar için toksisite lehinde bulgular saptanmamasına rağmen elektron mikroskopik değerlendirmede her

iki doz grubunda 14 ve 28. günlerde alınan kesitlerde fotoreseptör iç segmentlerinde kristalarda destrüksiyon, mitokondrilerde şişme ve parçalanma gözlenmiştir. Saptanan ultrastrüktürel hasarın apoptozise bağlı olup olmadığını anlamak amacıyla preparatlar immünohistokimyasal olarak caspase-3, caspase-9 ve bax boyama yöntemleri ile boyandığında hem düşük hem de yüksek doz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yoğun apoptotik boyanma izlenmiştir. ARPE 19, rat ganglion hücre kültürü (RGH5), fare fotoreseptör hücre kültürü (661W) üzerine aflibercept (0.125, 0.5, 2 mg), ranibizumab (0.125mg) ve bevacizumab (0.3125 mg) belirtilen dozlarda uygulandıktan sonra 1,24,48 ve 72 saat sonrasında hücre morfolojisi, canlılık, apoptozis ve proliferasyonu değerlendirilmiştir. Çalışmadan çıkan sonuca göre; aflibercept hücre morfolojisi, apoptozis, hücre canlılığı ve proliferasyon üzerine herhangi bir hücre kültüründe ve herhangi bir konsantrasyonda değişikliğe neden olmazken ranibizumab ve bevacizumab gruplarında belirgin farklılıklar saptanmıştır. (110). Bizim çalışmamızda aynı dozda kullandığımız bevacizumab grubunda benzer toksik etkiler görülmüş olup ALKAR ile birlikte bevacizumab kullanıldığında ise bu patolojik değişikliklerin azaldığı görülmüştür. Yapılan ışık mikroskopi değerlendirilme sonucunda; gerek morfolojik değişiklikler gerekse hücre canlılık oranındaki değişiklikler ALKAR'ın kullanılan bevacizumaba bağlı olumsuz etkilere karşı protektif özelliğinin olduğunu gösterdi. Bunu destekleyecek elektron mikroskopisi değerlendirilmesi ve elektrofizyolojik değerlendirmeler de içeren ileri çalışmalar gerekmektedir. Birlikte YBMD hastalarında ALKAR kullanımı progresyonu azaltmadaki etkisinin yanında bevacizumab ile beraber kullanımında da oluşabilecek istenmeyen etkileri azaltılabileceğini göstermektedir.

Asetil L-karnitin, rahatlıkla tolere edilebilir olması, doz güven aralığının yüksek olması sayesinde güvenli ve etkili bir terapotik bileşik olma potansiyeline sahiptir. 1,5 g ile 3,0 g/gün miktarındaki oral dozlar birçok durum için etkili olabilmekle birlikte, nöropatiler için i.m. enjeksiyonu da kullanılmaktadır. Daha çok araştırma ve klinik deney ile ALKAR'ın gelecekteki uygulamaları, tamamlayıcı tıp bakımından büyük potansiyel taşımaktadır. Şu anda piyasada bulunan ALKAR takviyeleri 2 g/gün dozunu kapsamaktadır. Çalışmamızda 1mM, 10mM ve 100mM ALKAR'ın ARPE hücrelerinde canlılık düzeylerine etkileri değerlendirildi. Daha önceki hücre kültürü çalışmalarında etkin doz olarak gösterilen 20 mg / kg'a karşılık



gelen 10 mM'de uygulanmasında antianjiojenik özelliğinin fazla olduğu tespit edilmiştir (11). Bizde çalışmamızda daha sonraki değerlendirmelerde 10mM ALKAR kullandık. Hiposik kalmış RPE hücrelerinde ALKAR verilen grubun Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p<0.05$ ) hücre canlılığını devam ettirdiği gösterilmiştir. Ayrıca hipoksik ortamda RPE hücrelerindeki değişiklikleri ALKAR verilen grupta daha az görülmüştür. ALKAR'ın hipoksiye karşı protektif etkinliğini gösteren bulgular patofizyolojide hipoksinin rol oynadığı hastalıklarda faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Hipoksinin indüklediği faktör-1 $\alpha$  bir hipoksi belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Hipoksi sırasında, HIF-1 $\alpha$  bozulmasından sorumlu enzimlerin aktivasyonu azaldıkça HIF-1 $\alpha$  hızla birikir (111). CoCl<sub>2</sub>, HIF-1 $\alpha$  bozulmasının kimyasal inhibitörüdür (25). VEGF mRNA salınımını, hipoksi HIF-1 $\alpha$  aracılığı ile stimule eder. Rigeracciolo ve arkadaşları, hipoksik ortamda HIF-1 $\alpha$ 'nın VEGF geninin transkripsiyon aktivasyonunu düzenlediğini gösterdi (52). Yeni doğan retinopatisi ile ilgili bir çalışmada, hipoksinin HIF-1 $\alpha$ 'nın upregülasyonunu indüklediğini ve VEGF ekspresyonunu daha da artırdığını, novaskülarizasyonu kolaylaştırdığı, böylece hastalığın başlangıcını ve ilerlemesini hızlandırdığı gösterilmiştir(53). Son yıllarda yapılan çalışmalarda retina anjiyogenezi ve hipoksi sürecinde HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı vitreusda HIF-1 $\alpha$ 'nın azalması VEGF ekspresyonunu azalttığı gösterildi (54). HIF-1 inhibitörü akriflavinin, proliferatif diyabetik retinopati ve diğer iskemik retinopatiler ile ilişkili retinal neovaskülarizasyonu baskıladığını gösterilmiştir (55). Çalışmamızda ALKAR grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde HIF1- $\alpha$  miktarının azalmış olduğu görüldü. HIF 1- $\alpha$  ile VEGF korelasyonu literatürdeki önceki çalışmalar ile benzer bulunuştur. Daha önceki kanser araştırmalarında HIF-1 $\alpha$ 'yı baskılayan ve benzer etkiyi ARPE 19 hücrelerinde de gösteren ALKAR'ın hipoksinin patofizyolojide rol oynadığı retinal hastalıklarda faydalı olabileceğini göstermektedir.

CXCR4, membran yerleşimli, hipoksiyle ilişkisi gösterilen, Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) için spesifik bir alfa-kemokin reseptörüdür (112). Kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, hipoksi sırasında CXCR4 ekspresyonunun arttığını ve VEGF upregülasyonuna aracılık ettiğini ortaya koymuştur (113, 114). Bu, CXCR4'ün neovaskülarizasyonun inhibisyonu için yararlı bir hedef olabileceğini

düşündürmektedir. ARPE 19 hücrelerinde yapılan çalışmada Resveratrolün CXCR4'ü hedefleyerek retinal neovaskülarizasyonu baskılamak için terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (102). SDF-1 / CXCR4'ün; retina anjiyogenezinde uç hücrelerin ve mikrogliyanın aktivasyonu ve hareketleri üzerinde önemli etkileri olduğunu, sistemik inhibisyonunun in vivo retinal vasküler gelişimde filizlenme anjiyogenezini engellediği gösterildi (115). Diyabetik retinopati modelindeki farelerde hiperglisemiye maruz kalan ARPE-19 hücrelerinde SDF-1/CXCR4'ün upregüle olduğu da gösterilmiştir (116). Bizim çalışmamızda daha önceki hipoksi modelleridekine benzer şekilde kontrol grubumuzda CXCR4 miktarının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ( $p<0.05$ ) artmış olup korele şekilde VEGF miktarının da arttığını tespit ettik. ALKAR tedavi grubunda ise hem CXCR4'ün hem de VEGF miktarının, sadece CoCl<sub>2</sub> verdiğimiz sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ( $p<0.05$ ) azaldığını tespit ettik. Dolayısı ile CXCR4 düzeyine etki eden ALKAR; indirekt olarak VEGF düzeylerine olan etkisi ile anti- VEGF'lerin kullanıldığı hastalıklarda da faydalı olabileceği kanaatini doğurmuştur.

Bu çalışmada CoCl<sub>2</sub> kullanılarak ARPE-19 hücrelerinde oluşturulan hipoksi modelinde; ALKAR'ın CXCR4 ve VEGF arasındaki etkileşimleri hedeflenerek neovaskülarizasyonu baskılama potansiyeli değerlendirildi. Diğer çalışmalara benzer şekilde, CXCR4 ve VEGF düzeylerinin kimyasal olarak indüklenen hipoksi sırasında arttığı doğrulandı (117). ALKAR'ın CXCR4 ekspresyonunu ve VEGF sekresyonunu inhibe ettiği gösterildi. Ayrıca hipoksi ortamında ALKAR grubu canlılık analizinde kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla bulunmuştur ve ALKAR'ın hipoksi ortamına maruz kalan retina hücrelerinde protektif etkinliği gösterildi. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde patofizyolojisinde hipoksinin, oksidatif stresin, inflamasyonun ve apoptozisin rol aldığı YBMD'nin tedavisinde ALKAR'ın fayda sağlayacağını düşündürmüştür.

## 5. KAYNAKLAR

1. Cousins SW. Role of mitochondrial dysfunction in dry age-related macular degeneration: The site of intracellular metabolism may be a relevant drug target in dry AMD. *Retina Today*, 2015.
2. Roman K, Bressler NM. Profile of a potential treatment for geographic atrophy: An in-depth look at a complement-targeted therapy. *Retina Today*, 2015.
3. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell* 2014; 156(4): 744-758.
4. Chen M, Rajapakse D, Fraczek M, Luo C, Forrester JV, Xu H. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye-a mechanism to repair damage and maintain homoeostasis. *Aging Cell* 2016; 15(3): 436-445.
5. Koçyiğit A, Selek Ş. Eksojen antioksidanlar iki yönü keskin kılıçlardır. *Bezmialem Science* 2016; 4(2): 70-75.
6. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119(10): 1417-1436.
7. Koçak N, Kaya M, Kaynak S. Maküla pigment optik dansitesinin yaşa bağlı değişim analizi. *Turk J Ophthalmol* 2010; 40(5): 260-265.
8. Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 309(19): 2005-2015.
9. Li S, Chaudhary SC, Zhao X, Gaur U, Fang J, Yan F, et al. Artemisinin protects human retinal pigmented epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by enhancing the activation of AMP-active protein kinase. *Int J Biol Sci* 2019; 15(9): 2016–2028.
10. Landa G, Butovsky O, Shoshani J, Schwartz M, Pollack A. Weekly vaccination with Copaxone (glatiramer acetate) as a potential therapy for dry age-related macular degeneration. *Curr Eye Res* 2008; 33(11): 1011–1013.

11. Baci D, Bruno A, Bassani B, Tramacere M, Mortara L, Albini A, et al. Acetyl-L-carnitine is an anti-angiogenic agent targeting the VEGFR2 and CXCR4 pathways. *Cancer Lett* 2018; 429: 100–116.
12. Yanoff M DJ. *Ophthalmology*. Second ed. Mosby: St.Louis, 2004.
13. American Academy of Ophthalmology. *Oftalmolojinin Esas ve İlkeleri* (Çev. Ed. Pınar Aydın O'DWYER) Güneş Kitapevi, 2008.
14. Burris C, Klug K, Ngo IT, Sterling P, Schein S. How Müller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *J Comp Neurol* 2002; 453(1): 100-111.
15. Schmidt SY, Peisch RD. Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27(7): 1063-1067.
16. Mazzitello KI, Arizmendi CM, Family F, Grossniklaus HE. Formation and growth of lipofuscin in the retinal pigment epithelium cells. *Phys Rev E-Stat Nonlinear, Soft Matter Phys* 2009; 80(5): 051908
17. Werner JS, Keltner JL, Zawadzki RJ, Choi SS. Outer retinal abnormalities associated with inner retinal pathology in nonglaucomatous and glaucomatous optic neuropathies. *Eye* 2011; 25(3): 279-289.
18. Spaide RF, Curcio CA. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: Literature review and model. *Retina* 2011; 31(8): 1609-1619.
19. Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: Something more than a constituent of the blood-retinal barrier-implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 190724.
20. Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, et al. Generation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Small Molecules and OCT4 Reprogrammed Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(2): 96–109.

21. Zhu X, Sato EF, Wang Y, Nakamura H, Yodoi J, Inoue M. Acetyl-l-carnitine suppresses apoptosis of thioredoxin 2-deficient DT40 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2008 15; 478(2): 154-160.
22. Hargrave PA. Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(1): 3-9.
23. Ding N, Luo S, Yu J, Zhou Y, Wu Z. Vitreous levels of apolipoprotein A1 and retinol binding protein 4 in human rhegmatogenous retinal detachment associated with choroidal detachment. *Mol Vis* 2018; 24: 252–260.
24. Dunn KC, Aotaki-Keen Ae, Putkey FR, hjelmeland lm. ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Exp Eye Res* 1996; 62(2): 155–170.
25. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl<sub>2</sub>, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002.
26. Seong H, Ryu J, Jeong JY, Chung IY, Han YS, Hwang SH, et al. Resveratrol suppresses vascular endothelial growth factor secretion via inhibition of CXCR4-chemokine receptor 4 expression in ARPE-19 cells. *Mol Med Rep* 2015; 12(1): 1479–1484.
27. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*. 2005; 85: 845–881.
28. Betts BS, Parvathaneni K, Yendluri BB, Grigsby J, Tsin ATC. Ginsenoside-Rb1 Induces ARPE-19 Proliferation and Reduces VEGF Release. *ISRN Ophthalmol* 2011; 2011: 1–6.
29. Tong JP, Yao YF. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions. *Clin Biochem*. 2006; 39(3): 267–276.
30. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  is increased in ischemic retina: Temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40(1): 182-189.
31. Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: Role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006; 83(3): 473-483.

32. Shams N, Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am* 2006; 19(3): 335–344.
33. Lin RC, Rosenfeld PJ. Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 2007; 47(1): 117-137.
34. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life*. 2001; 52(1-2): 61-66.
35. Kim I, Ryan A, Rohan R, science SA Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Retina* 1999; 40(9): 145 149.
36. Burke JM. Epithelial phenotype and the RPE: Is the answer blowing in the Wnt? *Prog Retin Eye Res* 2008; 27(6): 579-595.
37. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Ahmed E, Carrasquillo KG, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(5): 2155-2162.
38. Pierce EA, Foley ED, Smith LEH. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996; 114(10): 1219-1228.
39. Wells JA, Murthy R, Chibber R, Nunn A, Molinatti PA, Kohner EM, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 1996; 80(4): 363-366.
40. Senger DR, Connolly DT, Van De Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH<sub>2</sub>-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor-secreted Vascular Permeability Factor. *Cancer Res* 1990; 50(6): 1774-1778.
41. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot* 2003; 91: 179-194.
42. Connor KM, Sangiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, et al. Increased dietary intake of  $\omega$ -3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 2007; 13(7): 868-873.
43. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12): 1103–1111.

44. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12): 5447–5454.
45. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ* 2008; 15: 621-627.
46. Semenza GL. HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J App Physiol* 2000; 88: 1474–1480.
47. Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology*. 2008; 23: 263-274.
48. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272(36): 22642-22647.
49. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* 2005; 118: 301-311.
50. Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 48403-48409.
51. Koh M. Y, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(9): 364-372.
52. Rigracciolo DC, Scarpelli A, Lappano R, Pisano A, Santolla MF, Marco P De, et al. Copper activates HIF-1 $\alpha$ /GPER/VEGF signalling in cancer cells. *Oncotarget* 2015; 6(33): 34158-34177.
53. Fu Z, Cheng H, Chen D, Wang F. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under hypoxia. *Med Sci Monit* 2015; 21: 318-325.
54. Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 $\alpha$  on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(16): 5071–5076.

55. Zeng M, Shen J, Liu Y, Lu LY, Ding K, Fortmann SD, et al. The HIF-1 antagonist acriflavine: visualization in retina and suppression of ocular neovascularization. *J Mol Med* 2017; 95(4): 417–429.
56. Murphy PM, Heusinkveld L. Multisystem multitasking by CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3. *Cytokine*. Academic Press, 2018: 2–10.
57. Calabrese V, Stella AMG, Calvani M, Butterfield DA. Acetylcarnitine and cellular stress response: Roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. *J Nutr Biochem* 2006; 17(2): 73-88.
58. Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63: 1420-1480.
59. Lehninger AL, Nelson DL CM. No Title. *Principles of biochemistry*. 2nd ed. New York; Worth Publishers, 1993.
60. Chen W, Huang YC, Shultz TD, Mitchell ME. Urinary, plasma, and erythrocyte carnitine concentrations during transition to a lactoovovegetarian diet with vitamin B-6 depletion and repletion in young adult women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(2): 221-230.
61. Mayes, PA. Lipids of physiologic significance. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. Stamford: Appleton and Lange, 2000: 160-171.
62. Pacifici EHK, McLeod LL, Sevanian A. Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(4): 297-309.
63. Sultan A, Sokolove PM. Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: An overview. *Arch Biochem Biophys* 2001; 386(1): 52-61.
64. Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, Utsumi T, Doi Y, et al. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(8): 1037-1046.
65. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, Mcmillin JB. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(5): 2124-2132.



66. Schönfeld P, Bohnensack R. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett* 1997; 420(2-3): 167-170.
67. Chang B, Nishikawa M, Sato E. L-Carnitine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys* 2002; 405: 55-64.
68. Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB, Farber JL. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1993; 268(19): 13791-13798.
69. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006; 217: 213-220.
70. Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sci* 2006; 78(8): 803–811.
71. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vázquez CM. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2008; 21(11): 1231-1237.
72. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, et al. Protective effects of l-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol Res* 2007; 56(4): 303-310.
73. Savica V, Santoro D, Mazzaglia G, Ciolino F, Monardo P, Calvani M, et al. L-carnitine infusions may suppress serum C-reactive protein and improve nutritional status in maintenance hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2005; 15(2): 225-230.
74. Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Calvani M, Nicolai R, Mosconi L, Vivoli E, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2007; 26(4): 820-827.
75. Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Calvani M, Nicolai R, Mosconi L, Toscano A, et al. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on neuropathic pain and apoptosis: A role for the nicotinic receptor. *J Neurosci Res* 2009; 87(1): 200-207.
76. Fariello RG, Ghirardi O, Pescechera A, Ramacci MT, Angelucci L. Transient nigral ubiquinone depletion after single MPTP administration in mice. *Neuropharmacology*. 1987; 26(12): 1799-1802.

77. Taglialatela G, Angelucci L, Ramacci MT, Werrbach-Perez K, Jackson GR, Perez-Polo JR. Acetyl-L-carnitine enhances the response of PC12 cells to nerve growth factor. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; 59(2): 221-230.
78. Onofri M, Fulgente T, Melchionda D, Marchionni A, Tomasello F, Salpietro FM, et al. L-acetylcarnitine as a new therapeutic approach for peripheral neuropathies with pain. *Int J Clin Pharmacol Res* 1995; 15(1): 9-15.
79. Quatraro A, Roca P, Donzella C, Acampora R, Marfella R, Giugliano D. Acetyl-L-carnitine for symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1995; 38(1): 123-125.
80. Di Giacomo C, Latteri F, Fichera C, Sorrenti V, Campisi A, Castorina C, et al. Effect of acetyl-L-carnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle. *Neurochem Res* 1993; 18(11): 1157-1162.
81. Tufekci O, Gunes D, Özoğul C, Kolatan E, Altun Z, Yilmaz O, et al. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin nephrotoxicity. *Chemotherapy* 2009; 55(6): 451-459.
82. Gunes D, Kirkim G, Kolatan E, Guneri EA, Ozogul C, Altun Z, et al. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy* 2011; 57(3): 186-194.
83. Sastry BV, Janson VE. Retinal Cholinergic System: Characterization of Rat Retinal Acetyltransferases Using Specific Inhibitors of Choline- and Carnitine-Acetyltransferases. *J Ocul Pharmacol* 1994; 10(1): 203-215.
84. Lowitt S, Malone JJ, Salem A, Kozak WM, Orfalian Z. Acetyl-L-carnitine corrects electroretinographic deficits in experimental diabetes. *Diabetes* 1993; 42(8): 1115-1118.
85. Falsini B, Porciatti V, Bolzani R, Marchionni A. Spatial-frequency-dependent changes in the human pattern electroretinogram after acute acetyl-L-carnitine administration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991; 229(3): 262-266.
86. Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging* 2006; 27(7): 983-993.

87. Hua X, Su Z, Deng R, Lin J, Li DQ, Pflugfelder SC. Effects of l-carnitine, erythritol and betaine on pro-inflammatory markers in primary human corneal epithelial cells exposed to hyperosmotic stress. *Curr Eye Res* 2015; 40(7): 657–667.
88. Cao Y, Li X, Wang CJ, Li P, Yang B, Wang CB, et al. Role of NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of l-carnitine against high glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells. *Biomed Pharmacother* 2015; 69: 345–348.
89. Calandrella N, De Seta C, Scarsella G, Risuleo G. Carnitine reduces the lipoperoxidative damage of the membrane and apoptosis after induction of cell stress in experimental glaucoma. *Cell Death Dis* 2010; 1(8): 62-99.
90. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2016: 371–387.
91. Pamies D, Bal-Price A, Chesné C, Coecke S, Dinnyes A, Eskes C, et al. Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. *ALTEX* 2018; 35(3): 353–378.
92. Dinc E, Ayaz L, Kurt AH. Protective Effect of Combined Caffeic Acid Phenethyl Ester and Bevacizumab Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human RPE Cells. *Curr Eye Res* 2017; 42(12): 1659–1666.
93. Soltan-Dallal MM, Validi M, Douraghi M, Fallah-Mehrabadi J, Lormohammadi L. Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEP-2 cell line by MTT assay. *Microb Pathog* 2017; 113: 416-420.
94. Ardyanto TD, Osaki M, Tokuyasu N, Nagahama Y, Ito H. CoCl<sub>2</sub>-induced HIF-1 $\alpha$  expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: A possible role for the PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol* 2006; 29(3): 549–555.
95. Zhong X, Lin R, Li Z, Mao J, Chen L. Effects of Salidroside on cobalt chloride-induced hypoxia damage and mTOR signaling repression in PC12 cells. *Biol Pharm Bull* 2014; 37(7): 1199-1206.
96. Wang LF, Yan ZY, Li YL, Wang YH, Zhang SJ, Jia X, et al. Inhibition of Obtusifolin on retinal pigment epithelial cell growth under hypoxia. *Int J Ophthalmol* 2019; 12(10): 1539–1547.

97. Singer M, Bahadorani S. Recent advances in the management and understanding of macular degeneration. *F1000Res* 2017; 6: 519-521.
98. Ammar DA, Mandava N, Kahook MY. The effects of aflibercept on the viability and metabolism of ocular cells in vitro. *Retina* 2013; 33(5): 1056-1061.
99. Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, Yoeruek E, Peters S, Henke-Fahle S, et al. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(10): 1316-1321.
100. Danis R, McLaughlin MM, Tolentino M, Staurengi G, Ye L, Xu CF, et al. Pazopanib eye drops: A randomised trial in neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(2): 172–178.
101. Al-Kharsan H, Hussain RM, Ciulla TA, Dugel PU. Innovative therapies for neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. Taylor and Francis Ltd, 2019: 1879–1891.
102. Seong H, Ryu J, Jeong JY, Chung IY, Han YS, Hwang SH, et al. Resveratrol suppresses vascular endothelial growth factor secretion via inhibition of CXC-chemokine receptor 4 expression in ARPE-19 cells. *Mol Med Rep* 2015; 12(1): 1479–1484.
103. Hashimoto H, Arai K, Hayashi S, Okamoto H, Takahashi J, Chikuda M. The effect of astaxanthin on vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and peroxidation reactions in the aqueous humor. *J Clin Biochem Nutr* 2016; 59(1): 10-15
104. Tao Y, Jiang P, Wei Y, Wang P, Sun X, Wang H. Lipoic Acid Treatment Improves Vision-Related Quality of Life in Patients with Dry Age-Related Macular Degeneration. *Tohoku J Exp Med*. 2016; 240(3): 209–214.
105. Li C, Miao X, Li F, Wang S, Liu Q, Wang Y, et al. Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 9702820.
106. Yokoi M, Yamagishi SI, Takeuchi M, Ohgami K, Okamoto T, Saito W, et al. Elevations of AGE and vascular endothelial growth factor with decreased total antioxidant status in the vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(6): 673-675.

107. Shamsi FA, Chaudhry IA, Boulton ME, Al-Rajhi AA. L-carnitine protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Curr Eye Res* 2007; 32(6): 575–584.
108. Mancino R, di Pierro D, Varesi C, Cerulli A, Feraco A, Cedrone C, et al. Lipid peroxidation and total antioxidant capacity in vitreous, aqueous humor, and blood samples from patients with diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2011; 17: 1298-1304.
109. Inan UU, Avci B, Kusbeci T. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized rhuMAB vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1773-1781.
110. Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, Hofmann J, Szurman P, Spitzer MS, et al. Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol* 2013; 97(7): 917-923.
111. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001; 13: 167-171.
112. Wei L, Fraser JL, Lu Z-Y, Hu X, Yu SP. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis* 2012; 46(3): 635–645.
113. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells. In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 $\alpha$ . *Am J Pathol* 1999; 154: 1125-1135.
114. JIN, Fengyan, et al. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Can Res* 2012; 10: 1021-1031.
115. Unoki N, Murakami T, Nishijima K, Ogino K, van Rooijen N, Yoshimura N. SDF-1/CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(7): 3362–3371.
116. Deng L, Jia J, Yao J, Xu Z. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 improves diabetic retinopathy. *Biosci Biotechnol Biochem* 2019; 83(6): 1072–1076.

- 117.** Zhang ZX, Wang YS, Shi YY, Hou HY, Zhang C, Cai Y, et al. Hypoxia specific SDF-1 expression by retinal pigment epithelium initiates bone marrow-derived cells to participate in choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model. *Curr Eye Res* 2011; 36: 838-849.



## 6. ÖZGEÇMİŞ

1987 Kahmaranmaraş'ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kahramanmaraş'ta tamamladı. 2006-2012 yılları arasında, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinde, Tıp eğitimi aldı. 2013-2016 Yılları arası İstanbul Adli Tıp Kurumunda araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2016 yılında F.Ü. Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalında Uzmanlık Eğitime başladı halen devam etmektedir. Evli ve iki çocuk babasıdır.

