

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

**DENEYSEL DİYABETİK RAT MODELİNDE RETİNAL
DOKUDA NEFERİN'İN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehmet ÇEVİK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Orhan AYDEMİR

ELAZIĞ

2020

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Mehmet YALNIZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Fatma Ülkü ÇELİKER

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Orhan AYDEMİR _____ Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan, deneyim ve desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Sn. Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Sn. Dr. Öğr. Üy. Mehmet BALBABA, Sn. Dr. Öğr. Üy. Onur ÇATAK ve Sn. Dr. Öğr. Üy. Hakan YILDIRIM başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalışmama katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Orhan AYDEMİR'e ve beraber çalıştığımız Sn. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU, Sn. Prof. Dr. Nevin İLHAN, Sn. Dr. Öğr. Üy. İlknur ÇALIK'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim boyunca beraber çok şey paylaştığımız, beraberce uzmanlık eğitimi almaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma, işbirlikleri ve her daim verdikleri destekten ötürü kliniğimiz hemşire, sekreter ve personellerine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, yanımda olan, hedeflerime ulaşmamda fedakârlık ve sabır gösteren aileme sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Diyabetes Mellitus komplikasyonlarından biri Diyabetik retinopatidir. Diyabetin retinopati patofizyolojisinde; oksidatif stres, apoptozis, kontrolsüz vasküler proliferasyon bulunmaktadır.

Çalışmamızın amacı; streptozotosinle (STZ) diyabet oluşturulmuş ratların retinalarında Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Proliferatif Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) immün reaktivitelerini, apoptozisi, oksidatif stres düzeylerini incelemek ve Neferin'in etkisini araştırmaktır.

Çalışmada 35 adet, 8-10 haftalık Sprague Dawley cinsi erkek ratlar her grupta 7'şer tane olacak şekilde rastgele beş gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (grup I) 4 haftalık deney süresince bir uygulama yapılmadı. Sham grubuna (grup II) deney başlangıcında 60 mg/kg tek doz STZ ve deney süresince her gün 0,25ml/kg %0,9 normal salin intraperitoneal uygulandı. Neferin grubuna (grup III) deney süresince her gün 4 mg/kg Neferin intraperitoneal uygulandı. Grup IV ve V'e deney başlangıcında 60 mg/kg tek doz STZ intraperitoneal uygulandı. Diyabet+Bevacizumab grubuna (grup IV) tek seferlik 0,01mL (2,5 mg/kg) Bevacizumab ve her gün 0,25ml/kg %0,9 normal salin intraperitoneal uygulandı. Diyabet+Neferin grubuna (grup V) her gün intraperitoneal 4mg/kg Neferin uygulandı. Deney sonunda dekapitasyon yapıp, enükleasyon yapıldı. Serumda, göz doku homojenatında Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) düzeyleri Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELİSA) yöntemiyle değerlendirildi. PCNA, VEGF için immünohistokimyasal boyama yapıldı ve TUNEL yöntemiyle apoptozise giden hücreler belirlendi.

Diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, Diyabet+Neferin grubunda TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artma görülürken; TOS, VEGF düzeylerinde ve apoptotik hücrelerde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.05$), PCNA düzeylerinde anlamlı değişiklik görülmedi.

Çalışmamızda diyabetin retina dokusunda TAS'ı azalttığı, TOS ve apoptotik hücreleri, VEGF ve PCNA immünreaktivitelerini arttırdığı, Neferin'in PCNA dışındaki parametreleri tersi yönde değiştirdiği görüldü. Sonuç olarak Neferin'in diyabetin etkilerini azaltabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik retinopati, Rat, Neferin, PCNA, VEGF

ABSTRACT

THE EFFECT OF NEFERINE ON RETINAL TISSUE IN EXPERIMENTAL DIABETIC RAT MODEL

Diabetic retinopathy is a complications of diabetes mellitus and oxidative stress, apoptosis, uncontrolled vascular proliferation causes this condition.

Aims of our study are to investigate the levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunoreactivities, apoptosis, oxidative stress levels in rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes and the effect of Neferine.

In this study, 8-10 weeks-old Sprague Dawley male rats used (n=35). Diabetes induced with single-dose 60mg/kg STZ intraperitoneal (IP) injection in diabetes groups. The control group got no treatment. Diabetes-Sham group received 0.25ml/kg 0.9% saline via IP injection daily. Neferine-treatment group received 4mg/kg Neferine via IP injection daily. Diabetes+Bevacizumab group received single dose 2.5mg/kg Bevacizumab and daily 0.25ml / kg 0.9% normal saline via IP injection. Diabetes+Neferine group received 4mg/kg Neferine via IP injection daily.

Diabetes+Neferine group have shown significant increase in Total Antioxidant Status (TAS) and a significant decrease in Total Oxidant Status (TOS) in serum and eye tissue homogenate with ELISA. VEGF levels and number of apoptotic cells significant decrease compared to diabetes group ($p<0.05$) and There was no significant change in PCNA levels with immunohistochemistry staining.

In our study, we observed that diabetes reduced TAS levels; increased TOS levels, number of apoptotic cells, and VEGF, and PCNA immunoreactivity in retinal tissue. It was also observed that Neferine changed these parameters in the opposite direction except PCNA. Based on our study, we concluded that Neferine could reduce the effect of diabetes.

Key Words: Diabetic retinopathy, Rat, Neferine, PCNA, VEGF.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Retinanın Anatomik ve Histolojik Yapısı	1
1.1.1. Retinanın Topografik Anatomisi	1
1.1.2. Retinanın Histolojik Katları	2
1.1.3. Retinanın Hücresel Yapısı	5
1.1.4. Retinanın Kanlanması	6
1.1.5. Kan- Retina Bariyeri	7
1.2. Diyabetes Mellitus	7
1.3. Diyabetik Retinopati	8
1.3.1. Epidemiyoloji	8
1.3.2. Risk Faktörleri	9
1.3.3. Patogenez ve Klinik Bulgular	10
1.3.4. Sınıflandırma ve Komplikasyonlar	13
1.3.4.1. Nonproliferatif Diyabetik Retinopati (NPDR)	13
1.3.4.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR)	14
1.3.4.3. Diyabetik Makülopati	14
1.3.5. Diyabetik Retinopati Tedavisi	15
1.4. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	17
1.4.1. Bevacizumab	18
1.4.2. Diyabetik Retinopati ve VEGF	20
1.5. Apoptozis	21

1.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	22
1.6.1. Diyabet ve Oksidatif Stres	23
1.6.2. Total Oksidatif Stres (TOS)	25
1.6.3. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)	25
1.6.4. Antioksidanlar	26
1.7. Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)	27
1.8. Neferin	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	32
2.2. Diyabet İndüksiyonu	32
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	32
2.4. Örneklerin Alınması	33
2.5. Biyokimyasal Çalışma	34
2.5.1. Kan glikoz düzeyleri	34
2.5.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Seviyesi Ölçümleri	34
2.5.2.1. TAS Ölçümü	34
2.5.2.2. TOS Ölçümü	35
2.6. Histolojik Çalışma	35
2.7. İmmünohistokimya	36
2.8. TUNEL Metodu	37
2.9. İstatistiksel Analiz	38
3. BULGULAR	39
3.1. Klinik Bulgular	39
3.2. Biyokimyasal Bulgular	39
3.2.1. Kan glikoz miktarları	39
3.2.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Düzeyleri	41
3.2.2.1. TAS Düzeyleri	41
3.2.2.2. TOS Düzeyleri	42
3.3. TUNEL Bulgular	43
3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	46
3.4.1. VEGF İmmünreaktivitesi	46

3.4.2. PCNA İmmünreaktivitesi	50
4. TARTIŞMA	54
5. KAYNAKLAR	62
6. ÖZGEÇMİŞ	72



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Histolojik takip serileri	35
Tablo 2. TUNEL boyama prosedürü.	38



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Diyabetik retinopati ve oksidatif stres mekanizması	24
Şekil 2.	Poliol yolu aktivasyonu	25
Şekil 3.	Neferin'in kimyasal yapısı	29
Şekil 4.	Neferin'in Antianjiogenezde etki mekanizması	31
Şekil 5.	Deney hayvanlarının başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları (gr).	39
Şekil 6.	Deney hayvanlarının başlangıç ve deney sonu (4. hafta) kan glukoz miktarları (mg/dl).	40
Şekil 7.	Serum ve göz doku homojenatı TAS düzeyleri.	41
Şekil 8.	Serum ve göz doku homojenatı TOS düzeyleri.	42
Şekil 9.	Kontrol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	43
Şekil 10.	Sham (DM) grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	44
Şekil 11.	Neferin grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	44
Şekil 12.	DM+Bevacizumab grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	45
Şekil 13.	DM+Neferin grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.	45
Şekil 14.	Apoptotik İndeks.	46
Şekil 15.	Kontrol grubuna ait H&E boyalı kesit üzerinde retina tabakaları.	47
Şekil 16.	Kontrol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.	47
Şekil 17.	Sham grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.	48
Şekil 18.	Neferin grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.	48
Şekil 19.	DM+ Bevacizumab grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.	49
Şekil 20.	DM+ Neferin grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.	49
Şekil 21.	VEGF Histoskoru.	50
Şekil 22.	Kontrol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.	51
Şekil 23.	Sham grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.	51
Şekil 24.	Neferin grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.	52
Şekil 25.	DM+ Bevacizumab grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.	52
Şekil 26.	DM+ Neferin grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.	53
Şekil 27.	PCNA Histoskoru.	53

KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	: Etil benzatiazolin sulfonik asit
AGE	: Advanced Glycolisylation Endproducts (İleri glikolizasyon ürünleri)
ADP	: Adenin dinükleotid fosfat
ADPR	: ADP riboz
AMP	: Adenozin monofosfat
Ca	: Kalsiyum
DAG	: Diaçilgliserol
DM	: Diyabetes Mellitus
DMÖ	: Diyabetik maküla ödemi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Diyabetik retinopati
DRS	: Diabetic Rethinopathy Study
DRVS	: Diabetic Rethinopathy Vitrectomy Study
EPO	: Eritropoetin
ETDRS	: Early Treatment Diabetic Rethinopathy Study
FDA	: Food and Drug Administration
FFA	: Fundus flöresein anjiyografi
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast büyüme faktörü)
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
G6PD	: Glikoz- 6- Fosfat Dehidrogenaz
GSH	: Glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HIF-1	: Hypoxia inducible factor (Hipoksinin indüklediği faktör)
IGF	: İnsülin like Growth Factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü)
IL	: İnterlökin
ILM	: İç limitan membran
İRMA	: İntraretinal mikrovasküler anomaliler
KAMÖ	: Klinik olarak anlamlı maküla ödemi
MDA	: Malondialdehit

MMP	: Matriks metalloproteinaz
MT	: Metallothionein
NAD	: Nikotinamid dinükleotid
NO	: Nitrik oksit
NPDR	: Non- proliferatif diyabetik retinopati
OCT	: Optical Cohorens Tomography
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PARP	: ADP riboz polimeraz
PCNA	: Proliferatif hücre nükleer antijeni
PDGF	: Plasental Derivated Growth Factor
PDR	: Proliferatif diyabetik retinopati
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PTH	: Paratiroid hormon
PVR	: Proliferatif vitreoretinopati
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
RPE	: Retina pigment epiteli
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
STZ	: Streptozotosin
TAS	: Total antioksidan kapasitesi
TF	: Tissue Factor (Doku faktörü)
TGF-β	: Transforming Growth Factor β
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü α
TOS	: Total oksidatif stres
VEGF	:Vascular endothelial growth factor
VEGFR	: VEGF reseptörü
YBMD	: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu

1. GİRİŞ

1.1. Retinanın Anatomik ve Histolojik Yapısı

1.1.1. Retinanın Topografik Anatomisi

Retina, gözün sinir tabakası olup, globun arka dörtte üçlük iç yüzeyini örten saydam bir tabakadır. Retinanın en kalın bölgesi optik sinirle birleştiği yerdir. Kalınlığı fovea kenarında 0,25 mm, optik disk yakınında 0,56 mm, ekvatorunda 0,18 mm ve ora serratada 0,11 mm'dir. En ince olduğu yer olan foveadaki kalınlığı 0,1 mm'dir. Retinal yüzey alanının 1206 mm² olduğu hesap edilmektedir. Retinanın iç yüzeyi vitreusla, dış yüzeyi koroidin Bruch zarıyla temas halindedir.

Retina, embriyolojik olarak nöroektodermden köken alan iki tabakadan oluşur. Bunlardan dıştaki pigment epiteli katı, içteki ise duysal retinadır. Retinanın sensöryel kısmı optik sinirden siliyer cismin arkasına kadar uzanır. Nörosensöryel retina, görme yollarının üç önemli hücresi olan bipolar hücreler, fotoreseptör hücreler ve gangliyon hücrelerini içerir. Retina pigment epiteli (RPE) tabakası, altındaki koroid tabakasına yapışmış tek sıra altıgen şekilli hücrelerden oluşur. Potansiyel bir boşluk olan subretinal aralık iki tabaka arasında bulunur. Nörosensöryel tabaka önde siliyer cismin pigmentli epitel hücrelerine, RPE tabakası ise siliyer cismin pigmentli epitel hücrelerine dönüşerek sonlanır. Retinanın sinir tabakasının bittiği ön kısmına ora serrata denir. Retina, pigment epiteline ora serratada ve optik diskte sıkı yapışıklık gösterir.

Fovea (sarı nokta, maküla lutea), arka kutbun merkezinde 1,5 mm çapındaki alandır. Optik sinir başı merkezinin 4 mm temporalinde ve 0,8 mm aşağısında yer alır. Foveada ikinci ve üçüncü nöronların kenara doğru itilmesine bağlı olarak 22 derecelik klivus adlı bir çukurluk meydana gelir. Fovea, keskin ve renkli görmeyi sağlayan bir hücresel yapıya sahiptir. Fovea üzerinde kan damarları, rod ve mavi koni hücreleri bulunmaz; kırmızı ve yeşil koni konsantrasyonu ise en üst düzeydedir. Bu bölgedeki koniler retina yüzeyine dik, birbirine paralel bir şekilde dizilmişlerdir. Foveada ışık dağılımını azaltmak amacıyla iç nükleer kat, iç pleksiform kat, sinir lifi katları ve gangliyon hücreleri bulunmaz. Sinir lifi tabakasının en kalın olduğu yer, foveanın nazalindeki papillomaküler demettir.

Foveola, merkezi fovea çöküntüsüdür ve kapiller damarları içermez. 0,4 mm'lik fovea damarsız bölgesi koryokapilları beslenir. Santral koni demetini çevreleyen foveola, 150 µm kalınlık ve 350 µm çapındadır.

Foveal alanı çevreleyen 0,5 mm genişliğindeki halkaya *parafovea* denir. Gangliyon hücresi, iç nükleer ve dış pleksiform tabakalarının en kalın olduğu bölümdür. Dış pleksiform katı Henle tabakasını bu bölgede oluşturur. *Henle tabakası*, parafoveolar bölgeden foveanın kenarına kadar paralel seyreden fotoreseptör liflerinin oluşturduğu yapıdır. Parafovea bölgesinde rodler görülmeye başlar.

Parafoveyı çevreleyen, foveanın en dış kısmındaki 1,5 mm'lik halkasal alan *perifovea* bölgesidir. Gangliyon hücre tabakası tek sıraya düştüğünde sonlanır ve rod hücrelerinin yoğunluğu bu bölgede artar. Bu bölgeden sonra 3 mm genişliğindeki *orta çevresel alan* başlar.

İki temporal retina arteri arasında bulunan 5,5 mm çaplı alana *maküla* (arka kutup, merkezi alan) denilmektedir. Retinanın sadece bu bölümünde birden fazla gangliyon hücre tabakası bulunur. Maküla sarı rengini, dış nükleer kattan içe doğru retina katlarında bulunan *ksantofil* isimli karotenoid pigmentinden alır. Ksantofil pigmenti foveadaki kromatik sapmayı önler, toksik olan mavi ışığı emer ve reaktif oksijen türlerini baskılar.

Fovea çapı (1,5 mm) + 2 x parafovea kalınlığı (2x0,5 mm) + 2 x perifovea kalınlığı (2x1,5 mm) = makula çapını oluşturur (5,5 mm).

Uzak çevresel alan, orta çevresel alandan temporalde 10 mm'ye, nazalde 16 mm'ye kadar uzanır, ardından ora serrata başlar. Dış limitan membran öne doğru ilerleyerek pigmentsiz ve pigmentli siliyer epiteli birbirinden ayırır. Vitreus tabanının olduğu 4 mm'lik bölgede iç limitan membran kalınlaşır. Foveadan sonra retinanın en ince olduğu bölge *Ora serrata*dır. Limbustan uzaklığı temporalde 7 mm, nazalde 6 mm'dir (1).

1.1.2. Retinanın Histolojik Katları

Retina, ışık mikroskopunda laminer yapıda izlenir, histolojik olarak dıştan içe doğru on kattan oluşur:

1. 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. Gangliyon hücreleri katı
9. Sinir lifi katı
10. İç limitan membran (İLM)

Retina pigment epiteli; altıgen şekilli, nöroektodermal kökenli, koroidin Bruch zarına yapışık tek sıra küboidal hücre tabakasıdır. Optik disk kenarından ora serrataya uzanır ve siliyer cismin pigmentli epiteli ile devamlılık gösterir. Hücre membranları apikal bölgede *zonula okludens*, bazal bölgede *zonula adherens* tipi bağlantılar kurarlar. Hücreler arasındaki bağlantıların sıkı olması, retina damarlarıyla birlikte pigment epitelinin ikinci kan-retina bariyerini oluşturmasını sağlar. Sıkı bağlantılar, okludin ve klaudin gibi spesifik proteinlerden oluşmakta ve bariyer fonksiyonunun devamlılığını sağlamaktadır. Hücrelerin apikal kısmındaki villöz çıkıntılar, fotoreseptör hücrelerinin dış kısımlarını sarar ve aralarında bağlantı bulunmaz. RPE hücrelerinin bazal membranlarında bikarbonat-klorid pompası, apikal yüzeylerinde aktif sodyum-potasyum (Na-K^+) pompası bulunur ve negatif basıncın korunmasını sağlarlar. RPE hücrelerinde lipofuskin pigmenti ve melanin granülleri bulunur. *Melanin* serbest radikal stabilizatörü bir ajandır ve retinotoksik maddeleri de tutar. *Lipofuskin* fotoreseptör dış segmentlerinin tamamlanmamış fagositoz artığı olarak değerlendirilmektedir.

Retina pigment epitelinin işlevleri; subretinal alandan sıvı transportu, A vitamini depolanması ve salınımı, fotoreseptör hücrelerinin dış segmentlerinin fagositozu, dağılan ışığın absorpsiyonu, interfotoreseptör matriks sentezi ve hücre içine girip çıkacak olan materyallerin aktif geçişinin sağlanmasıdır. Ayrıca kan-retina bariyerini oluşturur, toksik ve oksidatif hasara karşı koruyucu görevi vardır (2).

Bruch membranı, 7 μ kalınlığında kollajen yapıda, koryokapillaris tabakasını retina pigment epitelinden ayıran koryokapillarisin bazal membranıdır.

Gözün kırıcı ortamları tarafından yönlendirilen görüntüyü nöral sinyallere dönüştürerek görme olayını başlatan hücreler, fotoreseptör hücreleridir. Basiller (rodlar) ve koniler olmak üzere iki tip fotoreseptör hücresi vardır. Rodların sayısı 110-125 milyon, konilerin sayısı ise 6,3-7 milyondur. Optik diskte rod ve koni yoktur, bu nedenle ışığa duyarsızdır.

Dış limitan membranda fotoreseptörlerin Müller hücreleriyle yaptığı bağlantılar bulunur, gerçek bir zar değildir. Optik diskin kenarında fotoreseptör dış segmentleriyle birlikte sonlanır.

Dış nükleer katta rod ve konilerin hücre gövdeleri bulunur. Çevresel retinal alanlarda bu katın çekirdek sayısı ve kalınlığı azalır.

Dış pleksiform tabaka rod ve koni hücrelerinin uzantıları, horizontal hücreler ve bipolar hücreler arasındaki sinapslardan oluşmaktadır. Retinanın birinci ve ikinci sıra nöronlarının sinaps yaptığı bölgedir. Işık mikroskopunda sinaptik yoğunluklar olarak görülen ve *orta sınırlayıcı zar* da denilen yapı, retina tarafından uzanan damarların uç sınırını oluşturur. Retinal dolaşımın sınırında kalan gevşek yapıdaki bu bölgede eksuda ve hemorajiler, kistik oluşumlar birikme eğilimindedir.

İç nükleer katta horizontal, amakrin, bipolar, interpleksiform hücreler ve Müller hücrelerinin çekirdekleri yer alır. Foveada bu tabaka yoktur.

İç pleksiform tabakada gangliyon ve bipolar hücreleri sinaps yapar. Retinanın ikinci ve üçüncü sıra nöronlarının sinaptik bağlantı bölgesidir, retinal kan damarlarını içerir, foveolada bulunmaz.

Gangliyon hücre katı, maküla bölgesinde sekiz kat, çevresel retinada tek kat hücre çekirdeği bulundurulur. Bu tabaka foveolada kaybolur (3).

Korpus genikulatum lateralede sonlanan gangliyon hücre aksonları, optik diske uzanarak *sinir lifi tabakasını* (stratum optikum) oluştururlar. Normalde bu lifler lamina kribrozaya uzanmaya kadar miyelin içermez ve aralarında glia hücresi bulunmaz. Bu tabakada bulunan mikroglia, astrosit ve oligodendrositler retinanın arter, ven ve kapillerleri çevresinde kümelenmişlerdir. Sinir lifi katı optik diskin üst ve alt temporal kenarlarında kalındır.

İç limitan membran (İLM), Müller hücrelerinin bazal zarından oluşmaktadır. Retinadaki tek gerçek bazal membran yapısıdır. Nöral retina ile vitreus arasında difüzyon bariyeri oluşturur. Fovea da dahil tüm retinal yüzeyi örter; önde siliyer epitel

üzerinde, arkada optik disk kenarında sonlanır. İçeriğinde fibronektin, laminin, tip I ve tip IV kollajen bulunmaktadır.

1.1.3. Retinanın Hücresel Yapısı

Retinada yaklaşık 1 milyon gangliyon hücresi bulunur ve her gangliyon hücresi başına 100 fotoreseptör hücresi düşer. Foveada koniler en yüksek konsantrasyondadır, rodlar ise bulunmaz. Koni pigmentleri ışık spektrumunun 531 nm (yeşil), 419 nm (mavi), 558 nm (kırmızı) dalga boylarındaki fotonları maksimum düzeyde absorbe ederler. Her üç koninin eşit oranda uyarılması beyaz ışık olarak algılanır.

Basiller karanlıkta görmeden ve siyah/beyaz görüntü algılamadan, Koniler aydınlıkta renk ayırımından ve keskin görmeden sorumludurlar. Rodların fotosensitif olan dış kısmı *rodopsin* proteinini içerirken, koniler *iyodopsin* içerir. Fotoreseptör hücrelerinin dış segmentleri görme pigmenti içeren diskleri taşıyan kısımdır, mukopolisakkarid yapıda bir örtüyle kaplıdır ve retina pigment epiteliyle temas halindedir. Fotoreseptörlerin iç segmentleri, dış segmentlere metabolik destek sağlamaktadır. İç segment ile dış segment arasındaki bağlantıya silyum denir. İç segment *elipsoid* ve *miyoid* bölümlerden oluşmaktadır, hücre içi organellerin yerleştiği bölgedir. Elipsoid bölüm dış segmente yakındır ve mitokondri içerir, miyoid bölüm ise hücre gövdesinin yakınında golgi kompleksi, ribozom, vezikül ve vakuoller içermektedir. Protein sentezi miyoid bölümünde gerçekleşir. İç lif rodlarda *sferül*, konilerde *pedikül* adlı sinaptik genişlemelerle sonlanır ve bipolar hücrelerin dendritleriyle sinaps yapmalarını sağlar. Fotoreseptörler nörotransmitter olarak *glutamat* kullanırlar (4).

Bipolar hücreler, aksonları iç pleksiform tabakada gangliyon ve amakrin hücreleriyle, dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basillerle sinaps yapan hücrelerdir.

Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir. Dendritleri bipolar hücreler ve amakrin hücreleriyle sinaps yapar. Optik sinir gangliyon hücre uzantılarının bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Lateral genikülat cisimdeki sonlanış yerine göre Parvoselüler (P, X hücreleri) ve Magnoselüler (M, Y hücreleri) gangliyon hücreleri mevcuttur. P tip hücreler keskin ve renkli görmeden sorumlu iken, M tip hücreler kaba hareketlerin, hareket ve ışık şiddetindeki değişimlerin, stereopsisin algılanmasında görevlidirler. X

hücreleri uyarıldıkları sürece impuls oluştururlar. Y hücreleri ise geçici impuls yaratan gangliyon hücreleridir. Gamma (W) hücreleri yavaş ileti yapar, hareketi fark etmeyi ve karanlıkta görmeyi sağlayan sinyalleri taşırlar. Fotoreseptör gangliyon hücreleri ise suprakiazmatik çekirdeğe uzanırlar; melatonin salgılanması, pupilla boyutunun ayarlanması ve günlük ritmlerin ayarlanmasında rol alırlar (5).

Horizontal hücreler, basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınında yer alan multipolar hücrelerdir. Horizontal hücrelerin görme stimulusunun integrasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir. *Amakrin hücreler*, gangliyon ve bipolar hücreleriyle sinaps yapar ve uyarıyı engelleyici yönde düzenleme yaparlar. Bu olaya lateral inhibisyon denir.

Nöral retinanın destekleyici glia hücreleri iki gruba ayrılır. *Mikroglia* hücreleri *perisitler ve damar endoteli* gibi mezoderm kökenlidir. *Makroglia* grubunda olan *astrositler ve Müller hücreleri* ise nöral krestten köken alırlar. Duyusal (nöral) retinadaki boşlukları Müller hücreleri doldurur, retina nöronları ve damar duvarları ile yakın ilişki içindedirler. Retinayı baştan başa kat ederek destek görevi görürler ve beslenmeye yardımcı olurlar. Müller glia hücreleri embriyogenezde, iç sınırlayıcı membran ve fotoreseptör farklılaşmasına öncülük eder. Astrositler retinanın sadece iç katlarında bulunurlar. Mikroglia hücreleri sinir lifi katından dış pleksiform kata kadar uzanırlar ve premaküler bölgedeki Henle katında bulunan tek glia hücreleridir.

1.1.4. Retinanın Kanlanması

Birim doku ağırlığı başına vücuttaki en fazla oksijen tüketen doku retinadır. İki kaynaktan kan desteği alır. *Arka siliyer arterler*, optik sinir çevresindeki sklerada anastomoz yaparlar. Dış pleksiform tabakaya kadar olan katlar; rodler, koniler ve dış nükleer tabaka koroid kapillerlerinden doku sıvısı aracılığıyla beslenir. Dış pleksiform ve dış nükleer tabakalarda damar yapısı izlenmez. Retinanın üçte ikilik iç kısmının ise santral retinal arter ve ven ile dolaşımı sağlanır. *Santral retinal arter* oftalmik arterin ilk dalıdır. Santral retinal arter disk içinde ya da üzerinde süperior ve inferior dallarına ayrılır (6).

Retina arterleri uç arterlerdir ve normal şartlarda arteriyovenöz anastomoza rastlanmaz. Bu nedenle damar tıkanıklıkları ciddi problemlerle seyreder. Retinal damarlar birbirine kapillerlerle bağlanır.

Arter dalları sinir lifi katında iç sınırlayıcı zara yakın seyir gösterir. Sadece prekapiller arteriyoller iç pleksiform kata kadar uzanır. Arteriyoller arasında da anastomoz yoktur ve yaygın bir kapiller ağ oluştururlar. Kapillerlerin duvarları deliksiz endotel hücrelerinden oluşur. Endotel bazal membranının altında perisitler bulunur. *Perisit hücreleri* kontraktıl özellikleriyle retinal dolaşımın otoregölasyonunda görev alırlar. Sağlıklı damarlarda her bir endotelyal hücreye bir adet perisit karşılık gelir.

Afferent arteriyol ve efferent venöl arasında kapiller ağ meydana gelir. Yüzeyel kapillerler sinir lifleri ve gangliyon hücre tabakaları arasında, derin kapillerler ise iç nükleer tabakada yer alırlar. Kapiller ağların en yoğun olduğu bölge maküladır, ancak foveada damar izlenmez. 250-350 µm genişliğindeki bu alan *foveal avasküler zon* olarak tanımlanır.

Santral retinal ven, santral retinal artere eşlik eder. Optik sinirde ven arterin lateralinde seyrederek ve kavernöz sinüse veya süperior oftalmik vene drene olur. Retinada lenf damarı bulunmaz (7).

1.1.5. Kan- Retina Bariyeri

1. Dış Kan-Retina Bariyeri: Retina pigment epiteli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur.
2. İç Kan-Retina Bariyeri: Retinal kapiller endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur.

Hücreler arası bağlantılar adezyon moleküllerini de içermektedir. Adezyon molekülleri hücreleri bağlamanın yanı sıra proteinler ve sinyal moleküllerinin aktarımını, apoptozisin düzenlenmesini ve de kontakt inhibisyonla hücre büyümesini sağlarlar (8).

1.2. Diyabetes Mellitus

Diyabet, dünya genelinde milyonlarca insanın hayatını etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Yapılan çalışmalarda 2011 yılında 366 milyonun üzerinde kişinin diyabet hastası olduğu bildirilmiştir (9). Diyabet hastalığının görülme sıklığı artmakta ve 2050 yılında her üç kişiden birinde görülmesi beklenmektedir. Bu nedenle fiziksel, psikososyal ve finansal bir sorun haline gelmiştir.

Diyabetes Mellitus endojen insülinin yokluğu, eksikliği veya dokulardaki etkisinin azalması sonucu ortaya çıkan kronik hiperglisemiyle seyreden progresif bir multisistem hastalığıdır. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmayla seyreder. Diyabet hastalarının %10-15'i insuline bağımlı tip 1 grubu, %85-90'ını insuline bağımlı olmayan tip 2 grubu oluşturur.

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

Diabetes Mellitusa bağlı oküler komplikasyonlar; üçüncü, dördüncü, altıncı kraniyal sinir paralizileri, azalmış gözyaşı üretimi, korneada iyileşmeyen punktat epitelyopati, neovasküler glokom, rubeosis iridis, katarakt, optik nöropati, refraksiyon değişiklikleri ve proliferatif retinopatidir.

1.3. Diyabetik Retinopati

Diyabetik retinopati (DR) retinada kapillerlerin, arteriyollerin ve venüllerin etkilendiği mikroanjiyopati ve buna eşlik eden bir nöropati tablosudur. DR en yaygın görülen diyabet komplikasyonlarından biridir. Dünya genelinde çalışma yaşındaki erişkinlerde önde gelen körlük nedenleri arasındadır (10).

1.3.1. Epidemiyoloji

Dünya nüfusunun yaklaşık %2'si diyabet hastasıdır. Bunların %25'inde herhangi bir düzeyde diyabetik retinopati (DR) izlenmekte ve bunun da %5'ini proliferatif DR oluşturmaktadır. DR'nin prevalansı hastanın yaşı ve hastalık süresi ile ilişkilidir. DR, 5 yıl süresince diyabeti olanların %27'sinde, 10 yıldan uzun süre diyabeti olanların %71-90'ında izlenmektedir. Hastalığın başlangıcından 20 yıl sonra

tip 2 diyabetli hastaların %60'ından fazlasında, tip 1 diyabetli hastaların tamamında DR bulgularına rastlanmaktadır. Bu nedenle tip 1 diyabette tanı konulduktan ortalama 4 yıl sonra, tip 2 diyabette ise hemen retinopatinin kontrol edilmesi gerekli görülmektedir (11).

Şiddetli retinopati gelişme riski Tip 1 diyabetli hastalarda tip 2'ye göre daha yüksektir ancak diyabet hastalarının yaklaşık %95'ini tip 2 hastalar oluşturduğundan, şiddetli retinopati gelişen olguların büyük kısmı bu gruptadır. Proliferatif DR'nin prevalansı 15 yıllık tip 1 diyabetiklerde %50'dir, tip 2'de ise daha düşüktür. Diyabetik maküler ödem ise iki grupta da benzer oranlarda görülür.

Wisconsin Diyabetik Retinopati Epidemiyolojik Araştırması'nda, diyabetik hastalar 30 yaş altı ve üstü olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Otuz yaş altındaki diyabetiklerde; hastalık süresi 5 yıldan az olanlarda %17, 15 yıldan fazla olanlarda %98 retinopati saptanmıştır (12). Otuz yaş üstünde diyabet tanısı alanlarda; insüline bağımlı olmayan grupta, hastalık süresi 5 yıldan az olanlarda %17-29, 15 yıldan fazla olanlarda %50-63 retinopati saptanmıştır. İnsüline bağımlı olan grupta ise 5 yıl altında retinopati oranı %40 iken, 15 yıl üstünde %85 olarak bildirilmiştir (13).

Diyabetik Retinopati Epidemiyolojisi Araştırma Grubu tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye'de diyabetik hastalarda DR prevalansı %30,5 olarak bildirilmiştir. Otuz yaş üstü diyabet tanısı olan tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında DR saptanma oranları sırasıyla; 0-4 yıl tanı süreli grupta %18,7 ve %9,7 iken, 15 yıldan uzun tanı süresi olanlarda %77,6 ve %57,1 olarak saptanmıştır (14).

Diyabetik hastalarda 10 yaş altında retinopati genellikle izlenmez, ancak puberte çağında büyüme hormonlarının etkisiyle retinopati gelişimi hızlanır. Tip 1 diyabette başlangıç yaşı ilerledikçe retinopati gelişim hızı da azalmaktadır. Yetmiş yaş üstü diyabetiklerde ise retinopati gelişimi nadiren görülür.

1.3.2. Risk Faktörleri

Tüm popülasyonlarda DR ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilen başlıca risk faktörleri; kötü glisemik kontrol, uzun diyabet süresi ve hipertansiyondur (15).

Retinopati gelişimi için en önemli risk faktörü diyabetin süresidir. Kontrolsüz diyabet, hipertansiyon, puberte, nefropati, gebelik, hiperlipidemi, sigara bağımlılığı,

obezite, anemi ve geçirilmiş katarakt cerrahisi de diyabetik retinopati progresyonunu hızlandıran faktörlerdir.

Glokomlu ve miyopik gözlerde DR gelişiminin daha az olduğu gösterilmiştir (16). Retinitis Pigmentosa tanılı diyabet hastalarında, proliferatif DR gelişme riskinin azaldığı belirtilmiştir. Bunun azalan rod hücre sayısı nedeniyle enerji gerektiren metabolik reaksiyonların azalmasıyla ve oksidatif strese bağlı olarak üretilen reaktif oksijen radikallerinin birikiminde azalmayla ilişkili olduğu düşünülmüştür (17).

1.3.3. Patogenez ve Klinik Bulgular

Diyabetik retinopati; enflamasyon, mikroanjyopati ve nöroglial dejenerasyonla seyretmektedir. Vasküler patolojiler temel olarak uzamış hiperglisemiye bağlanmıştır.

Perisit ve düz kas hücrelerinin kaybı, bazal membranda kalınlaşma, endotel hücre proliferasyonunun artışı gibi faktörler kapiller hasarın gelişiminde etkili olmaktadır. Ayrıca vasküler hücrelerin yapısının bozulması, trombosit adezyonunu arttıran faktörler ve hiperviskozite gelişimi kapiller disfonksiyon gelişiminden sorumludur. Kapiller yapının bozulması sonucu vasküler yatakta sızıntı ve tıkanıklıklar gelişir. Endotelyal hücre ve bağlantılarının hasarı, iç kan-retina bariyerinin de bozulmasına neden olur. Erken safhadaki diyabetik maküler ödemde, iç kan-retina bariyerindeki bozulma, dış kan-retina bariyerindeki bozulmadan daha baskın şekilde ortaya çıkar. Dış kan-retina bariyeri genellikle kronik dönemde hasar görmektedir.

Kapiller geçirgenlik artışının neden olduğu klinik bulgular; sert eksuda (serum lipoproteinleri), hemoraji ve retina ödemidir. *Perisit kaybı*, retinopatinin en erken bulgusu olan mikroanevrizmaların gelişimine neden olur (18). Hemodinamik otoregülasyondaki bozulma sonucu boğumlanmalar ve venöz dilatasyon meydana gelir.

Kapiller tıkanıklıklar, retinal perfüzyonu bozar ve hipoksi gelişimine neden olur. *Retinal iskemi*, anjiyogenik faktörler aracılığıyla neovaskülarizasyonu stimüle etmektedir. DR'de görülen neovasküler proliferasyondan sorumlu olan primer mediatörün Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) olduğu düşünülmektedir. Retinal hipoksi klinik olarak; arteriyovenöz şantlar (intraretinal mikrovasküler

anomaliler-İRMA), neovaskülarizasyon ve yumuşak eksudalar (sinir liflerinin infarktı) ile kendini gösterir. *Neovaskülarizasyon*, iç retina katlarının iskemisine sekonder olarak, venöz endotelin proliferasyonu ile başlamakta ve optik disk/retina yüzeyi ile iç limitan membran (İLM) arasında gelişmektedir. İleri evrelerde preretinal/intravitreal kanama, traksiyonel retina dekolmanı, fibrozis gibi komplikasyonlara neden olmaktadır. Tüm bu patolojik bulguların şiddeti ve yaygınlığı diyabetik retinopatinin evresini belirlemektedir.

Hücre hasarının gelişiminde; hücre içi sorbitol birikimi, ileri glikolizasyon ürünlerinin birikimi, nitrik oksit seviyesinin artması, protein kinaz C (PKC) izoformlarının aktivasyonu, enflamasyon ve oksidatif stres gelişimiyle serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması etkili bulunmuştur.

Hipergliseminin hücre içinde *poliol (aldoz redüktaz) yolunu* aktive ettiği, oluşan sorbitolün hücre içi elektrolit imbalansı ve Na-K⁺ ATPaz pompasında bozukluğa yol açarak osmotik vasküler hasara neden olduğu düşünülmektedir.

Uzamış hiperglisemi hücre fonksiyonlarını düzenleyen genlerin de yapısını bozmaktadır. Hiperglisemiye maruz kalan vasküler dokularda, hücre içi glikoliz artar, bu da diaçilgliserol (DAG) sentezini artırır. DAG, PKC'nin aktivatörüdür. PKC, gen transkripsiyonu seviyesinde vasküler permeabiliteyle ilişkili faktörleri ve büyüme faktörlerini regüle etmektedir. DAG ve PKC; endotelial hücre aktivasyonuna, vasküler geçirgenlik artışına, lökosit adezyonuna, düz kas hücrelerinin kontraksiyonuna, VEGF, tümör büyüme faktörü- β (TGF- β) ve endotelin sentezine, hücre dışı matriks protein sentezinde artışa neden olan hücre içi moleküllerdir. Ayrıca histamin ve büyüme faktörleri sinyalizasyonunu da bozarlar.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda proliferatif diyabetik retinopati (PDR) ve plazma eritropoetin (EPO) yüksekliğinin birlikteliği de ilişkili bulunmuştur. Eritropoetin, VEGF'ten bağımsız bir anjiyogenetik faktör olarak bildirilmiştir (19).

Glikozun proteinlerin amino gruplarına enzimatik olmayan yolla bağlanmasıyla *ileri glikozilasyon ürünlerinin* (AGE-Advanced Glycosylation Endproducts) oluşumu, proteinlerin yapı ve fonksiyonunu bozar. Parçalanmaya dirençli bu ürünler, transmembran reseptörlere bağlanıp hücre fonksiyonlarını ve sinyalizasyonunu değiştirir. Oluşan reseptör komplekslerinin PKC aktivasyonu, oksidatif stres ve enflamatuvar sitokinlerin artışıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Üç

aylık diyabetik kontrolün göstergesi olan *Hemoglobin-A1c*, bu mekanizmayla oluşmaktadır.

Kallikrein-kinin sisteminin de DR patogeneğinde etkili olduğu bilinmektedir. Diyabetik retinopatide karbonik anhidrazın artarak intraoküler pH'ı yükselttiği, *kallikrein-kinin sistemini* aktive ettiği ve bradikinin reseptör aktivasyonuna neden olarak kan-retina bariyerinde bozulmaya neden olduğu düşünölmektedir (20).

Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlardan sorumlu tutulan mekanizmalardan biridir. *Serbest radikaller* hücrede lipid peroksidasyonuna, proteinlerin yanlış katlanmasına, DNA hasarına ve mitokondriyal hasara neden olmaktadır (21). Serbest radikallerin artışı, aminoasit bağlarını değiştirerek okside proteinlerin gelişimine neden olur. Ayrıca plazma ve hücre membranı lipoproteinleri, laminin, kollajen gibi proteinler oksidasyona uğrar. Bunun sonucunda kan hücrelerinin agregasyon ve aglütinasyonlarında artış ve mikrotrombozlar meydana gelir. *Reaktif oksijen türevlerindeki artışın*, PKC'yi ve aldoz redüktazı aktive edebildiği ve AGE üretimiyle diaçilgliserol düzeyini arttırabildiği belirtilmiştir (22). Serbest radikal miktarındaki artış, antioksidanların kan ve doku düzeyinde azalmasına da neden olmaktadır.

Diyabetik retinopatinin erken evrelerinden itibaren apoptozis artışı, mikrogliyal aktivasyon, glial hücre reaktivitesi ve glutamat metabolizmasında değişikliklere bağlı nörogliyal dejenerasyon da izlenmektedir (23). İskemi nedeniyle biriken fazla miktardaki glutamat, nörotoksiktir ve nöronal hücre ölümüne neden olur. Diyabetik retinalarda apoptozis ile ilişkili olan bax proteini düzeyinde artış saptanmıştır (24). Gangliyon hücre ve iç pleksiform tabakalarında hücre kaybı sonucu retina incelmektedir. Diyabetik farelerde nöral hasarın mevcudiyeti tipik vasküler lezyonlardan uzun zaman önce gösterilmiştir (25). Nörodejeneratif bu değişimlerin; kliniğe retinada incelme, elektroretinografi değişiklikleri, renkli görme ve kontrast duyarlılıkta bozulma şeklinde yansıdığı düşünölmektedir.

Diyabetik retinada enflamatuar moleküller ve akut faz reaktanlarının ekspresyonunda artış, makrofaj infiltrasyonu, lökosit adezyonunda artış, mikrogliyal hücre ve kompleman aktivasyonu izlenmekte, bu bulgular sürecin enflamatuar boyutunu göstermektedir (26).

1.3.4. Sınıflandırma ve Komplikasyonlar

Diyabetik retinopatide, takip ve uygun tedavi yönteminin şekli ve zamanlaması, Diabetic Rethinopathy Study (DRS), Early Treatment Diabetic Rethinopathy Study (ETDRS), Diabetic Rethinopathy Vitrectomy Study (DRVS) çalışmalarıyla sınıflandırılmıştır (27).

Diyabetik retinopati iki ana grupta sınıflandırılır:

- I. Nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)
- II. Proliferatif diyabetik retinopati (PDR)

1.3.4.1. Nonproliferatif Diyabetik Retinopati (NPDR)

İlk bulgusu *mikroanevrizmalardır*. Yuvarlak/mum alevi şeklinde retinal hemoraji, sert eksuda bulguları eşlik eder. Klinik olarak dört alt gruba ayrılır.

1. Hafif NPDR:

Mikroanevrizmalar ve retinal hemorajilerin izlendiği retinopatinin başlangıç dönemidir. 5 yıl içerisinde %15’inde PDR gelişme riski vardır.

2. Orta NPDR:

Retinal hemorajiler ve mikroanevrizmalar daha geniş bir retinal alanda görülür. İRMA, venöz boncuklanmalar ve yumuşak eksudalar eşlik eder. Venöz boncuklanma ve İRMA bir kadrandan daha fazla alan kaplamaz. 5 yıl içerisinde %33’ünde PDR gelişme riski vardır.

Hafif ve orta dereceli NPDR’li hastalar 6-12 ay aralıklarla takip edilebilirler. Diyabetik maküla ödemi (DMÖ) varlığında daha sıkı takip yapılır. Klinik olarak anlamlı maküla ödemi (KAMÖ) varsa fokal laser tedavisi önerilir.

3. Ağır NPDR:

- *Dört kadranda retinal hemoraji*
- *En az iki kadranda venöz boncuklanma*
- *En az bir kadranda İRMA*

bulgularından bir veya birden fazlasının birlikteliğiyle karakterizedir. Retinada iskemik alanlar mevcuttur. 5 yıl içerisinde %60’ında PDR gelişme riski vardır. Takip süresi 4 ayda bir olarak tavsiye edilir. KAMÖ mevcutsa laser fotokoagülasyon yapılabilir.

4. Çok Ağır NPDR:

Bulgular oldukça yaygındır ancak neovaskülarizasyon gelişmemiştir. 2-3 ayda bir takip edilir. 1 yıl içerisinde %75’inde PDR gelişme riski vardır.

Ağır ve çok ağır NPDR “*preproliferatif retinopati*” olarak da adlandırılır ve *artmış iskemi* görülmektedir.

1.3.4.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR)

Retina yüzeyinde ve/veya optik disk üzerinde yeni damar oluşumu, fibröz doku proliferasyonunun varlığı PDR tanısında belirleyicidir. Neovasküler doku venöz endotelin proliferasyonu ile başlayıp, iç sınırlayıcı membranın altında ilerler ve vitreus boşluğuna açılma eğilimindedir.

PDR klinik olarak iki aşamada gözlenir:

1. Erken PDR:

Retinal yüzeyde preretinal hemorajiler ve neovasküler doku mevcuttur.

2. Yüksek Riskli PDR:

Neovasküler doku vitreusa doğru yönelmiş ve *fibröz doku* belirginleşmiştir. Fibröz doku kontraksiyonu sonucu ağır *preretinal ve intravitreal hemorajiler* gelişmektedir. *Traksiyonel retina dekolmanı* eşlik edebilir. *Rubeosis iridis*; iris yüzeyi ve ön kamara açısında yeni damar oluşumlarıyla seyredebilir. En erken zamanda tedavi başlanması gereklidir, panretinal laser fotokoagülasyon yapılır.

1.3.4.3. Diyabetik Makülopati

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

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

Maküla merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki (1500 µ) retinal alanlarda, sert eksuda varlığı veya retina kalınlaşması *fokal diyabetik maküla ödemi* olarak tanımlanır. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) tarafından klinik

uygulamada fokal bir ödemin şiddet ve seviyesini belirlemek ve tedavi kriterlerini saptamak için *linik olarak anlamlı maküla ödemi* tanımı belirlenmiş ve retinal kalınlaşma esas alınmıştır. Buna göre fokal bir maküla ödeminin KAMÖ kabul edilebilmesi için;

1. Maküla merkezinde veya merkezin 500µ çevresinde retina kalınlaşması,
2. Maküla merkezinde veya merkezin 500µ çevresinde, bitişiğindeki retinanın kalınlaşmasıyla birlikte olan sert eksudaların varlığı,
3. Herhangi bir bölümü maküla merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki (1500µ) bir alanda yerleşmiş, bir disk çapı veya daha büyük retinal kalınlaşma bölgesinin varlığı gerekmektedir (28).

Maküla merkezini de içine alan iki ya da daha fazla disk çapı büyüklüğündeki retina kalınlaşmaları *diffüz diyabetik maküla ödemi* olarak isimlendirilir. Fokal ödemden farklı olarak diffüz tipte kan-retina bariyeri büyük moleküllerin geçişine engel olduğu için sert eksuda plakları nadiren görülür. Diffüz tipte makulada kistoid değişiklikler izlenir, FFA'da çiçek paterni izlenebilir, ayrıca erken fazda retinal kapiller yatağın görünürlüğü artmıştır. Optical Cohrens Tomography'de (OCT) kistoid değişiklikler ve retinal kalınlaşma düzeyi ayrıntılı olarak değerlendirilebilir (29).

1.3.5. Diyabetik Retinopati Tedavisi

Günümüzde DR'nin gelişimi ve progresyonu tam olarak ortadan kaldırılamamakla birlikte, mevcut tedavi yöntemleriyle hastalarda ortaya çıkabilecek görme kayıplarının engellenmesi ya da en aza indirgenmesi amaçlanmaktadır. DR ve DMÖ'de erken teşhis ve tedaviyle görme keskinliğinde artış veya stabilizasyon sağlanabilir. Tedavi diyabetin ve varsa hipertansiyonun regülasyonu ile başlar. Açlık kan glikoz düzeyinin 110 mg/dl, HbA1c'nin %6,5, kan basıncı düzeyinin 130/85 mmHg değerlerinin altında olması önerilmektedir. Kan lipid profilinin de takibi önerilmektedir. ETDRS çalışmasında total kolesterol seviyesi 240 mg/dl üzerinde olan hastalarda sert eksuda görülme olasılığı, 200 mg/dl 'nin altında total kolesterol düzeyi olan hastalara göre 2 kat daha fazla saptanmıştır (28).

Laser fotokoagülasyon tedavisi, santral tutulumu olmayan ödem veya görme azalması yapmayan erken ödem tedavisinde standarttır. KAMÖ varlığında fokal ödem

için uygulanan laser tedavisi, sert eksudaların rezorbsiyonunu hızlandırmayı ve maküladaki ödemi azaltmayı amaçlar. Panretinal fotokoagülasyonda amaç, fibröz doku gelişiminin ve neovaskülarizasyonun engellenmesi, durdurulması ve gerilemesinin sağlanmasıdır. Panretinal laser fotokoagülasyonun PDR'de 5 yıl içinde ağır görme kaybı gelişme olasılığını %50 azalttığı gösterilmiştir (30).

Laser fotokoagülasyon sonrası; başağrısı, korneal abrazyon ve yanıklar, lens opasiteleri, ön kamarada sığlaşma, göz içi basıncı artışı, görmede geçici bulanıklık, fovea ve optik sinir hasarı, iris yanıkları, iskemik papillopati, maküler ödem, Bruch membranında rüptür, koroidal kanama ve neovaskülarizasyon, subretinal neovaskülarizasyon, epiretinal membran oluşumu, retinal yanık alanlarında genişleme, vitreus hemorajisi, görme alanında skotomlar gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir.

Laserin etkisi diffüz ödemin tedavisinde sınırlıdır ve medikal tedavi üstünlük kazanmıştır. İntravitreal olarak *Vasküler endotelyal büyüme faktörü* baskılayan ajanlar (*anti-VEGF ajanlar*) ve *kortikosteroidler* uygulanmaktadır (29). Bu tedavilerle enflamatuvar mediatörlerin ve vasküler permeabilite artışına neden olan faktörlerin salınımının engellenmesi hedeflenmektedir.

Fluosinolon asetonid, triamsinolon asetonid, deksametazon intravitreal olarak uygulanan steroid yapısındaki ajanlardır. Enflamasyonu baskılamakla birlikte VEGF düzeyini azaltırlar. Kortikosteroidlerin katarakt, göz kapağı cildinde atrofi, pitozis, midriyazis, skleral incelme, glokom, bağışıklık mekanizmalarının baskılanması sonucu enfeksiyonlara yatkınlık gibi yan etkileri mevcuttur. Ayrıca intravitreal uygulamaya bağlı retina dekolmanı ve endoftalmi riski mevcuttur (31).

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

Kalıcı vitreus hemorajileri, premaküler hemoraji, vitreomaküler traksiyon, traksiyonel retina dekolmanı, aktif fibrovasküler proliferasyon gelişiminde uygulanan

vitreoretinal cerrahi ile komplikasyonların önlenmesi ve ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır.

Diyabetik retinopatinin medikal tedavisinde; aldoz redüktaz inhibitörleri (Sorbinil, Ponalrestat), antioksidanlar (E vitamini, C vitamini), PKC inhibitörleri (Reboksitaurin, PKC-412), ileri glikolizasyon son ürün inhibitörleri (Aminoguanidin, Pimagedin), büyüme hormonu inhibitörleri ve somatostatin analogları (Octreotid) gibi diğer ajanlar çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (32). Medikal tedavideki gelişmelerle DR gelişimi, progresyonu ve komplikasyonlarının önlenmesi, laser fotokoagülasyon ve vitreoretinal cerrahiye gereksinimin azaltılması hedeflenmektedir.

1.4. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, retina anjiyogenezinde anahtar mediatör olan, homodimerik, glikoprotein yapısında heparin bağlayan bir büyüme faktörüdür. Retina iskemisine cevap olarak stimüle olur, endotel proliferasyonunu ve permeabiliteyi düzenler. Anjiyogenez, proteolitik aktivite, endotel hücre çoğalması, kapiller tüp oluşumu olaylarında etkindir. VEGF retinada; vasküler endotel hücreleri, retina pigment epiteli hücreleri, gangliyon hücreleri, astrositler, Müller hücreleri ve retinaya göç etmiş lökositler tarafından salınmaktadır. Ayrıca iris pigment epiteli, kornea endoteli, üveal melanositler ve koroidal fibroblastlarda da VEGF üretimi mevcuttur.

Gen ailesinin içinde 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır; VEGF-A, B, C, D, E, F ve PlGF. *VEGF-A'nın anjiyogenezde* en önemli faktör olduğu düşünülmektedir. VEGF-A endotel hücrelerini ve monositleri uyarak doku faktörü (TF) yapımını artırır ve koagülasyon zincirini aktive eder. Farelerde VEGF-A'nın tek bir allelinin hedefli inaktivasyonu vasküler gelişimin belirgin bir şekilde bozulmasına neden olur. VEGFR-1 üzerinden pozitif ve negatif anjiyogenetik etki gösterir. VEGFR-2 üzerinden de anjiyogenetik, mitojenik ve vasküler geçirgenlik artışı gibi etkileri vardır. VEGF hücre dışına salgılanarak reseptörüne bağlandığında spesifik PKC izoformunu ($\beta 2$) aktive ederek *ödem* ve *neovaskülarizasyon* oluşturur.

İnsanlarda VEGF-A'nın 9 izoformu tespit edilmiştir. *VEGF 165 izoformu*, in vivo en çok görülen ve en güçlü biyoaktiviteye sahip olan alt tipidir. VEGF ekspresyonu RPE'de daha fazladır. Özellikle VEGF 121 ve VEGF 165 izoformları

retinada bulunmakta ve koryokapiller fenestrasyonun devamlılığını sağlamada yer aldığı düşünülmektedir. Normal damar gelişimi için VEGF gerekli bir faktördür. VEGF, VEGFR-1 veya VEGFR-2'yi kodlayan genlerin hasara uğratıldığı ratlarda erken intrauterin ölümler meydana gelmiş ve histopatolojik incelemelerde tamamlanmamış damar oluşumu, yetersiz endotel farklılaşmasını gösteren bulgular saptanmıştır (33).

Yapılan çalışmalarda, VEGF salınımını düzenleyen çok sayıda faktör araştırılmıştır. *Oksidatif stres ve hipoksik ortamda* düzeyi artan hypoxia inducible factor-1 (*HIF-1*) VEGF gen ekspresyonunda ana düzenleyicidir. VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, fibroblast büyüme faktörü-4 (FGF-4), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), TNF- α , nitrik oksit (NO) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) gibi endojen ajanlarla da düzenlenmektedir (34).

Anjiyogenezin bir mediatörü olan *NO*, VEGF'in nitrik oksit sentaz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşarak endotel hücre toplanmasında rol alır. Endotelyal VEGFR-2 salınımı da lokal hipoksiyle direkt uyarılabilmektedir. İn vitro VEGFR-2 gen ekspresyonu, kardiyovasküler hemostazda önemli bir faktör olan, aynı zamanda DR progresyonunda da rol oynayan *anjiyotensin-II* ile direkt arttırılmaktadır. DR ileri evrelerinde, VEGFR-2'nin arttığı iskemik alanlarda yüksek miktarlardaki VEGF-A üretimi, bulguların gelişiminde rol oynamaktadır.

Hipoksik hücrelerden salgılanan adenozinin, adenosin A2 reseptörlerine bağlanarak, c-AMP bağımlı protein kinaz A yolağı üzerinden VEGF düzeyinde artışa neden olduğu bulunmuştur (35).

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün diyabetik retinopati, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD), prematüre retinopatisi, retinal ven oklüzyonu hastalıklarında, iris ve kornea neovaskülarizasyonu gelişiminde ve patolojik damar oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (36).

1.4.1. Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin; Genentech, Inc; San Francisco CA) Food and Drug Administration (FDA) tarafından metastatik kolorektal kanserlerin tedavisi için

onaylanmış, direkt VEGF’i inhibe eden, insanlarda kullanılabilir hale getirilmiş monoklonal bir antikordur (37).

Bevacizumab, VEGF’in endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasına engel olarak endotel hücrelerinin proliferasyonuna sebep olan reseptör dimerizasyonunu ve buna bağlı olarak transfosforilasyon yoluyla aktivasyonunu ve hücre içi aktivasyonu engellemektedir. Üzerinde iki adet antijen bağlanma bölgesi bulunur. Molekül ağırlığı 140 kDa’dur. Bevacizumab’ın büyük molekül ağırlığı, vitreus içine verilen bu monoklonal antikorların retinaya veya retina altı boşluğa geçişini zorlaştırır. Ancak yapılan deneysel çalışmalarda intravitreal enjeksiyon sonrası Bevacizumab’ın retinayı geçebildiği gösterilmiştir. Ayrıca Bevacizumab’ın klinik kullanımda intravitreal enjeksiyonu sonrası görülen hızlı cevaplar da bu ilacın bir şekilde iç limitan membranı geçtiğini düşündürmektedir. Klinik uygulamalarda Bevacizumab’ın 1,25 mg dozunun yeterli olabileceği birçok klinik çalışmalarla desteklenmiştir. Tekrar enjeksiyon süresinin ise ilacın biyolojik aktivitesi göz önüne alınarak 4-5 hafta olduğu bildirilmiştir.

Onay dışı (off label) kısa süreli çalışmalarda, eksudatif tip yaşa bağlı maküla hastalığında intravitreal ve sistemik kullanımı ile ilgili ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (38,39). Ayrıca iris ve retina neovaskülarizasyonu ile giden proliferatif diyabetik retinopati tedavisinde, maküler ödem gelişmiş santral retinal ven tıkanıklığında ve neovasküler glokomda Bevacizumab’ın intravitreal kullanımı ile ilgili olumlu sonuçlar yayınlanmıştır (40).

Avery RL. ve ark.’nın diyabete sekonder iris ve/veya retinal neovaskülarizasyonu bulunan hastalarla yaptıkları çalışmalarında intravitreal Bevacizumab enjeksiyonu yapılan hastalarda retinal ve iris neovaskülarizasyonunda hızlı gerileme olduğu bildirilmiştir (41). Haritoğlu ve ark. DMÖ’lü 51 göze 1.25 mg Bevacizumab içeren 0.05ml enjeksiyon uygulamışlar ve 6 haftalık izlemde %29’unda, 12 haftalık izlemde ise %26’sında en az 3 sıralık görme artışı elde etmişlerdir. İntravitreal Bevacizumab’ın fotokoagülasyon, intravitreal triamsinolon asetonid (İVTA), vitrektomi gibi tedavilere cevap vermeyen diffüz DMÖ’sü olan gözlerde faydalı olduğu bildirilmiştir (42).

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün tüm izoformlarını bloke eden Bevacizumab’ın periodik intravitreal uygulamalarıyla yaşa bağlı makula

dejeneresansına sekonder koroidal neovasküler membran tedavisinde, diyabetik makuler ödem tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Aslında kolon kanserleri için FDA onayı olan Bevacizumab'ın göz hastalıklarında kullanımının off-label olduğu da göz ardı edilmemelidir. Ekonomik ve ulaşılabilir olması özellikle az gelişmiş ülkelerde tercih sebebi olabilmektedir. Wu L. ve ark.'nın çalışmalarında; 1173 hastanın 1310 gözü intravitreal enjeksiyon sonrası 12 ay boyunca takip edilmiş, 18 hastada (% 1,5) sistemik yan etkiler bildirilmiştir. Bu hastaların 7'sinde (% 0,59) kan basıncında ani artış, 6'sında (%0,5) serebrovasküler olaylar, 5'inde (% 0,4) miyokard infarktüsü, 2'sinde (%0,17) iliak arter anevrizması, 2'sinde (%0,17) parmak amputasyonu, 5'inde (%0,4) ölüm görülmüştür. Oküler komplikasyonlar ise 7 hastada (%0,16) bakteriyel endoftalmi, 7 hastada (%0,16) traksiyonel retina dekolmanı, 4 hastada (% 0,09) üveit, 1 hastada (% 0,02) yırtıklı retina dekolmanı ve vitre içi hemoraji olarak bildirilmiştir (43).

1.4.2. Diyabetik Retinopati ve VEGF

Diyabetik retinopati patogenezinde enflamasyon etkindir. *Proenflamatuar* özelliği olan VEGF-A, retinal adezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve lökosit adezyonunu artırarak enflamasyonu kısır bir döngü haline getirmektedir. İntravitreal VEGF enjeksiyonu yapılan primat gözlerinde, retina ve iris neovaskülarizasyonu ile birlikte neovasküler glokomu içeren şiddetli PDR benzeri bir klinik durumun ortaya çıktığı görülmüştür (36). Kan-retina bariyerindeki bozulmanın ve hastalığın progresyonunun VEGF inhibisyonu ile engellenebileceği düşünülmüştür.

Diyabetin erken döneminde, VEGF düzeyinin retinal proliferatif değişikliklerden önce arttığı izlenmiştir. Diyabetik retinopatide neovaskülarizasyonun başlamasıyla proliferatif evreye geçilmiş olur. Deneysel çalışmalarda, VEGF salınımı ile *neovaskülarizasyon* gelişimi korelasyon göstermiştir. Diyabet hastalarından alınan vitreus örneklerinde PDR'li gözlerde, NPDR'li gözlere göre VEGF-A düzeyinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (44). Neovaskülarizasyon nedeniyle uygulanan başarılı panretinal fotokoagülasyon tedavisi sonrası intraoküler VEGF seviyesinin azaldığı da gözlenmiştir.

1.5. Apoptozis

Apoptozis programlı hücre ölümü olarak tanımlanmakta, hasta ve gerekmeyen hücrelerin genetik olarak kontrol edilen mekanizmalarla çevre hücrelere zarar verilmeden yok edilmesidir. Patolojik, fizyolojik etkenlerle ortaya çıkabilir. Hücre bütünlüğünü bozarak nekroza neden olabilen her durum apoptozla sonuçlanabilir. Dokularda normal hücre popülasyonunun dengeli devamlılığı sağlanırken, immün sistem reaksiyonlarında korunma mekanizması olarak, kalıcı hücre hasarında ve yaşlılıkta apoptozis görülür. Hücrelerin programlı yıkımı, hormon bağımlı involüsyonu, enflamatuar olaylar, tümörler gibi birçok patolojik, fizyolojik ve adaptif olay apoptozisi tetikleyebilir.

Sitokinler aracılığıyla hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, büyüme faktörlerinin yetersizliği, hipoksi, antineoplastik ilaçlar, radyasyon, ısı, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler; metabolik sistem ve hücre siklus bozuklukları, DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, pH'da düşme gibi hücre içi etkenler apoptozu başlatabilir.

Apoptozisin indüklenmesiyle hücre içi *kaspaz* adlı proteazlar aktive olur ve mitokondrinin dış zar geçirgenliği artar. Sitoplazmaya pro-apoptotik proteinler salınır. Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskadın başlamasına neden olurlar.

Hücreler apoptozda sıvı kaybederek küçülür ve büzülür, kromatin kondansasyonu gelişir. Hücre, zarla çevrili küçük parçalara bölünerek *apoptotik cisimcikler* oluşturur. Apoptotik cisimcikler fagositozla çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından temizlenir.

Apoptotik süreci başlatan yolları aktifleyerek hücre ölümüne neden olan etkenlerden biri de *serbest oksijen radikalleridir*. *Hipoksi ve iskemi* varlığında oksidatif hasar şiddetlenir. Hücrede oksidatif fosforilasyon azalır ve enerji depoları boşalır. Bunun sonucunda hücre zarında bulunan Na-K⁺-ATPaz pompası inhibe olur. Oksidatif strese mitokondriyal membran potansiyeli ve kalsiyum dengeleri değişir. Bu değişiklik DNA'da ve mitokondride hasara yol açarak hücreyi apoptozla sürükler.

1.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Proton sayısı ile elektron sayısı nötr bir atomda eşittir ve atom bu halde reaktif değildir. Elektron alan ya da veren atom, elektriksel olarak yüklü hale (iyon) geçer. İyonlar *reaktif* yapıda olup, yüksek enerjilerinden kurtulmak için ortamdaki başka iyon veya atomlarla etkileşime girme eğilimindedirler. *Serbest radikaller* de, dış yörüngesinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren yüksek enerjili reaktif bileşiklerdir. Herhangi bir molekülle etkileşime girerler ve bu moleküllerden elektron alır veya ona elektron vererek yapısını bozarlar.

Reaktif özellik, organizmada birçok biyolojik yapıya zarar verir. Antioksidan savunma sistemi ile serbest oksijen radikalleri arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan *oksidatif stres*; diyabet, immünsüpresyon, kalp-damar hastalıkları, kanserler, katarakt, iskemi/reperfüzyon hasarı, yaşlanma, enflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojinin gelişimine neden olmaktadır (45).

Organizma içinde oksijen kullanılarak enerji üretimi sırasında oluşan reaktif moleküllere *serbest oksijen radikalleri* (oksidan moleküller-SOR; reaktif oksijen türevleri-ROS) denir. Süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), tekli oksijen ($1O_2$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$) ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleri bu grup moleküllerdendir. Aşırı üretimleri veya indirgenmelerinin yetersiz kalması hücre makro moleküllerinin okside olmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle karbonhidrat, protein, lipid ve DNA hasarlarına neden olan metabolik reaksiyonlara yol açarak hücre ve doku hasarı oluşturmaktadırlar.

Serbest radikaller, hücre membranlarındaki Ca^{+2} , Mg^{+2} ve ATPaz ile etkileşim sonucunda hücre içi kalsiyum düzeyini artırır. Kalsiyum düzeyindeki artış, fosfolipaz aktivitesini stimüle ederek araşidonik asit düzeyini yükseltir. Siklooksijenaz ve lipoksijenaz yolları üzerinden *prostoglandinler*, *lökotrienler* ve *toksik lipid peroksitleri* oluşur. Oluşan peroksitler, siklooksijenaz aktivitesi aracılığıyla vazokonstriktör tromboksan oluşumunu artırmaktadır. Lipoksijenaz aktivitesiyle oluşan PAF (platelet activating factor) ve lökotrienler; vazokonstriksiyona, lökosit adezyonuna, kemotaksise ve sonuçta endotel hasarına neden olmaktadır (46). Ayrıca hücre içi Ca^{+2} düzeyinin artışı proteolitik enzimleri aktive ederek apoptozisi indüklemektedir.

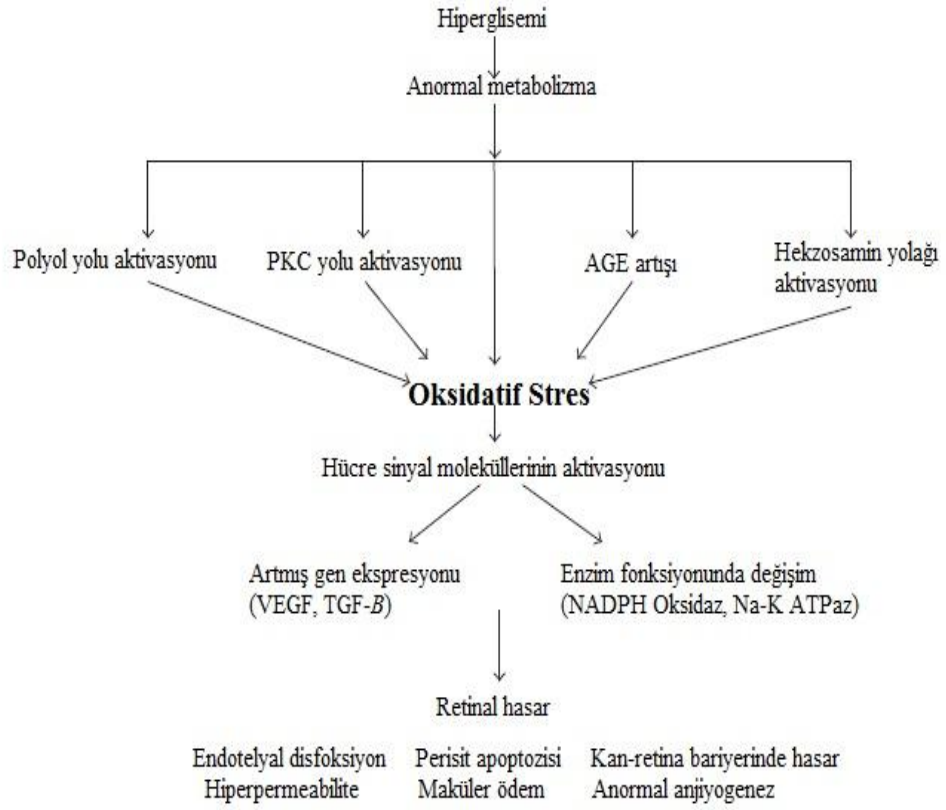
Serbest radikallerin hücre ve dokularda oluşturduğu patolojiler; hücre zarı yapısı ve fonksiyonunda değişim, nükleik asit hasarı, hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısında bozulma, hücre içi proteazların aktivasyonu, hücre içi enzim fonksiyonlarında bozulma, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal aerobik solunumun bozulması, hücrenin potasyum kaybında artış, trombosit agregasyonunun ve dokularda fagosit birikiminin artması, hücre dışı kolajen, elastin, doku komponentlerinin, mukopolisakkaritlerin ve transmitterlerin yıkımıdır.

1.6.1. Diyabet ve Oksidatif Stres

Kronik metabolik bir bozukluk olan diyabet aynı zamanda oksidatif stres sonucu gelişip ilerleyebilen ve oksidatif hasarı şiddetlendirebilen bir hastalıktır.

Sağlıklı bireylerde antioksidanlar ve serbest radikaller arasında denge mevcuttur. Hiperglisemide enerji metabolizmasının değişmesiyle oluşan metabolik stres, otooksidatif glikozilasyon, hipoksi, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu, poliol yolu aktivasyonu, iskemi ile meydana gelen doku hasarı sonucu serbest radikallerin oluşumunun hızlanması ve antioksidan savunma sisteminin değişmesi bu dengeyi bozmakta, diyabetik komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır (Şekil 1).

Deneyisel diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabet hastalarında serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun artışı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Pankreas β hücreleri oksidatif hasara duyarlıdır. Ayrıca pankreas hücrelerindeki antioksidan kapasitenin böbrek, karaciğer, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokulara kıyasla oldukça düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (45). Enflamatuvar hücrelerin β hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir (47).

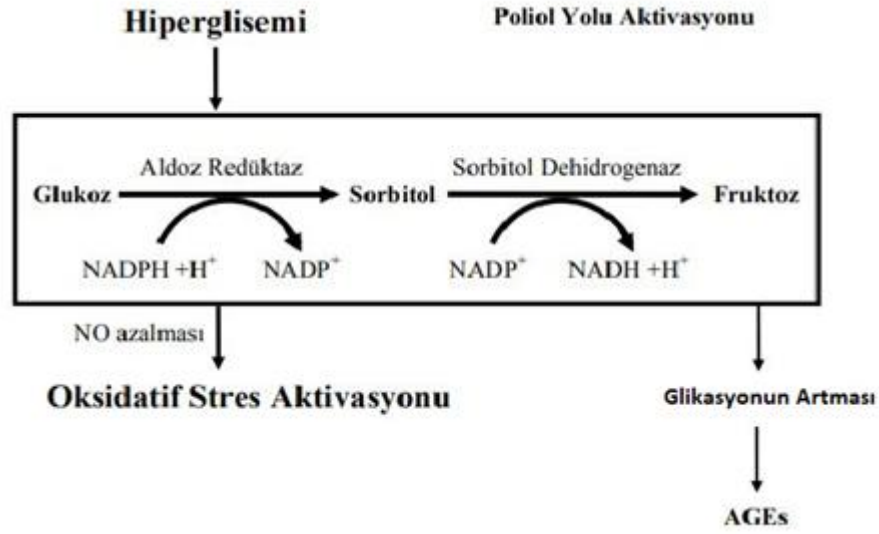


Şekil 1. Diyabetik retinopati ve oksidatif stres mekanizması (48)

Oksidatif stresin insülin direnciyle ilişkili olduğu ve insülin direncinin patogenezinde rol oynadığı da bilinmektedir. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin de insülinin gen transkripsiyonunu azalttığı ve pankreas β hücre apoptozuna yol açtığı düşünülmektedir. Diyabetik kişilerin serum ve dokularında lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (49).

Diyabetik retinopatide hücresel düzeyde hiperglisemi halinde, mitokondriyal elektron transport zincirinde, hücre içi enerji metabolizması sırasında normal şartlarda meydana gelen hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumunun daha da arttığı bildirilmiştir (50).

Hiperglisemi, poliollu yolu ile sorbitol üretimine neden olur (Şekil 2). Sorbitol, glukozdan fruktoz oluşumu sırasında meydana gelen, glukozun bir alkolüdür. Hücre içi sorbitol metabolik yolu aktif olunca, sorbitol hücre içinde birikmeye başlar.



Şekil 2. Poliöl yolu aktivasyonu (51)

Diyabette serbest radikal artışının ve radikal bağlayıcı sistemde bozulmanın saptanmasıyla, diyabetik hastaların antioksidanlara daha çok ihtiyaç gösterebileceği düşünülmüş, tedavide ve hastalık gelişiminin engellenmesinde radikal oluşumunu önleyici antioksidan vitaminlerin kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

1.6.2. Total Oksidatif Stres (TOS)

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı üretimi veya antioksidan tampon mekanizmalarının eksikliği sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stresin toplam değerinin ölçüm tekniği şu şekildedir; numunedeki oksidanlar ferröz iyon şelatör kompleksini *ferrik iyon*a dönüştürürler, ferrik iyon asidik ortamda kromojenle birlikte renkli bir kompleks oluşturur, *spektrofotometrik* olarak ölçülen rengin yoğunluğu örnekteki oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilir ve sonuçlar litrede mikromolar H_2O_2 eşivalan ($\mu mol H_2O_2 equiv/L$) olarak verilir.

1.6.3. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Vücuttaki oksidasyon reaksiyonlarının tamponize edilmesinde, kan vasıtasıyla antioksidanların tüm vücuda dağıtılması önemli rol oynar. Serumda bulunan antioksidan moleküller antioksidanların toplam değerine en büyük katkıyı sağlar.

Serumda antioksidanların etkileşimiyle tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla olan sinerjik bir antioksidan etki oluşmaktadır. Bu nedenle total antioksidan seviyesinin ölçümü daha değerli bilgiler verir.

Total antioksidan kapasitesinin ölçümü, numunedeki tüm antioksidan moleküllerin renkli *Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit (ABTS)* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Numunelerdeki antioksidanlar lacivert yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirger, ABTS solüsyonun 660 nm dalga boyunda absorbands değişikliği ölçülür. *Absorbans değişikliği* numunenin total antioksidan düzeyiyle ilişkilidir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan *Trolox* kullanılır.

1.6.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumlarını inhibe eden, zararlı etkilerini azaltan, oksidasyon olaylarını engelleyen maddelerdir. Serbest radikallerin protein, lipid ve DNA gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini azaltmaktadırlar. Glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-s-transferaz (GST), glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), mitokondriyal sitokrom oksidaz ve hidroperoksidaz intrasellüler savunma sisteminin *enzimatik antioksidanlarıdır*. Albümin, bilirubin, seruloplazmin, melanin, askorbat, transferrin, β -karoten, α -tokoferol, Glutatyon (GSH) ve ürik asit ise *enzimatik olmayan antioksidanlar* olarak tanımlanmıştır.

Antioksidanlar dört temel yolla oksidanları etkisiz hale getirmektedir:

1. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktarıp inaktive etme durumudur. *Mannitol* ve *vitaminler* bu şekilde etki eder. Oksidatif stres sonucu gelişen lipid peroksidasyonunu önleyen antioksidan vitaminlerden bazıları C ve E vitaminleridir.

2. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. *Antioksidan enzimler* bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: *Hemoglobin* ve *ağır mineraller* oksidanları kendilerine bağlayıp inaktive eder.

4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onararak etki eder.

Antioksidanlar hücrelere saldırmadan serbest radikalleri stabilize ve inaktive etme özelliği olan moleküllerdir. İyi bir antioksidanda bulunması gereken bazı özellikler; doku ve vücut sıvılarında uygun fizyolojik seviyelerde bulunma, redoks metalleriyle şelat oluşturabilme, diğer antioksidanlarla ilişkide bulunarak onları yenileyebilme ve sinerji gösterme, serbest radikallerin etkinliğini ortadan kaldırma, kolayca emilme, sıvı ve zarlarda fonksiyon gösterebilme, gen ekspresyonu üzerine onarıcı etkilere sahip olma olarak tanımlanmıştır (52).

Diyabetin kronik komplikasyonlarının oluşumunda oksidatif stresin önemli bir yeri vardır. Antioksidanların ekzojen olarak verildiğinde bu komplikasyonları önleme ve progresyonunu engellemede kullanılabileceği, diyabet tedavisinde oksidatif stresi azaltmada antioksidan özelliğe sahip ajanların kullanımının gerekli olabileceği düşünülmektedir (51).

1.7. Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)

Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni *cyclin* adıyla da bilinmektedir. Hücre proliferasyonu ve DNA replikasyonunda görev alan *DNA polimeraz deltanın kofaktörüdür*. 36 kD ağırlığında, 262 aminoasit içeren bir nükleer proteindir. DNA polimeraz delta S fazında, DNA replikasyonunda rol alır ve hücre siklusunda düzenleyici bir proteindir. Hücre siklusu kontrolünde, DNA sentezi ve tamirinde görevli birçok protein PCNA'ya bağlanarak görev yaptığından bu olayların düzenlenmesinde PCNA önemli bir faktördür (53). Replikasyonun G1 fazında salınımı başlar, S fazında en üst düzeye ulaşır ve G2, M fazında azalır. PCNA, akut lösemi ve kronik myelositer lösemi krizinde *immünohistokimyasal proliferasyon markırı* olarak kullanılmaktadır. PCNA'yı aşırı tutan dokularda hiperplazi, displazi veya skuamöz hücreli karsinom saptanabilir. Son yıllarda parafinde bloklanan doku örneklerinden hazırlanan kesitlerde, PCNA ekspresyonunun belirlenmesinde monoklonal PCNA antikorları da kullanılmaktadır.

İmmünohistokimyasal boyamalarda önemli ölçüde çekirdek lokalizasyonu gösteren PCNA'nın, fetal dönemdeki yüksek farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerde, lenfoma ve osteosarkom hücrelerinde, plasentanın sitotrofoblastlarında hem çekirdek hem de sitoplazmada lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır. PCNA, hücre döngü oranını ve hücre proliferasyonunu göstermede, farklılaşma işlemine giren

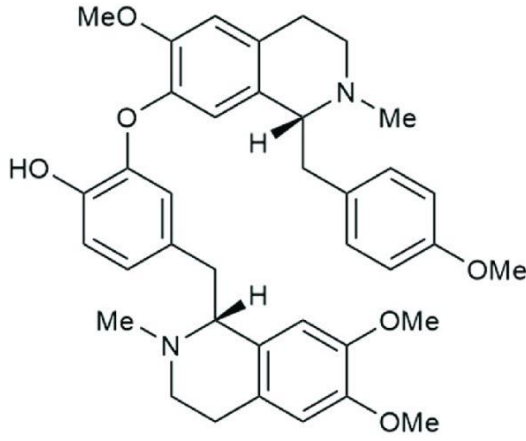
hücrelerden çoğalma özelliği olanları ayırıp tanımlamada kullanılabilen iyi bir belirteçtir.

Hücre siklusunu regüle eden antijenler proliferatif hastalıklarda yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Proliferatif diyabetik retinopati ve proliferatif vitreoretinopati gibi proliferatif retinal hastalıklarda gözlenen epiretinal membranların yapısında da hücre proliferasyon markırlarının arttığı gösterilmiştir (54).

1.8. Neferin

Neferin (Şekil 3), lotus (*Nelumbo nucifera*) bitkisinin yeşil tohumunda bulunan anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-diyabetik, antihipertansif, anti-aritmik, anti-koagulan, vasküler düz kas gevşetici ve anti-kanser etkili bisbenzilisoqunolin alkaloid bir biyoaktif bileşendir (55). Güney Asya ülkelerinde sinirsel hastalıklarda, uykusuzluk, kardiyovasküler ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. Neferin periferik kan hücreleri gibi sağlıklı normal hücrelerde ise TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar molekülleri baskılar, antioksidan kapasiteyi güçlendirir, oksidatif hasarı azaltır veya önler (56). Diyabete bağlı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (57).

Farklı kanser hücrelerinde daha önce yapılan çalışmalara göre Neferin, antikanser etkinliği yüksek doğal bir moleküldür. Bu çalışmalardan bazılarına göre Neferin, osteosarkoma hücrelerinde hücre döngüsünü durdurmakta (58), çoklu ilaç dirençli kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkin bir şekilde inhibe edebilmekte (59) ve ovaryum sarkomasında angiogenezi inhibe edebilmektedir (60). Neferin'in içerdiği çok sayıda biyoaktif bileşenden dolayı antimikrobiyal (61), sedatif etki (62), antidepresan (63), antidiyabetik, antiaterosklerotik, antiinflamatuvar ve obezite önleyici etkisinin de olduğu belirtilmektedir (64).



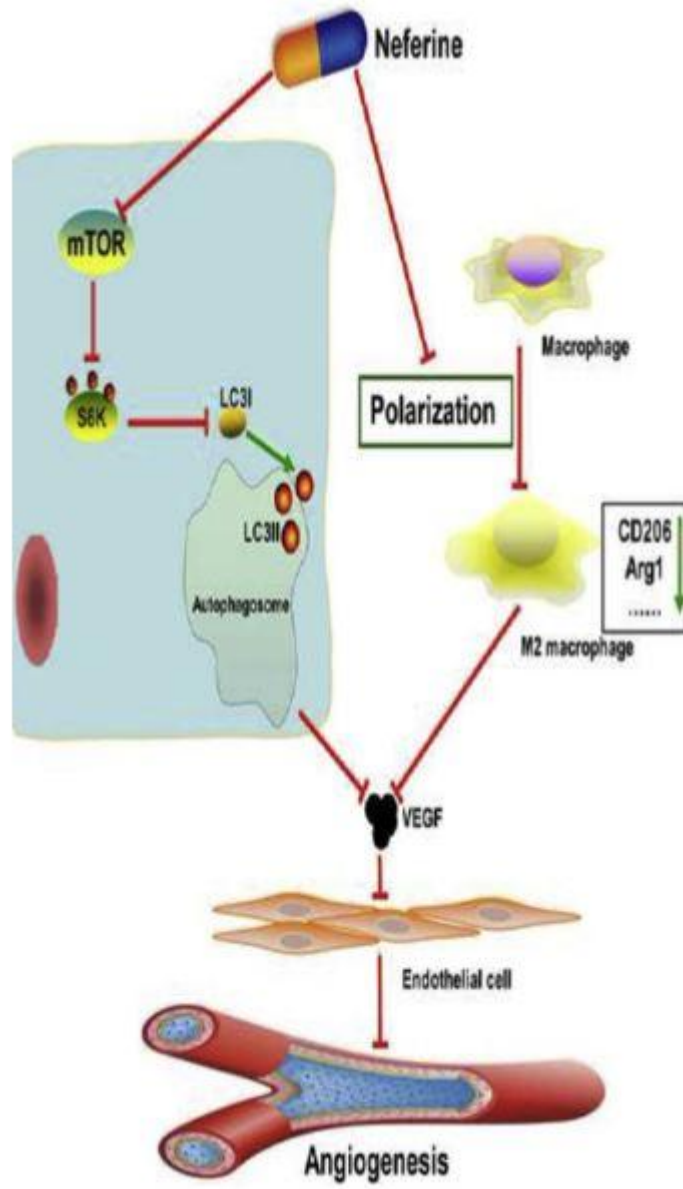
Şekil 3- Neferin'in kimyasal yapısı

Neferin vücuda alındıktan sonra hızlıca değişik organlarda dağıldığı bilinmekle beraber en yüksek konsantrasyonda karaciğerde metabolize olduğu bilinmektedir. Hayvan (sıçan) çalışmalarında Neferin'in ağırlıklı olarak karaciğerde metabolize olduğu ve CYP2D6 ile liensinine, izoliensinine, dimetil-liensinine ve dimetil-izoliensinine biyolojik dönüşüm geçirdiği gösterilmiştir (65). Neferin'in hipotansif ve trombosit agregasyon inhibisyonu etkisinin olduğu, bu etkiden sorumlu mekanizmanın TXA2/PGI2 ve cAMP/cGMP dengesinin düzenlenmesiyle ilgili olduğu belirtilmiştir (66). Neferin ayrıca trombüs oluşumuna karşı aktivite gösterdiği için bir anti-trombotik ve anti-agregan ajan olarak kullanılabilir. Bunu önceden oluşturulmuş agregatların çözülmesiyle birlikte trombositlerin aktivasyonunu, agregasyonunu ve yapışmasını önleyerek sağlamaktadır (67).

Hipoksi aracılı stres inflamasyon ve hücre ölümünden sorumludur. Neferin hipoksinin neden olduğu sitotoksositeye, inflamasyona ve oksidatif strese karşı insan periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde sitoprotektif etki gösterir (57). Ayrıca farelerde fibrozis üzerine Neferin'in anti-fibrotik etkisi gösterilmiş, Neferin'in anti-fibrotik etkisinin karaciğerde transforme edici büyüme faktörü β -1 (TGF- β 1) ekspresyonunun azalmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (68). Neferin'in anti-anjiyogenez mekanizmasının mTOR/p70S6K yolağının inhibisyonu yoluyla olduğu (şekil 4) (69), Neferin'in VEGF-A ekspresyonunu hafifçe inhibe ettiği, p-VEGF-R2 ve VEGF-R2 ekspresyonunu keskin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir (69).

Neferin; açlık kan glikozunu, trigliseritleri ve tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α)'yı azaltır ve ayrıca anti-obezite etkisi gösterir. Neferin'in insüline dirençli dişi Wistar sıçanlarında insülin duyarlılığını arttırdığı, insülin duyarlılığını arttırarak insülin seviyelerini de azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle Neferin'in diyabetes mellitus tip 2 tedavisinde kullanılan bir insülin duyarlılaştırıcı olan rosiglitazon ile eşdeğer olan güçlü bir anti-diyabetik ajan olduğu belirtilmiştir (70). Tip 2 diyabetik sıçanlarda Neferin tedavisinden sonra, vücut ağırlığı, açlık kan glikozu, kan basıncı, toplam kolesterol seviyesi, trigliseritler ve insülin seviyesi azalırken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesinin tedavi edilmemiş diyabetik sıçanlara kıyasla arttığı gösterilmiştir (71).

Yüksek glikoz kaynaklı oksidatif stres, endotelyal disfonksiyon ve apoptozdan sorumludur ve bunlar diyabetik vaskülopatinin önemli özellikleridir. İnsan umbilikal ven endotelyal hücrelerinin (HUVEC) Neferin ile muamelesi üzerine, hipergliseminin neden olduğu HUVEC apoptozunun etkili bir şekilde baskılandığı gösterilmiş ve Neferin'in diyabetik vaskülopati tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (72). Aynı zamanda Alzheimer hastalığına ve diğer oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı terapötik ve önleyici bir alternatif olarak araştırılması gereken bir ajan olduğu düşünülmektedir (73).



Şekil 4. Neferin'in Antianjiogenezde etki mekanizması (69).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 18.09.2019 tarih ve 169 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji, Biyokimya laboratuvarlarında yapılmıştır.

2.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Deneysel çalışmada kullanılan Sprague Dawley cinsi 35 adet 8-10 haftalık erişkin erkek ratlar FÜDAM biriminden temin edilmiştir. Ratlar FÜDAM hayvan laboratuvarında bulundukları ortamın sıcaklığı 22–25°C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00- 07:00) karanlıkta takip edildi. Ratlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslenildi ve her gün altları temizlendi. Deney başlangıcı ve sonunda hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı.

2.2. Diyabet İndüksiyonu

Diyabet oluşturmak için 21 adet rata 60mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar, Pharmacia, France) 0,4ml (0,1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4,5) çözündürülerek 26 gauge'lık insülin enjektörüyle intraperitoneal (i.p) olarak tek doz uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan alınarak glukometre cihazı ile açlık kan glikozu ölçüldü. Açlık kan glikozu > 250 mg/dl'yi geçen ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Chemstrip bG (Bio-Dynamics, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) ile yapıldı. Ratların açlık kan glikoz düzeyleri 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah saat 8-10 arasında ölçüldü.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 8-10 haftalık 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek ratlar 5 gruba ayrıldı;

Grup I (Kontrol grubu) (n=7); Deney süresi olan 4 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (Sham grubu) (n=7); 60 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum sitrat tamponunda (pH:4,5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca her gün 0,25 ml/kg %0,9 normal salin intraperitoneal uygulandı.

Grup III (Neferin grubu) (n=7); Normal sağlıklı ratlara deney süresi boyunca her gün 4 mg/kg Neferin intraperitoneal uygulandı.

Grup IV (Diabetes Mellitus + Bevacizumab grubu) (n=7); 60 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum sitrat tamponunda (pH:4,5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı ve 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kanda kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra tek seferlik intraperitoneal 0,01mL (2,5 mg/kg) Bevacizumab uygulandı ve devam eden günlerde deney süresi boyunca her gün 0,25 ml/kg %0,9 normal salin intraperitoneal uygulandı.

Grup V (Diabetes Mellitus + Neferin grubu) (n=7); 60 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1M sodyum sitrat tamponunda (pH:4,5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı ve 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kanda kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca her gün 4 mg/kg Neferin intraperitoneal uygulandı.

2.4. Örneklerin Alınması

Deneyin dördüncü haftasının sonunda tüm gruptaki ratlar tartıldıktan sonra, ketamin (75mg/kg)+xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Çalışmada biyokimyasal analizlerin tayini için kullanılacak kan numuneleri her bir ratdan uygun şekilde, K3-EDTA içeren tüplere alındı. Alınan kan numuneleri 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-German) plazmaları ayrıldı. Ratların göz dokuları dekapitasyonun ardından hızla çıkarıldı. Göz doku örnekleri 0,01M'lık Fosfat tampon (w:v; 1:3)

çözeltisi içerisinde, 16000 rpm’de 4 dakika uygun şartlarda homojenize edildi. Homojenat 5000 xg’de 10 dk. (+4°C’de) santrifüjlenerek süpernatantları ayrıldı ve hemen çalışıldı. Tüm gruplara ait göz dokuları histolojik çalışma için % 10’luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

2.5. Biyokimyasal Çalışma

2.5.1. Kan glikoz düzeyleri

Çalışma süresince kan glikoz düzeyleri glukometre [Chemstrip bG (Bio-Dynamics, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)] ile ölçüldü. Diğer biyokimyasal çalışmalar Aydın (74)’nın kullandığı moleküler teknikler modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapıldı.

2.5.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Seviyesi Ölçümleri

Serum ve süpernatant TAS ve TOS düzeyleri Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemiyle çalışıldı. Süpernatantlardaki protein düzeyleri Lowry metodu (75) ile tayin edildi. Bu yöntemin prensibi; alkali ortamda proteinlerin Folin-Fenol ayırıcı ile mavi bir renk oluşturmaya dayanmaktadır.

2.5.2.1. TAS Ölçümü

Plazma ve süpernatant TAS düzeyleri, rat TAS ELISA kiti (Sunred Biotechnology Company, katalog no; 201-11-2672) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plazma sonuçları U/ml, süpernatant sonuçları U/mg.protein olarak ifade edildi. Kitin ölçüm aralığı 0,2-60 U/ml ve sensitivitesi 0,175 U/ml idi. Intra-Assay’i CV<%9; Inter Assay’i CV<%11 idi.

2.5.2.2. TOS Ölçümü

Plazma ve süpernatant TOS düzeyleri, rat TOS ELISA kiti (Sunred Biotechnology Company, katalog no; 201-11-1669) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plazma sonuçları nmol/ml, süpernatant sonuçları nmol/mg.protein olarak ifade edildi. Kitin ölçüm aralığı 0,1-20 nmol/ml ve sensitivitesi 0,073 nmol/ml idi. Intra-Assay’i CV<%8; Inter Assay’i CV<%10 idi.

2.6. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan göz dokuları, % 10’luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra musluk suyunda yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 1). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında kesitler alındı.

Tablo 1. **Histolojik takip serileri**

Sıra	İşlem Süresi
1)%70Alkol	2 saat
2)%80Alkol	1,5 saat
3)%96Alkol I	30 dakika
4)%96Alkol II	30 dakika
5)%100Alkol I	30 dakika
6)%100Alkol II	30 dakika
7)Alkol+Xylol	15 dakika
8)Xylol I	15 dakika
9)Xylol II	15 dakika
10)Yumuşak parafin+Xylol	45 dakika
11)Yumuşak parafin	1 saat
12)Yumuşak parafin+Sert parafin	1,5 saat
13)Sert parafin	3 saat
14)Gömme	

2.7. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan 4–6µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6,0'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline,P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solusyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilüe edilen VEGF ve PCNA primer antikorlar (Vascular endothelial growth factor, E2611, Spring Bioscience, USA, Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, M0879, Dako, Baltimore, MD, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbitIgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi. Dijital fotoğraflar Olympus DP Controller(2002-2006 Olympus Corporation) ile çekildi.

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25,0.4:%26-50, 0.6:%51-75,0.9:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak *histoskor* oluşturuldu. Histoskor = yaygınlık x şiddet

2.8. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak ve üretici firmanın talimatları uygulanarak apoptozise giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. % 0,05'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer+%30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer'da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilin ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik hücreler sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. TUNEL boyama prosedürü.

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı(% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksisilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma	

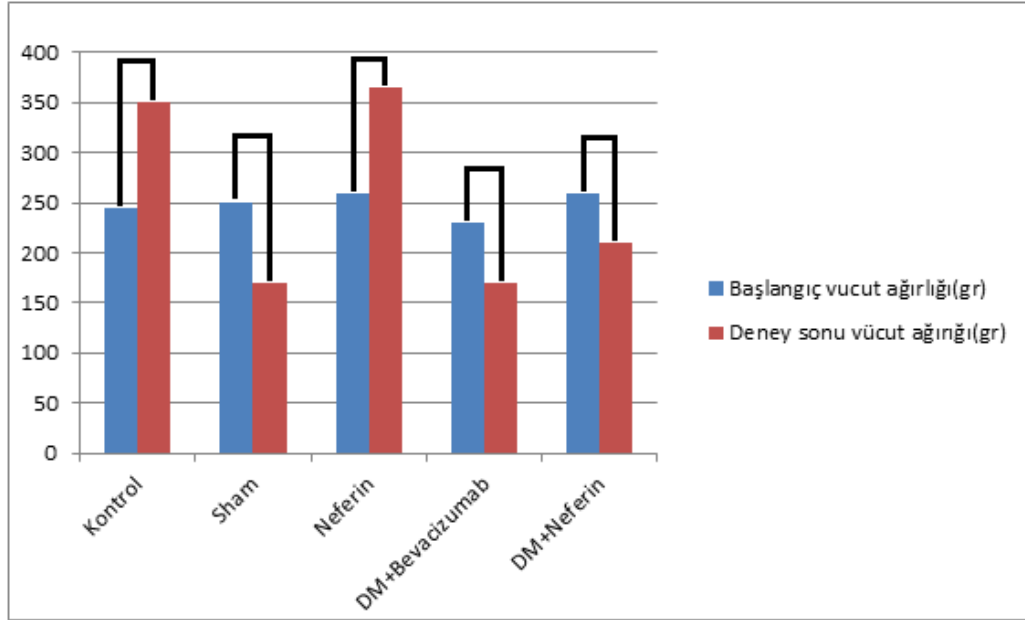
2.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve Posthoc Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

Başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları tüm gruplara ait ratlarda değerlendirildiğinde; Kontrol ve Neferin gruplarındaki ratların vücut ağırlıkları başlangıç vücut ağırlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.05$). Diyabet, Diyabet+Neferin ve Diyabet+Bevacizumab gruplarındaki ratların vücut ağırlıkları ise başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p<0.05$) (Şekil 5).



— $p<0,05$ - - - $p>0,05$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Şekil 5. Deney hayvanlarının başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları (gr).

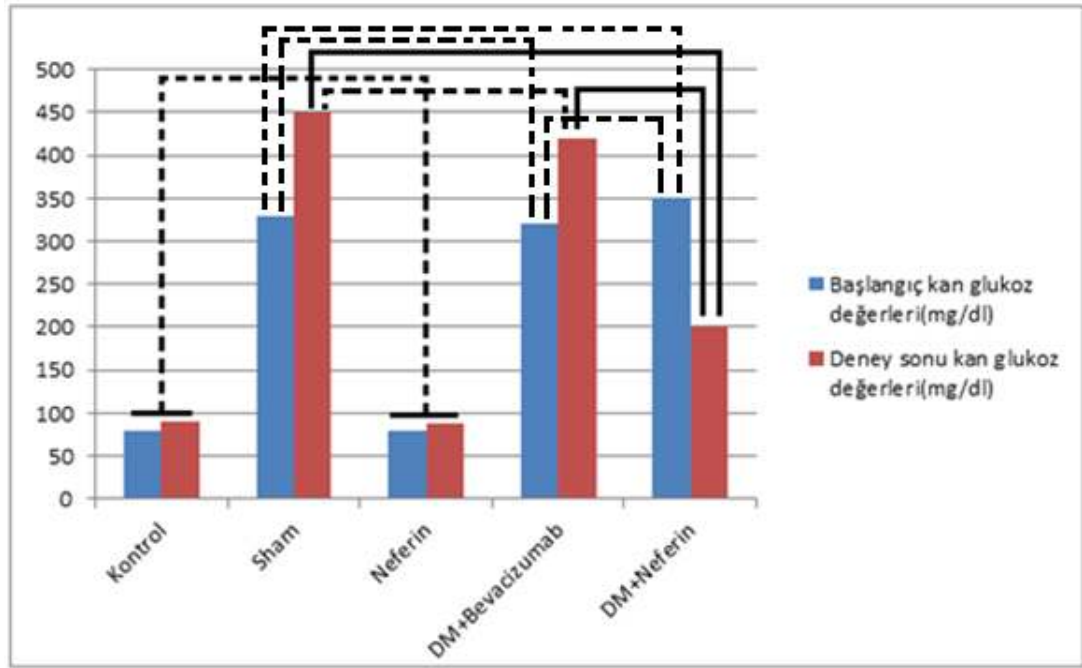
3.2. Biyokimyasal Bulgular

3.2.1. Kan glikoz miktarları

Başlangıç kan glikoz miktarları tüm gruplara ait ratlarda değerlendirildiğinde; Kontrol ve Neferin gruplarındaki ratların kan glikoz miktarlarında istatistiksel olarak

anlamli bir fark gorulmedi. Diyabet grubu, Diyabet+Bevacizumab grubu ve Diyabet+Neferin gruplari Kontrol grubuyla karstislastirildiginda her uc grupta da kontrol grubuna gore istatistiksel olarak anlamli bir sekilde yuksek goruldu ($p<0.05$). Diyabet grubu, Diyabet+Bevacizumab grubu ve Diyabet+Neferin gruplari karstislastirildiginda istatistiksel olarak anlamli bir fark gorulmedi.

Deney sonu kan glikoz miktarlari tum gruplara ait ratlarda degerlendirildiginde; Kontrol ve Neferin gruplarindaki ratlari kan glikoz miktarlari istatistiksel olarak anlamli bir fark gorulmedi. Diyabet grubunda Kontrol grubuyla karstislastirildiginda istatistiksel olarak anlamli bir sekilde yuksek goruldu ($p<0.05$). Diyabet+Bevacizumab grubu ile Diyabet grubu karstislastirildiginda kan glikoz duzeylerinde istatistiksel olarak anlamli bir fark gorulmedi. Diyabet+Neferin grubunda Diyabet grubu ile karstislastirildiginda kan glikoz duzeyleri istatistiksel olarak anlamli bir sekilde dusuk izlendi ($p<0.001$). Diyabet+Neferin grubunda Diyabet+Bevacizumab grubu ile karstislastirildiginda kan glikoz duzeyleri istatistiksel olarak anlamli bir sekilde dusuk izlendi ($p<0.05$) (Sekil 6).



— $p<0,05$ - - - $p>0,05$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

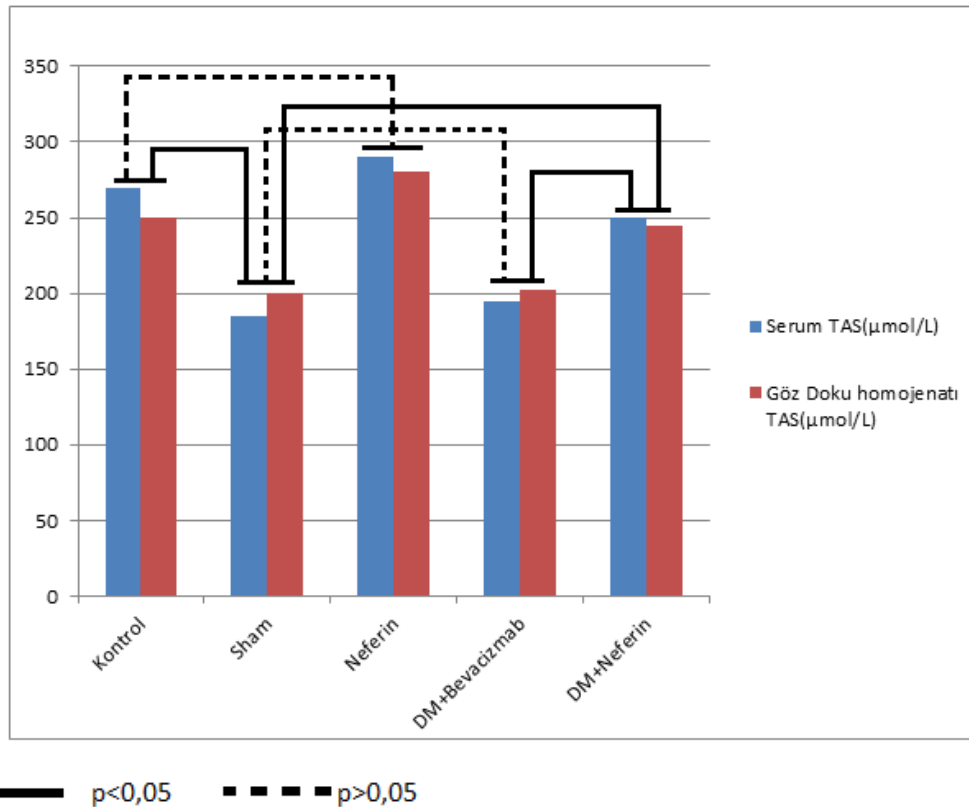
Şekil 6. Deney hayvanlarının başlangıç ve deney sonu (4. hafta) kan glukoz miktarları (mg/dl).

3.2.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS)

Düzeyleri

3.2.2.1. TAS Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum ve göz doku homojenatı TAS düzeyleri değerlendirildiğinde; TAS düzeyleri; Kontrol ve Neferin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Diyabet grubunda Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma izlendi ($p<0.006$). Diyabet+Bevacizumab grubunda Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Diyabet+Neferin grubunda Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış izlendi ($p<0.005$). Diyabet+Neferin grubunda Diyabet+Bevacizumab grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış izlendi ($p<0.005$) (Şekil 7).

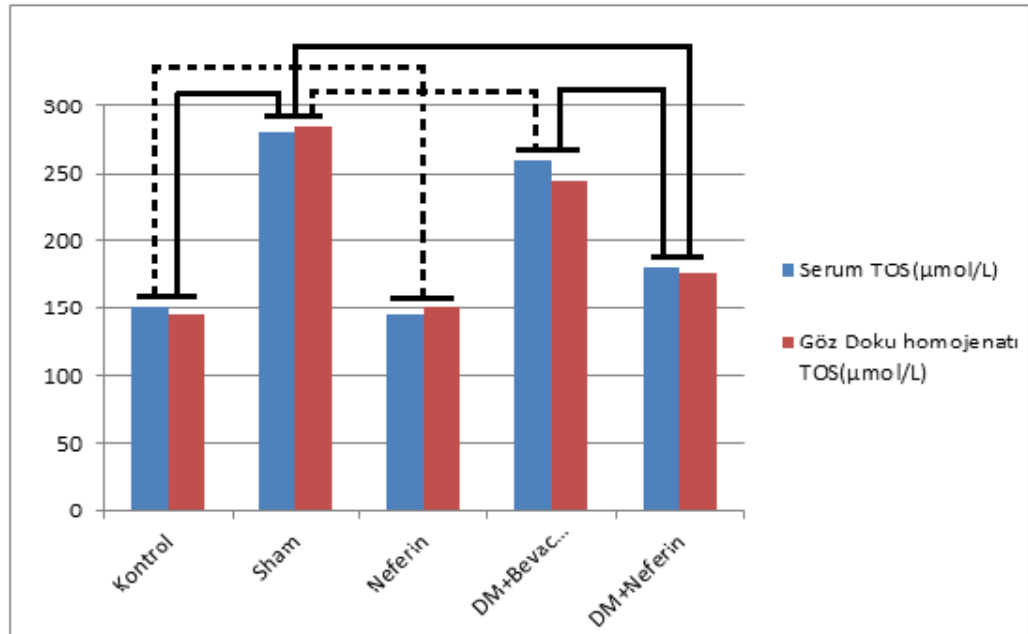


Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Şekil 7. Serum ve göz doku homojenatı TAS düzeyleri.

3.2.2.2. TOS Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum ve göz doku homojenatı TOS düzeyleri değerlendirildiğinde; TOS düzeyleri; Kontrol ve Neferin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Diyabet grubunda Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış izlendi ($p<0.001$). Diyabet+Bevacizumab grubu ile Diyabet grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Diyabet+Neferin grubunda Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma izlendi ($p<0.05$). Diyabet+Neferin grubunda Diyabet+Bevacizumab grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma izlendi ($p<0.05$) (Şekil 8).



— $p<0,05$ - - - $p>0,05$

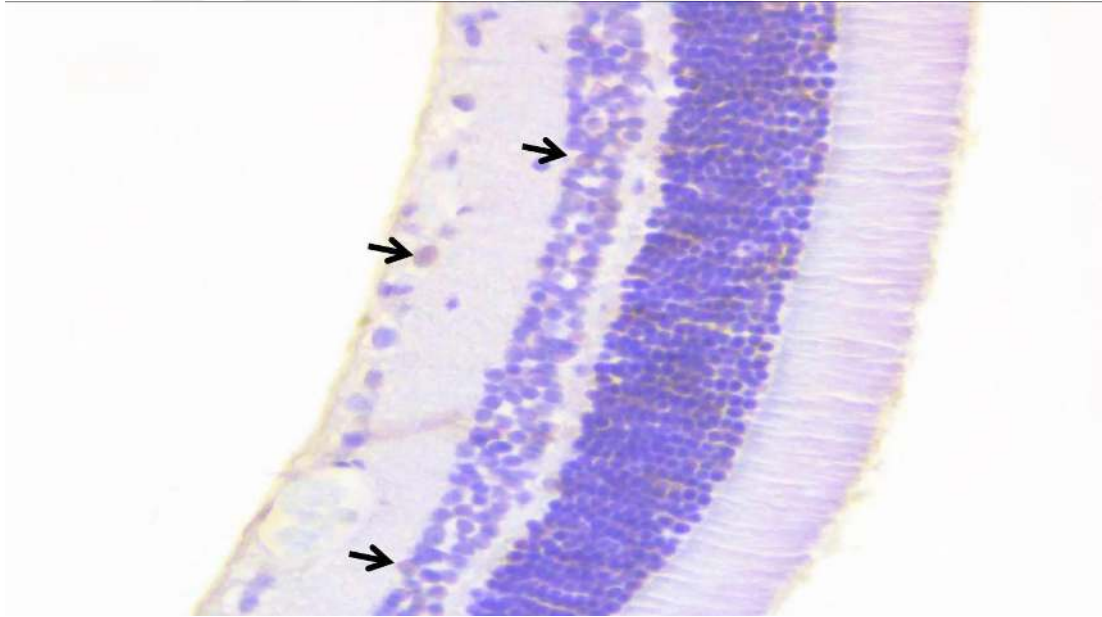
Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Şekil 8. Serum ve göz doku homojenatı TOS düzeyleri.

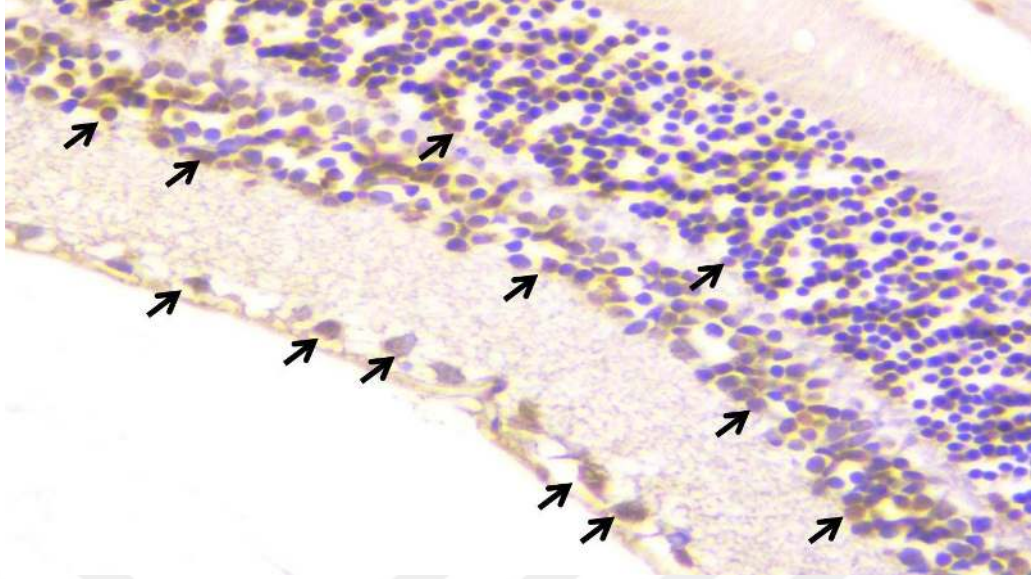
3.3. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği retina dokusunda gangliyon hücre tabakasında gözlemlendi.

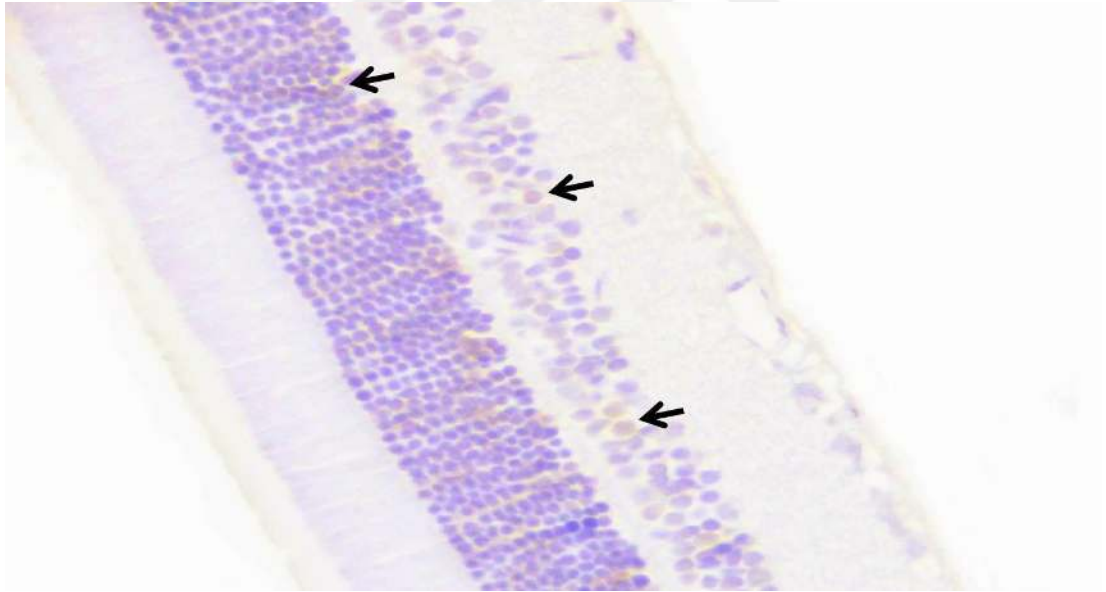
TUNEL pozitifliği; Kontrol (şekil 9) ve Neferin (şekil 11) grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Diyabet grubunda (şekil 10) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p<0.001$). Diyabet+Bevacizumab (şekil 12) grubunda Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p<0.001$). Diyabet+Neferin (şekil 13) grubunda Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p<0.001$). Diyabet+Neferin grubu ile Diyabet+Bevacizumab grupları arasında anlamlı fark görülmedi. Apoptotik indeks (%) (Şekil 14).



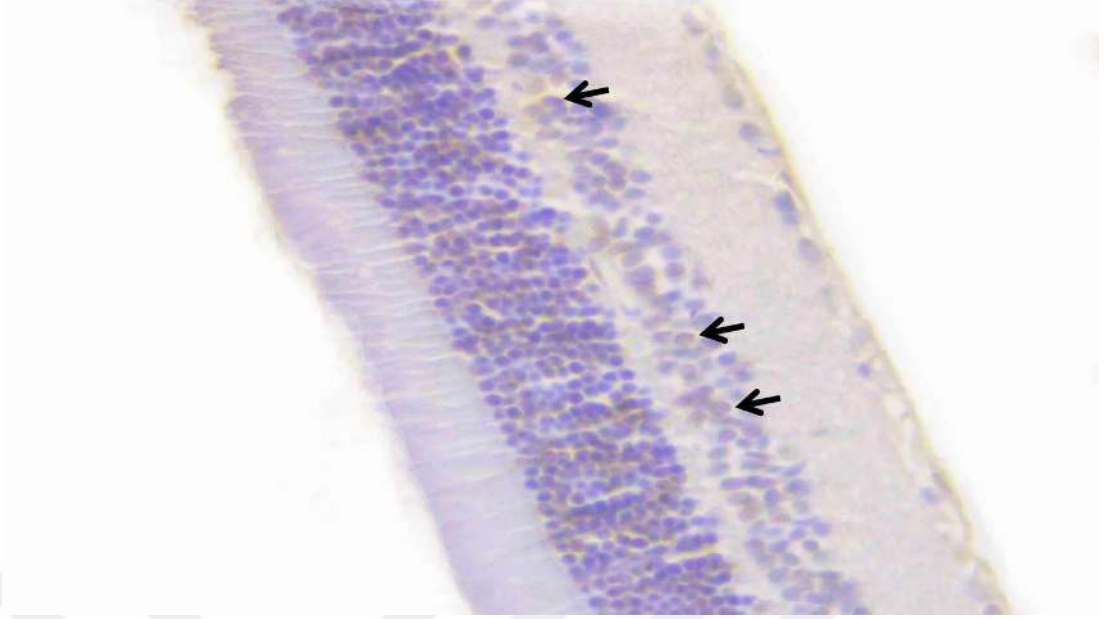
Şekil 9. Kontrol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



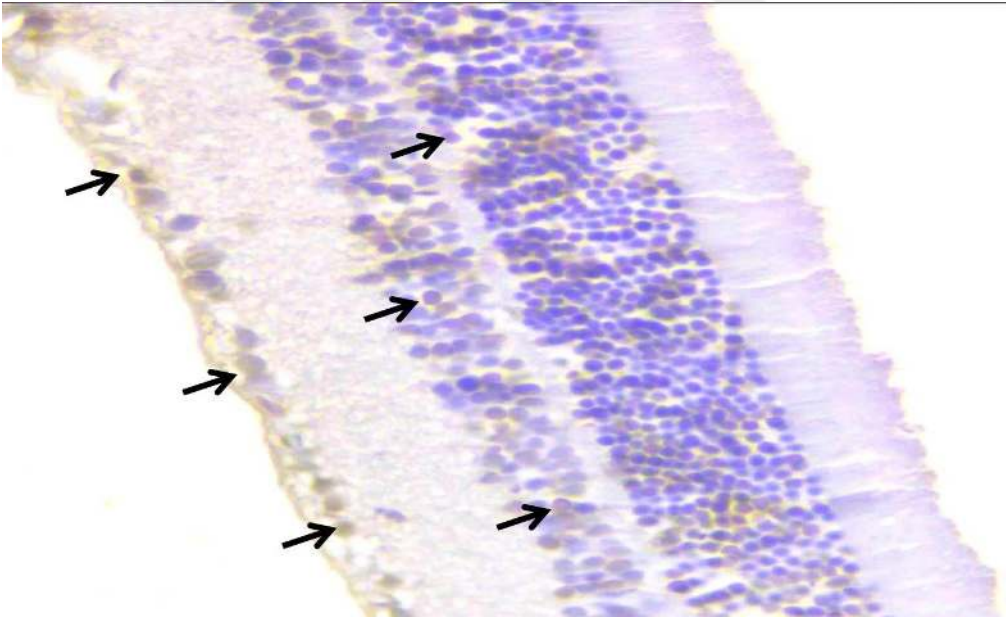
Şekil 10. Sham (DM) grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



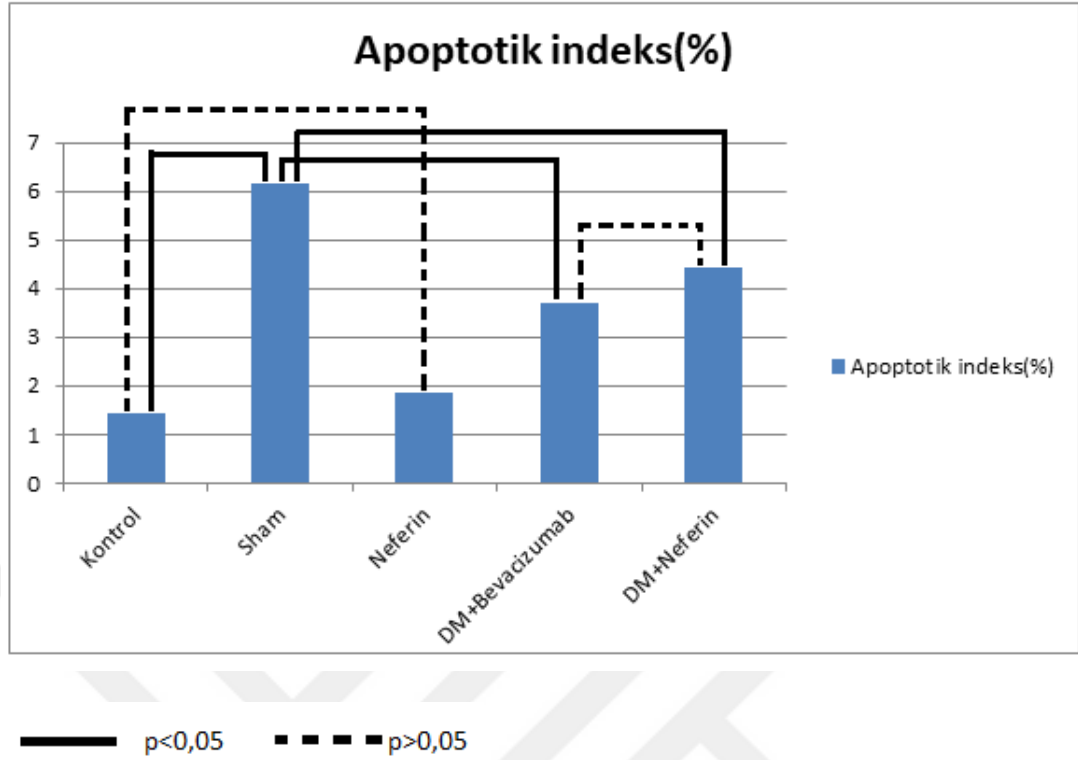
Şekil 11. Neferin grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



Şekil 12. DM+Bevacizumab grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



Şekil 13. DM+Neferin grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Şekil 14. Apoptotik İndeks.

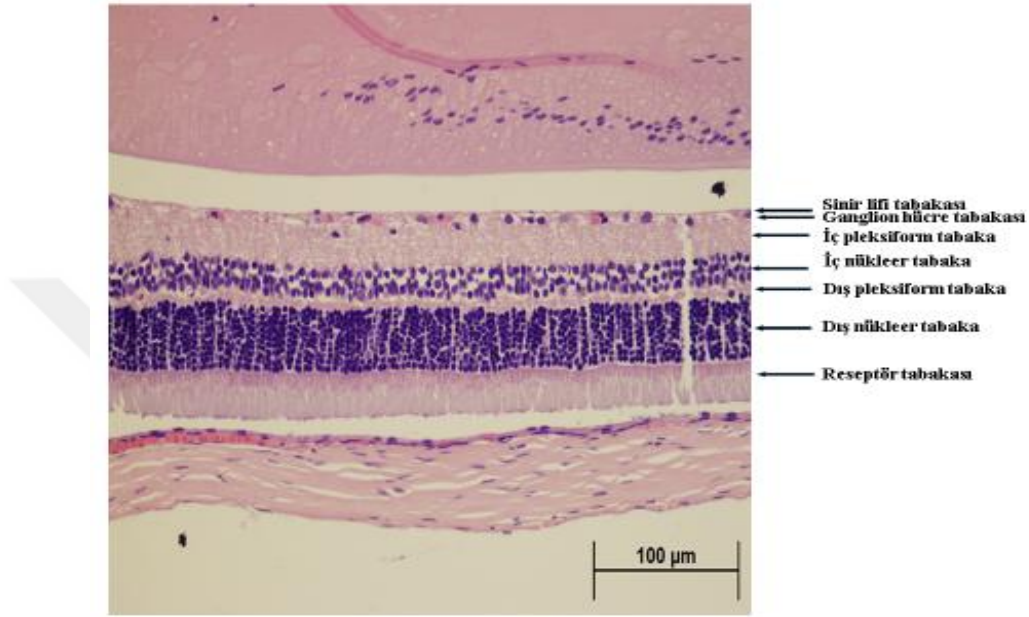
3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

3.4.1. VEGF İmmünreaktivitesi

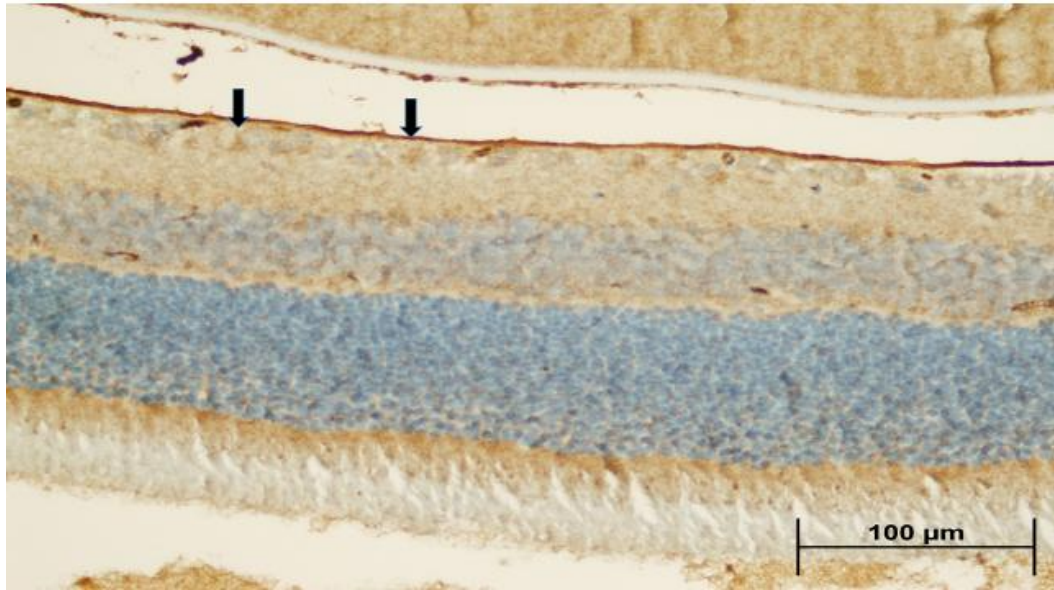
Vasküler endotelyal büyüme faktörü immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; VEGF immünreaktivitesi retinada gangliyon hücre tabakasında sitoplazmik kahverenkli boyanma (siyah ok) olarak gözlemlendi. Şekil 15’te kontrol grubuna ait hematoksil-eozin (H&E) boyalı kesitlerde retina tabakaları da gösterilmiştir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü immünreaktivitesi; Kontrol (şekil 16) ve Neferin (şekil 18) grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Diyabet grubunda (şekil 17) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p<0.001$). Diyabet+Bevacizumab grubunda (şekil 19) Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi.

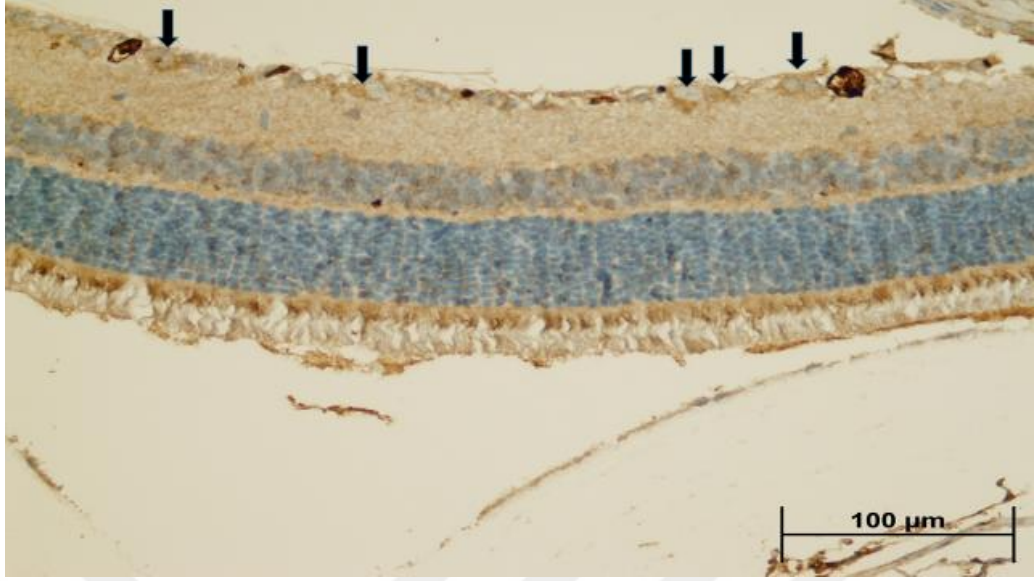
($p < 0.005$). Diyabet+Neferin grubunda (şekil 20) Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p < 0.005$). DM+Bevacizumab grubu ile DM+Neferin grubu karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Histoskor (Şekil 21).



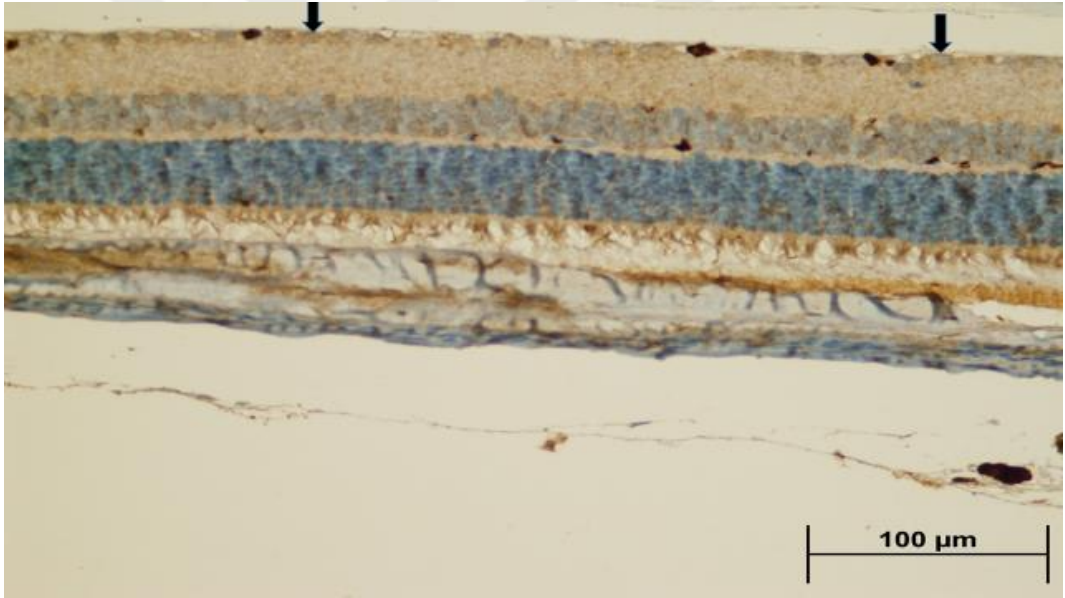
Şekil 15. Kontrol grubuna ait H&E boyalı kesit üzerinde retina tabakaları.



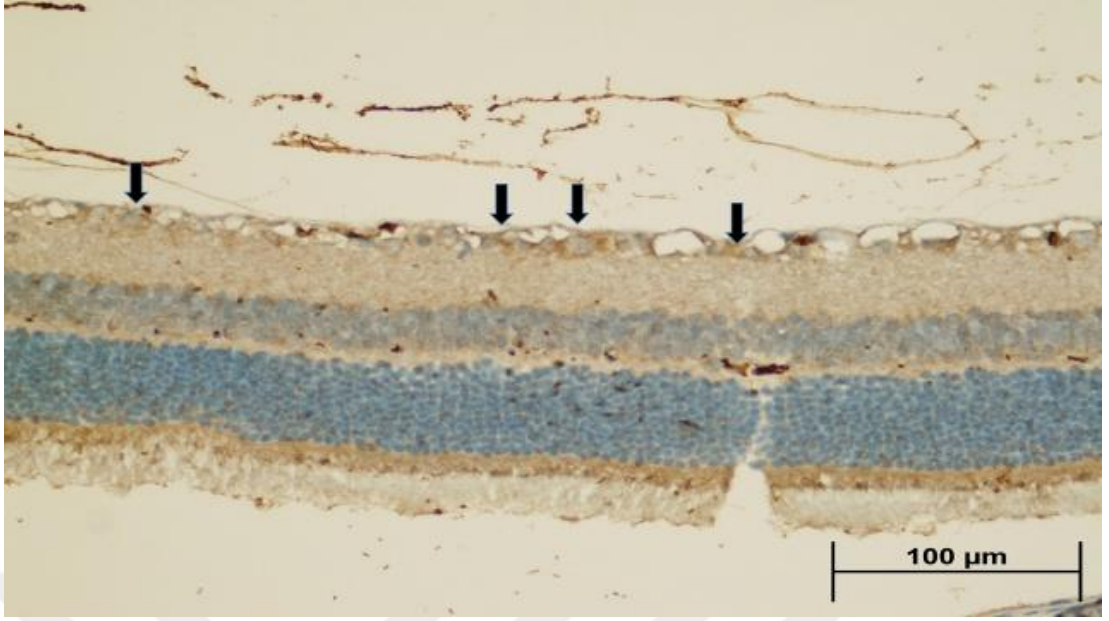
Şekil 16. Kontrol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.



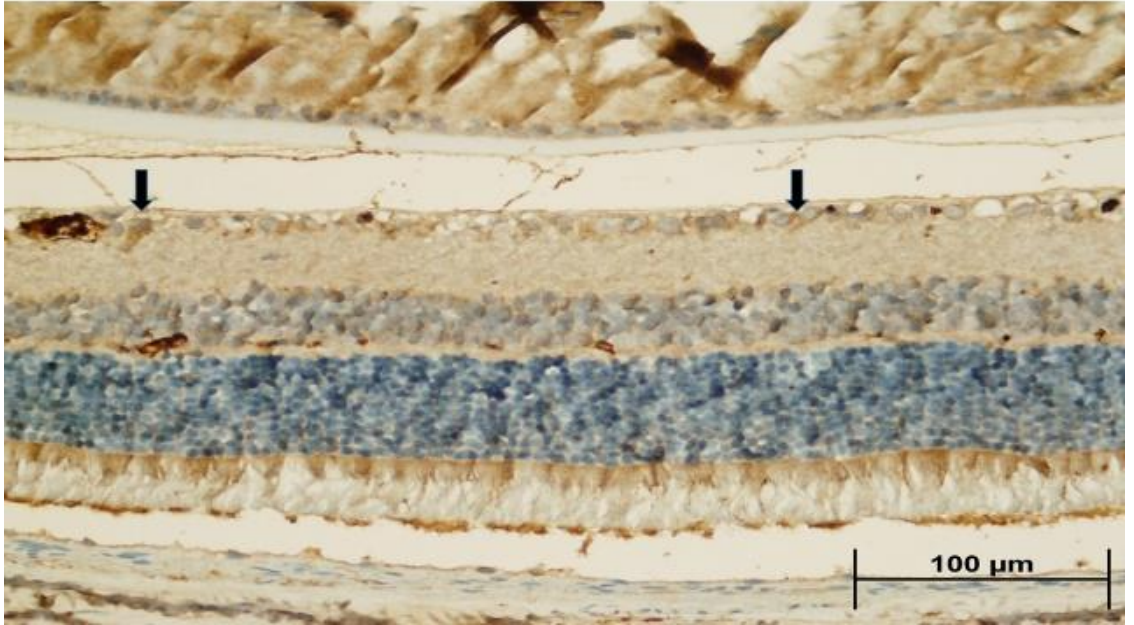
Şekil 17. Sham grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.



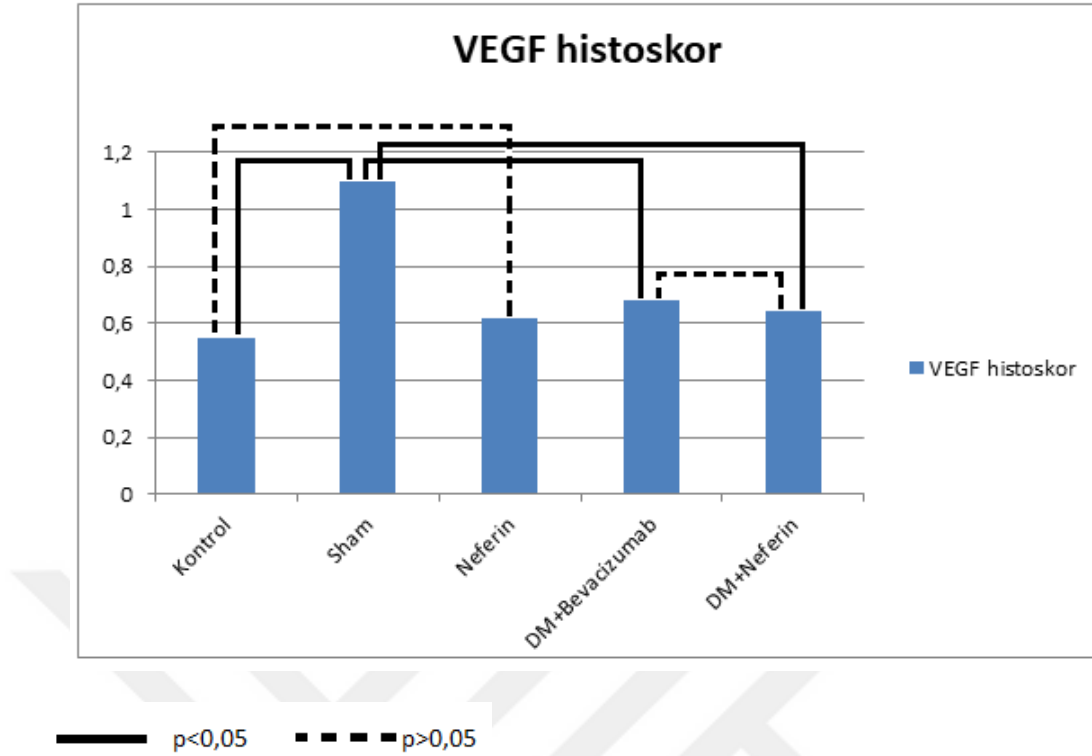
Şekil 18. Neferin grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.



Şekil 19. DM+ Bevacizumab grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.



Şekil 20. DM+ Neferin grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi.



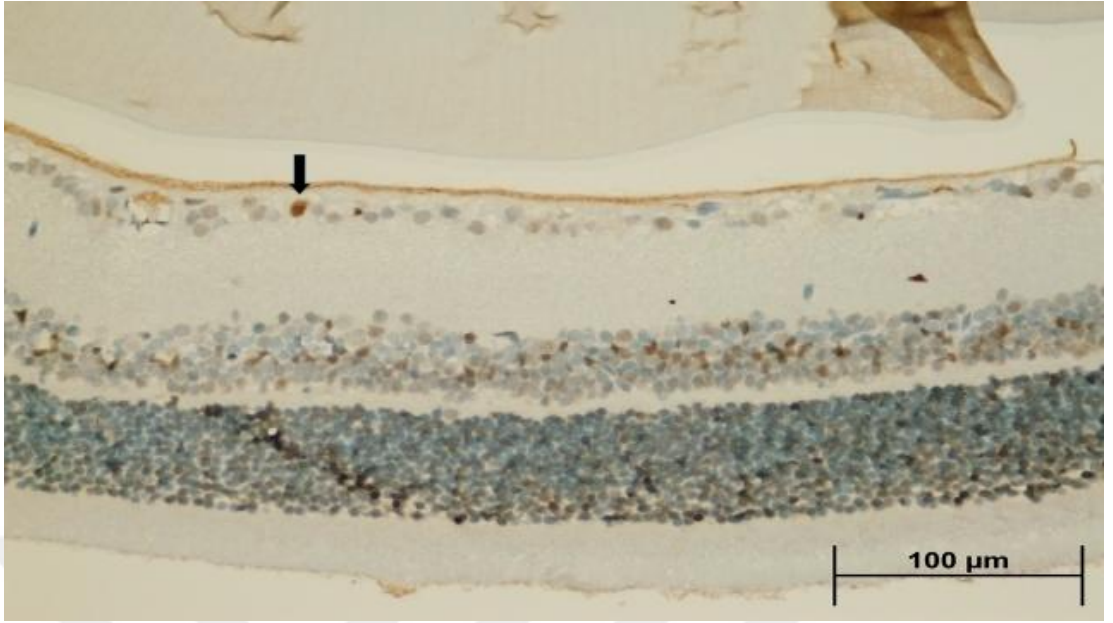
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Şekil 21. VEGF Histoskoru.

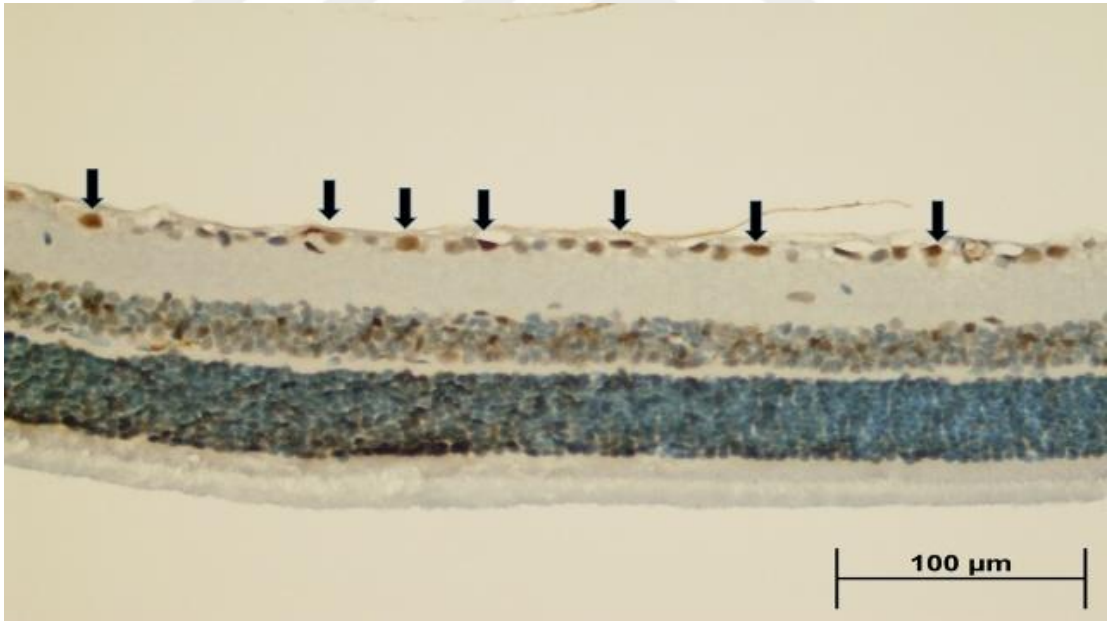
3.4.2. PCNA İmmünreaktivitesi

Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; PCNA immünreaktivitesi retinada gangliyon hücre tabakasında nükleer kahverenkli boyanma (siyah ok) olarak gözlemlendi.

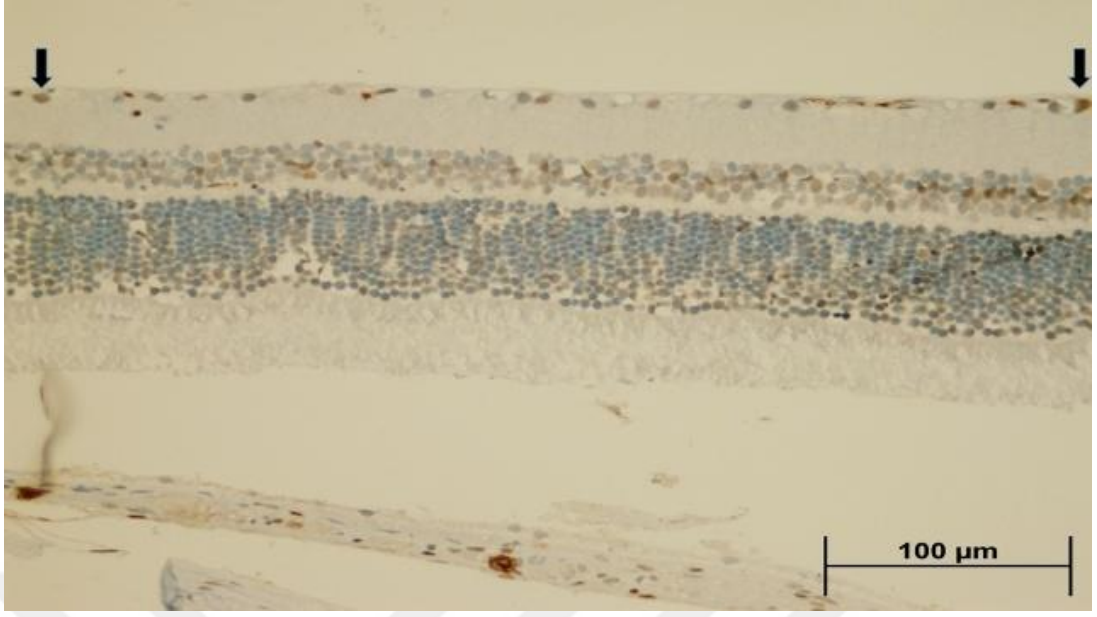
Proliferatif hücre nükleer antijeni immünreaktivitesi; Kontrol (şekil 22) ve Neferin (şekil 24) grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Diyabet grubunda (şekil 23) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PCNA immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak bulundu ($p<0.011$). Diyabet+Neferin (şekil 26) ve Diyabet+Bevacizumab (şekil 25) grupları Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında PCNA immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Diyabet+Neferin grubu ile Diyabet+Bevacizumab grupları karşılaştırıldığında PCNA immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Histoskor (Şekil 27).



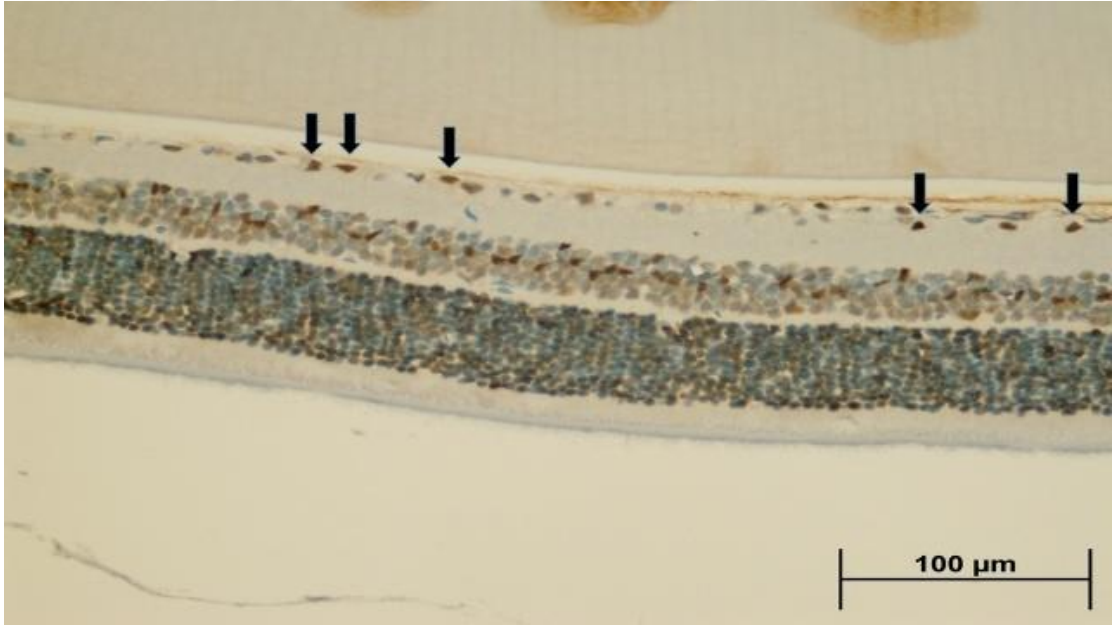
Şekil 22. Kontrol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.



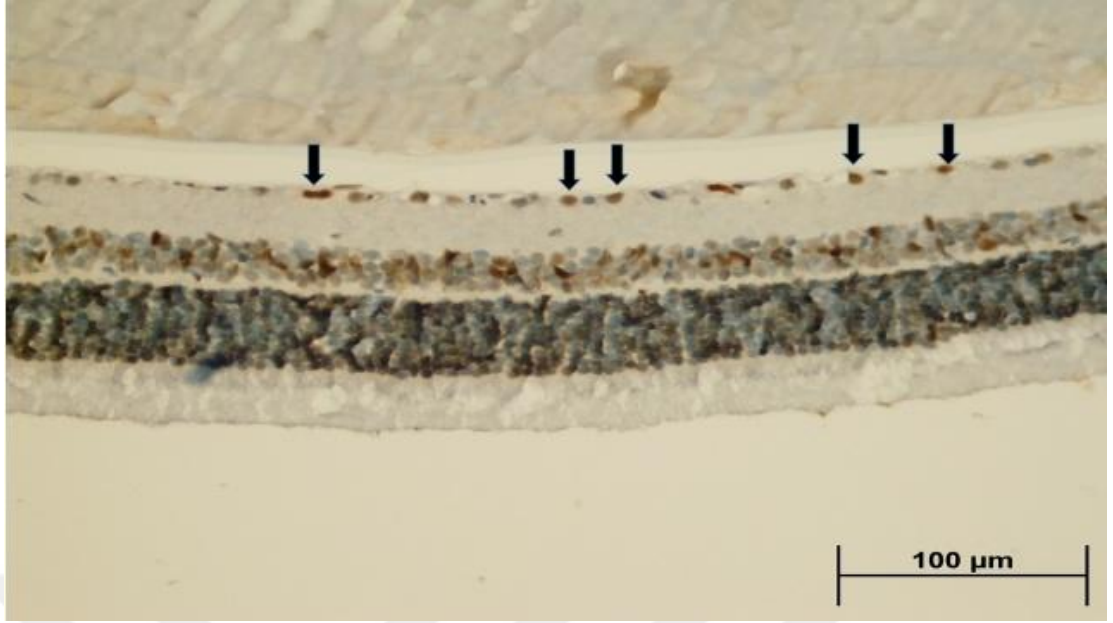
Şekil 23. Sham grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.



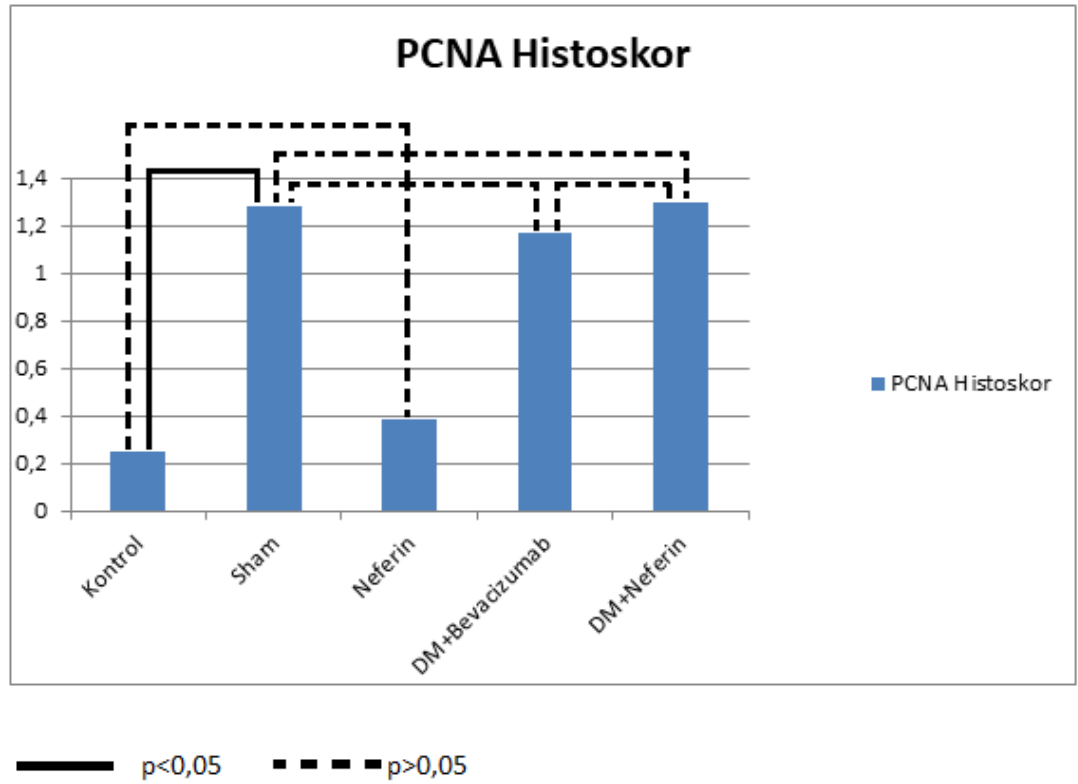
Şekil 24. Neferin grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.



Şekil 25. DM+ Bevacizumab grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.



Şekil 26. DM+ Neferin grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi.



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Şekil 27. PCNA Histoskoru.

4. TARTIŞMA

Diyabetes Mellitus; karbonhidrat, yağ ve proteinlerin insülin eksikliği ya da insülinin etkisindeki sorunlar nedeniyle yeterli düzeyde kullanılmadığı, vasküler ve nöropatik komplikasyonlarla karakterize olan, temel metabolik bozukluğun hiperglisemi olduğu kronik bir hastalıktır.

Her geçen yıl hızlı bir şekilde artmakta olan diyabetli insan sayısının Uluslararası Diyabet Federasyonuna (IDF) göre 2030 yılında 435 milyon kişiye yükselmesi beklenmektedir (76). Bu diyabetli hasta sayısının artışı ile orantılı olarak, ülkelerin sağlık harcamaları da artmakta, hastalığın ve komplikasyonlarının tedavisi için etkin ve ekonomik alternatif çözüm yolları araştırılmaktadır.

Diyabete bağlı uzun dönemde oluşan komplikasyonların neden olduğu morbidite ve mortalite; somatik ve otonom sinir sisteminin ikisini de içeren nöropatiler, kapiller bazal membran kalınlaşmasıyla ilişkili olan mikrovasküler hastalık, hızlanmış aterosklerozla birlikte görülen makrovasküler hastalık, kas zayıflığıyla birlikte görülen nöromusküler disfonksiyon ve enfeksiyonlara direncin azalmasıyla oluşmaktadır. Gelişen kronik komplikasyonlar; göz, sinir sistemi, böbrek, kalp ve kan damarlarını etkilemektedir (77).

İnsülinin kullanılmaya başlanması diyabette kısmi olarak problemin çözümüne katkı sağladıysa da, günümüzde kardiyovasküler sistem hastalıkları gibi birçok hastalığa zemin hazırladığı ve retinopati bulgularını ağırlaştırdığından dolayı hala gündemdeki yerini korumaktadır. Çünkü diyabet sadece insülin eksikliğinden değil, aynı zamanda insülin direncinden veya her ikisinin birlikteliğinden kaynaklanan kompleks olaylardan oluşmaktadır. Bu komplike, kompleks olaylar zincirinin altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak için günümüzde çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Tüm bunlara rağmen diyabetin etyopatogenezi tam olarak anlaşılamamıştır.

Mevcut tedavi modaliteleri olan insülin tedavisi, oral antidiyabetikler ve glisemik kontrol, mikrovasküler komplikasyonların progresyonunu önlemede yeterli değildir. Metabolik regülasyona rağmen hiperglisemik vasküler stres devam etmektedir ve bu durum ‘metabolik hafıza’ olarak adlandırılmaktadır.

Vasküler endotelial disfonksiyon; mikroanjiyopati ve makroanjiyopati gelişiminde en önemli faktör olarak görülmektedir. DR patogeneğinde; hiperglisemi sonrası retina kapillerlerinde gelişen dejenerasyon, endotelde perisit kaybı ve endotel proliferasyonu, bazal membranda kalınlaşma ve oklüzyon etkilidir. DR ve komplikasyonlarının oluşmasında, toksisite, enflamasyon, anjiyogenez ve apoptozisin önemli yeri vardır.

Deneyisel diyabetik ratlar üzerinde Su ve ark.'nın (78) yaptıkları çalışmalarında, streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların retinopati progresyonunun izleminde; erken dönemde hiperglisemi ve mikroanjiyopati gelişimi görülmüş, ratlar normoglisemik hale getirilerek uzun dönem takipleri değerlendirildiğinde, normoglisemiye rağmen retinopati progresyonunun devam ettiği saptanmıştır. Diyabetin erken döneminde, dördüncü haftaya kadar vasküler yapılarda henüz spesifik ve fonksiyonel değişimler başlamadan morfolojik değişikliklerin başladığı belirtilmiş, geç dönemde de kan şekeri regülasyonuna rağmen progresyonun devam ettiği gözlenmiştir (79). Bu durum diyabetik retinopati progresyonundaki diğer etkenlerin önemini göstermektedir.

Deneyisel diyabetik rat modeli oluşturulan çalışmalarda diyabete bağlı ratlarda vücutta kilo kaybının meydana gelebildiği gösterilmiştir. Nitekim Cam ve ark. yaptıkları çalışmalarında (80); 4 ve 6 haftalık deney sonunda diyabetik ratların vücut ağırlıklarında anlamlı azalma olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da Cam ve ark.'nın çalışmalarıyla uyumlu olarak diyabet grubundaki ratlarda deney başlangıcına göre anlamlı kilo kaybı olduğunu saptadık. DM+Neferin ve DM+Bevacizumab gruplarında da deney başlangıcına göre anlamlı kilo kaybı olduğunu gördük. Kontrol ve Neferin gruplarında ise deney başlangıcına göre anlamlı kilo artışı olduğunu saptadık. Bu bulgularımıza göre Neferin'in vücut ağırlığı üzerine olumlu ya da olumsuz etkisinin olmadığı sonucuna vardık.

Y. Pan ve ark.'nın ratlar üzerinde yaptığı çalışmalarında (70) Neferin'in; açlık kan şekeri, insülin seviyelerini azalttığı, insülin duyarlılığını artırdığı gösterilmiş, Neferin'in; diyabetes mellitus tip 2 tedavisinde kullanılan bir insülin duyarlılaştırıcı olan rosiglitazon ile eşdeğer olabilecek güçlü bir anti-diyabetik ajan olabileceği belirtilmiştir. G.Li ve ark.'nın Tip 2 diyabetik ratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında; Neferin tedavisinden sonra, açlık kan glikozu, kan basıncı, toplam kolesterol seviyesi,

trigliseritler ve insülin seviyesi azalırken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesinin tedavi edilmemiş diyabetik ratlara kıyasla arttığını göstermişlerdir (71).

Çalışmamızda; DM+Neferin grubunda kan glikoz düzeyinde Diyabet grubuna göre anlamlı bir düşüş olduğunu saptadık. Diyabet+Bevacizumab grubu ile Diyabet grubu karşılaştırıldığında kan glikoz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Diyabet+Neferin grubunda Diyabet+Bevacizumab grubu ile karşılaştırıldığında kan glikoz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma izlendi. Bu bulgularımıza göre Neferin'in diyabette kan glikozunu düşürmek yoluyla da etkili olabileceği kanaatine vardık.

Diyabet ve diyabete bağlı gelişen komplikasyonların reaktif oksijen türleri ile olan bağlantısını araştıran çalışmalarda; sorbitol yolunun aktivasyonu, enerji metabolizmasında gelişen değişiklikler sonucunda ortaya çıkan metabolik stres, enzimatik olmayan glikasyon, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucunda meydana gelen doku hasarlarının serbest radikal oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (81). Deneysel diyabetik ratlarda veya diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (82).

Diyabetik retinopatide oksidatif stresin progresyona etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada; DR'li grupta kontrol grubuna göre serumdaki oksidatif stres ürünlerinin arttığı, antioksidan enzim aktivitesinin ise azaldığı bildirilmiştir. Yüksek TOS düzeyi ve düşük TAS düzeyinin DR progresyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (83).

Diyabette oksidatif stresin kaynağı olarak; antioksidan savunma enzimlerinin (SOD ve Katalaz) aktivitelerinin bozulması, düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerin (glutasyon, vitamin E) azalması, redoks dengesinin bozulması olarak gösterilmiştir (84). Antioksidan sistemin yetersiz kalması, oksidatif stres, hücre içi elektron dengesinin bozulması, kalsiyumun artışı ve mitokondriyal defektler apoptozisi uyaramaktadır (85).

Diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasının engellenmesi ve azaltılmasında eksojen olarak verilen antioksidanların yararlı olabileceği düşünülmüştür. Birçok çalışmada tip 2 diyabetli hastalarda C ve E vitamini gibi

antioksidanların açlık kan glikoz değerleri, HbA1c düzeyleri, TOS ve insülin direnç indekslerinde önemli oranda düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (86).

Neferin'in çok sayıda değişik biyolojik olaylarda önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (48,49). R.Baskaran (56) çalışmalarında; Neferin'in, hipoksinin neden olduğu sitotoksisteye, inflamasyona ve oksidatif strese karşı sitoprotektif etkisini göstermiştir. B.R. Sharma (64) çalışmasında; Neferin'in antidiyabetik, antiaterosklerotik, antiinflamatuvar etkisinin olduğunu belirtmiştir. H.A. Jung ve ark. çalışmalarında (73); Alzheimer hastalığı ve diğer oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı Neferin'in terapötik ve önleyici bir alternatif olarak araştırılması gereken bir ajan olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda; DM grubuna ait retinal dokularda apoptozisin kontrol grubuna göre belirgin olarak artmış olduğunu, tedavi olarak verilen Neferin'in apoptozisi anlamlı düzeyde azalttığını saptadık. Diyabetik gruba ait retina dokularındaki artmış apoptozisin oksidatif hasara bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Buna paralel olarak kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda DM grubunda TOS düzeylerinde anlamlı bir artışın olduğunu gördük. Deneysel diyabetik gruplarımızdaki TOS düzeylerinin yüksek olması; hipergliseminin glikoz otooksidasyonunu, lipid peroksidasyonunu, glikolize proteinleri arttırması ve sonuç olarak diyabetin serbest radikal oluşumunu arttırmasıyla açıklanabilir. DM grubu ile karşılaştırdığımızda DM+Neferin grubunda, apoptozisteki belirgin azalma Neferin'in antioksidan etkisine bağlı olabilir. Çünkü bu grupta, TAS düzeylerinde belirgin bir artış ve TOS düzeylerinde belirgin azalma olduğunu saptadık. DM+Neferin grubunda DM+Bevacizumab grubu ile karşılaştırıldığında TOS düzeylerinin anlamlı düşük, TAS düzeylerinin ise anlamlı derecede yüksek olduğunu gördük. Bu da Neferin'in antioksidan kapasitesinin Bevacizumab'a göre anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bulgularla Neferin'in diyabette oksidatif stresi azaltarak etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Hücre bütünlüğünü bozarak nekroza neden olabilen her durum apoptozla sonuçlanabilmektedir. Dokularda normal hücre popülasyonunun dengeli devamlılığı sağlanırken, immün sistem reaksiyonlarında korunma mekanizması olarak, kalıcı hücre hasarında ve yaşlılıkta apoptozis görülür. Hücrelerin programlı yıkımı, hormon bağımlı involüsyonu, enflamatuvar olaylar, hiperglisemi, tümörler gibi birçok patolojik, fizyolojik ve adaptif olay apoptozisi tetikleyebilir.

G. Guan ve ark.'nın insan umbilikal ven endotelyal hücreleriyle (HUVEC) yaptıkları çalışmalarında (72); Neferin ile hipergliseminin neden olduğu HUVEC apoptozunun etkili bir şekilde baskılandığı, Neferin'in diyabetik vaskülopati tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Diyabet gruplarımızda saptadığımız artmış TUNEL pozitifliği, oksidatif stresin DNA hasarına sebep olduğuna bir gösterge olarak kabul edilebilir. Oksidatif stres durumunda hücre içi kalsiyum dengeleri ve mitokondriyal membran potansiyeli değişmekte, bu değişiklik mitokondrilerde ve DNA'da hasara yol açarak hücreyi apoptozise sürüklemektedir. Diyabet grubumuzda artan apoptozisin TUNEL yöntemiyle gösterilmiş olması literatür bilgileriyle uyushmaktadır. DM grubu ile karşılaştırdığımızda DM+Neferin grubunda apoptozisteki belirgin azalma, Neferin'in antiapoptotik etkisini göstermektedir. DM+Neferin grubunda DM+Bevacizumab grubu ile karşılaştırıldığında apoptozis üzerine olan etkileri arasında anlamlı fark görülmedi. Apoptozis üzerine Neferin'in Bevacizumab'a göre üstünlüğü gösterilememekle beraber diyabet grubuna göre anlamlı farkın olması diyabet tedavisinde Neferin'in antiapoptotik etkinliğinden yararlanılabileceği düşünülmüştür. Bu bulgularla Neferin'in diyabette antiapoptotik etkisiyle yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Retinal mikrovasküler diyabetik komplikasyonlarda başlıca rol oynayan faktör anjiyogenezis ve vasküler geçirgenlik faktörü olan VEGF'tir. Retinal iskemi ile seyreden retinal neovaskülarizasyon durumlarında da VEGF önemli bir role sahiptir. Deneysel çalışmalarda VEGF salınımının neovaskülarizasyon gelişimiyle paralel olduğu gösterilmiştir (87). Yüksek VEGF konsantrasyonları kan-retina bariyerinin yıkılmasından ve DR'de fibrovasküler proliferasyondan sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenlerden dolayı VEGF, DR'nin tedavisinde önemli bir terapötik hedeftir.

Diyabetik ve diyabetik olmayan ratlar üzerinde VEGF salınımının derecelendirildiği bir çalışmada (88); diyabetik ratların retinalarında VEGF mRNA düzeylerinde artış saptanmış, Diyabetik olmayan ratlarda VEGF immünreaksiyonunun çok zayıf olduğu belirlenmiştir. VEGF salınımının özellikle retinanın gangliyon hücreleri, iç ve dış nükleer tabakalarında yoğun olduğu görülmüştür. Çalışmamızda da DM grubundaki ratların gangliyon hücre ve sinir lifi tabakalarında

immünohistokimyasal olarak VEGF tutulumu diğer retina tabakalarına göre daha yüksek düzeyde görüldü.

Diyabete bağlı iskekiye sekonder vitreusa salgılanan VEGF'in vasküler geçirgenliği artırarak anjiyogenezise ve maküler ödeme yol açtığı ve bunu önlemek için de multpl intravitreal enjeksiyonların gerekli olduğu belirtilmiştir (89).

Kimyasal yanık sonrası neovaskülarizasyon oluşturulan ratlar üzerinde yapılan çalışmada (90); topikal uygulanan Bevacizumab'ın korneal neovaskülarizasyonu sınırlandırdığı görülmüştür. Domuz retinal pigment epiteli hücre kültüründe yapılan çalışmada da Bevacizumab ve Ranibizumab'ın VEGF'i güçlü bir şekilde nötralize ettiği gösterilmiştir (91).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü vasküler endotel hücreleri için spesifik bir mitojendir ve anjiyogenezisin patogeneğinde ana rol oynar. VEGF konsantrasyonu aktif proliferatif DR'li hastalarda retina, vitreus, ön kamara sıvısında yükselmiştir. VEGF, proliferatif ve non-proliferatif diyabetik retinopatinin patogeneğinde rol oynamaktadır (92). Literatür çalışmalarında PDR saptanan gözlerde VEGF düzeyi kontrol grubuna ve NPDR olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (93). Çeşitli çalışmalarda enflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın VEGF salınımını artırarak indirekt olarak anjiyogenezisi uyurabileceği bildirilmiştir. Vitreustaki IL-6 düzeyinin aktif PDR'de inaktif PDR'ye göre daha yüksek olduğu ve VEGF üzerinden PDR'de anjiyogenezisi uyurabileceği gösterilmiştir. (94).

Qing Zhanga ve ark. Neferin'in anti-anjiyogenez mekanizmasının mTOR/p70S6K yolağı inhibisyonu, VEGF ekspresyonunun azaltılmasıyla olduğunu bildirmişlerdir (69). Priya LB (57) çalışmalarında, Neferin'in diyabete bağlı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde olumlu etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda VEGF immünreaktivitesi; DM grubuna ait retina dokularında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak görüldü. Her iki tedavi verdiğimiz grubun (DM+Neferin ve DM+Bevacizumab) diyabet grubu ile karşılaştırılmalarında; tedavi gruplarında VEGF immünreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığını saptadık. DM+Bevacizumab ile DM+Neferin grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Bu sonuç Neferin'in de diyabetik retinopati güncel anti-VEGF tedavisinde kullanılan Bevacizumab kadar etkili olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca bu sonuçlarımıza göre DR’de neovaskülarizasyon gelişiminin güçlü bir uyarıcısı olan VEGF’in azalması, Neferin’in neovaskülarizasyon gelişimini ve sekonder komplikasyonlarını önlemesi açısından umut verici bir bulgudur. Diyabetik rat grubumuzda saptanan artmış VEGF immünreaktivitesi oksidatif hasara bağlı olabilir. Nitekim hiperglisemi oksidatif stresi tetiklemekte ve endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır (32). DM+Neferin grubunda retinal VEGF miktarının azalması da Neferin’in antioksidan etkisi ile endotelyal disfonksiyonu azaltabileceği yönünde değerlendirilebilir. Bu bulgular, Neferin’in antioksidan ve antianjiyogenetik özelliğini destekler niteliktedir.

DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu kontrolünde görevli birçok protein, PCNA’ya bağlanarak görev yapmaktadır. PCNA, hücre döngü oranını ve hücre proliferasyonunu göstermede, farklılaşma işlemine giren hücrelerden çoğalma özelliği olanları ayırıp tanımlamada kullanılmaktadır.

Plasental endotel hücrelerinin gelişiminde fetömaternal insülin düzeyinin etkili olduğu bilinmektedir. Diyabetik plasentalarda villuslarda immatürite izlenmekte ve vasküler gelişim bozukluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu patolojilere bağlı gelişen çok sayıda komplikasyon fetusta görülebilmektedir. Diyabetik ve normal insan plasentalarında hücre siklus proteinlerinin immünohistokimyasal dağılımları karşılaştırıldığında, diyabetik term placentilla villuslarında ve endotel hücrelerinde PCNA’nın belirgin düzeyde artmış olduğu saptanmıştır (95). Diyabetik olan ve olmayan rat plasentaları ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diyabetik olan gruptaki plasentaların endotel hücrelerinde PCNA immünreaktivitesi beş kat daha yüksek düzeyde saptanmış, villöz sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinin çekirdeklerinde apoptozisin arttığı izlenmiştir (96). Bu bulgular incelendiğinde; proliferasyon, diferansiasyon ve apoptozis süreçlerinin aktivasyon belirteci olan PCNA düzeyinin yükselmesinin diyabetiklerde gelişen mikroanjiyopati patogenezinin aydınlatılmasında etkili olabileceğini göstermektedir.

Proliferatif vitreoretinopati modeli oluşturulan deneysel tavşan modelinde; PCNA inhibisyonu için kimerik ribozim kullanılmış, retina pigment epiteli ve fibroblast hücrelerinde proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir (97). Günümüzde de proliferatif vitreoretinopati hastalarının retinalarında saptanan PCNA’nın düzeyini azaltan yeni tedavi alternatifleri araştırılmaktadır.

Neferin'in antiproliferatif etkiye sahip olduğunu destekleyen çalışmalar da mevcuttur. Farklı kanser hücrelerinde daha önce yapılan çalışmalara göre Neferin, antikanser etkinliği yüksek doğal bir moleküldür. Bu çalışmalardan bazılarına göre Neferin; osteosarkoma hücrelerinde hücre döngüsünü durdurmakta (58), çoklu ilaç dirençli kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkin bir şekilde inhibe edebilmekte (59) ve ovaryum sarkomasında angiyojenezi inhibe edebilmektedir (60).

Diyabetes Mellitus grubumuzda kontrol grubuna göre immünohistokimyasal olarak retinada PCNA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğunu saptadık. Her ne kadar çeşitli çalışmalarda (58,59) Neferin'in antiproliferatif etkiye sahip olduğu bildirilmiş olsa da çalışmamızda Neferin'in PCNA düzeyi üzerine anlamlı bir etkisini göremedik. Bu sonuç; deney süresi olan 4 haftanın kısalığından, Neferin'in antiproliferatif etki için yeterli dozda olmamasından kaynaklanabilir. Diyabet+Neferin ve Diyabet+Bevacizumab gruplarında diyabet grubu ile karşılaştırıldığında PCNA düzeylerinde anlamlı azalma görülmedi. Diyabet+Neferin ile Diyabet+Bevacizumab grupları karşılaştırıldığında da PCNA düzeylerinde anlamlı fark görülmedi. Neferin takviyesinin PCNA düzeyleri üzerine olan etkisini doğrulamak için başka ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kontrol grubu ile Neferin grubu karşılaştırıldığında; kan glikoz düzeyleri, TAS-TOS parametreleri, TUNEL pozitiflik düzeyleri, VEGF ve PCNA immünreaktiviteleri benzer olarak görüldü. Bu bulgularımız da Neferin'in dokular üzerine toksik etkisinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamız sonucunda, deneysel diyabetin retina dokusunda TAS'ı azalttığı, TOS ve apoptotik hücreleri, VEGF ve PCNA immünreaktivitelerini arttırdığı, tedavi olarak verilen Neferin'in ise PCNA dışında bu parametreleri tersi yönde değiştirdiği ve Bevacizumab kadar etkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda diyabet grubu ile karşılaştırıldığında Neferin verilen diyabetik ratlarda kan glikozunda da anlamlı azalma izlenmiştir. Çalışmamız dört haftalık zaman diliminde yapılmış olup, diyabetin retina dokusunu etkilemesinin patofizyolojisindeki rolünün aydınlatılabilmesi ve Neferin takviyesinin diyabetik retinopatideki etkisini doğrulamak için gelecekte daha uzun sürelerle yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Richard S. Snell, Michael A. Lemp, Clinical Anatomy of the Eye, 2nd Edition, 2013-978-1-118-69098-7.
2. Marmor MF. The retinal pigment epithelium: Yanoff M, Duker JS (eds). Ophthalmology. 1st ed. London: Mosby, 1999: 8.
3. Akar S, Akyol S. Retina Embriyogenezi-Fizyolojisi. O'dwyer PA, Akova YA (editörler). Temel Göz Hastalıkları. III. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2015: 634-640.
4. Tripathi RC, Wond M. The Eye. Basic and clinical science course. Section 2. American Academy of Ophthalmology, Elsevier, 1999: 47-92.
5. Remington LA. Clinical anatomy and physiology of the visual system. 3rd ed. St. Louis: Elsevier Butterworth Heinemann; 2009: 61-92.
6. Snell RS, Lemp MA. The orbital blood vessels. Clinical Anatomy of the Eye. 2nd ed. Blackwell Science, 1998: 277-289.
7. Duker J, Weitter JJ. Ocular circulation. Tasman W, Jaeger EA (editors). Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology. New York: JB Lippincott, 1991: 1-34.
8. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. Nature 2005; 437: 426-431.
9. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2011; 94: 311-321.
10. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. Lancet Glob Health. 2013; 1: 339-349.
11. Moss SE, Klein R, Klein BE. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. Ophthalmology 1994; 101: 1061-1070.

12. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 520-526.
13. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 527-532.
14. Taş A, Bayraktar MZ, Erdem Ü, Sobacı G, Uçar M. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in Turkey. *Gulhane Med J* 2005; 47: 164-174.
15. Bourne RR, Jonas JB, Flaxman SR, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, et al. Prevalence and causes of vision loss in high income countries and in Eastern and Central Europe:1990-2010. *Br J Ophthalmol* 2014; 98: 629-638.
16. Rand LI, Krolewski AS, Aiello LN, Warren J, Baker RS, Maki T. Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 1985; 313: 1433-1438.
17. Arden GB. The absence of diabetic retinopathy in patients with retinitis pigmentosa: implications for pathophysiology and possible treatment. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 366-370.
18. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1961; 66: 366-378.
19. Takagi H, Watanabe D, Suzuma K, Kurimoto M, Suzuma I, Ohashi H, et al. Novel role of erythropoietin in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: 62-64.
20. Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* 2007; 13: 181-188.
21. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010; 107: 1058-1070.
22. Chertow B. Advances in diabetes for the millennium: vitamins and oxidant stress in diabetes and its complications. *Med Gen Med* 2004; 6: 4.

23. Lynch SK, Abràmoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res* 2017; 139: 101-107.
24. Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, Lorenzi M. Bax is increased in the retina of Diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 2000; 156: 1025-1032.
25. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Penn State Retina Research Group: Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes: early onset and effect of insulin. *J Clin Invest.* 1998; 102: 783-791.
26. Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, Harris NR. Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology* 2017; 24: 229-241.
27. Aiello LM. Diagnosis, management and treatment of nonproliferative diabetic retinopathy and macular edema. Albert DM, Jakobiec FA (editors). *Principles and Practice of Ophthalmology*, WB. Saunders Company, 1994: 747-760.
28. Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: ETDRS report no:19. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1144-1155.
29. Tıgrel G. Retinanın vasküler hastalıkları. O'dwyer PA, Akova YA (editörler). *Temel Göz Hastalıkları. III. Baskı*, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2015: 655-662.
30. Diabetic Retinopathy Study Research Group: Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 383-396.
31. Kanski JJ. *Klinik Oftalmoloji SistematiK Yaklaşım*. Yonca A. Akova (çeviri editörü). 7. Baskı, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri, 2011: 534-551.
32. Lu L, Jiang Y, Jaganathan R, Hao Y. Current Advances in Pharmacotherapy and Technology for Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *J Ophthalmol* 2018; 2018: 1694187.
33. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.

34. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987; 235: 442-447.
35. Takagi H, King GL, Robinson GS, Ferrara N, Aiello LP. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2165-2176.
36. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP, et al. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 964-970.
37. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:427-434.
38. 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; 112:1035-1047.
39. Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, Haddad ZA, Haibi CPE, Noureddin BN. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006; 26:352-354.
40. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006; 26:352-354.
41. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006;113:1695.
42. Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, Wolf A, Priglinger S, Strauss R, et al. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina* 2006;26:999- 1005.
43. Wu L, Martinez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H, Arevalo JF, Berrocal MH, Farah ME, et al. 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;246:817.

44. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
45. 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.
46. 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.
47. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
48. Li C, Miao X, Li F, Wang S, Liu Q, Wang Y, Sun J. Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 9702820.
49. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995:12-16.
50. Kowluru RA, Mishra M. Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 2474-2483.
51. Unger J. Screening, diagnosis, and management of diabetes related complications; Diabetes management in the primary care setting. Birinci Baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 516.
52. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
53. Paunesko T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 1007-1021.

54. Heidenkummer HP, Kampik A, Petrovski B. Proliferative activity in epiretinal membranes. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in proliferative vitreoretinal diseases. *Retina* 1992; 12: 52-58.
55. Selvi SK, Vinoth A, Varadharajan T, Weng CF, Padma VV. Neferine augments therapeutic efficacy of cisplatin through ROS-mediated non-canonical autophagy in human lung adenocarcinoma (A549 cells). *Food and Chemical Toxicology*. 2017;103:28-40.
56. Baskaran R, Priya LB, Kalaiselvi P, Poornima P, Huang C-Y, Padma VV. Neferine from *Nelumbo nucifera* modulates oxidative stress and cytokines production during hypoxia in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:736.
57. Priya LB, Baskaran R, Huang CY, Padma VV. Neferine modulates IGF- 1R/Nrf2 signaling in doxorubicin treated H9c2 cardiomyoblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;119:1441-1452.
58. Zhang XY, Liu ZJ, Xu B, Sun ZL, Gong YQ, Shao CS. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization. *European journal of pharmacology*. 2012;677(1-3):47-54.
59. Kadioglu O, Law BYK, Mok SWF, Xu SW, Efferth T, Wong VKW. Mode of Action Analyses of Neferine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid of Lotus (*Nelumbo nucifera*) against Multidrug-Resistant Tumor Cells. *Front Pharmacol*. 2017;8:238.
60. Zhang Q, Li Y, Miao C, Wang Y, Xu Y, Dong R, et al. Anti-angiogenesis effect of Neferine via regulating autophagy and polarization of tumor-associated macrophages in high-grade serous ovarian carcinoma. *Cancer Lett*. 2018;432:144-155.
61. P.K. Mukherjee, K. Saha, S.N. Giri, M. Pal, B.P. Saha. Antifungal screening of *Nelumbo nucifera* (Nymphaeaceae) rhizome extract, *Indian J. Microbiol*. 33 (1995) 327–330.
62. Y. Sugimoto, S. Furutani, A. Itoh, T. Tanahashi, H. Nakajima, H. Oshiro, et al. Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system, *Phytomedicine* 15 (2008) 1117–1124.

63. Nakajima H, Tanahashi T, Yamada J, Sun SJ, Sugimoto Y. Benzylisoquinoline derivative- or bisbenzylisoquinoline derivative-containing psychotropic agent, analgesic and/or antiphlogistic, and health food. Google Patents; United States Patent Application Publication. Pub. No: US 2007/0027181 A1-2007.
64. B.R. Sharma, L.N. Gautam, D. Adhikari, R.A. Karki, Comprehensive review on chemical profiling of *Nelumbo nucifera*: potential for drugdevelopment, *Phytother. Res.* 31 (2017) 3–26.
65. Y. Huang, Y. Bai, L. Zhao, T. Hu, B. Hu, J. Wang, et al. Pharmacokinetics and metabolism of neferine in rats after a single oral administration, *Biopharm. Drug Dispos.* 28 (2007) 361–372.
66. J. Yu, W.S. Hu, Effects of neferine on platelet aggregation in rabbits, *Yao Xue Xue Bao* 32 (1997) 1–4.
67. Y.J. Zhou, J.Z. Xiang, H. Yuan, H. Liu, Q. Tang, H.Z. Hao, et al. Neferine exerts its antithrombotic effect by inhibiting platelet aggregation and promoting dissociation of platelet aggregates, *Thromb. Res.* 132 (2013) 202–210.
68. M.S. Chen, J.H. Zhang, J.L. Wang, L. Gao, X.X. Chen, J.H. Xiao, Anti-fibrotic effects of neferine on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice, *Am. J. Chin. Med.* 43 (2015) 231–240.
69. Qing Zhanga, Yinuo Lia, Chunying Miaoa, Yuqiong Wanga, Ying Xua, Ruifen Donga, et al. Anti-angiogenesis effect of Neferine via regulating autophagy and polarization of tumor-associated macrophages in high-grade serous ovarian carcinoma, *Cancer Letters* 432 (2018) 144–155.
70. Y. Pan, B. Cai, K. Wang, S. Wang, S. Zhou, X. Yu, et al. Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats, *J. Ethnopharmacol.* 124 (2009) 98–102.
71. G. Li, H. Xu, S. Zhu, W. Xu, S. Qin, S. Liu, et al. Effects of neferine on CCL5 and CCR5 expression in SCG of type 2 diabetic rats, *Brain Res. Bull.* 90 (2013) 79–87.
72. G. Guan, H. Han, Y. Yang, Y. Jin, X. Wang, X. Liu, Neferine prevented hyperglycemia-induced endothelial cell apoptosis through suppressing ROS/Akt/NFkappaB signal, *Endocrine* 47 (2014) 764–771.

73. H.A. Jung, S. Karki, J.H. Kim, J.S. Choi, BACE1 and cholinesterase inhibitory activities of *Nelumbo nucifera* embryos, *Arch. Pharm. Res.* 38 (2015) 1178–1187.
74. Aydın S. Sıçan Akciğer ve Karaciğerinde Formaldehit Maruziyetiyle Oluşan Oksidatif Hasar ve İrisin Hormon Değişimlerine Karşı Karnozinin Etkisinin Biyokimyasal, Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi. Elazığ: Doktora Tezi, Fırat üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı, 2015.
75. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193(1): 265-75.
76. Holt RIG, Cockram CS, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. Textbook of Diabetes. 4th ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010: 115.
77. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005; 523: 151-161.
78. Su EN, Alder VA, Yu DY, Yu PK, Cringle SJ, Yorgesan K. Continued progression of retinopathy despite spontaneous recovery to normoglycemia in a long-term study of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238: 163-173.
79. Su EN, Yu DY, Alder VA, Yu PK, Cringle SJ. Altered vasoactivity in the early diabetic eye: measured in the isolated perfused rat eye. *Exp Eye Res* 1995; 61: 699-712.
80. Cam M, Yavuz O, Güven A, Ercan F, Bukan N, Ustundag N. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res* 2003; 35:212- 220.
81. Boynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
82. Akkuş İ, Kalak S, Vural H, Çağlayan O, Menekşe E, Can G, et al. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* 1996; 244: 221-227.

83. Beyazyildiz E, Cankaya AB, Ergan E, Anayol MA, Ozdamar Y, Sezer S, et al. Changes of total antioxidant capacity and total oxidant status of aqueous humor in diabetes patients and correlations with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2013; 6: 531-536.
84. 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.
85. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
86. Lai MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and E supplementation for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43: 191-198.
87. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92: 905-909.
88. Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 1998; 47: 401-406.
89. Arevalo JF, Garcia-Amaris RA. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5: 39-46.
90. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 804-807.
91. Klettner A, Roider J. Comparison of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 4523-4527.

92. Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Luty GA. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2729-2741.
93. Selim KM, Sahan D, Muhittin T, Osman C, Mustafa O. Increased levels of vascular endothelial growth factor in the aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2010; 58: 375-379.
94. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736-741.
95. Leach L, Gray C, Staton S, Babawale MO, Gruchy A, Foster C, et al. Vascular endothelial cadherin and beta-catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. *Diabetologia* 2004; 47: 695-709.
96. Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MA, Costa E, Calderan IM, Gonçalves CR, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 143-149.
97. Mandava N, Blackburn P, Paul DB, Wilson MW, Read SB, Alspaugh E, et al. Ribozyme to proliferating cell nuclear antigen to treat proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3338-3348.

6. ÖZGEÇMİŞ

10.09.1985 yılında Ağrı’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ağrı ilinde tamamladım. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesin’den mezun oldum. 2016 yılında Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

