

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

**RATLARDA OKSİJENLE İNDÜKLENMİŞ RETİNOPATİ
MODELİNDE İNTRAPERİTONEAL CRYPTOTANSHİNONE VE
DECORİN UYGULANMASININ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Seda DURAN GÜLER**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BALBABA**

**ELAZIĞ
2020**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Fatma Ülkü ÇELİKER

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BALBABA _____ Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Prof. Dr. Tamer DEMİR, Prof. Dr. Burak TURGUT, Dr. Öğr. Üyesi Onur ÇATAK, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BALBABA ve Sn. Uzm. Dr. Hakan YILDIRIM başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BALBABA'ya ve birlikte çalıştığımız Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ, Arş. Gör. Dr. Sena ÖZCAN'a tezime verdikleri destek için teşekkür ederim. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı teknisyenleri Veysel ÇAK ve Suat DOĞAN ile hastanemiz biyomedikal cihaz teknikeri Fikret GEDİK'e deneyim sürecindeki sabır ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım kliniğimiz hemşire ve personellerine teşekkür ederim.

Beni bugünlere yetiştiren ve yaşamım boyunca attığım her adımda arkamda duran anne ve babama, beni her zaman destekleyen canım ablama, hayatı paylaştığım sevgili eşim Mustafa'ya, güvenini her zaman hissettiğim sevgili dostum Gül GÜRGER'e en derin sevgilerimi sunarım.

Saygılarımla

Dr. Seda DURAN GÜLER

Mart 2020, ELAZIĞ

*Bu çalışma Fırat Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, in vivo oksijen indükte retinopati (OİR) rat modelinde cryptotanshinone (CPT) ve decorin (DCN)'in terapötik etkinliğini araştırmak ve sonuçlarımızı prematüre retinopatisi (ROP)'nde etkinliği kanıtlanmış bevacizumab ile karşılaştırmaktır.

Çalışmada her grupta 7 denek olmak üzere toplam 35 adet Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Grup A dışındaki 28 adet rat doğumlarını takiben 14 gün boyunca, %50 ve %10 arasında dalgalanma gösteren oksijene maruz bırakılarak, OİR modeli oluşturuldu. Grup A'da OİR modeli oluşturulmadan, grup B'de ise OİR modeli oluşturularak tıbbi veya cerrahi herhangi bir müdahale yapılmadı. Tedavi grubu olarak belirlediğimiz grup C, D ve E'de OİR modeli oluşturularak deneyin 15-17. günlerinde sırasıyla her bir gruba intraperitoneal CPT, DCN ve bevacizumab enjeksiyonları yapıldı. Retinal neovaskülarizasyonun kantitatif değerlendirmesi için iç limitan membran (İLM)'in vitreal yüzeyindeki neovasküler endotelial hücre çekirdekleri sayıldı. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) immünohistokimyasal analizi immünreaktif boyanan hücrelerin şiddeti ve yaygınlığına göre elde edilen bir histoskor ile değerlendirildi.

Grup A'da İLM'nin vitreal yüzeyinde neovasküler endotelial hücre çekirdeği izlenmedi. Grup B, C, D ve E'de sırasıyla $13,14 \pm 1,34$, $7,28 \pm 0,75$, $6,57 \pm 1,51$ ve $6,71 \pm 1,49$ ortalama neovasküler endotelial hücre çekirdeği gözlemlendi. Grup C, D ve E'de ortalama neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısı grup B'ye göre anlamlı azaldı ($p < 0,001$). Ortalama neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısı grup E ile grup C ve D arasında benzerdi (sırasıyla $p = 0,897$, $p = 0,999$). İmmünohistokimyasal boyamada, VEGF immünreaktivitesi sırasıyla $0,07 \pm 0,02$, $0,97 \pm 0,21$, $0,29 \pm 0,14$, $0,37 \pm 0,12$ ve $0,23 \pm 0,17$ ve TNF- α immünreaktivitesi sırasıyla $0,02 \pm 0,02$, $1,11 \pm 0,36$, $0,38 \pm 0,31$, $0,37 \pm 0,13$ ve $0,62 \pm 0,21$ 'idi. Grup B'de, VEGF ve TNF- α immünreaktivitesi grup A ile karşılaştırıldığında belirgin olarak arttı ($p < 0,001$). Grup C, D ve E'de VEGF ve TNF- α immünreaktiviteleri, Grup B'ye göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0,001$). VEGF ve TNF- α immünreaktiviteleri Grup E ile grup C ve D arasında benzerdi (sırasıyla VEGF; $p = 0,951$, $p = 0,449$ ve TNF- α ; $p = 0,359$, $p = 0,304$).

Sonuç olarak OİR modelinde CPT veya DCN tedavisi ile neovaskülarizasyon anlamlı oranda baskılandı ve bevacizumab ile kıyaslandığında bu etki benzer bulundu.

Sonuçlarımız ROP tedavisi açısından gelecek vadetmektedir. Ancak bu ajanların İV kullanımı ve doz ayarlaması ile ilgili daha ileri deneysel çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cryptotanshinone, decorin, prematüre retinopatisi, oksijen indükte retinopati

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF CRYPTOTANSHINONE AND DECORIN IN OXYGEN-INDUCED RETINOPATHY MODEL IN RATS

The aim of this study was to investigate the therapeutic efficacy of cryptotanshinone (CPT) and decorin (DCN) in an in vivo oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model and to compare our results with bevacizumab which has proven success in premature retinopathy (ROP).

A total of 35 Sprague Dawley rats, 7 in each group were used in this study. OIR model was created by exposing oxygen fluctuating between 50% and 10% for 14 days to 28 rats other than group A after their birth. Any of medical and surgical intervention was not performed in group A without OIR model and in group B with OIR model. Between the 15th and 17th days of the experiment intraperitoneal CPT, DCN and bevacizumab injections were applied respectively to each treatment group C, D and E with creating OIR model. For the quantitative assessment of retinal neovascularization the nuclei of neovascular endothelial cells on the vitreal side of the inner limiting membrane (ILM) were counted. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) has been done according to a histoscore obtained by the intensity and extent of the immunoreactive stained cells.

Neovascular endothelial cell nucleus was not observed in the vitreal surface of ILM in group A. In groups B, C, D and E, mean neovascular endothelial cell nuclei were observed $13,14 \pm 1,34$, $7,28 \pm 0,75$, $6,57 \pm 1,51$ and $6,71 \pm 1,49$, respectively. The mean number of neovascular endothelial cell nuclei decreased significantly in group C, D and E compared to group B ($p < 0,001$). The mean number of neovascular endothelial cell nuclei was similar between group E and groups C and D ($p = 0,897$, $p = 0,999$, respectively). In immunohistochemical staining, the immunoreactivity of VEGF were $0,07 \pm 0,02$, $0,97 \pm 0,21$, $0,29 \pm 0,14$, $0,37 \pm 0,12$ and $0,23 \pm 0,17$, respectively and TNF- α were $0,02 \pm 0,02$, $1,11 \pm 0,36$, $0,38 \pm 0,31$, $0,37 \pm 0,13$ and $0,62 \pm 0,21$, respectively. In group B, VEGF and TNF- α immunoreactivity were significantly increased compared to group A ($p < 0,001$). Immunoreactivity of VEGF and TNF- α was significantly decreased in group C, D and E compared to group B ($p < 0,001$). VEGF

and TNF- α immunoreactivities were similar between group E and groups C and D (VEGF; $p=0,951$, $p=0,449$, respectively and TNF- α ; $p=0,359$, $p=0,304$, respectively).

In conclusion, neovascularization was significantly suppressed by CPT or DCN treatment in the OIR model and this effect was similar when compared with bevacizumab. Our results are promising in terms of ROP treatment. However, further experimental studies on IV use and dose adjustment of these agents are required.

Key words: Cryptotanshinone, decorin, retinopathy of premature, oxygen induced retinopathy

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	3
1.2.1. Normal Retinal Vasküler Gelişim	3
1.2.1.1. Vaskülogenez Fazı	4
1.2.1.2. Anjiogenez Fazı	4
1.2.2. Patolojik Retinal Vasküler Gelişim	5
1.2.3. Oküler Neovasküler Hastalıklar	7
1.2.3.1. Korneal Neovaskülarizasyon	7
1.2.3.2. İris Neovaskülarizasyonu	8
1.2.3.3. Retina ve Koroid Neovaskülarizasyonu	8
1.2.4. Prematüre Retinopatisi	9
1.2.4.1. Epidemiyoloji	9
1.2.4.2. İnsidans ve Prevalans	10
1.2.4.3. Risk Faktörleri	11
1.2.4.4. Patofizyoloji	11
1.2.4.4.1. Faz 1 Prematüre Retinopatisi: Hiperoksi ve Besin Yetersizliği ile Gözlenen Fizyolojik Gelişimin Duraklaması	12
1.2.4.4.2. Faz 2 Prematüre Retinopatisi: Fibrovasküler Proliferasyon, İntravitreal Neovaskülarizasyon	12
1.2.4.5. Patogenezde Rol Oynayan Başlıca Moleküller	13
1.2.4.5.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	13
1.2.4.5.2. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1	15

1.2.4.5.3. Fibroblast Büyüme Faktörü	15
1.2.4.5.4. Tümör Nekrozis Faktör- α	15
1.2.4.5.5. Eritropoetin	16
1.2.4.5.6. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü	16
1.2.4.5.7. Hepatosit Büyüme Faktörü	16
1.2.4.6. Sınıflandırma	16
1.2.4.7. Tedavi Yönetimi	21
1.3. Güncel Anti-VEGF Ajanlar	25
1.3.1. Bevacizumab	25
1.3.2. Ranibizumab	27
1.3.3. Aflibercept	27
1.3.4. Conbercept	28
1.4. Cryptotanshinone	28
1.5. Decorin	32
2. GEREÇ ve YÖNTEM	37
2.1 Hayvan Deneyi Modelinin Oluşturulması	37
2.2. İlaçların Hazırlanması	38
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	39
2.4. Göz Dokularının Alınması ve Histolojik Preparatların Hazırlanması	39
2.5. Retinal Neovaskülarizasyonun Histolojik Değerlendirilmesi	40
2.6. VEGF ve TNF- α İmmünohistokimyasal Boyanması	40
2.7. İstatistiksel Analiz	41
3.BULGULAR	43
3.1. Retinal Tabakaların Morfolojik Analizi	43
3.2. Kantitatif Retinal Neovaskülarizasyon Analizi	44
3.3. VEGF İmmünohistokimyasal Analizi	48
3.4. TNF- α İmmünohistokimyasal Analizi	52
4. TARTIŞMA	56
5. KAYNAKLAR	66
6. ÖZGEÇMİŞ	97

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler	6
Tablo 2. ROP gelişiminde başlıca risk faktörleri	11
Tablo 3. VEGF ailesi	15
Tablo 4. VEGF ve TNF- α boyanma şiddetinin değerlendirilmesi	41
Tablo 5. VEGF ve TNF- α immünreaktivite yaygınlığının değerlendirilmesi	41
Tablo 6. Gruplardaki neovasküler endotelial hücrelerin ortalama ve standart sapma değerleri	44
Tablo 7. Gruplardaki VEGF immünreaktivitesinin ortalama ve standart sapma değerleri	48
Tablo 8. Gruplardaki TNF- α immünreaktivitesinin ortalama ve standart sapma değerleri	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	İnsanlarda retinal vasküler gelişimin şematik çizimi	3
Şekil 2.	VEGF reseptörleri	14
Şekil 3.	ICROP sınıflandırmasında belirtilen zon bölgeleri	18
Şekil 4.	Prematüre retinopatisi evreleri ve hastalığın ilerleyişine ait örnek çizim	19
Şekil 5.	Arka kutup vasküler bozukluğa örnek olarak artı öncesi (pre-plus) hastalık (a) ve daha ilerlemiş formu olan artı (plus) hastalık (b)	20
Şekil 6.	ROP gelişim süreci, evreleri ve tedavisi	22
Şekil 7.	ROP tedavi algoritması	25
Şekil 8.	CPT'nin VEGF üzerindeki etki mekanizması.	29
Şekil 9.	CPT hücre içi antiinflamatuvar etki mekanizması.	30
Şekil 10.	TGF- β sinyal yolağı ve CPT ile ilişkisi.	31
Şekil 11.	CPT'nin kanser hücresinde apoptozis etki mekanizması.	32
Şekil 12.	TGF- β sinyal yolağı ve DCN ile ilişkisi.	35
Şekil 13.	Grup A'ya (sağlıklı kontrol grubu) ait normal görünümlü retina dokusu, Hematoksilen & Eozin x200.	43
Şekil 14.	Tüm gruplarda neovasküler endotelial hücre analizi.	45
Şekil 15.	Grup B'ye (sham grubu) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması-1.	45
Şekil 16.	Grup B'ye (sham grubu) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması-2.	46
Şekil 17.	Grup C'ye (OİR+CPT) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması.	46
Şekil 18.	Grup D'ye (OİR+DCN) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması.	47
Şekil 19.	Grup E'ye (OİR+Bevacizumab) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması.	47
Şekil 20.	Tüm gruplarda VEGF immünreaktivitesi.	49
Şekil 21.	Grup A'ya (sağlıklı kontrol grubu) ait sağlıklı retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması; pozitif boyanma izlenmemektedir.	49
Şekil 22.	Grup B'ye (sham grubu) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.	50

Şekil 23. Grup C'ye (OİR+CPT) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.	50
Şekil 24. Grup D'ye (OİR+DCN) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.	51
Şekil 25. Grup E'ye (OİR+Bevacizumab) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.	51
Şekil 26. Tüm gruplarda TNF- α immünreaktivitesi.	53
Şekil 27. Grup A'ya (sağlıklı kontrol grubu) ait sağlıklı retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması; pozitif boyanma izlenmemektedir.	53
Şekil 28. Grup B'ye (OİR) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.	54
Şekil 29. Grup C'ye (OİR+CPT) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.	54
Şekil 30. Grup D'ye (OİR+DCN) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.	55
Şekil 31. Grup E'ye (OİR+Bevacizumab) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.	55

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Akt	: Protein kinaz B
APROP	: Agresif posterior prematüre retinopati
BEAT-ROP	: Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
CO₂	: Karbondioksit
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CPT	: Cryptotanshinone
CRYO-ROP	: Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity
DA	: Doğum ağırlığı
DCN	: Decorin
DRP	: Diyabetik retinopati
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
Epo	: Eritropoetin
ERK-1/2	: Ekstraselüler sinyal regüle kinaz-1/2
ETROP	: Early Treatment for Retinopathy of Prematurity
FAK	: Fokal adezyon kinaz
FDA	: Food and Drug Administration
FFA	: Fundus fluoresein anjiyografi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FLT-1	: Fms-ilişkili tirozin kinaz-1
FÜBAP	: Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
GHT	: Ganglion hücre tabakası
GY	: Gebelik yaşı
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HGFR	: Hepatosit büyüme faktör reseptörü
HIF-1α	: Hipoksi-indüklenebilir faktör 1 α

HRP	: Horseradish peroksidaz
HUVEC	: İnsan umblikal ven endotel hücresi
ICROP	: International Classification of Retinopathy of Prematurity
İFN	: İnterferon
IgG1	: İmmünglobülin G1
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-1R	: İnsulin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü
IL	: İnterlökin
IVNV	: İntavitreal neovaskülarizasyon
ILM	: İnternal limiting membrane
İLM	: İç limitan membran
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
ip	: İnteraperitoneal
İU	: İnteruterin
İV	: İntavitreal
JAK	: Janus kinaz
kDa	: Kilo dalton
KDR	: Kinaz domain region
LFK	: Laser fotokoagülasyon
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojen aktiveli protein kinaz
MCP1	: Makrofaj kemoatraktan proteini
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
m-RNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NF-κB	: Nükleer faktör kappa-B
NO	: Nitrik oksit
NV	: Neovaskülarizasyon
NVG	: Neovasküler glokom
NVİ	: İris neovaskülarizasyonu
O₂	: Oksijen
OIR	: Oxygen-induced retinopathy

OİR	: Oksijen indükte retinopati
PBS	: Phosphate-buffered salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PDR	: Proliferatif diyabetik retinopati
PEDF	: Pigmentli epitel türevli faktör
PI3K	: Fosfoinozid 3-kinaz
PIGF	: Plasental büyüme faktörü
PM	: Postmenstrüel
PVR	: Proliferatif vitreoretinopati
RD	: Retina dekolmanı
RNV	: Retinal neovaskülarizasyon
ROP	: Prematüre retinopatisi
RPE	: Retina pigment epiteli
RVO	: Retinal ven oklüzyonu
Src	: SH2 domain
STAT3	: Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatörü-3
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
TIMP	: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü
TLR	: Toll like reseptör
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
TSII-A	: Tanshinon II-A
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	: Vasküler endotel kaynaklı büyüme faktörü reseptörü
YBMD	: Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Vaskülogenez ve anjiogenez embriyonal yaşamda vasküler ağın oluşumunda yer alan iki ayrı süreçtir. Gelişimin tamamlandığı erişkin dönemden sonra vaskülogenez ve endotel hücre proliferasyonu durmaktadır. Ancak bazı patolojik süreçlerde anormal endotel hücre proliferasyonu ve neovaskülarizasyon (NV) izlenmekte; kornea, iris, optik disk ve retina gibi oküler yapılar olumsuz etkilenebilmektedir. Patolojik NV sonucu oluşan damarlar zayıf olup sızıntı, hemoraji, eksudasyon ve fibrozise neden olarak görme azalması ile sonuçlanabilmektedir (1).

Tüm yaş gruplarında neovasküler göz hastalıkları ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Proliferatif diyabetik retinopati (PDR), prematüre retinopatisi (ROP), yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD) ve retinada vazooklüzyona bağlı meydana gelen patolojik NV görme kaybının ana nedenlerindendir (2). Özellikle artan prematüre doğum sıklığı ve yenidoğan bakımındaki gelişmeler ile daha küçük bebeklerin yaşatılabiliyor olması; ROP insidansının, başlangıç zamanının ve progresyon oranının değişmesine yol açmıştır.

Koroid ve retinada herhangi bir nedenle oluşan hipoksi; proanjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin salınımına neden olmaktadır. Sato ve ark. (3)'nın çalışmasında ROP olgularında vitreusta 27 sitokin seviyesi taranmış ve interleukin (IL)-6, IL-7, IL-10, IL-15, eotaksin, fibroblast büyüme faktörü (FGF), granülosit koloni stimülan faktör, granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör, interferon- γ -indüklenebilir protein-10, siklooksijenaz gibi birçok faktörün seviyesi yüksek bulunmuş ve bu mediatörlerin preretinal NV'nin gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (3). Birçok faktör oküler patolojik NV'yi tetiklese de bunlardan en bilineni vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür (4-6). VEGF aracılığı ile uyarılan vasküler endotel kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-2 endotelial hücrelerde proliferasyon, migrasyon, morfogenez ve permeabilite artışı olmak üzere birçok hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedir (7).

Çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda vasküler yatak ve dokuda yayılım tarzı farklılık göstermekle beraber, patolojik düzeyde oluşan damarsal yapılar tüm oküler neovasküler hastalıklarda benzer özellikler taşımaktadır (8, 9). Bevacizumab,

ranibizumab, deksametazon ve aflibercept gibi anti-proliferatif, antianjiogenik ve antiinflamatuvar etkili ajanlar yeni tedavi seçenekleri oluşturmakla birlikte, zaman zaman etkileri kısıtlı olmakta ve bazen yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle retinal neovasküler hastalıklarda antianjiogenik kalıcı, güvenilir ve etkili tedavi seçenekleri aranmaktadır. Hedefimiz, dokulara hasar vermeden etkili bir şekilde oküler anjiogenezi inhibe edebilen yöntemleri geliştirmek, görme kaybına hatta körlüğe neden olan oküler neovasküler hastalıklarda yeni tedavi yöntemlerini araştırmaktır.

Cryptotanshinone (CPT), Çin’de angina pectoris ve serebrovasküler hastalık gibi iskemik hastalıkların tedavisinde kullanılan *Salvia miltiorrhiza* bitki türünün aktif bileşenidir (10). CPT’nin, VEGFR2’nin Tyr1175 bölgesindeki fosforilasyonunu bozduğu ve güçlü bir VEGFR2 inhibitörü olabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (11).

Decorin (DCN), lösinden zengin proteoglikandır (12) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), VEGFR2, insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) dahil olmak üzere birçok tirozin kinaz reseptörünün parakrin etkili bir inhibitörüdür. Çoklu tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan DCN; anjiogenez ve tümörögenez inhibitörü olarak etki etmektedir (13). VEGF reseptörlerini baskılayarak anjiogenezin yol açtığı patolojik durumlarda alternatif tedavilerin geliştirilmesi için potansiyel bir temel sağlamaktadır.

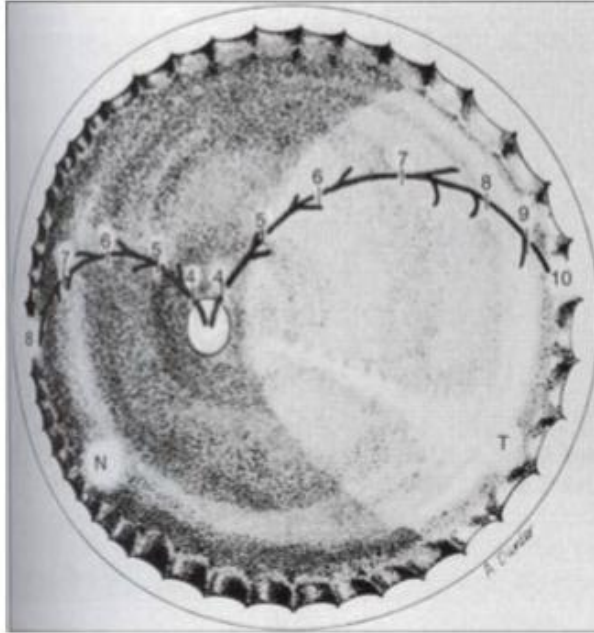
Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda; CPT veya DCN’nin antianjiogenik ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde iskemik retinal neovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine dair hipotezimizi araştırmayı amaçladık. Ratlarda oksijen indükte retinopati (OİR) modeli, insandakine benzer vasküler yapılanma göstermektedir, oluşan retinal neovaskülarizasyon (RNV) tekrarlanabilir ve kantifiye edilebilir niteliktedir. Bu nedenle insanlarda RNV’un patogeneze ve tedavi arayışlarına yönelik çalışmalarda uygun bir model oluşturmaktadır. Bu amaçla OİR in vivo rat modelinde, intraperitoneal (ip) CPT ve DCN enjeksiyonunun endotelial hücre proliferasyonu, retina morfolojisi ile VEGF ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) immünreaktivitesi üzerine etkilerini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçları daha önceden etkisi kanıtlanmış olan bevacizumab tedavisi ile kıyasladık.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Normal Retinal Vasküler Gelişim

Normal fetüste retinal damar gelişimi, intrauterin (IU) 16. haftada gelişmeye başlayarak vaskülogenez ve angiogenez mekanizmaları aracılığı ile 2 fazda olmak üzere, postmenstrual 36-40. haftalar arasında tamamlanır.

Retina gebeliğin yaklaşık 16. haftasına kadar avaskülerdir. Bu dönemde gelişen lens ve ön segmenti hyaloid arter besler (14). Hyaloid arter başlangıçta hiçbir yan dal vermediği için gelişmekte olan retina koroid damarlarından difüzyonla beslenir. Fetusta retinal damarların gelişimi gebeliğin 15-18. haftasında başlar. Şekil 1’de gösterildiği gibi retinal damarlar optik diskten perifere doğru gelişir ve vaskülarizasyon nazal retinada yaklaşık olarak 36. haftada temporal retinada ise 40. haftalarda tamamlanır (15). Bu nedenle prematüre bebeklerde doğum anında retina tam vaskülarize olmayıp, doğumdaki gebelik yaşına (GY) göre genişliği değişen periferik avasküler zon mevcuttur. Vaskülarizasyonun tamamlanması postmenstrüel (PM) 48-52. haftaya kadar gecikebilir (16, 17).



Şekil 1. İnsanlarda retinal vasküler gelişimin şematik çizimi

Retinal vasküler gelişim iki aşamalı olarak gerçekleşir;

1. Vaskülogenez (erken faz),
2. Anjiogenez (geç faz).

Vasküler sistem gelişimi tamamlandıktan sonra vaskülogenez gerilemektedir. Ancak anjiogenez menstrüel siklus boyunca endometriyumda, kıl büyümesinde, yara iyileşmesinde, egzersiz bağımlı kas remodelizasyonunda, doku tamiri, inflamasyon, tümör metastazı ve invazyonu gibi durumlarda erişkin dönemde de varlığını sürdürebilmektedir (18).

1.2.1.1. Vaskülogenez Fazı

Vaskülogenez fazı 15-21. gestasyonel haftalar arasında gerçekleşir. 15. haftadan itibaren hiyaloid arterin adventisyasından köken alan primitif mezenşimal işsi hücreler, arka kutuptan başlayıp retinanın derin ve iç tabakalarına göç ederek retina periferine doğru ilerler. Işınsal tarzda göç eden bu hücreler, ora serrataya kadar uzanan bir örtü meydana getirir. İşsi hücreler, nöroglial hücrelerdir ve retinanın damarsal yapısının gelişimine kadar geçen süreçte retinanın enerji ihtiyacını karşılamakla görevlidirler. Bu hücreler diferansiye ve proliferat olup endotel hücrelerinin kanalı oluşturur (19).

Vaskülogenez fazı hipoksiden bağımsız olarak, VEGF ve diğer sitokinlerin (TNF- α ve IL gibi) salınımına bağlı gerçekleşir.

Vaskülogenezde oluşan primitif vasküler yapı ve bu yapının gelişiminde; VEGF'in ana rol oynadığı hayvan çalışmalarında incelenmiş ve gösterilmiştir. Çalışmalarda VEGF allellerinden birisi eksik olan farelerin, kardiyovasküler sistemde oluşan gelişim defekti nedeniyle intrauterin dönemde öldüğü izlenmiştir (20).

1.2.1.2. Anjiogenez Fazı

Anjiogenez 18-40. gestasyonel haftalarda gerçekleşir. Vaskülogenez ile oluşan vasküler çatı aracılığı ile optik sinirden ora serrataya doğru radial şekilde vasküler gelişim tamamlanmaya kadar devam eder. Anjiogenez döneminde yeni gelişen damarlar, önceden var olan damarların üzerinden tomurcuklanarak çoğalırlar (19). Vaskülarizasyonun sonlandığı avasküler alanda yer alan fotoreseptör tabakasının aktivasyonu ve bu bölgedeki nöral doku gelişimi, yeterli oksijen (O₂) desteği alamayan avasküler dokuda fizyolojik hipoksiye yol açar (21).

Anjiogenez, İU dönemdeki fizyolojik hipoksi tarafından stimule edilir. Fizyolojik hipoksiye karşı hassas olan astrositler aktive olarak VEGF salınımının artmasına neden olur. Retina dokusunda artan VEGF miktarına bağlı olarak, vasküler

endotel hücrelerinin farklılaşması ve göç etmesi ile iç vasküler pleksusun ora serrataya kadar ilerlemesi sağlanır. VEGF dışında immatür retina dokusundan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), anjiopietin gibi anjiogenik faktörlerin de fizyolojik düzeyde salgılanması ile yeni damar yapıları perifer retinaya doğru gelişmektedir (21).

Normal vasküler gelişimde VEGF ile IGF-1 arası etkileşim önemli rol oynar. İntrauterin 3. trimesterde maternal/plasental kaynaklı IGF-1 seviyeleri yükselir ve bebekte oküler kaynaklı olan VEGF'in aktivasyonunu sağlar. Bunun yanında IGF-1'in koruyucu ve düzenleyici etkisi önemlidir. IGF-1 endotel proliferasyonu için gerekli olan; protein kinaz B (Akt), ekstrasellüler sinyal regüle kinaz-1/2 (ERK-1/2), mitojen aktiveli protein kinaz (MAPK) ve endotelial gelişmeyi dengeleyen; p44/42 MAPK'ı regüle eder. Dolayısıyla normal retinal vaskülarizasyon için VEGF ve IGF-1 ortamda birlikte bulunmalıdırlar.

Anjiogenez ayrıca derin retina vasküler pleksus, astrosit, Müller hücresi gibi glial hücrelerin, ganglion hücresi gibi nöronal hücrelerin oluşumunda da çok önemli bir etkiye sahiptir (22-24).

1.2.2. Patolojik Retinal Vasküler Gelişim

Fizyolojik rollerinin yanı sıra, anjiogenez patolojik süreçlerde de meydana gelmektedir. Patolojik anjiogenez Tablo 1'de gösterilen; proanjiogenik ve antianjiogenik mediatörler arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır (9, 25).

Oküler dokularda patolojik anjiogenez tüm yaş gruplarında önemli körlük nedeni oluşturan oküler neovasküler hastalıkların temelini oluşturmaktadır (26). Çocukluk döneminde ROP, erişkin dönemde diyabetik retinopati (DRP) ve retinal ven oklüzyonu (RVO), ileri yaşta ise YBMD bu hastalıklardandır (27-31).

Tablo 1. Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler

Anjiogenik Faktörler	Antianjiogenik Faktörler
VEGF	VEGF inhibitörü
Plasental büyüme faktörü (PIGF)	Endostatin
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Vazostatin
Transforme edici büyüme faktörü (TGF)- α	Anjiostatin, insan makrofaj metalloelastaz
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Trombospondin- 1 ve 2
TNF- α	Trombosit faktör-4 fragmanı
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	İnterferon (İFN)- α , β
Granülosit koloni uyaran faktör	Restin
IL-6, IL-8	Antitrombin-3 fragmanı
Anjiopoietin-1	Anjiopoietin-2

Yeni oluşan damarlar kornea, iris, koroid, retina ve optik disk gibi tüm oküler dokuları etkileyebilmektedir. Bu yeni oluşan damarlarda normal damar duvarında mevcut olan sıkı bağlantılar olmadığından; son derece zayıf yapıya sahiptirler. Bu damar yapısının sonucu meydana gelen sızıntılara bağlı hemorajiler görülebilmektedir (1).

Oküler anjiogenez, tıpkı yara iyileşmesinde olduğu gibi inflamasyon ve miyofibroblast formasyonu ile görülmektedir. Bu sebeple, hastalık sürecinde TGF- β 1 ve bağ doku büyüme faktörü gibi pro-fibrotik mediatörlerin artışıyla anjiogenik fazı takip eden fibrotik faz görülebilmekte ve sonuçta fibrozis, traksiyonel retina dekolmanı (RD) durumlarına neden olarak kalıcı görme kaybına yol açabilmektedir (32, 33).

Oküler anjiogenez ile ilişkili patolojilerde, anjiogenez muhtemelen nöronal metabolizmadan kaynaklı lokal doku hipoksisi, inflamasyon ve oksidatif stres ile tetiklenmektedir. NV'nin en önemli tetikleyicisi olarak değerlendirilen VEGF salınımının; retina pigment epiteli (RPE), astrosit, Müller hücresi, perisitler, endotel hücresi ve ganglion hücresi olmak üzere birçok farklı retinal hücre tipi tarafından gerçekleştirildiği görülmüştür (18).

İskemik retinopatilerde; iskemik retinadan NV'den sorumlu anjiogenik faktör salınımı olduğu fikri, ilk defa 1948 yılında öne sürülmüştür ve bu tarihten itibaren bu faktörleri tanımlayan çalışmalar hız kazanmıştır (34). İskemik retinopati hastalarda ve oküler neovaskülarizasyon oluşturulan hayvan modellerinde retina ve vitreus örnekleri incelendiğinde artmış VEGF seviyeleri tespit edilmiştir (6, 35-38).

Hastalıkların anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin bulunmasında deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesi oldukça önemli yer almaktadır. Ratlarda deneysel OİR modeli; tüm dünyada en yaygın olarak kullanılan hem santral damarlarda incelme hem de periferel damar gelişiminde fizyolojik gecikme özelliği ile insanlarda oluşan ROP'u en iyi olarak temsil eden deneysel yöntemdir (39). Oksijen indükte iskemik retinopati fare modelinde spesifik bir VEGF antagonistinin RNV'yi baskıladığının gösterilmesi ile VEGF'in RNV'yi uyardığı ilk defa net olarak ispat edilmiştir. Çalışmalarda ayrıca VEGF'in normal retinal gelişim için gerekli olduğu, yüksek O₂ konsantrasyonlarında VEGF düzeyinin baskılanmasına bağlı; yeni damar oluşumunun gerilediği ve böylece perfüze olmayan iskemik retinal alanların meydana geldiği gösterilmiştir (40, 41). Hiperoksik ortam sonrası tekrar oda O₂'sine geçilmesi; iskemik alanlarda hipoksiye neden olmakta ve bu alanlardan artmış VEGF salınımı ile RNV ortaya çıkmaktadır (36, 42). Yine bu modelde iskemik retina hücrelerinden salınan hipoksi-indüklenebilir faktör 1 α (HIF-1 α) düzeyleri ile VEGF düzeylerinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (43).

Takiben ilerleyen dönemde, HIF-1 α ilişkili faktörler olan PlGF, PDGF, TGF, EGF, TNF- α , IGF, IL'lerin ve FGF ailesinin iskemik retinada NV'ye katkı sağladığı gösterilmiştir (44-47).

Oküler neovasküler hastalıkların anlaşılması ve tedavisinde kullanılabilecek; anjiogenez kaskadını farklı basamaklarda inhibe eden moleküllere yönelik arayışlar devam etmektedir (35, 48).

1.2.3. Oküler Neovasküler Hastalıklar

Neovaskülerin patogenezinde yer alan VEGF'in kaynağı olan hücreler değişiklik göstermektedir. Korneada VEGF; epitel, stroma ve endotel tarafından eksprese edilirken, retinada; Müller hücreleri ve RPE başta olmak üzere ganglion hücrelerinin ve perisitlerin de VEGF düzeyinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

1.2.3.1. Korneal Neovaskülarizasyon

Kornea NV kornea iskemisi, kornea hasarı ve ön segment inflamasyonu gibi bazı patolojik durumlarda ortaya çıkar ve istenmeyen bazı durumları da beraberinde getirir (49, 50). Perikorneal pleksustan köken alan yeni damarlar ışığı bloke ederek

görme keskinliğini azaltabilir, inflamasyona, korneal skar ve ödeme neden olabilir (50).

1.2.3.2. İris Neovaskülarizasyonu

İris neovaskülarizasyonu (NVİ); başta DRP ve RVO olmak üzere çeşitli oküler ve sistemik hastalıklara sekonder olarak ortaya çıkmaktadır. Uzun süre asemptomatik olabilse de, aç ve trabeküler ağ üzerindeki fibrovasküler proliferasyon gelişimi; sekonder neovasküler glokoma (NVG) neden olarak, ciddi bir göz içi basıncı yüksekliği ve görme kaybı ile sonuçlanabilmektedir.

Neovasküler glokoma için yapılan çalışmalarda intravitreal (İV) bevacizumab enjeksiyonun göz içi basıncını düşürmede ve NV'yi geriletmede etkin olduğu gösterilmiştir (51, 52).

1.2.3.3. Retina ve Koroid Neovaskülarizasyonu

Hipoksi varlığında, VEGF mesajcı ribonükleik asit (m-RNA) sentezi 30 katına çıkar. Hipoksiye bağlı stimulasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF ve diğer büyüme faktörleri, artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur (53, 54). Retinal neovasküler hastalıklar; retinal damarlardan köken alan preretinal anjiogenezis ve koroidden köken alan subretinal anjiogenezis olarak iki kısımda incelenir (18).

Preretinal anjiogenez, kapiller perfüzyon bozukluğu ve lokal iskemi ile seyreden, iskemik retinopatiler olarak değerlendirilen RVO, DRP, ROP gibi hastalıklarda ortak bir sonuç olarak gelişmektedir. İskemik retina alanlarından salınımı artan anjiogenik faktörler, vitreus kavitesinde fibrovasküler membranların oluşumu ve buna bağlı komplikasyonlara neden olmaktadır.

Subretinal anjiogenez ise RPE, Bruch membranı ve koroidi etkileyen patolojiler sonucu ortaya çıkar. RPE ve Bruch membranı arasında, başta lipidler olmak üzere biriken depozitler; koryokapillaristen RPE tabakasına O₂ ve besin maddesi geçişini kesintiye uğratır (55). Oluşan hipoksi, başta VEGF olmak üzere anjiogenik maddelerin ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırmakta ve Bruch membranında lenfosit, fibroblast ve makrofaj birikimine neden olmaktadır. Koroid kökenli endotel hücreleri ve makrofajlardan salınan doku metalloproteinazları Bruch membranının proteolizine ve incelmesine neden olur ve membran üzerinde çatlakların oluşmasına yol açar. Anjiogenik faktörlerin uyardığı koroid endotel hücreleri de bu çatlaklardan

geçerek RPE altı alana yerleşir. Yeni damar endotelinin bariyer fonksiyonu gelişmediğinden, retina içi tabakalara sıvı, protein ve lipid sızdırırlar ve damar yapısının zayıf olmasından dolayı kanama eğilimleri fazladır. Oluşan kanamanın organize olması ile fibröz doku gelişimi tetiklenir. İlerleyen dönemlerde NV atrofik bir alan bırakarak gerileyebilmekte veya fibrotik skar oluşumuna neden olabilmektedir (18).

1.2.4. Prematüre Retinopatisi

Prematüre retinopatisi (ROP), prematüre yenidoğanlarda normal retina damarlanmasının bozulmasıyla ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır (56).

Çocukluk çağındaki önlenabilir körlüklerin önemli bir sebebi olup, her yıl yaklaşık 50 000 çocuğun bu sebeple kör olduğu düşünülmektedir (1). Bu bakımdan Dünya Sağlık Örgütü tarafından önlenabilir körlüklerin engellenmesi amacı ile başlatılan, VISION 2020 programında hastalığın kontrol altına alınması öncelikli olarak vurgulanmıştır (57).

1.2.4.1. Epidemiyoloji

Tarihsel olarak ilk ROP vakası 1941 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde tanımlanmıştır. 1942 yılında, prematüre bebeklerde lens arkasındaki fibroblastik kitlenin varlığını fark eden ve bunu düşük doğum haftası ve O₂ kullanımıyla ilişkilendiren Terry tarafından 'retrolental fibroplazi' olarak adlandırılmıştır (58). Sonrasında ise tüm dünyada yaygın bir şekilde görülmeye başlamış ve bugüne kadar farklı zaman dilimlerinde farklı nedenlerden kaynaklı hastalık epidemileri izlenmiştir.

İlk epidemi, 1950'li yıllarda monitörize edilmeden, kontrolsüz olarak yüksek miktarda uygulanan O₂'ye bağlı gelişmiştir. Bu dönemde Campbell tarafından aşırı O₂ kullanımının, ROP için risk faktörü olduğunun bildirilmesi ile prematürelere uygulanan O₂ desteğinde kısıtlamaya gidilmiş ve 1950 yılında %50 olan ROP görülme oranı 1961 yılında %4'e düşmüştür (59, 60). Ancak O₂ miktarının sürekli olarak monitörize edilmesine rağmen ikinci epidemi 1970'lerin sonlarında görülmüştür. Bu dönemde ROP epidemisinin görülmesi, etyolojide O₂ desteği dışında başka faktörlerin de rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bu faktörlerin; temel olarak gelişmiş ülkelerdeki tıbbi ve teknolojik gelişmelerle yenidoğan yoğun bakım koşullarındaki

iyileşmeye bağlı olarak daha küçük doğum ağırlığı (DA) ve haftasına sahip bebeklerin yaşama şansı bulması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (61). 2000’li yıllarda ise yardımcı üreme tekniklerinin yaygın kullanımıyla çoğul gebeliklerin artması ve beraberinde çok küçük prematürelerin yaşatılabilmesi özellikle gelişmekte olan ülkeleri etkileyen üçüncü epideminin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (62).

1.2.4.2. İnsidans ve Prevalans

Gelişmiş ülkelerde ROP’a bağlı körlük insidansı daha düşüktür. Bunun nedenleri prematürite oranının düşük olması, yenidoğan bakımının iyi olması ve deneyimli hemşireler tarafından yapılması, yenidoğana verilen O₂’nin dikkatle monitörize edilmesi, bebeklerin ihtiyacı olan tedavinin iyi seçilmiş ve uygun olması sayılabilir (63).

Fielder ve ark. (64) 1700 gram veya altında doğan 572 bebekte yaptıkları çalışmada akut ROP insidansını %50,9 olarak tespit etmişler ve hastalığın insidans ve şiddetinin DA ve GY azaldıkça arttığını ifade etmişlerdir.

1986 yılında başlatılan prospektif randomize çok merkezli bir çalışma olan ‘‘Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity (CRYO-ROP)’’ grubunun çalışmasında DA 1251 gr’dan küçük 4099 yenidoğan incelenmiş ve bir veya iki gözde herhangi bir evredeki ROP sıklığı %65,8 olarak bildirilmiştir (65). Ayrıca çalışmadaki veriler sonucunda DA 750 gr altındaki bebeklerin %90’ında, 750-999 g olanların %78’inde, 1.000-1.250 g arasında olanların %47’sinde çeşitli derecelerde ROP saptanmış ve 27 haftadan küçük bebekler de ise %83 oranında ROP geliştiği bildirilmiştir (65).

Yakın geçmişte yapılan çok merkezli ‘‘Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP)’’ çalışmasında DA 1251 gr altında doğan bebeklerin %68’inin herhangi bir evrede (evre 1-5) retinopati geliştirdiği görülmüştür. DA 1000-1250 gr olanların %44’ü, 751-999 olanların %76’sı ve 750 gr altı doğanların ise %93’ünün herhangi bir evrede retinopati geliştirdiği tespit edilmiştir (66). DA 1251 gr’dan az olan tüm yenidoğanlar için PR sıklığı %68 olarak ifade edilmiştir. GY 27 hafta ve altında olan yenidoğanların %89’unda ROP saptanırken, 28- 31 hafta GY olanlarda %52, GY 32 hafta ve üzerinde olan yenidoğanlarda ise %14,2 oranında ROP bildirilmiştir.

Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity ve ETROP çalışmalarının her ikisinde de doğum ağırlıklarına göre ROP sıklığı benzer bulunmuş olup, GY ve DA azaldıkça ROP sıklığının arttığı sonucuna varılmıştır.

1.2.4.3. Risk Faktörleri

Prematüre retinopatisi multifaktöriyel bir hastalık olup; gelişimi için belirlenen risk faktörleri prenatal ve postnatal risk faktörleri olmak üzere, iki ana başlık altında toplanmıştır. GY yani doğum haftası ve DA prenatal faktörleri oluştururken, gebelik süreciden farklı olarak O₂ aracılı büyüme faktörlerinde değişikliğe neden olan yüksek O₂ seviyelerine maruz kalmak ve maternal-fetal etkileşimin erken dönemde kaybı ise postnatal faktörleri oluşturmaktadır (67).

Tablo 2. ROP gelişiminde başlıca risk faktörleri

GY ve DA'nın düşük olması
O ₂ tedavisinin süresi ve konsantrasyonu
Hemodinamik anlamlı kardiyorespiratuvar problemler
Hiperoksi/hipoksi, hiperkapni/hipokapni
Asfiksi, hipotermi, metabolik asidoz
Bir haftadan uzun süren mekanik ventilatör tedavisi
Bronkopulmoner displazi
Sepsis/menenjit, sistemik mantar enfeksiyonları
İntrakraniyal kanama
Kan transfüzyon sayısı, kan değişimi
Hiperglisemi/insülin kullanımı
Prematüre anemisinin tedavisi için erken eritropoetin kullanımı
Çoğul gebelik

1.2.4.4. Patofizyoloji

Prematüre retinopatisi patogenezinde Smith-Asthon'un bifazik teorisi ve Kretzer-Hitner'in iğ hücresi (spindle cell) teorisi olmak üzere iki ana teori kabul edilmektedir. İkisinde de ROP patogenezinde anjiogenezin ana sorun olduğu kabul edilmektedir.

Prematüre retinopatisi bifazik bir hastalıktır ve preterm doğumla normal retinal gelişimin kesintiye uğramasıyla başlar.

Ashton ve ark. (68) yaptıkları deneysel çalışmalar sonucunda ROP'un, O₂ toksisitesi ve vasküler yapıların kaybı ile karakterize olan faz 1 ve hipoksinin aracılık ettiği vasoproliferasyon ve retinada patolojik yeni damar oluşumları ile karakterize faz 2 olarak; iki aşamalı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. O₂ destek

tedavisinin faz 1’de ROP gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu, faz 2’de ise ROP gelişim riskinde çok az miktarda azalmaya neden olmasına rağmen, akciğer hastalıklarında artışa neden olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (69,70).

1.2.4.4.1. Faz 1 Prematüre Retinopatisi: Hiperoksi ve Besin Yetersizliği ile Gözlenen Fizyolojik Gelişimin Duraklaması

İntrauterin dönemde fetüsün %50-60 olan O₂ satürasyonu yani ‘fizyolojik hipoksi’ olarak adlandırılan durum retinanın vasküler gelişimini tamamlaması için en önemli faktördür. Prematüre doğum sonrası bebeğin oda şartlarına alınması bile; O₂ satürasyonunu yükseltmekte olup, O₂ destek tedavisi ile bu hiperoksi durumu daha da şiddetlenmektedir (71). Şiddetli hiperoksi; fizyolojik hipoksi ortamında retinal vasküler yapıların gelişiminden sorumlu büyüme faktörlerini düzenleyen hipoksinin indüklediği faktörlerin (VEGF, IGF-1, eritropoetin) salınımında azalmaya ve vasküler gelişimin durmasına neden olur. Ayrıca fetal-meternal etkileşimin erken dönemde kesilmesi vasküler ve postnatal büyüme ve gelişme için gerekli olan IGF-1 ve diğer nutrisyonel maddelerin serum seviyelerindeki azalma faz 1’de gözlenen damar gelişiminin durmasına katkıda bulunur (72, 73).

1.2.4.4.2. Faz 2 Prematüre Retinopatisi: Fibrovasküler Proliferasyon, İntravitreal Neovaskülarizasyon

Genellikle postmenstürel 32. haftadan sonra gözlenen faz 2 evresinde, avasküler retina dokusunda gelişim için gerekli artmış metabolik ihtiyaç ve vasküler gelişimin durması ile ortaya çıkan hipoksi; hipoksinin indüklediği büyüme faktörlerinin aşırı salınımına neden olur. Salınımı artmış büyüme faktörleri, vasküler-avasküler retina bölgesinin birleşim yerinde anormal damar oluşumlarına neden olur (74). Bu patolojik damarlar avasküler retina bölgesini beslemez ve bu dönemde retina dokusunun yeterli oksijenizasyonu bu anormal damarlarda gerilemeye yol açabilir fakat retina dokusunun artmış metabolik ihtiyacı var olan O₂ ve beslenme desteğinin üzerindeyse anormal damar gelişimi devam ederek vitreusa doğru ilerleyen aşırı ve düzensiz bir vaskülarizasyon gelişimi ile sonuçlanır. NV ise retinal katlantı, maküler çekinti ve retina dekolmanına ilerleyen fibrotik ve skartisyel değişikliklere neden olarak kalıcı körlüğe yol açabilmektedir (72).

1.2.4.5. Patogenezde Rol Oynayan Başlıca Moleküller

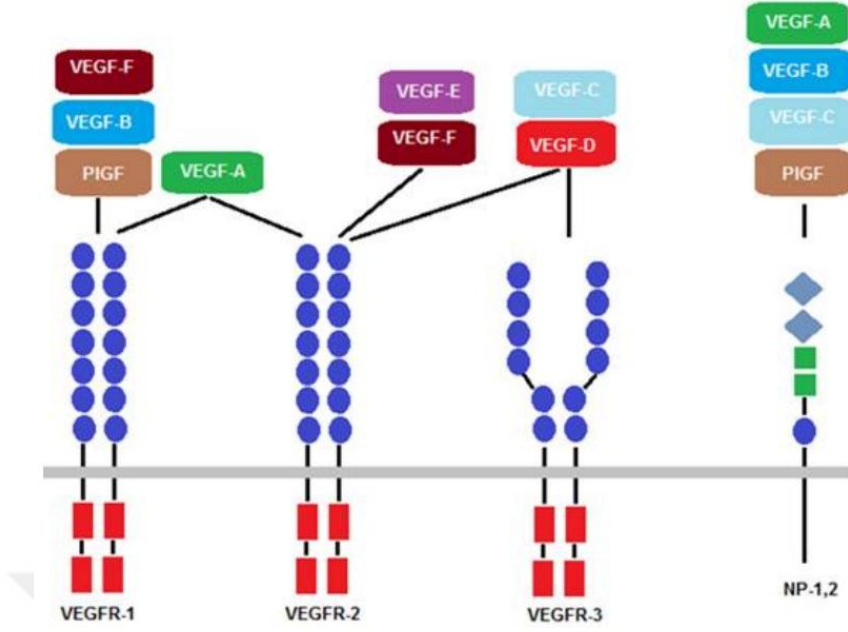
Prematüre retinopatisi patogenezinde rol oynayan temel olarak anjiogenez, inflamasyon ve nörodejenerasyonu düzenleyen, 16 adet çoklu sinyal yolağı mevcuttur (75)

1.2.4.5.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), retina dokusunda vasküler endotel hücrelerin gelişmesi ve çoğalması, endotel hücrelerin göçü, vasküler geçirgenliğin kontrolü, anjiogenezis sürecinin desteklenmesi, vasküler bütünlüğü sağlayarak kan-retina bariyerinin korunması gibi normal retina damar gelişim ve anormal damar oluşumu süreçlerinin başlaması için gereken en önemli moleküler yapıdır (73, 74).

Yapılan deneysel çalışmalarda artmış VEGF aktivitesinin, ROP oluşması ve gelişmesinde hastalığın hem 1. hem de 2. fazında önemli rolleri olduğu gözlenmiş olup, artmış VEGF seviyelerinin damar büyümesinin avasküler retina bölgesinden ziyade vitreus içerisine doğru yönelmesine neden olduğu belirtilmiştir (76, 77). Bu yönelmenin nedeni henüz net olarak ortaya konamamış olmasına rağmen ratlarla yapılan deneysel OİR modelinde; intravitreal neovaskülarizasyon (IVNV) olduğu dönemde vitreus içerisindeki VEGF miktarının retinadakinden 10 kat daha fazla olması ile ortaya çıkan düzensiz VEGF oranının damar büyümesinin vitreus içerisine doğru yönelmesine neden olabileceği belirtilmiştir (78).

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün tirozin kinaz reseptör ailesine ait reseptörleri vardır. VEGF damar endotelinde VEGFR 1, 2 ve 3 olmak üzere farklı reseptörleri aktive eder. VEGFR2 anormal damar oluşumundan sorumlu reseptördür. VEGFR1 ise anjiogenik özellikte olmasına rağmen, VEGF'e VEGFR2'den daha yüksek bir affiniteyle bağlanarak VEGFR2'nin bağlanmasını önleyici özelliktedir. VEGFR3 ise lenfanjiogenez ve anjiogenezis sürecinde önemli görevleri bulunmaktadır. İnsanlarda VEGF; VEGF121, VEGF165, VEGF189 şeklinde 3 ana izoform olarak sentezlenir. Sentezlenen bu VEGF molekülleri çözünürlük, moleküler kütle, reseptörlere bağlanma ve heparin sülfat bağlama özelliklerine göre farklılıklar gösterir. Ayrıca VEGF165; spesifik olarak semaforin reseptörleri grubundan nörofilin-1 ve nörofilin-2 reseptörlerine de bağlanır (79).



Şekil 2. VEGF reseptörleri

Vasküler endotelial büyüme faktörü salınımını arttıran ve azaltan faktörler mevcuttur. Arttıran faktörler; FGF, PDGF, TNF- α , nitrit oksit (NO), IL-1 ve IL-6 dır. VEGF salınımı inhibe edenler ise IL-10 ve IL-13 dür (80).

Oksijen seviyesindeki dalgalanmanın ROP gelişim süreci ile yakından ilgili olduğu bilinmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda, O₂ seviyelerindeki bu dalgalanmanın insandaki analogu VEGF165 olan; VEGF164'te, hipoksinin ise insandaki analogu VEGF121 olan; VEGF120 seviyelerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (81). VEGF164'ün rat modelinde faz 2 ROP patogenezindeki anormal yapıların oluşumunda daha etkin rol oynadığı bildirilmiştir (81). Diğer çalışmalar sonucunda VEGF164 ve VEGFR2 aktivitelerindeki aşırı artışın, insanlarda gelişen ROP'un 1. ve 2. faz aşamalarının oluşumu ve gelişiminde önemli rolü olduğu görülmüştür (82).

Vasküler endotel kaynaklı büyüme faktörü reseptörü 2 sinyal yolağının inhibe edilmesi ile 2. fazda ortaya çıkan IVNV yapılarında gerileme olduğu fakat bu inhibisyonunun fizyolojik retinal damar gelişiminin de durmasına neden olarak, retina dokusunda kalıcı avasküler alan gelişimine yol açtığı saptanmıştır. Normal anjiogenezis süreci için de önemli olan VEGFR2 aktivitesindeki artışın retinadaki normal damarsal gelişim sürecini durdurduğu ve damar endotel hücrelerindeki bölünmeyi bozarak damar büyümesinin retina dışındaki bir alana doğru yönelmesine yani IVNV oluşuma neden olduğu belirtilmiştir (81, 83). VEGF164'ün antikor ile

inhibe edildiği çalışmada ise ROP'da gözlenen arterlerdeki kıvrımlanma artışının önemli ölçüde gerilediği belirtilip, VEGF'in aynı zamanda vasküler tortuosite artışında da önemli bir etkiye sahip olduğu net olarak ortaya konmuştur (84).

Tablo 3. VEGF ailesi

VEGF Üyesi	VEGF Reseptörü	Fonksiyonu
PlGF	VEGFR1	İskemi, inflamasyon, yara iyileşmesi ve kanser hücrelerinde vaskülogenez ve anjiogenez
VEGF-A	VEGFR1 VEGFR2	Vaskülogenez Anjiogenez
VEGF-B	VEGFR1	Monositlerin aktivasyonu ve farklılaşması
VEGF-C	VEGFR3	Lenfanjiogenez

1.2.4.5.2. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, apoptozisin en güçlü inhibitörlerinden biri olmasının yanında; vasküler endotel hücrelerin Akt/Protein kinaz B ve MAPK yolağı aracılığı ile çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlayan maximum VEGF aktivitesi için gerekli anahtar bir faktördür (85). VEGF'in endotel hücreleri üzerinde etkili olabilmesi için IGF-1 gerekmektedir (86). Yapılan deneysel çalışmalarda IGF-1 seviyelerindeki azalmanın ROP gelişiminde önemli rolü olduğu, hastalığın her iki fazının gelişimine etkisi olduğu gösterilmiştir.

1.2.4.5.3. Fibroblast Büyüme Faktörü

Retinada bulunan ilk büyüme faktörü olan FGF ailesi; 23 adet heparin bağlayıcı peptid içermektedir. Bu ailenin üyesi olan temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF); gelişmekte olan ve olgun dokularda hücreler farklılaşma, anjiogenez, mitogenez ve yara iyileşmesinde rol oynar. Tıpkı VEGF gibi; tirozin kinaz reseptörleri aracılığıyla MAPK aktivasyonu yaparak, vasküler endotelde migrasyon ve proliferasyona neden olur (87). FGF bağlanma seviyesine bağlı olarak yeni damarların maturasyonun seviyesi değişmektedir. Normal retinada hücre sitoplazmasında bulunan bFGF, in vitro ve in vivo olarak anjiogeniktir (88).

1.2.4.5.4. Tümör Nekrozis Faktör- α

İnflamasyon ve apoptoziste major rol oynayan sitokinlerden biri olan TNF α ; düşük dozda endotelial hücre çoğalmasını sağlarken, yüksek dozda ters etki gösterir. VEGF salınımını direkt indükler ve ekstrasellüler matriks komponentlerinin,

plazminojen aktivatorlarının ve proteaz inhibitörlerinin üretimini artırır. Proinflatuar özellikleri ile in vivo olarak yeni damar oluşumunu sağlar (89).

1.2.4.5.5. Eritropoetin

Retinada hipoksi durumunda VEGF'den bağımsız olarak eritropoetin (Epo) seviyelerinin yükseldiği, ROP'da ise hem faz 1'deki normal anjiogeneze hem de faz 2'deki patolojik IVNV'da önemli roller oynadığı belirtilmektedir. Deneysel rat OİR modelinde β -common reseptörün fazla aktive olmadığı, fakat seviye ve aktivasyonları artmış Epo reseptörü ve VEGFR2'nin arasındaki etkileşimin vasküler endotel hücrelerde sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT3) reseptörlerini aktive ederek, faz 2'de IVNV gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (90).

1.2.4.5.6. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

Monosit ve trombositlerin alfa granüllerinde bulunan PDGF; erken anjiogeneze aşamasında mezenşim hücrelerinden perisit diferansiasyonunu sağlayarak görev alır. Aynı zamanda hipoksi sonucu artan VEGF salınımını potansiyelize eder (67). Yapılan bir çalışmada, PDR membranlarında PDGF ve reseptörleri bol miktarda tespit edilmiştir (92).

1.2.4.5.7. Hepatosit Büyüme Faktörü

Reseptörü olan cMet bağlanarak, hepatosit büyüme faktörü (HGF)/cMet sinyal ileti yoluyla; vasküler endotel hücrelerini uyarır ve VEGF salınımını artırır. Anjiogeneze, VEGF ile sinerjistik etki gösterir.

Lashkari ve ark. (93)'nin yaptığı bir çalışmada, evre 5 ROP'lu gözlerde HGF ve VEGF seviyelerinin arttığı ve bu faktörlerin ROP patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

1.2.4.6. Sınıflandırma

Hastalık ile ilgili ilk sınıflama; 1953 yılında Reese ve ark. (94) tarafından direkt oftalmoskopi ile yapılan muayene görünümüne göre yapılmıştır (94). Hastalığı, “akut proliferatif faz” ve “kronik sikatrisyel faz” olmak üzere iki ana başlıkta sınıflandırmışlardır. Bu sınıflandırma uzun dönem boyunca göz hekimleri tarafından kullanılmasına rağmen, gelişen teknoloji ile indirekt oftalmoskopun kullanıma girmesi

ve Reese sınıflandırmasında yer almayan periferik fundus görüntülerinin elde edilmesi ile hastalığın tanı ve takibi konusunda yeni bir sınıflandırma ihtiyacı doğmuştur.

1981 yılında ABD’de düzenlenen ROP sempozyumunda 11 farklı ülkeden 23 göz hastalıkları uzmanı ve oftalmik patoloğun katılımı ile hastalığın sınıflandırılması konusunda bir süreç başlatılmış ve bu süreç 1984 yılında “International Classification of Retinopathy of Prematurity (ICROP)” sınıflandırmasının yayınlanmasıyla tamamlanmıştır. Bu sınıflandırma 1987 yılında RD tanımının genişletilmesi ve 2005 yılında da “agresif posterior prematüre retinopati (APROP)” ve “artı öncesi hastalık” tanımlarının eklenmesi ile iki kez revize edilmiş ve bugünkü son halini almıştır (95-97).

Prematüre retinopatisine bağlı gelişen körlüklerin engellenmesinde temel strateji, ROP yönünden risk taşıyan bebeklerin muayene edilerek, tedavi ihtiyacı olanların tespit edilmesidir. Tarama adı verilen bu süreçte, risk grubunun iyi belirlenmesi ve risk grubundaki bebeklerinde tanı ve takiplerinin belirli bir standart içinde yapılması gerekmektedir. Bu bakımdan ICROP sınıflandırması hastalığın tanı ve takip sürecindeki standardizasyon açısından önem arz etmektedir. ICROP sınıflandırması hastalığın mevcut durumunu değerlendiren dört klinik parametreyi içermektedir. Bunlar;

1) Zon; hastalığın retinada yerleşimini ifade eder.

2) Yayılım; retina yüzeyinin saat kadranına benzer bir şekilde 30 derecelik 12 kadrana ayrılması ile ifade edilir.

3) Evre; hastalığın vasküler proliferasyon derecesi olarak ifade edilir.

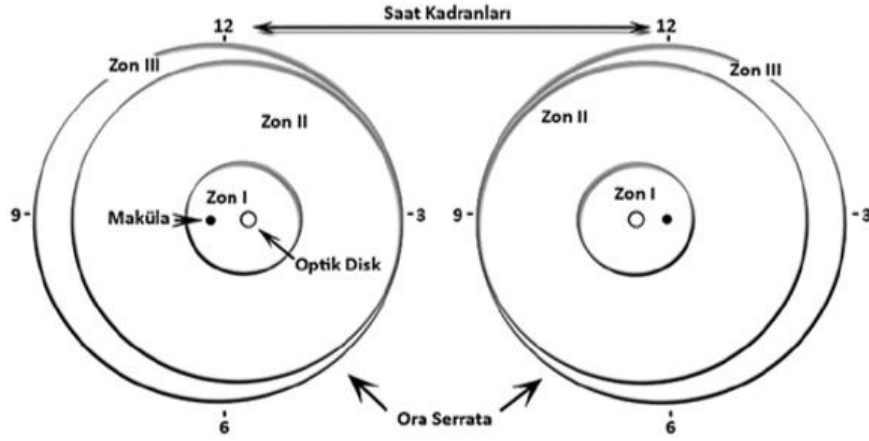
4) Arka kutuptaki vasküler anormallik varlığıdır.

Zon: Hastalığın optik diske göre olan yerleşimini belirtmekte olup, retinal yüzey 3 adet zon ile 3 bölüme ayrılmıştır. Bu bölümler Şekil 3’de gösterilmiştir.

Zon I: Merkezi optik disk, yarıçapı ise optik disk maküla arasındaki mesafenin 2 katı olan daireyi içermektedir.

Zon II: Zon 1 dış sınırından başlayan, nazal yarıda ora serrataya, temporalde ise anatomik ekvatora uzanan ikinci bir dairesel bir alanı içermektedir.

Zon III: Anatomik ekvator ile temporal ora serrata arasında kalan yarım ay şeklinde bölümü içermektedir.



Şekil 3. ICROP sınıflandırmasında belirtilen zon bölgeleri

Evre: Hastalık şiddet derecesine göre 5 evreye ayrılmıştır. Bunlar;

- Evre 1 (Demarkasyon hattı): Vasküler avasküler retina sınırında, yüzeyden kabarıklık olmayan beyaz renkte ince bir hat ile karakterizedir. Bu bölüme doğru gelen damarlar da artmış ve anormal dallanmalar görülebilir.

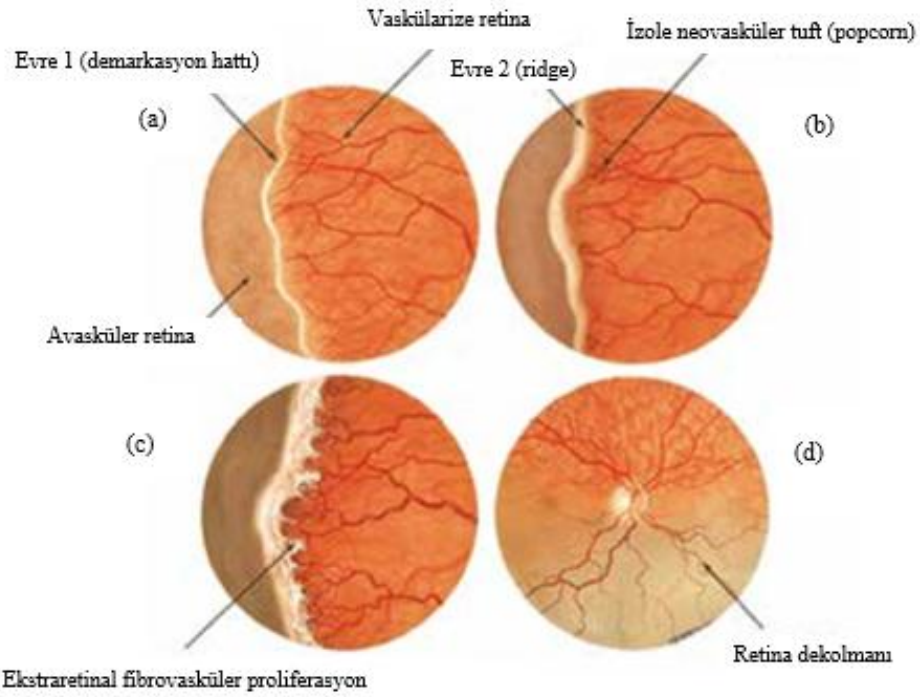
- Evre 2 (Ridge): Demarkasyon hattının hacim kazanması ile karakterizedir. Retinal yüzeyden kabarıklık pembe-beyaz renkte bir görünüme sahiptir. Ridge arka bölümünde “popcorn” adı verilen küçük izole yeni damar kümecikleri izlenebilir.

- Evre 3 (Ekstraretinal fibrovasküler proliferasyon): Avasküler retina kaynaklı iskemik cevaba bağlı olarak gelişen yeni damar oluşumu ile karakterizedir. Yeni oluşan bu damar yapıları ridge arka bölümünden vitreusa doğru uzanım gösterirler ve fragil yapıları nedeni ile ridge üzerinde ufak kanama odaklarına neden olabilirler. Yine fibrovasküler dokunun traksiyon etkisi ile ridge hattında düzensizlikler meydana gelebilir.

- Evre 4 (Parsiyel RD): Başlangıç sınıflandırmasında “sikatrisyel faz” olarak tanımlanmasına rağmen, 1987 yılındaki ICROP güncellemesinde foveal tutulum göstermeyen Evre 4A ve foveal tutulum gösteren Evre 4B parsiyel RD olarak 2 alt gruba ayrılmıştır. RD fibrovasküler dokunun yapıştığı bölümde başlamakta ve dairesel bir tarzda ilerleyerek iç bükey tarzda traksiyonel retina dekolmanına neden olmaktadır.

- Evre 5 (Total RD): Huni şeklinde total RD ile karakterizedir.

Hastalık evresi ile ilgili örnek çizimler Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. Prematüre retinopatisi evreleri ve hastalığın ilerleyişine ait örnek çizim.

(a) Anteriorda yerleşim gösteren avasküler retinayı, posteriordaki vaskülarize retinadan ayıran ince hafif kıvrımlı gösteren demarkasyon hattı gösterilmektedir. (b) Hastalığın ilerlemesi ile birlikte hacim kazanan demarkasyon hattının ridge hattına dönüşmesi gösterilmektedir. Bu bölümde ridge dokusuna ilerleyen damar yapıları ve izole neovasküler tuftlar (popcorn) da görülmektedir. (c) Yeni oluşan anormal damarlar fibrovasküler bir çatı ile retina üzerinden vitreusa doğru olan ilerlemesi görülmektedir. (d) Fibrovasküler dokunun büyümesi ile oluşan retina dekolmanı görülmektedir (98).

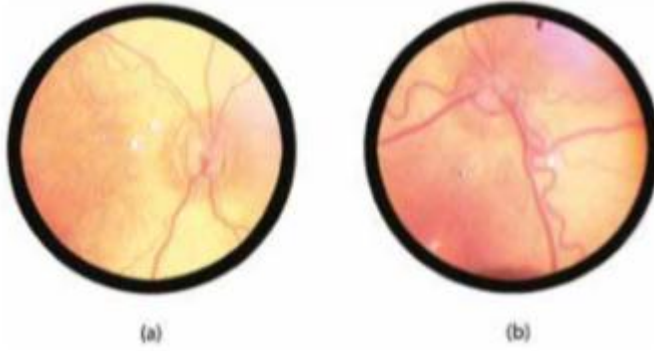
Evreleme konusu ile ilgili diğer bir husus ise, bir gözde birden fazla evrenin bir arada bulunabilmesidir. Bu durumda gözün sahip olduğu en ileri evre o göz için hastalık evresi olarak kabul edilir (97).

Yayılım: Hastalığın yayılımı, retina yüzeyinin saat kadranına benzer bir şekilde 30 derecelik 12 kadrana ayrılması ile ifade edilir. Bu şekilde hastalığın kaç saat kadranı boyunca yayıldığı tanımlanabilir. Hastalığın yayılımı devamlı veya kesintili bir tarzda olabilir.

Arka Kutuptaki Vasküler Anormallik:

Plus Hastalık: Hastalığın şiddetinin en önemli göstergesi olup, arka kutupta arterlerde aşırı kıvrımlanma ve venlerde ise aşırı dilatasyon ile karakterizedir. Bu patolojik bulgunun artı hastalık kabul edilebilmesi için optik disk üzerinden geçen ve birbirine dik olan iki hat ile oluşturulmuş dört retinal kadrandan en az 2 tanesinde izlenmesi gerekmektedir. Artı hastalık varlığı ROP'un ağırlığının bir göstergesidir ve vitreusta bulanıklık, iris damarlarında genişleme, pupil reaksiyonlarında azalma ile

birlikte olabilir. Hastalığın evresinin yanına ‘+’ sembolü konularak ifade edilir. Artı hastalığa örnek arka kutup resmi Şekil 5’de gösterilmiştir.



Şekil 5. Arka kutup vasküler bozukluğa örnek olarak artı öncesi (pre-plus) hastalık (a) ve daha ilerlemiş formu olan artı (plus) hastalık (b)

Pre-plus Hastalık: Arka kutupta tam olarak artı hastalık kriterlerine uymayan fakat normalden daha fazla olan venöz dilatasyon ve arterlerde kıvrımlanma artışı ile karakterizedir. Artı öncesi hastalığa örnek fundus resmi Şekil 5’de gösterilmiştir.

International Classification of Retinopathy of Prematurity sınıflandırmasına göre belirli bir standart içerisinde tanımlanan ROP’un, tedavi süreci de benzer olarak belirli bir standart çerçeve içinde yapılmaktadır. Bu çerçeve içinde yer alan tedavi kriterleri, ilk olarak ROP tedavisinde kriyoterapinin etkinliğinin değerlendirildiği çok merkezli CRYO-ROP çalışmasında tanımlanmış olan “eşik hastalık (threshold disease)” ile daha sonra eşik hastalık kriterlerine göre daha erken dönemde yapılan tedavinin etkinliğinin değerlendirildiği ETROP çalışmasında tanımlanmış olan “eşik öncesi hastalık (pre-threshold disease)” kriterleridir (99, 100).

Eşik Hastalık: Günümüzde artık kullanılmamakta olup CRYO-ROP çalışmasında tedavi gereken hastalar için eşik değer olarak kabul edilen kriterleri kapsamaktadır. Bu kriterler zon 1 veya zon 2’de artı hastalık ile birlikte ardışık 5 saat kadranı veya ardışık olmayan 8 saat kadranı boyunca evre 3 hastalık tanımlanmıştır

Eşik Öncesi Hastalık: Günümüzde şu an kullanılmakta olan tedavi kriterleri olup, ETROP çalışmasında tanımlanmıştır. Kendi içinde “yüksek riskli eşik öncesi hastalık” veya “tip 1 hastalık” ile “düşük riskli eşik öncesi hastalık” veya “tip 2 hastalık” olarak iki alt gruba ayrılmıştır.

Tip 1 hastalık tespitinde 48 saat içinde tedavi önerilerken, tip 2 hastalıkta ise yakın takip önerilmektedir (100). Bu kriterler;

➤ **Tip 1 (yüksek riskli eşik öncesi hastalık):**

- Zon 1’de artı hastalığın eşlik ettiği herhangi bir evre ROP
- Zon 1’de artı hastalık olmadığı halde evre 3 olması
- Zon 2’de artı hastalığın eşlik ettiği evre 2 veya evre 3 hastalık

➤ **Tip 2 (düşük riskli eşik öncesi hastalık):**

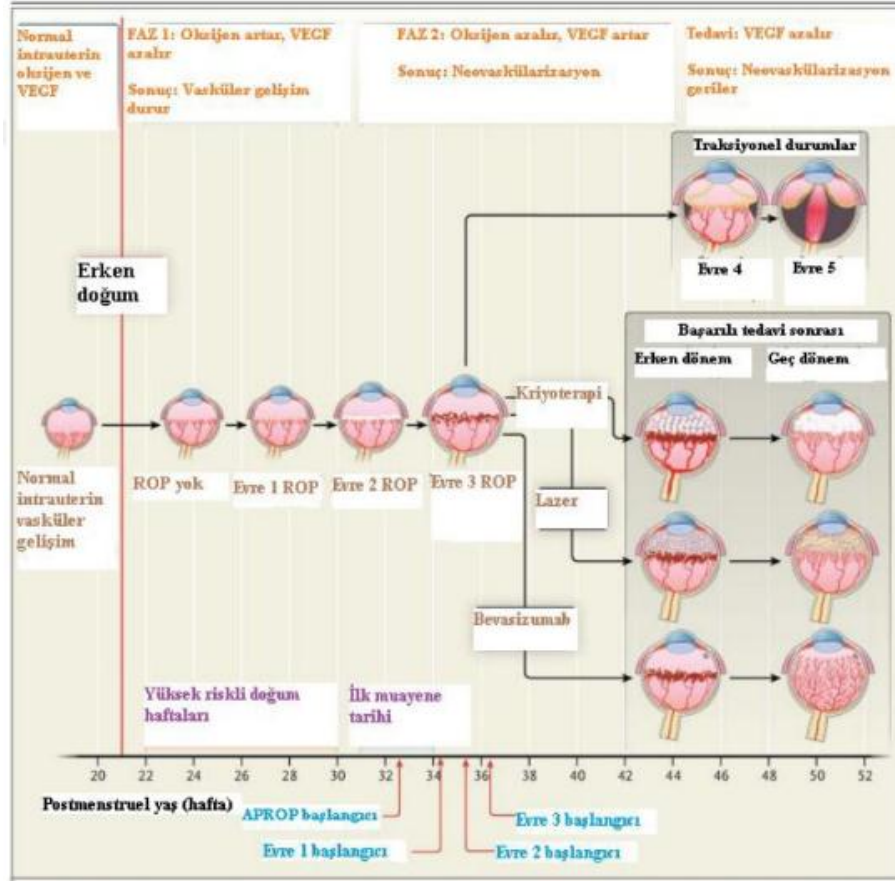
- Zon 1’de artı hastalığın eşik etmediği evre 1 veya evre 2 hastalık
- Zon 2’de artı hastalığın bulunmadığı evre 3 hastalık

Agresif posterior prematüre retinopati: Genellikle düşük GY ve DA’ya sahip bebeklerde görülen ROP formu olup, klinik özellikler ve hastalığın ilerleme süreci bakımından klasik tipteki ROP’dan farklılıklar gösterir. Daha önce Rush Hastalığı olarak da isimlendirilmiştir. 2005 yılındaki ICROP güncellemesi ile bu sınıflandırma içine dâhil edilmiştir. Hastalık genellikle zon 1 ve zon 2 posterioruna yerleşim göstermektedir. Görünüm olarak vasküler-avasküler retina sınırında, artı hastalığın eşlik ettiği, yüzeyden kabarık olmayan düz RNV ile karakterizedir. Bu bölümde retinal damarlar arasında şantlar ve retinal hemorajiler izlenebilir. APROP tipinde herhangi bir evre durumu mevcut değildir. Hastalık klasik tip ROP’daki gibi basamaklı bir ilerleme göstermeden çok hızlı bir şekilde doğruca evre 5’e ilerleyebilir. Bu nedenle tedavisinin acil yapılması önem arz etmektedir.

1.2.4.7. Tedavi Yönetimi

Tedavi endikasyonu ve tedavinin sonuçları değerlendirilirken göz önünde bulundurulmakta olan kriterler, CRYO-ROP ve ETROP çalışmalarında tanımlanmıştır. Bu çalışmalara göre tedavi seçenekleri;

- Durdurucu tedavi
- Antianjiogenik tedavi
- Cerrahi girişim



Şekil 6. ROP gelişim süreci, evreleri ve tedavisi

Durdurucu tedavi: Laser fotokoagülasyon (LFK) standart tedavi yöntemidir. Tedavide amaç avasküler periferik retina alanlarının ablasyonudur. Bu işlem diod LFK ile gerçekleştirilir. LFK tedavisi, ROP gelişen damarların üzerine değil, bu damarların önündeki tüm avasküler alanlara uygulanır. Retinal ablasyon tedavisi “eşik hastalık” ve yüksek riskli “eşik öncesi” hastalıkta endikedir (100, 101).

ROP’da LFK kriterleri çok merkezli çalışma grubu tarafından belirlenmiştir. Bu kriterlerde yüksek risk taşıyan eşik öncesi ROP bulguları da dikkate alınmıştır (101, 102). Erken tedavinin görme keskinliğini artırdığı ve olumsuz yapısal sonuçları azalttığı bildirilmiştir (103). Buna göre tedavi gerektiren durumlar şunlardır;

- Zon I’de evre 1 veya evre 2 ROP ve artı hastalık
- Zon I’de evre 3 ROP
- Zon II’de evre 2 veya evre 3 ROP ve artı hastalık

Genel anestezi veya sedasyon gerektirmesi, periferik retinayı kalıcı olarak hasara uğratması ve periferik görme alanını daraltması LFK tedavisinin dezavantajlarıdır. Ayrıca vitreus hemorajisi, katarakt oluşumu, göz içi basınç artışı,

koroidal efüzyon ve postoperatif inflamasyon gibi oküler komplikasyonlara da sebep olabilir (104). Yine de uygun bir şekilde uygulandığında LFK, oküler ve sistemik yan etkiler açısından oldukça güvenlidir ve günümüzde birçok kılavuzda önerilen tedavi olmaya devam etmektedir (104-106). Bununla birlikte APROP tedavisinde LFK sonrası olumsuz sonuçlar bildiren yayınlar da mevcuttur (107).

Özetle; ETROP çalışması verilerine göre tip 1 ROP'da ablatif tedavi önerilmekte, tip 2 ROP'da ise "bekle ve gör" yaklaşımı önerilmekte, tip 1 ya da eşik ROP'a ilerleme durumunda ablatif tedavi önerilmektedir.

Antianjiogenik tedavi: Anti-VEGF ajanlar ROP tedavisinde alternatif bir yöntemdir. İV enjeksiyon şeklinde uygulanır. Erişkinlerde YBMD, DRP, RVO ve prematürelde ROP tedavisinde kullanılmaktadır (108, 109).

Laser fotokoagülasyon, ROP tedavisinde altın standart olmakla birlikte; anti-VEGF ajanların daha kolay uygulanması, hızlı cevap alınması, korneanın opak, vitreusun bulanık olduğu ve pupillanın dilate olmadığı durumlarda kullanılabilmesi, görme alanında daralma olmaması avantajlarıdır (110-112). Ayrıca VEGF'in organogeneze önemli bir rol oynadığı düşünülürse; İV enjeksiyon sonrası sistemik dolaşıma geçen antianjiogenik ilaçların, serum VEGF düzeylerini düşürme ve sistemik yan etkilere sebep olma riski endişe oluşturmaktadır (113, 114). Ayrıca normal retinal vaskülarizasyonu bozabilir. Evre 4'e ilerlemiş vakalarda retina dekolmanının artmasına ve evre 5'e geçmesine neden olabileceğinden uygulama zamanlaması önemlidir. Minimum etkin dozu bilinmemekle birlikte genellikle yetişkinde kullanılan dozun yarısı uygulanmaktadır (Bevacizumab: 0.675mg/0.025 mL, Ranibizumab: 0.25mg/0.025 mL).

Bevacizumab ve LFK'nın karşılaştırıldığı çok merkezli bir çalışmada PM 54. haftada zon I'de evre 3 ROP veya posterior zon II ROP'ların tedavisinde bevacizumab kullanımı sonrası rekürrens ve yapısal anormalliklerin (retinal ayrılma, maküler ektopi) daha az olduğu bildirilmiştir (110).

Laser fotokoagülasyon tedavisi sonrası cevapsızlık ortalama 2-3 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Bevacizumab tedavisi sonrası ise geç rekürrensler bildirilmektedir bu nedenle bevacizumab tedavisi sonrası takiplerin daha uzun süreli yapılması gerektiği bildirilmiştir (115, 116). Anti-VEGF uygulanmış bebeklerde periferik retinal vaskülarizasyon çok yavaşlamaktadır. Bu bebeklerde periferik vaskülarizasyon

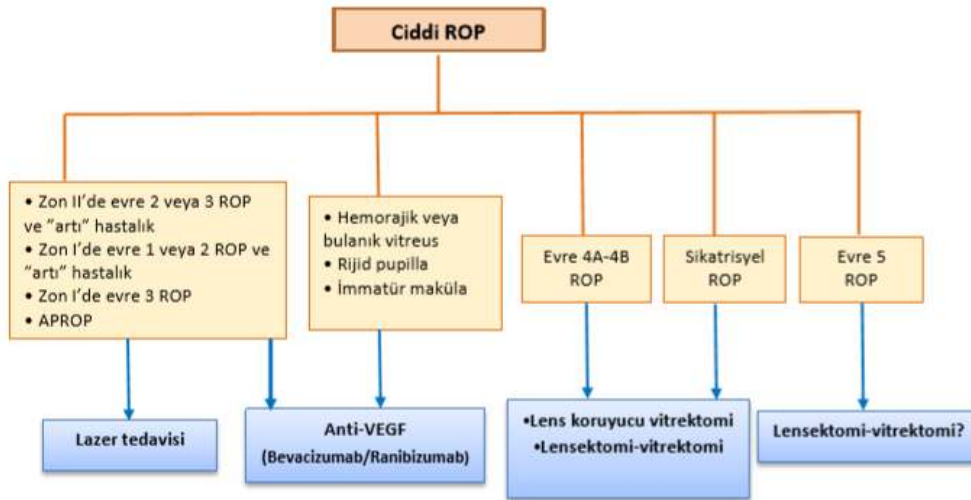
tamamlanana kadar izlem önemlidir ve 2-3 yaşına kadar sürebilir. Büyümüş bir bebeğin periferik retina muayenesi zor olabileceğinden genel anestezi altında muayene gerekebilir. Hastalık anterior zon 2 ye ulaştıktan sonra kalan avasküler alanlara LFK uygulanmak suretiyle bu uzayan takiplere son vermek uygun bir yaklaşım olabilir (117).

Amerikan Pediatri Akademisi, bevacizumabın zon I'de evre 3 ROP ve artı hastalıkta düşünülebileceğini ancak; dozu, optimal zamanlaması, güvenliği ve etkinliği konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır (101). Ayrıca, prematüre bebeklerde kullanımı için Food and Drug Administration (FDA) ve ülkemizde Sağlık Bakanlığı onayları yoktur. Tedavi öncesi ailelerden mutlaka yazılı onam alınmalıdır.

Anti-VEGF'lerle ilgili tüm bu bilinmeyenlere rağmen bu ajanların kullanımının ön planda tutulabileceği klinik durumlar aşağıda sıralanmıştır:

- Zon I veya posterior zon II'de ROP,
- APROP varlığı,
- Makülanın halen vaskülarize olmadığı (immatür maküla) durumlar; makülanın LFK tedavisinden kaçınmak için,
- Retinanın görülmesini zorlaştıracak durumları varlığı; pupil dilatasyonunun yetersiz olduğu gözler, korneal opasite varlığı, vitreusun hemorajik veya bulanık olduğu durumlar,
- Genel durumu LFK tedavisini kaldıramayacak kadar sorunlu olan bebekler.

Cerrahi girişim: LFK veya anti-VEGF ajanlar retina dekolmanını her zaman önleyemeyebilir. Total ya da subtotal retina dekolmanı gelişen vakalarda vitreoretinal cerrahi tedaviler uygulanmaktadır.



Şekil 7. ROP tedavi algoritması

1.3. Güncel Anti-VEGF Ajanlar

Faz 2'de periferik avasküler retinadan salınan aşırı miktarda VEGF, ROP patogeneğinde önemli bir role sahiptir. VEGF etkisinin blokajı neovasküler aktiviteyi azaltacağından ROP tedavisinde antianjiogenik ilaçlar kullanılabilir (118). Ancak diğer oküler neovasküler hastalıkların aksine ROP'da devamlı değil, tek bir seferde fazla miktarda VEGF deşarjı olduğundan tedavi zamanlaması oldukça önemlidir. VEGF düzeylerinin düşüşe geçtiği dönemde yapılacak bir İV antianjiogenik ilaç fibrozisi uyararak traksiyona, retinal yırtık ve dekolman oluşumuna sebep olabilir (119). ROP tedavisinde günümüzde kullanılmakta olan antianjiogenik ilaçlar; bevacizumab, ranibizumab, aflibercept ve conbercept olup bu ajanların hiçbiri FDA tarafından onaylı değildir.

1.3.1. Bevacizumab

149 kilo dalton (kDa) molekül ağırlığına sahip, insan VEGF-A'nın bütün izoformlarına (VEGF-115, VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206) spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden, rekombinant bir insan monoklonal immünglobülin G1 (IgG1) antikorudur (83). VEGF-A'nın endotel yüzeyindeki Fms-ilişkili tirozin kinaz-1 (Flt-1) ve kinaz domain region (KDR) reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek endotelial hücre proliferasyonunu engeller. Bevacizumab, VEGF'nin damar endotelial hücrelerinin yüzeyindeki VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanmasını inhibe ederek damar oluşumunu baskılar (120-

122). Kanser tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almış ilk antianjiogenik ilaçtır. Metastatik kolorektal kanserlerde terminal döneme kadar kullanılmaktadır (123). Bu kullanımda, yeni damar oluşumunu baskılamada etkili olduğunun gösterilmesi üzerine, meme ve böbrek kanseri gibi diğer bazı kanserlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Tümör dokusunda oksijenizasyon ve besin yoksunluğuna yol açarak ve anormal damarlanma üzerinde geçici bir düzelme sağlayarak etki gösterdiği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında bevacizumabın neovaskülarizasyon ve ödeme giden oküler hastalıklarda da etkili olabileceği düşünülmüştür. Ancak henüz oküler hastalıkların tedavisinde kullanım ruhsatı bulunmamaktadır. Buna rağmen son yıllarda bevacizumabın; DRP, neovasküler tip YBMD, RVO ve üveite bağlı gelişen maküla ödeminde ve neovaskülarizasyonla seyreden ROP'ta İV enjeksiyon yöntemiyle yoğun olarak kullanıldığı ve etkili olduğu bildirilmektedir (124-129). NVG'da intrakamaral olarak kullanılan bevacizumab ile oldukça başarılı sonuçlar bildirilmektedir (130). Bevacizumabın korneal neovaskülarizasyondaki etkinliği ise son zamanlarda araştırılmakta olup, bu amaçla yapılan klinik çalışma ve hayvan modellerinde subkonjonktival ve topikal kullanım ile korneal neovaskülarizasyonun inhibe edildiği gösterilmiştir (120, 131).

Antikor hem Fab hem de Fc parçalarını içerdiği için ranibizumaba göre serumda yarılanma ömrü daha uzundur. Bevacizumabın molekül büyüklüğünün ranibizumaba göre 3 kat fazla olması; İV yarı ömrünün ranibizumaba göre %36 daha uzun olmasını sağlar (119).

Artı hastalığın eşlik ettiği zon 1 veya posterior zon 2 evre 3 ROP tedavisinde bevacizumabın etkinliğini değerlendiren Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity (BEAT-ROP) çalışması konvansiyonel LFK'a kıyasla zon 1 hastalıkta bevacizumabın anlamlı üstün olduğunu ancak zon 2 hastalıkta sonuçların benzer olduğunu göstermiştir (110). Literatürde bevacizumab'ın hem LFK ile kombine edildiğinde hem de tek başına kullanıldığında zon 1 ROP ve APROP tedavisinde etkili olduğunu gösteren çok sayıda yayın mevcuttur (110, 132-134). Yine de BEAT-ROP çalışmasında İV bevacizumab enjeksiyonundan ortalama 16 hafta sonra hastaların %6'sında rekürrens geliştiği gösterilmiştir (110). Buna karşılık Chen

ve ark. (135), bevacizumab enjeksiyonu yaptıkları 41 gözden hiçbirinde nüks saptanmadığını belirtmişlerdir.

1.3.2. Ranibizumab

Ranibizumab, inflamasyona sebep olan Fc parçasını içermeyip sadece Fab parçasını içeren, 48 kDa ağırlığında, rekombinant bir insan monoklonal antikor parçasıdır (119). VEGF için tek bağlanma bölgesine sahip olmakla birlikte VEGF'e bağlanma afinitesi bevacizumaba göre yaklaşık 10 kat fazladır. Aynı zamanda moleküler ağırlığı retinadan geçebilmesine izin verecek kadar düşük olduğu için subretinal aralığa yüksek konsantrasyonda ulaşabilir.

İlk defa 2006 yılında yaş tip YBMD'de kullanılmak üzere FDA onayı almıştır ve bu tarihten beri çok çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır (135).

Ranibizumabın bevacizumaba göre daha kısa olan yarı ömrü ve daha düşük olan molekül ağırlığı sistemik yan etki riskini azaltır, ancak vitreustan hızlı temizlenmesi daha erken rekürrense sebep olabilir (118-120). Literatürde İV ranibizumab enjeksiyonu sonrası ROP reaktivasyonu oranlarının bevacizumab enjeksiyonuna göre daha erken dönemde ve daha yüksek oranda olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (119-121).

1.3.3. Aflibercept

İnsan IgG1'in Fc parçası ile VEGF reseptörleri olan VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin birleştirilmesi ile oluşturulmuş, 115-kDa büyüklüğünde, rekombinant bir füzyon proteindir (136). Bu tuzak molekülünün bevacizumab ve ranibizumaba göre VEGF-A'ya afinitesi daha yüksek ve yarı ömrü daha uzundur (137). Molekül aynı zamanda VEGF-B ve PlGF'i de bağlamaktadır (138). Bevacizumab ve ranibizumab tedavilerine yanıt vermeyen gözlerde, aflibercept ile pigment epitel dekolmanlarında tama yakın rezolüsyon bildirilmiştir (139).

Literatürde aflibercept'in ROP tedavisindeki yerini değerlendiren çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada tip 1 ROP tanısı ile 1mg/0,025 ml aflibercept yapılan olguların tamamında ROP'da gerileme saptandığı gösterilmiştir (140). OİR'de İV afliberceptin hem yüksek dozda hem de düşük dozda neovasküler damarlanmayı azaltmada etkili olduğu ve enjeksiyondan sonraki ilk 3 günde avasküler

alanı arttırsa da 7. günde tedavi uygulanmayan gözlere göre düzelme görüldüğü ve bu durumun doz bağımlı olduğu bildirilmiştir (141). Aflibercept kullanılan ROP olgularında etkinlik bildirilmekle birlikte yapılan bir çalışmada oküler kan akımında azalma olduğu gösterilmiştir (140).

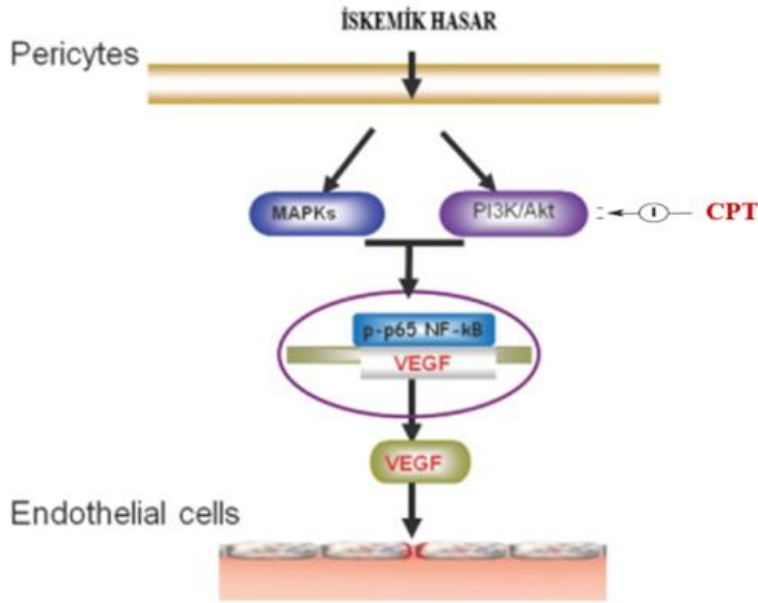
1.3.4. Conbercept

Conbercept; IgG1'in Fc parçasına VEGFR-1'in ikinci bölgesi ve VEGFR-2'nin üçüncü ve dördüncü bölgesinin eklenmesiyle oluşturulan, VEGF-A, VEGF-B ve PlGF'e yüksek afinite ile bağlanan, 143 kDa ağırlığında, rekombinant bir füzyon proteindir (142). Yapısal olarak aflibercepte benzemekle birlikte, farklı olarak içerdiği VEGFR-2'nin dördüncü bölgesi sayesinde ekstraselüler matrikse daha az geçer, VEGF'e daha yüksek afinite ile bağlanır ve yarı ömrü daha uzundur (142). Çin'de 2013 yılında neovasküler tip YBMD tedavisinde Çin Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onay almıştır (50). Jin ve ark. (143)'nın çalışmasında artı hastalığın eşlik ettiği zon 1/2 evre 2/3 ROP veya APROP tedavisinde İV 0,25 mg/0,025 ml conbercept uygulanan hastalarda conberceptin güvenli ve etkili bir tedavi seçeneği olduğu bildirilmiştir. Conbercept henüz ülkemizde bulunmamaktadır.

1.4. Cryptotanshinone

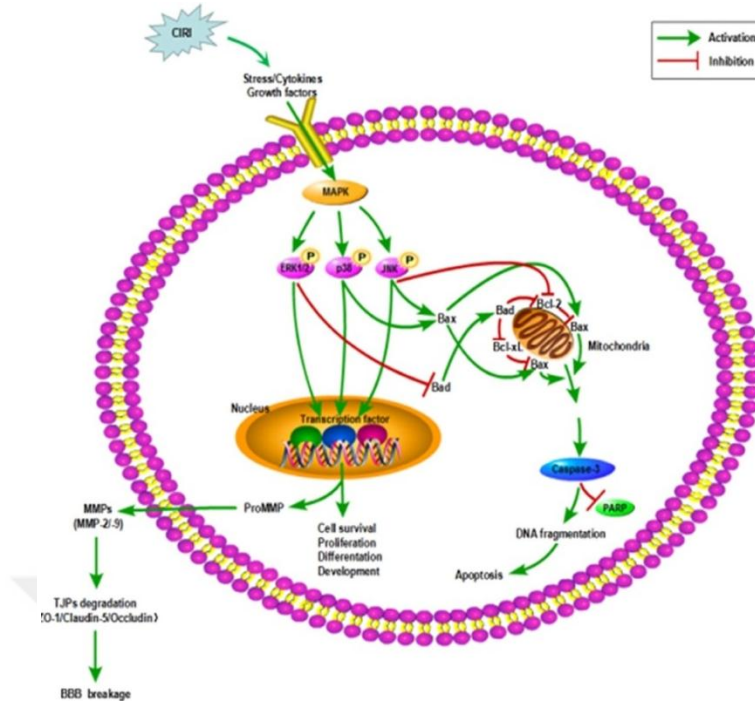
Cryptotanshinone (CPT); Çin'de kalp-damar hastalıkları, hepatit, diyabet ve kronik karaciğer yetmezliğinin tedavisinde kullanılan *Salvia miltiorrhiza* adlı bitki türünün köklerinden ekstrakte edilmiş lipofilik bir bileşiktir (144). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; iskemi, ateroskleroz ve Alzheimer hastalığını önleme potansiyeline sahip olan bu bileşiğin aynı zamanda antiinflamatuvar (145), antibakteriyel, antikanser (146), antioksidatif (147) ve antiagregan (148) etkileri de bulunmaktadır.

Cryptotanshinonenin insan umbilikal ven endotel hücresi (HUVEC) kültürlerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolunu baskılaması ile VEGF ve siklin D1 düzeylerini modüle ederek antianjiogenik etkisi gösterilmiştir (149). *Salvia miltiorrhiza*'nın aktif bir bileşeni olan CPT'nin endotel hücrelerinde SH2 domain (Src)/fokal adezyon kinaz (FAK) ve ERK1/2 sinyal yollarını baskılayarak, VEGFR2'nin Tyr 1175 bölgesinin fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (11). Böylece endotel hücre çoğalmasını inhibe ederek anjiogenez ile ilgili hastalıkların tedavisindeki terapötik potansiyeli vurgulanmıştır.



Şekil 8. CPT'nin VEGF üzerindeki etki mekanizması.

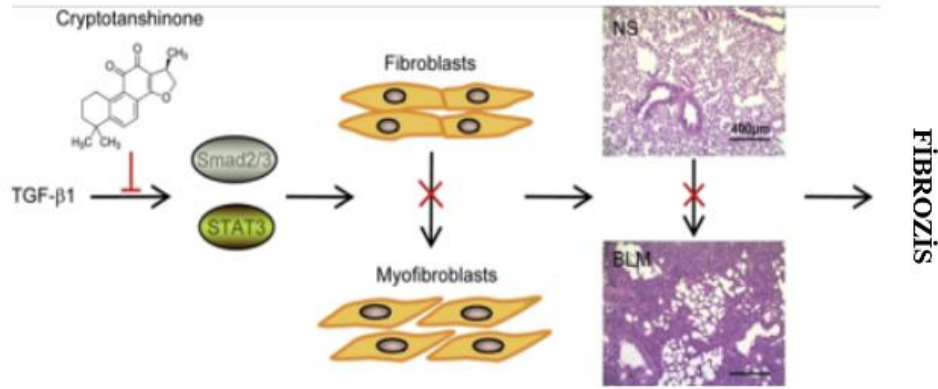
Cryptotanshinonenin antipermeabilite ve antianjiogenik etkileri yanısıra diğer sitokinler ve kemokinler ile etkileşiminde antiinflamatuvar özellikleri vardır. Tang ve ark. (150)'nin lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış makrofajlarda CPT'nin etkinliğini araştırdıkları çalışmada, CPT'nin MAPK'nın fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini ve tamamen LPS ile tetiklenen nükleer faktör kappa-B (NF-κB) aktivasyonunu ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmadan esinlenilerek yapılan başka bir çalışmada CPT'nin, NF-κB aktivasyon inhibisyonunun yanı sıra; NO üretiminin, LPS ile uyarılmış makrofajlarda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (151).



Şekil 9. CPT hücre içi antiinflamatuvar etki mekanizması.

Cryptotanshinone ile ilgili literatürde birçok çalışma olmasına karşı oftalmoloji alanında tek bir çalışmaya rastlanmaktadır; *Angiostrongylus cantonensis* enfeksiyonunun neden olduğu optik nörit fare modelinde, tek başına albendazol ve albendazol ile kombine olarak verilen sırasıyla deksametazon, tanshinon II-A (TSII-A) ve CPT tedavilerinin; görsel uyarılmış potansiyel testi P2 latans süresi, retina kalınlığı, akson sayısı, optik sinir lifi çapı ve ganglion hücre sayısı üzerindeki etkileri kıyaslanmıştır. Çalışma sonucunda TSIIA'nın, CPT'nin antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilerine ek olarak nöroprotektif etkisinin de olduğu gösterilmiştir (152).

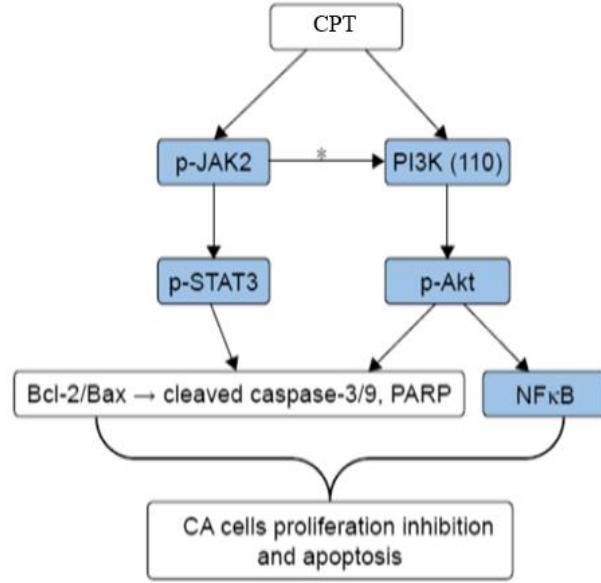
Ratlarda radyasyonla indüklenen akciğer fibrozisi modelinde CPT'nin IL-6, TGF- β , MMP (matriks metalloproteinaz)-1 seviyelerinin baskılanması ile antiinflamatuvar ve antifibrotik etkinliği üzerinden terapötik potansiyeli vurgulanmıştır (153). Bleomisin ile indüklenen akciğer fibrozisi modelinde ise CPT'nin Smad 2/3 ve STAT3'ün fosforilasyonunu baskılayarak TGF- β 1'i inhibe ettiği ve bu sayede fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (154).



Şekil 10. TGF-β sinyal yolağı ve CPT ile ilişkisi.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre kültüründe; CPT'nin fosfoinozimid 3-kinaz (PI3K), Akt sinyal yolu inhibisyonu yaparak G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (155). Kolanjiokarsinoma hücre kültürü çalışmasında gösterilmiştir ki; CPT, hem janus kinaz (JAK)2/STAT3'ü hemde PI3K/Akt/NFκB sinyal yolağını baskılanması ile Bcl-2 ve kaspaz aktivasyonu yaparak tümör hücrelerinde apoptozisi uyarmıştır (156).

Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatörü-3 kanser hücresi proliferasyonunda anahtar bir transkripsiyon aktivatörüdür. JAK'lar tarafından düzenlenen STAT3, çoğu insan malign tümöründe yapısal olarak aktive olur ve kanser hücrelerinde proliferasyon, anjiogenez ve apoptozise yol açar (157, 158). Shin ve ark. (159)'nın renal hücreli karsinom modeli oluşturdukları farelerde CPT'nin STAT3'ün Tyr705 bölgesinin fosforilasyonunu inhibe etmesi ile hücre apoptozunun indüklendiği ve proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. CPT ayrıca tümörögenizde antimetastatik rol oynadığı da aynı çalışmada gösterilmiştir (160). Renal hücreli karsinom dışında CPT'nin güçlü bir STAT3 inhibitörü özelliği sayesinde; prostat kanseri, lösemi, gliomalar, akciğer kanseri, hepatik karsinomlar, pankreas kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, squamos hücreli özafagus kanseri ve melanoma gibi farklı kanser hücresi modellerinde de antikanser etkinliği gösterilmiştir (146, 159, 161-170).



Şekil 11. CPT'nin kanser hücresinde apoptozis etki mekanizması.

Tüm bu çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda; ratlarda OİR modelinde yeni bir ajan olarak kullandığımız CPT'nin, retinal endotelial hücrelerde VEGFR2 ve STAT3'ü seçici olarak düşürmesi ile rerinal NV'yi azaltabileceğini düşündük. OİR modeli oluşturduğumuz ratlarda ip olarak uyguladığımız bu ajanın retina morfolojisine, neovaskülarizasyona ve VEGF ile TNF- α immünreaktivitesi üzerine etkilerini inceledik.

1.5. Decorin

Decorin; konnektif dokuda bulunan, fibronectin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks molekülleri ile çok yönlü ilişkisi olan, küçük lösin yönü zengin bir proteoglikandır (12). Vücutta proteoglikanların bulunduğu her türlü dokuda bulunmaktadır. Bunlar arasında kornea stroması, kemik, kıkırdak, vasküler endotel, endometrium, serviks bağ dokusu, plasenta, desidua, dişeti gibi dokular bulunmaktadır.

Ekstraselüler matriksi (ECM) kontrakte ederek kollajen doku oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (171). Kollajen fibrillogenez haricinde miyogenez ve plasental invazyonun sınırlanması gibi fizyolojik görevleri vardır (172).

Decorin, EGFR ve diğer ErbB familyası üyeleri, IGF-1, Met, hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR) gibi tirozin kinaz reseptörlerinin parakrin etkili pan-inhibitörü olarak görev yapmaktadır (173-175). Anjiogenez ve tümör gelişiminde Met

sinyal yolağı önemli bir rol oynar (176-178). Birçok insan kanserinde Met aktivasyonu olduğu ve DCN'nin bu yolağı inhibe ederek; tümör hücresinin çoğalmasını, anjiogenezi inhibe ettiği ve anti-metastatik etkinliği gösterilmiştir (179-184).

Decorin antianjiogenik olan trombospondin-1 ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörlerinin (TIMP's); özellikle de TIMP-2 ve TIMP-3'ün ekspresyonunu indüklemektedir (185). Güçlü proanjiogenik faktörleri azaltarak ve endojen antianjiogenik ajanları indükleyerek; normoksi altında tümör anjiogenezi baskılayıcı olarak rol oynamaktadır (186). DCN eş zamanlı olarak iki proanjiogenik proteaz olan MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunu ve enzimatik aktivitesini baskılamaktadır. Barnet ve ark. (187)'nin yaptığı bir çalışmada metalloproteinazların retinal anjiogenezi kısmen rol oynadığı ve gelecekte ROP tedavisinde MMP selektif inhibitörlerinin kullanılabileceği bildirilmiştir. MMP-2 ve MMP-9 geni yok edilmiş transgenik OİR fareler ile kontrol OİR farelerin karşılaştırıldığı çalışmada; özellikle MMP-2 olmayan grupta diğer gruplara göre ekstraretinal neovaskülarizasyonun az olduğunu tespit edilmiştir (188). OİR'de MMP-2 ve 9 selektif inhibitörlerinin RNV'ü kısmen azalttığını gösteren bu iki çalışma gelecekte DCN'in oküler neovasküler hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Decorin, iyi bilinen bir antianjiogenik molekül olan İFN, özellikle de İFN-γ'nin aktivitesini kuvvetlendirerek inflamasyonla ilişkili anjiogenezi de azaltmaktadır (189).

Kornea stromasında bulunduğu bilinen DCN geninin defekte uğratıldığı farelerin hasarlı kornealarında anjiogenezi mekanizmasının bozulduğu gösterilmiştir (190). Buradan yola çıkarak DCN'nin in vivo anjiogenezi modüle edebileceği, bulunduğu duruma göre antianjiogenik özelliklere sahip olabileceği ve başta kornea ve retina olmak üzere oküler anjiogenezin tedavisinde umut vad edebileceği düşünülmüştür.

Decorin ile ilgili oftalmolojide yapılmış çalışmalardan bahsedecek olursak; Mohan ve ark. (191)'nin yaptığı çalışmada ilk kez DCN'nin EGFR için biyolojik bir ligand olarak hareket ettiğini ve fibroblast göçünü antagonize ederek korneal yara iyileşmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada tavşanlarda in vivo korneal NV modelinde, adeno-ilişkili virüs serotip 5 ile hedeflenmiş DCN gen terapisinin stroma içine verilmesinin NV'yi azalttığı, CD31 immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir (192). Ayrıca kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

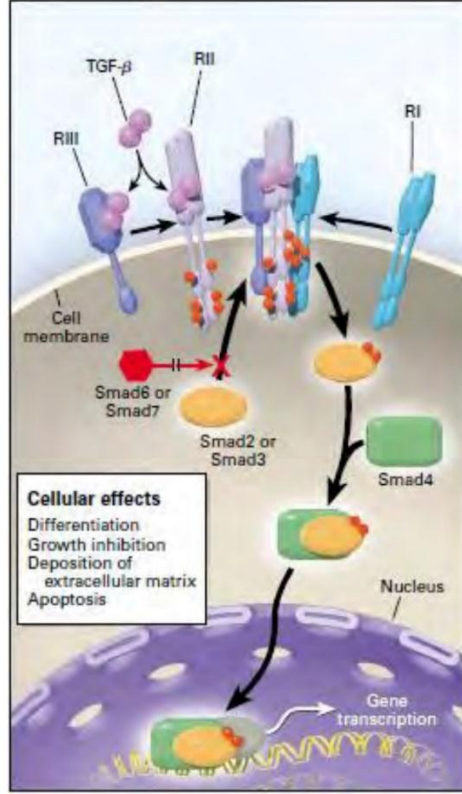
çalışması ile VEGF, makrofaj kemoatraktan proteini (MCP1) ve anjiyopietin seviyelerinin azaldığı, pigmentli epitel türevli faktör (PEDF) seviyesinin arttığı böylelikle; DCN'nin potansiyel olarak inflamasyonla ilişkili korneal neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Mohan ve ark. (193)'nın yaptığı bir başka çalışmada, in vivo DCN gen terapisinin, kornea fibrozisini inhibe ettiği hipotezi doğrulanmıştır ve bunun DCN'nin TGF- β 'yı inhibe edici etkisinden kaynaklandığına dair kanıtlar bulunmaktadır.

Kornea hasarını takiben artmış TGF- β seviyeleri, keratositlerin miyofibroblastlara transformasyonuna ve korneada skarlaşmaya neden olur. Hill ve ark. (194), *Pseudomonas keratiti* oluşturulan fare modelinde, kornea opasitesi ve bakteriyel keratitin skarlaşmasını azaltmak için rekombinant DCN'i oküler yüzeye uygulamışlar ve 16 gün içinde kornea opaklığının azaldığını göstermişlerdir. Benzer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da, DCN'nin etkisini, yara iyileşmesinde major bir düzenleyici sitokin olan; TGF- β ekspresyonunu inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir. Böylelikle araştırmacılar tarafından DCN'nin klinikte korneal skar tedavisinde kullanılabileceği fikri öne sürülmüştür (195).

Kısaca bahsedecek olursak TGF- β , doku onarım sürecinde yapımı artan, ECM yeniden yapılandırılmasında ve skar formasyonunda görev alan önemli bir sitokindir (196). Memeli dokularında gösterilmiş TGF- β 'nın 3 izoformu (TGF- β 1, 2, 3) vardır. TGF β ailesi üyeleri; hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozunu, göçünü ve ECM üretimini kontrol eder, ayrıca yara iyileşmesi ve anormal skar oluşumunda rol oynar (197). Çalışmalarda fare retinasında ganglion hücre tabakası (GHT) ve Müller hücrelerinde bulunan TGF- β reseptörü tip I ve tip 2'nin serin/treonin kinaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (198). TGF- β , retinada RPE hücreleri ve perisitler tarafından üretilir (199) ve İV TGF- β seviyelerinin artması, retinal anjiogenez ile ilişkili görünmektedir (200, 201). TGF- β 'nın, insan RPE hücre kültürlerinde VEGF salgılanmasını önemli ölçüde uyardığı bildirilmiştir (202, 203).

Transforme edici büyüme faktörü- β , kendine ait serin/treonin protein kinaz yapısındaki 2 tip reseptörünü aktive etmektedir (204). TGF- β tip II reseptörün aracılık yaparak tip I reseptörü aktive etmesi TGF- β sinyallerinin başlamasına neden olur (205). Bu şekilde aktive olan tip I reseptör, sitozolde bulunan Smad-2 ve 3 proteinlerini fosforiller (206). Bu fosforlanmış Smad proteinleri, uyarıcı Smad proteinine (Smad-4)

bağlanır (207). Daha sonra Smad2-Smad3-Smad4 kompleksi bir transkripsiyon faktörü olarak çekirdeğe yer değiştirir ve transkripsiyonel sinyallerin iletimi için translokasyona uğrar (208, 209).



Şekil 12. TGF-β sinyal yolağı ve DCN ile ilişkisi.

Yapılan çalışmalarda uygulanan DCN'nin, TGF-β ligandına bağlanıp inaktif hale getirmesiyle TGF-β/Smad yolağındaki sinyal iletimini bozarak, fibrozisi ve ECM proteinlerinin üretimini azalttığı öne sürülmektedir (210, 211). Bu sayede fibrozisle seyreden hastalıklarda TGF-β inhibitörü rolü oynayarak, skar oluşumunu baskıladığı için tedaviye yönelik kullanılabileceği gösterilmiştir (212-214). Bu çalışmalardan esinlenilerek DCN'nin fibrovasküler aşamalarla seyreden koroidal ve retinal neovasküler hastalıklarda kullanılabileceği fikri doğmuştur.

Nassar ve ark. (215), travmatik proliferatif vitreoretinopati (PVR) tavşan modelinde, vitrektomi sonrası adjuvan olarak uygulanan İV DCN tedavisinin fibrozis ve traksiyonel RD gelişimini azalttığını bildirmişlerdir. Klinik ve histopatolojik değerlendirmelere dayanarak doğal TGF-β inhibitörü olan DCN'nin potansiyel bir adjuvan PVR profilaksi ilacı olarak kullanılabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Decorinin antifibrotik etkinliğinden yola çıkarak glokom hastalarında da umut vadedebileceği düşünülmüş ve çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Tavşanlarda glokom filtrasyon cerrahisi uygulanarak yapılan bir çalışmada, perioperatif subkonjonktival DCN enjeksiyonu yapıldığında filtrasyon cerrahisi başarısının uzayabileceği gösterilmiştir (216). DCN'nin primer açık açılı glokom modelinde trabeküler ağda ECM birikimini azaltarak göz içi basıncını düşürdüğü ve retinal ganglion hücre hasarını azalttığı bildirilmiştir (217). DCN bu etkisi primer açık açılı glokomda tedavi stratejisi olarak daha ayrıntılı çalışmalarla desteklenmelidir.

Özay ve ark. (218), travmatik beyin hasarı modeli oluşturulan ratlarda ip uygulanan DCN tedavisinin, oksidatif stres ve apoptoz ile ilişkili olan TGF- β 1, kompleman sistemi ve TNF- α 'yı inhibe ettiğini göstermişlerdir. DCN'nin antiapoptotik özellikleri, antiinflamatuvar aktiviteleri (kompleman 1q, semaforin3a, TGF- β ve TNF- α 'nın inhibisyonu) ve VEGF supresyonu üzerindeki etkileri sayesinde; travmatik beyin hasarı sonrası, nöron hücrelerini koruduğunu bildirmişlerdir.

Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak biz çalışmamızda, DCN'nin kanıtlanmış antianjiogenik ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde; iskemik retinal neovasküler hastalıkların tedavisinde faydalanılabileceğine dair hipotezimizi araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, Penn ve ark. (39) tarafından geliştirilmiş in vivo OİR rat modelinde ip DCN enjeksiyonunun retina morfolojisine, neovaskülarizasyona ve VEGF ile TNF- α immünreaktivitesi üzerine etkilerini incelendi.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu izni alındıktan sonra (Karar No: 186, Proje No: 19.05, Onay Tarihi: 30/11/2018) Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1 Hayvan Deneyi Modelinin Oluşturulması

Çoğu hayvanın retinal vasküler gelişiminin doğumdan sonra tamamlandığı bilinmektedir. Bu özellikleri sayesinde, ROP ile ilgili çalışmalar, hayvan OİR modelleri üzerinden yapılabilmektedir (219). Deneysel OİR modelleri genellikle yenidoğan hayvanların farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda O₂'ye maruz bırakılması ile üretilir. Bu modellerle ilgili çalışmalar genellikle kedilerde (220), köpeklerde (221), farelerde (222, 223) ve sıçanlarda (224) bildirilmiştir. Ek olarak; bu hayvanlar içinden sıçan retinal vasküler gelişimi, insan retinal vasküler gelişimine en benzerdir (225). Bu nedenle, bizim çalışmamızda sıçan yavruları kullanıldı.

Deneyimizde Penn ve ark.'nın (39) 1994 yılında geliştirdikleri, RNV'yi ve ROP'un proliferatif neovasküler fazını yansıtan, tekrarlanabilir bir model olan; 50/10 OİR rat modeli oluşturuldu. Bu modelde yapılan çalışmalarda; 18. günde prematüre bebeklerdeki zon 2 evre 3 ROP'a benzer olarak fizyolojik retinal vaskülarizasyonda gecikme ve İV yeni damar oluşumlarının izlendiği raporlanmıştır (39, 226).

Deneysel çalışmamızda 8 adet gebe Sprague Dawley cinsi rat ile bu ratlardan elde edilen, ağırlıkları 15-20 gr arasında değişen, 35 adet yenidoğan yavru rat kullanıldı. Tüm gebe ratlara aynı standart rat yemi verilerek add-libitum su, yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük olarak altları temizlenerek bakımları yapıldı.

Grup A'yı oluşturan sağlıklı kontrol grubu olarak belirlediğimiz ratlar, anneleriyle birlikte, doğumdan itibaren çalışma sonlanıncaya kadar normal oda koşullarında özel kafeste tutuldu ve anne sütü ile beslendi.

Grup A dışındaki 28 adet rat, doğumlarını takiben ilk 4 saat içerisinde, anneleriyle aynı kafeslerde bulundukları, ortam sıcaklık, nem, O₂ seviyelerinin ayarlanabildiği; Isolette C2000 model kuvöze alındı. 22-25°C ısıda, %45-60 nem oranındaki kuvözde; 12 saat ışık (7: 00–19: 00) ve 12 saat karanlıkta (19: 00–7: 00) tutularak özel olarak yaptırılan kafeslerde, anne sütü ile beslendi. Toplam 7 siklus, 14

gün olacak şekilde, dönüşümlü olarak 24 saat süreyle ortamda %50 konsantrasyonda O₂'ye, 24 saat süreyle de ortamda %10 konsantrasyonda O₂'ye tabi tutuldu. Kuvözdeki tüm yavrular, doğumdan sonra 14 gün boyunca, %50 ve %10 arasında dalgalanma gösteren O₂'ye maruz bırakılarak; ROP'daki O₂ dalgalanmalarının ve aralıklı gelişen hipoksi ataklarının taklit edilmesi hedeflendi.

Kuvözdeki O₂ konsantrasyonu oluşabilecek cihaz kaynaklı hataları elimine etmek amaçlı 2 adet cihaz (Dräger kuvöz O₂ sensörü ve Quantek model 902p O₂/Karbondiyoksit (CO₂) analizörü) yardımı ile ölçülerek takip edildi. Ortam O₂ ve CO₂ seviyeleri günde ortalama 8 defa kontrol edildi ve gereken durumlarda kalibrasyon yapıldı. CO₂ miktarının düzenlenmesi için sistemde gerekli gaz akışı sağlandı ve CO₂ absorbanı (soda lime) kullanıldı.

Ratlar 14 gün kadar kuvözün içinde kaldıktan sonra postnatal 15. günde oda şartlarına alındı ve 4 gün süreyle burada tutulduktan sonra 18. günde modelin oluştuğu kabul edildi.

2.2. İlaçların Hazırlanması

İntraperitoneal enjeksiyonlar için; bevacizumabın (Altuzan 100mg/ml flakon, Roche, ABD) orjinal flakonundan, CPT (C5624; Sigma-Aldrich) ve DCN'nin (D-8428; Sigma-Aldrich) orjinal tozlarından elde edilen solüsyonlar kullanıldı.

Orijinal toz CPT 4°C'de saklandı ve literatürde önerildiği gibi hazırlanarak elde edilen solüsyon kullanıldı (227). Mevcut çalışmada Sun ve ark.'nın (228) yaptığı çalışmaya istinaden ip olarak 3 gün boyunca uyguladığımız CPT dozu 50 mg/kg/gün, 0,1 mL miktarda belirlendi.

Orijinal toz DCN -20°C'de saklandı ve literatürde önerildiği gibi hazırlanarak elde edilen solüsyon kullanıldı (215). Mevcut çalışmada Alan ve ark.'nın (229) yaptığı çalışmaya istinaden ip 3 gün boyunca uyguladığımız DCN dozu 0,1 mg/kg/gün, 0,1 mL miktarda belirlendi.

Bevacizumab orijinal flakonu +4°C'de saklandı ve literatürde önerildiği gibi hazırlanarak elde edilen solüsyon kullanıldı (230). Mevcut çalışmada Acun ve ark.'nın (231) yaptıkları çalışmaya istinaden ip bevacizumab dozu 2,5 mg/kg olarak belirlendi ve 0,1 mL olacak şekilde uygulandı.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Doğumlarıyla birlikte oda şartlarındaki kafesde tutulan grup A'daki deneklerde OİR modeli oluşturulmamıştır. Doğumdan itibaren kuvöze alınan deneklerde ise OİR modelinin oluştuğu varsayılarak, ratlar randomize 4 gruba ayrıldı.

Çalışmamızda kullanılan Sprague Dawley cinsi ratların vücut ağırlığı enjeksiyon döneminde yaklaşık 15-20 gr olarak ölçüldü ve gruplar aşağıdaki şekilde belirlendi:

Grup A (sağlıklı kontrol grubu): OİR modeli oluşturulmadı, deneklere herhangi bir işlem uygulanmadı (n= 7 göz).

Grup B (sham grubu): OİR modeli oluşturuldu, deneyin 15-16 ve 17. günlerinde ip 0,1 mL phosphate-buffered salin (PBS) solüsyonu enjeksiyonu yapıldı (n= 7 göz).

Grup C (OİR+CPT grubu): Bu gruptaki deneklerde OİR modeli oluşturuldu ve deneyin 15-16 ve 17. günlerinde ip 0,1 mL (50 mg/kg/gün) CPT enjeksiyonu yapıldı (n= 7 göz).

Grup D (OİR+DCN grubu): Bu gruptaki deneklerde OİR modeli oluşturuldu ve deneyin 15-16 ve 17. günlerinde ip 0,1 mL (0,1 mg/kg/gün) DCN enjeksiyonu yapıldı (n= 7 göz).

Grup E (OİR+Bevacizumab grubu): Bu gruptaki deneklerde OİR modeli oluşturuldu ve deneyin 15. gününde ip 0.1 mL (2,5 mg/kg) bevacizumab enjeksiyonu yapıldı (n= 7 göz).

2.4. Göz Dokularının Alınması ve Histolojik Preparatların Hazırlanması

Oxygen-induced retinopathy (OIR) modelinin en belirgin olarak geliştiği postnatal 18. günde sağlıklı kontrol grubu dahil olmak üzere; tüm gruplardaki ratlar tartıldıktan sonra, ketamin (90 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ip uygulanarak anestezi altında kurban edildi. Kurban edilen sıçanların gözleri optik sinir çok kısa kalmayacak şekilde enükleasyon yöntemiyle alınıp %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edilip, takiben 24 saat süresince musluk suyu ile yıkama işleminden geçirildi. Ardından dereceli alkol serilerinden geçirilen dokular ksilol ile parlatılıp parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan optik sinire paralel, sagittal planda, optik diskin her iki yanındaki beş alandan, yaklaşık 100 mikron

aralıklarla seri kesitler alındı. Optik siniri içeren kesitler, sinirden uzanan normal damarlar neovasküler damarlarla karışabileceği için değerlendirmeye alınmadı. Alınan 5 µm kalınlığındaki seri doku kesitlerine histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama teknikleri uygulandı. Örneklem her göz için ortalama retinal uzunluğun %10'una denk gelecek şekilde, 10 kesitten oluşturuldu. Parafin blok haline getirilen doku örneklerinden mikrotomla 5 µm kalınlığında doku kesitleri, pozitif şarjlı lamlar (Thermo Scientific) üzerine alındı. 58°C'deki etüvde deparafinize edilen kesitler rutin Hematoksilen & Eozin tekniği ile boyanıp entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar, Olympus BH2 (Tokyo, Japan) fotomikroskopla incelenip fotoğraflandı.

2.5. Retinal Neovaskülerizasyonun Histolojik Değerlendirilmesi

Işık mikroskobu altında tanımlanan neovasküler hücre çekirdekleri, iç limitan membranın (İLM) vitreal tarafında bulunursa yeni damarlarla ilişkili oldukları düşünülmüştür (232-234). Mevcut çalışmada ışık mikroskobunda İLM'nin vitreal tarafındaki hematoksilen ile boyanmış vasküler endotelial hücre çekirdekleri, her bir gözden seri olmayan 10 kesitte, x400'lük büyütmede, retinanın normal yapılarından ayırt edilerek, tedaviye kör iki bağımsız gözlemci tarafından sayıldı. Tüm gruplardaki her bir gözün, vasküler endotelial hücre çekirdeğinin ortalama sayısı hesaplanarak belirlendi.

2.6. VEGF ve TNF-α İmmünohistokimyasal Boyanması

Polilizinli lamlara soğutulmuş parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli alkol serilerinden geçirilip, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific) ile muamele edildi. Antigen retrieval için kesitler, sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyanmasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) solüsyonu ile muamele edildikten sonra kesitler primer antikor ile (Rabbit Polyclonal anti-TNF-α (Bioss) ve Rabbit Polyclonal anti-VEGF (Bioss)) 1 gece boyunca optimal dilüsyonda (1:400) +4°C' de nemli ortamda inkübe edildi. Daha sonra doku kesitleri, biyotinli sekonder antikor (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse/rabbit IgG), Thermo Scientific) ile 30 dakika inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3-

5 kez yıkanıp horseradish peroksidaz (HRP) konjuge streptavidin (HRP; TS-060-HR, Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific) enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Kesitler tekrar PBS ile 3-5 kez yıkanıp, AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole) substrat solüsyonu (TA-060-HA, AEC Substrate System, Thermo Scientific) damlatıldı. Reaksiyon, ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra bütün dokularda eş zamanlı olarak distile su ile sonlandırıldı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Distile su ile yıkanan preparatlar kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar, Olympus BH2 (Tokyo, Japan) fotomikroskopla incelenip fotoğraflandı. VEGF ve TNF- α pozitif immün işaretlenme gösteren hücreler; şiddeti ve yaygınlığına göre tedaviye kör iki bağımsız gözlemci tarafından değerlendirildi ve histoskorlaması ile analiz edildi. Bu analiz her sıçanın 3 retina kesitinde yapıldı ve ortalama değer belirlendi.

Tablo 4. VEGF ve TNF- α boyanma şiddetinin değerlendirilmesi

VEGF ve TNF- α Ekspresyonu	Boyanma Şiddeti
0	Boyanma yok
+0,5	Çok az boyanma
+1	Az boyanma
+2	Orta boyanma
+3	Şiddetli boyanma

Tablo 5. VEGF ve TNF- α immünreaktivite yaygınlığının değerlendirilmesi

VEGF ve TNF- α Ekspresyonu	Boyanmada immünreaktivitenin yaygınlığı
0,1	<%25
0,4	%26-50
0,6	%51-75
0,9	%76-100

İmmünohistokimyasal boyanmanın skorlanması; daha önce yapılmış çalışmalarda olduğu gibi immünreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti esas alınarak histoskorlaması ('Histoskor=yaygınlık x şiddet' formülü ile) oluşturuldu (235).

2.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Version 25.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) programı kullanıldı. Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde gruplar arası parametrelerin değerlendirilmesinde bağımsız örneklem tek tönü varyans analizi

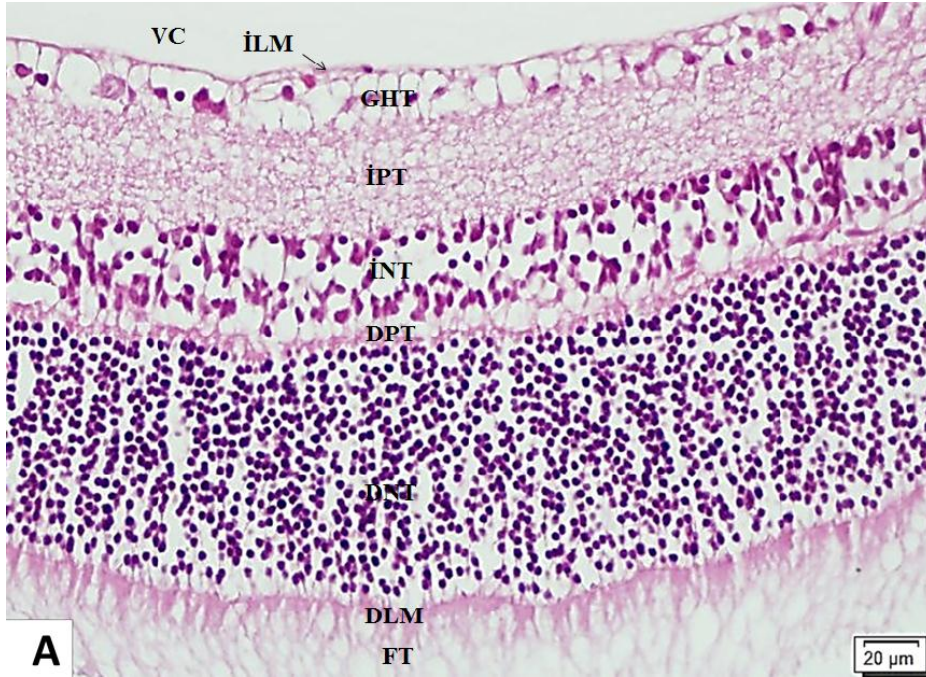
ve post hoc Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak belirtildi. $P<0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. Retinal Tabakaların Morfolojik Analizi

Retina katmanlarının morfolojik analizinde sağlıklı kontrol grubuna ait kesitlerde retina dokusu normal yapıda gözlemlendi (Şekil 13). Grup B’de retinal katmanlar disorganize, dış nükleer tabakada yer yer hücre kaybı, hiposellülarite, dejenerasyon, İLM’nin vitreal yüzeyinde endotelial hücre proliferasyonu ve neovaskülarizasyon ayırt edildi (Şekil 15, 16). Grup C, D ve E’de kistik dejenerasyon, hiposellülarite ve nükleer tabakanın kaybı tespit edilmedi (Şekil 17, 18, 19). Ayrıca, retinal tabakalar düzenli seyirli histolojik yapılarını korumakla birlikte İLM’nin vitreal yüzeyinde grup B’ye göre oldukça azalmış olmakla birlikte neovasküler endotel hücre çekirdeklerine rastlandı (Şekil 17, 18, 19)



Şekil 13. Grup A’ya (sağlıklı kontrol grubu) ait normal görünümlü retina dokusu, Hematoksilen & Eozin x200.

VC: vitröz cisim, İLM: iç limitan membran, GHT: gangliyon hücre tabakası, İPT: iç pleksiform tabaka, İNT: iç nükleer tabaka, DPT: dış pleksiform tabaka, DNT: dış nükleer tabaka, DLM: dış limitan membran, FT: fotoreseptör hücre tabakası.

3.2. Kantitatif Retinal Neovaskülarizasyon Analizi

Tablo 6. Gruplardaki neovasküler endotelial hücrelerin ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Neovasküler Endotelial Hücre Analizi (Ort.± SD)
Grup A (sağlıklı kontrol grubu)	0,00±0,00
Grup B (sham grubu)	13,14±1,34 ^{a*} c* d*e*
Grup C (OİR+CPT)	7,28±0,75 ^{a*} b*
Grup D (OİR+DCN)	6,57±1,51 ^{a*} b*
Grup E (OİR+Bevacizumab)	6,71±1,49 ^{a*} b*

^a Sağlıklı kontrol grubuna göre,

^b Sham grubuna göre,

^c OİR+CPT grubuna göre,

^d OİR+DCN grubuna göre,

^e OİR+Bevacizumab grubuna göre, anlamlı farklılığı göstermektedir. (* = p<0,05)

Neovaskülarizasyon gelişimi retinal parafin kesitlerinde İLM'nin vitreal yüzeyindeki neovasküler endotelial hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edildi. Grup A (sağlıklı kontrol grubu)'da İLM'nin vitreal yüzeyinde neovasküler endotelial hücre çekirdeği gözlenmedi (Şekil 13). Grup B, C, D ve E'de İLM'nin vitreal yüzeyinde sırasıyla 13,14±1,34, 7,28±0,75, 6,57±1,51 ve 6,71±1,49 neovasküler endotelial hücre çekirdeği gözlemlendi.

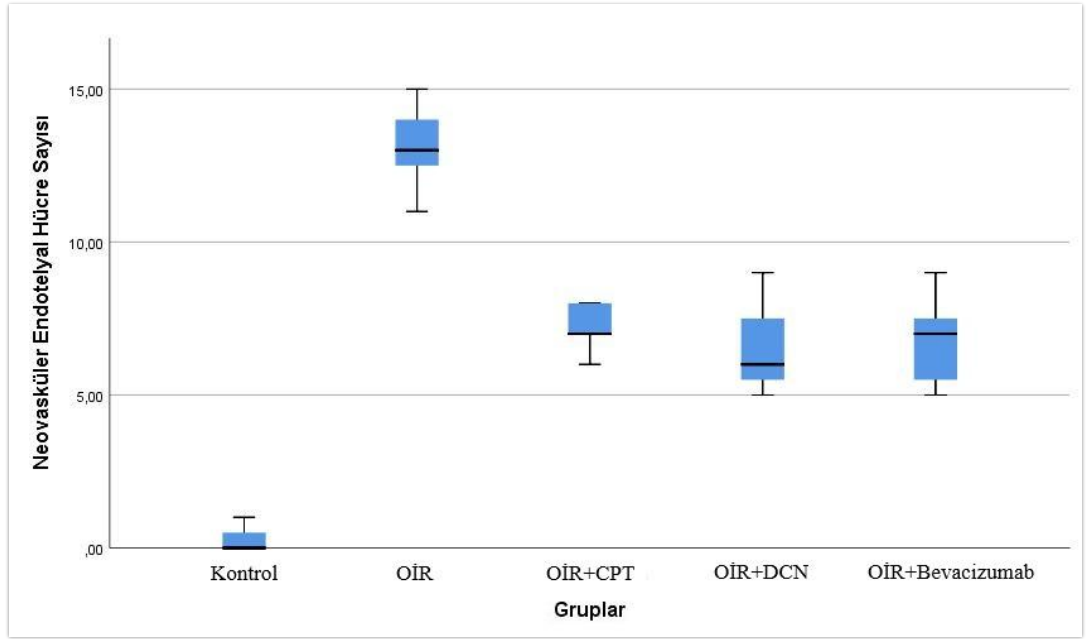
Grup A ile grup B karşılaştırıldığında; grup B'de neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısı istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (p<0,001).

Grup B ile grup C, D, E karşılaştırıldığında; grup C, D ve E'de neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısı istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu (p<0,001).

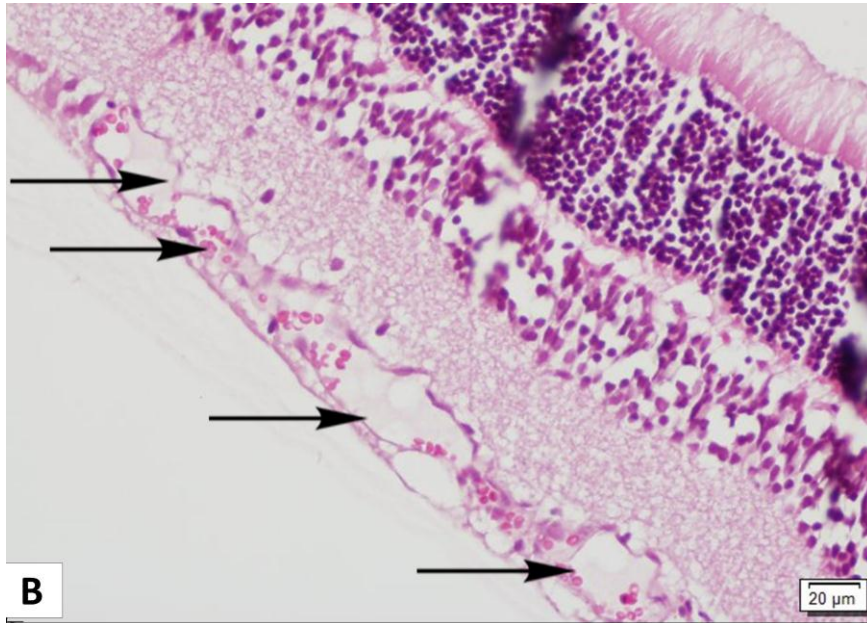
Grup C ile grup D karşılaştırıldığında neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,796).

Grup D ile grup E karşılaştırıldığında neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,999).

Grup C ile grup E karşılaştırıldığında neovasküler endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,897).

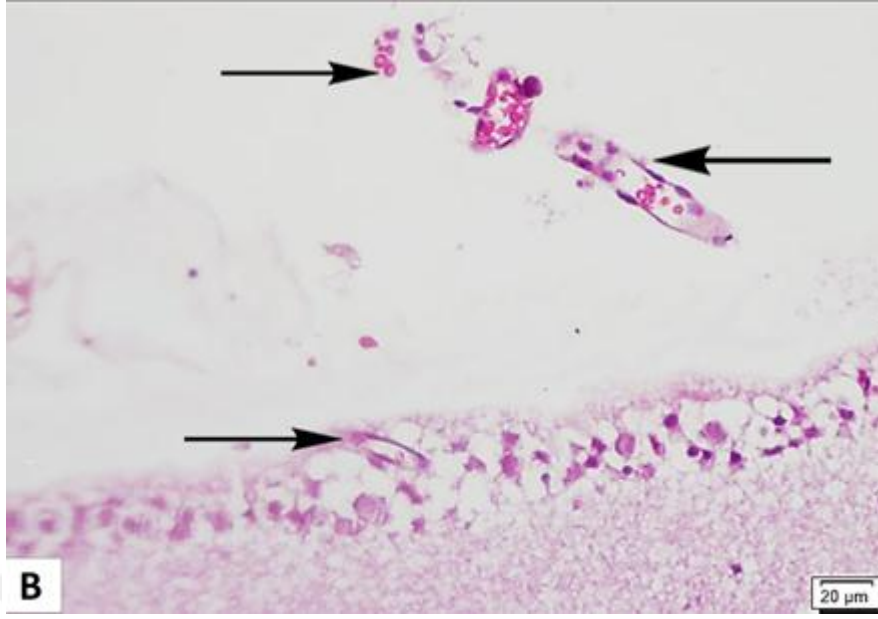


Şekil 14. Tüm gruplarda neovasküler endotelial hücre analizi.



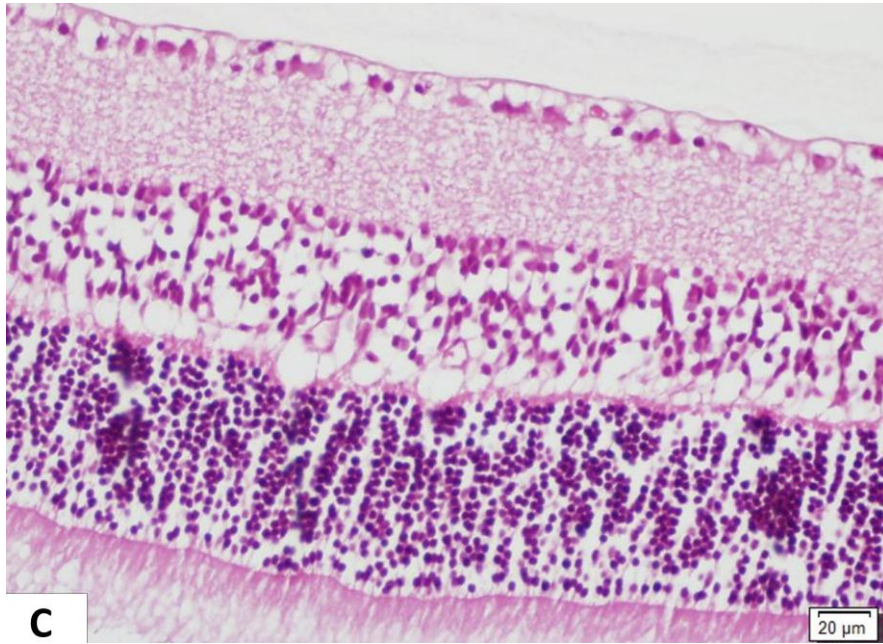
Şekil 15. Grup B'ye (sham grubu) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması-1.

İLM'nin vitreal yüzeyinde neovasküler endotelial hücre proliferasyonu (siyah ok) gözlenmektedir.



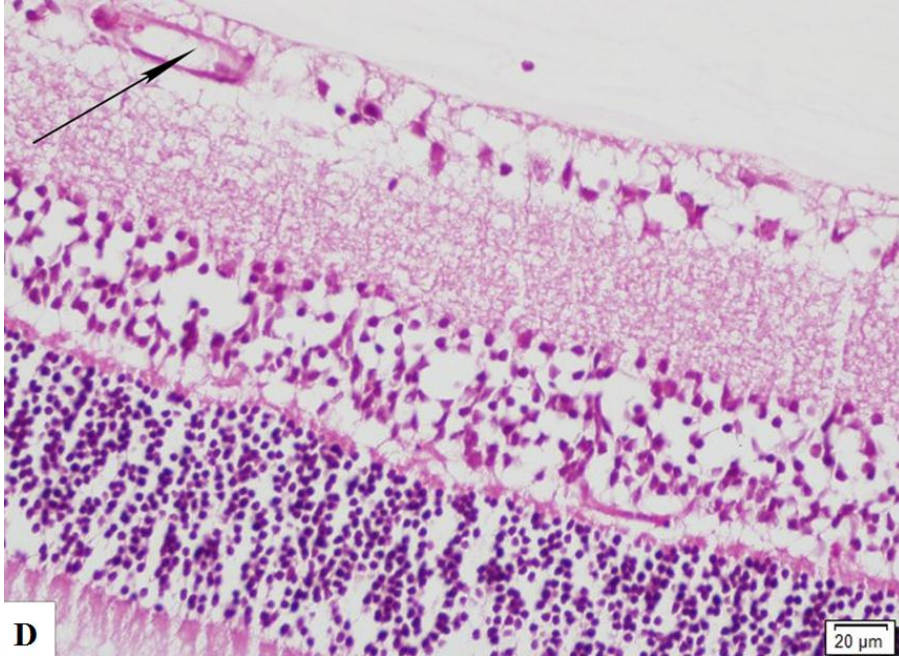
Şekil 16. Grup B'ye (sham grubu) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması-2.

İLM'nin vitreal yüzeyinde neovasküler endotelial hücre proliferasyonu (siyah ok) gözlenmektedir.



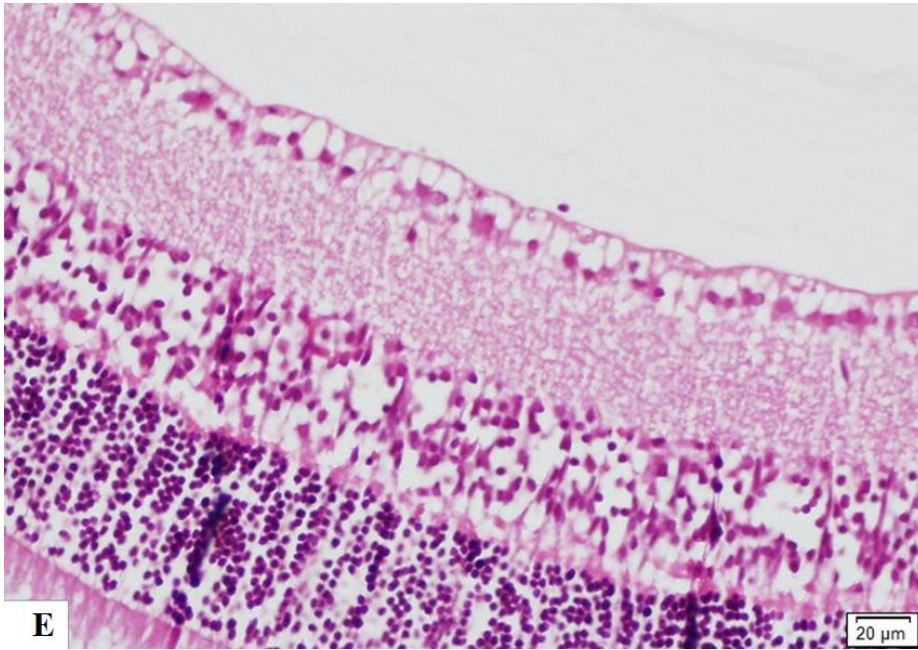
Şekil 17. Grup C'ye (OİR+CPT) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması.

Retinal tabakaların CPT tedavisiyle normal düzenli yapısını koruduğu gözlenmektedir.



Şekil 18. Grup D'ye (OİR+DCN) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması.

Retinal tabakaların DCN tedavisiyle normal düzenli yapısını koruduğu ve İLM'nin vitreal yüzeyinde neovasküler endotelial hücre proliferasyonu (siyah ok) gözlenmektedir.



Şekil 19. Grup E'ye (OİR+Bevacizumab) ait retina dokusunun Hematoksilen & Eozin boyanması.

3.3. VEGF İmmünohistokimyasal Analizi

Tablo 7. Gruplardaki VEGF immünreaktivitesinin ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	VEGF immünreaktivitesi (Ort.± SD)
Grup A (sağlıklı kontrol grubu)	0,07±0,02 b* d*
Grup B (sham grubu)	0,97±0,21 a* c* d*e*
Grup C (OİR+CPT)	0,29±0,14 b*
Grup D (OİR+DCN)	0,37±0,12 a* b*
Grup E (OİR+Bevacizumab)	0,23±0,17 b*

^a Sağlıklı kontrol grubuna göre,

^b Sham grubuna göre,

^c OİR+CPT grubuna göre,

^d OİR+DCN grubuna göre,

^e OİR+Bevacizumab grubuna göre, anlamlı farklılığı göstermektedir. (* = p<0,05)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü pozitif immün işaretlenme gösteren hücreler; şiddeti ve yaygınlığına göre değerlendirildi ve histoskorlaması ile analiz edildi. VEGF immünreaktivitesi tüm gruplarda sırasıyla 0,07±0,02, 0,97±0,21, 0,29±0,14, 0,37±0,12 ve 0,23±0,17 idi.

Grup A ile grup B karşılaştırıldığında; grup B’de VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (p<0,001).

Grup A ile grup D karşılaştırıldığında; grup B ve D’de VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (p<0,001).

Grup B ile grup C, D ve E karşılaştırıldığında; grup C, D ve E’de VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu (p<0,001).

Grup C ile grup D karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,860).

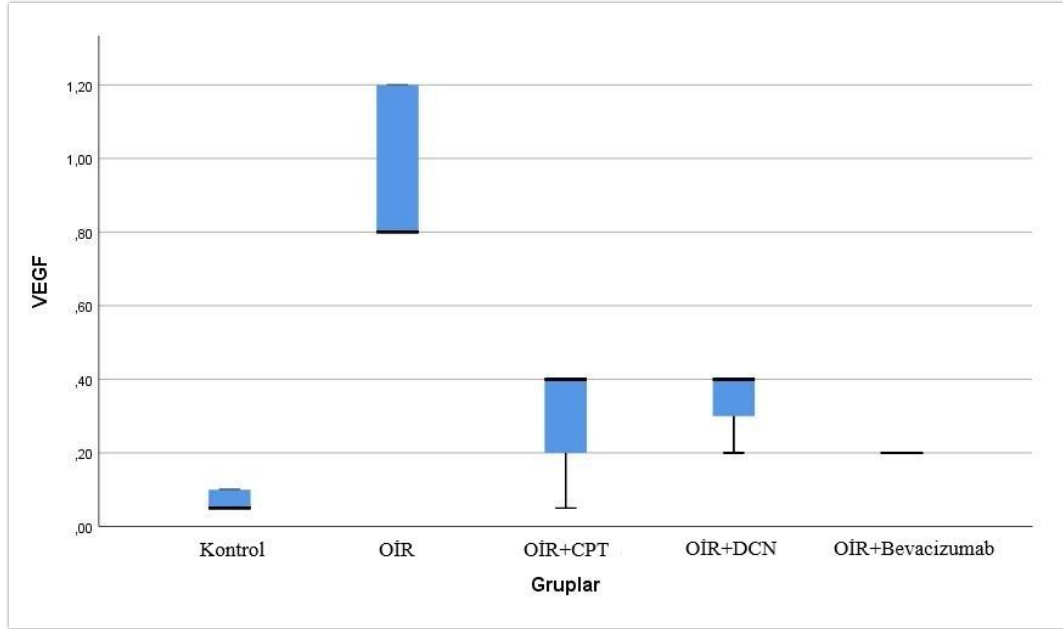
Grup C ile grup E karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,951).

Grup D ile grup E karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,449).

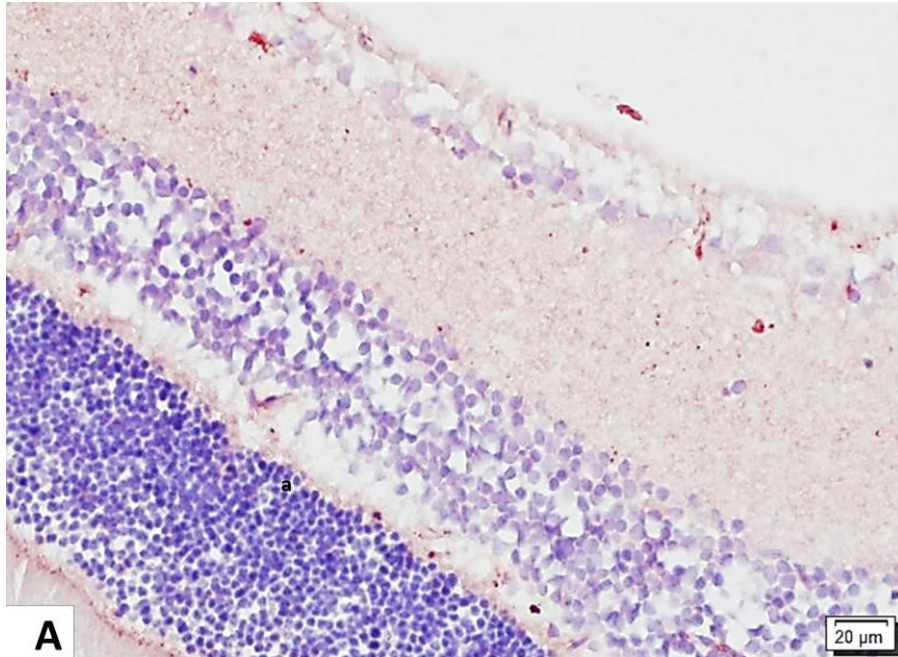
Grup A ile grup C karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,066).

Grup A ile grup E karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,264).

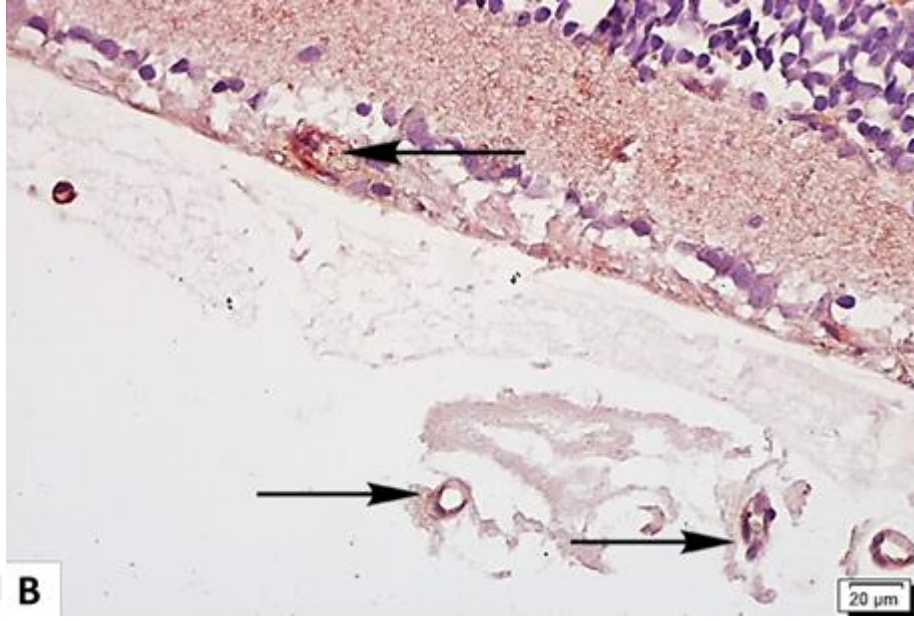
Grup C ve E’de VEGF immünreaktivitesi azalmış olmakla birlikte, grup A ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması; CPT ve bevacizumabın VEGF seviyelerini sağlıklı kontrol grubuna benzer seviyelere kadar inhibe ettiğini göstermektedir.



şekil 20. Tüm gruplarda VEGF immünreaktivitesi.

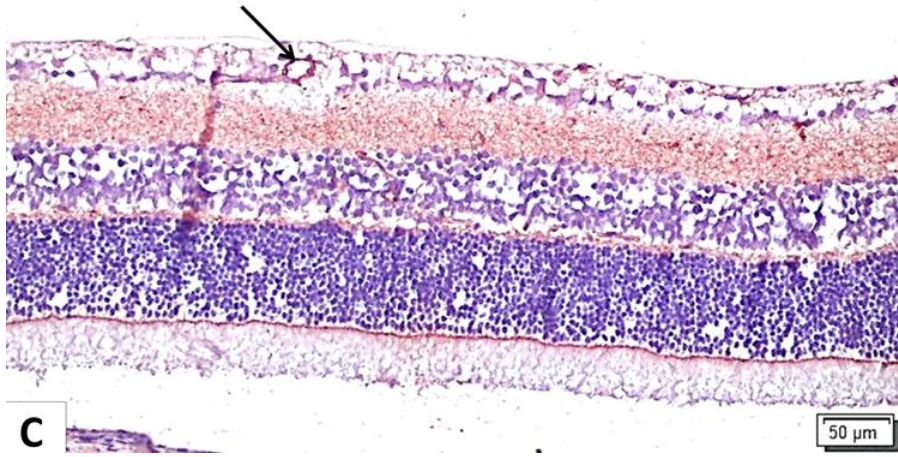


şekil 21. Grup A’ya (sağlıklı kontrol grubu) ait sağlıklı retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması; pozitif boyanma izlenmemektedir.



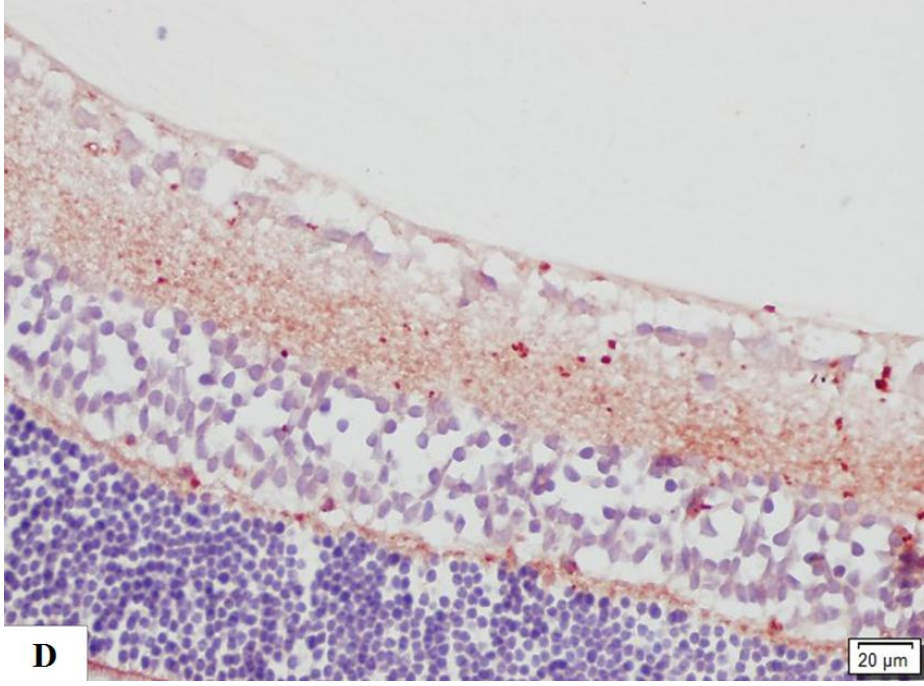
Şekil 22. Grup B'ye (sham grubu) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.

İLM'nin vitreal yüzeyinde neovasküler endotelial hücre proliferasyonu ve ganglion hücre tabasında VEGF immünreaktivitesi (siyah ok) gözlenmektedir.

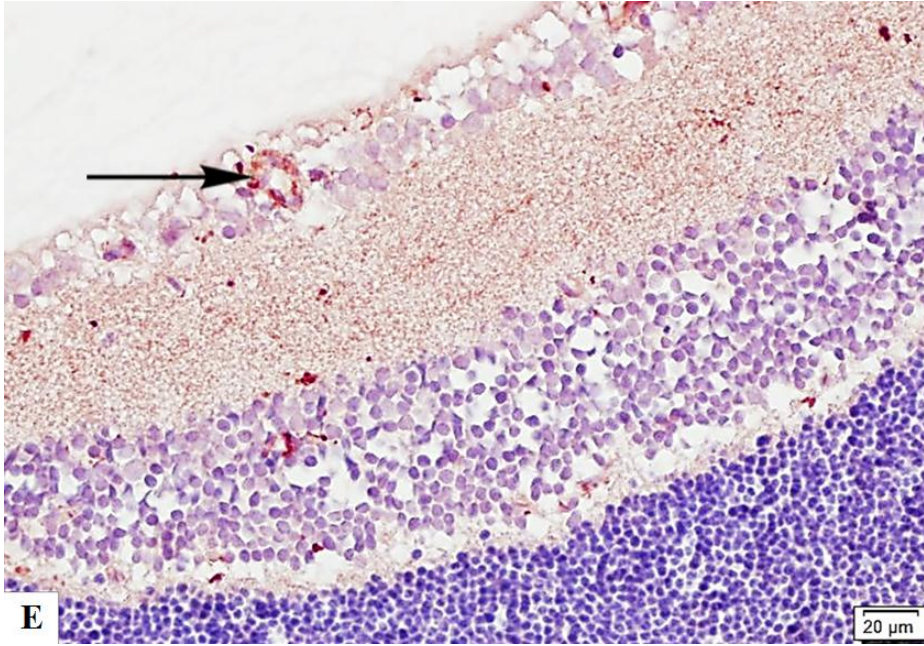


Şekil 23. Grup C'ye (OİR+CPT) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.

Ganglion hücre tabasında VEGF immünreaktivitesi (siyah ok) gözlenmektedir.



Şekil 24. Grup D'ye (OİR+DCN) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.



Şekil 25. Grup E'ye (OİR+Bevacizumab) ait retina dokusunun VEGF immünohistokimyasal boyanması.

Retinal tabakaların bevacizumab tedavisiyle normal düzenli yapısını koruduğu görülmekte, GHT'da VEGF immünreaktivitesi (siyah ok) ayırt edilmektedir.

3.4. TNF- α İmmünohistokimyasal Analizi

Tablo 8. Gruplardaki TNF- α immünreaktivitesinin ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	TNF- α immünreaktivitesi (Ort. $\pm$ SD)
Grup A (sağlıklı kontrol grubu)	0,02 $\pm$ 0,02 ^{b* c*}
Grup B (sham grubu)	1,11 $\pm$ 0,36 ^{a* c* d*e*}
Grup C (OİR+CPT)	0,38 $\pm$ 0,31 ^{b*}
Grup D (OİR+DCN)	0,37 $\pm$ 0,13 ^{b*}
Grup E (OİR+Bevacizumab)	0,62 $\pm$ 0,21 ^{a* b*}

^a Sağlıklı kontrol grubuna göre,

^b Sham grubuna göre,

^c OİR+CPT grubuna göre,

^d OİR+DCN grubuna göre,

^e OİR+Bevacizumab grubuna göre, anlamlı farklılığı göstermektedir. (* = p<0,05)

Tümör nekrozis faktör- α pozitif immün işaretlenme gösteren hücreler; şiddeti ve yaygınlığına göre değerlendirildi ve histoskorlaması ile analiz edildi. Tüm gruplarda TNF- α immünreaktivitesi sırasıyla 0,02 $\pm$ 0,02, 1,11 $\pm$ 0,36, 0,38 $\pm$ 0,31, 0,37 $\pm$ 0,13 ve 0,62 $\pm$ 0,21 idi.

Grup A ile grup B karşılaştırıldığında; grup B’de TNF- α immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (p<0,001).

Grup A ile grup E karşılaştırıldığında grup E’de TNF- α immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (p=0,001).

Grup B ile grup C, D ve E karşılaştırıldığında; grup C, D ve E’de TNF- α immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu (p<0,01).

Grup C ile grup D karşılaştırıldığında TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=1,000).

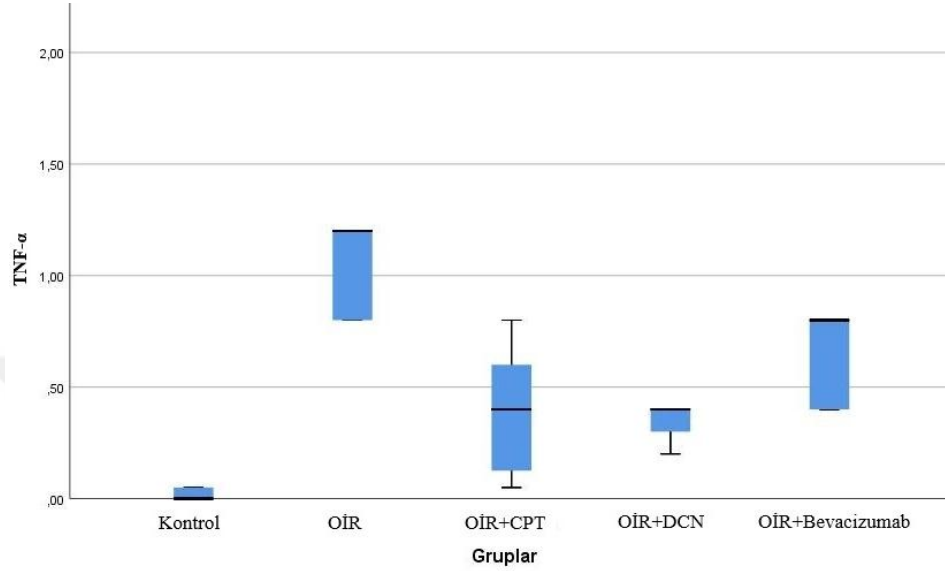
Grup C ile grup E karşılaştırıldığında TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p=0,359).

Grup D ile grup E karşılaştırıldığında TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p=0,304).

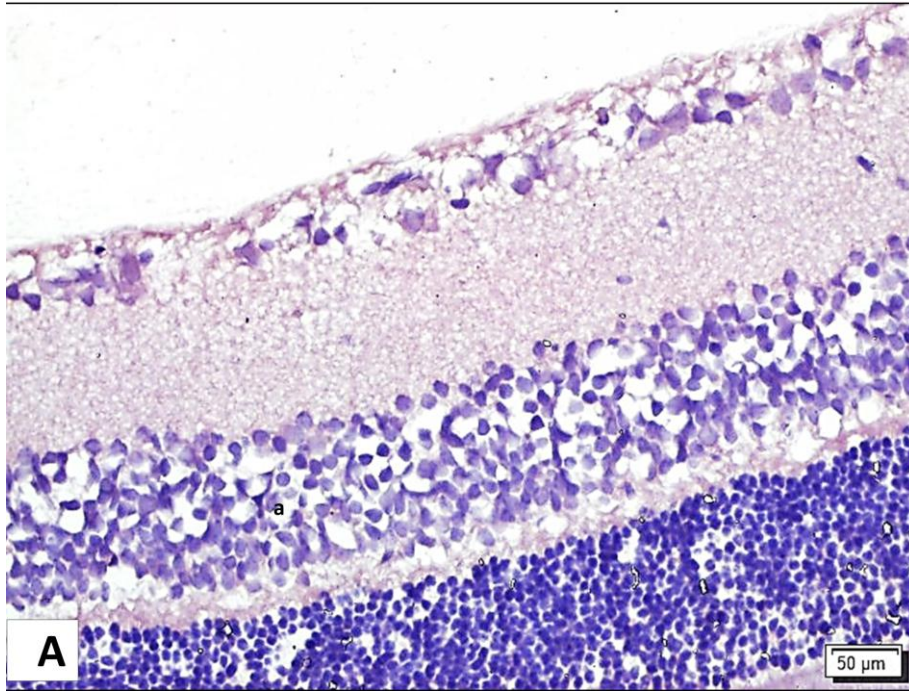
Grup A ile grup C karşılaştırıldığında TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,063).

Grup A ile grup D karşılaştırıldığında TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,080).

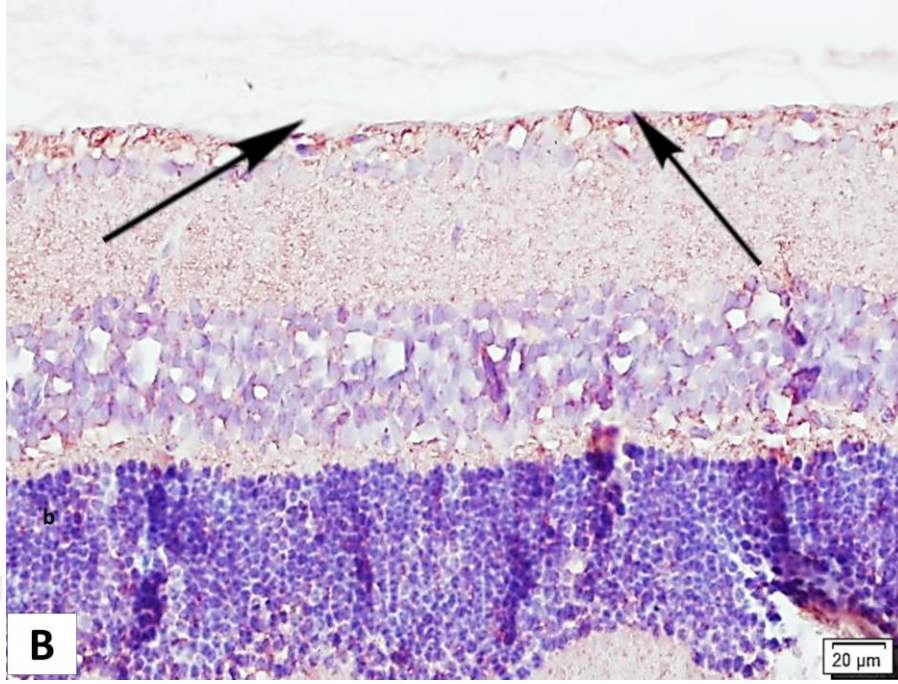
Grup C ve D’de TNF- α immünreaktivitesi azalmış olmakla birlikte, grup A ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması; CPT ve DCN’nin TNF- α seviyelerini sağlıklı kontrol grubuna benzer seviyelere kadar inhibe ettiğini göstermektedir.



şekil 26. Tüm gruplarda TNF- α immünreaktivitesi.

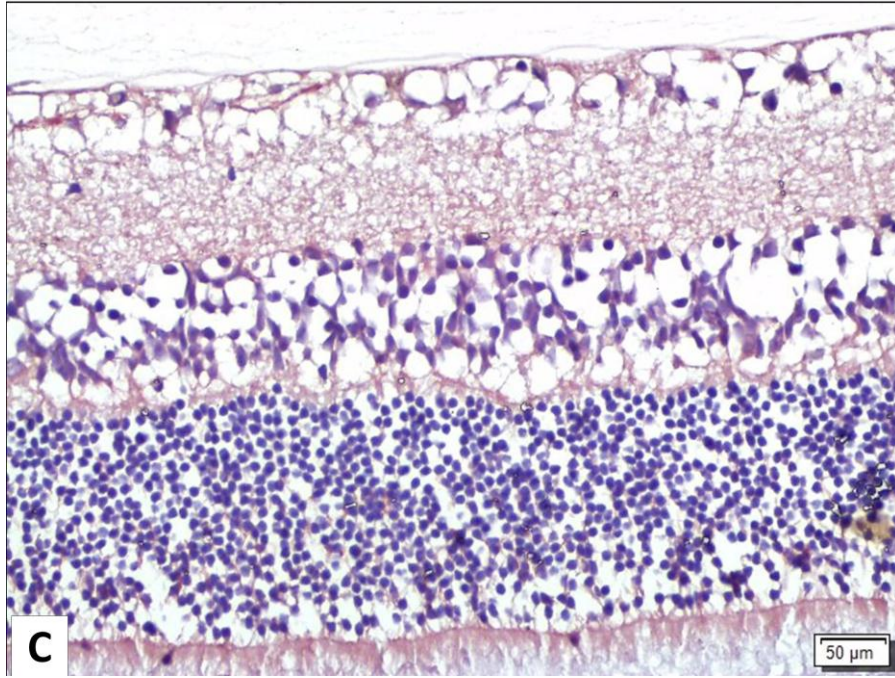


şekil 27. Grup A’ya (sağlıklı kontrol grubu) ait sağlıklı retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması; pozitif boyanma izlenmemektedir.

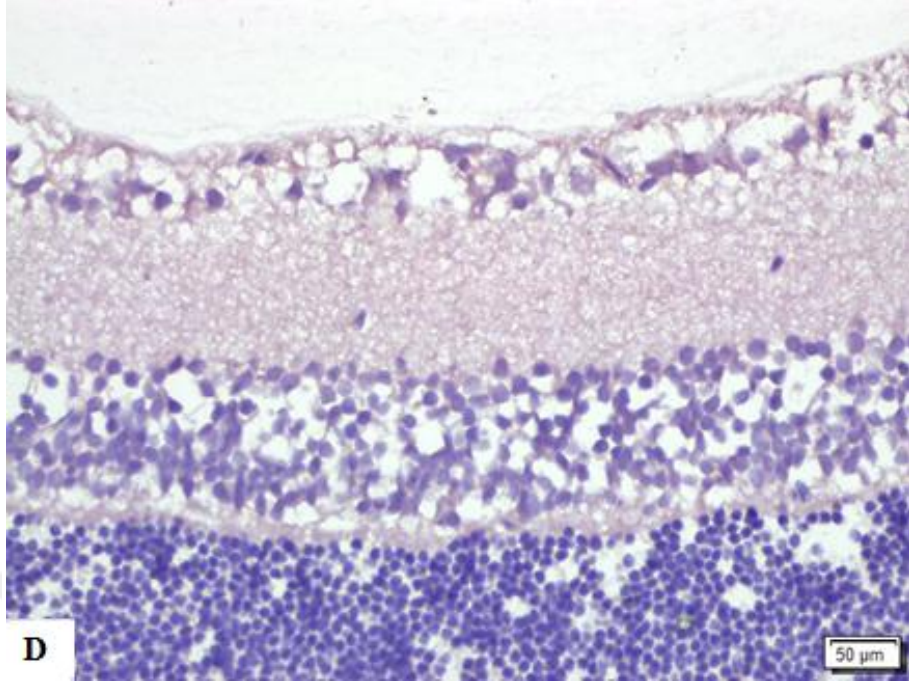


Şekil 28. Grup B'ye (OİR) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.

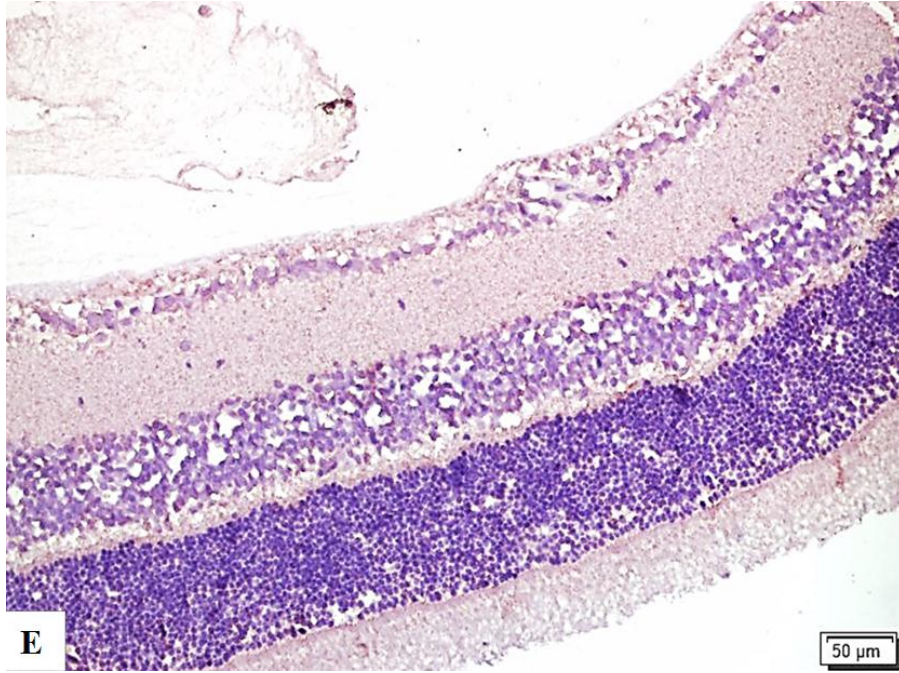
Ganglion hücre tabakasında TNF- α immünreaktivitesi (siyah ok) ayırt edilmektedir.



Şekil 29. Grup C'ye (OİR+CPT) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.



Şekil 30. Grup D'ye (OİR+DCN) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.



Şekil 31. Grup E'ye (OİR+Bevacizumab) ait retina dokusunun TNF- α immünohistokimyasal boyanması.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda OİR rat modelinde Sprague Dawley cinsi rat kullanarak ip uygulanan CPT ve DCN'nin, retinal endotelial hücre proliferasyonuna, retinal morfolojik yapıya ve VEGF ile TNF- α immünreaktivitesine olan etkisini incelendik ve daha önceki çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış olan bevacizumab uygulaması ile karşılaştırdık. Sağlıklı kontrol grubu ile sham grubu kıyaslandığında neovasküler endotelial hücre analizi, VEGF ve TNF- α histoskorları arasında anlamlı fark bulunması; OİR modelimizin uygun bir şekilde oluştuğunu göstermektedir.

Prematüre retinopatisi gelişiminde, avasküler retinadan salınan ve neovaskülarizasyonu uyaran vasoproliferatif maddeler sorumlu tutulmuştur. Önceki araştırmalar, VEGF'in ROP'daki bu vazoproliferatif süreçte önemli bir rol oynadığını göstermiştir (4). Oluşan VEGF biyoaktivasyonunun inhibisyonu, ROP tedavisinde önemli bir hedef olmuştur (236).

Bu hedefle ROP tedavisinde ilk girişim; VEGF üreten retina avasküler alanlarının ablasyonu olmuştur. İlk olarak 1980'lerde kriyoterapi kullanılmıştır. 1990'lardan bu yana kriyoterapinin yerini alan ve zamanla daha yaygın hale gelen LFK, altın standart tedavidir (237). Her ne kadar etkin ve sistemik olarak güvenilir olsa da, laser tedavisinin; anterior segment iskemisi, katarakt ve görme alanı defekti oluşturması, fotokoagülasyon sonucu retina gelişimini durdurması, miyopi gelişimi, skatrisyel komplikasyonlara neden olması ve uygulamasındaki zorluklardan ötürü oftalmologları daha uygun başka tedaviler aramaya yöneltmiştir (238).

Anti-VEGF ajanların oftalmolojiye girişi ile birlikte; diğer bir tedavi seçeneği olarak ROP tedavisinde kullanılması gündeme gelmiştir. Bu amaçla ilk kullanılan ajan olan bevacizumab ile ilgili, LFK tedavisinden üstünlüğünü vurgulayan literatürde çok sayıda çalışma vardır (239, 240). ROP tedavisinde bu kadar yaygın kullanılmasına rağmen, bevacizumabın oküler kullanımı için FDA onayı yoktur ve üretim tekniği oftalmolojide kullanıma uygun değildir. Ranibizumab ile aflibercept ise FDA onaylı ajanlardır. Ancak bu ajanlardan hiçbirinin ROP'da kullanım endikasyonu onayı yoktur.

Food and Drug Administration onayı olmasa da bevacizumab tedavisi uzun süreden beri oküler neovaskülarizasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak nöral

gelişim aşamasını henüz tamamlayamamış olan yenidoğanlarda ileri yaşlarda gelişebilecek sistemik sorunların uygulanan bevacizumab tedavisi ile ilişkilendirilmesi olasılığı medikolegal bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu gerçek ROP tedavisinde İV tedavi endikasyonu koyacak olan oftalmologlar arasında endişe ve fikir ayrılığı yaratmaktadır.

Laser fotokoagülasyon gibi periferik retinayı kalıcı hasara uğratmaması sebebiyle ROP tedavisinde İV uygulanan bevacizumabın fizyolojik retinal vaskülarizasyonun tamamlanmasını engellemediği düşünülmüştür (119, 241). Ancak Tahija ve ark. (242), İV bevacizumab enjeksiyonundan ortalama 87,5 hafta sonra RetCam fundus fluoresein anjiyografi (FFA) yaptıkları 20 gözden 11'inde periferik retinal vaskülarizasyonun tamamlanmadığını, bunlardan 9'unda ise vasküler-avasküler alan sınırında fluoresein sızıntısı görüldüğünü belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar medikolegal risklerine rağmen İV bevacizumab tedavisinin etkinliği konusunda akıllarda soru işareti bırakmaktadır.

Ayrıca yapılan çalışmalarda, İV anti-VEGF tedavisi uygulanan olgularda, ilacın sistemik dolaşıma geçtiği gösterilmiş olup, bu durumun dolaşımdaki VEGF düzeyinde düşüklüğe neden olabileceği ve ilacın potansiyel yan etkilere sebep olabileceği vurgulanmıştır (243). Metastatik kolon ve renal hücreli karsinomda kullanılan bevacizumabın, hipertansiyon ve vasküler patolojiler dahil olmak üzere birçok ciddi etki ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (244). Bununla birlikte, hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalar VEGF-A'nın sadece vaskülarizasyonda değil nöronlar ve epitel hücrelerinde de kritik homeostatik ve trofik fonksiyonunu belgelemiştir (245, 246). Sistemik dolaşıma geçen anti-VEGF ilaç, nöral gelişim aşamasını henüz tamamlayamamış olan prematüre bünyede, potansiyel olumsuz etkiler oluşabileceği kuşku yaratmaktadır. Bu kuşku VEGF'in trofik etkilerinin (akciğer, böbrek maturasyonu ve karaciğer rejenerasyonu, kemiklerde kırık iyileşmesinde angiogenetik ve osteogenik etki, nöromotor yapıların gelişimindeki etkisi) inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır (247). Ayrıca; LFK tedavisi ve mevcut intraoküler inflamasyon kan-retina bariyerini bozduğu için, İV bevacizumab tedavisi sonrası sistemik absorpsiyon oranları da artmaktadır. Bununla birlikte ROP genellikle bilateral seyreden bir hastalık olduğundan bevacizumab her iki göze uygulandığında sistemik VEGF blokaj riski ikiye katlanmaktadır.

Sistemik yan etkileri konusunda yaygın tartışmalar bulunması araştırmacıları sistemik riskleri en aza indirmek için en düşük bevacizumab dozunu bulmaya yönlendirmiştir. Düşük doz anti-VEGF ilaç uygulama; intraoküler toksisite, sistemik absorpsiyon ve olabilecek yan etkiler açısından avantajlı olsa da, düşük doz uygulamanın yetersiz kalabilmesi, rekürrens oranının artması, ilaç dilüsyonunda olabilecek yanlışlıklar ve kontaminasyon riskleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Yüksek dozun sistemik yan etki riski, düşük dozun rekürrens riski nedeniyle ROP'da uygulanacak anti-VEGF dozunun ayarlanması konusu oftalmologlar arasında tartışmalıdır. Literatürde bevacizumab ile tedavi edilmiş ancak 2-3 yaşlarında reaktivasyon bildirilmiş olgular mevcuttur (248). Reaktivasyon riski nedeniyle ROP nedeniyle anti-VEGF tedavi almış olan infantların periferik retinal vaskülarizasyonları tamamlanana kadar yakın takiplerinin yapılması gerekmektedir. Bu uzun ve sık takip süreleri hem aile açısından hem de maliyet açısından sorun yaratmaktadır. Ayrıca rekürrens görülmesi durumunda anti-VEGF ilacın tekrar uygulanması yüksek ilaç maliyeti nedeniyle sorunlar yaratmaktadır.

Çalışmalarda IV anti-VEGF enjeksiyonu sonrası gelişen oküler komplikasyonlar da bildirilmiştir;

- Fibrovasküler kontraksiyonda artış sonucu (özellikle evre-4a ve 4b'de membran kontraksiyonu ile) traksyonel RD'ye ilerleme (249, 250),
- Koroid rüptürü (251),
- İntraoküler hemoraji, retinal hemoraji ve vasküler kılıflanma (252),
- Endoftalmi.

Bahsettiğimiz bildirilen komplikasyonların ciddiyeti, ilacın sistemik ve oküler yan etkileri ile medikolegal riskleri düşünüldüğünde, günümüzde kullanılan anti-VEGF ilaçların hastalığın mevcut seyrinden daha az yıkıcı olup olmayacağı sorusu akıllara gelmektedir. Ancak prematüre bebekler için körlük riski taşıyan bu retinopatinin seyrinde görülen patolojik anjiogenezi; önleyecek, durduracak veya geciktirecek alternatif tedaviler geliştirmek acil ve önemlidir. İdeal bir tedavi protokolünde; retinal alanlar korunmalı, patolojik vazoproliferatif süreç önlenmeli, fizyolojik retinal vaskülarizasyon bozulmamalı, rekürrensler görülmemeli, yan etki profili düşük ve tedavinin maliyeti uygun olmalıdır.

Alternatif tedavi olarak doku hasarını en aza indirgeyerek, patolojik neovaskülarizasyonu engelleme amacına yönelik olarak vasküler endotel hücre üzerine etkili anjiogenik maddeleri hedef alan ilaçlar denenmektedir. Bunlardan en önemlileri VEGF blokajı yapan ilaçlardır.

Literatürde, daha önce çeşitli çalışmalarda CPT'nin antianjiogenik özellikleri olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir, ancak patolojik oküler neovaskülarizasyon modellerinde daha önce hiç çalışılmamıştır.

Literatürde daha çok tümör hücre kültürü çalışmalarında gösterilen CPT'nin tümör anjiogenezi baskılayıcı etkisi; VEGF inhibisyonu sayesinde gerçekleşmektedir. Yapılan bir çalışmada CPT'nin, osteosarkom hücre kültüründe, VEGF mRNA ve protein seviyeleri üzerindeki etkisini değerlendirebilmek için kantitatif PCR analizi yapılmış ve CPT'nin VEGF seviyesini doza bağlı bir şekilde azalttığı ve anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (253). Zhang ve ark. (254)'nin kolorektal kanser hücre kültüründe yaptıkları çalışmada CPT'nin PI3K, Akt, rapamisin'inin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağını ve HIF-1 α nükleer translokasyonunu inhibe ederek tümör anjiogenezi baskıladığı böylece kolon kanserinin büyümesini ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda sham grubu ile OİR+CPT grubu karşılaştırıldığında; OİR+CPT grubunda neovasküler endotel hücre analizinde endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Ancak OİR+CPT grubu ile OİR+bevacizumab grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde CPT'nin neovasküler endotel hücreler üzerindeki antianjiogenik etkisinin bevacizumab ile benzer olduğu saptandı. Ek olarak sham grubuna göre, OİR+CPT grubunda VEGF immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Bu sonuçlardan yola çıkarak CPT'nin antianjiogenik etkisinin; literatürdeki çalışmaların çoğunda gösterildiği gibi (155, 255, 256), iskemik retinadaki VEGF'in transkripsiyonel aktivatörü olan PI3K/Akt yolağının fosforilasyonunun inhibisyonu neticesinde, VEGF seviyelerini azaltmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Bununla birlikte OİR+CPT grubu ile OİR+bevacizumab grubu kıyaslandığında, iki grup arasında VEGF immünreaktivitesi açısından anlamlı fark olmaması; bize CPT ile bevacizumabın VEGF inhibisyonu üzerindeki etkilerinin benzer olduğunu düşündürdü. Bu iki grup, grup A (sağlıklı

kontrol grubu) ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulunmaması ve grup A'da VEGF immünreaktivitesinin düşük olması; CPT ve bevacizumabın VEGF'i sağlıklı kontrol grubuna benzer seviyelere kadar inhibe ettiğini göstermektedir.

Literatür incelendiğinde CPT'nin antianjiogenik etkisi haricinde antiinflamatuvar etkisi de görülmüştür. Yapılan bir çalışmada böbrekte oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarı modelinde CPT; MAPK ve NF- κ B sinyalinin aktivasyonunu engelleyerek sağladığı antiapoptotik ve antiinflamatuvar etki sayesinde renal iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu olarak rol oynamıştır (257). Feng ve ark. (258)'nın farelerde osteoartrit modelinde yaptığı çalışmada ise CPT'nin, NF- κ B ve MAPK aktivasyonunu baskılayarak IL-1 β 'in neden olduğu inflamasyonu baskıladığı bildirilmiştir. Kronik sinir hasarına bağlı oluşturulan nöropatik ağrı rat modelinde, PI3K/Akt sinyal yolağının artmış fosforilasyonuna bağlı tetiklenen; IL-6, IL-1 ve TNF- α ekspresyonlarındaki artışın oral CPT tedavisi ile baskılandığı ve inflamasyonunun önlendiği gösterilmiştir (259). Astım modeli üzerinde yapılan çalışmalarda da CPT'nin NF- κ B sinyal hedefi üzerinden sağladığı antiinflamatuvar etki sayesinde hava yolu inflamasyonunun baskılandığı görülmüştür (260, 261). Ayrıca CPT, HUVEC'de NF- κ B sinyal yolu ve ERK aktivasyonunun inhibe ederek; TNF- α kaynaklı serbest oksijen radikallerinin oluşumunu doza bağımlı bir şekilde inhibe etmiştir (262).

Özetleyecek olursak; CPT'nin antianjiogenik etkisinin literatürdeki çalışmalar ışığında, başta PI3K/Akt yolağının baskılanması olmak üzere; VEGF salınımını etkileyen sinyal yolları aracılığıyla, antiinflamatuvar etkisinin ise NF- κ B sinyal yolunun baskılanması ile başta TNF- α olmak üzere; inflamatuvar mediatörlerin seviyesini azaltmasına bağlı ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

Mevcut çalışmada TNF- α immünreaktivitesi verilerine baktığımızda; sağlıklı kontrol grubu ile OİR+CPT grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmedi, bununla birlikte sham grubu ile OİR+CPT grubu kıyaslandığında OİR+CPT grubunda, TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu. Elde edilen veriler CPT'nin, sham grubunda artmış olan TNF- α seviyelerini, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılabilir düzeyde baskıladığını göstermiştir. Bu sonuç bize CPT'nin terapötik etkisinin; yalnızca antianjiogenik özelliğinden değil, aynı zamanda antiinflamatuvar etkisiyle de ilgili olduğunu düşündürdü.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar CPT'nin ROP tedavisinde hem antianjiogenik hem de antiinflamatuvar etki mekanizmaları üzerinden çift yönlü rol oynadığını göstermiştir.

İn vivo bir çalışmada, DCN'nin aşırı ekspresyonunun, endojen VEGF üretimini inhibe ederek, tümör hücrelerinde anjiogenezi baskıladığı gösterilince (263), bu ajanın neovaskülarizasyonla seyreden oküler hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği fikri doğmuştur.

Lee ve ark. (264)'nın OİR rat modelinde yaptıkları çalışmada, retinada PCR analizi sonucu; başta VEGF, entactin, tübülün $\beta 5$, fibrillin-1, spectrin $\beta 2$ olmak üzere 10 adet gen ekspresyonunda artış, miyelinle ilişkili oligodendrositik bazik protein, ısı şok proteini ve DCN gen ekspresyonlarında ise azalma gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada Park ve ark. (265) OİR rat modelinde, retinada GHT ve İLM'de azalmış DCN seviyesinin, İV uygulanan triamsinolon tedavisi ile önlenebileceğini göstermişlerdir. Bu iki çalışmadan yola çıkarak; triamsinolonun DCN seviyesini arttırması ile OİR modeli oluşturulan ratlarda iyileşme sağlanması ve OİR modelinde azalmış DCN gen seviyelerinin hastalığın progresyonunu arttırması; OİR'de görülen patolojik RNV'nin tedavisinde DCN'nin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Literatür incelendiğinde; DCN'nin bu etkiyi antianjiogenik etki mekanizmaları üzerinden gerçekleştirebileceğini düşündürecek patolojik oküler neovaskülarizasyon modelleri de dahil olmak üzere in vitro ve in vivo çalışmalara rastlanmaktadır.

Bugüne kadar oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde birçok antianjiogenik ajan öne sürülmüştür. Ancak bunların en önemli eksikliği, patogeneizde rol oynayan birden fazla anjiogenik faktörden sadece birini hedeflenmesidir. Yapılan bir çalışmada, DCN'nin, VEGFR-2 için antagonist bir ligand olduğu ve sadece hipoksi ile indüklenen endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunu baskılamakla kalmayıp aynı zamanda VEGFR-2 reseptörleri üzerine spesifik antagonist etkisi ile de anjiogenezi baskılayacağı düşünülmüştür (266). DCN'nin birden fazla mekanizma ile VEGF reseptörlerini baskılaması; anjiogenezin yol açtığı patolojik durumlarda, alternatif tedavi stratejileri geliştirilmesi için potansiyel bir temel sağlar. Bu temelde DCN'nin multikinaz bir inhibitör olması yatmaktadır (267). Multikinaz inhibitörleri, çoklu büyüme faktörlerinin hücrel etkisini önleyen yeni bir antianjiogenik tedavi sınıfıdır.

Hipoksik RPE hücrelerinde DCN aşırı ekspresyonunun; koroidal neovaskülarizasyon üzerine etkisini incelemek için yaptıkları, in vitro ARPE-19 hücre kültürü çalışmasında, çoklu tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan DCN'nin antianjiogenik etkinliği gösterilmiştir (268). Aynı çalışmada DCN'nin bu etkiyi; Met sinyal yolağı aktivasyonunu baskılayarak, hipoksiye cevaben artmış olan Rac1 ve HIF-1 α ekspresyonunu inhibe edip, VEGF seviyesini azaltarak yaptığı gösterilmiştir (268). Her ne kadar koroidal NV'nin altında yatan patogeneze tam olarak açıklanmamış olsa da; artan deneysel ve klinik çalışmalar bu çok faktörlü sürecin, VEGF haricinde inflamatuvar hücreler ve sitokin ağları dahil olmak üzere çoklu moleküller içerdiğini ortaya koymuştur. Önceki çalışmalarda koroidal NV modelinde, birden fazla faktöre aynı anda müdahale eden moleküllerin, tekli hedef ajanlardan daha etkili olduğu gösterilmiştir (269). Koroidal NV ve ROP'da görülen RNV'nin benzer mekanizmalarla oluştuğu düşünülerek; ROP tedavisinde anjiogeneze aşamasında farklı sinyal yollarını bloke eden çoklu tirozin kinaz inhibitörü olan DCN'nin etkili olabileceği ön görüldü.

Nitekim bulgularımız DCN'nin neovasküler endotelial hücreler üzerinde antianjiogenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda sham grubu ile OİR+DCN grubu karşılaştırıldığında; OİR+DCN grubunda neovasküler endotelial hücre analizinde endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Ancak OİR+DCN grubu ile OİR+bevacizumab grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde DCN'nin neovasküler endotelial hücreler üzerindeki antianjiogenik etkisinin bevacizumab ile benzer olduğu düşünüldü. Ek olarak sham grubuna göre, OİR+DCN grubunda VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü. Bu sonuçlardan yola çıkarak DCN'nin antianjiogenik etkisinin; birden fazla mekanizma üzerinden VEGF reseptörlerini baskılamasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Bununla birlikte OİR+DCN grubu ile OİR+bevacizumab grubu kıyaslandığında, iki grup arasında VEGF immünreaktivitesi açısından anlamlı fark olmaması; DCN ile bevacizumabın VEGF inhibisyonu ve RNV üzerindeki etkilerinin karşılaştırılabilir olduğunu düşündürdü.

Decorinin oftalmoloji literatüründe yer alan çalışmalarda antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkilerinden de bahsedilmektedir. Yapılan bir çalışmada

yüksek glukoz ve hipoksiye maruz bırakılan ARPE-19 hücrelerindeki kan-retina bariyer fonksiyonundaki bozulmanın, p38 MAPK aktivasyonunun baskılanmasını sağlayan DCN ile önlendiği gösterilmiştir (270). Bu sayede DCN; diyabetik maküler ödem ve vasküler geçirgenlik artışını azalttığı ve dış retinal bariyerdeki bozulmayı önemli ölçüde engellediği için yeni bir terapötik strateji olanağı sunmaktadır Aynı zamanda p38 MAPK; proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve reaktif oksijen radikalleri gibi çeşitli hücre proteinler ve sitokinler tarafından aktive edilen başlıca MAPK yollarından biridir (271). Yapılan bir çalışmada, DCN çekirdek proteininin, p38 MAPK yolu ile ilişkili olan TLR gibi reseptörlerin aktivasyonunu inhibe ederek inflamasyonu baskılayabileceğinden bahsedilmektedir (272).

Literatürde OİR fare modelinde TGF- β 1 ve Smad-4 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (273). Çalışmalarda uygulanan DCN'nin, TGF- β ligandına bağlanıp inaktif hale getirmesiyle; TGF- β /Smad yolağındaki sinyal iletimini bozarak, fibrozisi ve ECM proteinlerinin üretimini azalttığı öne sürülmektedir (210). Bu özelliği sayesinde ROP'un ileri evrelerinde görülen fibrovasküler süreçte terapötik etkinliğinin olabileceğini, ancak bu konunun yapılacak daha fazla in vivo araştırmayı hak ettiğini düşünmekteyiz.

Zhang ve ark. (274) koroidal NV oluşumunu takiben meydana gelen retinadaki yüksek VEGF ve TNF- α seviyelerinin, TGF- β /Smad sinyal yolunun aktivasyonu sonucu meydana geldiğini göstermişlerdir. Son zamanlarda IL-1 ve IL-6, TNF- α ve TGF- β gibi bazı inflamatuvar sitokinlerin koroidal NV üzerinde bir etkisi olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır (202, 274). TGF- β 'nin NV üzerindeki muhtemel etkisi; RPE tarafından aşırı VEGF ekspresyonunu uyarmasının yanı sıra TNF- α birikimini uyarması ile de açıklanmaktadır. Wang ve ark. (275), laser ile indüklenmiş koroidal NV fare modelinde, uygulanan DCN tedavisinin; Smad2-3 fosforilasyonu sonucu artan VEGF ve TNF- α protein ekspresyonunu inhibe ederek antianjiogenik etkisini göstermişlerdir. Çalışmada İV olarak verilen DCN'nin, TGF- β /Smad sinyal yolağı üzerinden VEGF inhibisyonu yoluyla NV gelişimini baskıladığı gösterilmiş olup aynı mekanizma ile TNF- α seviyelerini de baskılaması bize DCN'nin ROP'da meydana gelen inflamasyonu da baskılayabileceğini düşündürmüştür.

Ayrıca OİR hayvan modellerinde, TNF- α inhibitörlerinin fizyolojik anjiogenezi düzelttiği ve anormal vaskülarizasyonu azalttığı da gösterilmiştir (276).

Kociok ve ark. (277), TNF- α reseptörlerinden olan; TNF-Rp55'in yok edildiği; (TNF-Rp55-/-) transgenik OİR modeli oluşturulan farelerde yaptıkları bir çalışmada hem anormal vaskülarizasyonda hem de VEGF ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. Böylece TNF- α 'nın proanjiojenik olduğunu ve VEGF'i, TNF-Rp55'e bağlı bir yolda eksprese ettiğini saptamışlardır. Farklı bir çalışmada TNF- α 'nın, 'makrofaj migrasyon inhibitör faktör' salınımını regüle ederken; VEGF, FGF ve TGF üretimini de artırarak neovaskülarizasyonu arttırdığı bildirilmiştir (278). Yani DCN; tirozin kinaz reseptörlerinin inhibisyonuyla VEGF seviyelerini baskıladığı gibi, TNF- α inhibitörü özelliği ile de hem inflamasyonu hem de VEGF seviyelerini baskılamaktadır. Böylece DCN hem VEGF üzerinden hem de inflamasyonla ilişkili anjiyogenez üzerinden çift etki ederek antianjiyogenik rol oynamaktadır.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular, bahsettiğimiz daha önce yapılmış çalışmaları destekler niteliktedir. Elde ettiğimiz TNF- α immünreaktivitesi verilerine bakıldığında; sağlıklı kontrol grubu ile OİR+DCN grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilemedi, bununla birlikte sham grubu ile OİR+DCN grubu kıyaslandığında OİR+DCN grubunda, TNF- α immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu. Elde edilen veriler DCN'nin, sham grubunda artmış olan TNF- α seviyelerini, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılabilir düzeyde baskıladığını göstermiştir. Bu sonuç DCN'nin mevcut çalışmadaki terapötik etkisinin yalnızca antianjiyogenik özelliğinden değil, aynı zamanda antiinflamatuvar etkisiyle de ilgili olduğunu düşündürdü.

Cryptotanshinone ve DCN'nin ip olarak uygulanması çalışmamızın eksikliğini oluşturmaktadır. Ancak ümit verici sonuçlar elde etmiş olmamız nedeniyle daha sonraki deneysel çalışmalarda İV uygulama yapılarak bu sonuçlar desteklenmelidir. Ayrıca OİR modelinde uyguladığımız ilaçların ultrastrüktürel incelemede mitokondriler üzerine koruyucu etkileri olup olmadığı ve TUNEL çalışmasında apoptozisi azaltıp azaltmadığı ileriye yönelik yapılacak çalışmalarla tespit edilebilir.

Çalışmamızda retinal morfolojik analizde uyguladığımız ajanların hücresel bazda toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ek olarak; CPT veya DCN'nin yaptıkları VEGF inhibisyonunun devam eden fizyolojik retinal vasküler gelişimi olumsuz etkileyip/etkilemediği, serum VEGF seviyelerini ne yönde etkilediği ve sistemik yan etkileri ileri çalışmalarla araştırılmalıdır.

Çalışmamız OİR modeli oluşturulmuş ratlarda CPT veya DCN tedavisinin etkinliğinin araştırıldığı ilk deneysel çalışma niteliğindedir. Literatürde henüz yeterli sayıda oküler veya intravitreal CPT veya DCN uygulaması ile in vivo ve/veya in vitro çalışmalar mevcut değildir. Çalışmamızda uyguladığımız ip ilaç dozlarını daha önceki farklı deneysel çalışmalarda kullanıldığı gibi (bkz. 2.2.) uyguladık. Ancak ratlarda OİR modelinde İV uygulanacak etkin doz ve yan etki profili analizi için; prospektif farmakokinetiğe yönelik çalışmalar ile dozların incelenmesi gerekmektedir.

Prematüre retinopatisinde yaygın olarak kullanılan LFK ve intravitreal bevacizumab tedavisinin sınırlı etki ve nadirde olsa görülen yan etkileri nedeni; CPT veya DCN'nin ROP tedavisinde geleneksel yöntemlere alternatif bir antianjiogenik ve antiinflamatuvar tedavi olanağı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Yenidoğan bakımındaki gelişmelere paralel olarak GY ve DA çok daha düşük prematüre bebeklerin yaşama şanslarının artması ROP'un daha sık bir sorun olarak karşımıza çıkmasına neden olmaktadır. Görme kaybının başlıca nedenlerinden olan RNV'da yeni tedavi yöntemlerini araştırmak ve bebeklerin gelişimsel sürecine katkıda bulunup, yaşam kalitesini artırmak amaçlı yaptığımız çalışmada CPT veya DCN'nin etkilerinin, bevacizumaba benzer olduğunu gördük; bu sonuç bize CPT veya DCN'in ROP'un tedavisinde yeni bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Lee P, Wang CC, Adamis AP: Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43(3): 245-269.
2. Asano MK, Dray PB. Retinopathy of prematurity. *Dis Mon* 2014; 60(6): 282-291.
3. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmol* 2009; 116(11): 2165-2169.
4. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 445-450.
5. Grisanti S, Tatar O. The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27: 372-390.
6. Chan-Ling T, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(7): 1201-1214.
7. Songyi S, Wonhee S. Antiangiogenic effect of dasatinib in murine models of oxygen-induced retinopathy and laser-induced choroidal neovascularization. *Molecular Vision* 2017; 23: 823-831
8. Schlingemann RO. Witmer AN. Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Prog Brain Res* 2009; 175: 253-267.
9. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 2005; 438: 960-966.
10. Yu XY, Lin SG, Chen X, Zhou ZW, Liang J, Duan W, et al. Transport of cryptotanshinone, a major active triterpenoid in *Salvia miltiorrhiza* Bunge

widely used in the treatment of stroke and Alzheimer's disease, across the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab* 2007; 8(4): 365-378.

11. Xiaoming X, Li W, Xinbin Z, Nanyang Z, Qin Z, Jinxiu Y, et al. Cryptotanshinone inhibits VEGF-induced angiogenesis by targeting the VEGFR2 signaling pathway. *Ymve* 2016; 24: 146-152.
12. Järvinen TA, Prince S. Decorin: a growth factor antagonist for tumor growth. *Inhibition Biomed Res Int* 2015; 765: 1-15.
13. Neena L, Gannareddy VG, Alia CB, Peeyush KL. Mechanisms in decorin regulation of vascular endothelial growth factor-induced human trophoblast migration and acquisition of endothelial phenotype; *Biology Reproduct* 2012; 87(3): 59.
14. Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, Hasegawa T, Luttly GA. Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(6): 2020-2032.
15. McLeod DS, Hasegawa T, Prow T, Merges C, Luttly G. The initial fetal human retinal vasculature develops by vasculogenesis. *Dev Dyn* 2006; 235(12): 3336-3347.
16. Hussein MA, Coats DK, Khan H, Paysse EA, Steinkuller PG, Kong L, O'Brian SE. Evaluating the association of autonomic drug use to the development and severity of retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 2014; 18: 332-337.
17. Paysse, EA. Retinopathy of Prematurity. Garcia-Prats JA, Saunders RA (Eds), UpToDate, Waltham, MA, 2014.
18. Siemerink MJ, Augustin AJ, Schlingemann RO: Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators. *Dev Ophthalmol* 2010; 46: 4-20.
19. Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. Vaskularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1217-1228.

20. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.
21. Slomiany MG, Rosenzweig SA. IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 alpha expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(8): 2838-2847.
22. Bai Y, Ma JX, Guo J. Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J Pathol* 2009; 219: 446–454.
23. Jiang Y, Wang H, Culp D. Targeting Muller cell-derived VEGF164 to reduce IV neovascularization in the rat model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 824–831.
24. Rivera JC, Sapienza P, Joyal JS. Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis. *Neonatology* 2011; 100: 343–353.
25. Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18(6): 502-508.
26. Rezzola S, Belleri M, Gariano G, Ribatti D, Costagliola C, Semeraro F, Presta M. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis* 2014; 17(3): 429-442.
27. Mechoulam H, Pierce EA: Retinopathy of prematurity: molecular pathology and therapeutic strategies. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3(4): 261-277.
28. Chen J, Stahl A, Hellstrom A, Smith LE. Current update on retinopathy of prematurity: screening and treatment. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23(2): 173-178.
29. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Munoz B, Friedman DS, et al. Eye Diseases prevalence research G: causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4): 477-485.

30. Klein BE. Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic Epidemiol* 2007; 14(4): 179-183.
31. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, et al. Eye diseases prevalence research G: prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4): 564-572.
32. Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, Vogels IM, Goldschmeding R, Van Noorden CJ, et al. Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(9): 4267-4276.
33. Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA, de Smet MD, van Meurs JC, Tanck MW, Oliver N, et al. The angio-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 2008; 3(7): e2675.
34. Campochiaro PA, Aiello LP, Rosenfeld PJ. Anti-vascular endothelial growth factor agents in the treatment of retinal disease: from bench to bedside. *Ophthalmology* 2016; 123(10): 78-88.
35. Wang X, Wang G, Wang Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1a in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2009; 148: 883–889.
36. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 905–909.
37. Gao G, Li Y, Zhang D, Gee S, Crosson C, Ma J. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 2001; 489: 270–276.
38. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 1–12.

39. Penn JS, Henry MM, Tolman BL. Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat. *Pediatr Res* 1994; 36: 724–731.
40. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1(10): 1024-1028.
41. Pierce EA, Foley ED, Smith LE, Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996; 114(10): 1219-1228.
42. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, 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* 1995; 92(23): 10457-10461.
43. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(1): 182-189.
44. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7(5): 575-583.
45. Seo MS, Okamoto N, Viores MA, Viores SA, Hackett SF, Yamada H, et al. Photoreceptor- specific expression of platelet-derived growth factor-B results in traction retinal detachment. *Am J Pathol* 2000; 157(3): 995-1005.
46. Mori K, Gehlbach P, Ando A, Dyer G, Lipinsky E, Chaudhry AG, et al. Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(6): 2001-2006.

47. Lima SR, Shen J, Hackett SF, Kachi S, Akiyama H, Kiuchi K, et al. The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. *FASEB J* 2007; 21(12): 3219-3230.
48. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22(1): 1-29.
49. Del Monte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37: 588-598.
50. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 242-249.
51. Ehlers JP, Sporn MJ, Lam A, Sivalingam A, Samuel MA, Tasman W. Combination IV bevacizumab/panretinal photocoagulation versus panretinal photocoagulation alone in the treatment of neovascular glaucoma. *Retina* 2008; 28(5): 696-702.
52. Yazdani S, Hendi K, Pakravan M. IV bevacizumab (Avastin) injection for neovascular glaucoma. *J Glaucoma* 2007; 16(5): 437-439.
53. Bayraktar MZ, Ergin MM, Or M, Subaşı M, Menteş J, Ozkan SS, et al. Diyabetik makulopati ve tedavisi. Ozkan Ş, Akar S (ed). *Diyabetik Retinopati İstanbul: Dilek Ofset* 2000: 23-36.
54. Allen C, Clermont MS, Lloyd LP. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for VEGF in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 433-446.
55. Starita C, Hussain AA, Patmore A. Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 762-767.

56. Schubert HD, Atebara NH, Kaiser RS. Retinopathy of Prematurity. Cantor LB, Rapuano JC, Ga C (eds). American Academy of Ophthalmology (AAO) Basic and clinical science course (BCSC) Section 12: Retina and Vitreous 2014: 157-170.
57. Gilbert C, Foster A. Childhood blindness in the context of VISION 2020- the right to sight. Bull World Health Organ 2001; 79(3): 227-232.
58. Terry TL. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. Am J Ophthalmol 1942; 25: 203-204.
59. Campbell K. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia; a clinical approach. Med J Aust 1951; 2(2): 48-50.
60. Hatfield EM. Blindness in infants and young children. Sight Sav Rev Summer 1972; 42(2): 69-89.
61. Gibson DL, Sheps SB, Schechter MT, Wiggins S, McCormick AQ. Retinopathy of prematurity: a new epidemic. Pediatrics 1989; 83(4): 486-492.
62. Gilbert C, Rahi J, Eckstein M, O'Sullivan J, Foster A. Retinopathy of prematurity in middle-income countries. Lancet 1997; 350(9070): 12-14.
63. Askin DF, Diehl-Jones W. Retinopathy of Prematurity. Crit Care Nurs Clin North Am 2009; 21(2): 213-233.
64. Fielder AR, Shaw DE, Robinson J, Ng YK. Natural history of retinopathy of prematurity: a prospective study. Eye (Lond) 1992; 6: 233-242.
65. Palmer EA. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Ophthalmol 1991; 98(11): 1628-1640.
66. Good WV ETROP Cooperative Group. Final results of the ETROP randomized trial. Trans Am Ophthalmol Soc 2004; 102: 233-248.

67. Zenaida Soriano R, Sharef Waadallah A-M, Flordeliz B, Cheryl M, Anuradha G, Sanaa A-Z, et al. Retinopathy of prematurity: Revisiting incidence and risk factors from Oman compared to other countries. *Oman Journal of Ophthalmology* 2017; (1): 26.
68. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 1954; 38(7): 397–432.
69. [No authors listed] Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. *Pediatrics* 2000; 105(2): 295–310.
70. Chen ML, Guo L, Smith LE, Dammann CE, Dammann O. High or low oxygen saturation and severe retinopathy of prematurity: a meta-analysis. *Pediatrics* 2010; 125(6): 1483–1492.
71. Madan A, Penn JS. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Frontiers in bioscience. J Virtual Lib* 2003; 8: 1030–1043.
72. Gupta MP, Chan RVP, Anzures R, Ostmo S, Jonas K. Practice patterns in retinopathy of prematurity treatment for disease milder than recommended by guidelines. *Am J Ophthalmol* 2016; 163: 1-10.
73. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 2008; 11(2): 109–119.
74. Lukiw WJ, Ottlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, Bazan NG. Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(10): 4163-4170.
75. Rivera JC, Holm M, Austeng D, Morken TS, Zhou TE, Beaudry-Richard A, et al. Retinopathy of prematurity: Inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. *J Neuroinflammation* 2017; 14(1): 165.

76. Budd S, Byfield G, Martiniuk D, Geisen P, Hartnett ME. Reduction in endothelial tip cell filopodia corresponds to reduced intravitreous but not intraretinal vascularization in a model of ROP. *Exp Eye Res* 2009; 89(5): 718–727.
77. Geisen P, Peterson LJ, Martiniuk D, Uppal A, Saito Y, Hartnett ME. Neutralizing antibody to VEGF reduces intravitreous neovascularization and does not interfere with vascularization of avascular retina in a rat model of retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2008; 14(11): 345–357.
78. Hartnett ME. Studies on the pathogenesis of avascular retina and neovascularization into the vitreous in peripheral severe retinopathy of prematurity (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2010; 108: 96–119.
79. Liu CH, Wang Z, Sun Y, Chen J. Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *FASEB J* 2017; 31: 14-19.
80. Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene: a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3): 564-573.
81. McColm JR, Geisen P, Hartnett ME. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP. *Mol Vis* 2004; 10: 512–520.
82. Hartnett ME. Advances in understanding and management of retinopathy of prematurity. *Surv Ophthalmol* 2017; 62(3): 257-276.
83. Hartnett ME, Capone A. Advances in diagnosis, clinical care, research, and treatment in retinopathy of prematurity. *Eye Brain* 2016; 8: 27-29.
84. Hartnett ME, Martiniuk D, Byfield G, Geisen P, Zeng G, Bautch VL. Neutralizing VEGF decreases tortuosity and alters endothelial cell division orientation in arterioles and veins in a rat model of ROP: relevance to plus disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(7): 3107–3114.
85. Smith LE, Hard AL, Hellström A. The biology of retinopathy of Prematurity: How Knowledge of Pathogenesis Guides Treatment. *Clin Perinatol* 2013; 40(2): 201-214.

86. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 1999; 5(12): 1390-1395.
87. Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14(5): 533-537.
88. Markowska A, Cao Z, Panjwani N. Glycobiology of ocular angiogenesis. *Glycobiology* 2014; 24(12): 1275-1282.
89. Distler JH. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *QJ Nucl Med* 2003; 47(3): 149-161.
90. Yang Z, Wang H, Jiang Y, Hartnett ME. VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2- mediated pathological angiogenesis. *Am J Pathol* 2014; 184(4): 1230–1239.
91. Stavri GT. Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1995; 358(3): 311-315.
92. Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 3649-3663.
93. 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.
94. CLASSIFICATION of retrolental fibroplasia. *Am J Ophthalmol* 1953; 36(10): 1333-1335.
95. [No authors listed] An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol* 1984; 102(8): 1130-1134.

96. [No authors listed] An international classification of retinopathy of prematurity. II. The classification of retinal detachment. The International Committee for the Classification of the Late Stages of Retinopathy of Prematurity. Arch Ophthalmol 1987; 105(7): 906-912.
97. [No authors listed] International Committee for the Classification of Retinopathy of P. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. Arch Ophthalmol 2005; 123(7): 991-999.
98. Kanski JJ. Clinical Ophthalmology: a Systematic Approach. 6th ed Edinburgh: Butterworth-Heinemann/Elsevier 2007.
99. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Preliminary results. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Arch Ophthalmol 1988; 106(4): 471-479.
100. Early Treatment For Retinopathy Of Prematurity Cooperative Group. Revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity: results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial. Arch Ophthalmol 2003; 121(12): 1684-1694.
101. [No authors listed] Section on Ophthalmology, American Academy of Pediatrics; American Academy of Ophthalmology; American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus. Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. Pediatrics 2013; 131: 189-195.
102. Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES. A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. N Engl J Med 1992; 326: 1050-1054.
103. Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group, Good WV, Hardy RJ, Dobson V, Palmer EA, Phelps DL, et al. Final visual acuity results in the early treatment for retinopathy of prematurity study. Arch Ophthalmol 2010; 128: 663-671.
104. Suelves AM, Shulman JP. Current screening and treatments in retinopathy of prematurity in the US. Eye Brain 2016; 8: 37-43.

105. Liegl R, Hellström A, Smith LE. Retinopathy of prematurity: the need for prevention. *Eye Brain* 2016; 8: 91-102.
106. Gunay M, Celik G, Ovali F, Yetik H, Aktas A, Gunay BO. One-year clinical outcome after laser treatment for retinopathy of prematurity at a tertiary center in Turkey. *Int Ophthalmol* 2015; 35(1): 27-35.
107. Chandra P, Tewari R, Salunkhe N, Kumawat D, Kumar V. Giant Retinal Tear With Retinal Detachment in Regressed Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity Treated by Laser. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2017; 54: e34-e36.
108. Micieli JA, Surkont M, Smith AF. A systematic analysis of the off-label use of bevacizumab for severe retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 2009; 148: 536-543.
109. Castellanos MA, Schwartz S, García-Aguirre G, Quiroz-Mercado H. Short-term outcome after IV ranibizumab injections for the treatment of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 2013; 97: 816-819.
110. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ, BEAT-ROP Cooperative Group. Efficacy of IV bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 2011; 364: 603-615.
111. Reynolds JD. Bevacizumab for retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 2011; 364: 677-678.
112. Menke MN, Framme C, Nelle M, Berger MR, Sturm V, Wolf S. Iv ranibizumab monotherapy to treat retinopathy of prematurity zone II, stage 3 with plus disease. *BMC Ophthalmol* 2015; 15(1): 20-26.
113. Hoerster R, Muether P, Dahlke C, Mehler K, Oberthür A, Kirchhof B, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in an infant treated with ranibizumab for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol* 2013; 91(1): e74-75.
114. Hong YR, Kim YH, Kim SY, Nam GY, Cheon HJ, Lee SJ. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor in retinopathy of prematurity after IV bevacizumab injection. *Retina* 2015; 35(9): 1772-1777.

115. Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichteinstein SJ, Galasso JM, et al. Reactivation of retinopathy of prematurity after bevacizumab injection. *Arch Ophthalmol* 2012; 130: 1000-1006.
116. Jalali S, Balakrishnan D, Zeynalova Z, Padhi TR, Rani PK. Serious adverse events and visual outcomes of rescue therapy using adjunct bevacizumab to laser and surgery for retinopathy of prematurity. The Indian Twin Cities Retinopathy of Prematurity Screening database Report number 5. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013; 98(4): F327-333.
117. Kim R, Kim YC. Posterior pole sparing laser photocoagulation combined with IV bevacizumab injection in posterior retinopathy of prematurity. *J Ophthalmol* 2014; 2014: 257-286.
118. Hu Q, Bai Y, Chen X, Huang L, Chen Y, Li X. Recurrence of retinopathy of prematurity in zone II stage 3+ after ranibizumab treatment: A retrospective study. *J Ophthalmol* 2017; 2017: 65-85.
119. Huang Q, Zhang Q, Fei P, Xu Y, Lyu J, Ji X, et al. Ranibizumab injection as primary treatment in patients with retinopathy of prematurity: anatomic outcomes and influencing factors. *Ophthalmol* 2017; 124(8): 1156-1164.
120. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol* 2008; 145(3): 424-431.
121. Chiang CC, Chen WL, Lin JM, Tsai YY. Effect of bevacizumab on human corneal endothelial cells: a six-month follow-up study. *Am J Ophthalmol* 2008; 146(5): 688-691.
122. Park HY, Kim SJ, Lee HB, Kim ES, Tchah H. Effect of intracameral bevacizumab injection on corneal endothelium in rabbits. *Cornea* 2008; 27(10): 1151-1155.

- 123.** Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-2342.
- 124.** Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an IV injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36(4): 331-335.
- 125.** Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an IV injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36(4): 336-339.
- 126.** Laud K, Spaide RF, Freund KB, Slakter J, Klancnik JM. Treatment of choroidal neovascularization in pathologic myopia with IV bevacizumab. *Retina* 2006; 26(8): 960-963.
- 127.** Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB. IV bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina* 2006; 26(3): 279-284.
- 128.** Spaide RF, Fisher YL. Iv bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006; 26(3): 275-278.
- 129.** Ferrara DC, Koizumi H, Spaide RF. Early bevacizumab treatment of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 2007; 144(6): 864-871.
- 130.** Grisanti S, Biester S, Peters S, Tatar O, Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU. Intracameral bevacizumab for iris rubeosis. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(1): 158-160.
- 131.** Bock F, Onderka J, Dietrich T. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(6): 2545-2552.

132. Nicoara SD, Stefanut AC, Nascutzy C, Zaharie GC, Toader LE, Drugan TC. Regression rates following the treatment of aggressive posterior retinopathy of prematurity with bevacizumab versus laser: 8-year retrospective analysis. *Med Sci Monit* 2016; 22: 1192-1209.
133. Yetik H, Gunay M, Sirop S, Salihoglu Z. Iv bevacizumab monotherapy for type-1 prethreshold, threshold, and aggressive posterior retinopathy of prematurity – 27 month follow-up results from Turkey. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; 253(10): 1677-1683.
134. Şahin A, Şahin M, Cingü AK, Türkcü FM, Yüksel H, Kaya S, et al. Iv bevacizumab monotherapy for retinopathy of prematurity. *Pediatr Int* 2013; 55(5): 599-603.
135. Chen SN, Lian I, Hwang YC, Chen YH, Chang YC, Lee KH, et al. IV anti-vascular endothelial growth factor treatment for retinopathy of prematurity: comparison between ranibizumab and bevacizumab. *Retina* 2015; 35(4): 667-674.
136. Subhani S, Vavilala DT, Mukherji M: HIF inhibitors for ischemic retinopathies and cancers: options beyond anti-VEGF therapies. *Angiogenesis* 2016; 19(3): 257-273.
137. Konner, J. and J. Dupont, Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4 Suppl 2: S81-85.
138. Papadopoulos N. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 2012; 15(2): 171-185.
139. Stewart MW. Clinical and differential utility of VEGF inhibitors in wet age-related macular degeneration: focus on aflibercept. *Clin Ophthalmol* 2012; 6: 1175-1186.
140. Sukgen EA, Söker G, Koçluk Y, Gülek B. Effect of IV aflibercept on central retinal arterial blood flow in type 1 retinopathy of prematurity. *Eur J Ophthalmol* 2017; 10: 144-148.

- 141.** Tokunaga CC, Mitton KP, Dailey W, Massoll C, Roumayah K, Guzman E, et al. Effects of anti-VEGF treatment on the recovery of the developing retina following oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(3): 1884-1892.
- 142.** Li X, Xu G, Wang Y, Xu X, Liu X, Tang S, et al; AURORA Study Group. Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration: results from a 12-month randomized phase 2 study: AURORA study. *Ophthalmol* 2014; 121(9): 1740-1747.
- 143.** Jin E, Yin H, Li X, Zhao M. Short-term outcomes after IV injections of conbercept versus ranibizumab for the treatment of retinopathy of prematurity. *Retina* 2017; 3: 31-33.
- 144.** Yu XY, Lin SG, Chen X, Zhou ZW, Liang J, Duan W, et al. Transport of cryptotanshinone, a major active triterpenoid in *Salvia miltiorrhiza* Bunge widely used in the treatment of stroke and Alzheimer's disease, across the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab* 2007; 8(4): 365-378.
- 145.** Kim SY, Moon TC, Chang HW, Son KH, Kang SS, Kim HP. Effects of tanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza* bunge on arachidonic acid metabolism and in vivo inflammatory responses. *Phytother Res* 2002; 16: 616–620.
- 146.** Park IJ, Kim MJ, Park OJ, Park MG, Choe W, Kang I, et al. Cryptotanshinone sensitizes DU145 prostate cancer cells to Fas (APO1/CD95)-mediated apoptosis through Bcl-2 and MAPK regulation. *Cancer Lett* 2010; 298: 88–98.
- 147.** Lee WY, Liu KW, Yeung JH. Reactive oxygen species-mediated kinase activation by dihydrotanshinone in tanshinones-induced apoptosis in HepG2 cells. *Cancer Lett* 2009; 285: 46–57.
- 148.** Jin DZ, Yin DZ, Yin LL, Ji XQ, Zhu XZ. Cryptotanshinone inhibits cyclooxygenase-2 enzyme activity but not its expression. *Eur J Pharmacol* 2006; 549: 166–172.

149. Chen Q, Zhuang Q, Mao W, Xu XM, Wang LH, Wang HB. Inhibitory effect of cryptotanshinone on angiogenesis and Wnt/B-Catenin signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Chin J Integr Med* 2014; 10: 743-750.
150. Tang S, Shen XY, Huang HQ, Xu SW, Yu Y, Zhou CH, et al. Cryptotanshinone suppressed inflammatory cytokines secretion in RAW264.7 macrophages through inhibition of the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation* 2011; 34: 111–118.
151. Xin L, Li HL, Ting B, Yan LW, Ying W, Wen XX, et al. Cryptotanshinone inhibits LPS-induced proinflammatory mediators via TLR4 and TAK1 signaling pathway. *International Immunopharmacology* 2011; 11: 1871-1876.
152. Feng F, Feng Y, Liu Z, Li WH, Wang WC, Wu ZD, et al. Effects of albendazole combined with TSII-A (a Chinese herb compound) on optic neuritis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in BALB/c mice. *Parasites & Vectors* 2015; 8(1): 606.
153. Yifang J, Fengming Y, Jie Z, Chuan Z, Ran Y, Jinhao Z. Cryptotanshinone ameliorates radiation-induced lung injury in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019; 1-14.
154. Yuting Z, Weiting L, Xiaolei Z, Jing L, Suowen X, Shaorui C, et al. Cryptotanshinone protects against pulmonary fibrosis through inhibiting Smad and STAT3 signaling pathways. *Pharmacological Research* 2019; 147: 4307-4311.
155. Kim SA, Kang OH, Kwon DY. Cryptotanshinone induces cell cycle arrest and apoptosis of NSCLC cells through the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9): E2739.
156. Fayong K, Zheng W, Xiaoling S, Qiang M, Yunping H, Lin J, et al. Cryptotanshinone induces cell cycle arrest and apoptosis through the Jak2/sTaT3 and Pi3K/akt/ nF κ B pathways in cholangiocarcinoma cells. *Drug Design, Development and Therapy* 2017; 11: 1753–1766.

- 157.** Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11): 798–809.
- 158.** Masuda M, Wakasaki T, Suzui M, Toh S, Joe AK, Weinstein IB. Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers. *Curr. Cancer Drug Targets* 2010; 10(1): 117–126.
- 159.** Shin DS, Kim HN, Shin KD, Yoon YJ, Kim SJ, Han DC, Kwon BM. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69(1): 193–202.
- 160.** Zhiguo C, Rujian Z, Jiayi Z, Chen C, Chi H, Junjie M, et al. Cryptotanshinone inhibits proliferation yet induces apoptosis by suppressing STAT3 signals in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 50023-50033.
- 161.** Kim JH, Jeong SJ, Kwon TR, Yun SM, Jung JH, Kim M, et al. Cryptotanshinone enhances TNF-alpha-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia KBM-5 cells. *Apoptosis* 2011; 16: 696-707.
- 162.** Lu L, Li C, Li D, Wang Y, Zhou C, Shao W, et al. Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation by suppressing STAT3 signaling. *Mol Cell Biochem* 2013; 381: 273-282.
- 163.** Chen L, Wang HJ, Xie WL, Yao YY, Zhang YS, Wang HL. Cryptotanshinone inhibits lung tumorigenesis and induces apoptosis in cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Med Rep* 2014; 9: 2447-2452.
- 164.** Park IJ, Yang WK, Nam SH, Hong J, Yang KR, Kim J, et al. Cryptotanshinone induces G1 cell cycle arrest and autophagic cell death by activating the AMP-activated protein kinase signal pathway in HepG2 hepatoma. *Apoptosis* 2014; 19: 615-628.
- 165.** Ge Y, Yang B, Chen Z, Cheng R. Cryptotanshinone suppresses the proliferation and induces the apoptosis of pancreatic cancer cells via the STAT3 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2015; 12: 7782-7788.

166. Li S, Wang H, Hong L, Liu W, Huang F, Wang J, et al. Cryptotanshinone inhibits breast cancer cell growth by suppressing estrogen receptor signaling. *Cancer Biol Ther* 2015; 16: 176-184.
167. Li W, Saud SM, Young MR, Colburn NH, Hua B. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro. *Mol Cell Biochem* 2015; 406: 63-73.
168. Wu CF, Klauck SM, Efferth T. Anticancer activity of cryptotanshinone on acute lymphoblastic leukemia cells. *Arch Toxicol* 2016; 90: 2275-2286.
169. Ye T, Zhu S, Zhu Y, Feng Q, He B, Xiong Y, et al. Cryptotanshinone induces melanoma cancer cells apoptosis via ROS-mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion. *Biomed Pharmacother* 2016; 82: 319-326.
170. Yubin J, Yichen L, Nina X, Tingting D, Liyuan W, Rui H, et al. Cryptotanshinone inhibits esophageal squamous-cell carcinoma in vitro and in vivo through the suppression of sTaT3 activation. *OncoTargets and Therapy* 2019; 12: 883–896.
171. Shawn PR, Clayton JU, Jeffrey AW. Effects of decorin proteoglycan on fibrillogenesis, ultrastructure, and mechanics of type I collagen gels. *Matrix Biol* 2013; 32: 414–423.
172. Nandi P, Siddiqui MF, Lala PK. Restraint of trophoblast invasion of the uterus by decorin: role in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 351-360.
173. Iozzo RV, Buraschi S, Genua M, Xu SQ, Solomides CC, Peiper SC, Morrione A. Decorin Antagonizes IGF Receptor I (IGF-IR) Function by Interfering with IGF-IR Activity and Attenuating Downstream Signaling. *J Biol Chem* 2011; 286(40): 34712–34721.
174. Santra M, Eichstetter I, Iozzo RV. An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 35153-35161.

- 175.** Santra M, Reed CC, Iozzo RV. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem* 2002; 277: 35671-35681.
- 176.** Hoot KE, Oka M, Han G, Bottinger E, Zhang Q, Wang XJ. HGF upregulation contributes to angiogenesis in mice with keratinocyte-specific Smad2 deletion. *J Clin Invest* 2010; 120: 3606-3616.
- 177.** Ding S, Merkulova RT, Han ZC, Tobelem G. HGF receptor upregulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood* 2003; 101: 4816-4822.
- 178.** Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 12718-12723.
- 179.** Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Decorin. *Am J Pathol* 2012; 181(2): 380-387.
- 180.** Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 1998; 101(2): 406-412.
- 181.** Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, et al, An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol* 2008; 173: 844-855.
- 182.** Csordás G, Santra M, Reed CC. Sustained Down-regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor by Decorin. *J Biol Chem* 2000; 275(42): 32879-32887
- 183.** Nyman MC, Sainio AO, Pennanen MM. Decorin in human colon cancer. *J Histochem Cytochem* 2015; 63(9): 710-720.
- 184.** Järveläinen H, Sainio A, Wight TN. Pivotal role for decorin in angiogenesis. *Matrix Biol* 2015; 43: 15-26.

185. Al Haj ZA, Lafont A, Durand E, Brasselet C, Lemarchand P, Godeau G, et al. Effect of adenovirus-mediated overexpression of decorin on metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and cytokines secretion by human gingival fibroblasts. *Matrix Biol* 2003; 22: 251–258.
186. Neill T, Painter H, Buraschi S, Owens RT, Lisanti MP, Schaefer L, et al. Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3. *J Biol Chem* 2012; 287: 5492–5506.
187. Barnett JM, McCollum GW, Fowler JA. Pharmacologic and Genetic Manipulation of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Reduce Retinal Neovascularization in Rodent Models of Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 907-915.
188. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004; 116: 883-895.
189. Scott RA, Panitch A. Decorin mimic regulates platelet-derived growth factor and interferon- γ stimulation of vascular smooth muscle cells. *Biomacromolecules* 2014 9; 15(6): 2090-2103.
190. Schönherr E, Sunderkötter C, Schaefer L, Thanos S, Grassel S, Oldberg Å, et al. Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. *J Vasc Res* 2004; 41: 499–508.
191. Mohan RR, Tripathi R, Sharma A, Sinha PR, Giuliano EA, Hesemann NP, Chaurasia SS. Decorin antagonizes corneal fibroblast migration via caveolae-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor. *Experimental Eye Research* 2019; 180: 200–207.
192. Mohan RR, Tovey JCK, Sharma A, Schultz GS, Cowden, J. W., & Tandon, A. Targeted Decorin Gene Therapy Delivered with Adeno-Associated Virus

Effectively Retards rneal Neovascularization In Vivo. PLoS One 2011; 6(10): e26432.

- 193.** Mohan RR, Tandon A, Sharma A, Cowden JW, Tovey JCK. Significant Inhibition of Corneal Scarring In Vivo with Tissue-Selective, Targeted AAV5 Decorin Gene Therapy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(7): 4833-4841.
- 194.** Hill LJ, Moakes RJA, Vareechon C, Butt G, Ng A, Brock K, et al. Sustained release of decorin to the surface of the eye enables scarless corneal regeneration. NPJ Regen Med 2018; 3: 23-29.
- 195.** Mohan R, Tovey J, Gupta R, Sharma A, Tandon A. Decorin biology, expression, function and therapy in the cornea. Curr Mol Med 2011; 11(2): 110–128.
- 196.** Nunes I. Structure and activation of the large latent transforming growth factor-Beta complex. J Am Opt Ass 1998; 69: 643–648.
- 197.** Seuntjens E. Transforming Growth Factor type beta and Smad family signaling in stem cell function. Cytokine & growth factor reviews 2009; 20: 449–458.
- 198.** Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003; 113: 685–700.
- 199.** Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. Current Diabetes Rev 2006; 2: 71–98.
- 200.** Loukovaara S. Ang-2 upregulation correlates with increased levels of MMP-9, VEGF, EPO and TGFbeta1 in diabetic eyes undergoing vitrectomy. Acta ophthalmologica 2013; 91: 531–539.
- 201.** Van Royen N. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2002; 16: 432–434.

- 202.** Nagineni CN. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 2003; 197: 453–462.
- 203.** Shi X. TGF-beta/Smad3 inhibit vascular smooth muscle cell apoptosis through an autocrine signaling mechanism involving VEGF-A. *Cell Death & Disease* 2014; 5: e1317.
- 204.** Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994; 370: 341-347.
- 205.** Yamashita H, Ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1994; 269: 20172-20178.
- 206.** Bassing CH, Yingling JM, Howe DJ, Wang T, He WW, Gustafson ML, et al. A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 1994; 263: 87-89.
- 207.** Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- 208.** Yamashita H, Tobari I, Sawa M. Functions of the transforming growth factor-beta super family in eyes. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1997; 101: 927–947.
- 209.** Mehra A, Wrana J. TGF – beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol* 2000; 80: 605–622.
- 210.** Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267(24): 6954-6967.
- 211.** Soyoz M, Özçelik N. TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ve Sinyal İletimi. *Turkiye Klin J Med Sci* 2007; 27: 426-433.

212. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 346: 281–284.
213. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90: 1–7.
214. Kol B M, Margetts PJ, Galt T. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(3): 770-777.
215. Nassar K, Lüke J, Lüke M, Kamal M, Abd El-Nabi E, Soliman M, et al. The novel use of decorin in prevention of the development of proliferative vitreoretinopathy (PVR). *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmol* 2011; 249(11): 1649–1660.
216. Grisanti S, Szurman P, Warga M, Kaczmarek R, Ziemssen F, Tatar O, Bartz-Schmidt KU. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: a pilot study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 191–196.
217. Hill LJ, Mead B, Blanch RJ, Ahmed Z, De Cogan F, Morgan-Warren PJ, et al. Decorin Reduces Intraocular Pressure and Retinal Ganglion Cell Loss in Rodents Through Fibrolysis of the Scarred Trabecular Meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 3743-3748.
218. Özay R, Türkoğlu E, Gürer B, Dolgun H, Evirgen O, Ergüder Bİ, et al. Does Decorin protect neuronal tissue via its antioxidant and antiinflammatory activity from traumatic brain injury? An experimental study. *World Neurosurg* 2017; 97: 407–415.
219. Kim CB, D'Amore PA, Connor KM. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Eye Brain* 2016; 8: 67-79.
220. Kremer I, Kissun R, Nissenkorn I, Ben-Sira I, Garner A. Oxygen-induced retinopathy in newborn kittens. A model for ischemic vasoproliferative retinopathy. *Inves Ophthalmol Visual Sci* 1987; 28: 126-130.

221. Lutty GA, McLeod DS, Bhutto I, Wiegand SJ. Effect of VEGF trap on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the dog. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2011; 52: 4039-4047.
222. Rabinowitz R, Priel A, Rosner M, Pri-Chen S, Spierer A. Avastin treatment reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Current Eye Res* 2012; 37: 624-629.
223. Akkoyun I, Yilmaz G, Oto S, Kahraman B, Haberal N, Akova YA. Impact of triamcinolone acetonide on retinal endothelial cells in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol Scand* 2007; 85(7): 791-794.
224. Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2015; 122(1): 200-210.
225. Penn JS, Tolman BL, Henry MM. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1994; 35: 3429-3435.
226. Hartnett ME, Martiniuk DJ, Saito Y, Geisen P, Peterson LJ, McColm JR. Triamcinolone reduces neovascularization, capillary density and IGF-1 Receptor phosphorylation in a model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4975–4982.
227. Medhat AM, Azab KS, Said MM, El Fatih NM, El Bakary NM. Antitumor and radiosensitizing synergistic effects of apigenin and cryptotanshinone against solid Ehrlich carcinoma in female mice. *Tumour Biol* 2017: 1–13.
228. Sun PP , Fang Y, Jing X, Ke S, Jie C, Su G. Cryptotanshinone ameliorates hepatic normothermic ischemia and reperfusion injury in rats by anti-mitochondrial Apoptosis *Biol Pharm Bull* 2014; 37(11): 1758–1765.
229. Alan C, Kocoglu H, Altintas R, Alici B, Ersay AE. Protective effect of decorin on acute ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Arch Med Sci* 2011; 2: 211-216.

230. Kaja S, Hilgenberg JD, Everett E, Olitsky SE, Gossage J, Koulen P. Effects of dilution and prolonged storage with preservative in a polyethylene container on Bevacizumab (Avastin™) for topical delivery as a nasal spray in anti-hereditary hemorrhagic telangiectasia and related therapies. *Hum Antibodies* 2011; 20(3-4): 95-101.
231. Acun G, Ozdemir H, Sunamak O, Ozdemir ZU, Baskan E, Yazı M, et al. The effect of single-dose ip. bevacizumab on peritoneal adhesion formation. *Rev Invest Clin* 2018;70: 279-284.
232. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 101–111.
233. Park K, Chen Y, Hu Y, Mayo AS, Kompella UB, Longeras R, Ma JX. Nanoparticle-mediated expression of an angiogenic inhibitor ameliorates ischemia-induced retinal neovascularization and diabetes-induced retinal vascular leakage. *Diabetes* 2009; 58: 1902–1913.
234. Jiang J, Xia XB, Xu HZ. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1alpha and VEGF. *J Cell Physiol* 2009; 218(1): 66–74.
235. Gurel A, Atli H, Kaya N, Onalan E, Kuloglu T, Aygen B. Effects of vitamin D on kidney histology and trpv1 channels in doxorubicin-induced nephropathy. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8): 13548-13555.
236. Pozarowska D, Pozarowski P. The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy. *Cent Eur J Immunol* 2016; 41(3): 311-316.
237. Connolly BP MJ, Sharma S, Regillo CD, Tasman W. A comparison of laser photocoagulation with trans-scleral cryotherapy in the treatment of threshold retinopathy of prematurity. *Ophthalmol* 1998; 105: 1628-1631.

238. Jandek C. New therapeutic approaches in the treatment of retinopathy of prematurity. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 2009; 226: 914-920.
239. Karkhaneh R, Khodabande A, Riazi-Esfahani M, Roohipour R, Ghassemi F, Imani M, et al. Efficacy of IV bevacizumab for zone-II retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol* 2016; 94: 417-420.
240. O'Keeffe N, Murphy J, O'Keeffe M, Lanigan B. Bevacizumab compared with diode laser in stage 3 posterior retinopathy of prematurity: A 5 year follow up. *Irish Med J* 2016; 109: 355-359.
241. Kabataş EU, Kurtul BE, Altıaylık Özer P, Kabataş N. Comparison of IV bevacizumab, IV ranibizumab and laser photocoagulation for treatment of type 1 retinopathy of prematurity in Turkish preterm children. *Curr Eye Res* 2017; 42(7): 1054-1058.
242. Tahija SG, Hersetyati R, Lam GC, Kusaka S, McMenamin PG. Fluorescein angiographic observations of peripheral retinal vessel growth in infants after IV injection of bevacizumab as sole therapy for zone I and posterior zone II retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(4): 507-512.
243. Xu Y, Tan CS. Safety and complications of IV injections performed in an Asian population in Singapore. *Int Ophthalmol* 2016; 12: 145 -152.
244. Allen JA, Adlakha A, Bergethon PR. Reversible Posterior Leukoencephalopathy Syndrome After Bevacizumab/FOLFIRI Regimen for Metastatic Colon Cancer. *Arch Neurol* 2006; 63: 1475–1478.
245. . Saint-Geniez M, Maharaj ASR, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, et al. (2008) Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS One* 2008; 3(11): e3554.
246. Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E, Friedlander M. Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *J Clin Invest* 2012; 122: 4213–4217.

247. Sato T, Wada K, Arahori H. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 2012; 153(2): 327-333.
248. Snyder LL, Garcia-Gonzalez JM, Shapiro MJ, Blair MP. Very late reactivation of retinopathy of prematurity after monotherapy with IV bevacizumab. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2016; 47(3): 280-283.
249. Honda S, Hirabayashi H, Tsukahara Y, et al. Acute contraction of the proliferative membrane after an IV injection of bevacizumab for advanced retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 1061-1063.
250. Zapeda-Romero C, Liera-Garcia JA, Gutierrez-Marure E, et al. Paradoxical vascular-fibrotic reaction after intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Eye* 2010; 24: 931-933.
251. Atchaneevasakul LO, Trinavarat A. Choroidal ruptures after adjuvant injection of bevacizumab for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *J Perinatol* 2010; 30: 497-499.
252. Wu WC, Yeh PT, Chen SN, et al. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in Taiwan. *Ophthalmol* 2011; 118: 176-183.
253. Xu YJ, Zhang Q, Wang Y. Cryptotanshinone down-regulates the expression of VEGF and inhibits angiogenesis in U2OS osteosarcoma cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2016; 32(1): 29-33.
254. Zhang L, Chen C, Duanmu J, Wu Y, Tao J, Yang A, et al. Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1 α nuclear translocation. *Int Immunopharmacol* 2018; 65, 429–437.

255. Zhang J, Wen G, Sun L, Yuan W, Wang R, Zeng Q, et al. Cryptotanshinone inhibits cellular proliferation of human lung cancer cells through downregulation of IGF-1R/PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep* 2018; 40(5): 2926-2934.
256. Ke F, Wang Z, Song X, Ma Q, Hu Y, Jiang L, et al. Cryptotanshinone induces cell cycle arrest and apoptosis through the JAK2/STAT3 and PI3K/Akt/NFκB pathways in cholangiocarcinoma cells. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 1753-1766.
257. Tao B, Kang Y, Cong Q, Tao X, Xi Y, Jie Z. Cryptotanshinone ameliorates renal ischaemia–reperfusion injury by inhibiting apoptosis and inflammatory response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019; 00: 1–10.
258. Zhenhua F, Wenhao Z, Xiaobin L, Jian L, Chenglong X, Hang L, Liang C. Cryptotanshinone protects against IL-1β-induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes and ameliorates the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol* 2017; 50: 161-167.
259. Zhang W, Suo M, Yu G, Zhang M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of cryptotanshinone through PI3K/Akt signaling pathway in a rat model of neuropathic pain. *Chemico-Biological Interactions* 2019; 305: 127-133.
260. Schuliga M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules* 2015; 5(3): 1266–1283.
261. Sheller JR , Polosukhin VV , Daphne M, Cheng DS, Stokes RP Timothy S. Blackwell. NF-kB Induction in Airway Epithelium Increases Lung Inflammation in Allergen Challenged Mice. *Exp Lung Res* 2009; 35(10): 883-895.
262. Xiaoli R, Wenwen Z, Wenping L, Jingshan S, Xiuping C. Cryptotanshinone inhibits TNF-α-induced LOX-1 expression by suppressing reactive oxygen

species (ROS) formation in endothelial cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2016; 20(4): 347-355.

263. Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV, Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 4765-4777.
264. Lee NE, Park YJ, Chung IY, Seo SW, Park JM, Yoo JM, Song JK. Gene expression changes in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Korean J Ophthalmol* 2011; 25(1): 42-47.
265. Park YJ, Kim YH, Choi WS, Chung IY, Yoo JM. Treatment With Triamcinolone Acetonide Prevents Decreased Retinal Levels of Decorin in a Rat Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Current Eye Res* 2010; 35(7), 657–663.
266. Khan GA, Girish GV, Lala N, Di Guglielmo GM, Lala PK, Decorin is a novel VEGFR-2-binding antagonist for the human extravillous trophoblast. *Mol Endocrinol* 2011; 25(8): 1431-1443.
267. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1013–1031.
268. Du S, Wang S, Wu Q, Hu J, Li T. Decorin inhibits angiogenic potential of choroid-retinal endothelial cells by downregulating hypoxia-induced Met, Rac1, HIF-1a and VEGF expression in cocultured retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2013; 116: 151–160.
269. Spaide RF. Rationale for combination therapies for choroidal neovascularization. *Am. J Ophthalmol* 2006; 141: 149-156.
270. Wang S, Du S, Wu Q, Hu J, Li T. Decorin Prevents Retinal Pigment Epithelial Barrier Breakdown Under Diabetic Conditions by Suppressing p38 MAPK Activation. *Investigative Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(5): 2971-2974.

- 271.** Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81: 807–869.
- 272.** Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV, Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J* 2013; 280: 2165–2179.
- 273.** Fan Y, Lei C, Chen H, Hu J. Increased expression of TGF- β 1 and smad 4 on oxygen-induced retinopathy in neonatal mice. *Retinal degenerative diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology* 2017; 71: 664-670.
- 274.** Zhang P, Su Y, Liu F. The relationship between intervention in the CD40 signal pathway and choroidal neovascularization. *OncoTargets Therapy* 2014; 7: 263–267.
- 275.** Wang X, Ma W, Han S, Meng Z, Zhao L, Yin Y et al. TGF- β participates choroid neovascularization through Smad2/3-VEGF/TNF- α signaling in mice with Laser-induced wet age-related macular degeneration. *Scientific Reports*, 2017; 7: 148-162.
- 276.** Gardiner TA, Gibson DS, de Gooyer TE. Inhibition of tumor necrosis factor- α improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 2005; 166: 637-644.
- 277.** Kociok N, Radetzky S, Krohne TU. Pathological but not physiological retinal neovascularization is altered in TNF-Rp55-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 5057-5065.
- 278.** Hayahi T, Matsuoka K, Saitoh M, Takeda S, Kimura M. Influence of α -tumor necrosis factor and β -interleukin-1 on production of angiogenic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32: 15–22.

6. ÖZGEÇMİŞ

30.08.1990 yılında Malatya’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya ilinde tamamladım. 2007 yılında Malatya Fen Lisesi’nden mezun oldum. 2013 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi’den mezun oldum. 2015 yılında Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

