

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**PREMATÜRE RETİNOPATİSİ İN VİVO FARE
MODELİNDE OCTREOTİD ASETAT İN RETİNAL
ENDOTELYAL HÜCRE PROLİFERASYONUNA VE
RETİNA MORFOLOJİSİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Fatma Selin KAYA

DANIŞMAN:

Doç. Dr. İmren AKKOYUN

Ankara, 2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince eğitime katkıda bulunan ve başta değerli Anabilim Dalı Başkanımız, hocam sayın Prof. Dr. Yonca Akova, çalışmamın planlanmasından yürütülmesine ve tamamlanmasına her aşamada değerli destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. İmren Akkoyun, uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Sibel Oto, Prof. Dr. Gürsel Yılmaz, Prof Dr. Ahmet Akman, Doç Dr. Dilek Dursun Altınörs, Doç Dr. Şansal Gedik, Yrd. Doç. Dr. Cem Küçükerdönmez, Uzm Dr. Sezin Akça Bayar'a, Uzm Dr. Altuğ Çetinkaya ve tüm asistan arkadaşlarıma, Anabilim Dalı çalışanlarına, ayrıca anlayışları ve destekleri için sevgili aileme teşekkür ederim.

Fatma Selin Kaya

Ankara, 2009

ÖZET

Bu çalışma in vivo prematüre retinopatisi (PR) fare modelinde C57BL/J6 tipi fare kullanılarak, somatostatin analogu olan Octreotid asetat' ın farklı dozlarda retinal endotelial hücre proliferasyonuna inhibitör etkisinin araştırılması ve retinal morfolojik yapıya etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır.

In vivo analizler prematüre retinopatisi fare modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yirmialtı C57BL/J6 fare postnatal 7. günden 12. güne kadar %75 oksijene tabi tutulmuştur. Fareler 4 gruba ayrılmıştır. Grup-1 negatif kontrol grubunu, grup-2 kontrol grubunu, grup-3 0.1µg İVO enjeksiyon grubunu ve grup-4 0.05µg İVO enjeksiyon grubunu oluşturmuştur. Onikinci gün 12 farenin sağ gözüne (grup-3) 0.1µg intravitreal Octreotid asetat (İVO), 14 farenin sağ gözüne (grup-4) 0.05µg İVO ve diğer gözlerine izotonik solüsyon enjeksiyonu (grup-2, n=26) uygulanmıştır. Deneyin 17. günü fareler sakrifiye edilmiş ve gözler preretinal neovaskülarizasyonun kantitatif analizi için ve morfolojik yapı incelenmesi için enükle edilmiştir. Dört tane işlem görmemiş fare negatif kontrol grubunu (grup-1) oluşturmuştur. Neovaskülarizasyon internal limitan membranın vitreosa bakan yüzündeki vasküler hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edilmiştir. Histolojik ve ultrastrüktürel morfolojik değişiklikler ışık mikroskopi ve elektronmikroskopi ile incelenmiştir.

Bir histolojik kesitte neovasküler endotelial hücre sayısı kontrol grubunda (grup-2), grup-3 ($p<0.0001$) ve grup-4 ($p=0.01$) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup-1 de (negatif kontrol grubu) neovasküler endotelial hücre proliferasyonu tespit edilmemiştir. Histolojik incelemede hiç bir grupta toksik etki saptanmamıştır. Elektron mikroskopik incelemede kontrol grubunda hiperoksiye bağlı mitokondriyal dismorfoloji saptanmıştır. Mitokondriyal dismorfoloji İVO enjekte edilen gözlerde 0.1µg İVO enjeksiyon grubunda artış göstermektedir. Kontrol grubu ve 0.05µg İVO enjeksiyonu yapılan grup kıyaslandığında mitokondriyal dismorfolojinin benzer düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak İVO enjeksiyonu in vivo PR fare modelinde endotelial hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir. C57BL/J6 farenin retinasında

hiperoksiye bağlı morfolojik hasarın yanında Octreotid asetat ile ultrastrüktürel hasar geliştiği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: in vivo fare modeli, intravitreal Octreotid asetat, endotelyal hücre proliferasyonu, mitokondria, elektron mikroskopi



ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effects of Octreotide acetat, at different concentrations, on retinal endothelial cell proliferation and retinal morphological structure in an oxygen-induced retinopathy of preamaturity (ROP) mouse model.

In vivo analysis were performed using ROP mouse model with C57BL7J6 newborn mouse. There were four groups (group-1=negative control group), group-2=control group, group-3=0.1 μ g IVO injected group, group-4= 0.05 μ g IVO). Twentysix C57BLJ6 mice were exposed to 75% oxygen from postnatal day 7(P7) to 12 (P12). On day 12 Octreotide acetat 0.1 μ g was administered intravitreally to one eye of 12 mice (group 3), 0.05 μ g Octreotide acetat to one eye of 14 mice (group 4) and contralateral eyes (group-2 n=26) received isotonic saline. Four mice of the same age that had been kept in room air without any exposition to high oxygen were used as negative control.

On day 17, the mice were sacrificed and eyes enucleated for quantitative analysis of preretinal neovascularisation. Neovascularizations were quantified by counting the endothelial cell nuclei on the vitreal side of the inner limiting membrane of the retina. Histological and ultrastructural changes were examined by using light and electron microscopy.

The endothelial cell count, per histological section in the control group was significantly higher compared with group 3 ($p<0.0001$) and group 4 ($p=0.01$). In grup-1 (negative kontrol group) there were no endothelial cell nuclei detected on the vitreal side of the inner limitig membrane. Histologic evaluation of retinal layers using light microscopy showed no retinal toxicity in any group. Electron microscopy revealed similar mitochondrial dysmorphology in group-2 and grup-4, but mitochondrial dysmorphology displayed increase in group- 3.

In conclusion we can say that intravitreal injection of octreotide acetat supresses endothelial cell proliferation in a ROP mouse model. In addition to hyperoxia induced vulnerability of C57BL/J6 retina, morphological findings implicate further ultrastructural vulnerability due to octreatid acetate.

Key words: intravitreal octreotide acetat, ROP mouse model, retinal endothelial cells, mitochondria, electronmicroscopy

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Prematüre Retinopatisi	3
2.1.1 Evreleme.....	3
2.1.2 Tedavi	4
2.2 Prematüre retinopatisi patogenezi	4
2.3 Anjiyogenez ve anjiyogenezde etkili faktörler	6
2.3.1 Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü (VEGF).....	7
2.3.2 İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-1).....	11
2.3.3 Basic Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF).....	12
2.3.4 Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF).....	13
2.3.5 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF).....	13
2.3.6 Tümör Nekroz Faktörü (TNF).....	13
2.3.7 Plasenta Kaynaklı Büyüme Faktörü	14
2.4 Antianjiyojenik ajanlar	14
2.4.1 Triamsinolon Asetonid	14
2.4.2 Anekortav Asetat.....	14
2.4.3 Pegaptanib Sodyum.....	15
2.4.4 Bevacizumab	15
2.4.5 Ranibizumab	16
2.4.6 VEGF- Trap	16
2.4.7 Endostatin ve Anjiostatin.....	16
2.5 Somatostatin.....	17
2.6 Octreotid asetat	18
2.7 Oksijene Bağlı Prematüre Retinopatisi Fare Modeli	19

2.7.1 Neovasküler Proliferatif Retinopati Modelinin Nitelendirilmesi.....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1 Hayvan Deneyi	25
3.2 Histolojik Değerlendirme	26
3.3 Elektron Mikroskopik İnceleme	26
3.4 İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1 Histolojik Değerlendirme (Işık Mikroskobu).....	27
4.2 Ultrastrüktürel Değerlendirme (Elektron Mikroskobu)	27
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ.....	33
7. REFERANSLAR	34
8. RESİMLER	55

KISALTMALAR VE SİMGELER

PR	: Prematüre Retinopatisi
DRP	: Diyabetik Retinopati
SST-14	: Somatostatin 14
SST-28	: Somatostatin 28
SSTR1	: Somatostatin Reseptör 1
SSTR2	: Somatostatin Reseptör 2
SSTR3	: Somatostatin Reseptör 3
SSTR4	: Somatostatin Reseptör 4
SSTR5	: Somatostatin Reseptör 5
IGF-1	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IGF-1R	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 Reseptörü
VEGF	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü
VEGF A	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/A
VEGF B	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/B
VEGF C	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/C
VEGF D	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/D
VEGF 164	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/164
VEGF 165	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/65
VEGF 121	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/121
VEGF 189	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/189
VEGF R1	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü 1
VEGF R2	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü 2
PDR	: Proliferatif Diyabetik Retinopati
PDGF	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PDGFA	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü.A
PDGF B	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü.B
FGF	: Fibroblast Kökenli Büyüme Faktörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
VEGF-TRAB	: Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü- TRAB
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
c AMP	: Siklik Adenozin Monofosfat

TSH	: Tiroid Stimulan Hormon
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
GNRH	: Gonadotropin Releasing Hormon
GABA	: Gaba Amino Bütirik Asit
PAS	: Periodic Acid Schiff
RPE	: Retina Pigment Epiteli
OSO4	: Osmium Tetraoksid
DDSA	: 2-Dodecenyl succinic anhydrate
BDMA	: Benyldimethyl amine
YBMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejeneresansı
KNV	: Koroidal Neovasküler Membran
IVO	: İntravitreal Ochterotide Asetat
IVTA	: İntravitreal Triamsinolon
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
AP-1	: Aktivatör Protein-1
IL-1	: İnterlökin-1
FU	: 5- Florourasil
Ig G	: immunglobulin G
Na	: Sodyum
K	: Potasyum
H	: Hidrojen
Ca	: Kalsiyum

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubunun histolojik kesitlerinde internal limitan membranın vitreus tarafındaki neovaskülarizasyon kümeleri; RPE ve retina kesitindeki yapay ayrılma görülmektedir. (büyütme: x40).....	55
Resim 2: Negatif kontrol grubunun histolojik kesitinde neovasküler hücre kümeleri izlenmemektedir. (büyütme: x40)	
Resim 3: Grupların (grup-1, -2, -3 ve grup-4) histolojik kesitlerinde retina hücre tabakalarında dismorfolojik bulgu izlenmemektedir. (büyütme: x40).....	56
Resim 4: Negatif kontrol grubunun elektron mikroskopik incelemesinde mitokondri yapılarında dismorfoloji izlenmemektedir	57
Resim 5: Kontrol grubunun elektron mikroskop incelemesinde fotoreseptör iç segmentindeki mitokondrilerde benekli matriks ϕ , yoğun kesif içeren litik matriks χ ve dış membran kaybı ϕ olduğu gözlemlendi.....	58
Resim 6: 0,1 μ g IVO enjeksiyonu yapılan grupta mitokondriyal morfolojik değişiklikler daha yoğun olarak izlenmektedir.....	59
Resim 7: Retinal pigment epitel, koroid ve sklera düzeyinde dismorfoloji hiç bir grupta görülmemiştir	60

1. GİRİŞ

Neovasküler göz hastalıkları tüm yaş gruplarında ciddi sağlık sorunudur. Gelişmiş ülkelerde, proliferatif diyabetik retinopati, genç ve orta yaş grubunu etkileyen en önemli körlük nedenidir.¹ Eksüdatif makula dejenerasyonu ileri yaş grubunda en sık neovasküler hastalık nedenidir.² Gelişen tıbbi imkanlar sayesinde daha düşük doğum haftasındaki preterm bebekler yaşatılabilmektedir. Prematüre retinopatisi (PR), dünyada çocukluk çağında önemli körlük sebebidir.³ Bu hastalıkların etkiledikleri doku dağılımı ve vasküler yatak farklı olmakla birlikte hepsindeki ortak mekanizma patolojik kan damarı proliferasyonu meydana gelmesidir.

İlk defa Poulsen tarafından, postpartum pitütüer infarkt olan bir hastada diyabetik retinopatinin gerilediğini bildirmesiyle büyüme hormonunun damar proliferasyonunu destekleyici etkisi fark edilmiştir.⁴ Diyabetik mikrovasküler hastalıkta peptid büyüme faktörlerinin rol oynadığını gösteren kanıtlar artmaktadır. Yapılan çalışmalarda IGF-1, VEGF ve diğer bazı faktörlerin etkili olduğu anjiyogenez mekanizmaları tanımlanmıştır.⁵⁻⁸ Yapılan çalışmalar da IGF-1' in retinal neovaskülarizasyon gelişiminde etkili olduğunu desteklemektedir. Merimee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hızlı ilerleyen diyabetik retinopati olan hastalarda serum IGF-1 düzeyleri daha yüksek ölçülmüştür.⁹ Diyabetik hastaların katıldığı kapsamlı bir çalışmada 30 yaş üzeri 928 hastanın sistemik IGF-1 düzeylerine bakılmış ve daha yüksek olan hastalarda proliferatif retinopati ve orta ciddiyette non proliferatif retinopati sıklığının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.¹⁰ Grant ve arkadaşları somatostatin reseptörlerinin varlığını insan retina endotel hücre kültüründe göstermişlerdir.¹¹ Eksüdatif YBMD tanısı alan gözlerde erken evre koroidal neovasküler membranda yoğun somatostatin reseptörleri özellikle de somatostatin reseptör 2A (SST2A) ekspresyonu saptanmıştır.¹² Farelerde proliferatif retinopati modelinde somatostatin analoglarının inhibitör etkileri gözlenmiştir.¹³

Neovasküler hastalıklarda tedavi, lazer fotokoagülasyon ile iskemik dokunun tahrip edilerek neovaskülarizasyonu tetikleyen faktörlerin azaltılması esasına dayanır.¹⁴ Panretinal fotokoagülasyon, proliferatif diyabetik retinopati ve PR' nin standart tedavisidir. Ancak bu tedavi sonucunda doku hasarı meydana gelir. Doku hasarını en aza indirgeyerek, patolojik neovaskülarizasyonu engelleme amacına yönelik olarak vasküler endotel hücre üzerine etkili anjiogenik maddeler hedef

alınmaktadır.¹⁵ Bunlardan en önemlileri VEGF blokajı yapan ilaçlardır. Son yıllarda eksudatif AMD tedavisinde VEGF inhibitörü ilaçlarla iyi sonuçlar alınmaktadır.¹⁶ Bu gelişmelere rağmen neovasküler hastalıkların tedavisinde monoterapi yada sinerjistik etkili olarak kullanılabilecek alternatif farmakolojik tedavi yöntemleri üzerindeki araştırmalar devam etmektedir .

Somatostatin ilk olarak hipotalamustan izole edilen, pitütüer büyüme hormonu salınımını baskılayan endojen maddedir.¹⁷ Somatostatin analoglarının, SMS 201-995 (Octreotid asetat), RC 160 (vapreotid) sırası ile %61 ve %68 oranında civciv embriyo koryallantoik zarının gelişimi esnasında meydana gelen normal neovaskülarizasyonu inhibe ettikleri gösterilmiştir.¹⁸ Potent bir somatostatin analogu olan Octreotid asetatın koryoallantoik zar modelinde somatostatin reseptör-2 ile bağlanarak anjiyogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkisini G proteinlerinin inhibitör alttıpleri, c-AMP, Ca bağımlı yollar aracılığı ile gerçekleştirir.¹⁹

Proliferatif diyabetik retinopati (PDR) tedavisinde somatostatin analogu ilaçlarının sistemik olarak pitütüer somatostatin reseptör aktivasyonu ile GH-IGF-1 aksını inhibe ederek etki ettiği düşünülmektedir.²⁰ Ancak Octreotid asetat sistemik uygulamasının sonuçları diyabetik retinopati tedavisinde akromegali tedavisinde olduğu kadar başarılı değildir. Bunun başlıca nedeninin Octreotid etki mekanizmasının sistemik olarak değil, oküler hedef dokudaki somatostatin reseptör (SSTR) aktivasyonu ile olabileceği ve bu parakrin etkinin GH inhibisyonu yapan Octreotid etkisinin selektif olduğu SSTR2 ve SSTR5 ile oluştuğu düşünülmektedir.²¹ Pepdid yapıda olan Octreotid asetat sistemik uygulandığında kan-beyin bariyerini geçmediği için ancak kan-beyin bariyerinin hasarlandığı durumlarda göz içindeki hedef dokulara ulaşabilmesine bağlı parakrin etkinliğinin az olduğu düşünülmektedir.

Kliniğimizde daha önce in vivo PR-fare modelinde yapılan çalışmada intravitreal triamsinolon enjeksiyonunun neovaskülarizasyon üzerine baskılayıcı olduğu gösterilmiş ve retina dokularındaki morfolojik etkileri incelenmiştir.²² Bu çalışmamızda in vivo PR-fare modelini kullanarak intravitreal verilen Octreotid asetatın farklı dozlarda neovaskülarizasyon üzerine etkisi ve retinal morfolojide oluşturduğu morfolojik etkiler ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 PREMATÜRE RETİNOPATİSİ

Premature retinopatisi, düşük doğum ağırlıklı, erken doğan bebeklerde görülen retinal damarların anormal proliferasyonuna bağlı oluşan ve çocukluk çağında körlüğe yol açan vasküler bir hastalıktır.²³ CRYO-ROP çalışmasındaki veriler sonucunda 750 gr altındaki bebeklerde %90 oranında, 27 haftadan küçük bebeklerde %83 oranında PR geliştiği bildirilmiştir.²⁴ Hastalığın gelişiminde en önemli risk faktörü postmenstrüel yaş ve düşük doğum ağırlığıdır.

2.1.1 EVRELEME

PR Uluslar arası geçerli sınıflandırmaya göre değerlendirilir.²⁵

Uluslar arası PR sınıflamasına(ICROP) göre hastalığın şiddetini dört etken belirler:²⁵

- a. Retina tutulumun yerleşimi; zonlarla ifade edilir.
- b. Retina tutulumunun yaygınlığı; saat kadranı olarak ifade edilir.
- c. Retinopatinin ciddiyeti; evre olarak ifade edilir.
- d. Retina arka kutup damarlarında dilatasyon varlığı (plus hastalık)

ZON TANIMI:

Zon 1: En içteki alandır. Optik disk merkezinden, makula merkezine uzanan mesafenin iki katı çaptadır.

Zon 2: Zon 1 sınırından nasal ora serrataya uzanan alandır.

Zon3: Zon 2 yi çevreleyen hilal şeklinde retina alanıdır.

Evre 1: İmmatür damarlanma ve demarkasyon hattı

Evre 2: Kabarık demarkasyon hattı (ridge)

Evre 3: Ekstraretinal fibrovasküler proliferasyon

Evre4: Kısmi retina dekolmanı

- Evre 4A: Ekstrafoveal
- Evre 4B: Foveal

Evre5: Tünel şeklinde total retina dekolmanı

2.1.2 TEDAVİ

PR tedavisi için uluslar arası kriterler geçerlidir.²⁶ Lazer veya kriyo tedavisi ile pretreshold ve treshold hastalıkta avasküler retinanın ablasyonu ile hastalığın progresyonunun engellenmesi esasına dayanır .²⁶

Evre 4a, evre 4b ve evre 5 hastalıkta serklaj cerrahisi veya vitrektomi uygulanmaktadır. Prospektif vaka serilerinde intravitreal bevaciumab tek başına veya cerrahi ile kombine tedavisi ile olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir ancak bazı yayınlarda mevcut dekolmanın kötüleştiği rapor edilmektedir.²⁷

2.2 PREMATÜRE RETİNOPATİSİ PATOGENEZİ

Retina damarlanması gestasyonun 16. haftasında başlar.²⁸ Retina damarları optik diskten mezenşim içsi hücreleri olarak yayılır. Mezenşim içsi hücrelerin yayılımını endotel proliferasyonu ve kapiller oluşum izler. Yeni kapiller damarlardan matür retina damarları oluşur. Gestasyonun 6. haftasında oluşan koroid damarları avaskularize retina alanlarını besler. Retinanın nazal bölümü 36. haftada tümüyle vaskularize olurken, temporal alanın vaskülarizasyonu 39. haftada tamamlanır. Bu nedenle prematür doğan bebeklerde gestasyonel yaşına uygun immatür tamamlanmamış vaskülarizasyon ve periferik avasküler zon vardır. Prematüre retinopatisinin ilk fazında (Faz-1) bebek anne karnındayken devam etmesi gereken vaskülarizasyon durur ve oluşmuş damarlarda vazooobliterasyona bağlı kayıp olur. Bebeğin matürasyonu ile vaskülarize olmayan retina alanı metabolik olarak aktif ve hipoksik duruma gelir.

Retina neovaskülarizasyonu, PR' nin ikinci fazı (Faz-2) hipoksiye bağlıdır ve yaklaşık postmenstrüel 34. haftada meydana gelir.²⁹⁻³⁰ Hipoksinin tetiklediği retinal neovaskülarizasyon fazı diğer proliferatif retinopatiler ile benzerdir.

PR' deki moleküler yolları çalışmak için fare modeli geliştirilmiştir.³¹ Fare, kedi, rat gibi hayvanların gözleri doğumda tam olarak vaskülarize olmadığı için prematür infantların retinal vasküler gelişimine benzerlik gösterir. Deney hayvanlarının hiperoksiye maruz kalması PR' nin Faz-1 evresine benzerlik gösteren, normal vasküler gelişimin duraklamasına ve vazooobliterasyona neden olur. Fareler oda ortamına alındığında retinada perfüzyonun olmadığı alanlar hipoksik hale gelir ve daha sonra Faz-2 PR evresindeki gibi neovaskülarizasyon meydana gelir.

Hipoksi proliferatif retinopatilerde ve Faz-2 PR' de neovaskülarizasyonu tetikleyen ana nedendir. Retinal hipoksi farede neovaskülarizasyonun gelişiminden önce Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ekspresyonunda artışa neden olur.³⁵ VEGF inhibisyonunun neovasküler cevabı azaltması VEGF' in retinal neovaskülarizasyonda önemli olduğunu kanıtlamaktadır.³⁶⁻³⁷ VEGF, PR olan bebeklerin retinasında fare modeline benzer şekilde yüksek bulunmuştur.³⁸ VEGF normal damar gelişimi için gereklidir ve hayvan modellerindeki PR-Faz-1 evresi, VEGF bağımlıdır. Retina gelişimi vaskülarizasyondan daha önce olduğu için hipoksi yaratan lokalize oksijen ihtiyacı vardır.³⁸ Fizyolojik hipoksi damar gelişimini tetikler.^{29,30} VEGF hipoksiye cevap olarak salınır ve kan damarları VEGF uyarısına doğru büyür. Yeni oluşan damarlardaki oksijen hipoksiyi azalttıkça VEGF mRNA ekspresyonu azalır ve büyüme durur. Oksijen tedavisi fare ve rat modellerinde normal gelişimi engeller. Hayvan modellerinde hiperoksi, VEGF mRNA süpresyonuna neden olarak VEGF fizyolojik dalgasını engeller ve damar büyümesini duraklatır. Hiperoksinin tetiklediği vazoobliterasyon vasküler endotel hücrelerinin apoptozu ile olur ve kısmen dışarıdan uygulanan VEGF ile engellenebilir.³⁹⁻⁴⁰ Bu VEGF' in immatür retinal damarların devamlılığı için gerekli olduğunu gösterir ve hiperoksinin PR patogenezindeki etkisini kısmen açıklayabilir.⁴⁶

VEGF inhibisyonu PR Faz-2 evresindeki hipoksiye bağlı retinal neovaskülarizasyonu tamamen engellemez. PR' nin klinikte birçok faktöre bağlı olduğu açıktır. PR için en önemli risk faktörü prematüritedir ve bu nedenle büyüme ve gelişme ile ilgili faktörler hastalık oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir. Büyüme hormonunun (GH) etkileri proliferatif diyabetik retinopatide gösterildiğinden,⁴¹⁻⁴² GH ve insulin benzeri büyüme hormonu-1 (IGF-1) mitojenik etkileri nedeniyle PR patogenezinde etkili oldukları düşünülmektedir. PR Faz-2 evresindeki proliferatif retinopati GH reseptör antagonisti eksprese eden transgenik farelerde veya GH hormon salınımını baskılayan somatostatin analogu olan MK 678 (seglitide) ile tedavi edilen transgenik olmayan farelerde proliferatif retinopatinin azaldığı gözlenmiştir.⁴³ GH inhibisyonu IGF-1 inhibisyonu ile etki gösterir çünkü sistemik IGF-1 uygulanan kontrol farelerde neovaskülarizasyon meydana geldiği gözlenmiştir. Proliferatif evredeki farelere IGF-1 reseptör antagonisti verildiğinde VEGF cevabında değişiklik olmadan retinal neovaskülarizasyonun baskılandığı gözlenmiştir.⁴⁴ IGF-1 maksimum VEGF

stimulasyonu ile yeni damar gelişimine neden olur. IGF-1 seviyeleri düşük olduğunda VEGF varlığında bile damar büyümesi engellenir. Bu nedenle IGF-1, PR gelişiminde nonhipoksik faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir.⁴³

IGF-1, PR' nin ilk evresinde normal damar gelişiminde önemli role sahiptir.⁴⁵ PR' nin ilk evresindeki damar gelişimindeki aksaklık, ikinci evredeki hastalığın şiddetini belirler. Doğumdan sonra plasenta ve amniyon sıvısından sağlanan IGF-1 olmadığı için IGF-1 seviyesi in utero koşullara göre düşük olur. IGF-1 olmayan farelerde retina damar gelişiminin prematür bebeklerdeki benzer şekilde yavaşladığı gözlenmiştir . IGF-1 maksimum VEGF aktivasyonu ile bir hücre içi ikincil mesaj sistemi olan Akt endotel hücre yolunu kontrol eder. Bu bulgu IGF-1 kaybının nasıl vasküler endotel hücrelerin hayatiyetini etkileyerek hastalığın oluşumuna neden olduğu açıklayabilir.⁴⁶

Bu gözlemler PR olan bebeklerin kan IGF-1 seviyelerinin aynı postmenstrüel yaştaki normal bebeklerdeki kan IGF-1 seviyelerine göre daha düşük bulunması ile uyumludur.⁴⁶

2-3 ANJİYOGENEZ ve ANJİOYOGENEZDE ETKİLİ FAKTÖRLER

Anjiyogenez var olan kapiller damarlardan yenilerinin oluşmasıdır. Anjiyogenez süreci ve düzenlenmesi oldukça karmaşıktır ve tam olarak anlaşılamamıştır. Proanjiyojenik ve antianjiyojenik moleküller arasındaki denge bu süreci kontrol eder. Anjiyogenez endotel hücre aktivasyonu, çevre dokularda proteoliz, endotel hücrelerinin tüplere adhezyonu, migrasyonu, proliferasyonu, hücre- hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşiminin yeniden yapılanması gibi birçok basamağı kapsar.⁴⁷ Anjiyogenez embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik süreçte yer alır.

Anjiyogenezin ilk basamağı damarlarda dilatasyon ve geçirgenlik artışıdır. Çevredeki matriksin yıkımı ile birlikte endotel hücreleri göç ederek tüp yapılarını oluştururlar.⁴⁸ Tomurcuklanan yeni damarların çevredeki diferansiye olmuş peri-endotel hücrelerinden ve matriksden destek aldığı düşünülmektedir. Takiben matürasyon ve yeniden şekillenme fazı ile birlikte yeni bir damar ağı oluşur. Endotel hücre göçü ve invazyonu ürokinaz tip plazminojen aktivatörü, matriks metalloproteinazları ve muhtemelen sistein proteinaz sistemlerinin ortak aktivitesini gerektirir.⁴⁹ Proteaz genlerinin ekspresyonu sitokinler ve fibroblast büyüme faktörü

ve VEGF-A gibi anjiogenik faktörlerle artarken proteolizis artışı bir taraftan pro-proteinazların aktive olmasıyla, diğer taraftan plazminojen aktivatörü inhibitörleri, metalloproteinaz doku inhibitörleri ve sistatinlerin downregülasyonu ile sağlanır. Aktive olmuş endotel hücreleri $\alpha\beta_3$ gibi integrinleri eksprese ederek yıkılmış olan matriks içinde yayılır ve daha sonra çoğalmaya başlar. Takiben yeni oluşmuş kapillerlerin endotel hücreleri yeni bazal membran sentezler. Yeni kapillerlerin sağlamlığını ise perisit ve düz kas hücrelerinin sağladığı düşünülmektedir.⁵⁰ Bu süreç trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) tarafından düzenlenmektedir.⁵¹ Anjiyogenezi düzenleyen mekanizmalarda aksaklık sonucunda patolojik anjiyogenez meydana gelir. Malignite, inflamatuvar ve oküler hastalıklarda patolojik anjiyogenez önemli rol oynar. Anjiyogenez basamaklarının engellenmesi ile bu tür hastalıklara yeni tedavi yaklaşımları geliştirileceğine inanılmaktadır.⁴⁷

2-3-1 VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

VEGF ilk olarak deneysel kobay tümörünün yol açtığı batındaki asit sıvısından izole edilmiştir.⁵² Damar geçirgenliğini histaminden 50.000 kat daha fazla arttırmaktadır.⁵³ İlk kez 1989 yılında klonlanmış, in vitro modellerde endotel hücre büyümesini ve in vivo modellerde neovaskülarizasyonu tetiklediği saptanmıştır.⁵⁴⁻⁵⁵ VEGF endotel hücre kültürüne eklendiğinde de novo kan damarı oluşumunu arttırmasının yanı sıra endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu da içeren kan damarı oluşumunda yer alan çoğu basamağı tetiklemektedir ve VEGF bazal membran hasarı ve kan damarlarının çevre doku stromasına yayılması için gerekli metalloproteinaz enzimlerin üretimini arttırmaktadır.⁵⁶ VEGF patolojik neovaskülarizasyonda yer alan monositler için güçlü bir kemoatraktan görevi görür.⁵⁷

VEGF yüksek affiniteli sinyal reseptörü olan VEGFR1 ve VEGFR2' ye bağlanmaktadır.⁵⁸⁻⁵⁹ Bu reseptörler ilk önce vasküler endotel hücrelerinde saptanmışlar ancak daha sonra diğer non vasküler hücrelerde de bulunmuşlardır.⁶⁰⁻⁶¹ VEGFR1 ve VEGFR2 tirozin kinaz reseptör ailesinde yer alırlar. Üçüncü reseptör olan nöropilin VEGF' in VEGF165 izoformuna özgüllük gösterir.⁶³ Bu reseptör nöral, endotelial ve tümör hücrelerinde bulunmaktadır.

VEGF' in aynı genden eksprese edilen birçok protein izoformu vardır.⁵⁶ En fazla çalışılmış olanları VEGF121, VEGF165, VEGF189 izoformlarıdır. İsimlendirmedeki

sayılar proteinde bulunan aminoasit sayısını ifade eder. VEGF evrim sürecinde büyük ölçüde korunmuş olduğu halde murin homologlarında bir aminoasit eksiktir ve VEGF 165 proteinin murindeki karşılığı VEGF 164' tür.⁶³

VEGF geninde yeralan sekiz ekzon farklı farklı protein izoformlarına ait mRNA' ları oluşturmak üzere alternatif olarak bağlanırlar. Proteinlerin heparine gösterdikleri affinite farklıdır. Heparin affinitesi hücre yüzeylerinde ve bazal membranlarda bulunan heparan sulfat proteoglikanı ile etkileşme yeteneğidir.⁶⁴ En küçük izoform olan VEGF121 heparini bağladığı için serbestçe çözünebilir ve salgılandıktan sonra daha uzak mesafelere ulaşabilir. VEGF189 gibi daha büyük izoformlar hücre yüzeyinde bulunur ve bazal membranda depolanır. Bu izoformlar plazmin gibi proteazlar aracılığı ile hızla salgılanabilir.⁶⁴ Bu nedenle teoride anjiyogenez de novo VEGF üretimi için gen ve protein sentezi mekanizmasını beklemeye gerek kalmadan başlatılabilir.⁶⁵ Sistem pıhtılaşma kaskadının analogudur. VEGF' in çözünebilir ve heparine bağlanan formlarının bulunması nedeniyle ortamdaki VEGF dağılımı kontrol edilebilir. Mikroçevredeki küçük değişiklikler mükemmel olarak dallanmış vasküler yapının oluşmasına neden olur.⁶⁶⁻⁶⁷

Son yıllarda VEGF ailesine VEGF-A' ya ek olarak VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörü eklenmiştir. VEGF-C ve VEGF-D tirozin kinaz reseptörleri aracılığıyla VEGFR3 ve VEGFR2' yi kullanarak lenfanjiyogenezde rol aldığına inanılmaktadır.⁶⁸ VEGF-B ve plasental büyüme faktörünün anjiyogenezde yer aldıkları düşünülmektedir.⁶⁹⁻⁷⁰

Doku kültüründe çok sayıda retinal hücre tipi VEGF üretmekte ve hipoksik ortamda bu üretim artmaktadır.⁷¹⁻⁷² VEGF inhibe edilirse mitojenik kapasite ortadan kalkar. Retina iskemik olduğunda VEGF düzeyleri retinada, vitreusta ve aköz sıvısında yüksek seyreder.⁷³⁻⁷⁶ Bu düzeyler patolojik damarların büyümesi ve regresyonu ile orantılıdır.⁷³ VEGF' in birincil kaynakları ganglion, müller, retina pigment epitel hücreleri ve nöral hücrelerdir.⁷³ İskemik retinada özellikle panretinal fotokoagülasyon sonrasında VEGF düzeyleri hızla düşer.⁷⁷ VEGF düzeyleri ve neovaskülarizasyon arasındaki ilişki kornea, iris, retina ve koroide ilişkin deneysel modellerde gözlenmiştir.⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁸⁰⁻⁸¹ Yine bu modellerde VEGF inhibe edildiğinde dokularda kan damarı büyümesi baskılanır. Primat gözüne yapılan intravitreal VEGF enjeksiyonu retina ve iris neovaskülarizasyonu ile birlikte neovasküler glokoma içeren şiddetli diyabetik retinopati tablosuna benzer bir klinik durum

ortaya çıkarır.⁸²⁻⁸³ Bu veriler VEGF' in oküler neovaskülerizasyon oluşumunda gerekli ve yeterli olduğunu gösterir.

Bugüne kadar oküler neovasküler hastalıkta VEGF ve reseptörleri insanda gösterilmiştir. Diyabetik retinopati,⁷⁹⁻⁸⁰ retinal ven oklüzyonu,⁸⁰⁻⁸⁴⁻⁸⁵ iris neovaskülerizasyonu,⁸⁰ prematüre retinopatisi⁸⁶, yaşa bağlı makula dejenerasyonu⁸⁷ ve korneal neovaskülerizasyonda,⁸⁹ VEGF' in patolojik damar büyümesinde yer aldığını gösteren veriler elde edilmiştir.

Tüm bu patolojik olaylarda yer almasının yanında VEGF vücuttaki damar gelişimi için gereklidir. VEGF,VEGFR1 veya VEGFR2 kodlayan genlerin delesyona uğratıldığı sıçanlarda erken dönem in utero ölüm meydana gelmiş ve histopatolojik incelemelerde yetersiz endotel farklılaşması, tamamlanmamış ve olgunlaşmamış damar oluşumunu gösteren bulgular elde edilmiştir.⁹⁰⁻⁹¹⁻⁹²⁻⁹³ Bu bulgular ortamda VEGF olmaması durumunda yerini dolduracak yedek bir molekül üretilmediğini göstermektedir. Farklı deneylerde VEGF tek bir allelinin delesyonunun ağır damar yetersizliğine bağlı in utero fare ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.⁹⁴ Bu bulgular kan damarı oluşumunun sağlıklı olabilmesi için VEGF düzeylerinin sıkı kontrolünün gerekliliğine işaret eder. VEGF düzeylerinde %50' lik azalma kusurlu kan damarı oluşumuna yol açarken, çift dozu ölümcüldür.⁹⁵

Kemirgen tümör oluşumu modellerinde tümör oluşumu modellerinde kullanılan VEGF-bloke edici antikor, tümör anjiyogenez inhibisyonu ile tümör büyümesini güçlü bir şekilde baskılamaktadır.⁶⁹ Ancak başarılı denemelerde bile tümör büyümesinin yavaşlamakla birlikte ilerlemeye devam ettiği görülmüştür. Bu durum anjiyogenez basamaklarının çokluğunu ve karmaşık yapısını gösterir ve gerçek anlamda anjiyogenez ve oküler neovaskülerizasyonun baskılanması için çoğul moleküler hedeflere yönelik ajanlar gerekebilir.⁹⁶

VEGF' in damar geçirgenliğini indükleyerek makula ödemi gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. Diyabetik retinopati modelinde kan-retina bariyeri VEGF inhibisyonu ile korunmakta ve hasarı halinde geri dönüşüm olabilmektedir.⁹⁷

Diyabetik makula ödeminde VEGF düzeyleri yükselmiştir ve klinik durum ile uyum gösterir.⁹⁸ VEGF salınımının engellendiği kemirgen üveit modelinde viterustaki hücre miktarı ve kan-retina bariyerindeki hasar güçlü şekilde baskılanmıştır (yamashiro adamis ve ark avo 2003). VEGF kan-retina bariyer hasarına oldukça karmaşık mekanizmalarla neden olur. VEGF, lökosit aracılı endotel hasarı, fenestra oluşumu, sıkı bağlantıların çözülmesi ve hücreler arası yoğun sıvı akışı ile

damarların sızdırmasına yol açabilmektedir.¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁻¹⁰² Bu mekanizmalar tek başına ya da toplu halde kan-retina bariyerinde hasar oluşturabilir. VEGF inhibisyonu ya da yokluğunda kan-retina bariyeri yeniden oluşabilmektedir. Kan–retina bariyerinin bozulmasına yol açan VEGF miktarı ve süresi neovaskülarizasyon için gerekenden azdır.⁸²⁻⁸³ Bazı araştırmacılar vasküler geçirgenliğin, neovaskülarizasyon oluşması için gerekli ve öncü bir basamak olduğunu düşünmektedirler.¹⁰³ Maküler ödemde kortikosteroid kullanımının etkinliği bilinmektedir. Steroidler VEGF ekspresyonunun baskılanması, ve VEGF ile indüklenen lökosit hasarının inhibisyonu mekanizmaları ile maküler ödemde etkili olmaktadır.¹⁰⁴

VEGF ve reseptörleri normal gözde eksprese edilir.⁶¹ VEGF ekspresyonu retina pigment epitelinde daha fazladır ve özellikle VEGF121 ve VEGF165 izoformları bulunur. VEGF ekspresyonunun kesin amacı bilinmemekle beraber koryokapillaris için trofik olabileceği ve koryokapiller fenestranın devamlılığını sağlamada yer aldığı düşünülmektedir. Diğer fenestre vasküler yapılarda yapılan incelemeler bu varsayımı destekler. Sistemik panizofom VEGF inhibisyonu gerçekleştiğinde ortaya çıkan proteinüri, hasarlı böbrek glomerülünü düşündürmektedir.¹⁰⁵ VEGF glomerüllerde eksprese edilir, glomerül endoteli için sağ kalım faktörüdür ve glomerüler fenestranın bir indukleyicisi olarak görev yapabilir.¹⁰⁵ VEGF izoformları gözde ve diğer vücut bölgelerinde fizyolojik role sahiptir.

VEGF etkilerini parakrin olarak meydana getirir ve lökositlere bağlandığında proinflamatuvar etkiler gösterdiğine dair kanıtlar elde edilmiştir.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Bu hücrelerde VEGF üretilmekte ve salınmaktadır. VEGF reseptörleri trombositler de dahil olmak üzere inflamatuvar hücre tiplerinde mevcut ve aktiftir.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Yapılan çalışmalarda inflamatuvar hücrelerin kan-retina bariyeri hasarı ve neovaskülarizasyonda yer aldıkları gösterilmiştir. Önceleri iskeminin indüklediği neovaskülarizasyonun noninflamatuvar karakterde olduğu düşünülmekteydi; ancak günümüzde inflamatuvar hücrelerinde bu sürece dahil oldukları bilinmektedir.¹¹¹ Tüm farklı izoformlar arasında VEGF165 en fazla proinflamatuvar özellik gösterendir ve patolojik neovaskülarizasyonda yer alır. VEGF164 normal retinal damar gelişiminde gerekli değildir ancak oksijen ile indüklenen retinopati modeli kullanılarak patolojik damar oluşumu sağlanan farelerde VEGF164 eksikliğinde neovaskülarizasyon baskılanır.¹¹¹ Bu nedenle VEGF164 neovaskülarizasyonla ilişkili en spesifik izoformdur. VEGF164 inhibisyonu sağlandığında patolojik

neovaskülarizasyon baskılanırken normal damar büyümesi zayıflamaktadır. VEGF164 hücrelerarası adhezyon molekülü-1' in artışı ile lökositlerin neovaskülarizasyon alanlarına adezyonunu sağlamaktadır.¹⁰⁷ İnflamatuvar hücrelerin neovaskülarizasyon alanlarına göçü engellendiğinde yeni damar gelişimi baskılanabilmektedir.¹¹³⁻¹¹⁴ Bu alanlardaki inflamatuvar hücrelerin bazıları endotelyal progenitör hücrelere dönüşmektedir ve fiziksel olarak yeni damar oluşumuna katılabilmektedir.¹¹⁵ T lenfositler bu yapılanmada görev almakta ve damarların şekillendirilmesi yoluyla düzenleyici rol oynamaktadırlar.¹¹⁵

Anti-VEGF tedavi yaklaşımların yeni damar gelişmesini engellemede oldukça etkili yöntemler oldukları düşünülmektedir. Ancak bu yaklaşımları damar regresyonu üzerine farklı etkileri olduğu görülmüştür. VEGF blokajı henüz gelişmekte olan damarların regresyonunu sağlamakta ancak gelişimini tamamlamış damarlara etki etmemektedir. Yeni oluşan damarlar lökositler ile yeniden şekillendirilmekte ve mural hücreler tarafından hızla çevrelenmektedir.¹¹⁶ Yeni gelişen damarlar yaklaşık 14 gün içinde olgunlaşmakta ve VEGF blokajına dirençli hale gelmektedirler.¹¹⁷ Bu direncin mural hücrelerin varlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Perisitlerin oluşumunu henüz tamamlamamış damarlardan uzaklaştırılması bu damarları yeniden VEGF blokajına duyarlı hale getirir.¹¹⁷ Perisitlerin olgunlaşmasında trombositlerden türeyen büyüme faktörü-B önemli bir yere sahiptir.¹¹⁷ Bu faktörlerin engellenmesi ile yeni oluşan damarların yanısıra daha önceden oluşmuş olan patolojik damarların regresyonuna yol açabilir. VEGF fizyolojik ve patolojik damar oluşumunda önemli bir yere sahip olsa da yeni damarların karmaşık gelişimi birden fazla büyüme faktörünün varlığını gerektirir. Diğer önemli bazı büyüme faktörleri trombosit türevi büyüme faktörü, IGF-1 ve anjiyopoetindir.¹²³⁻¹²⁴

2.3.2 İNSULİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ IGF-1

İnsulin benzeri büyüme faktörü IGF-1 birçok dokuda bulunur, hücre büyümesi, farklılaşması ve transformasyonunda çok önemli bir faktördür.¹²⁵ IGF-1 insanlarda 12. kromozomda ve farelerde 10. kromozomda yer alan IGF- gen ürünüdür.¹²⁶ IGF-1 prenatal ve postnatal dönemde gelişimde çok önemli görev üstlenir ve bu etkilerini IGF-1 reseptörlerine bağlanarak (IGF-1R) gösterir ve bu etkiler IGF-1 bağlayıcı proteinler ile düzenlenir.¹²⁷ Dolaşımda bulunan IGF-1 başlıca karaciğer

tarafından büyüme hormonunun kontrolünde salgılanır buna ek olarak birçok organda da parakrin ve otokrin etki gösteren IGF-1 salgılanır .¹²⁶⁻¹²⁸

IGF-1 vasküler düz kas hücre kültüründe sentezlenip, salgılanır.¹²⁹ IGF-1 damar düz kas hücreleri için mitojen ve antiapoptotik bir faktördür ve damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarır.¹³⁰ Hücre döngüsünde G1-S geçişini uyarması nedeniyle diğer büyüme faktörlerinin mitojenik etkileri için gereklidir. Anjiotensin II ve PDGF' e bağlı damar düz kas büyümesinin anti IGF-1 antiserumu ile engellendiği çalışmalarda gösterilmiştir.¹³¹

IGF-1 endotel hücrelerinde düşük düzeylerde salgılanırlar ve dolaşımdaki IGF-1 önemli oranda endotel hücrelerine alınır.¹³²⁻¹³³ Hem büyük hem küçük damarların endotel hücrelerinde IGF-1R ekspresyonu olur.¹³⁴ IGF-1 sistemin elemanlarının ekspresyonu birçok vasküler orjinli büyüme faktörü, hipoksi, hücre yoğunluğu, TGF- β ve VEGF ile olur.¹³⁵ IGF-1 etkileri mikrovasküler ve makrovasküler damarlarda farklıdır.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ IGF-1 mikrovasküler damarlarda aminoasit, glukoz alınımını ve DNA sentezini artırır ancak bu etki makrovasküler damar endotel hücrelerinde gözlenmemiştir.¹³¹ IGF-1 migrasyon, anjiyogenezi düzenler ve endotel hücrelerindeki inflamatuvar ve vazodilatör cevabı güçlendirir.^{142,142,144} IGF-1 endotel hücreleri üzerindeki etkileri nitrit oksit sentaz (e NOS) ve VEGF ile düzenlenir.¹⁴⁵ IGF-1 retinal anjiyogenezin oluşmasında önemlidir ve IGF-1R antagonistleri retinal anjiyogenezi VEGF üzerinden in vivo baskılar.¹⁴⁵

2-3-3 BASİT FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (bFGF)

Retinada bulunan ilk büyüme faktörüdür. Ortak 120 aminoasitlik bir iskelete sahip, 9 proteinden oluşan geniş bir aileye aittir. İn vitro ve in vivo olarak anjiyojeniktir .¹⁴⁶ Çok çeşitli hücrede mitoz ve diferansiyasyonu uyarır. Ekstraselüler matriksteki varlığının kaynağı bilinmemektedir. bFGF organizmada özellikle normal retinada bulunur. Hücre sitoplasmasında bulunur ve bazal membrandaki heparan sulfat ile bağlanır. bFGF, endotel hücrelerinde çoğalma ve epiblast hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar. bFGF doğrudan veya dolaylı olarak endotel hücre aktivitesini düzenler. Potent bir endotel hücre stimülatörü olan bFGF; endotelde migrasyon, proliferasyon ve tüp oluşumundan sorumludur. bFGF ile VEGF'in anjiyogenezi üzerinde sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. PDGF ve bFGF de heparine bağlı peptid yapıda büyüme faktörleri olarak VEGF gibi tirozin

kinaz reseptörleri üzerine etki ederek dimerizasyon, otofosforilasyon ve neticede Mitogen Activate Edici Protein Kinaz (MAPK) gibi intrasellüler kinazların aktivasyonunu sağlanmasıyla activator protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri uyarılarak mitojenik etkili genlerde cevap oluşturulur.¹⁴⁷

2.3.4 TROMBOSİT KÖKENLİ BÜYÜME FAKTÖRÜ (PDGF)

İki homolog zincir olan PDGFA ve PDGFB' den oluşan bir heterodimerdir. Monosit ve trombositlerin alfa granüllerinde bulunur. İn vivo ve İn vitro koşullarda anjiyogeniktir. Erken anjiyogeneze mezenşim hücrelerinden perisit diferansiasyonunu sağlayarak görev alır . Hipoksi sonucu artan VEGF salınımını potansiyelize eder ¹⁴⁸. Bir çalışmada proliferatif diyabetik retinopati membranlarında PDGF ve reseptörleri bol miktarda tespit edilmiştir .¹⁴⁹

2.3.5 TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ (TGF)

Trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik, böbrek gibi farklı dokulardan izole edilmiştir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Düşük dozda anjiyogenik, yüksek dozda antianjiyogenik özellikler gösterir. Monositleri uyararak FGF, PDGF,TNF, IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Makrofajlar için kemotaktiktir; fibroblast kemotaksisi ve proliferasyonunu uyarır. Kollajen sentezini uyarırken, diğer taraftan kollajenazı aktive eden faktörlerin etkisini azaltır. Fibroblastlarda fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak yara kontraksiyonunda rol oynar. Matriks remodeling olayında görev yaparak epitelyal hücre proliferasyonunu uyarır.¹⁵⁰

2.3.6 TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ ALFA (TNF)

Düşük dozda endotelyal hücre çoğalmasını ve tübül oluşumunu sağlarken, yüksek dozda ters etki gösterir. İnaktif prekürsör olarak salınır ve ekstraselüler ortamda aktive edilir. VEGF salınımını direkt indükler ve ekstraselüler matriks komponentlerinin, plazminojen aktivatörlerinin ve proteaz inhibitörlerinin üretimini artırır. Proenflamatuar özellikleri ile in vivo olarak yeni damar oluşumuna yol açar

2.3.7 PLASENTA KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ (PIGF)

VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni aminoasitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 aminoasit içeren son hali olur VEGF-B gibi VEGFR- 1'e bağlanarak etki gösterir .¹⁵²

2.4 ANTİANJİYOJENİK AJANLAR

KontROLSÜZ anjiyogenez sonucu oluşan komplikasyonlar prematüre retinopatisi, diyabetik retinopati, retinal ve oklüzyonu ve inflamatuvar hastalıklarda ciddi ve geri dönüşümsüz görme kaybına neden olur. Yıllardır retinal iskeminin bu hastalıklarda anjiogenetik faktörleri uyaran temel faktör olduğu düşünülmektedir.¹⁵³ Bu nedenle bu hastalıkların tedavisinde antianjiogenetik maddeler önem kazanmıştır.

2.4.1 TRIAMNİSOLON ASETONİT

Sentetik bir steroid olup antiinflamatuvar ve anjiostatik etkiye sahiptir. İnflamasyonu baskılar ve RPE migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır. Ayrıca vasküler endotelial hücre ekstrasellüler matriksinin yapımını da etkiler.¹⁵⁴ PR fare modelinde in vivo koşullarda neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir.¹⁹ Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda, diffüz diyabetik makula ödeminde ve kistoid makula ödemi tedavisinde kullanılır.¹⁵⁵⁻¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ İntravitreal triamcinolon (IVTA) sonrası komplikasyonlar katarakt oluşumu, göz içi basınç yüksekliği, endoftalmi ve regmatojen retina dekolmanıdır .¹⁵⁷

2.4.2 ANEKORTAV ASETAT

Anti-anjiogenik etki gösteren bir steroidir.¹⁵⁹ Anekortav asetatın YBMD'li olgularda etkilerini incelemek için birkaç çalışma yürütülmüştür. Anekortav asetat, spesifik olarak tasarlanmış bir kanülle 6 ay aralıklarla lokal anestezi altında arka sklera üstüne enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır. Anekortav asetatın etkisini ve güvenilirliğini araştırmak için baskın klasik KNV'li olgulara üç ayrı dozda (30 mg,

15 mg ve 3 mg) uygulanmış ve kontrol grubu ile bir yıllık takip sonuçları karşılaştırılmıştır. 12. ayın sonunda gerek ortalama görme düzeylerindeki değişiklik, gerekse görmenin stabilitesi ve şiddetli görme kaybının önlenmesi açısından 15 mg anekortav asetatın kontrol grubuna üstünlüğü gözlenmiştir .¹⁶⁰⁻¹⁶¹

2.4.3 PEGAPTANİB SODYUM

28-baz ribonükleik asit molekülüne, polietilen glikol parçalarının bağlanmasından oluşmaktadır. 50 kDa molekül ağırlığındadır. Selektif olarak VEGF165'e bağlanabilme özelliği olan bir aptamerdir. Antikor değildir ama antikor etkisi gösterir. İmmünojenik değildir. Farmakokinetiği nedeniyle 6 haftada bir vitre içi uygulanabilir.¹⁶² Fotodinamik tedavi veya diğer anti-VEGF ilaçlar ile birlikte kombinasyon tedavisinde yer alabilir .¹⁶³

2.4.4 BEVACİZUMAB

İnsan VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize eder ve fare epitoplarının insana uyarlanması ile fareden VEGF'e karşı elde edilmiş monoklonal antikordur (IgG) .¹⁶¹ Metastatik kolon kanseri ve küçük hücreli dışındaki akciğer kanseri tedavisinde 2004 yılında FDA onayı almış bir ajandır. Tümör hücreler boyut artışında difüzyonla beslenemez hale gelir ve yeni kan damarlarına ihtiyaç duyarlar. Tümöral hücrelerden salgılanan mediatörler (en önemlisi VEGF) anjiyogenezi başlatır. Kolonkanserlerinde 5 Floro Urasil (FU) tedavisine adjuvan olarak bevacizumab eklenir.

Serumda yarılanma ömrü ortalama 20 gündür.¹⁶² Kolon kanseri nedeniyle sistemik bevacizumab tedavisi alan hastalarda YBMD bulgularında belirgin bir düzelme olduğunun fark edilmesi üzerine Mayıs 2005 tarihinden bu yana intravitreal onay dışı kullanılmaktadır.¹⁶⁴ Bevacizumab'ın gözde kullanım endikasyonları genişleyerek neovasküler glokom, pseudofakik kistoid makula ödem, santral retinal ven oklüzyonlarına bağlı maküler ödem, proliferatif diabetik retinopati, diabetik maküler ödem, prematüre retinopatisinde kullanılmaya başlanmıştır.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Intravitreal uygulama dozu 1.25-2.5 mg aralığındadır. Oküler kullanımda 1 haftadan daha uzun bir süre sistemik dolaşımda kalır. Bütün bir IgG molekülünün

yaklaşık 150 kDa (150000 Da) olması, vitreus içine verilen bu monoklonal antikorların retinaya veya retina altı boşluğa geçişini zorlaştırdığı düşünülmektedir. Internal limitan membran ve ganglion hücre tabakası retina geçişine engel olur. VEGF'in majör yapım yeri RPE bazal yüzüdür, bu bölgedeki ilacın yeterli bir konsantrasyon da olması etkinliği sağlamaya yeterli olabilir.¹⁶⁷

2.4.5 RANİBİZUMAB

Bevacizumab'ın molekül büyüklüğü nedeniyle VEGF'e karşı monoklonal antikorun antijen bağlayan kısmının pepsin ayırma yöntemiyle ayrılması sonucu elde edilen yaklaşık 48 kDa monoklonal antikor parçasının vitreus içine uygulanmasının daha etkili olacağı düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak, insan VEGF'ine karşı fareden elde edilen monoklonal antikorun antijen bağlayan parçasının çeşitli işlemlerden geçirilmesi ile ranibizumab elde edilmiştir.¹⁶⁸ Yakın zamanda koroidal neovasküler membran tedavisinde FDA onayı almıştır.

2.4.6 VEGF-Trap

VEGF-trap, VEGF reseptör 1 ve 2 nin antijen bağlayan kısımlarıyla Immunoglobulin G'nin (IgG), Fc parçalarının birleştirilmesiyle oluşturulan bir füzyon proteindir. Bu füzyon proteinin reseptör kısmı bütün VEGFA izoformlarının yanında VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü 1 ve 2 ye bağlanabilir. Böylece VEGF-Trap VEGF-A nın tüm izoformlarını bloke etmekle birlikte, proanjiyojenik özelliğe sahip diğer VEGF ailesi üzerinden de etkisini göstermektedir.¹⁶⁹

2.4.7 ENDOSTATİN ve ANGIOSTATİN

Her ikisi de endotel hücrelerinde apoptozu indükleyen ve migrasyon ve proliferasyonu önleyen endojen anti-anjiyojenik faktörlerdir. Endostatin kollajen XVIII'in 20 kDa'luk, angiostatin ise plazminojenin 38 kDa'lık fragmanıdır. İnsan endostatini 4 farklı peptid halinde sentelenmiş ve peptid 1 ile 4' ün invivo ve invitro modellerde anjiogenezi baskıladığı gösterilmiştir.¹⁷⁰ Rekombinant Endostatin'in i.v. bolus enjeksiyonları sonrasında hiçbir yan etki görülmemiştir.¹⁷¹

2.5 SOMATOSTATİN

Pitütüer bezden büyüme hormon salınımını engelleyen bir faktör olup, hipotalamus ekstresinden GHRH izolasyonu çalışmaları sırasında rastlantısal olarak keşfedilmiştir. GH ve insülin sekresyonunu inhibe eden peptid yapıdaki somatostatini 1973 yılında hipotalamustan izole edilmiştir. 14 aminoasitten oluşan siklik yapıda bir peptid olan somatostatin-14 (SST-14) ve sekretuar bir ürün olan somatostatin-28 (SST-28) alt tipleri bulunur. Somatostatinin her iki formu da ortak bir pro-hormonun, prohormon konvertaz ile değiştirilmesinden sonra oluşur. Bu iki peptid dokularda farklı oranlarda bulunarak nörotransmitter olarak veya parakrin ve otokrin etki ile salgılanma, nöromodulasyon, düz kas kasılması, besin absorpsiyonu ve hücre büyümesi gibi fizyolojik etkiler gerçekleştirir.¹⁷² SST-14 beyin ve hipotalamusta, retinada baskın olarak bulunurken, SST-28 gastrointestinal sistemde bulunan başlıca formdur.¹⁷³

Somatostatin dağılımı anatomik olarak çok yaygındır ve birçok hedef organdaki biyolojik etkilerini 5 farklı reseptör ailesi ile gerçekleştirir.¹⁷⁴

Somatostatin reseptörlerinin 5 değişik alt tipi gen klonlama teknikleri ile tanımlanmıştır. Bunlarda SSTR2 iki farklı şekilde eksprese olur. Bu reseptörlerin farklı alt tipleri değişik kromozomlar üzerindeki ayrı genler ile birçok hedef organda tek başına veya birlikte eksprese olur. Bu moleküller farklı ikincil mesajcılara bağlanır ve bu nedenle hücre içi etki mekanizmaları farklıdır. Reseptör alt tiplerinin somatostatin analoglarına bağlanma affiniteleri farklıdır. Bu farklılıklar somatostatin analoglarının değişik tedavi ve tanı alanlarında kullanılmasına neden olur.¹⁷⁴

İnsandaki somatostatin reseptörleri, kemirgendeki somatostatin reseptörleri ile homoloji gösterir. Bu oran SSTR1' de % 99 gibi yüksek bir oran iken SSTR4, SSTR5, SSTR3 daha az korunmuştur ve %82-83 homoloji görülür.¹⁷³

Bütün SSTR reseptör alt tipleri pertusis toksine duyarlı G proteinleriyle eşleşmiştir ve SST-14 ile SST-28' e yüksek affinite ile nanomolar düzeyinde bağlanırlar. Diğerlerinden farklı olarak SST-28, SSTR-5' e yüksek affinite gösterir. SSTR-1 ve SSTR-2 beyinde en çok bulunan alt tiplerdir ve muhtemelen post sinaptik etkilerine ek olarak hipotalamus ve limbik ön beyinde presinaptik oto reseptör olarak görev

yaparlar. SSTR4 hipokampusüste en yoğun olarak bulunur. Bütün reseptör alt tipleri pitüit bezde eksprese edilir ancak SSTR2 ve SSTR5 en fazla bulunur.

Somatostatinin reseptörü ile bağlanması plazma zarında bulunan inhibitör G proteinlerinin aktivasyonuna ve sonrasında adenil siklaz aktivitesini azaltarak hücre içi cAMP miktarının azalmasına neden olur. Somatostatin reseptörlerinin G proteinine bağlı diğer ortak yolları vanadat-duyarlı fosfotirozin fosfataz enziminin aktivasyonu ve mitojen-aktif protein kinazların (MAPK) modulasyonudur. Somatostatin reseptörlerinin farklı grupları ayrıca, K⁺ kanallarına, voltaj bağımlı Ca²⁺ kanallarına, Na⁺/H⁺ kanallarına, glutamat reseptörlerine, fosfolipaz C ve fosfolipaz A' ya bağlı olarak bulunur. Hücre içi cAMP ve Ca²⁺ miktarının azalması hormon sekresyonunun azalmasında en önemli mekanizmadır. Fosfotirozin fosfataz ve MAPK proteini üzerindeki etkileri ile somatostatin, tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder.¹⁷⁴⁻¹⁷⁵

İnsan gözü retina pigment epitel hücrelerinde immunhistokimya ile somatostatin reseptörleri gösterilmiş ve somatostatin reseptör ekspresyonu insan retina pigment epitel hücre kültüründe reverse transkriptaz-PCR metodu ile kesin olarak doğrulanmıştır. IGF-1 insan RPE hücrelerinde doza bağlı olarak IGF-1R fosforilasyonunu uyarak somatostatin analogu olan octreotid IGF-1 reseptör fosforilasyonunda ve VEGF üretiminde azalmaya neden olur. IGF-1 fosforilasyonu ile birlikte VEGF mRNA birikimi, somatostatin ve octreotidin fizyolojik düzeyleri ile inhibe olur ve bu etki somatostatin reseptör tip 2 (SSTR2) aracılığı ile olur.¹⁹⁵

2.6 OCTREOTİD ASETAT

Klinik çalışmalarda octreotide, lanreotide, vapreotid ve MK-678 bileşiklerince incelenmiştir. Octreotid asetat sentetik bir somatostatin analogudur ve daha uzun plazma yarılanma ömrüyle birlikte büyüme hormonuna karşı daha yüksek spesifite gösterir. Yüksek metabolik stabilitesi ve uzun etki süresi farklı uygulama şekilleri ile kullanılabilmesine imkan verir. Octreotid asetatın civciv koryallantoik zarında anjigenezi ve endotel hücrelerinin replikasyonunu durdurduğu bildirilmiştir.¹⁹⁶ Octreotid asetat SSTR2,-5' e yüksek affinite, SSTR3'e orta affinite ve SSTR1,-4' e düşük affinite göstermektedir. Octreotid asetat, somatostatin reseptörü olan hücrelerde antiproliferatif etki gösterir.¹⁷⁸ Octreotid asetat akromegalide aşırı GH

salgısını baskılayarak tümör boyutunu küçültür. TSH salgılayan adenomlarda cerrahi sonrasında kullanılır. Karsinoid tümör, VIPoma, glukagonoma, insülinoma metastatik tümörlerin tedavisinde kullanılır. Octreotid asetat ishalin bazı formlarının tedavisinde ve pankreatik fistülde sekresyonları azaltmak için kullanılır. Octreotid safra salgısını ve kontraktilitesini azaltarak safra çamuru oluşumuna ve safra taşı oluşumuna neden olabilir. Diğer yan etkiler bulantı, abdominal kramp, yağ emiliminin azalmasına bağlı diyaredir. Glukoz toleransında azalma karbonhidrat emiliminde azalma, GH ve glukagon sekresyonunda azalma nedeniyle görülmez.

Yapılan çalışmalarda octreotid insan endotel hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri gösterilmiştir.¹⁷⁹ Bu etkilerini endotel hücreleri üzerinde bFGF ve IGF-1 etkisinin doğrudan inhibisyonu ile gösterdikleri düşünülmektedir.¹⁸⁰

Tavşanlar üzerinde gerçekleştirilen intravitreal doz çalışmalarında 0.1mg ve 1 mg doz aralığında yapılan intravitreal enjeksiyonlar güvenli bulunmuş ve oküler toksik etki gözlenmemiş ancak daha yüksek dozlarda gerçekleştirilen intravitreal enjeksiyonlarda katarakt oluşumu ve retina pigment epiteli seviyesinde multinukleer füziform hücre proliferasyonu izlenmiştir.¹⁸¹ Yüksek dozların intravitreal enjeksiyonu sonrası görülen katarakt oluşumunun mekanizması bilinmemektedir.

Kedi gözüne intravitreal enjeksiyon yapılan bir çalışmada aköz octreotid asetat ve uzun etkili form karşılaştırılmış ve aköz formun yarılanma ömrü 16 saat olduğu, enjeksiyondan 4 gün sonra gözde çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık uzun etkili form pik seviyesine enjeksiyondan 28 gün sonra ulaştığı ve göz içinde yaklaşık 42 gün sonra bile var olduğu bulunmuştur.¹⁸²

2.7 OKSİJENE BAĞLI PREMATÜRE RETİNOPATİSİ FARE MODELİ

Deneyde Smith ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdiği, retinal neovaskülarizasyonu ve prematüre retinopatisinin proliferatif neovasküler evresini yansıtan tekrarlanabilir bir model olan oksijene bağlı prematüre retinopatisi fare modeli kullanılmıştır.¹⁸³ Bu bölümde o model hakkında bilgi verilmektedir. Neovaskülarizasyonun miktarını kantifiye etme imkanı verir. Fare retinasında oluşturulan tekrarlanabilir ve üretilebilir neovaskülarizasyonun parametreleri tanımlanmıştır. Bu modelde kalıcı skatrizasyon yerine PR' de bulunan, ilaçların

test edilebileceği, ve diğer neovasküler hastalıklar için örnek olabilecek neovaskülarizasyonun olduğu bir model kurulması amaçlanmıştır.

Modeli geliştirmek için yaş ve oksijen konsantrasyonu parametreleri dikkate alınmıştır. Başlangıçta yeni doğmuş (P0) farelerden, postnatal 7. güne (P7) kadar olan fareler 5 gün süre ile oksijene maruz bırakılmış ve gözleri, oda havasında 1 ile 5 gün arasında değişen sürelerde kaldıktan sonra kesit alınarak incelenmiştir. Hyaloid regresyon ve yetersiz retinal neovaskülarizasyon arasındaki dengeyi optimize etmek için postnatal 7. gündeki fareler en uygun bulunmuştur. %50, %75 ve %95 oksijen konsantrasyonunun neovaskülarizasyonun üzerindeki etkileri incelendikten sonra toksik etkinin az olması ve neovaskülarizasyonu yeteri kadar uyarması nedeniyle %75 oksijen konsantrasyonu seçilmiştir. Fareler anne fare ile birlikte 12 saatlik döngüsel oda ışığında bırakılmışlardır. Oksijene maruz bırakılan fareler, %75 oksijen konsantrasyonuna imkan veren oksijen tüpü ile bağlı inkübatör içinde tutulmuşlardır. 1.5 l/min akış hızı günde iki kez kontrol edilerek kafes sıcaklığı $23C \pm 2C$ olacak koşulların sabit kalması sağlanmıştır. Fareler inkübatör içinde yeterince su ve yem ile birlikte bırakılmışlar ve içeride oldukları P7-P12 arasındaki süre boyunca kafes hiç açılmamıştır. Bu modelde P12 fareler tekrar oda koşullarına alındıktan sonra P17 ve P21 arasındaki farelerde en üst düzeyde neovasküler cevap gözlenmiştir.

2.7.1 NEOVASKÜLER PROLİFERATİF RETİNOPATİNİN NİTELENDİRİLMESİ

Smith ve arkadaşlarının¹⁸³ geliştirmiş olduğu modelde hayvanlar sakrifiye edildikten sonra gözler enukleasyondan sonra %4 paraformaldehyde içinde en az 24 saat bekletilerek parafin blok içine yerleştirilir. 6µm aralık ile optik sinire paralel sagittal seri kesiler alınarak periodic acid- Schiff (PAS) ve hematoksilen ile kesitler boyanır. Geçmişteki tecrübelerden neovaskülarizasyonun kadranslar arasında fark göstermediği bilinmektedir. Oluşan yeni damarların endotel hücre çekirdekleri ışık mikroskopunda retinanın normal yapılarından ayırt edilerek sayılır.

Göz küresinin santralinden, optik sinirin 30µm ile 90 µm uzağından yaklaşık 150 seri kesit alınır. Örneklem her göz için ortalama retinal uzunluğun %10' una denk gelecek şekilde 4 ile 8 kesiti içerir. Optik sinirden geçen kesitler, sinirden uzanan normal damarlar neovasküler damarlarla karışabileceği için

değerlendirmeye alınmaz. İnternal limitan membranın vitre tarafındaki hematoksilen-eozin ile boyalı yeni damarların hücre çekirdekleri sayılmıştır. Neovasküler damarlarda perisit hücreleri morfolojik olarak tanımlanmamıştır ve neovasküler hücrelerde var oldukları bildirilmemiştir. İntraretinal damarlar nöral retinadan PAS boyama ile ayrılırlar.

P0 ve P7 fareler üzerinde yapılan gözlemler sonucunda P7 farelerin retinalarının maksimal hyaloid regresyonu ve minimal damar gelişimi nedeniyle prematüre bebeklerin retinalarına en yakın model olduğu görülmüştür. P0 fareler %80 konsantrasyonun üzerinde oksijene maruz bırakıldıklarında hyaloid damarların yoğun dilatasyonu ve disk üzerinde tanımlanamayan yoğun vaskülarizasyona yol açmışlardır. Buna karşın P7 farelerin %75 oksijen konsantrasyonunda bırakıldıktan sonra oda koşullarına alındıklarında hyaloid damarlarda dilatasyon oluşturmada tekrarlanması ve kantifiye edilmesi mümkün olan neovaskülarizasyon oluşturdıkları gözlenmiştir. P7 fareler %80 oksijen konsantrasyonunda bırakıldıklarında bir miktar daha fazla neovaskülarizasyon oluşturmakla birlikte mortalitenin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle prematüre retinopatisi modelinde %80 oksijen konsantrasyonu yerine %75 oksijen konsantrasyonu tercih edilir.

Hiperoksik ortamdan oda havasına alınan P12-P44 farelerde yapılan günlük incelemeler sonucunda en fazla neovasküler cevabın P17 ve P21 arasında meydana geldiği görülmüştür. Bu cevabı P24 farelerin düz retina örneklerinde görülen neovasküler damarlarda yavaş regresyon ve daha fazla normal damarlanma paternin gelişimi izler. Yetişkin vasküler paterni olan P24 fareler %75 oksijenli ortamda 5 gün bırakıldıktan sonra oda koşullarına alındıklarında hipoperfüzyonun veya neovaskülarizasyonun oluşmadığı görülmüştür.

Normal P17 farelerin retinalarında optik sinirden periferik uzanan birbirine damarlarla bağlanmış derin ve yüzeyel damar tabakası vardır. Damarlar yüzeyde ince radyal dallanma ve derinde poligonal retiküler dallanma gösterir. Hiperoksiye maruz kalan farelerde hem derin hem yüzeyel damarlarda santral perfüzyon azalır. Neovasküler cevap insanlarda olduğu gibi farelerde mid-periferde perfüzyonun olduğu ve olmadığı retinanın birleştiği alandır. İnsanlardaki PR' den farklı olarak santral retinada perfüzyon olmazken, perifer retinada perfüzyon olur. Hyaloid damarların kalıntıları perifer retinadaki damarlarla bağlantı sağlar. Bu patern hiperoksiye maruz kalan bütün farelerin retinalarında görülür. Flöresein-dakstran

perfüzyonu yapılan düz retina örneklerinde ve parafin kesitlerinde, hiperoksiye bağlı vazoproliferasyon ile farelerin ağırlık ve cinsiyetleri arasında ilişki bulunmamıştır. 6µm kalınlığındaki parafin kesitlerin incelenmesi flöresein-dekstran anjiyografide görülen vasküler paterni doğrulamış ve ek ayrıntıların aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. P21 farelerde gözlenen normal patern optik sinirden ora serrataya doğru uzanan derin damar ağı ile birlikte bununla bağlantısı olan yüzeyel damar ağından oluşur. PAS ve hematoksilin-eozin ile boyanan vasküler hücreler internal limitan membranın vitreal yüzüne doğru uzanmaz. P7 ve P12 arasında yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz bırakıldıktan sonra oda havasında tutulan P21 farelerde özellikle midperiferde vitreusa uzanan neovasküler hücre kümeleri görülmüştür. Flöresein-dekstran perfüzyonu yapılan örnekler görülen neovasküler hücre kümelerinin derin retinal damarlar ile devam ettiği gözlenmiştir. Bu gözlem neovasküler damarların hyaloid veya vitreal damarlardan değil de retinal damarlardan kaynaklandığını doğrular. Kesitlerde morfolojik olarak retinal hipoperfüzyonun olduğu ve olmadığı retinal alanlara komşu koroid alanlarında kalınlık farkı gözlenmemiştir.

Hiperoksinin tetiklediği neovaskülarizasyon miktarı seri parafin kesitlerde vitreus tarafındaki hücre çekirdekleri sayılarak belirlenmiştir. Normal P21 farede ortalama 6 µm kesit başına 0.6 ± 0.9 SD hücre çekirdeği vitreusa uzanırken, oksijenli ortamda tutulan fare gözlerinde 6 um kesit başına 89 ± 34 SD hücre çekirdeğinin vitreusa uzandığı belirlenmiştir. Kesit başına hiperoksiye maruz bırakılan farelerin derin damar profilleri sayıca fazla bulunmamış ancak birim alanda ortalama damar profili daha fazla bulunmuş ve bu damarların normal retinadaki damarlara göre PAS ile daha koyu boyandığı gözlenmiştir. Ayrıca P15 ve P16 fare retinalarının derin damarlarının normal retinalardakine göre alan başına daha fazla hücre çekirdeği içerdiği görülmüştür. Gerileme evresinde (P21 – P44) derindeki damarlar hücre çekirdekleri PAS ile boyanan madde kaybolmadan önce yok olur ve bu bulgu ekstrasellüler maddelerin intrasellüler maddelere göre daha uzun süre kaldığını gösterir.

Hiperoksiye bağlı diğer değişiklikler proliferatif retinopati gelişmeden ortaya çıkar. Normal P7 fare retinasında ora serrata yakınına uzanan yüzeyel damar tabakası ve optik sinirden midperifere uzanan derin bir bağlantı tabakası bulunur. Bunun yanında ora serrata yakınında damar gelişiminin henüz olmadığı, perfüzyonun olmadığı küçük bir alan bulunur. Oksijene maruz kaldıktan 8 saat sonra optik disk

etrafında dallanan iyi gelişmiş yüzeyel radyal damarların perfüzyonu normal olarak devam ederken, muhtemelen vazokonstriksiyona bağlı olarak, ince kapiller damarlarda perfüzyon azalır. Fareler 8 saat sonra hiperoksik ortamdan uzaklaştırıldıklarında santral vazokonstriksiyon geri dönüşlüdür ve 5 gün sonra normal retinal vasküler gelişim gözlenir. 24 saatlik ve 5 günlük oksijen maruziyeti sonrasında santral hipoperfüzyon alanı 8 saatlik maruziyete göre daha yaygındır. 5 gün yüksek oksijenli ortamda kaldıktan sonra 2 gün oda koşullarında tutulan P14 farede santral retinanın büyük bölümünde perfüzyon olmaz. Radyal damarlar dilate ve kıvrımlı görünümündedir.

Hipoperfüzyonun geri dönüşülebilirliği oksijene maruziyetten 24 saat sonra azalır. Oda koşullarına alındıktan 5 gün sonra (P16) parafin kesitlerde internal limitan membranın üzerinde vasküler hücre çekirdek kümeleri görülebilir. Vitreusa uzanan neovasküler damar oluşumları, midperiferde santralde perfüzyonun olmadığı retina alanı ile perfüzyonun iyi olduğu perifer retinanın birleşme yerinde bulunur. Bu cevap en fazla P17 ve P21 günleri arasında gözlenir. P17 ve P21 arasında kesitlerde gözlenen subretinal hemoraji ve retinal fold diğer oksijene bağlı prematüre retinopati hayvan modellerinde tanımlanmıştır. Erişkin retinal damar gelişimi olan P24 fareler oksijenli ortamda bırakıldıktan sonra oda havasına alındıklarında hipoperfüzyon veya proliferatif retinopati meydana gelmediği gözlenmiştir.

Fare retinası bazı özellikleri nedeniyle oksijene bağlı proliferatif retinopati modeli için elverişlidir. Fare retinasının normal gelişim süreci vasküler gelişimin tüm evrelerini incelemeyi mümkün kılacak şekilde doğum sonrası ilk iki hafta içinde olur. Yeni doğan fare retinasının damar gelişim evreleri, gestasyonun 4. ve 5. ayındaki prematür infantlarınkine çok benzer. İnsanlardakine benzer olarak bu gelişim prekürsör işi hücrelerin yüzeyel tabakayı oluşturmasıyla başlar ve daha sonra derin vasküler retinal tabaka oluşur.

Bu çalışma P7 farede olduğu gibi hyaloid damarlar tamamen regresyona uğradığında retinal damarların hiperoksiye cevabının daha tutarlı olduğu ve hyaloidopati ile karışık retinopati yerine proliferatif retinopati geliştiğini gösterir.

P7 fareler hiperoksiye maruz kaldıklarında başlangıçta santral vazokonstriksiyon olur ve daha sonra perfüzyon durur. Daha periferde olan damarlar persistan hyaloid kalıntılarının bağlantısı ile akım sağlayabilir. Çoğunlukla ora serratada vasküler gelişimin olmamasına bağlı küçük avasküler zon bulunabilir. Oda

havasına geri döndükten sonra P14 farelerde retinal neovaskülarizasyon gelişmeden önce radyal damarlarda insanlardaki plus hastalığa benzer şekilde engorjman ve kıvrımlanma artışı olur. Bundan sonra vaskülarize retina ve avasküler retina ayırımında neovaskülarizasyon meydana gelir ve bunu regresyon ve vasküler paternin normalizasyonu takip eder. İnsanlarda iyi ayırt edilebilen mezenşimal kabarıklık farelerde gözlenmez. Bunun yerine ışık mikroskopunda vasküler ve avasküler retina ayırımında, iç retina katmanında artmış içsi hücre sayısına bağlı lokalize kabarıklıklar fark edilir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 HAYVAN DENEYİ

Tüm deneyler Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu Hayvan Hakları Komitesinin onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi (Proje No: DA09/02). Deneyler Smith ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdikleri oksijen endükte in vivo prematüre retinopatisi fare modeli ile yapıldı. Yeni doğan C57BL/J6 fareler anneleriyle birlikte postnatal 7. güne kadar oda havasında bekletildikten sonra, postnatal 7.-12 günlerde ortalama 75 ± 2 oksijenli ortama bırakıldı. Fareler cam kafeste yeteri kadar yem, su ve anneleriyle birlikte tutuldu. Oksijen maruziyeti süresince kafes hiç açılmadı.

Postnatal 12. günde fareler tekrar oda koşullarına alındı (%21 oksijen). Aynı gün fareler tartıldıktan sonra ketamin hydrochloride (40 mg/kg) ve Xylazine hydrochloride (5mg/ml) intraperitoneal enjeksiyonu ile farelere anestezi yapıldı. İntravitreal enjeksiyon için bir somatostatin analogu olan Octreotid asetat etken maddeli Sandostatin (Novartis, USA) adlı ticari form kullanıldı. Fareler 4 gruba ayrıldı:

Grup 1:Negatif kontrol grubu (oksijene tabi tutulmamış ve işlem uygulanmamış) (n=4)

Grup 2: Kontrol grubu (oksijene tabi tutulmuş (n=26)

Grup 3: 0.1µg IVO enjeksiyon uygulanan PR grubu (n=12)

Grup 4: 0.05µg IVO enjeksiyon uygulanan PR grubu (n=14)

Postnatal 12. günde 0.1 µl intravitreal Octreotid asetat enjeksiyonu farelerin sağ gözlerine 32 gauge Hamilton şırıngası ile stereoskopik mikroskop altında gerçekleştirildi. Enjeksiyonlar korneoskleral bileşkede saat 6 hizasından lokal betadin uygulamasından sonra yapıldı. Grup 3 (n=12) 0.1mg/ml Octreotid asetat konsantrasyonu 1 µl enjeksiyon uygulandı. Grup 4 (n=14) 1 ml steril izotonik solüsyon ve 1 ml 0,1 mg/ml Octreotid asetat karıştırılarak elde edilen 0.05 mg/ml konsantrasyonundaki karışımdan 1 µl intravitreal enjeksiyon uygulandı. Grup 1 (n=4) 17 gün boyunca oda koşullarında tutularak negatif kontrol grubunu oluşturdu. Grup-2 (n=26) postnatal 7. ve 12. günler arasında %75 oksijenli ortamda anneleri ile birlikte bırakılan farelerin sol gözlerine 1 µl izotonik solüsyon enjeksiyonu uygulandı. Fareler 5 gün oda koşullarında anneleri ile birlikte

birakıldıktan sonra postnatal 17. günde intraperitoneal ketamin hydrochloride (100 mg/kg), xylazine hydrochloride (5mg/kg) uygulandıktan sonra sakrifiye edildi ve gözler enükle edildi.

3.2 HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Işık mikroskop incelemesi için gözler enukleasyon sonrasında %4 paraformaldehyde çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Sonra parafin bloklardan 6 µm aralıklarla optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde kesitler elde edildi. Her gözden seri kesitler alındı ve bu kesitler periodic acid-schiff ve hematoksilen ile boyandı. Her gözden optik sinir sınırından sonraki 3. kesit seçilerek değerlendirme o kesitten yapıldı. Optik siniri içeren kesitler optik sinirden uzanan yoğun damar yapısı nedeniyle değerlendirmeye alınmadı. İnternal limitan membranın vitreous tarafındaki hematoksilen ile boyanmış vasküler hücre çekirdekleri ışık mikroskopunda sayıldı. İntraretinal damarlar nöral retinadan PAS boyama ile ayırt edildi.

3.3 ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

Her gruptan 2 göz elektron mikroskopi incelemesi için fosfat tampon içeren % 2.5 gluteraldehide çözeltisinde 2-3 saat bekletildikten sonra %1 osmium tetraoksid (OSO₄) içinde fikse edildi. Alkolle seri olarak muamele edilerek dehidrate edildi. Propilen oksite geçtikten sonra örnekler Araldyte CY212, DDSA (2- dodecenyl succinic anhydtrate), BDMA (benziyldimethyl amine) ve dibutylpytalate içinde bekletildi. Yarı-ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Ultra-ince kesit alınarak uranyl acetat ve lead sitrait ile boyanarak LEO 906 EM transmisyon elektron mikroskopu ile incelendi.

3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar sayılan endotel hücre çekirdek sayısının ortalama değeri olarak belirtildi. İstatiksel analiz PASW 17.0 versiyonu (PASW Inc.,Chicago, IL, USA) ile hesaplandı. Herbir gruptaki ortalama değer ANOVA testi ile karşılaştırıldı ve p < 0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME (IŞIK MİKROSKOPU)

Vitreus tarafındaki endotel hücre çekirdeği sayısı grup 3' te (0.1 mg/ml IVO) 5.1 ± 1.0 ve grup 4' te (0.05 mg/ml IVO) 6.9 ± 1.4 tane sayıldı. Grup 2' de (kontrol grubu) vitreusa uzanan, retina damarlarından köken alan çok sayıda neovasküler hücre kümeleri izlendi. Kontrol grubunda histolojik kesit başına vitreus tarafına bakan 19.9 ± 2.6 hücre sayıldı (Resim 1). Grup 1' de (negatif kontrol grubu) iç limitan membranın vitreus tarafında endotel hücre çekirdeği görülmedi (Resim 2). Grup 3 ($p < 0.0001$) ve grup 4 ($p = 0.0001$), grup 2 ile kıyaslandığında endotel hücre çekirdeği sayısında belirgin farklılık saptandı. Grup 3 ve grup 4 arasında fark bulundu ($p = 0.023$).

Histolojik incelemede hiç bir grupta ışık mikroskop incelemesinde kistik dejenerasyon, hiposelularite, nukleer tabaka kaybı gibi toksik etki gözlemlenmedi (Resim 3).

4.2 ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRME (ELEKTRON MİKROSKOPU)

Elektron mikroskopik incelemede özellikle iç ve dış fotoreseptör bölgesinde mitokondriler incelendi. Negatif kontrol grubunun ultrastrüktürel incelenmesinde mitokondrilerde belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı (Resim 4). Kontrol grubunda hiperoksiye bağlı mitokondriyal dismorfoloji saptandı (Resim 5). Kontrol grubunda fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde morfolojik değişiklikler mitokondrilerde benekli matriks ϕ , yoğun kesif içeren litik matriks χ ve mitokondriyal dış membran kaybı φ şeklinde gözlemlendi. 0.1 μ g intravitreal Octreotid asetat enjekte edilmiş grupta (mitokondriyal morfolojik değişiklikler) daha yoğundu (Resim 6). 0.05 μ g intravitreal Octreotid asetat enjekte edilmiş olan grup ile kontrol grubu arasında mitokondriyal morfolojik farklılık bulunmadı.

Retinal pigment epitel, koroid ve sklera düzeyinde dismorfoloji hiç bir grupta görülmedi (Resim 7).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada gerçekleştirilen deneylerin sonucunda bir somatostatin analogu olan Octreotid asetatın, farklı dozlarda PR fare modelinde in vivo neovaskülarizasyonu baskılayıcı etkilerini gözledik. Elektron mikroskop incelemelerinde 0.1 µg intravitreal Octreotid asetat enjeksiyonu uygulanan farelerde mitokondriyal dismorfolojide artış olduğu gözlemlendi. Buna karşılık 0.05 µg intravitreal Octreotid asetat enjeksiyonu uygulanan gözlerdeki mitokondrial dismorfoloji miktarı kontrol gruba benzer düzeydeydi.

Anjiyogenez, birçok inhibitör ve stimülatör maddenin arasındaki denge ile düzenlenir.¹⁸⁴ Fizyolojik anjiyogenez çok sıkı denetim altındadır ve sadece gelişim, doku tamiri gibi belli koşullarda aktive olur. Bu dengenin bozulması gözde de meydana gelen patolojik neovaskülarizasyon ile sonuçlanır.¹⁸⁵ PR iki evreden oluşan bir hastalıktır. İlk (FAZ-1) evrede prematür doğum sonrası retinal vasküler gelişim durur. İkinci (FAZ-2) evrede gelişen retinanın yetersiz vaskülarizasyonuna bağlı olarak stimülatör faktörlerin salınımı ile anormal yeni damar oluşumu gözlenir. Bu evrede vaskülarize olan ve vaskülarize olmayan retina sınırında fibrovasküler dokuda artış olur.¹⁸⁶ Bu çalışma ile PR' nin ikinci evresinde bozulan bu dengeyi taklit eden oksijene bağlı proliferatif retinopati modelinde Octreotid asetatın antiproliferatif etkisini tespit ettik.

Neovaskülarizasyonu uyaran birçok faktör oksijen endükte PR fare modelinde çalışılmıştır.¹⁸³ Oksijen ile regüle edilen medyatör maddelerin en önemlisi VEGF' tir. Başlangıçtaki proliferatif cevapta etkili esas maddedir. Oksijenin sonlandırılmasından 10-12 saat sonra VEGF protein ekspresyonunun maksimum düzeye ulaştığı, bununla beraber bFGF seviyesi oksijenin sonlandırılmasından 5-6 gün sonra, maksimum neovasküler cevap sırasında yükseldiği gözlenmiştir.¹⁸⁷ VEGF supresyonu olduğunda normal damar gelişimi duraklar, buna karşılık VEGF aşırı yükseldiğinde patolojik neovaskülarizasyon görülür. Retinal neovaskülarizasyonda önemli oksijen bağımlı olmayan diğer bir önemli faktör IGF-1' dir. IGF-1 reseptör antagonisti in vitro koşullarda neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkisini p44/42 mitojen aktive protein-kinaz aracılığı ile VEGF aktivasyonunu kontrol ederek gerçekleştirir.¹⁸⁸ VEGF' e benzer şekilde IGF-1 düşük düzeylerinde vasküler gelişim durur ve proliferatif evrede IGF-1

seviyesinde artmaya bağılı patolojik neovaskülariasyon oluşur.¹⁸³ Bu iki medyatörün etkileşimi PR patofizyolojisinde önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada hedef alınan iki önemli madde VEGF ve IGF-1'dir. Bu çalışmamızda VEGF ve IGF-1 aktivitesinin azalmasını indirekt olarak histolojik kesitlerdeki neovaskülarizasyon kümesinin azalması olarak gözledik.

Faz-1 PR' de IGF-1 yetersizliği nedeniyle retinal damar gelişiminin duraklaması ikinci evrede ani ve aşırı şekilde VEGF, IGF-1 düzeylerinin yükselerek neovaskülarizasyon ile sonuçlanması evreye göre tedavi stratejisi belirlenmesi sonucunu doğurur. Bu nedenle FAZ-1 hastalıkta IGF-1 desteği ile hastalığı önlenmesi hedeflenirken, diğer proliferatif retinopatilere benzeyen FAZ-2 hastalıkta VEGF ve IGF-1 benzer anjiojenik maddeler yönelik antiproliferatif tedaviler gündeme gelmektedir.¹⁸⁹

Bir gözü lazer ile tedavi edilen ve diğer gözünde hiçbir tedavi uygulanmayan bebeğin ölümünden sonra gözleri incelenmiş ve tedavi edilmemiş gözde periferik avasküler retinada VEGF mRNA düzeyleri yüksek bulunmuştur. Tedavi edilmiş gözde VEGF mRNA öncelikle ganglion tabakada ve daha sonra iç nukleer tabakada bulunduğu gözlenmiştir. Lazer ile tedavi edilmiş gözde VEGF mRNA lazer yanıkları arasındaki alanda ganglion hücre tabakasında artış gösterir. Bu bulgu PR patogeneğinde hipoksiye bağılı VEGF üretiminin arttığı düşüncesini destekler ve hayvan modellerinde gözlenen hipoksi sonucu VEGF artışı ile uyumludur.¹⁹⁰

Somatostatin nöroendokrin, inflamatuvar ve immün hücrelerden salınan polipeptid yapıda bir hormondur.¹⁹¹ Çeşitli hormonların ve büyüme faktörlerinin salınımını inhibe eder ve antiproliferatif etkisi nedeniyle hücre döngü üzerine etkilidir. Damar kasılmasını inhibe eder¹⁹². Vasküler remodeling engellenir.¹⁹³ Anjiyogenez ve hücre çoğalması baskılanır.¹⁹⁴ Bu nedenle bu çalışmada bu özelliklerinde dolayı antiproliferatif ajan olarak bir somatostatin analogu olan Octerotid asetat seçilmiştir. Somatostatin analogu olan Octreotid asetat, yüksek affinite ile SSTR2' ye ve daha düşük affinite ile SSTR5' e bağlanır.¹ Somatostatin retina pigment epiteli hücrelerinde (RPE), IGF-1 sinyal iletim yolağını inhibe ederek VEGF üretimini baskılar. Somatostatin reseptörleri insan gözünün retina pigment epiteli hücrelerinde immün histokimya ile gösterilmiş ve insan retina pigment epitel kültüründe somatostatin reseptörlerinin varlığı reverse-transcriptaz PCR tekniği ile kanıtlanmıştır.¹⁹⁵

İnsan retina pigment epiteli hücre kültüründe IGF-1 doz bağımlı olarak IGF-1R fosforilasyonunu ve VEGF mRNA üretimini artırır. Somatostatin ve bir somatostatin analogu olan Octreotid asetat IGF-1 fosforilasyonunu ve VEGF üretimini azaltır. Hem IGF-R fosforilasyonu hem de VEGF mRNA akümüasyonu somatostatinin fizyolojik seviyelerinde (1 nm) inhibe olur.¹⁹⁵

Woltering ve arkadaşlarının yaptığı 0.5 ug, 2.5 ug ve 50 ug Octreotid asetat farklı dozlarıyla yaptığı çalışmada civciv diskinde anjiogenezin sırası ile %15, %56 ve %61 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir.¹⁹⁶

Somatostatin benzeri immunoreaktivite yada somatostatin reseptörleri rat fetus retinasında, fare retinasının iç pleksiform tabakasında gözlenmiştir.¹⁹⁷ Erişkin insan retinasında somatostatin reaktif hücreler ganglion hücre tabakasında iç pleksiform ve sinir tabakasında yer alır.¹⁹⁸ Bu nedenle oksijene bağlı fare retinopatsinin Octreotid asetat ile tedavi etkinliğinin insandaki ile benzer olacağını düşünüyoruz.

Ciddi nonproliferatif ve yüksek riskli olmayan proliferatif retinopatisi olan hastalarda Octreotid asetat ile yapılan kontrollü olmayan bir çalışmada diyabetik retinopati progresyonunda fark bulunmamıştır.¹⁹⁹ Ancak aynı araştırmacının yaptığı diğer bir kontrollü çalışmada ileri diyabetik retinopati olguların Octreotid asetat tedavisinin progresyonu azalttığı ve lazer fotokoagülasyon ihtiyacını geciktirdiği gösterilmiştir.²⁰⁰

Octerotid asetat ile yapılan en uzun süreli kontrollü çalışmada vitreus hemoraji insidansı Octreotid asetat ile tedavi edilen grupta önemli oranda azaldığı bulunmuştur. Bunun yanısıra görme keskinliği seviyelerinin korunduğu veya daha iyi olduğu saptanmıştır. Stereoskopik fotoğraf ve anjiyografi ile yapılan takiplerde Octreotid asetat grubunda proliferasyonda regresyon meydana geldiği gözlenmiştir.²⁰¹ Bu bulgular somatostatin analogu olan octreotid asetatın neovaskülarizasyonu supressör etkili olduğunu desteklemektedir. Ancak bu çalışmalarda Octerotid asetat sistemik yolla uygulanmıştır ve uzun süreli yoğun tedavinin yan etkileri olduğu belirtilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda somatostatin analoglarının etkilerini pütüer aksı etkileyerek değil, büyüme hormonu ve IGF-1 aktivitesini retinal seviyede baskılayarak gerçekleştirdiğini bildiren yayınlar mevcuttur.²⁰² Somatostatin endotel hücre proliferasyonunu ve neovaskülarizasyonu IGF-1, VEGF, PEDF, EGF gibi büyüme faktörlerinin postreseptör sinyal mekanizmalarını parakrin olarak

etkileyerek bir çok yolla baskılayabilir.²⁰³ Ek olarak SSTR2 ve SSTR3 selektif blokörlerinin in vitro olarak retina endotel hücre proliferasyonunu azalttıkları gösterilmiştir.²⁰⁴⁻²⁰⁵ Biz çalışmamızdaki antiproliferatif etkinin bu post sinyal hücre içi mekanizmalarla gerçekleştiği düşüncesindeyiz. Bu antiproliferatif etkinin göz içine uygulanan ilacın parakrin etkisi ile meydana gelmektedir. Octreotid asetatın antiproliferatif etkinliğinin 0.1mg/ml ve 0.05mg/ml uygulanan gruplar arasında birbirine yakın değerlerde olmasını ilaç konsantrasyonlarının PR modelinde neovasküler doku için önemli fark yaratmadığını göstermektedir.

Biz çalışmamızda 0.05 µg ve 0.1 µg IVO uygulanan gözlerde Octreotid asetatın sırasıyla %65 ve %75 oranında inhibitör etkili olduğunu tespit ettik. Bu oran daha önce Akkoyun ve arkadaşlarının intravitreal triamsinolon etkinliğini ölçen çalışmadaki %92-95 oranının altındadır. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada aynı fare modeli üzerinde intravitreal thalidomide enjeksiyonu uygulanmış ve bizim çalışmamızdaki oranlara yakın % 62 oranında neovasküler hücre sayısını azalttığı ve buna karşılık morfolojik olarak hiçbir toksik etki gözlenmediği bildirilmiştir.²⁰⁷

Yapılan bir diğer çalışmada C57BL/J6 farelerde oksijen bağımlı prematüre retinopati modelinde intraperitoneal yolla P7,8,9,11,13,15 ve 17 günlerinde, 5,10,20,30 mg/kg dozlarda uygulanan GH antisense oligonukleotid olan ATL227446 ve 20 mg/kg Octreotid asetat karşılaştırılmış ve en yüksek dozda bile neovaskülarizasyon supresyon etkisi ATL227446 grubunda % 38 ve Octreotid asetat grubunda %26 olarak bildirilmiştir. Bu bizim çalışmamızda elde ettiğimiz %65 ve %75 oranın altında bir değerdir.²⁰⁹ Bu sonuçlardan Octreotid asetatı intravitreal yolla uygulamanın daha etkili olabileceği kanatine ulaşılabilir.

Qu ve arkadaşlarının 15 tavşan üzerinde gerçekleştirdiği deneysel KNV modelinde (50 µg/kg) Octreotid asetat retrobulber olarak uygulanmıştır. Enjeksiyondan 3 gün sonra RPE- koroid kompleksindeki VEGF ve IGF-1 mRNA düzeyleri tedavi alan ve almayan hayvanlarda karşılaştırılmış ve koroid dü örneklerinde KNV büyüklüğü flöresein anjiyografi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda retrobulber Octreotid asetat enjeksiyonunun flöresein sızıntısını ve KNV büyüklüğünü belirgin azalttığı tespit edilmiştir.²¹⁰

Tavşan gözünde yapılan toksisite çalışmalarında intravitreal Octreotid asetat enjeksiyonu sonrası gözler incelenmiş ve 1mg ve daha az dozlarda Octreotid intravitreal enjeksiyonu güvenli olarak bildirilmiştir.²⁰⁶ Yüksek doz intravitreal

Octreotid enjeksiyonu yapılan grupta (5mg, 2mg) katarakt gelişimi ve elektroretinografide b dalga amplitüdünde azalma gözlenirken 1mg altında verilen dozlarda hiçbir klinik farklılık ve ERG değişikliği gözlenmemiştir. Biz çalışmamızda ışık mikroskopu ile histolojik incelemede retinada morfolojik değişiklik tespit etmedik. Histolojik düzeyde morfolojik patoloji görmememizi 0.1µg ve 0.05µg gibi düşük doz Octreotid asetat intravitreal enjekte etmemize bağlı olduğunu düşünmekteyiz. . Elektron mikroskop incelemesinde kontrol grubunda mitokondrial dismorfoloji gözlemledik. İntravitreal Octerotid asetat enjeksiyonu yapılan gruplarda 0.1µg Octerotid asetat verilen grupta ultrastrüktürel etkilerin arttığını tespit ettik. C57BL/J6 PR fare modelinde oksijen endükte morfolojik hasar olduğu bilinmektedir.²⁰⁸ Biz çalışmamızda oksijen endükte doku vulnerabilitenin yanında 0.1µg Octretid asetata bağlı vulnerabilite artışı olduğunu gözlemledik.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmanın sonucunda C57BL/J6 oksijen endukte premature retinopatisi in vivo fare modelinde intravitreal yolla uygulanan Octreotid asetatın vasküler endotel üzerine antiproliferatif etkili olduğunu gözlemledik. Farklı iki doz arasında yapılan karşılaştırmada antiproliferatif etki açısından istatistiksel zayıf anlamlı ($p=0.02$) fark olduğunu tespit ettik. Işık mikroskopu ile yapılan incelemelerde herhangi bir morfolojik değişiklik olmamasına rağmen elektron mikroskopik incelemelerde oksijen toksisitesine bağlı morfolojik değişiklikler gördük ve bu değişikliklerin intravitreal octreotid asetat uygulanan farelerde doza bağımlı olarak arttığını saptadık. Sonuç olarak intravitreal uygulanan Octreotid asetatın neovaskülarizasyon üzerine supressör etkileri gözlenmiştir ancak proliferatif retinopati tedavisinde yerini alabilmesi için kapsamlı deneysel ve klinik çalışmalar yapılması gerekmektedir.

7. REFERANSLAR

1. Frank RN. On the pathogenesis of diabetic retinopathy. A 1990 update. *Ophthalmology*. 1991 ;98(5):586-93.
2. Zimmer-Galler IE, Bressler NM, Bressler SB. Treatment of choroidal neovascularization: updated information from recent macular photocoagulation study group reports. *Int Ophthalmol Clin*. 1995 Fall;35(4):37-57.
3. Gibson DL, Sheps SB, Uh SH, Schechter MT, McCormick AQ. Retinopathy of prematurity-induced blindness: birth weigh specific survival and new epidemics. *Pediatrics*. 1990 Sep;86(3):405-12.
4. Poulsen J: The Houssey phenomemenon in man: recovery from retinopathy in a case of diabetes with Simmond's disease.1953; *Diabetes* 2:7-12.
5. Aiello LP, Bursell S-E, Clermont A, Duh E,Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Ways K, J i rousek M, Smith LEH, King GL: Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinaseC in vivo and suppressed by an orally effective - isoform-selective inhibitor. *Diabetes*1997;46:1473-1480.
6. Grant MB, Caballero S, Ta rnuzzer RW, Bush DM, Spoerri PE: Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration. *Diabetes* 1998;47:1335-1339.
7. Grant MB, Ta rnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, Feoktistov I, Biaggioni I, Shryock JC, Belardinelli L: Adenosine induces vascular endothelial growth factor in human retinal micro vascularendothelial cells. *Circ Res* 1998;85: 699 -706.
8. Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM: Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization.1997 *Science* 276:1706-1709.
9. Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER: Insulinlike growth factors: studies in diabetics with and without retinopathy.1983;*N Engl J Med*3 ;09: 527-530.

10. Dills DG, Moss SE, Klein R, Klein BE: Association of elevated IGF-I levels with increased retinopathy in late-onset diabetes. *Diabetes*.1991;40:1725–1730.
11. Grant, MB, Caballero, S, Millard, WJ. Inhibition of IGF-I and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization *Regul Pept*;1993: 48,267-278.
12. Lambooi AC , Kuijpers RW, van Lichtenauer-Kaligis EG, Kliffen M, Baarsma GS, van Hagen PM, Mooy CM. Somatostatin receptor 2A expression in choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ;41(8):2329-35.
13. Smith, LEH, Kopchick, JJ, Chen, W, et al (1997) Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization *Science* 276,1706-1709. Luty GA, Chang-Ling T, Phelps DL et (2006): Proceedings of third international symposium on retinopathy of prematurity: an update on ROP from the lab to the nursery. *Mol Vis* 12:532-580.
14. Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation of treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of Diabetic retinopathy Study Findings. *Ophthalmology*1978;85:82-106.
15. Luty GA, Chang-Ling T, Phelps DL et: Proceedings of third international symposium on retinopathy of prematurity: an update on ROP from the lab to the nursery. *Mol Vis*.2006;12:532-580.
16. Costa RA, Jorge R, Calucci D, Cardillo JA, Melo LA, Scott IU. Intravitreal Bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IbeNA Study): Results of a phase I dose escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4569-4578.
17. Brazeau P, Vale WW, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*1973; 179: 77–79.
18. Woltering, E.a, Barrie R.,O' Dorsio, T.M, Arce D., Ure, T. Cramer A., Holmes D, Robertson J., Fassler J. Somatostatin analogues inhibit angiogenesis in the chick choriocapillary membrane. *J. Surg. Res.*1991;50: 245-251.

19. Patel PC, Barrie R, Hill N, Landeck S, Kurozawa D, Woltering EA. Postreceptor signal transduction mechanisms involved in octreotide-induced inhibition of angiogenesis. *Surgery*. 1994 Dec;116(6):1148-52.
20. Hyer SL, Sharp PS, Brooks RA, Burrin JM, Kohner EM: A two-year follow-up study of serum insulin-like growth factor-I in diabetics with retinopathy. *Metabolism* 1989;38:586–589.
21. Stella S. PaliNonpeptide somatostatin receptor agonists specifically target ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:50-94-5102.
22. Akkoyun İ, Yılmaz G, Oto S, Kahraman B, Haberal N, Akova Y. Impact of triamcinolone acetonide on retinal endothelial cells in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007 Nov;85(7):791-4.
23. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, et al. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 1991; 98 :1628 –1640.
24. Hardy RJ, Palmer EA, Schaffer DB, Phelps DL, Davis BR, Cooper CJ. Outcome-based management of retinopathy of prematurity. Multicenter Trial of Cryotherapy for Retinopathy of prematurity Cooperative Group. *J AAPOS*. 1997;1:46 –54.
25. An International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity Revisited. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123:991-999.
26. Good WV. Revised Indications for the Treatment of Retinopathy of Prematurity. Results of the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Randomized Trial. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:1684–1696.
27. A.M. Micieli JA, Surkant M, Smith A.F A systemic analysis of the off-label use of bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 2009 Oct; 148 (4):536-543.
28. R. Foos and S. Kopelow, Development of retinal vasculature in perinatal infants *Surv Ophthalmol*. 1973;117–127.
29. I. Michaelson, The mode of development of the vascular system of the retina, with some observations in its significance for certain retinal diseases. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*. 1948;68:137–180.

30. N. Ashton, B. Ward and G. Serpell, Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol*.1954;38:397–432.
31. L.E. Smith, E. Wesolowski, A. McLellan, S.K. Kostyk, R. D'Amato, R. Sullivan and P.A. D'Amore, Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:101–111.
32. N. Ashton, Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The Francis I. Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol*.1966; 62: 412–435.
33. J.S. Penn, B.L. Tolman and M.M. Henry, Oxygen-induced retinopathy in the rat: Relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35: 3429–3435.
34. D. McLeod, S. Crone and G. Litty, Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37: 1322–1333.
35. E.A. Pierce, R.L. Avery, E.D. Foley, L.P. Aiello and L.E. Smith, Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci*1995;92:905–909.
36. G.S. Robinson, E.A. Pierce, S.L. Rook, E. Foley, R. Webb and L.E. Smith, Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*1996;93: 4851–4856.
37. L.P. Aiello, E.A. Pierce, E.D. Foley, H. Takagi, H. Chen, L. Riddle, N. Ferrara, G.L. King and L.E.H. Smith, Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*1995;92:10457–10461.
38. T.L. Young, D.C. Anthony, E. Pierce, E. Foley and L.E. Smith, Histopathology and vascular endothelial growth factor in untreated and diode laser-treated retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 1997;1:105–110.
39. J. Stone, A. Itin, T. Alon, J. Pe'er, H. Gnessin, T. Chan-Ling and E. Keshet, Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-

- induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci*1995; 15 :4738–4747.
40. E.A. Pierce, E.D. Foley and L.E. Smith, Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity [see comments] [published erratum appears in *Arch. Ophthalmol.* 115(3) (1997) Mar. 427]. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1219–1228.
 41. P.S. Sharp, T.J. Fallon, O.J. Brazier, L. Sandler, G.F. Joplin and E.M. Kohner, Long-term follow-up of patients who underwent yttrium-90 pituitary implantation for treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*1997;30:199–207.
 42. A.D. Wright, E.M. Kohner, N.W. Oakley, M. Hartog, G.F. Joplin and T.R. Fraser, Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *Br Med J.* 1969;2:346–348.
 43. L.E. Smith, J.J. Kopchick, W. Chen, J. Knapp, F. Kinose, D. Daley, E. Foley, R.G. Smith and J.M. Schaeffer, Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science*1997;276:1706–1709.
 44. L.E. Smith, W. Shen, C. Perruzzi, S. Soker, F. Kinose, X. Xu, G. Robinson, S. Driver, J. Bischoff, B. Zhang, J.M. Schaeffer and D.R. Senger, Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature Med.*1999;5:1390–1395.
 45. A. Hellstrom, C. Perruzzi, M. Ju, E. Engstrom, A.-L. Hard, J.-L. Liu, K. Albertsson-Wikland, B. Carlsson, A. Niklasson, L. Sjobell, D. LeRoith, D.R. Senger and L.E. Smith, Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: Direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci. USA*2001; 98:5804–5808.
 46. Louis.E.h. Smith. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth hormone and IGF Research.*2004;14:140-144.
 47. Mause SA. Mechanisms of angiogenesis:potential therapeutic targets. In: Mause SA, ed. *Angiogenesis Inhibitors and Stimulators*. Austin: Eurakah com;2000:1-12.

48. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001;49:507-521.
49. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*. 1996; 49(1-3):117-137.
50. Crocker DJ, Murad TM, Geer JC. Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp Mol Pathol*. 1970;13:51-65.
51. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*. 2001;153:543-553.
52. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983–985.
53. Senger DR, Connolly DT, Van de WL, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990;50:1774 –1778.
54. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306 –1309.
55. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309 –1312.
56. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18 –31.
57. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535–1545.
58. deVries C, Escobedo J, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams L. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989 –991.

59. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835– 846.
60. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244 –253.
61. Kim I, Ryan AM, Rohan R, et al. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2115–2121.
62. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735–745.
63. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and posttranscriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 1996;271: 3877–3883.
64. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031–26037.
65. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737–744.
66. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163–1177.
67. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002;16:2684 –2698.
68. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276:1423–1425.
69. Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol* 1997;273(5 pt 2): H2091–H2104.

70. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:528 –535.
71. Shima D, Adamis AP, Ferrara N, et al. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the sole mitogen. *Mol Med* 1995;2:182–193.
72. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1538 –1544.
73. Miller J, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994;145:574 –584.
74. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445– 450.
75. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, 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.
76. Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1476–1482.
77. Shinoda K, Ishida S, Kawashima S, et al. Clinical factors related to the aqueous levels of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2000;21:655– 661.
78. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:18 –22.
79. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris

- neovascularization in a nonhuman primate. Arch Ophthalmol 1996;114:66 –71.
80. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:10457–10461.
 81. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. Arch Ophthalmol 2002;120:338 –346.
 82. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. Ophthalmology 1996;103:1820 – 1828.
 83. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. Arch Ophthalmol 1996;114:964 –970.
 84. Tripathi RC, Li J, Tripathi BJ, Chalam KV, Adamis AP. Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. Ophthalmology 1998;105:232–237.
 85. Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H, Keshet E. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. Lab Invest 1995;72:638–645.
 86. Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, McMeel JW, Kazlauskas A, Rahimi N. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. Am J Pathol 2000;156:1337–1344.
 87. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:1929 – 1934.
 88. Lopez PF, Sippy BD, Lambert M, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive

- for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:855– 868.
89. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2514 –2522.
 90. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439–442.
 91. Carmeliet P, Ferreira V, Breir G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435– 439.
 92. Fong G-H, Rossant J, Gertssenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66 –70.
 93. Shalaby F, Rossand J, Yamaguchi TP, et al. Failure of bloodisland formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995;376:62– 66.
 94. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435– 439.
 95. Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 2000;127:3941–3946.
 96. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362:841– 844.70 Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003;3:643– 651.
 97. Qaum T, Xu Q, Joussen AM, et al. VEGF-initiated bloodretinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2408 – 2413.
 98. Viores SA, Youssri Al, Luna JD, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. *Histol Histopathol* 1997;12:99 –109.

99. Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 2001;158:147–152.
100. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 1997;57:765–772.
101. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 1999;274:23463–23467.
102. Qu H, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM. Ultrastructural localization of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 1995;43:381–389.
103. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, et al. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991;174:1275–1278.
104. Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, Papakonstantinou E, Roth M. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1998;341:309–315.
105. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* 2003;278:12605–12608.80
106. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 1996;2:992–997.
107. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol* 2000;156:1733–1739.

108. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidalo MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997;41:4153– 4161.
109. Iijima K, Yoshikawa N, Connolly DT, Nakamura H. Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int* 1993;44:959–966.
110. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:663– 668.
111. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 2003;198:483– 489.
112. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2155–2162.
113. Moromizato Y, Stechschulte S, Miyamoto K, et al. CD18 and ICAM-1-dependent corneal neovascularization and inflammation after limbal injury. *Am J Pathol* 2000;157:1277–1281.
114. Sakurai E, Taguchi H, Anand A, et al. Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2743–2749.
115. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607– 612.
116. Ishida S, Yamashiro K, Usui T, et al. Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vasoobliteration in disease. *Nat Med* 2003;9:781–788.
117. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287–1295.
118. Marmor MF, Negi A, Maurice DM. Kinetics of macromolecules injected into the subretinal space. *Exp Eye Res* 1985; 40:687– 696.

119. Bell C, Lynam E, Landfair DJ, Janjic N, Wiles ME. Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35:533–542.
120. Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem* 1995;270:13581–13584.
121. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 2003;110:979–986.
122. Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2002;22:143–152.
123. Holmgren L, Glaser A, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R. Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression. *Development* 1991;113:749–754.
124. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 1999;79:213–223.
125. Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*. 1997; 336: 633–640.
126. Delafontaine P. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1995; 30: 825–834.
127. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*. 1995; 16: 143–163.
128. Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995; 16: 3–34.
129. Delafontaine P, Lou H, Alexander RW. Regulation of insulin-like growth factor I messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1991; 18: 742–747.

130. Arnqvist HJ, Bornfeldt KE, Chen Y, Lindstrom T. The insulin-like growth factor system in vascular smooth muscle: interaction with insulin and growth factors. *Metabolism*. 1995; 44: 58–66.
131. Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1993; 268: 16866–16870.
132. Kern PA, Svoboda ME, Eckel RH, Van Wyk JJ. Insulinlike growth factor action and production in adipocytes and endothelial cells from human adipose tissue. *Diabetes*. 1989; 38: 710–717.
133. Gajdusek CM, Luo Z, Mayberg MR. Sequestration and secretion of insulin-like growth factor-I by bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1993; 154: 192–198.
134. Bar RS, Boes M. Distinct receptors for IGF-I, IGF-II, and insulin are present on bovine capillary endothelial cells and large vessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 124: 203–209.
135. Boes M, Dake BL, Bar RS. Interactions of cultured endothelial cells with TGF- α , bFGF, PDGF and IGF-I. *Life Sci*. 1991; 48: 811–821.
136. Tucci M, Nygard K, Tanswell BV, Farber HW, Hill DJ, Han VK. Modulation of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein biosynthesis by hypoxia in cultured vascular endothelial cells. *J Endocrinol*. 1998; 157: 13–24.
137. Delafontaine P, Ku L, Anwar A, Hayzer DJ. Insulin-like growth factor 1 binding protein 3 synthesis by aortic endothelial cells is a function of cell density. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 222: 478–482.
138. Dahlfors G, Arnqvist HJ. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- α 1 regulate the expression of insulin-like growth factor-binding protein-3, -4, and -5 in large vessel endothelial cells. *Endocrinology*. 2000; 141: 2062–2067.
139. Erondy NE, Dake BL, Moser DR, Lin M, Boes M, Bar RS. Regulation of endothelial IGFBP-3 synthesis and secretion by IGF-I and TGF- α . *Growth Regul*. 1996; 6: 1–9.
140. Bar RS, Dolash S, Dake BL, Boes M. Cultured capillary endothelial cells from bovine adipose tissue: a model for insulin binding and action in microvascular endothelium. *Metabolism*. 1986; 35: 317–322.

141. King GL, Goodman AD, Buzney S, Moses A, Kahn CR. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest.* 1985; 75: 1028–1036.
142. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J.* 1999; 46 (suppl): S59–S62.
143. Kondo T, Vicent D, Suzuma K, Yanagisawa M, King GL, Holzenberger M, Kahn CR. Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1835–1842.
144. Che W, Lerner-Marmarosh N, Huang Q, Osawa M, Ohta S, Yoshizumi M, Glassman M, Lee JD, Yan C, Berk BC, Abe J. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK 3 in TN α induc 2002; 90: 1222–1230.
145. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med.* 1999; 5: 1390–1395.
146. Gaudric A, N'Guyen T, Moenner M, Glacet-Bernard A, Barritault D. Quantification of angiogenesis due to fibroblast growth factor in a modified rabbit corneal model. *Ophthalmic Res,* 1992; 24:181-188.
147. Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: Key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14: 533- 537.
148. Stavri GT, HY Zachary IC, Breier G, et al. Hypoxia and platelet-derived growth factor synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett,* 1995;358:311-315.
149. Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, et al. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3649-3663.
150. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* 2003; 98: 257- 265.

151. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *J Nucl Med.* 2003; 47: 149- 161.
152. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:561-569.
153. Michelson, IC . *Trans Ophthalmol. Soc. U.K.* 1948;68:137-180.
154. Ishibashi T Miki K Sorgente T Patterson R Ryan SJ Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovaskularization in subhuman primate. *Arch Ophthalmomol* 1985;103: 708-711.
155. Jonas JB. Intravitreal triamcinolone acetate for treatment of intraocular oedematous and neovascular diseases. *Acta Ophthalmol Scand* 2005;83:645-653.
156. Jonas JB, Akkoyun I, Kreissig I, Degenring R. Diffuse diabetic macular oedema treated by intravitreal triamcinolone acetate: a comparative , non-randomised study. *Br J Ophthalmol* 2005;89: 321-326.
157. Svaprasad S, McCluskey P, Lightman. Intravitreal steroids in the management of macular oedema. *Acta Ophthalmolo Scand* 2006;84: 722-733.
158. Spaide RF, Sorenson J, Maranan L. Combined photodynamic therapy with vertoporphin and intravitreal triamcinolone acetate for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2003;110:1517-25.
159. Gitter KA. Age-related macular degeneration. In: Yannuzzi LA eds. *Chibret International Journal of Ophthalmology.* Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989; 15-25.
160. D'Amico DJ, Goldberg MF, Hudson H, Jerdan JA, Krueger DS, Luna SP, Robertson SM, Russell S, Singerman L, Slakter JS, Yannuzzi L, Ziliox P; Anecortave Acetate Clinical Study Group. Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology* 2003;110:2372-2383.
161. Sönmez K, Atmaca LS. Yasa bağlı makula dejeneresansının tedavisinde yenilikler. *T Klin Oftalmoloji* 2006;2:38-47.
162. McCormack PL, Keam SJ. Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs.* 2008;68:487-506.

163. Ju M, Mailhos C, Bradley J, Dowie T, Ganley M, Cook G, Calias P, Lange N, Adamis AP, Shima DT, Robinson GS. Simultaneous but not prior inhibition of VEGF165 enhances the efficacy of photodynamic therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Feb (49); 662-70.
164. R PJ Moshfeghi AA Puliafito CA. OCT findings after Bevacizumab (avastin) for ARMD. *Ophthalmic Surg Lasers _maging* 2005;26:960-963.
165. Kreutzer TC, Alge CS, Wolf AH, Kook D, Burger J, Strauss R, Kunze C, Haritoglou C, Kampik A, Priglinger S. Intravitreal bevacizumab for the treatment of macular oedema secondary to branch retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol.* 2008 ;92:351-355.
166. Arevalo JF, Maia M, Flynn HW Jr, Saravia M, Avery RL, Wu L, Eid Farah M, Pieram. Tractional retinal detachment following intravitreal bevacizumab (Avastin) in patients with severe proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:213-216.
167. Adamis AP, Shima DT, The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease *Retina* 2005;25:111-118.
168. Macular photocoagulation study group. Risk factors for choroidal neovascular membrane in the second eye of patients with juxtafoveal or subfoveal choroidal neovascular membranes secondary to age related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1997;115 :741-747.
169. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, Papadopoulos N, Pyles EA, Torri A, Wiegand SJ, Thurston G, Stahl N, Yancopoulos GD. Inaugural Article: VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:18363-18370.
170. Cattaneo MG, Pola S, Francescat P, Chillemi F, Vicentini LM. Human endostatin-derived synthetic peptides possess potent antiangiogenic properties in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2003; 283: 230-236.
171. Zheng MJ, Endostatin derivative angiogenesis inhibitors. *Chin Md J (Eng)* 2009 Aug 20; 122(16) 1941-1957.
172. Patel YC, Liu JL, Galanopoulou AS, Papachristou DN. Production, action, and degradation of somatostatin. In: Jefferson LS, Cherrington

- AD, Eds. The Handbook of Physiology, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism, New York: Oxford Univ. Press, 1999: inpress.
173. Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258: 1952–1955.
 174. Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 348–367.
 175. Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family: Amini review. *Life Sci* 1995; 57: 1249–1265.
 176. Buscail L, Estève JP, Saint-Laurent N, Bertrand V, Reisine T, O'Carroll AM, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, Susini C. Inhibition of cell proliferation by somatostatin analogue RC-160 by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1580-4.
 177. Danesi R, Agen C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, Basolo F, Campagni A, Tacca MD. Inhibition of experimental angiogenesis by somatostatin analogue octerotide acetate (SMS 201-995). *Clin Cancer Res*. 1997 Feb;3(2):265-72.
 178. Bruns C, Shi V, Hoyer D, Schuurman H, Weeber G. Somatostatin receptors and the potential use of Sandostatin to interfere with vascular remodeling. *European Journal of Endocrinology*. 2000;143: 3-7.
 179. Danesi R, Agen C, Benelli U, Di Paolo A, Nardini D, Bocci G, Basolo F, Campagni A, Del Tacca M. Inhibition of experimental angiogenesis by somatostatin analogue octerotide acetate (SMS:201-995). *Clinical Cancer Research* 1997;26:265-272.
 180. Grant M, Caballerro S, Milard WJ. Inhibition of IGF-1 and b FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octerotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regulatory Peptides* 1993;48: 267-278.
 181. Liang C, Peyman G.A, Conway M, Woltering E. Retinal toxicity of intravitreal octerotide in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 1997;32:229-32.

182. Robertson J, Westra I, Woltering E, Winthrop K, Barrie R, O'Dorio T, Holmes D. Intravitreal Injection of octreotide acetate. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 1997;13:2.
183. Smith LE, Weselowski E, McLellan A, Kosytky SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 1994:101-111.
184. Folkman J, Angiogenesis. *Annual Review of Medicine* 57, 1-18.
185. Galiano R. F, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*. 2005; 438(7070), 960-966
186. Roth A.M., Retinal vascular development in premature infants. *American Journal of Ophthalmology*. 1977; 84: 636-640
187. Chavakis E, Riecke B., Linn J., Lin T, Bretel R.G., Preissner K.T., Brownle M, Hammes H.P. Kinetics of integrin expression in a mouse model of proliferative retinopathy and success of secondary intervention with cyclic RGD peptides *Diabetologia* 2002;45:262-267.
188. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker K, Kinoshita S, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR: Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1. *Nat Med* 1999;5:1390–1395.
189. Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Semin Neonatol*. 2003 Dec;8(6):469-73
190. Young L, Douglas CA, Pierce E, Foley E, Smith LE. Histopathology and Vascular endothelial growth factor in untreated and diode laser-treated retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 1997;1:105-10.
191. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 1999;20:157–98.
192. Lauder H, Sellers LA, Fan TP, et al. Somatostatin sst5 inhibition of receptor mediated regeneration of rat aortic vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1997;122:663–70.
193. Bruns C, Shi V, Hoyer D, et al. Somatostatin receptors and the potential use of Sandostatin to interfere with vascular remodeling. *Eur J Endocrinol*. 2000;143:S3–7.

194. Dasgupta P. Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther.* 2004;102:61–85.
195. Sall JW, Klisovic DD, O' Dorisio MS, Katz SE: Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells *Exp Eye Res.* 2004 OCT;79(4):465-76.
196. Woltering EA, Barrie R, O' Dorisio TM, et al. Somatostatin analogues inhibit angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Surg Res* 1991;50:254-51.
197. Bodenat C, Leroux P, Gonzales BJ, et al. Transient expression of somatostatin receptors in the rat visual system during development. *Neuroscience* 1991;41:595-606.
198. Mitrofanis C, Robinson SR, Provis JM. Somatostatinergic neurons of developing human and cat retina. *Neurosci Lett* 1989;104:209-16.
199. Grant MB, Mames R, Cooper R, et al. Octreotide does not prevent progression of diabetic retinopathy (Abstract). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:S958.
200. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, et al. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care.* 2000;23:504–9.
201. Boehm BO, Lang GK, Jehle PM, et al. Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res.* 2001;33:300–6.
202. McCombe M, Lightman S, Ecklan DJ, ET AL. Effect of long acting somatostatin analogue (BIM 23014) on proliferative diabetic retinopathy. A pilot study. *Eye* 1991;5:569-575.
203. Davis MI, Wilson SH, Grant MB: The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Horm Metab Res* 2001; 33:295–299.
204. Wilson SH, Davis MI, Caballero S, Grant MB: Modulation of retinal cell behaviour by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues: implications for diabetic retinopathy. *Growth Horm IGF. Res* 2001;11 : (Suppl. A) S53–S59.

205. Grant MB, Caballero S, Millard WJ: Inhibition of IGF-1 and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide, a potential treatment for ocular neovascularization. *Regul Pept* 1993; 48:267–278.
206. Liang C, Peyman G, Conway M, Woltering EA. Retinal toxicity of intravitreal octreotide in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 1997;32:229-32.
207. Vom Hagen F, Kampetter BA, Erber R, Jonas J, Hammes HP. Intravitreal Thalidomide reduces experimental preretinal neovascularization without induction of retinal toxicity. *Br J Ophthalmol*.2009;27 Epub ahead of print.
208. Natoli R. J Provis. K Valter. J Stone. Expression and role of the early response gene *Oxr1* in the hyperoxia-challenged mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49: 4561-7.
209. Jenifer L, Wilkonson Berka, Lofthouse S, Jaworski K, Ninkovic S, Tachas G, Wright C.J. An antisense oligonucleotide targeting the growth hormone receptor inhibits neovascularization in a mouse model of retinopathy. *Molecular Vision* 2007;13:1529-1538.
210. Qu Y, Zhang S,Xu X,Whang H, Li J, Zhou F, Whei F. Octreotide inhibits choroidal neovascularization in rats. *Ophthalmic Res* 2009;42:36-42.

8-RESİMLER

Resim-1



Resim-2



Resim-3

(1) negatif kontrol grubu

(2) kontrol grubu

(3) 0.1 μ g IVO grubu

(4) 0.05 μ g IVO grubu

(1)



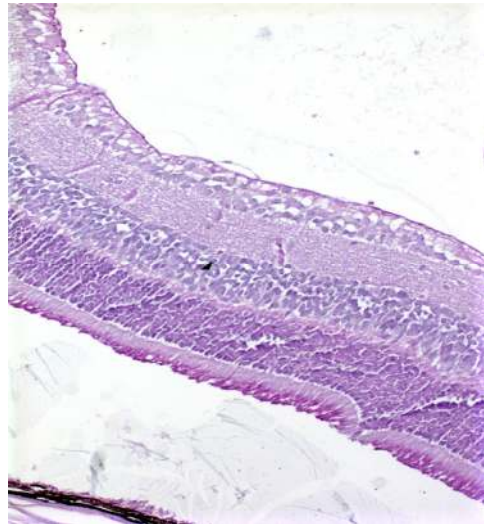
(2)



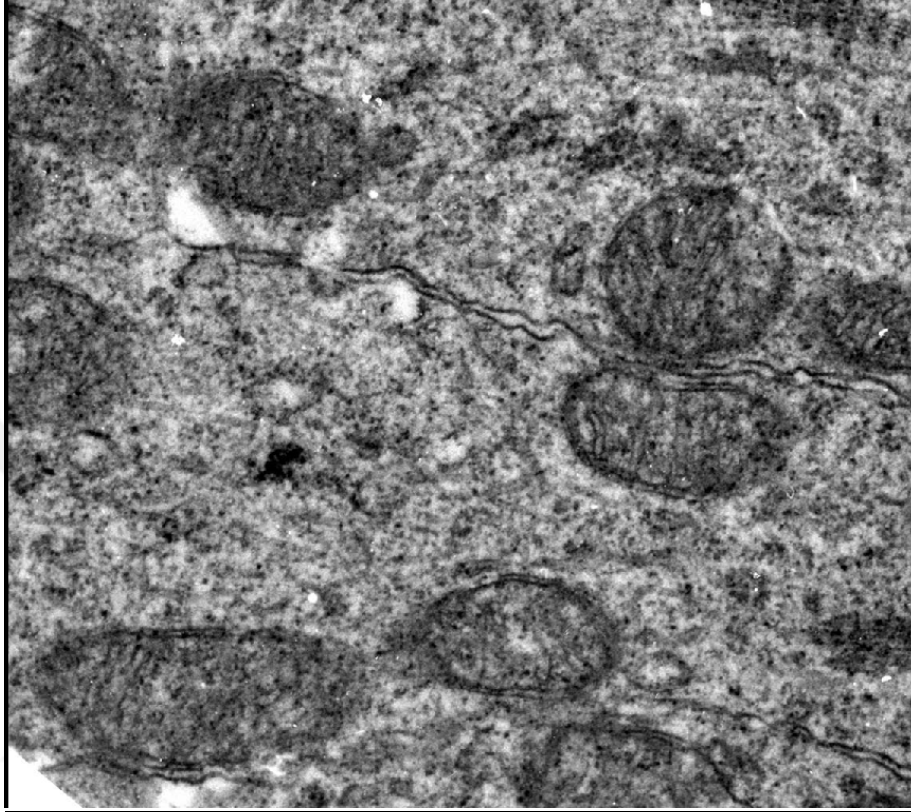
(3)



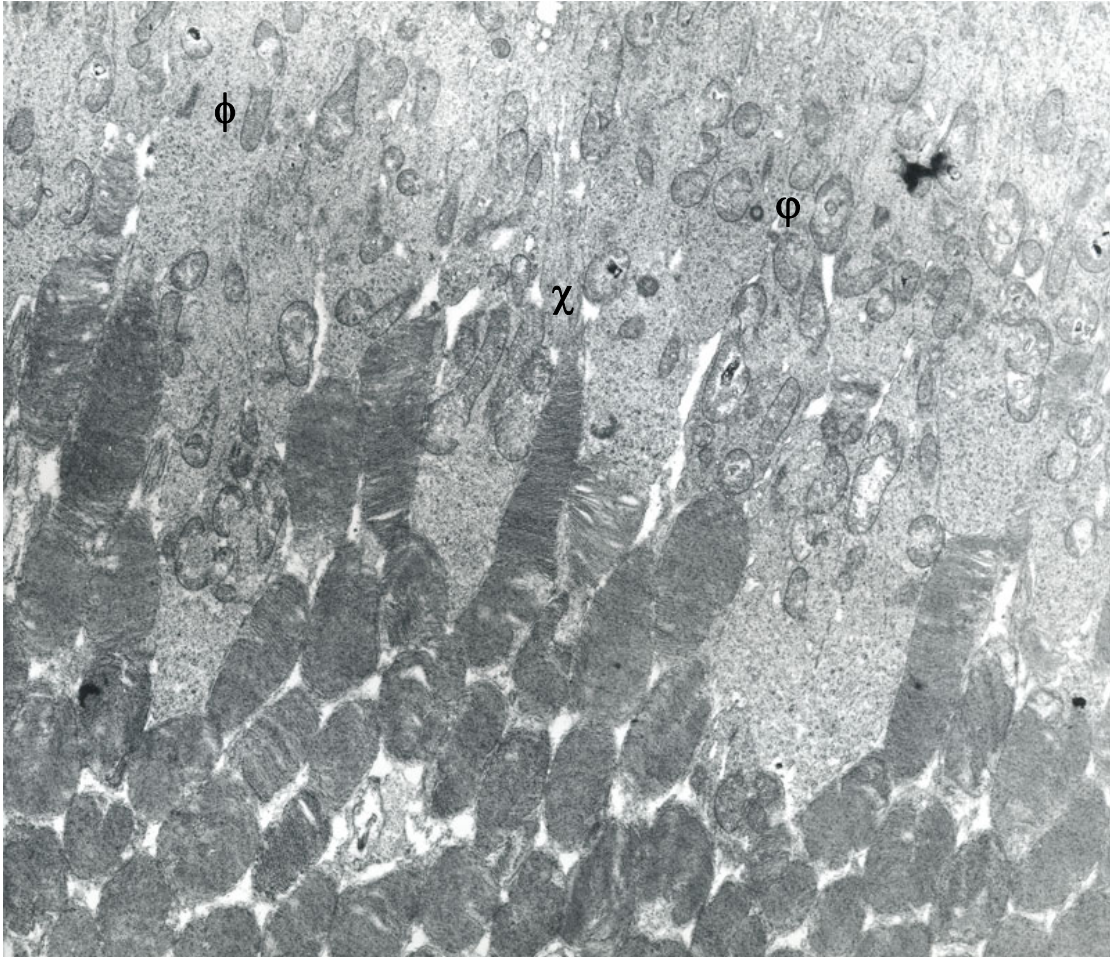
(4)



Resim-4



Resim-5



Resim-7

