

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DENEYSEL DİABETES MELLİTUS MODELİNDE İNTRAVİTREAL
BEVACİZUMAB VE FASUDİL'İN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, TÜMÖR
NEKROZİS FAKTÖR ALFA, NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B, VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE KASPAZ 3 DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. FATİH ÇELİK

BOLU
2012

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DENEYSEL DİABETES MELLİTUS MODELİNDE İNTRAVİTREAL
BEVACİZUMAB VE FASUDİL'İN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, TÜMÖR
NEKROZİS FAKTÖR ALFA, NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B, VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE KASPAZ 3 DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. FATİH ÇELİK

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. FATİH ULAŞ

BOLU
2012

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması, yürütülmesi ve sunuma hazırlanması aşamalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez danışmanlığımı yürüten değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Fatih Ulaş'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve tecrübelerinden faydalandığım anabilim dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Serdal Çelebi ve diğer değerli hocalarım Prof. Dr. A. Şahap Kükner, Doç. Dr. Mesut Erdurmuş, Yrd. Doç.Dr. Ümit Doğan ve Doç. Dr. Didem Serin'e,

Tezimin ELISA parametrelerini çalışan Yrd.Doç.Dr. Zeynep Güneş Özünal'e, deney hayvanlarına uygulanan işlemlerde yardımcı olan Vet. Hekim Ayhan Çetinkaya'ya, doku preparatlarının hazırlanmasında yardımcı olan Uz.Dr. Tülin Fırat'a ve asistanlığım süresince birlikte çalıştığım değerli arkadaşlarım: Dr. Ahmet Yalçın, Dr. Erkan Tırak, Dr. Sedat Özmen, Dr. Y. Yücel Bucak, Dr. Abdulgani Kaymaz, Dr. Adem Soydan, Dr.Asena Keleş, Dr.Sümeysra Ağca, Dr. Saygın Şahin'e ve göz hastalıkları kliniği çalışanlarına,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve asistanlarına,

Desteğini her zaman arkamda hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime,

Teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Fatih ÇELİK
2012

* Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Fatih Çelik, Deneysel Diyabetes Mellitus Modelinde İntravitreal Bevacizumab ve Fasudil'in Süperoksit Dismutaz, Tümör Nekrozis Faktör Alfa, Nükleer Faktör Kappa B, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Kaspaz 3 Düzeylerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Bolu, 2012.

Diabetes Mellitus (DM), 20-65 yaş grubunda en önemli legal körlük sebebidir. Birçok çalışma yapılmasına rağmen hastalığın etiyopatogenezinde etkili olan faktörler halen tam olarak bilinmemektedir. DM hastalarında hiperglisemiye bağlı olarak retina kapillerlerinde dejenerasyon, perisit kaybı, endotel proliferasyonu, bazal membranda kalınlaşma ve oklüzyon gelişmektedir. Diyabetik retinopati ve buna bağlı komplikasyonların gelişiminde toksisite, enflamasyon, anjiyogenez ve apoptozisin önemli yeri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, deneysel olarak diyabet oluşturulmuş tavşanlara intravitreal olarak uygulanan bevacizumab ve fasudilin süperoksit dismutaz (SOD), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), nükleer faktör kappa B (NF-kB), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve kaspaz 3 düzeylerine etkisi incelenmiştir. Çalışma için; 6 sağlıklı (Grup 1), 6 DM oluşturulmuş (Grup 2), 7 DM oluşturularak intravitreal bevacizumab (1,25 mg/50 μ L) uygulanmış (Grup 3), 7 DM oluşturularak intravitreal fasudil (180 μ M/50 μ L) uygulanmış (Grup 4) olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. DM oluşturulduktan 21 gün sonra intravitreal enjeksiyonlar tavşanların sağ gözüne yapıldı. Enjeksiyondan 3 gün sonra tavşan gözleri enükle edildikçe ELISA yöntemi ile SOD, TNF alfa, NF-kB, VEGF ve kaspaz 3 parametreleri çalışıldı. Sonuçların istatistiksel analizleri için Kruskal Wallis testi ve Bonferroni düzeltmesiyle Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal Wallis testi ile VEGF ve kaspaz 3 seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanırken (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,013$), SOD ve TNF alfa seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,135$ ve $p=0,792$). NF-kB düzeyleri ise hiçbir grupta ölçülebilecek seviyelerde değildi. Grup 1 ve grup 3'teki VEGF düzeyi, grup 2'ye göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (her ikisi içinde $p=0,004$). Diğer gruplar arasında VEGF düzeyleri

açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (p değerleri 0,015 ile 0,886 aralığında). Kaspaz 3 düzeyleri bakımından grup 1 ile grup 4, grup 2 ile grup 3, grup 3 ile grup 4 arasındaki farkın p değerleri sırasıyla $p=0,015$, $p=0,038$ ve $p=0,018$ olsa da ikinci aşama testlerde anlamlı kabul edeceğimiz değer olan 0,0083'ün üzerinde kaldı. Sonuç olarak deneysel DM oluşturulmuş tavşan modelinde intravitreal bevacizumab uygulaması yeni damar oluşumunda rol oynayan VEGF düzeylerini ve apoptoziste rol oynayan kaspaz 3 düzeylerini düşürmüştür. Fasudilin VEGF seviyeleri üzerine bevacizumab kadar olmasa da olumlu etkisi mevcuttur, kaspaz 3 düzeyleri üzerinde ise diğer gruplar ile karşılaştırıldığında belirgin artışa neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bevacizumab, Diyabet, Fasudil, Kaspaz 3, Nükleer faktör kappa B, Süperoksid dismutaz, Tümör nekrozis faktör alfa, Vasküler endotelial büyüme faktörü

ABSTRACT

Effect of Intravitreal Bevacizumab and Fasudil on Superoxide dismutase, Tumor necrosis factor alpha, Nuclear factor kappa B , Vascular endothelial growth factor and Caspase-3 levels in experimental diabetes mellitus model. Fatih Çelik, MD, The Master Thesis, Bolu, 2012.

DM is the most common cause of visual loss in patients aged between 20 and 65 years. The exact factors responsible for etiopathogenesis of the disease is not known despite many studies done. Hyperglycemia in diabetic patients results in degeneration of retinal capillaries, loss of endothelial pericytes, endothelial proliferation, thickening of basement membrane and occlusion. It is well known that toxicity, inflammation, angiogenesis and apoptosis play an important role in the development of diabetic retinopathy and its complications. In the present study, the levels of SOD, TNF alpha, NF-kB, VEGF and caspase 3 were assessed in rabbits that had experimentally induced DM and intravitreal injection of bevacizumab and fasudil, and results were compared with healthy controls rabbits. The study population composed of 6 healthy rabbits (Group 1), 6 rabbits with experimentally induced diabetes mellitus (Group 2), 7 rabbits with experimentally induced DM to which intravitreal bevacizumab were administered (Group 3) and 7 rabbits with experimentally induced DM to which intravitreal fasudil were administered (Group 4). An intravitreal injection of 1.25 mg/50 µL bevacizumab in the right eye of rabbits in Group 3 and intravitreal injection of 180 µM/50µL fasudil in the right eye of rabbits in Group 4 were administered on day 21 after induction of DM. Studied eyes of rabbits were enucleated three days after the intravitreal injection. SOD, TNF alpha, NF-kB, VEGF and caspase-3 levels were determined using ELISA method. Differences between study groups were assessed using the Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test with Bonferroni correction. Kruskal Wallis test revealed statistically significant difference in VEGF and caspase-3 levels between groups ($p=0.005$ and $p=0.013$, respectively), but SOD and TNF alpha levels did not differ between groups ($p=0.135$ and $p=0.792$, respectively). NF-kB level was below the

detectable range for all groups. It was found that VEGF levels were significantly lower in Group 1 and Group 3 than in Group 2 using Mann-Whitney U test with Bonferroni correction ($p=0.004$ for both comparison). There was no statistically significant difference between other groups with regard to VEGF levels (p value was ranging between 0.015 ile 0.886). Although the p values of caspase 3 level was 0.015 for group 1 and group 4, 0.038 for group 2 and group 3, 0.018 for group 3 and group 4, these p values remained above the threshold p value of 0.0083, which is statistically significant level for second stage tests. In conclusion, intravitreal administration of bevacizumab decreased both VEGF levels, which plays role in angiogenesis and caspase 3 levels, which plays role in apoptosis. Although not as much effective as bevacizumab, fasudil had a beneficial effect on VEGF levels, but significantly increased caspase 3 levels when compared with other groups.

Key words: Bevacizumab, Caspase 3, Diabetes, Fasudil, Nuclear factor kappa B, Superoxide dismutase, Tumor necrosis factor alpha, Vascular endothelial growth factor

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Retina Anatomisi	3
2.1.1. Retina Pigment Epiteli (RPE).....	3
2.1.2. Nöral Retina	4
2.1.3. Retinanın Kan Desteği.....	6
2.2. Diyabetik Retinopati	6
2.2.1. Epidemiyoloji	6
2.2.2. Tipleri	7
2.2.2.1. İnsüline Bağlı Diyabet.....	7
2.2.2.2. İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet.....	7
2.2.3. Patogenez	8
2.2.3.1. Polyol (Aldoz Redüktaz) Yolu	9
2.2.3.2. İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri (AGE)	9
2.2.3.3. Oksidatif Stres	9
2.2.3.4. Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu	10
2.2.4. Diyabetik Retinopati Gelişimindeki Risk Faktörleri	11
2.2.4.1. Diyabetin Süresi	11
2.2.4.2. Diyabetin İyi Metabolik Kontrolü	11
2.2.4.3. Gebelik	12
2.2.4.4. Hipertansiyon	12
2.2.4.5. Renal Hastalık	12
2.2.4.6. Sistemik Diğer Faktörler.....	12
2.2.4.7. Göze Ait Faktörler	13
2.2.5. DRP’de Görülen Klinik Bulgular	13
2.2.5.1. Mikroanevrizma	13
2.2.5.2. Mikrohemoraji.....	13
2.2.5.3. Sert Eksüda	14
2.2.5.4. Yumuşak Eksüda	14
2.2.5.5. Venöz Boncuklanma	14
2.2.5.6. İRMA (İntraretinal Mikrovasküler Anomaliler).....	14
2.2.5.7. Neovaskülarizasyon	15
2.2.5.8. Hemoraji.....	15
2.2.5.9. Vitreus Dekolmanı	15
2.2.5.10. Retina Ödemi	15
2.2.5.11. Diyabetik Makülopati.....	15

2.2.5.11.1. Fokal Makülopati	16
2.2.5.11.2. Diffüz Makülopati	16
2.2.5.11.3. İskemik Makülopati	16
2.2.5.11.4. Mikst Tip Makülopati	16
2.2.5.11.5. Klinik Anlamlı Maküler Ödem (CSME)	16
2.2.6. Diyabetik Retinopati Sınıflaması (ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study)	17
2.2.6.1. Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati	17
2.2.6.1.1. Hafif Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati	17
2.2.6.1.2. Orta Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati	17
2.2.6.1.3. Ağır Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati	18
2.2.6.1.4. Çok Ağır Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati	18
2.2.6.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDRP)	18
2.2.6.2.1. Erken PDRP	18
2.2.6.2.2. Yüksek Riskli PDRP	19
2.3. Anjiyogenez	19
2.3.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	19
2.3.1.1 Bevacizumab	21
2.4. Enflamasyon	22
2.4.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa	22
2.5. Apoptoz	23
2.5.1. Kaspaz Ailesi ve Kaspaz 3	23
2.5.2. Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB)	25
2.6. Toksisite	26
2.6.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)	26
2.7. Rho Kinaz (ROCK)	27
2.7.1. Fasudil	28
3. MATERYAL ve METOD	30
3.1. Çalışmaya Dahil Olma Kriterleri	30
3.2. Çalışma Dışı Kalma Kriterleri	30
3.3. Çalışma Grupları	31
3.4. VEGF, TNF alfa, NF-kB'nın ELISA Çalışma Prosedürü	32
3.5. Kaspaz 3 ELISA Çalışma Prosedürü	32
3.6. SOD ELISA Çalışma Prosedürü	33
3.7. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ	48
ETİK KURUL BELGESİ	50
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON BAŞKANLIĞI KARARI ..	51
7. KAYNAKLAR	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

AGE:	Artmış enzimatik olmayan glikozilasyon son ürün
CSME:	Klinik anlamlı maküler ödem
DAG:	Diaçilgliserol
DM:	Diyabetes mellitus
DRP:	Diyabetik Retinopati
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ETDRS:	Diyabetik retinopati erken tedavi çalışması
FA:	Fundus anjiyografi
FFA:	Fundus floresein anjiyografi
ICAM-1:	İntrasellüler adezyon molekülü-1
İLM:	İnternal limitan membran
İRMA:	İntraretinal mikrovasküler anomali
mM:	Milimolar
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
MLC:	Miyozin hafif zincir
NF-kB:	Nükleer faktör kappa B
NO:	Nitrik oksit
NPDR:	Proliferatif olmayan diyabetik retinopati
PDR:	Proliferatif diyabetik retinopati
PKC:	Protein kinaz C
PVR:	Proliferatif vitreo retinopati
ROCK:	Rho kinaz
ROS:	Reaktif oksijen türevleri
RPE:	Retina pigment epiteli
SR:	Serbest radikal
STZ:	Streptozosin
TNF alfa:	Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi p değerleri:	34
---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Diyabetik maküler ödem patofizyolojisi	21
Şekil 2: TNF alfanın enflamasyondaki rolü	23
Şekil 3: Gruplara göre ortalama VEGF düzeyleri	35
Şekil 4: Gruplara göre ortalama TNF alfa düzeyleri	35
Şekil 5: Gruplara göre ortalama SOD abzorbanları	36
Şekil 6: Gruplara göre ortalama kaspaz 3 abzorbanları	37

1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM) yüksek kan glukoz seviyesiyle karakterize metabolik bir hastalıktır. Kronik bir hastalık olduğu için mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları vardır. Diyabetin en önemli mikrovasküler komplikasyonlarından biri de retinopatidir. Diyabetik retinopati (DRP), 20 ile 65 yaş arasında görülen legal körlüğün en sık sebebidir. DM tanısı konulduktan sonraki ilk 5 yıl içerisinde DRP görülme olasılığı çok düşük olmakla birlikte, 5-10 yıl arasında %27, 10 yılın üzerinde ise %71-90 oranında görülmektedir.¹

DRP gelişiminde ana mekanizma uzun süreli hiperglisemiye bağlı toksisitedir. Ancak yapılan yoğun klinik ve deneysel araştırmalara rağmen moleküler patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. DRP esas olarak bir mikroanjiopatidir; iki temel değişiklik vasküler geçirgenliğin artması ve mikrovasküler oklüzyondur. Vasküler permeabilitenin artması lokal/yaygın ödeme, mikrovasküler oklüzyon ise retinal iskemiye ve daha ileri dönemde yeni damar oluşumlarına yol açar. Mikroanjiopati bulgularının yaygınlığı ve ağırlığı DRP'nin evresini belirler.¹

Hastalığın patogeneğinde hiperglisemi sonrası gelişen retina kapillerlerinde dejenerasyon, perisit kaybı, endotel proliferasyonu, bazal membranda kalınlaşma ve oklüzyon mevcuttur.¹ DRP ve komplikasyonlarının gelişiminde anjiyogenez, enflamasyon, toksisite ve apoptozisin önemli yeri olduğu bilinmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF); hipoksi, büyüme faktörleri ve nitrik oksit tarafından stimüle edilerek vasküler permeabiliteyi artıran ve yeni damar oluşumuna neden olan bir sitokindir. Tümör nekrozis faktör (TNF) alfa başlıca makrofaj, mast hücreleri ve lenfositlerden salgılanan proenflamatuvar bir sitokindir. Enflamasyon gelişiminde ve diğer sitokinlerin uyarımında birçok fonksiyona sahiptir. TNF alfa özellikle endotel hücreleri üzerinde adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin ifadenmesini ve fagosit mikrop öldürücü sistemlerinin uyarılmasını sağlar. Ayrıca dayanıksız hücrelerin apoptozuna yol açar. Nükleer faktör kappa B (NF-kB); enflamasyon, immün yanıt, proliferasyon ve apoptozisten sorumlu olan çok sayıda

genin önemli bir regülatörü olan bir transkripsiyon faktörüdür. Stres, serbest radikaller, ultraviyole, radyasyon, okside düşük dansite lipoprotein (LDL) gibi uyaranlara karşı verilen hücrel cevapta önemli rol oynar. Kaspaz 3; proteini aspartat aminoasidinden sonra kesen, aktif merkezinde sistein bulunan proteazlar ailesine mensuptur. Bu kesme işlemi proteinin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olabilir. Apoptoziste rol alır. Süperoksit dismutaz (SOD); süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir.

Bu çalışmanın amacı, deneysel diyabet modelinde intravitreal bevacizumab ve fasudilin SOD, TNF alfa, NF-kB, VEGF ve kaspaz 3 düzeylerine etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Retina Anatomisi

Retina gözün sinir tabakası olup göz küresinin iç yüzeyini örter. İnce ve saydam bir tabakadır. Kalınlığı optik disk yakınında 0,56 mm, ora serratada ise 0,1 mm'dir. Retinanın arka kutupta en ince olduğu nokta foveadır. Retina sinir lifi tabakası arkada optik sinirle devam eder. Önde nöral retina ora serrataya kadar uzanır ve pars plana pigmente olmayan siliyer cisim epiteli ile devam eder. Dış yüzeyi Bruch membranı ile, iç yüzeyi vitreus ile temas halindedir. Retina, optik disk kenarları ve ora serratada sıkı yapışıklık gösterir.

Retina embriyolojik olarak nöroektodermden köken alan iki yapıdan oluşur. Bunlardan dıştaki pigmente epitel katı, içteki ise duysal (nöral) retinadır. Retinanın sinir tabakasının bittiği ön kısmı dalgalı bir görünüm arz eder. Bu kısma ora serrata adı verilmektedir. Retinanın arka kısmının merkezinde maküla lutea adında oval, sarı bir alan bulunur. Bu alanın merkezindeki çöküntüye fovea santralis denir.

2.1.1. Retina Pigment Epiteli (RPE)

Nöroektodermal kökenli, tek katlı, altıgen şekilli küboidal hücre tabakasıdır. Optik disk sınırından ora serrataya kadar uzanır ve silyer cismin pigment epiteli ile devamlılık gösterir. Her bir RPE hücresinin apikal kısmındaki villöz çıkıntılar, fotoreseptör hücrelerin dış kısımlarını sarar ve aralarında hiçbir özel bağlantı bulunmaz. Komşu hücre membranları bazal bölgede zonula adherens, apikal bölgede ise zonula okludens ile birbirine bağlanır. Mikrovilluslara doğru uzanan çok sayıda yuvarlak veya oval melanin granülleri vardır. RPE hücrelerinin; dağılan ışığın absorpsiyonu, retina altı boşluğun devamlılığının sağlanması, rod ve kon hücrelerinin dış kısımlarının fagositozu, fotoreseptörlerin dış segmentlerin döngüsü, A vitamini depolanması ve salınımı, interfotoreseptör matriks sentezi gibi fonksiyonları vardır.²

2.1.2. Nöral Retina

Üç temel nöron grubundan oluşur: Bunlar fotoreseptörler, bipolar hücreler ve gangliyon hücreleridir. Aktivitenin düzenlenmesi için horizontal ve amakrin hücreler gibi ara nöronları içerir.

İki tip fotoreseptör vardır: rodlar ve koniler. Rodlar loş ışıklı ortamda ve siyah-beyaz görüntünün algılanmasından, koniler ise parlak ışıklı ortamda, hem detaylı hem de renkli görüntünün algılanmasından sorumludurlar. Rodların sayısı 110-125 milyon, konilerin sayısı ise 6,3-6,8 milyondur. Foveada rod bulunmaz, periferde doğru gittikçe sayıları birden artar ve uç noktalara yaklaştıkça azalır. Koniler ise foveada daha yoğundur ve periferde gittikçe sayıları azalır. Retinada yaklaşık 1 milyon gangliyon hücresi vardır ve her gangliyon hücresi başına 100 fotoreseptör hücresi düşer. Rodların, fotosensitif olan dış kısmı rodopsin proteinini içerir. Rodların dış segmentlerinde madeni para gibi üstüste binmiş, membranla kaplı 600-1000 adet lamel veya disk bulunmaktadır. Rodopsin molekülleri bu disklerin membranlarında bulunmaktadır. Disklerin rodların dış segmentinin tabanında oluştuğu ve dışa doğru itildiğine inanılmaktadır. Uç kısıma ulaşan diskler pigment epitel hücreleri tarafından fagosite edilmektedir. Rod hücresi dış segment, birleştiren sap, iç segment, dış lif, nükleus, iç lif, rod sferülü bölümlerinden oluşur. Koni hücreleri yaklaşık 65-75 µm uzunluğundadır. Dış segment, bağlayıcı sap ve iç segmentten oluşur. Dış segment koni şeklinde olup koninin tepesi dışa doğru bakmaktadır. Diskleri çevreleyen membran dış plazma membranı ile devamlılık arz eder. Konilerin uçları pigment hücreleri tarafından fagosite edilmez. Bu hücreler rodopsine benzer bir protein olan iyodopsini içerir.

Bipolar hücrelerin radyal bir yönelimi vardır. Bu hücrelerin bir veya daha fazla sayıda dendriti dışa doğru uzanarak fotoreseptör hücre terminalleri ile sinaps yapar. Tek olan akson içe doğru uzanarak gangliyon hücreleri ve amakrin hücreleri ile sinaps yapar. Gangliyon hücreleri görme yolunda ikinci nöronları oluşturur. Çapları 10-30 µm arasında değişir. Multipolar hücrelerdir ve dendritleri bipolar ve amakrin hücrelerin aksonları ile sinaps yapar. Aksonları miyelinsiz olup, optik siniri oluştururlar.³

Horizontal hücreler multipolar olup, fotoreseptör hücrelerinin terminal geniş kısımlarının yakınında yer alırlar. Işıkla uyarılmayı takiben rod ve konilerden salınan nörotransmitere cevap verirler. Bu hücrelerin bipolar hücrelerin aktivitesini baskılayan bir transmitter salgıladığına inanılmaktadır. Amakrin hücrelerinin aksonlarının olmadığı sanılmaktadır. Gangliyon hücrelerinin yakınında bulunurlar. Gangliyon hücrelerinin dendritleri ile bipolar hücrelerin akson uçları sinaps yapar. Amakrin hücreleri bipolar hücreler tarafından uyarılır ve gangliyon hücrelerini uyarır. Nöral retinadaki destekleyici hücreler nöroglial hücrelere benzerler. Nöral retinadaki boşlukların çoğunu Müller hücreleri doldurur. Bu hücreler; retina nöronları ve damar duvarları ile yakın ilişki içerisinde dirler. Retinayı baştan başa kat eden Müller hücreleri, destek görevi görür ve beslenmeye yardımcı olur. Retina astrositleri, perivasküler glial hücreler ve mikroglial hücreler gibi başka glia benzeri hücreler de tanımlanmıştır.

Retina, dıştan içe doğru on kattan oluşur:

1. Retina Pigment Epiteli
2. Rod ve Koniler
3. Dış Limitan Membran
4. Dış Nükleer Kat
5. Dış Pleksiform Kat
6. İç Nükleer Kat
7. İç Pleksiform Kat
8. Ganglion Hücreleri Katı
9. Sinir Lifleri Katı
10. İç Limitan Membran

Bu sınıflama ışık mikroskopu ile yapılan inceleme için geçerlidir. Elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalarda böyle katlardan oluşan bir yapıya rastlanmamıştır. Nöral retinanın özelleşmiş bölgeleri mevcuttur. Retinanın arka kısmının merkezindeki oval, sarı alana maküla lutea denilir. Çapı yaklaşık 4,5

mm'dir ve optik diskin yaklaşık 3 mm temporalinde bulunur. Makülanın sarı renginin kaynağı ksantofil isimli pigmenttir. Fovea santralis, makülanın merkezinde çökük bir alandır. Çapı yaklaşık 1,5 mm'dir. Çöküklüğün kenarına klivus, tabanına ise foveola denir. Burada iç retina katlarına ait sinir hücre ve lifleri kenara çekilmiş ve merkezde sadece fotoreseptör hücreleri kalmıştır. Fovea üzerinde kan damarına ve rod hücresine rastlanmaz ancak koni konsantrasyonu maksimuma ulaşmıştır.

2.1.3. Retinanın Kan Desteği

Retina iki kaynaktan kan desteği alır. Rodlar, koniler ve dış nükleer kattan oluşan dış lamina koroid kapillerlerinden doku sıvısı aracılığı ile beslenir. İç lamina ise santral retinal arter ve venden destek alır. Retina arterleri uç arterler olup herhangi bir arteriovenöz anastomoza rastlanmaz. Santral retinal arter, oftalmik arterin ilk dalıdır. Santral retinal arter disk içinde ya da üzerinde süperior ve inferior dallarına ayrılır. Nazal dallar ora serrataya doğru düz bir seyir izlerken temporal dallar fovea santralisin altından ve üstünden kavis yaparak ilerler. Retina arteriollerini yaygın bir kapiller ağ oluşturur. Bu kapillerlerin duvarları deliksiz endotel hücreleri ile çevrilidir. Endotel bazal membranının altında çok sayıda perisit vardır. Kapiller ağların en yoğun olduğu bölge maküladır fakat fovea santraliste damar bulunmaz. Yaklaşık 500 µm çapındaki bu bölgeye fovea avasküler zon denir. Retina periferinde damarlar daha az sayıdadır ve ora serratada bulunmaz. Santral retinal ven, göz küresini santral retinal artere eşlik ederek terk eder. Optik sinirde ven arterin lateralinde yer alır ve direkt olarak ya kavernoöz sinüse ya da süperior oftalmik vene drene olur. Retinada herhangi bir lenf damarı bulunmaz.

2.2. Diyabetik Retinopati

2.2.1. Epidemiyoloji

DRP, 20-65 yaşları arasındaki hastalarda görme azlığının en önemli nedenlerinden biridir. DRP'nin en iyi habercisi hastalığın süresi ve metabolik kontrolüdür. Tüm DRP tiplerinin prevalansı; DM süresi ve hasta yaşı ile birlikte artmaktadır. Beş yıl veya daha az süredir DM olan hastalar nadiren herhangi bir DRP

bulgusu gösterir. DRP 5-10 yıl arası DM olanların % 27'sinde, 10 yıldan uzun süre diyabeti olanların %71-90'ında görülmektedir.⁴ DRP, 10 yaşından küçük çocuklarda diyabetin süresi ne kadar olursa olsun nadir görülür. DRP'nin puberte çağından sonra görülme sıklığı artar. Otuz yaş altı DM tanısı almış olgulardaki retinopati ve maküla ödemi prevelansı ile diyabetin süresi arasındaki ilişkinin de irdelendiği Türkiye Diyabetik Retinopati Epidemiyoloji Grubu'nun 2 numaralı raporuna göre 215 insüline bağımlı Tip 1 diyabet hastasının % 24,7'sinde proliferatif olmayan DRP, % 6,5'inde proliferatif DRP olmak üzere toplam % 31,2 oranında DRP tesbit edilmiştir.⁵ Bu grupta ayrıca % 11,2 oranında makula ödemi tespit edilmiştir.⁵ İnsüline bağımlı olmayan Tip 2 DM olgularında proliferatif olmayan diyabetik retinopati (NPDRP) % 14,9, proliferatif diyabetik retinopati (PDRP) % 12,3 olmak üzere toplam % 27,7 oranında DRP tespit edilmiştir.⁵ Olguların % 17,1'inde diyabetik makülopati olduğu bildirilmiştir.⁵

2.2.2. Tipleri

Diyabet, endojen insülinin olmayışı veya etkisinin azalmasına bağlı olarak, sebat eden hiperglisemiyle karakterize olan hastalıktır. İki ana türü aşağıda belirtilmiştir:

2.2.2.1. İnsüline Bağlı Diyabet

Aynı zamanda Tip 1 diyabet olarak da bilinir. Sıklıkla 10-20 yaşlar arasında ortaya çıkar. Ancak yaşlı hastalar da insüline bağımlı hale gelebilir.

2.2.2.2. İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet

Tip 2 diyabet olarak da bilinir. Sıklıkla 50 - 70 yaşları arasında ortaya çıkar. İnsüline bağımlı tiplerde DRP gelişme riski, bağımlı olmayanlara göre daha yüksektir. DRP, 20 - 65 yaşlar arasındaki bireylerde ortaya çıkan yasal körlüklerin bir numaralı sebebinin teşkil etmektedir.¹

2.2.3. Patogenez

DRP, esas olarak DM'nin mikrovasküler bir komplikasyonudur. Retina damarlarında DM'ye bağılı olarak gelişen iki temel patolojik değışiklik; vasküler permeabilitenin artması ve mikrovasküler oklüzyondur. Vasküler permeabilite artışı lokal/yaygın ödeme, mikrovasküler oklüzyon ise retinal iskemiye ve daha ileri dönemde yeni damar oluşumlarına yol açar. Bunların yaygınlığı ve ağırlığı diyabetik retinopatinin evresini belirler.

Mikrovasküler kontraktıl hücrelerin (perisit) kaybı diyabetik retinopatinin en erken ve oldukça spesifik bulgularındandır. Perisit kaybı endotel hücre proliferasyonu ve DRP'nin en erken bulgusu olan mikroanevrizmalara yol açar. Hemodinamik ve vasküler otoregölasyondaki değışiklikler sonucu gelişen venöz dilatasyon ve venöz boğumlanmalar, intraretinal mikrovasküler anormallikler (İRMA), DRP'nin karakteristik bulgularıdır. Kapiller bazal membran kalınlaşması ve ekstrasellüler matriks komponentlerinin depolanması da anormal retina hemodinamiğinin gelişiminde rol oynamaktadır.

Damar endotel hücreleri iç kan-retina bariyerinin korunmasından sorumludur ve bu hücrelerin hasarı vasküler permeabilitenin artışı ile sonlanır ve intraretinal hemorajilerle sert eksüdalar ortaya çıkar. Diyabetik maküla ödeminin erken safhalarında, iç kan-retina bariyeri yıkılarak makülada ekstrasellüler sıvı birikimi olur. Vasküler hasar arttığında, retina kan akımının daha da bozulmasıyla çeşitli derecelerde retina iskemisi gelişir. Bu süreçte artmış retinal lökositler, trombositler ve eritrositler de yer alırlar. Fundus muayenesinde yumuşak eksüdalar saptanabilir.

Kapiller oklüzyon sonucu gelişen retinal iskemi, VEGF gibi anjiyogenik faktörler aracılığı ile neovaskülerizasyonu stimüle eder ve oluşan bu yeni damarlar PDRP'nin karakteristik bulgusudur. Yeni damar oluşumları vitreus içi kanamalara da neden olabilir. Bu evrede fibrozis, traksiyonel retina dekolmanı ortaya çıkabilir.⁶⁻⁸ Sürecin gelişiminde rol oynayan metabolik yollardan başlıcaları; polyol yolu aktivasyonu, ilerlemiş glikasyon son ürünleri (AGE) üretimi, oksidatif stresin artması, protein kinaz C aktivasyonu olarak özetlenebilir.

2.2.3.1. Polyol (Aldoz Redüktaz) Yolu

Hücre içi glukoz konsantrasyonu hiperglisemik seviyelere ulaştığında bu yol aktive olur. Aldoz redüktaz enzimi nikotinamid adenin dinükleotid fosfatı (NADPH) kullanarak glukozu sorbitole redükte eder. Sorbitol ise sorbitol dehidrogenaz aracılığıyla fruktoza okside olur. Hücre içi sorbitol birikiminin osmotik vasküler hasara yol açtığı öne sürülmektedir. Buna karşın hücre içi mikromolar ve milimolar seviyelerdeki glukoz metabolitleri ile karşılaştırıldığında nanomolar düzeylerdeki sorbitolün bu yolla etkili olmayacağı yönünde görüşler de vardır.⁹ Öte yandan retina laktat-pirüvat oranındaki artışın enzim aktivitelerini etkileyerek komplikasyonların gelişiminde rol oynaması muhtemeldir.¹⁰

2.2.3.2. İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri (AGE)

Glukozun proteinlerin amino grupları ile enzimatik olmayan glikolizasyon ürünlerine genel olarak AGE adı verilir. AGE ürünleri proteinlerin yapısını ve fonksiyonlarını bozar. AGE'ler transmembran reseptörlere (RAGE) bağlanarak hücre sinyalizasyonunda değişiklikler yoluyla da hücre fonksiyonunda bozulmalara yol açabilir. AGE ve bu ürünlere spesifik reseptör kompleksi oksidatif stres, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu, proenflamatuvar sitokinlerin hipersekresyonu ile de ilişkilendirilmektedir.^{11,12}

2.2.3.3. Oksidatif Stres

DM'ye bağlı gelişen komplikasyonlarda suçlanan diğer bir mekanizma ise reaktif oksijen türevleridir (ROS). Oksidatif stres ve serbest radikaller ya üretimin artması ya da klirensin azalması sonucu oluşur. Diyabette ROS üretimi; glukoz otooksidasyonu, polyol yolunun aşırı aktivasyonu, protein glikasyonunda artışa neden olabilir. ROS; aldoz redüktaz ve PKC'yi aktive edebilir ve AGE üretimi ile diaçil gliserol (DAG) formasyonunu arttırabilir.¹³

2.2.3.4. Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu

Çalışmalar hiperglisemiye maruz kalan vasküler dokularda PKC aktivitesi ve PKC aktivatörü olan DAG seviyesinin arttığını göstermektedir.⁹ Diyabette glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT-1) ile vasküler hücrelere taşınan aşırı glukozun çoğu glikoliz ile metabolize olur. Glikolizdeki artış DAG sentezini artırır. DAG ise PKC'nin özellikle de PKC-beta izoformunun başlıca endojen aktivatörüdür. Büyüme faktörleri, vasküler permeabilite ile ilişkili faktörler de gen transkripsiyonu seviyesinde PKC ile regüle olurlar.¹⁴

Özet olarak; DAG ve PKC, permeabilitede artışa ve endotel hücre aktivasyonuna neden olan ve kan akımı, lökosit adezyonu ve büyüme faktörleri sinyalizasyonunu olumsuz etkileyebilen önemli hücre içi sinyalizasyon molekülleridir. Bu nedenle aşırı PKC aktivasyonu mikrovasküler iskemi, geçirgenliğin artması ve anjiyogenez triadının temelinde yer alır.^{14,15}

VEGF, üzerinde oldukça yoğun araştırmaların sürdürüldüğü bir büyüme faktörüdür. VEGF, retina anjiogenezinde anahtar mediatördür. Retina iskemisine cevap olarak VEGF stimüle olur. VEGF 165 izoformu, en güçlü biyoaktiviteye sahip olan ve in vivo en sık görülen VEGF alt tipidir. VEGF, endotel proliferasyonunu, permeabiliteyi ve sağ kalımı düzenler.^{14,16} Klinik çalışmalar, diyabetli olmayan kişilerle karşılaştırıldığında, proliferatif olmayan veya aktif ya da sessiz PDRP'li diyabetlilerde aköz sıvısı ve vitreusta VEGF seviyesinin arttığını göstermiştir.¹⁴ NPDRP'den aktif PDRP'ye ilerleyen hastalarda VEGF seviyelerinin arttığı saptanmıştır.¹⁴ Yine neovaskülarizasyon nedeniyle başarılı panretinal fotokoagülasyon tedavisi sonrası hastalarda intraoküler VEGF seviyesinin % 75 oranında azaldığı gözlenmiştir.¹⁷

Diyabetin patogenezinde Rho kinaz (ROCK) enzimleri de önemli rol oynar. ROCK, endotel nitrik oksit sentazı (eNOS) inhibe ederek potent bir endotel koruyucusu olan nitrik oksit (NO) miktarını düşürüp endotel hasarına yol açar.¹⁸ Apoptoziste ve enflamasyonda rolü olan NF-kB'nin sitoplazmadan hücre çekirdeğine göçünü hızlandırarak endotelde intrasellüler adezyon molekülü 1

(ICAM-1) ve diğer lökosit adezyon moleküllerinin sentezini artırarak endotel hasarına yol açar ve aynı zamanda proliferatif membranların kontraksiyonuna neden olur.¹⁸

Gittikçe artan sayıda kanıt diyabetin erken evrelerinden itibaren nöral retinada belirgin hasarın ortaya çıktığına işaret etmektedir. Bunların başlıcaları apoptoziste artış, glial hücre reaktivitesi, mikrogial aktivasyon ve glutamat metabolizmasında değişikliklerdir. Nörodejeneratif bu değişimler; klinik olarak DRP gelişmeden elektroretinografideki değişiklikleri, renk görme ve kontrast duyarlılıkta bozulmaları kısmen açıklayabilir.¹⁹⁻²²

2.2.4. Diyabetik Retinopati Gelişimindeki Risk Faktörleri

2.2.4.1. Diyabetin Süresi

DRP gelişiminde en önemli faktördür. Otuz yaşından önce DM tanısı konmuş olan hastalarda 10 yıl sonra DRP gelişme insidansı % 50 iken, bu oran 30 yıl sonrasında % 90'a yükselmektedir. Diyabetin ortaya çıkışından itibaren 5 yıl içerisinde ve puberte öncesinde DRP gelişmesi nadir olsa dahi insüline bağımlı olmayan diyabetiklerin yaklaşık % 5'inin ilk muayenelerinde arka plan (background) DRP saptanır.

2.2.4.2. Diyabetin İyi Metabolik Kontrolü

Diyabetin sıkı metabolik kontrolü, DRP gelişimini önlemese de ortaya çıkışını belli bir süre geciktirebilmektedir. Buna mukabil metabolik kontrolü iyi olmayan diyabetik hastalar, iyi kontrol edilen diyabetik hastalara kıyasla daha erken bir tarihte diyabetik retinopati geliştirebilirler. DM'ye bağlı komplikasyonların kötü metabolik kontrol ile ilgili olduğu hususunda giderek artan kanaat, kan glukoz seviyesinin normalleştirilmesi yolunda agresif çabalara girişilmesine sebebiyet vermiştir. Ancak, bazı hastalarda ister cilt altı insülin pompalarıyla sürekli insülin

infüzyonu yapılarak, isterse de çok sayıda enjeksiyonlarla sağlanan başarılı kan glukoz kontrolünün ilk birkaç ayda DRP’de ağırlaşmaya neden olduğu saptanmıştır.¹

2.2.4.3. Gebelik

Zaman zaman PDRP’nin hızlı ilerleyişiyle birlikte bulunmaktadır. Retinopatinin ağırlaşacağını önceden tahmin ettiren faktörler arasında, diyabetin gebelik öncesinde kötü kontrolü, gebeliğin erken dönemleri esnasında hızlı biçimde kontrolün sıklaştırılması ve gebelik esnasında pre-eklampsi ile sıvı dengesizliği gelişmesi sayılabilir.

2.2.4.4. Hipertansiyon

Kötü kontrol edildiği takdirde DRP’nin kötüleşmesi ve bilhassa proliferatif hastalık gelişimi ile birlikte bulunmaktadır. Hipertansiyon, hem insüline bağımlı, hem de bağımlı olmayan diyabetliler için bir risk faktörüdür.

2.2.4.5. Renal Hastalık

Ağır hallerinde DRP’nin kötüleşmesiyle birlikte seyretmektedir. Buna mukabil böbrek transplantasyonu gibi renal hastalığın tedavisi de retinopatide düzelme ve fotokoagülasyona daha elverişli bir cevap alınması ile beraber bulunabilir.

2.2.4.6. Sistemik Diğer Faktörler

Şişmanlık, hiperlipidemi, tütün kullanımı ve anemi yer almaktadır.

2.2.4.7. Göze Ait Faktörler

Arka vitreus dekolmanı, glokom, karotis arter hastalığı, katarakt cerrahisi, YAG lazer kapsülotomi ve retinal ven tıkanıklığı DRP patogenezi ile ilişkili olabilen göze ait risk faktörleridir.

2.2.5. DRP’de Görülen Klinik Bulgular

2.2.5.1. Mikroanevrizma

DRP’nin ilk bulgusudur. Retinada küçük yuvarlak ya da oval kırmızı benekler tarzında görülürler. Mikrohemorajiler ile karıştırılır. Ayırıcı tanı ya uzun süreli kontroller ya da fundus floresein anjiyografi (FFA) yardımı ile sağlanır. Uzun süreli kontrollerde kaybolmayan kırmızı noktalar mikroanevrizmalardır. Ayrıca FFA’da mikroanevrizmalar hiperfloresans, mikrohemorajiler ise hipofloresans olarak görülür. Mikroanevrizmalar, DM nedeniyle perisit hücrelerinin erken kayıpları sonucunda damarın kese tarzında genişlemesi ya da endotel hücrelerinin anormal proliferasyonundan dolayı görülürler. Zaman içinde mikroanevrizma duvarında hyalinizasyon gelişmesi sureti ile kan akımı kaybolur. Bu dönemde anevrizmalar beyaz bir renk alırlar.

2.2.5.2. Mikrohemoraji

Mikrohemoraji, kapiller ya da venüllerin yırtılması sonucu oluşur.² DRP olgularında görülen kanamalar dış pleksiform ve iç nükleer tabakada yerleşir ve yuvarlak veya pençe şeklinde görülürler. FFA’da görüntüyü gölgeleyerek hipofloresan olarak izlenirler. Mum alevi görünümü, hemorajilerin sinir lifi tabakasında yer aldığını gösterir. Genellikle bu hemorajiler bir sızıntıdan kaynaklanır. Hastalık ilerledikçe koyu kırmızı benek tarzında (blot hemoraji) ya da ortası beyaz kırmızı benek görünümünde (Roth lekeleri) hemorajiler ortaya çıkar. Roth lekeleri küçük arteriyollerin tıkanığının işaretidir.

2.2.5.3. Sert Eksüda

Sert eksüdalar permeabilite bozukluğu sonucu oluşur. Dış pleksiform tabakada yerleşen sarı-beyaz renkte görülen serum lipoproteinleridir.² FFA’da hipofloresandır. Vasküler yapılardan retinaya geçen sıvı rezorbe olunca geride lipoprotein kristalleri kalır. Bu kristaller makrofajlar tarafından beslenmenin iyi olduğu bölgelere doğru taşınarak sınırda terk edilirler. Biriken kristaller sert eksüdaları oluştururlar. Bu sert eksüdalar daire şeklinde dizilirse buna sirsine retinopati denir. Sirsine retinopatilerin merkezinde mutlaka sızıntı veren bir vasküler yapı vardır. Permeabilite bozukluğu ve buna bağlı olarak gelişen ödem ve sert eksüdalar daha ziyade arka kutupta görülür.

2.2.5.4. Yumuşak Eksüda

Atılmış pamuk görünümündeki bu lezyonlar sinir liflerindeki küçük infarktlardır. Arterioller tıkanma veya staz sonucu görülürler. Gangliyon hücrelerinin variköz ödeminden ibaret olup, kirli beyaz veya gri renkte, kenarları kabarık atılmış pamuk manzarasındaki plaklardır.

2.2.5.5. Venöz Boncuklanma

İskemi sonucu ortaya çıkar. Retina venlerinin iskelet yapılarının bozulması sonucunda boğum boğum bir görüntü ortaya çıkar ve buna venöz beading (boncuklanma) adı verilir.

2.2.5.6. İRMA (İntraretinal Mikrovasküler Anomaliler)

İRMA, retina vasküler yapılarının terminal özelliklerini kaybedip arter-arter, ven-ven, arter-ven bağlantısını sağlayan vasküler yapıların ortaya çıkmasıdır. Bitişik alanda mutlaka kapillerlerden yoksun bir bölge vardır. İRMA’ların uzun süre, neovaskülarizasyonların başlangıcı olup olmadığı tartışılmıştır. Ancak daha sonra bunların neovaskülarizasyonlarla ilişkileri olmadığı anlaşılmıştır. FFA’da neovaskülarizasyonlar kadar aşırı boya sızdırmazlar.

2.2.5.7. Neovaskülarizasyon

İç retina katlarının iskemisine sekonder olarak gelişir. Venöz endotelin proliferasyonu ile başlar. Retina iç yüzeyi ile internal limitan membran (İLM) arasında gelişen bu damar yapısı zamanla İLM' yi delerek vitreus boşluğuna doğru ilerler. Retina yüzeyinde, optik sinir başında görülürler. FFA'da ilerleyen evrelerde kaçağa bağlı artan hiperfloresans şeklinde görülür.

2.2.5.8. Hemoraji

Preretinal ve vitreus içi hemorajileri, neovasküler dokulardan kaynaklanır. Lokalizasyonlarına ve yoğunluklarına göre ani görme kaybına yol açarlar.²

2.2.5.9. Vitreus Dekolmanı

Retinadaki iskekiye veya yapısal defektlere bağlı olarak vitreus kontraksiyonu gelişebilir. Komplet dekolmanın olması retinopatinin gerilemesine yol açarken, parsiyel vitreus dekolmanı, traksiyonel retina dekolmanı gelişmesine neden olabilir.

2.2.5.10. Retina Ödemi

Başlangıçta dış pleksiform ve iç nükleer tabakalar arasında yerleşmiştir. Daha sonraları iç pleksiform ve sinir lifi tabakaları da tutulur ve neticede retinanın bütün katları ödemli hale gelebilir. Sıvının birikmeye devam etmesi halinde fovea kistoid görünüme bürünür. Retina ödemi klinik olarak, altta yatan retina pigment epiteli ve koroidi görünmez hale getirecek derecede retina kalınlaşmasıyla karakterizedir.

2.2.5.11. Diyabetik Makülopati

Diyabetik retinopatinin her evresinde görülebilir. Başlangıç retinopatilerde görmeyi azaltan en önemli nedendir. Diyabetik makülopati tipik olarak fovea çevresine yerleşmiş sert eksüda, ödem ve ufak retina içi hemorajiler ile kendini

gösterir. Maküler ödem; fokal, diffüz, iskemik ve mikst tip şeklinde sınıflandırılmaktadır.

2.2.5.11.1. Fokal Makülopati

Çepeçevre ya da kısmi halkalar şeklinde sert eksüdalarla birlikte bulunan, sınırları belirgin sızdırma alanlarıyla karakterizedir. Eksüdalar perifoveal bölgeye karşı bir yatkınlık gösterir ve sızdıran mikroanevrizmalarla birlikte bulunurlar.

2.2.5.11.2. Diffüz Makülopati

Dilate kapillerlerden yaygın sızıntı ile karakterizedir. Kistoid maküler ödem, sıklıkla karşılaşılan bir bulgu olsa da, arka plan diyabetik retinopatiye ait diğer belirtiler bulunmayabilir. Ağır vakalarda diffüz retina kalınlaşmasına bağlı olarak foveanın yerini tespit etmek mümkün olmayabilir. FFA'daki görünüm oftalmoskopik görünüme nazaran daha dramatiktir.

2.2.5.11.3. İskemik Makülopati

Klinik olarak hemoraji ve eksüdaların başka yerlerde görülmesine rağmen, makülanın nispeten normal görünümü eşliğinde azalmış görme keskinliği mevcudiyetiyle karakterizedir. Tam olarak kapsadığı alan ancak FFA ile ortaya konabilse de iskeminin şiddetiyle görme keskinliği seviyesi arasında doğrudan bir korelasyon yokmuş gibi görünmektedir.

2.2.5.11.4. Mikst Tip Makülopati

Diffüz maküler ödem ve iskeminin bir arada bulunması ile karakterizedir

2.2.5.11.5. Klinik Anlamlı Maküler Ödem (CSME)

Aşağıda yer alan özelliklerin bir veya birkaçının mevcudiyetiyle tanımlanmaktadır:

- Fovea merkezinden itibaren 500 µm mesafe içinde retina ödemi
- Maküla merkezine 500 µm mesafe içinde, komşuluğundaki retinada kalınlaşma ile birlikte olan sert eksuda varlığı
- Herhangi bir kısmı fovea merkezine bir disk çapından daha az mesafede yer alan bir disk alanı boyutlarında veya daha büyük retina ödemi

2.2.6. Diyabetik Retinopati Sınıflaması (ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study)

2.2.6.1. Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati

İlk bulgusu mikroanevrizmalardır. Yuvarlak şekilli hemorajiler, mum şekilli hemorajiler ve sert eksüdalar mikrohemorajilere eşlik eden diğer klinik bulgulardır. Mevcut lezyonların ağırlığına göre NPDR; hafif, orta, ağır, çok ağır olmak üzere klinik olarak dört alt grupta değerlendirilir.

2.2.6.1.1. Hafif Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati

Retinopatinin başlangıç dönemidir. Mikroanevrizmalar ve küçük yuvarlak hemorajiler oftalmoskopik olarak görülen ilk bulgulardır. Yumuşak eksüdalara ve venöz değişikliklere çok az sayıda rastlanır. Hafif NPDR'li gözlerin % 15'inde 5 yıl içerisinde PDRP gelişme riski vardır.

2.2.6.1.2. Orta Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati

Çok daha geniş retina yüzeyinde mikroanevrizmalar, kanamalar (yuvarlak ve mum şeklinde) venöz boncuklanmalar ve yumuşak eksüdalar vardır. İRMA bir kadrandan fazla alanda görülmez. Bu gözlerin % 33'ünde 5 yıl içerisinde PDRP gelişmektedir.

2.2.6.1.3. Ağır Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati

Tüm retina yüzeyinde ağır kanamalar, çok sayıda yumuşak eksüda ve çok belirgin venöz değişikliklerle karakterizedir. Bu gözlerin %60'ında 5 yıl içerisinde PDRP gelişir. FFA'da retina kapillerlerinde tıkanmalar, perfüze olmayan sahalar tespit edilir.

2.2.6.1.4. Çok Ağır Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati

Neovaskülarizasyon gelişmesinden bir önceki evredir. Klinik görünüm olarak ağır NPDRP gibidir ancak lezyonlar çok fazla sayıdadır. Bu gözlerin %75' inde bir yıl içerisinde PDRP gelişme riski vardır.

2.2.6.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDRP)

PDRP tanısının konulabilmesi için retina yüzeyinde ve/veya optik disk üzerinde yeni damar oluşumunun ve birlikte fibröz doku çoğalmasının görülmesi şarttır. Proliferatif diyabetik retinopatinin esas bulgusu olan neovaskülarizasyon retina yüzeyinde özellikle üst ve alt temporal arkatlar boyunca ve optik disk üzerinde yerleşir. Neovasküler doku venöz endotelin proliferasyonu ile başlar, retina ile İLM arasında ilerler ve gelişme süreci içerisinde İLM' yi delerek vitreus boşluğuna doğru ilerler. Retina yüzeyinde gelişen damarların aksine optik disk üzerinde gelişen damarlar, optik disk üzerinde İLM'nin olmaması nedeniyle çok daha kısa sürede vitreus boşluğuna doğru ilerler. PDRP klinik olarak 2 dönemde değerlendirilir.

2.2.6.2.1. Erken PDRP

Retina yüzeyinde neovaskülarizasyon (NV) ve bunlardan kaynaklanan preretinal hemoraji ile karakterizedir. FFA'da geniş iskemik sahalar ve bu bölgelere komşu olarak gelişen NV'lere bağlı hiperfloresan bölgeler vardır.

2.2.6.2.2. Yüksek Riskli PDRP

Retina yüzeyindeki NV'ler vitreusa doğru kabarmıştır. Beraberindeki fibröz doku belirgin olarak görülür. Optik disk neovaskülarizasyonuna, ufak traksiyon dekolmanları, ağır preretinal hemorajiler ve vitreus hemorajileri eşlik eder.

2.3. Anjiyogenez

2.3.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve DRP gibi patolojik oküler anjiyogeneze neden olan hastalıklar, gelişmiş ülkelerdeki yaşlı nüfusta görme kaybına neden olan durumların başında gelmektedir.²³ Görme kaybının oluşmasında maküla ödemi ve anjiyogenezis önemli bir yer tutmaktadır. VEGF ailesi VEGF A (en önemlisi), VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E, VEGF F ve plasental büyüme faktöründen oluşur. Bu proteinler anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve vasküler permeabilitenin düzenlenmesinde rol oynar. VEGF ailesinin içinde en iyi bilinen ve oküler neovaskülarizasyonda primer rol oynayan faktör VEGF A'dır. VEGF A'nın 9 izoformu mevcuttur. Bunlar; VEGF121, VEGF145, VEGF 148, VEGF 162, VEGF 165, VEGF 165b, VEGF 183, VEGF 189, VEGF 206'dır. Bu izoformların çoğunun heparini bağlama afinitesi mevcuttur.²⁴ Bu izoformlardan VEGF 165b, VEGFR-2' ye bağlanarak endojen inhibitör rol oynar. VEGF 121 ise heparine bağlanmaz. VEGF A'nın izoformları plazmin gibi proteolitik enzimler aracılığıyla heparinden ayrılır.

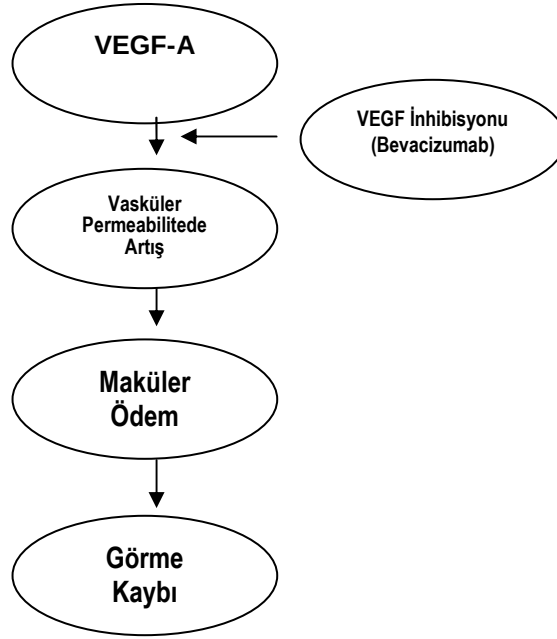
VEGF gen ekspresyonu hipoksi, büyüme faktörleri ve nitrik oksit tarafından stimüle edilebilir. Bu sentezde anahtar rol oynayan hipoksinin indüklediği faktör 1'dir. Bu faktör alfa ve beta olmak üzere 2 alt üniteden oluşur. Hipoksik durumlarda hipoksinin indüklediği faktör 1 sentezi artar, hidroksilasyonu baskılar ve yıkımı azalır.²⁵ Böylece VEGF A gen transkripsiyonu artar.

VEGF A, anjiyogenezis ve vasküler permeabiliteyi artırma etkisinin yanında, normal fizyolojik fonksiyonlarda da görev alabilir. Menstrüel siklus, saç büyümesi ve yara iyileşmesi bunlardan birkaçıdır. Ayrıca damar endotelinin apoptoza

gitmesini önler. VEGF A dimerik glikoprotein yapısındadır. Etkisini 2 tane tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak gösterir. Bu reseptörler VEGFR-1 ve VEGFR-2 dir.²⁶ Bu reseptörler primer olarak endotel hücrelerinde lokalizedir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda, vücutta başka dokularda da bu reseptörler bulunmuş olup, üçüncü bir reseptör neuropilin-1 dir.²³ VEGF 121 izoformu ise bu reseptöre bağlanmaz. Bu reseptör endotel hücreleri dışında nöral ve tümöral hücrelerde de bulunmuştur.

VEGF salınımına bağlı olarak meydana gelen oküler neovaskülarizasyonda hipoksi anahtar role sahiptir. İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda hipoksiye bağlı olarak VEGF A düzeyi retina hücreleri (gangliyon hücreleri, Müller hücreleri ve pigment epitel hücreleri), vitreus ve aköz hümör de yüksek ölçülmüştür.²³ Diyabete bağlı gelişen maküler ödem yüksek VEGF A düzeyleriyle ilişkilidir. Çeşitli faktörler aracılığıyla VEGF A damar duvarında sızıntıya neden olur. Bunlar; lökosit aracılı endotelial hasar, fenestrasyon oluşumu, endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda bozulma ve hücreler arası toplu akıştır. Kan retina bariyerinin bozulması için gereken VEGF A miktar ve süresi, neovaskülarizasyon oluşmasına göre daha azdır. Vasküler permeabilitenin artması neovaskülarizasyon için bir önceki basamak olabilir.²⁷

Diyabetik retinopatide enflamasyon da önemli role sahiptir. VEGF A proenflamatuvar özellik gösterir. Fakat mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. VEGF A T-hücre kemoatraktan kemokin interferon gama sentezini artırabilir.²³



Şekil 1: Diyabetik maküler ödem patofizyolojisi

2.3.1.1 Bevacizumab

Bevacizumab, monoklonal uzun etkili VEGF antikorudur. VEGF'in bütün alt tiplerine bağlanır. Sistemik olarak kolorektal kanserlerin karaciğer metastazında başarılı bir şekilde sistemik olarak kullanılmaktadır. Eksudatif tip yaşa bağlı maküla dejenerasyonunda, PDRP'ye bağlı vasküler permeabilite ve fibrovasküler proliferasyonda, santral retinal ven oklüzyonuna bağlı makula ödeminin azaltılmasında intravitreal bevacizumab enjeksiyonunun etkili olduğu bildirilmektedir.²⁸ Aynı zamanda hayvan modellerinde bevacizumabın retinanın tüm katlarına penetre olduğu gösterilmiştir.²⁹ Bugün için bevacizumabın intravitreal uygulanan dozlarının (1.25mg ile 2.5mg) retinaya toksik olmadığı ve toksisite açısından uygulanan bu iki doz arasında fark olmadığı gösterilmiştir.³⁰ İntravitreal uygulanan bevacizumabdan 7 ile 15 gün sonra neovaskülarizasyonda gerileme ve makula ödeminde azalma görülür.³⁰ Bevacizumab 214 aminoasidden oluşan, moleküler ağırlığı 149 kDa olan insan VEGF monoklonal antikorudur. Bevacizumabın göz içi kullanımı için FDA onayı yoktur. İntravitreal bevacizumab kullanımına bağlı olarak sistemik ve oküler yan etkilerin olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur.³¹ Kan basıncında yükselme, serebrovasküler olay, miyokard

enfarktüsü, iliyak arter anevrizması ve ölüm bildirilen sistemik yan etkiler arasındadır. Oküler komplikasyon olarak; bakteriyel endoftalmi, traksiyonel retina dekolmanı, üveit, regmatojen retina dekolmanı, vitreus hemorajisi görülmüştür.³⁰

2.4. Enflamasyon

2.4.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa

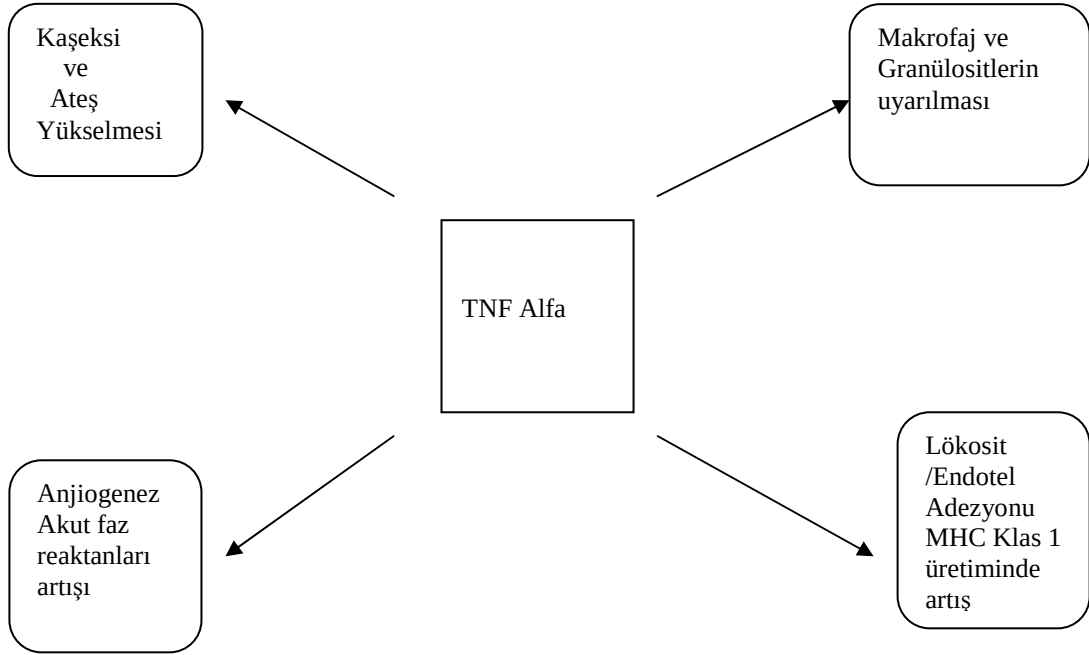
TNF alfa başlıca makrofaj, mast hücresi ve lenfositlerden salgılanan proenflamatuvar sitokindir. Enflamasyon gelişiminde ve diğer sitokinlerin uyarımında birçok fonksiyona sahiptir. TNF alfa özellikle endotel hücreleri üzerinde adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin sentezini ve fagosit mikrop öldürücü sistemlerin uyarılmasını sağlar. Ayrıca dayanıksız hücrelerin apoptozuna da yol açar.

TNF alfa ve interlekin 1 (İL-1) etki olarak birbirine benzeyen sitokinlerdir. İkisi de enfeksiyon ya da doku yaralanmasına yanıt olarak, makrofajlar gibi doğal bağışıklık hücrelerince salgılanır. Bu sitokinler, hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanıp, normalde hemen hemen tüm hücrelerin sitoplazmasında etkisiz olarak tutulan NF-kB'yi etkinleştirir. Etkinleşen NF-kB enflamatuvar yanıtta yer aldığı bilinen 60'tan fazla genin yazılımını başlatır. İmmün sistemin anahtarı olarak bilinir.

DRP'de erken evrelerde ortaya çıkan enflamasyon miktarı damar duvarındaki perisit ve endotel hücrelerinin kaybında kritik bir role sahip olabilir.³² Enflamasyondaki faktörlerden biri de TNF alfadır. Diyabetik retinopatide erken enflamatuvar olaylarda TNF alfa seviyesi retinada yüksek saptanmıştır.³³

TNF alfa inhibitörü verilen diyabetik ratlarda enflamatuvar moleküllerden biri olan hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) seviyesinin azalmış olduğu gösterilmiştir.³⁴ TNF alfa inhibisyonuna paralel olarak diyabete bağlı lökosit adezyonu, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) düzeyi, NF-Kb aktivasyonu ve kan-retina bariyer bozulma miktarı azalır.³⁴ Diyabetik maküler ödem tedavisinde TNF

alfa inhibitörlerine bağlı olumlu sonuçlar alınmıştır.³⁵ TNF alfa mikrovasküler hücrelerin apoptozunda güçlü bir uyarıcıdır.³⁶



Şekil 2: TNF alfanın enflamasyondaki rolü

2.5. Apoptoz

2.5.1. Kaspaz Ailesi ve Kaspaz 3

Proteini, aspartat aminoasidinden sonra kesen, aktif merkezinde sistein bulunan proteazlar ailesidir. Bu kesme işlemi proteinin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olabilir. Kaspazlar zimojen olarak salınırlar. Tüm kaspazların yapısında büyük (p10) ve küçük (p20) katalitik üniteleri vardır. N-terminal bölgesi kaspazdan kaspaza değişiklik göstermektedir. Buna bağlı olarak uzun N-terminal ön bölgesi bulunanlar başlatıcı, kısa N-terminal ön bölgesi bulunanlar sonlandırıcı kaspaz olarak ayrılırlar. Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmıştır. Kaspaz-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 başlatıcı kaspazlar olup, uzun N-terminal bölgesi içerirler.

Bu uzun N-terminal bölgelerinde kaspaz aktive edici toplayıcı bölge (CARD) veya ölümü etkileyen bölgeleri (DED) mevcuttur.³⁷ Kaspaz-3, 6, 7, 14 sonlandırıcı kaspazlar olup kısa N-terminal bölgesi içerirler. Başlatıcı kaspazlardan; kaspaz-1, 2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 CARD bölgesi, kaspaz-8, 10 ise DED bölgesi içermektedir. Kaspaz-3, 6, 7, 14 ise CARD veya DED bölgesi içermemektedir.

Uzun N-terminal ön bölgesi protein-protein ilişkisi için zemin hazırlar. Bu sayede aktive edici protein kompleksi oluşabilir.³⁸ Kaspaz-8 ve kaspaz-10, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) içinde aktive olur. Kaspaz-9'un aktivasyon kompleksi apopitozom olarak adlandırılır. Kaspaz-2 hakkında fazla veri yoktur. Sonlandırıcı kaspazlar 2 basamakta aktive olurlar. DISC ile aktive olmuş başlatıcı kaspaz-8 veya apopitozom ile aktive olmuş başlatıcı kaspaz-9; sonlandırıcı kaspaz 3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece aktivasyonuna neden olur. Bu otokatalitik aktivasyon basamağı hücrel kaspaz inhibitörleri (IAPS, XIAP) ile engellenebilir. En iyi karakterize edilmiş olanı olan XIAP; inhibitör etkili ön bölgenin kaspazdan ayrılmasını bloklayarak kaspaz-3 aktivasyonunu engelleyebilir. Başlatıcı kaspaz aktive olsa da, apopitoz sonlandırıcı kaspazların aktivasyonunu sağlayan proteoliz sırasında bu inhibitörler ile durdurulabilir.³⁹

Kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 14 apopitoz dışında göreve sahiptir. Kaspaz-1, 4, 5 proenflamatuvar sitokinlerin salınımında görevlidir. Örneğin; Kaspaz-14 keratinosit matürasyonunda görevlidir.⁴⁰ Ekstresek yolak ve intrinsek yolak olmak üzere 2 temel apopitoz yolağı mevcuttur. Ekstresek yolak TNF alfanın CD95 ligandına bağlanarak başlar. Bu yolak kaspaz-8, 10 üzerinden kaspaz-3'ü aktifleştirir. İntrinsek yolakta ise kaspaz 9 önemlidir.

Kaspaz aktivitesinin indüklenmesi; sitoskeletal ve nükleer proteinlerin parçalanmasında önemli rol oynar. Kaspazların indüklediği endonükleaz aktivitesi, çift sarmal DNA fragmanlarının oluşmasını ve elektroforezde DNA'da merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur.⁴¹

2.5.2. Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB)

NF-kB; enflamasyon, immün yanıt, proliferasyon ve apoptoziste sorumlu olan çok sayıda genin önemli bir regülatörü olan transkripsiyon faktörüdür. NF-kB homodimer ve heterodimerlerden oluşur. En iyi p65 ve p50 altbirimlerini içeren memeli hücrelerinde çalışılmıştır. NF-kB hücre sitoplazmasında inhibitör protein olan IκB ile kompleks halde bulunur. IκB kinaz kompleksi (IKK) tarafından IκB proteinin fosforillenmesiyle bu protein inaktive olur ve NF-kB'den ayrılır. Böylelikle serbest kalan NF-kB nükleusa geçer. DNA'ya bağlanarak spesifik genlerin aktivasyonuna yol açar.

Deneyssel olarak diyabet oluşturulmuş rat retinalarında, yüksek glukoz konsantrasyonlarında retina endoteli ve perisitlerde, NF-kB'nin aktive olduğu gösterilmiştir.⁴² Retina perisitlerinin nükleusuna NF-kB'nin migrasyonunda p65 alt ünitenin rol oynadığı gösterilmiştir.³⁶ Retina endotel hücreleri, perisitler, ganglion hücreleri ve iç nükleer tabaka hücrelerinde ise p50 alt ünitenin sorumlu olduğu gösterilmiştir.⁴³

DR'nin erken evrelerinin patogeneğinde NF-kB önemli role sahip olması ile ilgili 2 önemli kanıt gösterilebilir. Birincisi NF-kB tarafından üretimi regüle edilen (Ör; INOS ve ICAM) proteinlerinin inhibisyonunun retinadaki kapiller dejenerasyonu önlemesi, ikincisi ise çeşitli antioksidanların NF-kB aktivasyonunu inhibe ederek, diyabetik rat retinalarında kapiller dejenerasyonu ve perisit kaybı gelişimini önlemesidir.⁴⁴ Keza düşük doz salisilatlar (Ör; aspirin, sodyum salisilat, sülfasalazin) da NF-kB aktivasyonunu inhibe ederek, enflamatuvar mediyatörler olan INOS ve ICAM-1 seviyesini azaltıp, kapiller dejenerasyonu ve perisit kaybını önler.⁴⁵

Ayrıca; stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole ışınları, okside LDL, bakteriyel ve viral antijenler tarafından uyarılmış hücresel cevapta NF-kB önemli rol oynar.⁴⁶ Enfeksiyonlara yanıt olarak immün cevabın düzenlenmesinde önemlidir. NF-kB'nin bozuk regülasyonu kanser, otoimmün hastalıklar, septik şok, viral

enfeksiyon ve immatür immün yanıtı neden olabilir. Keza sinaptik plastisite ve hafızada da rolü vardır.

2.6. Toksisite

2.6.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Serbest radikaller (SR), biyomoleküllerle kolayca reaksiyona giren DM, kanser, miyokard enfarktüsü, immün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinin sorumlu yapılarıdır. SR'lerin büyük kısmını oluşturan oksijen türevleri nükleik asitler, proteinler, aminoasitler, lipidler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromoleküllerinde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasara yol açar.⁴⁷ Organizmada radikal oluşumunu en az düzeye indirecek ve oluşmuş olanları etkisiz hale getirecek koruyucu mekanizmalar geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan sistemlerdir.

Antioksidanlar, intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki farklı ortamda bulunur. Oksidan hasara ilk yanıtı veren intrasellüler enzimatik sistem olup bunlar bakır-çinko-süperoksid dismutaz (CuZnSOD), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktazdır.⁴⁸ Birçok araştırmacı tarafından DM komplikasyonları ile oksidatif stresin doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁴⁹

Enzimatik olmayan glikolizasyon ve oksidatif hasar, biyolojik makromoleküllerde postsentetik modifikasyonlar ile uzun dönem komplikasyonlara neden olur. Burada özellikle uzun yarı ömürlü ekstrasellüler proteinlerin etkilendiği görülür. Bu proteinlerden zengin olan yapılardaki değişiklikler ile katarakt, ateroskleroz ve nefropati gelişir.⁵⁰ Alloxan ve streptozosin (STZ) kimyasal diyabet yapıcı etkilerini SR'ler yoluyla gösterir. Bu maddelerin diyabetojenik etkilerine karşı SOD'nin koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir.⁵⁰ Lipid peroksidasyonunun DRP'deki rolü saptanmıştır.⁵¹ Diyabette, oksidan strese karşı koruyucu rol oynayan antioksidanların zayıfladığı bildirilmiştir.⁴⁸

Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu, süperoksit radikali meydana getirebilir. Buradaki en önemli metaller bakır ve demirdir. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksi radikali oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince, biri okside olur diğeri ise indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Hidrojen peroksit, katalaz enzimiyle 2 molekül su ve 1 molekül oksijene ayrılır.

2.7. Rho Kinaz (ROCK)

Diyabetik retinopatinin erken evrelerinde çeşitli klinik bulguların ortaya çıkmasında endotelial hasara sekonder lökosit adezyonu kritik rol oynar. ICAM-1 ve lökosit beta 2 integrinler önemli adezyon molekülleridir.⁵² Diyabetik retinopati patogenezinde ve PDR'ye bağlı neovaskülarizasyonda VEGF kritik rol oynar. VEGF'in indüklediği migrasyon ve proliferasyon anjiyogeneze yol açar. Bununla birlikte endotelial migrasyon ROCK yoluyla düzenlenir. Bu enzimin aktivatörü endotelial F-aktin sitoskeletonudur.¹⁸

ROCK yolu, diyabetik retinal mikrovaskülopati, neovaskülarizasyon, proliferatif membranların sikatriyel kontraksiyonuna sekonder meydana gelen traksiyonel retina dekolmanında kritik role sahiptir. Kortikal vitreusta hyalosit olarak bilinen makrofajlar bulunur. Bu hücreler proliferatif vitreoretinopati patogenezinde, proliferatif membranların sikatriyel kontraksiyonunda önemli role sahiptir.

Small GTP-binding protein Rho ve onun hedef proteini olan ROCK, hücre adezyonunda ve miyozin hafif zincir (MLC) fosforilasyonuna sekonder olan migrasyonda önemli fizyolojik rol oynar.⁵³ Serumda ve vitreusta glukoz, TGF-beta 2,

TNF alfanın yükselmesi, endotel hücreleri ve hyalositlerde ROCK yolunun aktivasyonuna yol açar. GTP bağlı RhoA proteininin aktivasyonu ROCK'u uyarır. ROCK eNOS'un defosforilasyonuna yol açıp potent bir endotel koruyucusu olan NO miktarını düşürerek endotelial hasara yol açar.

ROCK, NF-kB'nin nükleer göçünü artırarak endotel hücrelerinde ICAM-1 ekspresyonunu artırır ve ezrin, radixin, moesin moleküllerinin fosforilasyonu artırarak lökosit adezyonuna katkıda bulunur. MLC fosforilasyonu yoluyla lökosit adezyonu, endotel migrasyonu ve proliferatif membranların kontraksiyonuna yol açar.

2.7.1. Fasudil

Fasudil güçlü ve selektif bir ROCK inhibitörüdür. Serebral ve koroner vazospazm, angina, hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde fasudil kullanılan hastalarda ciddi bir yan etki görülmemiştir ve güvenli bulunmuştur.⁵⁴ Deneyisel hayvan modellerinde, etkili konsantrasyonlarda intravitreal fasudil enjeksiyonlarının, elektrofizyolojik ve morfolojik olarak retina dokularında bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür.⁵⁵ Bununla birlikte, hepatik fonksiyon anormallikleri, intrakranial hemoraji ve hipotansiyon rapor edilmiştir.⁵⁶ İntraoküler hastalıklara bağlı klinik kullanım için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

İn vitro olarak fasudilin, ROCK inhibisyonu yoluyla, VEGF aracılı retina kapiller endotel migrasyonu ve proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Bunu da endotel-timidin birleşmesini ve ERK1/2 fosforilasyonunu inhibe ederek yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca in vivo olarak fasudilin VEGF'in indüklediği kornea vaskülarizasyonunu zayıflattığı gözlemlenmiştir.⁵⁵

Fasudilin diyabetik retinopatinin son dönemlerinde etkili olduğu görülmüştür. Deneyisel PDRP oluşturulmuş göz çalışmalarında, fasudil verilen gözlerin hyalosit içeren kollajen jel sıvı analizinde, MLC fosforilasyonunun baskılanarak hemen hemen kollajen jel kontraksiyonunu tamamen ortadan kaldırdığı görülmüştür.⁵⁵ PVR

tavşan modellerinde alfa düz kas aktin (alfa-SMA) organizasyonunu etkili bir şekilde kesintiye uğrattığı ve proliferatif membranların kontraksiyonunu bloke ettiği saptanmıştır.¹⁸ Keza hidroksi metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü olan statinler, mevalonat yolu üzerinden ROCK aktivasyonunu bloke ederler.⁵⁷ Çalışmalar diyabetin geç evrelerinde ROCK inhibisyonunun PVR progresyonunu azalttığını göstermiştir.⁵⁸

DRP, belli bir süre sonra kronik retinal iskemi gelişimine yol açar. Vazokonstriksiyon patogeneğinde ROCK aktivasyonu önemli rol oynar. Bunu da NO bağımlı mekanizma üzerinden yapar. Fasudilin rat retina damarlarında NO miktarını artırarak dilatasyon ve kan akımını artırdığı bildirilmiştir.⁵⁹

DRP'ye sekonder gelişen retinal iskemi, retinal nöronlarda geri dönüşümsüz hasara yol açar. Kronik olarak retinanın iç katlarındaki nöron kaybı ve apoptozis artışı, retina sinir tabakası kalınlığında azalmaya yol açar.²¹ Nöronal hasarın patogeneğinde ROCK yolu ile ilişkili olabileceği son çalışmalarda görülmüştür.²¹ Deneysel rat modeli çalışmasında, ROCK inhibitörü olan Y-27632'nin, optik sinirde ganglion hücrelerinin rejenerasyonunu artırdığı görülmüştür.⁶⁰ Bununla beraber ROCK inhibisyonu, lökosit ekstrasvazasyonunu ve proenflamatuvar sitokinler olan TNF alfa ve interlökin- 6 (IL-6) düzeyini azaltarak, iskeminin indüklediği nöronal hasarı azaltır.

3 . M A T E R Y A L v e M E T O D

Bu çalışma, Abant İzzet Baysal Üniversitesi (A.İ.B.Ü.) Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'nun 2011/38 nolu onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. A.İ.B.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce 2011.08.02.467 nolu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Çalışmaya Dâhil Olma Kriterleri

Çalışmaya 2 - 4 aylık ortalama 2 - 2,5 kg ağırlığında 40 adet albino Yeni Zelanda tavşanı alındı. 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile anestezi uygulanan 30 tavşana sitratlı tampon solüsyonu (0,1 mol/L sitrik asit ve 0,2 mol/L sodyum fosfat, ph:4,5) içinde STZ 60 mg/kg'dan kulak veninden enjekte edilmesi planlanıyordu fakat deney aşamasında hayvanların anesteziye rağmen çok acı çektiği görülünce 60 mg/kg intraperitoneal olarak enjekte edildi. Üçüncü gün kan şekeri 145 mg/dl ve üzeri olan 20 tavşan DM kabul edilip çalışmaya dahil edildi. Kan şekeri Accu Chek Go (Roche) strip ve okuyucusu tarafından kulak veninden ölçüldü. STZ verilen tavşanlardan sadece 20 tavşanda kan şekeri 145mg/dL'nin üzerindeydi ve bunlar çalışmaya dahil edildi. STZ verilen tavşanların hepsinde diyabet gelişmediği için gruplara uygun olarak sağlıklı kontrol grubundaki tavşan sayısı 6 olarak belirlendi.

3.2. Çalışma Dışı Kalma Kriterleri

İntraperitoneal STZ uygulaması sonrası parapleji gelişen 1 tavşan, DM gelişmeyen 9 tavşan ve grupları eşitlemek için kontrol grubundan da 4 tavşan çalışma dışı bırakıldı.

3.3. Çalışma Grupları

Çalışmaya toplam STZ ile DM oluşturulmuş 20 tavşan ile sağlıklı 6 tavşan alındı. STZ ile DM oluşturulmuş 20 tavşan randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Sağlıklı 6 tavşan ise kontrol grubu olarak ayrıldı.

1. Sağlıklı kontrol grubu (n=6) (Grup 1)
2. DM oluşturulan ve intravitreal enjeksiyon yapılmamış tavşanlar (n=6) (Grup 2)
3. DM oluşturularak intravitreal bevacizumab enjeksiyonu yapılan tavşanlar (n=7) (Grup 3)
4. DM oluşturularak intravitreal fasudil enjeksiyonu yapılan tavşanlar (n=7) (Grup 4)

İntraperitoneal STZ enjeksiyonu ile DM oluşturulan tavşanların bağışıklık sisteminin zayıflamasına bağlı ölümlerini engellemek için içme sularına 160 mg/ml sülfatimidin sodyum tuzu 1 ml/kg olacak şekilde 5 gün boyunca ilave edildi. DM oluşturulduktan 21 gün sonra, Grup 3'teki 7 tavşanın sağ gözüne intravitreal 1,25 mg/50 μ l dozunda bevacizumab, Grup 4'teki 7 tavşanın sağ gözüne intravitreal 180 μ M/50 μ l hidroksi fasudil enjeksiyonu yapıldı. Fasudil için enjeksiyon sonrası vitreus konsantrasyonu 30 μ M/l olacak şekilde doz ayarlandı. İntravitreal enjeksiyonlar steril 30 gauge enjektör iğnesi ile limbusun 1 mm gerisinden uygulandı. Bevacizumab ve fasudil 50 μ l hacimde uygulandığı için intravitreal enjeksiyon sonrası ön kamaraya parasentez işlemi uygulanmadı. 3 gün sonra 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile anestezi uygulandıktan sonra 26 tavşanın sağ gözlerine enükleasyon yapıldı. Enükle edilen gözler mikroskop altında limbus bölgelerinden 360° eksizye edilerek kornea ve lens kısmı ayrıldıktan sonra vitreusları 5 cc'lik enjektörle aspire edilerek ependorf tüplerine konuldu ve -80 °C'de saklandı. Retina dokusu ince bir spatül aracılığıyla koroidden ayrılarak ependorf tüplerine konuldu. Alınan materyaller +4 °C'de Lizis Bufferda bekletildikten sonra 1 dakika 10000 devirde santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alınıp uygun şartlarda ELISA çalışması için -80 °C dondurucuya kaldırıldı. Enükleasyon işleminden sonra tavşanlara genel anestezi altında kanı boşaltma yöntemiyle ötenazi işlemi yapılarak deney sonlandırıldı.

3.4. VEGF, TNF alfa, NF-kB'nın ELISA Çalışma Prosedürü

VEGF, TNF-alfa, NF-kB parametreleri (ELISA/96 test/Cusabio) vitreusta ELISA yöntemiyle tek örnek çalışıldı. Her bir kuyucuğa standart, blank, ve örnekler 100 µl konuldu. Üzeri yapışkan strip kaplanıp 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra sıvılar yıkanmadan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl biotin-antibody çalışma solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Her bir sıvı aspire edilip yıkandı. Her bir kuyucuğa yaklaşık 200 µl yıkama tamponu konulup 2 dakika beklendi. Daha sonra sıvılar uzaklaştırıldı. Kuyucuklar içinde kalan sıvılar, kuyucuklar ters çevrilerek kağıt peçete üzerine birkaç defa vurularak temizlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Her birine HRP-avidin 100 µl çalışma solüsyonu eklendi ve üzeri yapışkan strip kaplanıp 37 °C'de yaklaşık 1 saat inkübe edildi. Yıkama tamponuyla kuyucuklar 5 kez yıkandı. 90 µl TMB substrat her birine eklendi ve 37 °C'de 10-30 dakika arası inkübe edildi. 50 µl stop solüsyon eklendi. Daha sonra 30 dakika içinde 450 nm dalga boylu mikropate okuyucu tarafından her birinin optik dansitesi belirlendi.

3.5. Kaspaz 3 ELISA Çalışma Prosedürü

Daha önce hazırlanan ve -80 °C'ye atılan vitreus ve retinadan oluşan süpernatant örneklerden protein tayin oranlarını eşitlemek için Biüret Yöntemi kullanıldı. 1-2-4-8-16-32-64 gr/lt oranlarında Bovin Serum Albumin (BSA) ile standartlar oluşturuldu. Standartlardan ve örneklerden 20 µl alınıp üzerine 80 µl Biüret (Noroteks Kimya) eklendi. ELISA okuyucuda (Thermo Multiskan FC) 570 nm de okutuldu. Sonrasında hesaplanarak proteinlerin miktarları eşitlenip Kaspaz 3 ELISA (Caspase-3/CPP 32 Colorimetric Assay Kit/100) çalışılma aşamasına geçildi.

50 µl örnekler kuyucuklara konuldu. Daha sonra 50 µl 2X Reaksiyon Tampon (10mM DTT) her bir kuyucuğa eklendi. 5 µl 4 mM DEVD-pNA substrat eklendi ve 37 °C'de yaklaşık 1-2 saat arası inkübe edildi. 405 nm de mikropate

okuyucuda okutuldu. Kaspaz kiti materyal yeterli olduğu için iki kez çalışılıp iki ölçümün ortalaması alındı.

3.6. SOD ELISA Çalışma Prosedürü

Biüret Yöntemiyle retina ve vitreustan oluşan örneklerin protein miktarları gruplar arasında eşitlendi. Dokular soğuk tampon (20 mM Hepes, pH:7,2, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol ve 70 mM süktroz) da homojenize edildi. Santrifüj (1500xg/5dk) edildikten sonra süpernatant -80 °C’de donduruldu. ELISA (Cayman Chemical Company/SOD Assay Kit/96) çalışılacağı gün dokular çıkarılıp buz içinde bekletildi. Her bir kuyucuğa 10 µl örneklerden konuldu. 200 µl dilüe edilmiş radikal dedektör her bir kuyucuğa eklendi. 20 µl dilüe ksantin oksidaz bütün kuyucuklara eklenerek reaksiyon başlatıldı. Ksantin oksidaz eklenen zaman not edildi. 96 kuyucuklu plate birkaç saniye çalkalayıcıda karıştırılıp üzeri örtüldü. Plate oda sıcaklığında 20 dakika boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Absorbanslar ELISA okuyucuda 450 nm’de okutuldu.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS (statistical package for social sciences) 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) bilgisayar paket programında yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde ifade edildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada, Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kabul edildi. Farklı olan grup veya grupların hangisi olduğunu saptamak için ikinci aşama testi olarak Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U testi kullanıldı. Burada p değeri 0,0083’ün altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 . B U L G U L A R

Gruplar arasında VEGF ve Kaspaz 3 seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,013$). TNF alfa ve SOD düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p=0,792$ ve $p=0,135$).

Kruskal Wallis testiyle gruplar arasında fark saptanan VEGF ve kaspaz-3 düzeyleri için farklı olan grupları saptamak amacıyla ikinci aşama testi olarak Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Burada p değeri 0,0083'ün altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tablo 4-1'de VEGF ve kaspaz-3 düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılma sonuçları verilmiştir.

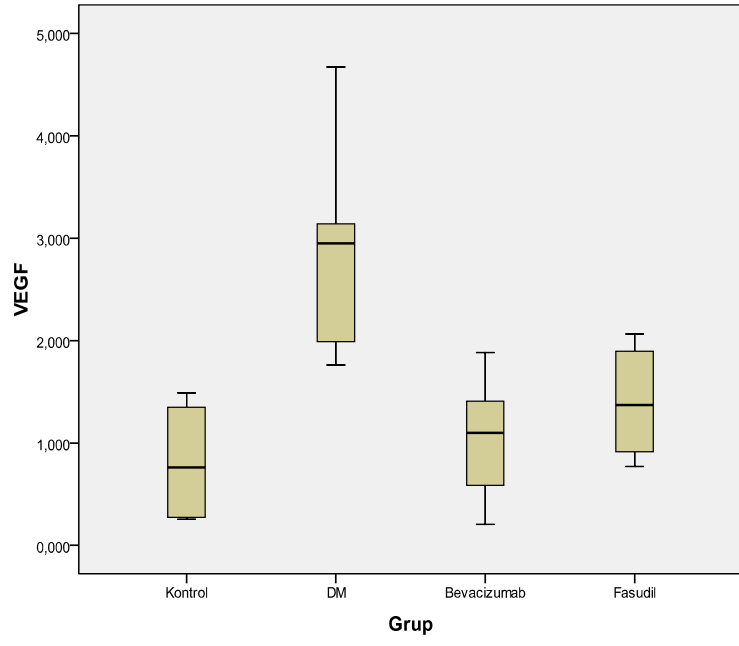
Tablo 4-1: Gruplar arasında VEGF ve Kaspaz 3 seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması *

	Grup 3-4	Grup 2-3	Grup 1-3	Grup 2-4	Grup 1-4	Grup 1-2
VEGF	0,338	0,004	0,886	0,015	0,116	0,004
Kaspaz 3	0,018	0,038	0,518	0,153	0,015	0,077

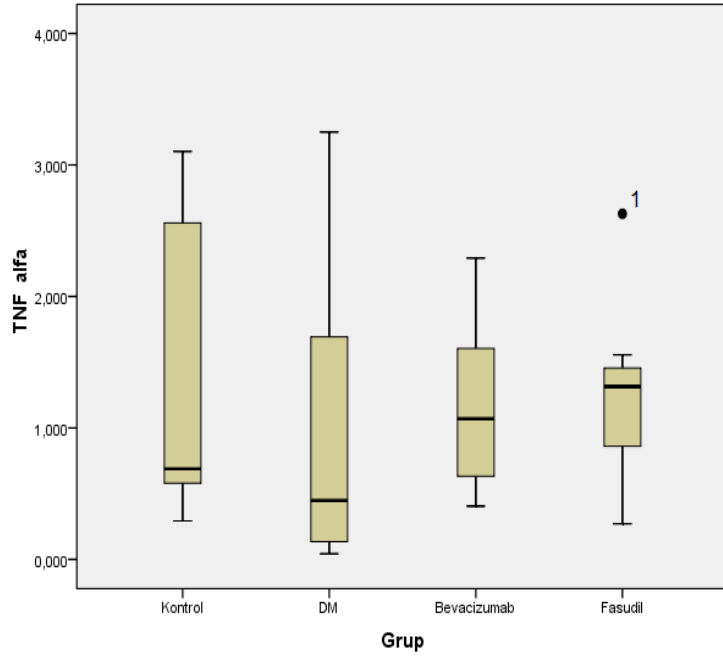
* Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi

Ortalama VEGF düzeyi Grup 1'de $0,81\pm0,57$ pg/ml, Grup 2'de $2,91\pm1,03$ pg/ml, Grup 3'te $1,03\pm0,63$ pg/ml ve Grup 4'de $1,40\pm0,55$ pg/ml idi. Şekil 3'te gruplara göre ortalama VEGF düzeyleri kutu grafiği şeklinde gösterilmiştir.

Ortalama TNF alfa düzeyi; Grup 1'de $1,32\pm1,19$ pg/ml iken, Grup 2'de $1,00\pm1,25$ pg/ml, Grup 3'te $1,18\pm0,70$ pg/ml, Grup 4'de ise $1,26\pm0,74$ pg/ml idi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,792$). Şekil 4'te gruplara göre ortalama TNF alfa düzeyleri kutu grafiği şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 3: Gruplara göre ortalama VEGF düzeyleri

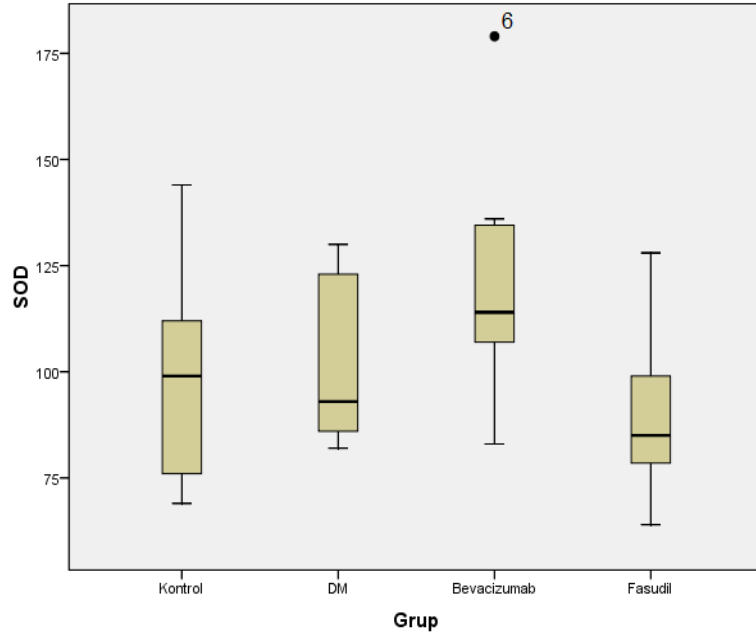


Şekil 4: Gruplara göre ortalama TNF alfa düzeyleri

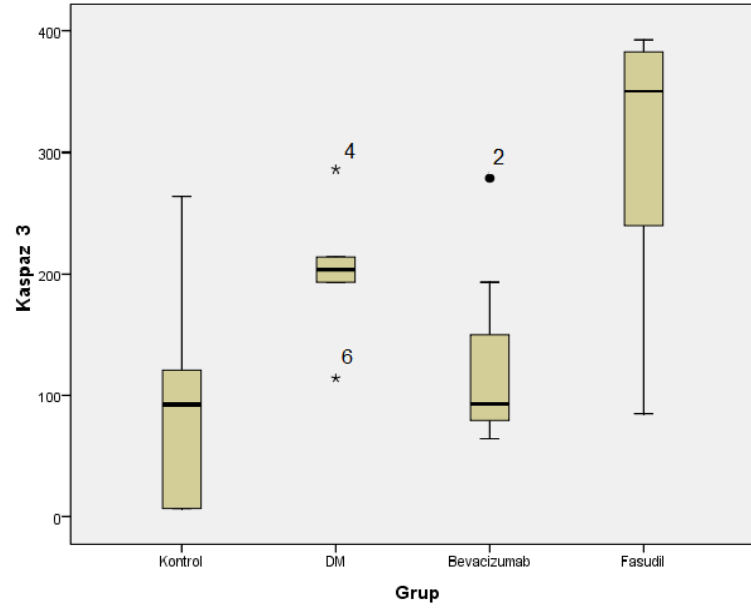
SOD düzeyleri yüzdelik abzorbars olarak değerdendirildi. Ortalama SOD düzeyi; Grup 1'de $99,83 \pm 26,97$, Grup 2'de $101,17 \pm 20,28$, Grup 3'te $122,71 \pm 30,55$, Grup 4'de ise $90,29 \pm 20,73$ olarak belirlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görölmedi ($p=0,135$). Şekil 5'de gruplara göre ortalama SOD abzorbarsları kutu grafiğı şeklinde gösterilmiştir.

Kaspaz 3 düzeyleri yüzdelik abzorbars olarak değerdendirildi. Ortalama kaspaz 3 düzeyi Grup 1'de $97,33 \pm 96,26$ iken, Grup 2'de $202,33 \pm 54,87$, Grup 3'te $127,71 \pm 79,15$, Grup 4'de ise $296,00 \pm 128,87$ olarak belirlendi. Şekil 6'da gruplara göre ortalama kaspaz 3 abzorbarsları kutu grafiğı şeklinde gösterilmiştir.

NF-kB düzeyleri ise hiçbir grupta ölçülebilecek seviyelerde saptanmadı.



Şekil 5: Gruplara göre ortalama SOD abzorbarsları



Şekil 6: Gruplara göre ortalama kaspaz 3 abzorbanları

5 . T A R T I Ŗ M A

DRP, gelişmiş ÷lkelerde körlüğün en önde gelen nedenlerinden biridir. Özellikle toplumun aktif çalışan 20 - 50 yaş arası nüfusunda görme kaybına yol açan bir hastalıktır. Gelişmiş toplumlarda bir yandan diyabetin görülme oranının giderek artması, diğer yandan da modern tedavi yöntemleriyle diyabetlilerde yaşam süresinin uzatılması, DRP ve buna paralel olarak da diyabetik makülopati görülme sıklığını artıran en önemli faktörlerdir.

Diyabetik hastalardaki görme kaybının en önde gelen nedenleri diyabetik makülopati ve PDRP'ye ait komplikasyonlardır. DRP'nin her aşamasında ortaya çıkabilen makülopati, maküla ödemi ve maküla iskemisi olarak iki farklı patolojiyi içerir ve proliferatif olmayan evredeki görme kayıplarının %80'inden sorumludur. Bu nedenle makula ödeminin erken tanı ve tedavisi görme kaybının önlenmesinde oldukça önemlidir.⁶¹

DM hastalarında morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni; koroner, serebral ve periferel damar tutulumu ile karşımıza çıkan aterosklerotik vasküler hastalıklar olup, DM ve buna bağılı komplikasyonlar önemli bir halk sağığı problemini oluşturmaktadır.¹ Diyabet hastalarında makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar gör÷lmekte olup, mikrovasküler komplikasyonlar; diyabetik retinopati, diyabetik nefropati ve nöropati iken, makrovasküler komplikasyonlar ise koroner arter hastalığı, karotis arter hastalığı, periferel arter hastalıkları ve diyabetik ayak şeklinde ortaya çıkmaktadır.⁶²

Hastalığın tanısı konulduktan sonraki ilk 5 yıl içerisinde retinopati görülme olasılığı çok düşük olmakla birlikte, 5 - 10 yıl arasında %27, 10 yılın üzerinde ise %71-90 oranında gör÷lmektedir. Mikroanjyopati ve makroanjyopati gelişiminde en önemli faktör vasküler endotelial fonksiyon bozukluğudur.⁶³

Hastalığın patogeneğinde, hiperglisemi sonrası retina kapillerlerinde gelişen dejenerasyon, endotelde perisit kaybı ve endotel proliferasyonu, bazal membranda

kalınlaşma ve oklüzyon mevcuttur. Hastalığın tanısı biyomikroskopik muayene ile konulabilmekle beraber, FFA, optik koherens tomografi, tanı ve takipte yardımcı olan görüntüleme yöntemleridir. DRP ve komplikasyonlarının gelişiminde, enflamasyon, toksisite, anjiyogenez ve apoptozisin önemli yeri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, diyabette intravitreal uygulanan bevacizumab ve fasudilin, retina ve vitreusta, enflamasyon, toksisite, anjiyogenez ve apoptozis üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

VEGF bilindiği üzere, DRP gelişiminde önemli bir role sahiptir.⁶⁴ Bu rolü de endotel hücrelerinde mitoz, göç, vasküler permeabilite artışı ve kapiller damar oluşumunu artırarak yapar.⁶⁵ Bu nedenle çalışmalar VEGF'in bloke edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bevacizumab, insan anti-VEGF monoklonal antikordur. Bu ilaç fundusta neovaskülarizasyonla seyreden hastalıklarda kullanılmaktadır.⁶⁶ Aynı zamanda fare modellerinde hemanjiyogenezis ve lenfanjiyogenezisin potent bir inhibitörü olduğu görülmüştür.⁶⁷ Diyabetik retina neovaskülarizasyonu ve proliferatif retinopatide bevacizumabın proliferasyonu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.⁶⁸ Bununla beraber DRP'nin tedavisinde bevacizumab uygulanması, progresyonun ilerlemesini durdurabilir. Fakat burada sınırlandırıcı olan durum, yarılanma ömrünün kısa olmasından dolayı en etkili VEGF inhibisyonunun, enjeksiyon yapıldıktan 1 hafta sonra gösterdiği, 2 ay sonra ise etkisinin çok azaldığı gösterilmiştir.⁶⁹ Bundan dolayı neovaskülarizasyonun önlenmesi için tekrarlayan enjeksiyonlar gerekebilmektedir.

Çalışmamızda VEGF düzeyi; bevacizumab yapılan grup ve sağlıklı kontrol grubunda, diyabetli gruba göre anlamlı olarak daha düşük saptandı. Bevacizumabın diyabetlilerde VEGF düzeyini azalttığı görüldü. Bununla ilgili başka çalışmalarda mevcuttur. Arevalo ve ark.'nın³⁰ yaptığı çalışmada diyabete bağlı meydana gelen iskemiye sekonder vitreusa salgılanan VEGF'in vasküler geçirgenliği artırarak anjiogenezise ve maküler ödeme yol açtığı ve bunu önlemek içinde çoklu bevacizumab enjeksiyonların gerekli olduğu belirtilmiştir. Jin Ma MD ve ark.'nın⁶⁹ 54 tane sıçanda STZ ile DM oluşturulduğu bir çalışmada 25mg/ml bevacizumab verilip ELISA ile VEGF düzeyleri bakılmış ve enjeksiyondan 1 hafta ve 1 ay sonra

vitreustaki VEGF düzeylerinin enjeksiyon yapılmadan önceki düzeylere göre daha düşük miktarda olduğu görülmüştür.

Bock ve ark.'nın⁷⁰ yapmış olduğu deneysel kornea neovaskülarizasyon çalışmasında bevacizumabın enflamasyonun indüklediği, anjiyogenezisi anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Kornea iskemisine sekonder oluşan neovaskülarizasyonun tedavisinde bevacizumabın topikal olarak uygulanması gelecekte tedavi protokolü olabileceğini düşünmekteyiz. Manzano ve ark.'nın⁷¹ yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, kimyasal yanık sonrası neovaskülarizasyon oluşturulan 16 ratta topikal uygulanan bevacizumabın korneal neovaskülarizasyonu sınırlandırdığı görülmüştür. Klettner ve ark.'nın⁷² domuz retinal pigment epitel hücre kültüründe yapmış olduğu çalışmada bevacizumab ve ranibizumabın VEGF'i güçlü bir şekilde nötralize ettiği görülmüştür. Ameri ve ark.'nın⁷³ yapmış olduğu başka bir deneysel tavşan çalışmasında ise; intravitreal olarak VEGF verilen tavşanların retinalarında hiperemi, vasküler dilatasyon, tortuosite ve optik disk başında sızıntının olduğu ve 1 hafta içinde neovasküler membranın geliştiği görülmüş ve bu tavşanlara 1. ve 2. gün, 1. hafta intravitreal verilen bevacizumabın, vasküler sızıntı, hiperemi, dilatasyonu azalttığı görülmüştür. Bevacizumab ile VEGF miktarını azaltarak DRP progresyonunun azaltılabileceğini düşünmekteyiz..

Bilindiği üzere diyabette endotel hasarı çok önemlidir. Endotel hasarının oluşması, damar duvarına artan lökosit adezyonu nedeniyle olmaktadır.⁷⁴ Lökositlerin göçü, adezyon molekülleri aracılığıyla olmaktadır. Adezyon molekülleri ICAM1 ve lökosit beta 2 integrinlerdir.⁷⁵ Deneysel diyabet modellerinde bu moleküllerin sentezinin artmış olduğu görülmüştür. Bu moleküllerin blokajı lökosit adezyonunu ve endotelyal hasarını önler.⁷⁶ Aynı zamanda, Fas-Fas ligand (FasL) etkileşimi, lökositin endotele adezyonunu hızlandırır ve bu ise endotel hasarı ve apoptozise yol açar.⁷⁷

ROCK, patolojik vasküler durumlarda önemli rol oynayan enzimdir. Mikrovasküler adezyon moleküllerinin sentez ve fonksiyonunu düzenleyerek lökosit adezyonunda rol oynar.⁷⁸ ROCK, retinal mikrodamarlarda lokalizedir. Bu enzim

ICAM1 sentezini ve MLC fosforilasyonunu uyarır ve adezyonu artırır.⁷⁹ Endotelial nitrik oksit sentazı inhibe ederek anti-apoptotik ve aynı zamanda potent bir vazodilatör olan NO miktarını azaltır. Fasudil, potent bir ROCK inhibitörüdür. Arita ve ark.'nın⁷⁸ yapmış olduğu çalışmada deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlara, vitreus konsantrasyonu 30 mikromol/litre olacak şekilde fasudil verilmiş, vasküler endotelial hasarın ve apoptozisin azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda aynı zamanda fasudilin VEGF üzerine olan etkisini araştırmayı da amaçladık. Fasudil verilen grupta diyabetik grup karşılaştırıldığında, VEGF düzeyi düşmüş olmakla birlikte, bu düşüş bevacizumab uygulanan grup düzeylerinde değildi. Zhu ve ark. akciğer kanser hücre dizisinde yapmış oldukları çalışmada, fasudille tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre hücre proliferasyonu, göç, invazyon ve VEGF'in salınımını azalttığını bulmuşlar.⁸⁰ Kuno ve ark.⁸¹ osteoblast hücre kültüründe fasudilin, ROCK'un TGF-beta aracılığıyla, VEGF sentezini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda, fasudil uygulanan grupta vitreusta ölçülen VEGF düzeylerinin, diyabetli gruptan oldukça düşük olduğunu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığını tespit ettik, burada denek sayımızın az olmasının da göz önünde bulundurulması gereken bir faktör olduğunu düşünüyoruz. Yokota ve ark.⁸² diyabet oluşturulmuş ratlarda, ROCK inhibitörü olan fasudil ve HMG CoA redüktaz inhibitörü fluvastatinin, platelet kaynaklı büyüme faktörü BB aracılı VEGF sentezini engellediğini göstermiş ve böylelikle DR tedavisinde başarılı olabileceğini belirtmişlerdir. Yin ve ark.'nın⁸³ yapmış olduğu başka bir çalışmada ise in vitro olarak insan umbilikal ven endotel hücrelerinde, fasudilin endotel hücre göçü, hareketliliği, formasyonunu azalttığı görülmüş ve antianjiyogenik özelliği olduğu belirtilmiştir. Adachi ve ark.'nın⁸⁴ yaptığı çalışmada osteoblast hücrelerinde prostoglandin E1'in VEGF sentezini stimüle ettiğini ve fasudilin PGE1'i baskılayarak PGE1'e bağlı VEGF sentezini baskıladığı görülmüştür. Nakabayashi ve ark.⁸⁵ başka bir ROCK inhibitörü olan HA1077'nin, gliom hücre dizisinde VEGF gen ve protein sentezini baskıladığı göstermişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlardaki farklılığın bir nedeni de fasudili uyguladığımız doz ve uygulama yöntemimizin diğer çalışmalardan farklı olmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızda fasudili infüzyonla sistemik dolaşıma vermeden direkt intravitreal enjeksiyonla uyguladık ve tekrarlayan enjeksiyonlar yapmaksızın tek bir enjeksiyon sonrası sonuçları değerlendirdik.

Diyabetik retinopatinin tedavisinde ve ilerlemesini önlemede fasudilin VEGF düzeyine olan etkisini anlayabilmek için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

TNF alfa, enflamasyon gelişiminde ve diğer sitokinlerin salınımında önemli bir sitokindir. DRP'de erken enflamatuvar değişikliklerde sinyal molekülü olduğu görülmüştür.⁸⁶ Diyabetik retinada TNF alfanın potansiyel kaynağı, astrositler ve Müller hücreleridir.⁸⁶ Ayrıca DRP'li hastalarda, ekstrasellüler matrix, endotel, damar duvarı fibrovasküler doku ve vitreusta TNF alfa düzeyinin yükseldiği görülmüştür.³³ Demircan ve ark.'nın⁸⁷ yaptığı çalışmada, vitrektomi yapılan 21 PDRP'li hastanın vitreus örnekleri ile sağlıklı kadavralardan elde edilen vitreus örnekleri ELISA metodu kullanılarak karşılaştırılmış TNF alfa ve IL-1'in sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. TNF alfa inhibitörleri verilen çalışmalarda ICAM 1, endotelial nitrik oksit sentaz miktarı ve NF-kB aktivitesinin azaldığı görülmüştür.³⁴ Behl ve ark.'nın⁸⁶ yapmış olduğu deneysel diyabet çalışmasında, TNF alfa inhibitörü verilen gözlerde apoptozla ilişkili olan kaspaz 3 aktivitesinin retinal mikrovasküler hücrelerde anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüş ve diyabetlilerde mikrovasküler hücre ölümünde önemli bir rol oynayabileceği vurgulanmıştır. Çalışmamızda, bevacizumab ve ROCK inhibitörü olan fasudilin, apoptozis ve enflamasyonda önemli rol oynayan TNF alfa düzeylerine etkisini vitreusta değerlendirdik. TNF alfa düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmamasında, ölçüm yaptığımız materyallerin farklı olmasının veya diyabete bağlı enflamasyon ve neovaskülarizasyon süreçlerinin oluşması için 21 günün yeterli olmamasından kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. Arimura ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada,⁸⁸ PDRP'li hastalarda vitrektomiden 1 hafta önce hastaların bir grubuna 1.25mg bevacizumab verilmiş ve vitrektomiden sonra vitreus materyalinde TNF alfa ve VEGF düzeyleri PDRP'li ilaç verilmeyen grupla karşılaştırılmış, VEGF düzeyinde anlamlı bir şekilde azalma tespit edilirken, TNF alfa düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Roh ve ark.'nın⁸⁹ yapmış olduğu çalışmada, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu nedeniyle koroidal neovaskülarizasyon gelişen hastalara bevacizumab verilmiş, bazılarına tekrarlayan dozlar yapılmış ve katarakt ameliyatı yapılan sağlıklı kontrol grubunun

aköz hümmör sıvılarıyla karşılaştırılmış, tekrarlayan doz yapılan gözlerde TNF alfa seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Burada tekrarlayan dozlarla tedavi olan gözlerde VEGF ve TNF alfa düzeylerinin düşük olması nedeniyle, koroidal neovaskülarizasyonda TNF alfanın da önemli rolü olabileceğini vurgulamışlardır.⁸⁹

Jeong ve ark.'nın⁹⁰ çalışmasında, kornea neovaskülarizasyonu olan 15 hastaya subkonjonktival bevacizumab verilmiş, 1. gün, 1. hafta ve 1. ay gözyaşında VEGF, TNF alfa, epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve İL-1 beta bakılmış, bevacizumabın VEGF düzeyini azalttığı fakat diğer faktörleri arttığı görülmüştür. Bu faktörlerin düzeylerinin artmasında kompensatuar mekanizmaların etkili olabileceğini belirtmişlerdir. ROCK inhibitörü olan fasudilin TNF alfa düzeyi üzerine ekisiyle ilgili literatürde yapılmış çalışmalar mevcuttur. İmpellizzeri ve ark.⁹¹ farelere spinal kord travması sonrası 1.hafta ve 6.hafta 10mg/kg i.p. olarak fasudil verip enflamatuvar yanıtı gözledikleri çalışmalarında; tedavi sonrası TNF alfa, NF-kB ve İL-1 düzeylerinin azaldığı tespit etmişlerdir. Biz de diyabette var olan enflamasyon düzeyine fasudilin etkisini araştırmak istedik. Fakat diyabet grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptamadık. Ma ve ark.'nın⁹² insan mezengial hücre kültürü çalışmasında, yüksek glukoz verilen hücre grubunda TNF alfa ve enflamatuvar faktörlerin daha yüksek düzeyde olduğunu, verilen fasudil sonrası TNF alfa düzeyinin azaldığını tespit etmişlerdir. Ding ve ark.'nın⁹³ farelerde yapmış olduğu sepsis çalışmasında, bir gruba sepsis oluşturulmadan 18 saat önce ve 1 saat önce 10 mg/kg fasudil verilmiş ve bu grupta sepsis oluşturulduktan 6 saat sonra bulguların geriye döndüğü, diğer sepsis gruplarına göre TNF alfa düzeyinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada fasudilin enflamasyonun erken dönemlerinde geri dönüşüme neden olması diyabet tedavisinde kullanılması açısından avantajlı olabilir.

DRP, daha çok retinal vasküler patolojilerle karakterize olmasına rağmen görme kaybında, retinal nöral dejenerasyon vasküler patolojilerin önüne geçmiştir.⁹⁴ Diyabete bağlı retinada gelişen nöropatide nöral fonksiyon bozuklukları, retina gangliyon hücrelerinde apoptoziste artma ve retina glial hücrelerde anormal

metabolik değişiklikler gözlenmiştir.⁹⁵ Nöral apopitozisin, kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımlı olmayan iki yolla olduğuna inanılmaktadır. Kaspaz 3, kaspaz bağımlı yolda anahtar rol oynar. Apopitozu indükleyen faktör (AIF) ise kaspazdan bağımsız yolun düzenleyici elemanıdır.^{96,97} Retina gangliyon hücre hasarında hangi yolun daha önemli olduğu bilinmemektedir. Diyabete bağlı nöronal apopitozda retinada gangliyon hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, iç ve dış nükleer tabaka kalınlığı azalmıştır.⁹⁸ Li ve ark.'nın⁹⁴ STZ ile ratlarda diyabet oluşturdukları çalışmalarında, 4 hafta sonra sinir lifi tabakası, gangliyon hücre tabakası ve iç pleksiform tabakada kaspaz 3 düzeylerinin artmış olduğunu tespit etmişlerdir.

Aynı zamanda VEGF inhibitörü olan bevacizumabın kaspaz 3 düzeylerine etkisiyle ilgili yapılan çalışmalar da mevcuttur. Iandiev ve ark.'nın⁹⁹ yapmış olduğu çalışmada domuz gözlerine 1,25 mg intravitreal bevacizumab, kontrol grubuna tuzlu su solüsyonu verilmiş ve elektron mikroskop incelemesinde retina tabakalarında ve kaspaz 3 düzeyinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Sari ve ark.'nın¹⁰⁰ yapmış olduğu çalışmada ise 25 gün arayla 3 doz 1,25 mg bevacizumab verilen gözlerde, kornea ve uvea dokularında toksik yan etki görülmediği ve uveoretinal dokularda apopitotik enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyonunun azaldığı görülmüştür. Bevacizumabın apopitozise olan etki mekanizması bilinmediği için daha çok deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır. ROCK inhibitörü olan fasudilin apopitozis üzerine olan etkisiyle ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur. Park ve ark.'nın¹⁰¹ farelerde siklosporinle böbrek hasarı oluşturup, intraperitoneal olarak fasudil verdikleri çalışmada, enflamatuvar sitokin düzeylerinin ve apopitozisin azaldığı görülmüş ve apopitozisteki azalmanın NF-kB miktarını azaltarak sağladığı düşünölmüştür. Ikeda ve ark.'nın¹⁰² yaptıkları çalışmada karbontetraklorid ile hepatosit hasarı yapılan ratlara ROCK inhibitörü olan HA-1077 verilmiş ve karaciğerdeki histolojik hasarın düzeldiği, Kaspaz 3 ve apopitozisin azaldığı görülmüştür, apopitozisteki azalmanın HA-1077 nin PI3-kinase/Akt yolunu bloke ederek sağladığı düşünölmüştür.

Çalışmamızda bevacizumab ve fasudilin diyabet oluşturulmuş gruplarda kaspaz 3 düzeyleri üzerine etkisini incelemeyi amaçladık ve bunu sağlıklı kontrol

grubu ile karşılaştırdık. Gruplar arasında kaspaz 3 düzeyleri açısından anlamlı fark saptadık ($p=0,013$). Bu fark en belirgin olarak fasudil-kontrol, bevacizumab-fasudil ve bevacizumab-diyabet grupları arasındaydı. Kaspaz 3 düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna en yakın değerlerin bevacizumab grubunda olduğu görüldü. Fasudil grubunda ki yüksek kaspaz 3 düzeyi, uygulama yöntemimizden (infüzyon ile değil intravitreal enjeksiyonla) kaynaklanmış olabilir. Sonuç olarak, fasudilin intravitreal uygulanması, retinada apoptozu belirgin olarak artırmaktadır. Fasudilin uygulama dozu ve uygulama yöntemi ile ilgili ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

DRP'nin major ve minör komplikasyonlarının gelişiminde, yüksek kan glukozuna bağlı oluşan oksidatif stres de önemli rol oynar.¹⁰³ SR'lerin üretimi ve eliminasyonu arasındaki denge çok önemlidir ve fazla üretimi zararlı olabilir. SR'lerin eliminasyonunun azalması hücrede oksidatif strese yol açar.¹⁰⁴ Klinik ve deneysel çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) diyabetin 2 tipinde de arttığını ve diyabetin erken dönem bulgularının oksidatif stresle ilişkili olduğunu göstermişlerdir.¹⁰⁵ Oksidatif stres sonucu ROS ve reaktif nitrojen türleri artar. ROS'un yüklü ve yüklü olmayan türleri vardır. Yüklü olanlar süperoksit ve hidroksil radikalidir. Yüklü olmayanlar ise hidrojen peroksit ve oksijen radikalidir. Diyabette oksidatif stresin kaynağı; glukozun otooksidasyonu, redoks dengesinde kayma, düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerinin (glutatyon, vitamin E) azalması ve antioksidan savunma enzimlerin (SOD ve Katalaz) aktivitelerinin bozulması kaynak olarak gösterilmiştir.¹⁰⁶ Tip 1 diyabette pankreasta yeni başlamış apoptozis ve tip 2 diyabetteki erken insülin direncinde, oksidatif stres kaynağının mitokondride oluşmuş ROS nedeniyle olduğu düşünülmektedir.¹⁰⁷ SOD hücre için önemli bir antioksidan enzimdir. Diyabetin patogeneğinde toksisite de önemli olduğu için çalışmamızda toksisiteyi değerlendirmek için SOD'u kullandık. Çalışmamızda gruplar arasında SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bevacizumabın hücrel toksisiteye yol açıp açmadığı ile ilgili yapılmış çalışmalar literatürde mevcuttur. Thaler ve ark.'nın¹⁰⁸ 25mg/ml ve 125mg/ml gibi yüksek dozda bevacizumab verilen ratlarda, yapmış olduğu çalışmada, enjeksiyondan 2 ay sonra yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede bevacizumabın hücrel değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Arraes ve ark.'nın¹⁰⁹ yaptıkları histolojik çalışmada

tavşanlar 3 gruba ayrılmış ve Grup 1'e 0,1ml dengeli tuz solusyonu, Grup 2'ye 1,25mg / 0,1ml bevacizumab, Grup 3'e 2,5mg/0,1ml bevacizumab verilmiş ve 90 gün sonra tavşanlar enükle edilerek nörosensöryal retina ve RPE incelenmiş, morfolojik olarak tabakalar değerlendirilmiş ve gruplar arasında histolojik ve tabaka kalınlığı olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda bevacizumabın histolojik olarak değişikliklere yol açmaması, güvenli olarak kullanılabileceği yönünde kanaate neden olmuştur. Çalışmamızda intravitreal bevacizumabın SOD düzeyinde sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılığa yol açmadığı için güvenli olduğunu düşünmekteyiz. Litaretürde ROCK inhibitörü olan fasudilin, SOD üzerine etkisiyle ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur. Li ve ark.'nın¹¹⁰ ratlarda intestinal iskemi ve reperfüzyon yoluyla oluşturdukları çalışmada, iskemi oluşturulmadan önce fasudil verilen gruplarda iskemik gruplara göre hasarın anlamlı bir şekilde azaldığı ve SOD aktivitesinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüş ve iskemiyeye bağlı hasarda ROCK'un anahtar rol oynayabileceği düşünülmüştür. Li ve ark.'nın¹¹¹ ratlardaki beyin iskemisi ve reperfüzyonu çalışmasında, fasudilin eNOS ve SOD aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığı, eNOS'u artırarak nörolojik defisit ve enfarkt alanlarını azalttığı, SOD'u artırıp SR'lerin miktarını azaltarak nöroprotektif etkisinin olduğu görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada fasudil verilen grupla diğer gruplar arasında SOD düzeyi arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (p=0,135). Ancak fasudil grubunda bevacizumab grubuna göre SOD düzeyi kontrol grubu değerlerine daha yakın saptandı.

NF-kB; enflamasyon, immün yanıt, proliferasyon ve apoptozisten sorumlu olan çok sayıda genin önemli bir regülatörü olan transkripsiyon faktörüdür. NF-kB diyabete bağlı gelişen retinopatinin erken evrelerinde patogeneizde önemli rol oynar. NF-kB, iNOS ve ICAM üretimlerini regüle eder. Bu proteinlerin inhibisyonu, retinadaki kapillerlerin dejenerasyonunu önler. Deneysel çalışmalarda antioksidanların NF-kB'yi inhibe ederek, diyabetik rat retinalarında kapiller dejenerasyon ve perisit kaybı gelişimini önlediği görülmüştür.⁴⁴ Düşük doz salisilatların NF-kB'yi inhibe ederek, enflamatuvar mediyatörler olan iNOS ve ICAM-1 seviyesini azaltıp kapiller dejenerasyon ve perisit kaybını önlediğine dair çalışmalar mevcuttur.¹¹² Fasudilin NF-kB üzerine olan etkisiyle ilgili çalışmalar

mevcuttur. Wang ve ark.'nın¹¹³ yaptığı çalışmada, deneysel olarak adriyaminle kardiyomiyopati oluşturulan ratlarda, fasudille tedavi edilen grupta bax/bcl-2 protein salınımı ve NF-kB aktivasyonunun azaldığı ve bu şekilde apoptozisi azalttığı görülmüştür. Ma ve ark.'nın¹¹⁴ hiperkolesterolemik ratlarda yapmış olduğu çalışmada, fasudilin antienflamatuvar etki gösterdiği ve bunu da ROCK'un etkisini azaltarak ve enflamatuvar medyatör olan NF-kB'nin translokasyonunu inhibe ederek aktivasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda parametre sayımız fazla olduğundan dolayı, NF-kB'yi sadece vitreusta çalıştık fakat vitreusta NF-kB saptanabilir düzeylerde değildi. NF-kB hücre içi bir molekül olduğu için retinada çalışılırsa sonuç verebileceğini düşünmekteyiz. Suzuki ve ark.'nın¹¹⁵ deneysel üveit çalışmasında, retina, RPE ve koroid kompleksinde NF-kB düzeyi anlamlı sonuç vermiştir. Bevacizumab ve fasudilin NF-kB düzeyine olan etkisini bu nedenle değerlendiremedik.

6 . S O N U Ç

Diyabet bilindiği gibi, hiperglisemiye bağlı özellikle küçük kan damarlarının etkilendiği bir mikroanjiyopatidir. Patogenezinde, endotel hasarına sekonder meydana gelen vasküler sızıntıdan kaynaklanan anjiyogenezis, sitokinlerin neden olduğu enflamasyon, oksidatif strese sekonder oluşan SR'lere bağlı toksisite ve apopitoz önemli yer tutmaktadır. Biz bu çalışmada bevacizumab ve fasudilin DM patogenezine olan etkisini incelemeyi amaçladık. ELISA parametreleri buna göre seçildi. Yaptığımız çalışmada VEGF ve kaspaz 3 seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görüldü. SOD ve TNF alfa açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmedi. VEGF seviyesi en yüksek diyabet grubunda ölçüldü ve bevacizumabın VEGF seviyesini belirgin olarak azalttığı görüldü. Diyabete bağlı maküler ödemin erken ve ileri dönemlerinde intravitreal bevacizumabın VEGF seviyelerini düşürerek progresyonu azaltacağını düşünmekteyiz. Çalışmamızda fasudil verilen grupta vitreustaki VEGF düzeyi, diyabetli gruba göre oldukça düşük olsa da istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu konuda daha fazla sayıda prospektif çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Kaspaz 3 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptadık. Bu fark en belirgin olarak fasudil-kontrol, bevacizumab-fasudil ve bevacizumab-diyabet grupları arasındaydı. Kaspaz 3 düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna en yakın değerler bevacizumab grubunda elde edildi. Fasudil grubundaki yüksekliği ise uyguladığımız fasudil dozu ve uygulama yöntemin buna neden olabileceğini düşünmekteyiz. Daha düşük dozlarla veya intravitreal infüzyon şeklinde verilmesinin farklı sonuçlar verebileceğini düşünüyoruz. Bu konuda daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. SOD düzeyleri olarak gruplar arasında fark görülmemesi, bu ilaçların toksik etkiye yol açmadığını düşündürmektedir. NF-kB düzeyleri ise hiçbir grupta ölçülebilecek seviyelerde saptanmadı. Bazı çalışmalar bevacizumab ve fasudilin TNF alfa seviyesini düşürdüğünü gösterse de bizim çalışmamızda anlamlı bir farklılık görülmedi. Bunun da diyabet süresi ve ayrıca TNF alfanın daha çok neovasküler olaylarla ilişkili

olabileceğinden, çalışma süremizin nispeten kısa olmasından dolayı TNF alfa düzeyleri arasında anlamlı farklılık görülmediğini düşünmekteyiz. Diyabetin patogenezendeki aşamalara etki edeceğini düşündüğümüz fasudil ve bevacizumab için daha çok prospektif çalışmaya ihtiyaç vardır.

ETİK KURUL BELGESİ



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı :B.30.2.ABÜ.0.05.05-050.01.04- 142

09/12/2011

Konu: Kararlar.

Sayın; Yrd. Doç. Dr. Fatih ULAŞ

A.İ.B.Ü Tıp Fakültesi
Göz Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu tarafından **2011/38 no.lu**'' Deneyisel Diabetes Mellitus Modelinde İntravitreal Uygulanan Bevacizumab ve Fasudilin'in SOD, TNF alfa, NFK-B, VEGF, Caspase 3 Düzeylerine Etkisi '' isimli çalışmanız etik olarak uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER
(Başkan)

Prof. Dr. Erol AYAZ
(Üye)

Prof. Dr. Ömer BOZDOĞAN
(Üye)

Prof. Dr. Mehmet YAZICI
(Üye)

Doç. Dr. Azra BOZCAARMUTLU
(Üye)

Doç. Dr. Şerap KÖYBAŞI
ŞANAL
(Üye)

Doç. Dr. Neriman ŞENGÜL
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Handan ESER
(Üye)

Yrd.Doç.Dr. Orçun TOPTAŞ
(Üye)

Av. Gazanfer GÜNLER
(Üye)

Av. Ümmügülsün KARABULUT
(Üye)

Adres : Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu 14280 Gökçöy / BOLU
Telefon : 0374 253 45 68 Fax : 0374 253 45 59

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON BAŞKANLIĞI KARARI



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı

Sayı: B.30.2.ABÜ.0.06.01.00-604 - 914

02.11.11* 11215

Konu: Komisyon kararı

Sayın Yrd.Doç.Dr.Fatih ULAŞ
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
İzzet Baysal Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları AD

01.11.2011 tarihli BAP Komisyon toplantısında alınan 2011-303 nolu karar gereği tarafımızdan önerilen “Deneysel diabetes mellitus modelinde intravitreal uygulanan bevacizumab ve fasudil’in SOD, TNFalfa, NF-kB, VEGF, caspase 3 düzeylerine etkisi.” başlıklı projenin, 22.400,90 TL bütçe ve 13 ay süre ile desteklenmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Proje sözleşmesi imzalamak üzere en kısa sürede Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine gelmeniz gerekmektedir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr.Akçahan GEPDİREMEN
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı

7 . K A Y N A K L A R

1. Kanski JJ. Clinical ophthalmology. 7th ed. China: Elsevier Saunders; 2011:534-51.
2. Müftüoğlu G. Retinanın vasküler hastalıkları. In: Aydın O'Dwyer P, Aydın Akova Y. eds. Temel Göz Hastalıkları. 2nd ed. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2010:537-43.
3. Remington LA. Clinical anatomy and physiology of the visual system. 3rd ed. St. Louis: Elsevier Butterworth Heinemann; 2009:61-92.
4. Moss SE, Klein R, Klein BE. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. Ophthalmology 1994;101:1061-70.
5. Or M. "Türkiye'de 30 Yaş Altı Diyabetik Retinopatinin ve Makulopatinin Prevelansı TDRE (Türkiye Diyabetik Retinopati Epidemiyolojisi) Gurubu Rapor No:2". TOD 36. Ulusal Oftalmoloji Kongresi Özet Kitabı. Ankara, 2002;72.
6. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. JAMA 2002;288:2579-88.
7. Aiello LP, Cavallerano J, Bursell SE. Diabetic eye disease. Endocrinol Metab Clin North Am 1996;25:271-91.
8. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis--a new target for future therapy. Vascul Pharmacol 2006;44:265-74.
9. Karadeniz Ş. Diyabetik Retinopati Epidemiyolojisi ve Patogenezi. In: Atmaca LS, ed. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:10 Tıbbi Retina. 1 ed. İstanbul: Türk Oftalmoloji Derneği; 2009:151-6.
10. Van den Enden MK, Nyengaard JR, Ostrow E, Burgan JH, Williamson JR. Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism. Implications for diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:1675-85.
11. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. Ann Intern Med 1984;101:527-37.
12. Ido Y, Chang KC, Lejeune WS, Bjercke RJ, Reiser KM, Williamson JR, Tilton RG.. Vascular dysfunction induced by AGE is mediated by VEGF via mechanisms involving reactive oxygen species, guanylate cyclase, and protein kinase C. Microcirculation 2001;8:251-63.
13. Chertow B. Advances in diabetes for the millennium: vitamins and oxidant stress in diabetes and its complications. MedGenMed 2004;6:4.
14. Idris I, Donnelly R. Protein kinase C beta inhibition: A novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy. Diab Vasc Dis Res 2006;3:172-8.
15. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. Diabetes Care 2003;26:2653-64.
16. Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. Diabetologia 2008;51:1574-80.
17. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale RL, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N Engl J Med 1994;331:1480-7.
18. Arita R, Hata Y, Ishibashi T. ROCK as a Therapeutic Target of Diabetic Retinopathy. J Ophthalmol 2010;2010:175163.
19. Han Y, Bearse MA, Jr., Schneck ME, Barez S, Jacobsen CH, Adams AJ. Multifocal electroretinogram delays predict sites of subsequent diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45:948-54.
20. Karadeniz S, Kir N, Yilmaz MT, Ongör E, Dinççag N, Başar D, Akarçay K, Satman I, Devrim AS. Alteration of visual function in impaired glucose tolerance. Eur J Ophthalmol 1996;6:59-62.

21. Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:283-90.
22. Juen S, Kieselbach GF. Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1990;108:372-5.
23. Shams N, Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am* 2006;19:335-44.
24. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-41.
25. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8.
26. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6:1677-83.
27. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991;174:1275-8.
28. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112:1035-47.
29. Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL. Electrophysiologic findings after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:270-4.
30. Arevalo JF, Garcia-Amaris RA. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5:39-46.
31. Wu L, Martinez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H, Arevalo JF, Berrocal MH, Farah ME, Maia M, Roca JA, Rodriguez FJ, Pan American Collaborative Retina Group (PACORES). Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:81-7.
32. Roy S, Nasser S, Yee M, Graves DT. A long-term siRNA strategy regulates fibronectin overexpression and improves vascular lesions in retinas of diabetic rats. *Mol Vis* 2011;17:3166-74.
33. Limb GA, Chignell AH, Green W, LeRoy F, Dumonde DC. Distribution of TNF α and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1996;80:168-73.
34. Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, Koizumi K, Döhmen S, Adamis AP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF- α suppression. *FASEB J* 2002;16:438-40.
35. Sfrikakis PP, Markomichelakis N, Theodossiadis GP, Grigoropoulos V, Katsilambros N, Theodossiadis PG. Regression of sight-threatening macular edema in type 2 diabetes following treatment with the anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody infliximab. *Diabetes Care* 2005;28:445-7.
36. Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 2002;51:2241-8.
37. Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jormakka M, Valks DM. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther* 2003;97:223-61.
38. Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 2005;29:489-96.
39. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004;14:231-43.
40. Turk B, Stoka V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS letters* 2007;581:2761-7.
41. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Methods* 1999;17:329-38.

42. Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radic Res* 2003;37:1169-80.
43. Zheng L, Howell SJ, Hatala DA, Huang K, Kern TS. Salicylate-based anti-inflammatory drugs inhibit the early lesion of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2007;56:337-45.
44. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001;50:1938-42.
45. Kowluru RA, Engerman RL, Case GL, Kern TS. Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants. *Neurochem Int* 2001;38:385-90.
46. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680-4.
47. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-45.
48. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990;280:1-8.
49. Dierckx N, Horvath G, van Gils C, Vertommen J, van de Vliet J, De Leeuw I, Manuel-y-Keenoy B. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:999-1008.
50. Hagglof B, Marklund SL, Holmgren G. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983;102:235-9.
51. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
52. Jousen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 2001;158:147-52.
53. Hirayama K, Hata Y, Noda Y, Miura M, Yamanaka I, Shimokawa H, Ishibashi T. The involvement of the rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3896-903.
54. Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:296-302.
55. Kita T, Hata Y, Arita R, Kawahara S, Miura M, Nakao S, Mochizuki Y, Enaida H, Goto Y, Shimokawa H, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17504-9.
56. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Okamoto S, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H. Dose escalation trial of a novel calcium antagonist, AT877, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 1990;107:11-5.
57. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-322.
58. Kawahara S, Hata Y, Kita T, Arita R, Miura M, Nakao S, Mochizuki Y, Enaida H, Kaqimoto T, Goto Y, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Potent inhibition of cicatricial contraction in proliferative vitreoretinal diseases by statins. *Diabetes* 2008;57:2784-93.
59. Okamura N, Saito M, Mori A, Sakamoto K, Kametaka S, Nakahara T, Ishii K. Vasodilator effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on retinal arterioles in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:207-12.
60. Lingor P, Teusch N, Schwarz K, Mueller R, Mack H, Bahr M, Mueller BK. Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem* 2007;103:181-9.
61. Şehirbay Ö, Akar S. Diabetik retinopati. İstanbul: Dilek Ofset; 1999.
62. Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am J Health Syst Pharm* 2004;61:160-73; quiz 175-6.

63. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997;34:55-68.
64. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
65. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-50.
66. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-72 e5.
67. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:859-70.
68. Minnella AM, Savastano CM, Ziccardi L, Scupola A, Falsini B, Balestrazzi E. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2008;86:683-7.
69. Ma J, Zhu T, Tang X, Ye P, Zhang Z. Effect of an intravitreal injection of bevacizumab on the expression of VEGF and CD34 in the retina of diabetic rats. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38:875-84.
70. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2545-52.
71. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chevez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007;91:804-7.
72. Klettner A, Roeder J. Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4523-7.
73. Ameri H, Chader GJ, Kim JG, Sadda SR, Rao NA, Humayun MS. The effects of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular membrane and normal capillaries in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5708-15.
74. Schroder S, Palinski W, Schmid-Schonbein GW. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 1991;139:81-100.
75. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989;83:2008-17.
76. Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, Fujita K, Aiello LP, Luscinskas FW, Adamis AP. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1153-8.
77. Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. *FASEB journal* 2003;17:76-8.
78. Arita R, Hata Y, Nakao S, Kita T, Miura M, Kawahara S, Zandi S, Almulki L, Tayyari F, Shimokawa H, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* 2009;58:215-26.
79. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273:245-8.
80. Zhu F, Zhang Z, Wu G, Li Z, Zhang R, Ren J, Nonq L. Rho kinase inhibitor fasudil suppresses migration and invasion through down-regulating the expression of VEGF in lung cancer cell line A549. *Med Oncol* 2011;28:565-71.
81. Kuno M, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani J, Otsuka T, Harada A, Adachi S, Kozawa O, Tokuda H. Rho-kinase inhibitors decrease TGF-beta-stimulated VEGF synthesis

through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *Biochem Pharmacol*. 2009;77:196-203.

82. Yokota T, Utsunomiya K, Taniguchi K, Gojo A, Kurata H, Tajima N. Involvement of the Rho/Rho kinase signaling pathway in platelet-derived growth factor BB-induced vascular endothelial growth factor expression in diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:424-30.

83. Yin L, Morishige K, Takahashi T, Hashimoto K, Oqata S, Tsutsumi S, Takata K, Ohta T, Kawaqoe J, Takahashi K, Kurachi H. Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1517-25.

84. Adachi S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E(1)-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;90:1-6.

85. Nakabayashi H, Shimizu K. HA1077, a Rho kinase inhibitor, suppresses glioma-induced angiogenesis by targeting the Rho-ROCK and the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signal pathways. *Cancer Sci* 2011;102:393-9.

86. Behl Y, Krothapalli P, Desta T, DiPiazza A, Roy S, Graves DT. Diabetes-enhanced tumor necrosis factor- α production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2008;172:1411-8.

87. Demircan N, Safran BG, Soyulu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2006;20:1366-9.

88. Arimura N, Otsuka H, Yamakiri K, Sonoda Y, Nakao S, Noda Y, Hashiquchi T, Maruyama I, Sakamoto T. Vitreous mediators after intravitreal bevacizumab or triamcinolone acetonide in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2009;116:921-6.

89. Roh MI, Kim HS, Song JH, Lim JB, Koh HJ, Kwon OW. Concentration of cytokines in the aqueous humor of patients with naive, recurrent and regressed CNV associated with amd after bevacizumab treatment. *Retina* 2009;29:523-9.

90. Jeong JH, Chun YS, Kim ES, Kim JC. Compensatory growth factor and cytokine response in tears after subconjunctival bevacizumab injection. *Cornea* 2011;30:1071-7.

91. Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Esposito E, Cuzzocrea S. Effect of Fasudil, a selective inhibitor of Rho Kinase activity, in the secondary injury associated with the experimental model of spinal cord trauma. *J Pharmacol Exp Ther* 2012.

92. Ma DW, Wang QY, Ma XY, Li J, Guan QH, Fu Y. [The effect of fasudil via Rho/ROCK signaling pathway on the inflammation and fibrosis in human mesangial cells in high glucose medium]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2011;50:580-4.

93. Ding RY, Zhao DM, Zhang ZD, Guo RX, Ma XC. Pretreatment of Rho kinase inhibitor inhibits systemic inflammation and prevents endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Surg Res*. 2011;171:e209-14.

94. Li YH, Zhuo YH, Lü L, Chen LY, Huang XH, Zhang JL, Li SY, Wang XG. Caspase-dependent retinal ganglion cell apoptosis in the rat model of acute diabetes. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:2566-71.

95. Fletcher EL, Phipps JA, Wilkinson-Berka JL. Dysfunction of retinal neurons and glia during diabetes. *Clin Exp Optom* 2005;88:132-45.

96. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002;9:1031-42.

97. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002;192:131-7.

98. Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 2003;46:1260-8.

99. Iandiev I, Francke M, Makarov F, Hollborn M, Uhlmann S, Wurm A, Sawinow A, Kohen L, Reichenbach A, Wiedemann P, Pannicke T, Bringmann A. Effects of intravitreal bevacizumab (Avastin) on the porcine retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:1821-9.
100. Sari A, Adiguzel U, Canacankatan N, Yilmaz N, Dinc E, Oz O. Effects of intravitreal bevacizumab in repeated doses: an experimental study. *Retina* 2009;29:1346-55.
101. Park JW, Park CH, Kim IJ, Bae EH, Ma SK, Lee JU, Kim SW. Rho kinase inhibition by fasudil attenuates cyclosporine-induced kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338:271-9.
102. Ikeda H, Kume Y, Tejima K, Tomiya T, Nishikawa T, Watanabe N, Ohtomo N, Arai M, Arai C, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y. Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G911-7.
103. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2012;12:5-18.
104. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
105. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17:189-212.
106. Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, Pugazhenth S, Reusch J, Kench J. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:43-54.
107. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000;17:171-80.
108. Thaler S, Fiedorowicz M, Choragiewicz TJ, Bolz S, Tura A, Henke-Fahle S, Yoeruek E, Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F, Schuettauf F. Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage. *Acta Ophthalmol* 2010;88:e170-6.
109. Arraes JC, Tedesco RC, Arraes TA, Silva EB, Ventura A, Avila MP. Intravitreal bevacizumab in pigmented rabbit eyes: histological analysis 90 days after injection. *Arq Bras Oftalmol* 2009;72:656-60.
110. Li Y, Yao JH, Hu XW, Fan Z, Huang L, Jing HR, Liu KX, Tian XF. Inhibition of Rho kinase by fasudil hydrochloride attenuates lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2011;88:104-9.
111. Li Q, Huang XJ, He W, Ding J, Jia JT, Fu G, Wang HX, Guo LJ. Neuroprotective potential of fasudil mesylate in brain ischemia-reperfusion injury of rats. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:169-80.
112. Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, Dralands L, Missotten L, Geboes K. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 2001;132:551-6.
113. Wang N, Guan P, Zhang JP, Chang YZ, Gu LJ, Hao FK, Shi ZH, Wang FY, Chu L. Preventive effects of fasudil on adriamycin-induced cardiomyopathy: possible involvement of inhibition of RhoA/ROCK pathway. *Food Chem Toxicol* 2011;49:2975-82.
114. Ma Z, Zhang J, Du R, Ji E, Chu L. Rho kinase inhibition by fasudil has anti-inflammatory effects in hypercholesterolemic rats. *Biol Pharm Bull* 2011;34:1684-9.
115. Suzuki M, Noda K, Kubota S, Hirasawa M, Ozawa Y, Tsubota K, Mizuki N, Ishida S. Eicosapentaenoic acid suppresses ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis* 2010;16:1382-8.

