

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA İNTRAVİTREAL GOLİMUMAB
UYGULAMASININ RETİNA ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. CEREN DURMAZ ENGİN

İZMİR-2018

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

TAVŞANLARDA İNTRAVİTREAL GOLİMUMAB
UYGULAMASININ RETİNA ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. CEREN DURMAZ ENGİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. ALİ OSMAN SAATCİ

ÖNSÖZ

Sadece tezimin oluşumunda değil, oftalmoloji eğitimimin her aşamasında bana destek veren; beraber çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam sayın Prof.Dr. Ali Osman SAATCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık eğitimim boyunca bilimsel, klinik ve cerrahi eğitimimde emeği geçen başta Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. F. Hakan ÖNER'e, değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet H. ERGİN'e, Prof. Dr. Süleyman KAYNAK'a, Prof. Dr. Ahmet MADEN'e, Prof. Dr. İsmet DURAK'a, Prof. Dr. Üzeyir GÜNENÇ'e, Prof. Dr. Ayşe Tülin BERK'e, Prof. Dr. Meltem Söylev BAJİN'e, Prof. Dr. Zeynep ÖZBEK'e, Prof. Dr. Nilüfer KOÇAK'a, Prof. Dr. Aylin YAMAN'a, Doç. Dr. Gül ARIKAN'a, Doç. Dr. Canan Aslı YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. A.Taylan ÖZTÜRK'e, Yrd. Doç. Dr. Mahmut KAYA'ya ve Uzm. Dr. Ziya AYHAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimdeki katkılarından ötürü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Prof.Dr. Bekir ERGÜR, Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK ve Doç. Dr. Serap CİLAKE MICİLİ'ya, Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Osman YILMAZ'a ve Romatoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Fatoş ÖNEN'e teşekkür ederim.

Asistanlık dönemimde uyum ve mutluluk içinde çalıştığım tüm asistan ve uzman olmuş doktor arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca kliniğimiz hemşire, sekreter ve personellerine, her zaman uyum içinde çalıştığımız için teşekkür ederim.

Yaşamımın her evresinde bana destek olup sevgi ve ilgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen, bugünlere ulaşmamda büyük emek ve desteği olan annem Fatma DURMAZ'a, babam Ali DURMAZ'a ve eşim Onur ENGİN'e saygı, sevgi ve minnet duygularımı sunarım.

Saygılarımla

Dr. Ceren DURMAZ ENGİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER i

KISALTMALAR ii

TABLO LİSTESİ iii

RESİM LİSTESİ iv

ÖZET 1

ABSTRACT 3

1. GİRİŞ ve AMAÇ 5

2. GENEL BİLGİLER 7

2.1. Retinanın Anatomisi ve Histolojisi 7

2.2. Temel İmmünoloji 14

2.3. Oküler İmmün Ayrıcılık 22

2.4. Apoptozis 23

2.5. Tümör Nekrozis Faktör 26

2.6. TNF- α Antagonistleri 29

3. GEREÇ VE YÖNTEM 39

4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 48

5. BULGULAR 49

6. TARTIŞMA 65

7. SONUÇ 73

8. KAYNAKLAR 74

KISALTMALAR

TNF-a	:Tümör Nekrozis Faktör alfa
BSS	:Dengeli Tuz Solüsyonu (Balanced Salt Solution)
H&E	:Hematoksilen-Eozin
DRP	:Diyabetik Retinopati
DMÖ	:Diyabetik Makula Ödemi
YBMD	:Yaşa Bağlı Makula Dejeneresansı
KMÖ	:Kistoid Makula Ödemi
RPE	:Retina Pigment Epiteli
FT	:Fotoreseptör Tabaka
DLM	:Dış Limitan Membran
DNT	:Dış Nükleer Tabaka
DPT	:Dış Pleksiform Tabaka
İNT	:İç Nükleer Tabaka
İPT	:İç Pleksiform Tabaka
GHT	:Ganglion Hücre Tabakası
İLM	:İç Limitan Membran
RSLT	:Retina Sinir Lifi Tabakası
EİÜ	:Endotoksin İlişkili Üveit
RA	:Romatoid Artrit
JIA	:Jüvenil İdiopatik Artrit
PsA	:Psöriatik Artrit
AS	:Ankilozan Spondilit
MTX	:Metotreksat
Kaspaz	:Cysteine Aspartate Spesifik Proteases
TUNEL	:Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick and Labelling
TdT	:Terminal deoksinükleotidil Transferaz
DAB	:Diaminobenzidine
PBS	:Phosphate-Buffered Saline (Fosfatla Tamponlanmış Salin)
ELISA	:Enzyme Linked Immunosorbent Assay
SD	:Standart Deviasyon
ERG	:Elektroretinografi
KS	:Kortikosteroid

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: İnflamatuvar yanıtta rol oynayan önemli sitokinler, kaynak hücreleri ve görevleri

Tablo-2: Işık mikroskopik doku takip protokolü

Tablo-3: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

Tablo-4: TUNEL yöntemi

Tablo-5: İmmunohistokimyasal yöntem

Tablo-6: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin H&E boyamada hücre sayıları

Tablo-7: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki H&E boyamada hücre sayısı karşılaştırması

Tablo-8: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi sayıları

Tablo-9: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi karşılaştırması

Tablo-10: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki KASPAZ-3 pozitif hücre yüzdesi sayıları

Tablo 11: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki KASPAZ-3 pozitif hücre yüzdesi karşılaştırması

RESİM LİSTESİ

- Resim-1:** Retinanın şematik organizasyonu a. Retina tabakaları ve hücreleri çizimi b. Makula histolojik kesiti
- Resim-2:** Donör insan gözünde normal RPE görünümü
- Resim-3:** Transmisyon elektron mikroskopisi. Rod hücresi
- Resim-4:** Transmisyon elektron mikroskopisi. Kon hücreleri
- Resim-5:** Transmisyon elektron mikroskopisi. İç nükleer tabaka
- Resim-6:** Makrofaj hücresinin sitokinleri ve inflamatuvar yanıtındaki işlevleri
- Resim-7:** T lenfosit hücresinin sitokinleri
- Resim-8:** TNF sitokin-reseptör etkileşimi
- Resim-9:** Anti-TNF ilaçlar ve fonksiyonel özellikleri
- Resim-10:** Tavşan gözlerine ait retina tabakaları
- Resim-11:** Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin ışık mikroskopik görünümleri
- Resim-12:** Tüm grupların TUNEL ile boyanma bulguları
- Resim-13:** Tüm grupların aktive-KASPAZ-3 ile boyanma bulguları
- Resim-14:** Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün retina katmanlarına ait görünüm
- Resim-15:** Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün dış nükleer tabakasındaki fotoreseptör hücre çekirdeklerine ait görünüm
- Resim-16:** Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün iç nükleer tabakasındaki bipolar hücrelere ait görünüm
- Resim-17:** Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün ganglion hücre tabakasına ait görünüm
- Resim-18:** Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün fotoreseptör iç segmentte mitokondrial kristalizis bulgusuna ait görünüm
- Resim-19:** Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün fotoreseptör dış segmentte disk yapısının bozulmasına ait görünüm
- Resim-20:** Golimumab enjekte edilen gözde fotoreseptör sinaptik cismi içerisinde bulunan pediküller ve sinaptik aralığa ait görünüm
- Resim-21:** Golimumab enjekte edilen gözde dış nükleer tabakada yer alan, çevre hücrelere göre daha translüsen görünümdeki fotoreseptör hücre çekirdeği ve karyoreksise ait görünüm
- Resim-22:** Golimumab enjekte edilen gözde fotoreseptör iç segment tabakasında yer alan myelin figüre ait görünüm

ÖZET

Amaç: Tavşanlarda intravitreal uygulanan Golimumab'ın (anti-TNF) retina üzerine histopatolojik etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmaya 16 adet tavşan (Yeni Zelanda albino tavşan) dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tavşanlar 3 gruba ayrılarak, deneklerin sağ gözüne intravitreal Golimumab enjeksiyonu [grup 1 (n=6): 5 mg/0.05 ml, grup 2 (n=6): 10 mg/0.1 ml, grup 3 (n=4): 20 mg/0.2 ml], sol göze ise eş volümde sham enjeksiyon (Dengeni Tuz Solüsyonu-BSS) yapıldı. Tavşanların gözleri bir hafta boyunca günlük takip edildi. Bir haftalık takibin ardından sakrifikasyon sonrası, gözleri enükle edilerek dokuları ışık mikroskopisinde apoptotik aktivasyonu gösteren immünohistokimyasal (TUNEL ve Kaspaz-3 boyama) ve elektron mikroskopi incelemeleri için hazırlandı.

Sonuçlar: Hematoksilen-eozin (H&E) boyama ile yapılan incelemede, çalışma gözlerinin histolojik kesitlerinin hiçbirinde makroskopik olarak retina tabakalarında kayba rastlanmadı. Tüm dozlarda (5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml), aynı volümde BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözlerine göre, Golimumab enjekte edilen gözlerde, H&E boyamada dış nükleer (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.044$ ve $p=0.045$) ve iç nükleer (sırasıyla $p=0.047$, $p=0.045$ ve $p=0.048$) tabakalarda azalmış hücre sayısı görülürken; ganglion hücre sayısında anlamlı farklılık gözlenmedi. (sırasıyla $p=0.11$, $p=0.067$ ve $p=0.20$) 5 mg/0.05 ml Golimumab enjeksiyonu yapılan gruptaki tavşan gözlerinde dış nükleer tabakada TUNEL ile kontrole göre boyanma yüzdesinde farklılık görülmezken; Kaspaz-3 boyanma yüzdesi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazla saptandı. (sırasıyla $p=0.061$ ve $p=0.048$) Aynı dozda iç nükleer tabakada ise TUNEL ve Kaspaz-3 boyanma yüzdeleri, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazla bulundu. (sırasıyla $p=0.018$ ve $p=0.015$) 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml dozlarında ise hem dış hem iç nükleer tabakada TUNEL ve Kaspaz-3 boyanma yüzdeleri, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazla saptandı. (TUNEL boyama ile sırasıyla $p=0.009$, $p=0.020$, $p=0.029$ ve $p=0.029$, Kaspaz-3 boyama ile sırasıyla $p=0.041$, $p=0.041$, $p=0.048$, $p=0.041$) Golimumab enjekte edilen gözlerin ganglion hücre tabakasında gerek TUNEL gerekse Kaspaz-3 boyamasında kontrol grubuna göre pozitif boyanan hücre yüzdesinde üç dozda da anlamlı farklılığa rastlanmadı. (TUNEL boyama ile

sırasıyla $p=0.937$, $p=1.000$ ve $p=1.000$, Kaspaz-3 boyama ile sırasıyla $p=0.064$, $p=0.163$ ve $p=0.198$) Kaspaz-3 boyanmada, artan dozlarda gruplar arasında her üç tabakada da apoptosis oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı doz bağımlı ilişki bulunmadı (Kaspaz-3 boyama ile sırasıyla $p=0.555$, $p=0.092$ ve $p=0.877$).

Tartışma: Tavşanlarda intravitreal olarak uygulanan TNF- α antagonisti Golimumab, retinal fotoreseptör ve bipolar hücrelerde apoptoza neden olmuştur. Uygulanan üç farklı dozda (5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml) da retina hücrelerinde kontrole göre artan hücre ölümü gözleendiğinden, tedavi planlaması esnasında bu dozlarda yapılacak intravitreal Golimumab enjeksiyonunun retina için toksik olabileceği göz önüne alınmalıdır.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, Golimumab, intravitreal anti-TNF ilaçlar, retina

SUMMARY

Purpose: The aim of this study is to evaluate the histopathological effect of intravitreal injection of Golimumab (anti-TNF) on the retina in rabbit eyes.

Methods: 16 rabbits (New Zealand albino rabbits) were included in the study. The rabbits were divided into 3 groups. Intravitreal injections of Golimumab [group 1 (n=6): 5 mg / 0.05 ml, group 2 (n=6): 10 mg / 0.1 ml, group 3 (n=4): 20 mg / 0.2 ml] were performed to the right eyes, while sham injections with the same volume were administered to the left eyes. The eyes of the rabbits were followed daily for a week. After one week of follow-up, the rabbits were sacrificed and the eyes were enucleated. Eye tissues were prepared for light microscopic immunohistochemical examination (TUNEL and Caspase-3 staining) which showed apoptotic activation and ultrastructural examination under electron microscopy.

Results: In hematoxylin-eosin (H&E) staining, none of the histological sections of the study eyes showed any evidence of retinal layer loss macroscopically. In all of the three different doses (5 mg / 0.05 ml, 10 mg / 0.1 ml and 20 mg / 0.2 ml), while number of the cells in outer nuclear ($p=0.001$, $p=0.044$ and $p=0.045$ respectively) and inner nuclear ($p=0.047$, $p=0.045$ and $p=0.048$ respectively) layers were decreased in Golimumab group compared to sham group; there was no significant difference in ganglion cell count ($p = 0.11$, $p = 0.067$ and $p = 0.20$, respectively) between three groups. In 5 mg/0.05 ml Golimumab injected eyes, there was no significant difference in the percentage of TUNEL staining in outer nuclear layer compared to control group, while the percentage of Caspase-3 staining of the same layer was significantly higher than the control group. ($p = 0.061$ and $p = 0.048$, respectively). For the same dose, in inner nuclear layer, TUNEL and Caspase-3 staining percentages were significantly higher in Golimumab group compared to control group. ($p = 0.018$ and $p = 0.015$, respectively) For 10 mg / 0.1 ml and 20 mg / 0.2 ml doses, TUNEL and Caspase-3 staining percentages in the outer and inner nuclear layers were found to be significantly higher than the control groups. (For TUNEL staining, $p = 0.009$, $p = 0.020$, $p = 0.029$ and $p = 0.029$ respectively, for Caspase-3 staining $p = 0.041$, $p = 0.04$, $p = 0.048$ and $p = 0.041$ respectively). In ganglion cell layer, for all dose groups, neither TUNEL nor Caspase-3 staining percentages showed any significant difference between Golimumab and control

groups (For TUNEL staining, $p = 0.937$, $p = 1.000$ and $p = 1.000$ respectively, for Caspase-3 staining $p = 0.064$, $p = 0.163$ and $p = 0.198$ respectively). Caspase-3 staining didn't show any significant higher apoptosis rates in increasing doses of Golimumab, therefore we didn't find any statistically significant dose-dependent relationship ($p = 0.555$, $p = 0.092$ and $p = 0.877$, respectively).

Discussion: Intravitreally administered TNF- α antagonist Golimumab caused apoptosis in both photoreceptors and bipolar cells in rabbit retina. Since there was increased retinal cell death in Golimumab injected eyes compared to control eyes for all of the three different doses (5 mg / 0.05 ml, 10 mg / 0.1 ml and 20 mg / 0.2 ml), potential toxicity of intravitreal Golimumab injections at these doses should be considered during treatment plan.

Keywords: Apoptosis, Golimumab, intravitreal anti-TNF drugs, retina

1. GİRİS VE AMAC

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α); makrofaj yüzeyinden, T-lenfositlerden, düz kas hücrelerinden ve fibroblastlardan eksprese edilen, 26 kDa ağırlığında homotrimerik yapıda transmembran bir proteindir.¹ Apoptotik hücre ölümünü ve inflamasyonu uyarırken; viral replikasyon ve tümör gelişimini engeller. ² TNF- α düzeyleri, romatoid artrit (RA) ve psöriaziste sinovial sıvıda, Chron hastalığı ve ülseratif kolitte bağırsak mukozasında ve akut üveit sırasında oküler dokularda artarak doku hasarı oluşturmaktadır.³⁻⁵

TNF- α 'nın inflamatuvar, neovasküler ve nörodejeneratif pek çok oküler hastalığın patogeneğinde yer aldığı gösterilmiştir.⁶⁻¹³ Periferik ülseratif keratit ve rekürren herpes keratiti olgularında keratositlerde artmış TNF ekspresyonu mevcuttur.^{7,8,14} Deney hayvanlarında endotoksin ile oluşturulan üveit modellerinde oküler dokularda artmış TNF konsantrasyonunun, T hücre efektör cevabını ve makrofaj aktivasyonunu kolaylaştırdığı izlenmiştir.⁹⁻¹¹ İnsan çalışmalarında enfeksiyöz olmayan üveit olgularında serum ve aköz TNF seviyesinin, kontrole göre artmış olduğu gösterilmiştir.^{12,13,15} Diyabetik retinopatide (DRP) hiperglisemi ile indüklenen oksidatif stresin yol açtığı TNF artışı ile retina damar yapısında bozulma ve neovaskülarizasyon ile buna eşlik eden makrofaj ve mikrogliya göçü olduğu bildirilmiştir.¹⁶⁻¹⁸ Tip 1 diabetes mellitus (DM) hastalarında retinopati ciddiyeti ile serum TNF düzeyleri arasında ilişki bulunmuştur.¹⁹ TNF, yaşa bağlı makula dejeneresansında (YBMD) kompleman aktivasyonu ve reaktif oksijen molekülleri oluşumu ile patogeneğinde rol oynamaktadır.²⁰⁻²²

Günümüzde klinik kullanımda olan beş adet TNF- α inhibitörü bulunmaktadır. Bunlar infliksimab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab ve Sertolizumab pegol olarak adlandırılmıştır. Bu ajanların kimyasal yapıları ve farmakolojik özellikleri birbirlerinden farklılıklar gösterir.²³

Golimumab, hem solubl hem de transmembran TNF- α reseptörlerine bağlanabilen insan anti TNF- α monoklonal antikorudur. İnsan TNF molekülüne yüksek afinite bağlanarak nötralize edebilen, yüksek kimyasal stabilitesi nedeniyle yarı ömrü uzun ve yüksek potansı nedeniyle daha az sıklıkta enjeksiyon rejimleri ile tedavide kullanılabilen nispeten yeni bir ilaçtır.^{24,25}

Romatolojik ve otoimmün hastalıklarda sistemik olarak verilen TNF- α inhibitörlerinin, hastalığın göz tutulumu için tedavi edici etkileri olduğu görülmüştür. Bu

ilaçlar, sistemik yan etkilerinden kaçınmak, vitreusu ilaç rezervuarı olarak kullanmak ve göze sınırlı hastalığın tedavisinde oküler dokulara ilaç erişimini kolaylaştırmak için , intravitreal olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{26,27}

Intravitreal enjekte edilen Etanercept, İnfliksimab ve Adalimumab'ın güvenlik ve etkinliği günümüze dek gerek hayvan modellerinde gerekse enfeksiyöz olmayan üveit, pseudofakik kistoid makula ödemi (KMÖ), DRP ve YBMD gibi hastalıkların tedavisinde çalışılmıştır.^{23,28} Ancak literatürde intravitreal Golimumab'ın güvenlik ve etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız; tavşan modelinde intravitreal Golimumab uygulamasının retina hücreleri üzerindeki histopatolojik etkilerini ve retina tabakalarında oluşturduğu apoptozisi ışık mikroskopisi, immünohistokimya ve elektron mikroskopisi ile araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RETİNA ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ

2.1.1. GİRİŞ

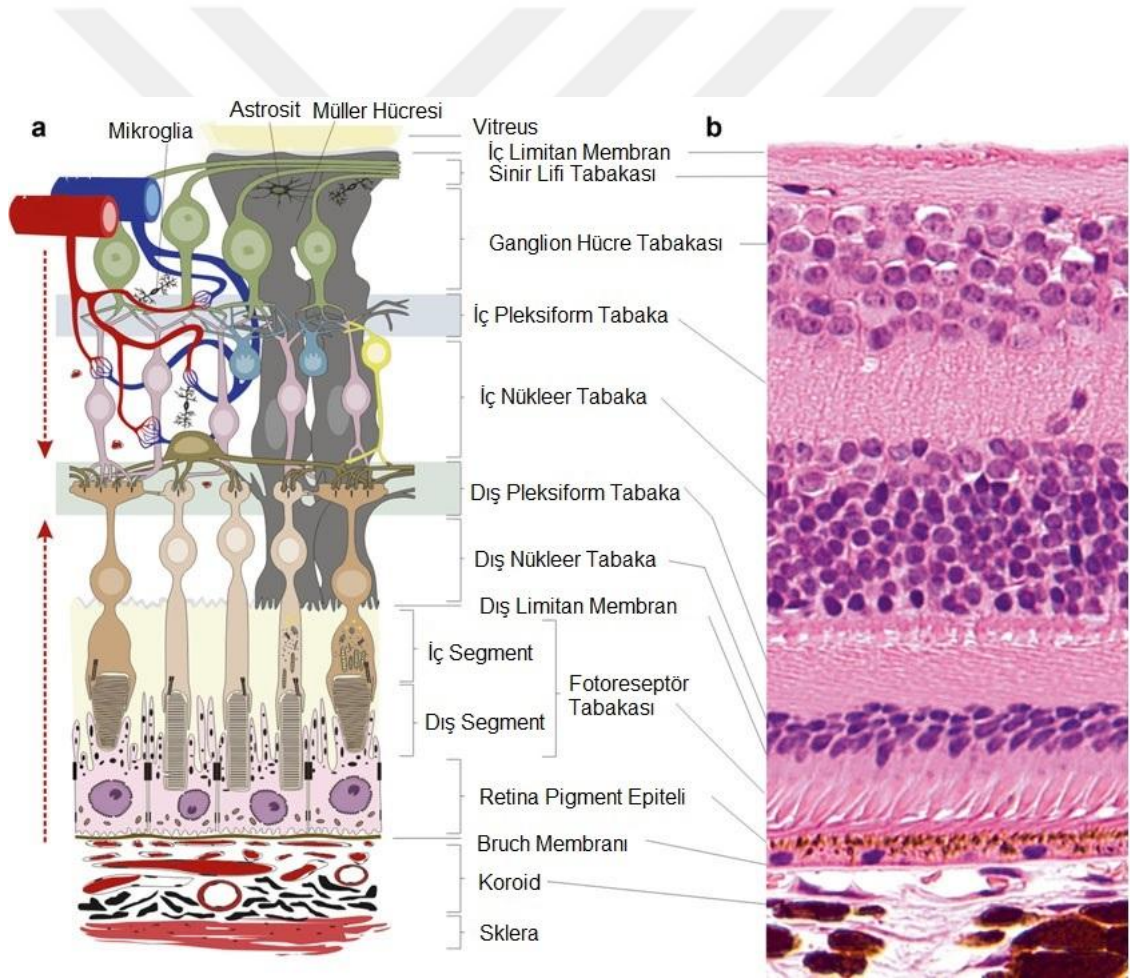
Retina, post mortem gözlerde dekole edilmiş retinanın ağ yapısına benzer özellikler göstermesi nedeniyle Yunanca ağ anlamına gelen “rete” kelimesinden köken almıştır. Optik çukurun en içteki tabakasından köken alan nörosensöriyel retina ve en dıştaki tabakasından köken alan retina pigment epiteli (RPE) olmak üzere iki katmandan oluşur.²⁹ Koroid ile yakın ilişkisi nedeniyle, bu damardan yoğun dokunun inflamatuvar hastalıklarında retina da etkilenmektedir. Kan retina bariyerinin bozulması nedeniyle sadece koroid değil, diğer ön ve arka segment yapılarının inflamatuvar hastalıkları özellikle makulada (örn. kistoid makula ödemi) bulgu vermektedir.³⁰

2.1.2 RETİNANIN TOPOGRAFIK ANATOMİSİ

İnsan gözünde retina önde silier cismin pars plana kısmı ile birleşerek oluşturduğu ora serratadan, arkada optik diske kadar uzanan yaklaşık 270 mm² boyutundaki alanı kaplar. Foveola (130 µm) ve ora serratada (100 µm) en ince olup, retinal liflerin optik diske girdiği yerde (560 µm) en kalındır. Topografik olarak arka kutup ve perifer retina olarak ayrılmaktadır. Makula arka kutupta yer alır; temporal damar arkadları tarafından çevrelenen fovea santralinden 5.5 mm yarıçaplı dairesel alanı kapsar. Makula lutea (sarı cisim) adı buradaki bipolar ve ganglion hücrelerinde bulunan ksantofil pigmentlerinin verdiği sarı renk nedeniyle konulmuştur. Fovea yaklaşık 1.85 mm çapa sahip olup, makula merkezinde bulunur ve merkezi 5° görme alanından sorumludur. Foveola, fovea merkezindeki 0.35 mm çapa sahip alandır ve merkezinde umbo bulunur. Foveayı çevreleyen 0.5 mm genişlikteki alan parafovea; parafoveayı çevreleyen 1.5 mm genişlikteki alan ise perifovea olarak adlandırılır. Perifer retina ise ora serratadan vorteks venlerin uç noktalarının önüne kadar uzanmaktadır.^{29,31}

2.1.3 RETİNANIN YAPISAL ORGANİZASYONU

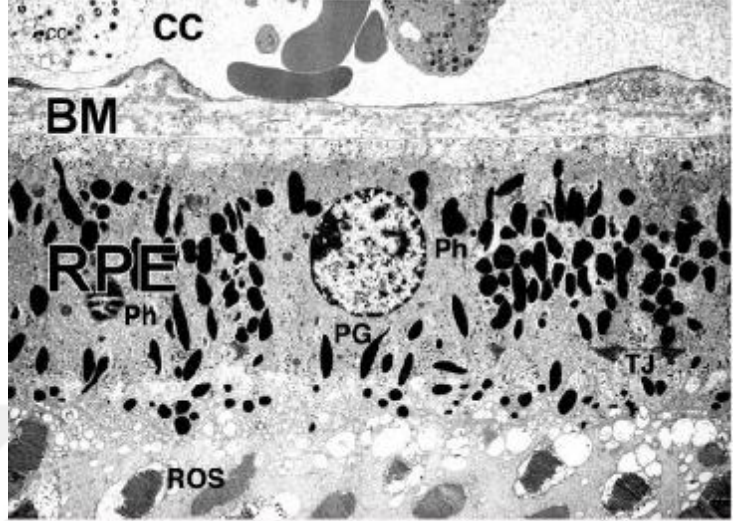
Nöroretina, fotopik uyarıyı elektriksel sinyale dönüştürmek üzere sinapslarla birbirine bağlanan özelleşmiş tabakalardan oluşur. Birincil nöronlar olan fotoreseptörler aldıkları uyarıyı ikincil nöron olan bipolar hücrelere iletirler. Bu uyarı direk (koni yolağı) ya da indirek (rod yolağı) olarak üçüncül nöron olan ganglion hücrelerine iletilir. Ganglion hücre aksonları optik siniri oluşturarak elektriksel sinyali lateral genikülat nükleusa iletir. Bu yapılanmada fotoreseptörleri birbirine bağlayan horizontal hücreler ve bipolar ve ganglion hücreleri ile iletişim halinde olan amakrin ve interpleksiform hücreler de rol oynar. Retinanın destek yapısını ise glial hücreler, özellikle de Müller hücreleri sağlar.³² (Resim 1)



Resim 1. Retinanın şematik organizasyonu a. Retina tabakaları ve hücreleri çizimi b. Makula histolojik kesiti (Hematoksilen-Eozin boyama, orta büyütme) (Springer yayıncılık izniyle)

Histolojik kesitlerde retina 10 katman şeklinde görülmektedir. Dıştan içe olacak şekilde bu katmanlar:

- **Retina Pigment Epiteli (RPE):** Tek sıralı küboidal ve silindirik hücrelerden oluşur ve Bruch membranının lamina vitreası üzerine yerleşir. Apikal mikrovillüsleri fotoreseptör dış segmentleri ile yakın komşuluk gösterir. RPE hücreleri genellikle mitoz sonrası hücreler olup hücre yoğunlukları hayat boyu azalır.



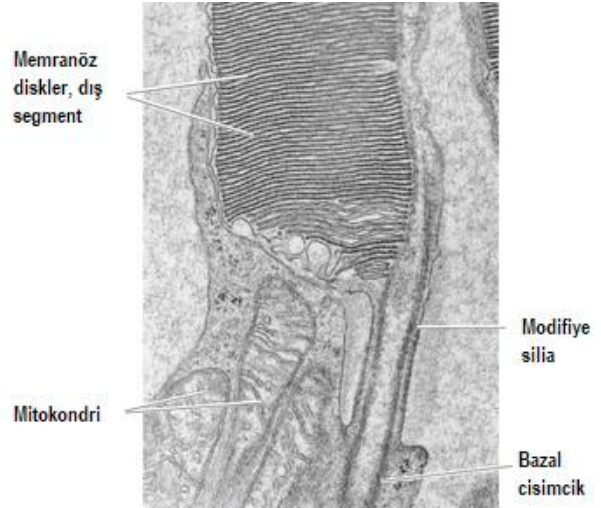
Resim 2. Donör insan gözünde normal RPE görünümü (Transmisyon elektron mikroskopisi). CC: koryokapillaris, BM: Bruch membranı, RPE: retina pigment epiteli, ROS: rod dış segmenti, Ph: fagozom, PG: pigment granülleri (<http://webvision.med.utah.edu/imageswv/StraussFig2.jpg>, Erişim tarihi: 22 Kasım 2017)

İnsanda inflamasyon ve travma sonrası geçici reaktif mitotik cevap görülse de belirgin RPE yenilenmesi yoktur. Apeksinde melanin granülleri

içerirken, nükleus ve mitokondrileri bazal kısımda bulunur. Retina periferinde RPE hücreleri çok çekirdekli olabilir. Ayrıca yeni yayınlarda ora serratada RPE kök hücreleri bulunduğu öne sürülmüştür. Yüksek metabolik kapasiteye sahip olduklarından RPE hücreleri mitokondriden zengindir. Birbirlerine apikal bölgede bulunan sıkı bağlantılar ile bağlıdırlar. Bu bağlantılar dış kan retina bariyerini oluştururken, iç kan retina bariyeri intraretinal kan damarlarının endoli tarafından oluşturulur.³³ (Resim 2)

- **Fotoreseptör Tabakası (FT):** Fotopik uyarıyı elektriksel sinyale dönüştüren tabakadır. RPE'ye dik şekilde uzanırlar ve RPE apikal mikrovillüsleri ile ilişki halindedirler. Rod (çomak) ve kon (koni) hücresi olmak üzere iki tür fotoreseptör mevcuttur.
- o **Rod hücreleri** sayıca daha fazladır (80-120 milyon) ve maksimum yoğunluğu $150,000/\text{mm}^2$ dir. Foveada bulunmazlar ve ışığa çok duyarlı olduklarından skotopik vizyondan sorumludurlar. Rod hücreleri iç ve dış segmentleri içeren apikal kısım ve nükleus ile hücre gövdesinden oluşan bazal kısımdan oluşur. Fotosensitiviteden sorumlu olan dış segment silindirik ve incedir ve plazma membranının çevrelediği yüzlerde intrasitoplazmik

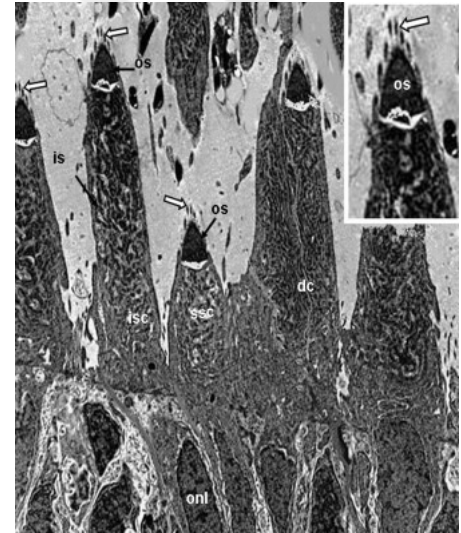
membranöz disk içerir. Fototransdüksiyondan sorumlu molekül rodopsin bu disklerde bulunur. Modifiye silia içeren sitoplazmik yapı dış ve iç segmentleri birbirinden ayırır ve bazal cisimciğe bağlıdır. Histolojik olarak iç segment iki farklı tabakaya ayrılabilir. Bunlar birçok mitokondri içeren dış eozinofilik ellipsoid tabaka ve ribozomdan zengin olan iç bazofilik myoid tabakadır. Elipsoid tabakada ayrıca sentiyol, düz endoplazmik retikulum, serbest ribozom ve glikojen granülleri bulunurken; myoid tabakada



Resim 3. Transmisyon elektron mikroskopisi. Rod hücresi (https://basicmedicalkey.com/wp-content/uploads/2016/06/B9781437719260100049_f04-04-9781437719260.jpg Erişim tarihi: 22 Kasım 2017)

düz ve granüllü endoplazmik retikulum, Golgi cisimciği, glikojen granülleri ve A vitamini bulunmaktadır. Dış limitan membranın üzerinde bulunan rod hücre nükleusları, kon hücre nükleuslarına göre daha küçük ve bazofilik olup belirgin nükleolusları mevcuttur. (Resim 3)

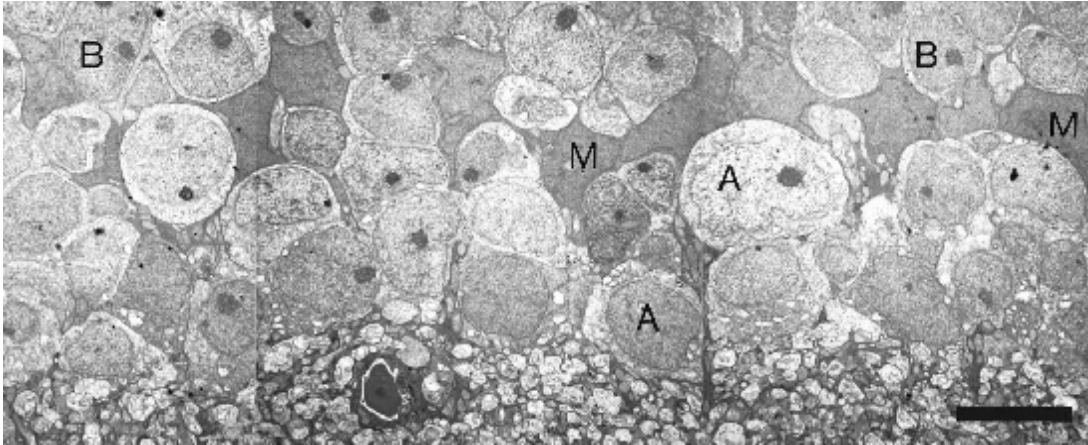
- o **Kon hücreleri** merkezi foveada maksimum yoğunluğa ($300,000/\text{mm}^2$) ulaşırlar da sayıları rodlara göre daha azdır. (5-6 milyon) Perifer retinaya doğru sayıca azalır ve boyutları foveada $85 \mu\text{m}$ iken perifer retinada $25 \mu\text{m}$ 'dir. İnsanda farklı dalga boylarını algılamak üzere özelleşmiş olan üç farklı kon tipi mevcuttur. Işık hassasiyetleri rod hücrelerinde göre daha az olup, temel olarak fotopik ortamda renk görmeden sorumludurlar. Foveada görsel rezolüsyonu arttırmak üzere her bir kon tek bir bipolar hücre ile sinaps yaparken perifer retinada birkaç kon hücresi tek bir bipolar hücre ile sinaps yapmaktadır. Rod hücrelerine benzer şekilde kon hücreleri de iç ve dış segmentler ile çanaklı uzantılardan oluşan apikal kısım ve hücre nükleusu, gövdesi ve pedikülü içeren bazal kısımdan oluşmuştur. Rod hücrelerindeki membranöz disklerin aksine



Resim 4. Transmisyon elektron mikroskopisi. Kon hücreleri. Lsc: uzun tek kon hücresi, ssc: kısa tek kon hücresi, dc: çift kon hücresi os: dış segment, is: iç segment, onl: fotoreseptör hücre çekirdeği, beyaz oklar: çanaklı uzantılar (Mostafa Ali Salem izniyle)

kon hücrelerinin dış segmentlerinde plazma membranının invajinasyonları görülmektedir ve bu alanlarda rodopsin yerine iodopsin pigmenti bulunmaktadır. Kon iç segmentleri rod iç segmentlerinden daha kısa ve kalındır ancak ellipsoid ve myoid tabakaları yapıca benzerdir.^{29,31} (Resim 4)

- **Dış Limitan Membran (DLM):** Müller hücreleri ve komşu fotoreseptörler arasındaki zonüler bağlantılardan meydana gelir. Fotoreseptör dizilimi ve stabilizasyonunda rol oynar.
- **Dış Nükleer Tabaka (DNT):** Kon ve rod fotoreseptörlerinin nükleus ve hücre gövdelerinden oluşur.
- **Dış Pleksiform Tabaka (DPT):** Rod ve kon hücrelerinin horizontal ve bipolar hücreleri ile sinaps yaptığı yerdir. Foveadan oblik olarak uzanan lifler (Henle tabakası) nedeniyle makulada en kalındır.
- **İç Nükleer Tabaka (İNT):** Horizontal, bipolar, amakrin ve Müller hücrelerinin nükleus ve hücre gövdeleri bu tabakada bulunur. (Resim 5)



Resim 5. Transmisyon elektron mikroskopisi. İç nükleer tabaka. A:amakrin hücresi B:Bipolar hücre M:Müller hücresi (<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/18/21/8936/F3.large.jpg>, Erişim tarihi: 22 Kasım 2017)

- o **Bipolar Hücreler:** Fotoreseptörler ve ganglion hücreleri arasında bağlantıyı sağlayan görme yolğunun ikincil nöronlarıdır. Sayıları yaklaşık olarak 130,000–140,000 civarındadır.

Dendritleri DPT, nükleusları İNT ve aksonları İPT’da bulunur ve dikey olarak dizilmişlerdir. Bipolar hücreler glutamat cevaplarına göre on (açık) ve off (kapalı) olarak sınıflandırılabilir. On bipolar hücreler yanıt olarak depolarize olurken; off bipolar hücreler hiperpolarize olmaktadır. Rodlar ile sinaps yapan bipolar hücreleri off tipinde iken kon bipolar hücreleri on ya da off tipinde olabilir.

- o **Horizontal Hücreler:** Rod ve kon hücrelerinden alınan görsel sinyallerin iletimi ve düzenlenmesinden sorumlu olan GABAerjik internöronlardır. Bipolar hücrelerin aksine yatay olarak dizilmişlerdir; nükleusları İNT ve uzantıları DPT’da bulunur.
- o **Amakrin Hücreler:** GABAerjik ve glisinerjik inhibitor internöronlardır. Hücre gövdeleri İNT’de, hücre uzantıları ise İPT’de yer almaktadır. Morfolojik olarak en az 30 farklı amakrin hücresi mevcuttur.
- o **İnterpleksiform Hücreler:** İki retina pleksiform tabakasını birbirine bağlayan bu hücreler amakrin hücresinden horizontal hücreye sinyal taşıyarak iç ve dış retina arasında bir geri bildirim döngüsü oluşturur. İnsanda çoğunlukla dopaminerjik olmakla birlikte GABAerjik ya da glisinerjik salgı da yapabilirler. Hücre gövdeleri ve nükleusları İNT’da bulunur.
- o **Müller Hücreleri:** Optik vezikülün iç tabakasından köken alır ve embriogenez esnasında retindaki nöron hücrelerinin yönlendirilmesi, pozisyonu ve diziliminin düzenlenmesi sağlar. DLM’den İLM’ye uzanan kolumnar bir hücre gövdesi vardır ve retinal hücrelere yapısal destek ve besin kaynağı sağlar. Damarsal yapılar içeren retina katmanlarında, damar etrafını çevreleyerek kan-retina bariyerine katkıda bulunur. Müller hücresinin iç bölgesi protein sentezi için özelleşmiş olduğundan yoğun endoplazmik retikulum ve serbest ribozom içerirken, dış bölgesi absorpsiyon ve hücre içi taşıma için özelleştikten mikrotübül, glikojen granülleri ve mitokondriden zengindir.
- o **Astrositler,** Müller hücreleri ile birlikte retinanın destek hücreleridir. Nöroepitelden köken alırlar ve fibröz ile protoplazmik astrosit olmak üzere iki farklı türü vardır. Nöronlar ve retinal damarların etrafında yerleşim gösterirler. Retina hasarında hipertrofi ve/veya hiperplazi

göstererek yara dokusu oluşumunu sağlarlar. İntraoküler inflamatuvar süreçlerde immün hücreleri ile etkileşim gösterirler.

- o **Mikroglia hücreleri** özelleşmiş makrofajlardır. DPT'den RSLT'ye kadar her tabakada dağılmış olup yapısal destek görevi yoktur. Aktive olduklarında antijen sunucu hücre olarak davranabilirler. Ayrıca inflamasyon cevabında sitokin salgılayarak önemli rol oynarlar.^{29,31,34-}

36

- **İç Pleksiform Tabaka (İPT):** Hücreler arası sinapsın en yoğun olduğu tabakadır. Bipolar hücre aksonları - ganglion hücre dendritleri, amakrin hücre dendritleri – bipolar hücre aksonları, amakrin ve interpleksiform hücre dendritleri burada sinaps yaparlar. Yoğun sinaptik yapı nedeniyle dış pleksiform tabakadan daha kalındır. Foveolada bulunmaz.
- **Ganglion Hücre Tabakası (GHT):** Ganglion hücre nükleus ve gövdeleri ile birkaç glia hücresi içerir. Makulada 6-9 kat ganglion hücresi mevcutken, perifer retinada genellikle tek katlıdır. Ganglion hücreleri görsel yolağın üçüncül duyu nöronlarıdır. Yoğun granüllü endoplazmik retikulum, Golgi cisimciği, bol miktarda nörofilaman ve yaşla sayıca artan lipofuksin granülleri içeren geniş hücre gövdeleri (10–30 µm) mevcuttur. Dendritleri İPT'ya doğru uzanırken, aksonları RSLT'nda retina yüzeyine paralel olarak seyreder. Ganglion hücreleri boyut, hücre uzantılarının dallanması ve amakrin ile bipolar hücreleri ile olan etkileşimlerine göre farklı türlere ayrılır:
- o **Magnoselüler (M) hücreler** ganglion hücrelerinin %10'unu oluşturur; geniş hücre gövdeleri ve hem rod hem kon bipolar hücreleri ile sinaps yapan uzantıları vardır. Aksonları lateral genikülat nükleusun magnoselüler tabakasına uzanır.
- o **Parvoselüler (P) hücreler** foveada baskın olan ganglion hücreleridir. Tek bir kon hücresinden sinyal taşıyan tek bir bipolar hücresi ile sinaps yaparlar.

Son yıllarda memeli retinasında intrinsik fotosensitivite özelliği olan yeni bir tür ganglion hücresi tanımlanmıştır. Melanopsin pigmenti içeren bu hücrenin pupilla ışık refleksi ve

sirkadian ritmin düzenlenmesi gibi görüntü oluşturulmayan görsel yollarda rol oynadığı düşünülmektedir.^{31,35,37,38}

- **Retina Sinir Lifi Tabakası (RSLT):** Ganglion hücrelerinin myelinsiz aksonları ve birkaç glial hücreden oluşur.
- **İç Limitan Membran (İLM):** Müller hücrelerinin bazal membranı ve bazı astrositlerin hücre uzantıları tarafından oluşturulur.

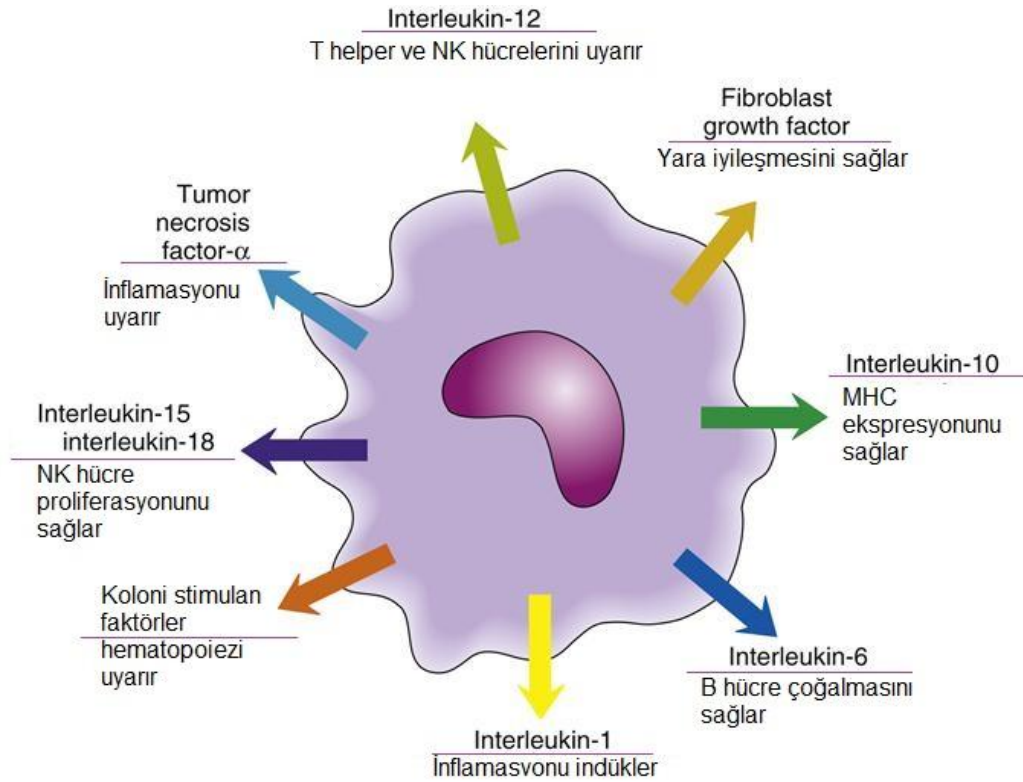
2.2. TEMEL İMMÜNOLOJİ

İmmünite, yabancı ve zararlı olan her türlü maddeye (protein, polisakkarid ve mikroorganizma, gibi) karşı organizmanın verdiği reaksiyondur. İmmün yanıtı başlatan yabancı maddeler antijen veya immünojen olabilir. İmmünojen terimi, sadece immün yanıt oluşturma yeteneğindeki herhangi bir madde için kullanılırken; antijen terimi bir molekülün, spesifik immünitenin ürünleri ile reaksiyona girebilme yeteneğini tanımlar; her zaman spesifik immüniteyi oluşturması beklenmez. Bütün immünojenlerin antijen olduğu ifade edilir, ancak bunun aksi her zaman geçerli olmayabilir. Hastalık yapan mikroorganizmaların çoğu iyi bir antijen yapısına doğada bulunurlar. İmmün sistem vücudun hemen her yerinde karşılaştığı sayısız yabancı antijene karşı savunma yapmak zorunda olduğundan immün sistem hücrelerinin kan, lenf ve dokular arasında dolaşabilme ve gerekli bölgelerde yerleşebilme özellikleri mevcuttur. Antijenin vücuda giriş yeri, oluşacak immün yanıtı etkiler. Deri yoluyla alınan antijenler, bu dokudaki makrofajlar (Langerhans hücre) ile tanınır ve lenfatik yoldan bölgesel lenf düğümlerine taşınır ve immün yanıt hem antijenin giriş yerinde hem de ilişkili lenf bezinde başlar. Kan dolaşımı ile giren antijenler dalaktaki makrofajlarca tanınır. Solunum yolu ve gastrointestinal kanal mukozasından girenler ise bölgedeki mukoza ilişkili lenfoid doku ile temas eder ve burada gerekli immün yanıt oluşturulur. İmmün yanıt nerede başlamış olursa olsun kan ve lenf yolu ile diğer bölgelere ulaşabilir. İmmün yanıtta immün sistem hücrelerinin yanı sıra, bunların oluşumu, farklılaşması ve aktifleşmesinde görev alan ve birbirleri arasında haberleşmeyi sağlayan sitokinler de önemli rol oynamaktadır.^{39,40}

2.2.1. İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİ

İmmün sistemin hücresel elemanları lenfositler, makrofajlar, Langerhans hücreleri, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller ve mast hücreleridir. Bu hücrelerin çoğunun aynı zamanda alt grup ve tipleri de vardır.

Makrofajlar



Resim 6. Makrofaj hücresinin sitokinleri ve inflamatuvar yanıtındaki işlevleri (Springer yayıncılık izniyle)

Tek çekirdekli olup (mononükleer), fagositik aktivite gösterirler ve vücutta yaygın olarak bulunurlar. Bulundukları dokuya göre alveolar makrofaj, osteoklast ve mikroglia gibi farklı isimler alırlar. Tüm bu hücrelerin oluşturduğu topluluk retiküloendotelial sistem (RES) veya mononükleer fagositik sistem olarak da adlandırılır. Makrofajlar kemik iliğinde üretilirler; kana geçer ve gezgin makrofaj ya da monosit adını alırlar. İnflamatuvar yanıtındaki görevleri *Resim 6*'da gösterilmiştir. Dokulara geçen monositler, kan dolaşımına geri dönemez ve dokularda yerleşik makrofaj olarak kalırlar.

Lenfositler

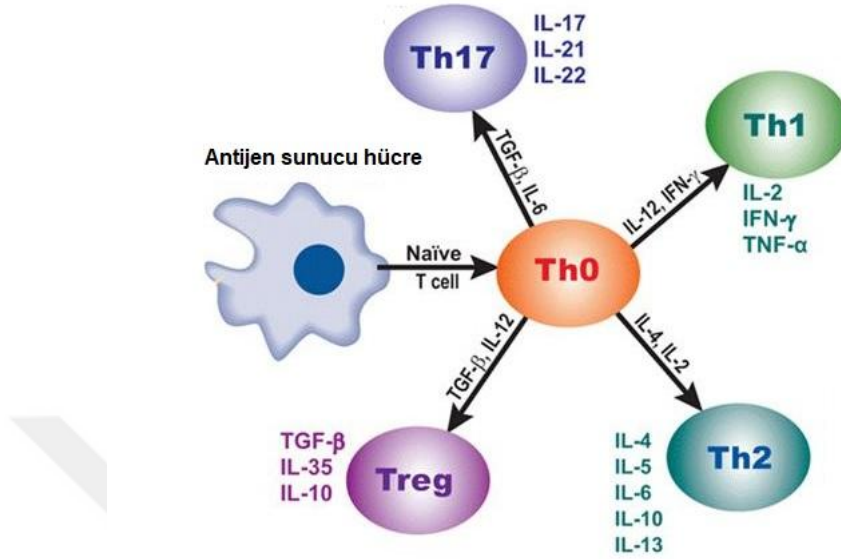
Kemik iliğindeki kök hücrelerden gelişerek, santral lenfoid organlarda (timus veya kemik iliği) olgunlaşırlar. Kan yoluyla periferik lenfoid doku ve organlara giderek buralardaki özelleşmiş bölgelere yerleşirler. Erişkin bir insanda yaklaşık 10^{12} lenfosit bulunur ve kandaki lökositlerin %20-30'unu lenfositler oluşturur. Lenfositler iri çekirdekli, dar sitoplazmalı, 8-12 mikron çapında hücrelerdir. Embriyolojik, işlevsel ve antijen yapıları açısından birbirinden ayrılan B ve T- lenfositleri olarak iki gruba ayrılırlar.

B-Lenfositler, hümmoral (antikora dayalı) immüniteden sorumludur. Sentezledikleri immünglobulin moleküllerini hücre yüzeylerinde taşırlar ve bu molekül antijene karşı özgül reseptördür. Bu yüzey immünglobulinler IgM ve IgD sınıfıdır. Özgülük nedeni ile immün sistemde, on binlerce çeşit antijene karşı özgül reseptör taşıyan on binlerce B-lenfosit çeşidi hazır durumda bulunmaktadır. Antijen vücuda girdiğinde, yüzeyinde bu antijene özgül reseptör taşıyan B-lenfositleri uyarılır. Uyarılan B-lenfositler plazma hücresine dönüşür ve immünglobulin sentezlemeye başlarlar. Uyarılan B lenfositlerinden bir kısmı ise bellek hücresine dönüşür. Bellek B-lenfositleri uzun ömürlüdür ve aynı antijenle tekrar karşılaştıklarında hızla çoğalarak daha hızlı ve güçlü antikor yanıtı oluşmasını sağlarlar.

T-lenfositler, hücreyel immün yanıtta sorumludurlar. Kemik iliğinde yapılır ve timusta olgun T-lenfosit haline gelirler. Bu olgunlaşma sırasında T-lenfosit yüzeyinde pek çok reseptör oluşur. Bunlardan en önemlisi antijenleri özgül olarak tanıyan T-hücre reseptörü (TCR)'dür. Bir T-lenfosit sadece tek bir çeşit antijen için TCR taşır ve B-lenfositlere benzer şekilde immün sistemde zaman içinde karşılaşma ihtimali olan onbinlerce çeşit antijene yanıt verebilecek onbinlerce çeşit T-lenfosit bulunmaktadır. Organizmaya antijen girdiğinde yüzeyinde bu antijene özgül reseptör taşıyan T-lenfositleri uyarılır ve sonuçta o antijene duyarlı T-lenfositler oluşur. İmmün yanıtta rolleri açısından T- hücre topluluğu yapı ve işlev özelliği farklı olan alt gruplardan oluşmaktadır:

Th lenfosit (T helper = yardımcı T lenfosit) CD4 yüzey molekülü taşır.

Tc/s lenfosit (T cytotoxic/supressor = sitotoksik/baskılayıcı T lenfosit) CD8 yüzey molekülü taşır.



Resim 7. T lenfosit hücrelerinin sitokinleri (Springer yayıncılık izniyle)

T-helper (Th) lenfositler, yardımcı ve uyarıcı rolü olan lenfositlerdir. CD4 yüzey molekülü taşırlar. (CD4+, CD8-). Çeşitli sitokinler salgılayarak T-hücresi, B hücresi, monosit-makrofaj ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve aktivite olarak güçlenmelerini sağlarlar. Bu özellikleri ile Th-lenfosit immün sistemin orkestra şefi pozisyonundadır.

T-cytotoxic/supressor (Tc/s) lenfositler, öldürücü ve baskılayıcı rolü olan lenfositlerdir. CD8 yüzey molekülü taşırlar (CD4- , CD8+). T-sitotoksik olanlar virus, bakteri ve parazit ile infekte hücreler, tümör hücreleri, transplante doku ve organ hücreleri gibi organizmaya zararlı veya yabancı hücrelere saldırarak yok ederler. T- baskılayıcı olanlar ise sitotoksik ve yardımcı T-hücre etkinliğini baskılayarak bağışık yanıtın dengede kalmasını sağlarlar. Bellek T-lenfositleri ise antijeni tanıyan ve antijenle tekrar karşılaştığında çok hızlı ve güçlü immün yanıt oluşturan hücrelerdir.

T hücresi alt tiplerinden salgılanan sitokinler *Resim 7'*de verilmiştir.

Doğal Öldürücü (Natural Killer-NK) Hücreler

Enfekte veya yabancı hücreleri öldüren, büyük granüllü lenfosit de denen hücrelerdir. T ve B-lenfositlerden farklı olarak yüzey immünglobulini veya TCR'si olmayan NK hücreleri, önceden tanıyıp duyarlı hale gelmeden hedeflediği hücreleri doğrudan tahrip edebilme

yeteneğine sahiptir. Hedef hücreleri genellikle parazit, mantar, bakteri özellikle de virüslerle enfekte hücreler ile tümör ve transplante doku hücreleridir. NK hücreleri bu özellikleriyle özgül olmayan vücut savunmasında önem taşırlar.

Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL) (Granülosit)

Kandaki lökositlerin %60-70'ini oluşturan çok loblu çekirdek ve bol granüllü sitoplazmaları bulunan hücrelerdir. Granüllerinin farklı boyanması ve farklı işlevlerinin olması nedeniyle nötrofil, eozinofil ve bazofil olmak üzere üç tip granülosit bulunur:

Nötrofiller, özellikle antikor ve kompleman varlığında güçlü fagositoz yetenekleri bulunan hücrelerdir. Mikroorganizmaları, yabancı maddeleri ve doku yıkım artıklarını hızla temizleyebilirler.

Eozinofiller, lökositlerin %2'sini oluştururlar. Fagositoz yetenekleri sınırlıdır olmasına karşın allerjik olaylarda ve parazitlerde etkili hücrelerdir.

Bazofiller, kanda en az bulunan lökositlerdir. (%0.5). 10-14 çapında, bazik boyalar (hemotoksilen) ile boyanan hücrelerdir. Genelde damarlarda bulunmasına rağmen dokulara sızabilir, histamin salınımı ile inflamasyona katılabilirler.

Mast Hücreleri

Bağ dokuda 20 µm, mukozada 10 µm çapında, sitoplazması histamin ve heparin içeren büyük granüllerle dolu hücrelerdir. Allerjik reaksiyonlarda rol oynar ve parazitlere karşı bağışıklıkta önemlidir.

Trombositler

Kan pıhtılaşması görevleri dışında, bağışık yanıt ve inflamasyonda rolü bulunan hücrelerdir.⁴¹

2.2.2 SİTOKİNLER

Sitokinler, immün sistem hücreleri arasındaki iletişimi sağlayan protein yapısında aracı moleküllerdir. Otokrin yani salgılandığı hücreyi etkileyen ya da parakrin yani komşu hücreleri etkileyen yapıda olabilirler. Sitokinler immün sistem hücrelerinin gelişmesi,

farklılaşması ve aktivasyonunda, antijen sunumu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, akut faz yanıtları gibi immün yanıtın ve inflamasyonun her safhasında, hücre ölümünde, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olayda rol oynayabilirler. Antijen spesifik olmadıkları halde yapımları ve salgılanmaları antijen uyarısına bağlıdır. Aynı hücre farklı sitokinler salgılayabilirken, farklı sitokinlerin hücre düzeyinde etkileri aynı veya benzer olabilir. Etkilerini spesifik reseptörlerine bağlandıklarında gösterebilirler ve etkileri kendi kendini sınırlandırabilir. IL-1 ve TNF ayrıca salgılanmadan, üretildikleri hücrenin membranına bağlı durumda iken hedef hücredeki reseptöre bağlanarak etki gösterebilirler. Bir sitokin diğer sitokinlerin ekspresyonunu uyarabilir veya baskılayabilir. Etkileri sinerjistik ve antagonistik olabilir.

Sitokin Aileleri:

- Hematopoetinler; Eritropoetin, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF
- TNF ailesi ; TNF- α ve β , CD40L, CD30L, CD27L, FasL
- IL-1 ailesi ; IL-1 - α ve β , IL-1Ra, IL-18
- Interferon (IFN) ailesi; IFN α , β , γ
- IL-10 ailesi; IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29
- IL-12 ailesi; IL-12, IL-23, IL-27
- Diğerleri; TGF- β (transforming growth factor- β), IL-16, IL-17, IL-25 [117]

Sitokin aracılı sinyal iletimi:

Sitokin reseptörlerinin hücre yüzeyinde ekspresyonu, bu reseptöre bağlanacak sitokin ya da başka bir sitokin tarafından regüle edilir. Sitokinler hedef hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlandıktan sonra hücre içine sinyal iletimi ile nükleus ya da sitoplazmada spesifik hedef genlerin transkripsiyonu, yeni mRNA ve protein sentezini başlatır. Sentezlenen sitokin ile hücrenin aktivasyonu, farklılaşması, büyüme ve çoğalması sağlanır.

Sitokin Tipleri

Proinflamatuvar sitokinler: TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- α , IFN- γ başlıcalarıdır. TNF- α , IL-1 β , IL-6 makrofajlar ve monositler tarafından üretilir. Serum amiloid A, C-reaktif protein, fibrinojen, kompleman faktörleri, alfa 1-antitripsin gibi akut faz proteinlerin sentezini arttırırlar. Proinflamatuvar sitokinler, mikro-organizmalar, antijenler, bitkisel lektinler, lenfokinler ve bazı kimyasallar tarafından indüklenir.

Anti-inflamatuvar sitokinler: IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, TGF- β ve bazı çözünür sitokin reseptörleridir. Anti-inflamatuvar etkisi olan çözünür sitokin reseptörlerinden başlıcaları olan TNF reseptörü, TNF'nin etkisini ve IL-1 reseptörü tip II ise IL-1 β 'nın etkisini antagonize eder. IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra), IL-1'in inhibitörü olup IL-1 reseptörüne bağlanmak için onunla yarışır.⁴¹⁻⁴³

İnflamatuvar yanıtta rol oynayan önemli sitokinler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. İnflamatuvar yanıtta rol oynayan önemli sitokinler, kaynak hücreleri ve görevleri

Sitokin	Salgılandığı Hücre	Görevi
IFN-a	Makrofaj (özellikle virüsler tarafından uyarılır)	Virüs replikasyonunu engeller, kanser hücrelerine toksiktir. Lökosit çoğalmasını ve T ve B lenfosit ile NK hücre aktivitesini uyarır. Ateş oluşturur.
IFN-b	Fibroblast (özellikle virüsler tarafından uyarılır)	Virüs replikasyonunu engeller, kanser hücrelerine toksiktir. NK hücre aktivitesini uyarır. Ateş oluşturur.
INF-γ	T lenfosit (T _H 1 ve CD8 ⁺) ve NK hücresi	Virüs replikasyonunu engeller. Antijen sunumunu uyarır. Hücre büyümesini engeller. Makrofaj ve myeloid hücre serisi çoğalmasını sağlar. B lenfosit IgG sentezlemesi için uyarır.
IL-1	Mononükleer fagosit	T hücre ve makrofajı uyarak akut faz reaksiyonlarını başlatır. TNF- α ve endojen pirojenlere benzer şekilde ateş oluşturur.
IL-2	T helper hücre	T hücre büyümesi ve timusta matürasyonu, B hücre çoğalması ve NK aktivasyonu
IL-3	T hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar	Diğer lenfositlerin, pluripotent kök hücrelerin, mast hücrelerinin ve granülositlerin çoğalması ve farklılaşması
IL-5	T helper hücre	B hücre çoğalması, IgA sentezi ve eozinofil farklılaşması
IL-6	Mononükleer fagosit, T helper hücre, endotel, tümör hücresi	B hücrelerinden immünglobulin salgılanması, ateş oluşumu, hematopoietik kök hücre ve sinir hücrelerinin farklılaşması
IL-7	Kemik iliğindeki stromal hücreler	İmmatür lenfositlerin T ve B lenfositlerine farklılaşması
IL-8	Makrofaj	Kemotaksis
IL-9	T helper hücre	T helper hücrelerinin büyümesini uyarır
IL-10	T hücreleri ve makrofajlar	Makrofaj ve dendritik hücrelerin aktivasyonu ve IL-12 üretimini engeller
IL-11	Kemik iliğindeki stromal hücreler	Trombosit oluşumunu uyarır
IL-12	Makrofaj, dendritik hücre	Th1 aktivitesini artırır, T lenfosit ve NK hücrelerinden INF-g salınımını sağlar
IL-13	Th2 hücresi	B hücre gelişimi ve IgE üretimini artırır, makrofajları baskılar
IL-14	T lenfosit	B hücre proliferasyonunu sağlar
IL-15	Makrofaj (özellikle viral enfeksiyon sonrası)	IL-2 ye benzer fonksiyonlar, CD8 ⁺ T hücre ve NK hücre proliferasyonu
IL-17	CD4 ⁺ T hücresi	Koloni stimüle edici faktör ve kemokin sentezini uyarır
IL-18	Makrofaj	NK hücre proliferasyonu ve Th1'den INF-g sentezi
IL-23	Makrofaj ve dendritik hücre	IL-12 ye benzer, hücrel immüniteyi uyarır
TNF-α	Makrofaj	Lökositözu uyarır. Ateş, kilo kaybı, infamasyon, bazı tümörlerin nekrozuna neden olur. Lenfokin sentezi sağlayarak makrofajları aktive eder. Virüs ve tümör hücrelerine toksiktir.
TNF-b	T hücre	T ve B hücre proliferasyonunu engeller
G-KSF, M-	Makrofaj, T hücre,	Kemik iliğinde granülosit ve monosit üretimi

KSF, GM-KSF	fibroblast	
TGF- β	T hücre, makrofaj	T hücre, B hücre ve makrofajı inhibe eder

2.3. OKÜLER İMMÜN AYRICALIK

Gözün immün ayrıcalığı ilk kez 1940'ta Sir Peter Medawar tarafından ön kamaraya yerleştirdiği yabancı cisim greftinin red reaksiyonu göstermediğini gördüğünde tanımlanmıştır.⁴⁴ Bunu sağlayan çeşitli faktörler mevcuttur. Kan-retina bariyeri ve efferent lenfatik akımın olmaması göze herhangi yabancı bir hücrenin giriş ve çıkışını kısıtlar. İnhibitör oküler mikroçevre, hücreye bağlı ya da çözünür immüsupresif faktörlerden meydana gelir. TGF- β ve melanosit uyarıcı hormon (MSH) gibi nöropeptidler buna örnek olarak verilebilir. Müller hücresi gibi gözde yerleşen özelleşmiş hücreler, salgıladıkları maddeler ve direk kontakt inhibisyon ile immün sistem hücrelerini inhibe edebilir.⁴⁵ Retina pigment epiteli hücreleri ise T hücrelerini inhibe etmekle kalmaz; onların Treg hücreye dönüşmesini sağlar.⁴⁶ Ayrıca oküler parenkim hücrelerinde MHC-1 VE MHC-2 gibi yabancı moleküllerin tanınmasını sağlayan hücre yüzey proteinlerin daha az miktarda eksprese edildiği izlenmiştir.⁴⁷

Gözdeki immün yanıtı kontrol eden diğer yapılar şunlardır:

Klonal delesyon: Fas ligand kornea, iris, siliyer cisim ve retinada sürekli üretilmektedir. İn vivo doku grefti çalışmaları ve doku kültürleri, dokudaki Fas ligandın göz içi yapılara giren antijen tanıyan Fas+ T-hücrelerinin yıkımına yol açtığını göstermişlerdir.⁴⁸

Klonal anerji: Aköz sıvıda TGF- β 2, serbest kortizol, IL-1 reseptör antagonisti gibi birçok immünomodülatör molekül bulunmaktadır. Uyarılmış T-hücreleri aköz içerisinde kültüre edilip antijene maruz bırakıldıklarında prolifer olamamakta ve INF- γ gibi mediatörleri sentezleyememekte; ortama serbest TGF- β 2'i inhibe etmek için TGF- β 2 reseptörü konulduğunda normal INF- γ üretimi başlamaktadır.⁴⁹

Kompleman inhibisyonu: Oküler dokularda bulunan kompleman sistemini kontrol eden faktörler göz yapılarını komplemana bağımlı oluşan yıkımdan korumaktır.

İmmün deviasyon: Ön kamarasına allojenik tümör hücreleri konan fareler allojenik

donörden alınmış cilt greftini reddetme yeteneğini kaybetmektedirler. Son çalışmalarda ön kamaraya yabancı protein enjeksiyonunun göz immün cevabını Th2 ya da hümmoral yanıtı doğru kaydırđıđı gözlenmiştir. ⁴⁸

T-hücre supresyonu: Ön kamaraya yerleştirilmiş olan antijen immün sistemin, gecikmiş tipte immün yanıtı engelleyecek antikorlar üretmesine neden olmaktadır. Deneyssel çalışmalarda gözde çözünen bir molekül ya da antijen taşıyan antijen sunucu hücrenin kana karışınca dalağa gittiğini göstermektedir. Dalakta ön kamara ilişkili immün regülasyonu düzenleyen T-hücreleri (CD8+) oluşur. Bunların bazıları TGF- β salgılamakta ve CD4+ T-hücre aktivasyonunu lokal ve sistemik olarak engellemektedir. ⁵⁰

2.4. APOPİTOZİS

2.4.1. GİRİŞ

Apoptoz Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan ve ilk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından kullanılan bir terimdir. 1983 yılında jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu gösterilmesi ile hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve böylece apoptoz ile ilgili çalışmalarda hızlanmıştır. ⁵¹

Apoptoz hasta ve kullanılmayan hücrelerin genetik olarak kontrol edilen bir mekanizma ile çevre hücrelere zarar verilmeden kontrollü yok edilme olayıdır. Apoptoz fizyolojik olabileceği gibi patolojik etkenlerle de ortaya çıkabilir, hücre bütünlüğünü bozarak nekroza neden olan her durum hücre hala yaşıyorsa apoptozla sonuçlanabilir. ⁵²

Apoptoz gelişim sırasında, immün sistem reaksiyonlarında, hücreler kalıcı olarak zedelendiğinde ve yaşlılıkta görülür. Embriyogenez sırasında hücrelerin programlı yıkımı, hormon bağımlı involüsyon, tümörler ve akut inflamatuvar yanıtta polimorf nüveli lökositlerin ölümü gibi çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olay apoptozu tetikler. ⁵³

Apoptoz hücre içinden ve dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyretmekte ve hücrenin fagositozu ile sona ermektedir. Bu aşamalar:

2.4.2. Apoptozun Başlatılması

Bir hücrede apoptozun başlaması için öncelikle genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir hücre içi veya hücre dışı sinyal gelmelidir.

1- Hücre dışından kaynaklanan sinyaller:

a- Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği: Hücreler komşu hücrelerden ve ekstraselüler matriksten gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise gitmektedirler.

b- Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu: Bazı sitokinler hücre membranındaki reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozisde rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesidir. Bu reseptör ailesinin birçok üyesi olup bir kısmı apoptozis oluştururken, bir kısmı ise apoptozisten korumaktadır. TNFR içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR-1'dir. Bu reseptörler uyarıldığında apoptoz için başlatıcı kaspazlar aktive olur.

c- Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler: Hipoksi, ısı, anti-neoplastik ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler de DNA hasarı oluşturarak apoptozisi başlatmaktadır.

2- Hücre içinden kaynaklanan sinyaller:

DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozukluklarıdır.

2.4.3. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

Hücre içinden ve dışından gelen sinyaller hücre içindeki kaspaz (cysteine aspartate spesifik proteases) adı verilen proteazları aktive etmektedir. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla kaspazları aktive etmektedir. Sinyaller mitokondri dışı zarında geçirgenliği artırır ve bu geçirgenliği arttıran proteinlerden en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bcl-2 grubu proteinlerin bir kısmı pro-apoptotik etkili

iken diğerk kısmı ise anti-apopitotik etkilidir. Pro-apopitotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apopitotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlarlar.^{54,55}

2.4.4. Kaspaz Ailesi ve Apoptozisdeki Roller

Kaspazlar, aktif merkezlerinde sistein yer aldığı için sistein proteazlar olarak adlandırılan bir enzim grubudur ve aspartik asitten sonraki peptid bağıny kırarlar. Tanımlanmış 14 kaspaz mevcuttur ve çoğı apoptozisde rol oynamaktadır.⁵⁶⁻⁵⁸ Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad oluştururlar. Kaspaz 2,8,9,10 başlatıcı kaspazlar iken; kaspaz 3,6,7 efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalarlar.⁵⁹

Kaspazlar, DNA endonükleazı bağlayan proteini yıkarak DNA kırıkları oluştururlar. Aktini yıkan proteini aktifleştirerek hücre şekil bozukluğına neden olurlar. Membran iç yüzünde bulunan fosfotidilserini dış yüzeyine yer değıştirir, intrasellüler adhezyon molekülleri (ICAM) ve trombospondin gibi adhezyon moleküllerini ortaya çıkarırlar.⁵¹ Kaspazların çoğı sitoplazmada bulunmakla birlikte bazı üyeleri, örneğın kaspaz 12, golgi aparatında, kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondride bulunabilir.⁶⁰ En önemli başlatıcı kaspazlar, tip I apoptozis (mitokondri aracılı, intrinsik) için kaspaz 8, tip II apoptozis (ekstrinsik) için kaspaz 9, tip III apoptozis (endoplazmik retikulum aracılı) için kaspaz 12'dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın son ve en önemli göstergesidir.⁶¹

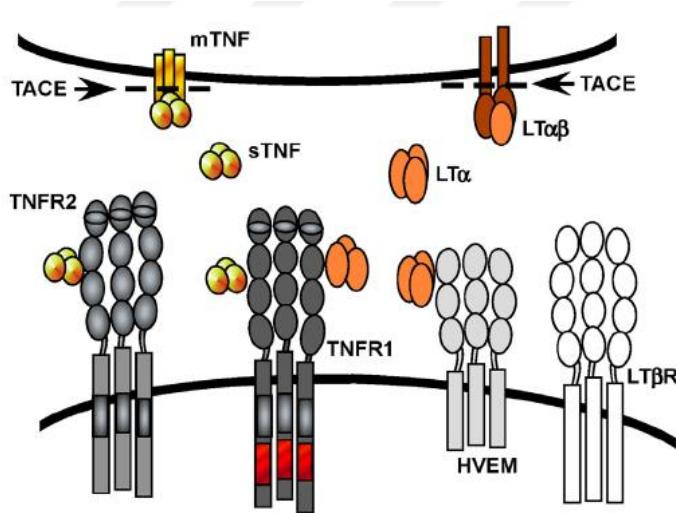
Apoptozisde hücreler morfolojik olarak yüzey yapılarını ve diğerk hücrelerle temas yüzeyi özelliklerini kaybeder. Hücreler sıvı kaybederek küçülür ve büzüşür. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirlerine yakınlığı görülür. Membranlar bütünlüklerini korurlar ve organeller genel olarak sağlamdır. En önemli değışiklik çekirdekde gözlenir. Kromatin, çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşır (kromatin kondensasyonu), çekirdek büzüşür ve bazen membranla sarılı olan birkaç parçaya ayrılabilir (karyoreksis). Hücre, zarla çevrili küçük parçalara bölünerek apoptotik cisimcikler ve myelin figürler oluşturur. Apoptotik cisimcikler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından temizlenir.⁵⁸

2.5. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR (TNF)

2.5.1. GİRİŞ

Tümör nekrozis faktör (TNF), ilk olarak 1975 yılında in vitro ortamda endotoksin ile uyarılarak, tümör nekrozuna yol açan bir sitokin olarak tanımlanmıştır. Rekombinant TNF ve organizmada TNF üretimini indükleyen lipopolisakkaritlerin laboratuvar koşullarında kolayca üretilmesi sonrası ilk in vivo deneyler mürin tümör modellerinde yapılmıştır.⁶² 5 farklı insan tümörü dokusu fare vücuduna heterotransplante edilerek yapılan deneylerde, in vivo olarak da tümör büyümesini engellemesinin keşfinin ardından bu sitokin üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmıştır.⁶³

Faz I klinik deneyler, TNF monoterapisi ile başlamıştır. Tüm olgularda ateş, bulantı-kusma, nefes darlığı, taşikardi, hipotansiyon ve konfüzyon gibi doza bağımlı yan etkiler gözlenmiştir. Bazı hastalarda geçici düzelme görülse de zaman içerisinde tümör boyutu eski haline dönerken, Rekombinant IL-2 ile birlikte verildiğinde de anlamlı başarı sağlanamamıştır. Yaklaşık 25 Faz I ve Faz II deney sonunda TNF'in tümör tedavisinde beklendiği gibi yarar sağlamadığı görüşü hakimiyet kazanmıştır.⁶⁴⁻⁶⁶ Bu deneylerle eş zamanlı



Resim 8. TNF sitokin-reseptör etkileşimi. TACE: TNF- α converting enzyme (TNF- α dönüştürücü enzim), STNF: Solubl (çözünmüş) TNF, TNFR1/TNFR2: TNF- α reseptörü $\frac{1}{2}$ HVEM: Herpes virus entry moderator (Herpes virüs giriş moderatörü) LT: lenfotoksin (https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1359610114000781-gr1_lrg.jpg Erişim tarihi: 26 Kasım 2017)

olarak fare modelinde, TNF'e karşı oluşan nötralizan antikorların hayvanı endotoksemiden koruduğu keşfedilmiştir. TNF'in tümör hücrelerini nekroza uğratmanın yanı sıra direk etkiyle ya da IL-6 ekspresyonunu arttırarak inflamasyonu güçlü bir şekilde uyaran bir sitokin olduğu

gözlemlenmiştir.⁶⁷ Bu buluşun ardından TNF nötralizasyonu, anti-inflamatuvar tedavi alanında kullanılmaya başlanmıştır.

TNF 26 KDa ağırlığında bir transmembran proteinidir. Enfeksiyon veya immünolojik hasara yanıt olarak esasen monosit-makrofaj sistemi ve T-lenfositleri, az miktarda da nötrofiller ve

mast hücreleri tarafından sentezlenen pleiotropik bir sitokindir. Endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından da üretilir. Membrana bağlı formu bir metalloproteinaz olan TNF- α dönüştürücü enzim (=TNF- α converting enzyme, TACE) tarafından parçalanırsa, 17 KDa ağırlığında trimerik çözünür TNF (=solubl TNF, sTNF) oluşur. Her iki form da TNF reseptörleri olan TNFR-1 (p55/60) ve TNFR-2'ye (p75/80) bağlanabilir. (Resim 8)

TNF doğrudan sitotoksitenin yanı sıra, sitokin üretimi, reaktif oksijen salınımı, araziidonik asit mediatörleri, metalloproteinazlar, kemokinler, adezyon molekülleri ve anjiyonez faktörleri gibi diğer proenflamatuvar molekülleri düzenlenmesi gibi mekanizmalar ile inflamasyon oluşturur.

TNF- α 'nın biyolojik etkilerinden bazıları şöyle sıralanabilir:

- ▼ Başlıca nötrofiller, eozinofiller ve mononükleer fagositler olmak üzere, lökositlerin mikroorganizmaları öldürmesini aktive eder.
- ▼ IL-1, IL-6, TNF- α 'nın kendisini ve diğer kemokinleri üretmek üzere mononükleer hücreleri ve diğer hücre sınıflarını uyarır.
- ▼ Damar endotelinde bazı adezyon moleküllerinin [ICAM-1, vasküler endotelyal hücre adezyon molekülü (VCAM)-1, endotelyal lökosit adezyon molekülü (ELAM)-1] ortaya çıkmasını sağlar. Bu moleküller endotelin nötrofiller ve mononükleer hücreler için adeziv olmasını sağlayarak lökositlerin inflamasyon bölgesine toplanmasını sağlar.
- ▼ Sınıf 1 Major Histocompatibility Complex (MHC) molekül ekspresyonunu arttırarak sitotoksik lenfositlerin virüsle enfekte olmuş hücreleri öldürmesine yardımcı olur.
- ▼ Mononükleer fagositler ve vasküler endotelden IL-1 ve IL-6 salınımı ve hepatositlerin serum amiloid A, C3 ve α 2 makroglobulin, C-reaktif protein (CRP) gibi akut faz proteinlerini sentezlemesini indükler.
- ▼ T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunu uyararak immünglobulin yapımını destekler.
- ▼ Endojen pirojen özelliği nedeniyle hipotalamik etkiyle ateş oluşturur. Ateşin TNF- α ve IL-1'e yanıt olarak yükselmesi sitokinle uyarılmış hipotalamus hücreleri tarafından arttırılan prostaglandin E2 senteziyle olur.
- ▼ Damar endotelinin prokoagülan ve antikoagülan fonksiyonlarını düzenler.

- ▼ Fibroblast ve sinoviyal hücrelerin proliferasyonunu, osteoblastik alkalen fosfataz aktivitesini, osteoklastların kemik rezorbsiyonunu ve kondrositlerin kıkırdak döngüsünü uyarır.

TNF aktivitesinin nötralize edilmesi, proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu, inflamasyon bölgesine göç eden kan hücrelerinin ve vasküler geçirgenliğin azalması ile vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) angiogenez üzerindeki etkisinin baskılanmasına neden olur^{68,69}

İnflamasyon, üveit, DRP ve DMÖ, YBMD gibi körlükle sonuçlanabilen pek çok retina hastalığında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle anti-inflamatuvar ilaçların tek ajan ya da kombine tedavi şemasıyla, oküler inflamatuvar hastalıklarda sistemik ve lokal olarak kullanımı denenmiştir.^{2,4,70}

2.5.2. OFTALMOLOJİDE HAYVAN MODELLERİNDE TNF

Enfeksiyöz olmayan arka segment intraoküler inflamasyonu (Posterior segment intraocular inflammation – PSII) T helper hücre tarafından yönetilen, makrofaj ve T lenfosit kaynaklı hasardır. En önemli örneği intermediate ve arka üveittir. PSII'nın deneysel modeli olan otoimmün uveoretinit modelinde T helper-1 ve sitokini TNF- α önemli rol oynamaktadır. Bu modelde intraoküler TNF m-RNA ekspresyonunda 16 kat artış görülmüştür.⁵ Aynı modelle tasarlanan diğer bir çalışmada çözünmüş TNF reseptör spesifik IgG ile TNF nötralizasyonu, makrofaj aktivitesi ve NO salınımının inhibisyonunu sağlayarak fotoreseptör hasarını azaltmıştır.⁷¹ TNF'in üveitte proinflamatuvar rolü olduğu, intravitreal enjeksiyon sonrası tavşan gözlerinde üveit geliştiğinin görülmesi ile desteklenmiştir. Bu modelde enjeksiyon sonrası aköz sıvıda monosit ve makrofaj yoğunluklu bir inflamatuvar hücre artışı olduğu ve bu cevabın maksimum 48. saatte izlendiği görülmüştür.⁷²⁻⁷⁴ Benzer şekilde, Lewis rat çalışmalarında TNF intravitreal enjeksiyonu erken ve geçici bir IL-6 üretimi sağlayarak rat gözlerinde üveit oluşturmuştur.⁷⁵ IL-1 ve TNF'nin üveit indüksiyonundaki rolü farelerde pasif Arthus reaksiyonu ile araştırılmış ve bu sitokinlerin reseptörlerinin yokluğunda immün kompleks ilişkili üveitin şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. Ancak her iki sitokin de endotoksin ilişkili üveit (EİÜ) için esansiyel değildir; öyle ki TNF inhibitörlerinin EİÜ'de etkisiz

olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.⁷⁶ DRP rat modelinde Etanercept tedavisi ile retinal damarlara lökosit adezyonu ve kan-retina bariyeri hasarı azalmıştır.⁷⁷ Ayrıca deneysel mürin ve tavşan modellerinde TNF'in retinal neovaskülarizasyonda rolü olabileceği gösterilmiştir.⁷⁸ TNF inhibisyonun sadece arka segmentte değil, ön segment inflamasyonunda da önemli rol oynadığı korneal transplant sonrası red reaksiyonlarında anti-TNF tedavinin etkinliğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır. Allograft korneal transplantasyon rejeksiyonu gözlenen tavşan gözlerinde, ön kamaradaki TNF mRNA miktarının red reaksiyonu esnasında anlamlı olarak arttığı; ancak ön kamaraya TNF reseptör Ig enjeksiyonu sonrası red reaksiyonun azaldığı izlenmiştir.⁷⁹

2.6. TNF- α ANTAGONİSTLERİ

2.6.1 GENEL BİLGİLER

TNF antagonistleri ilk olarak 1990'lı yılların sonunda RA tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.⁶⁹ Günümüzde klinik kullanımda olan beş tane anti-TNF- α ilacı bulunmaktadır. Bunlar İnfliksımab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab ve Sertolizumab pegol olarak adlandırılmıştır. İnfliksımab, insan immünglobülin (Ig) G1 Fc bölgesi ve fare kökenli değişken bölge içeren, kimerik yapıda bir monoklonal antikordur. Etanercept, rekombinant TNFR füzyon proteindir ve insan IgG1'in Fc parçasına bağlı insan TNFR2'nin iki ekstrasellüler parçasından oluşur. Adalimumab ve Golimumab ise insan sabit ve değişken bölgelerini içeren humanize monoklonal anti-TNF- α antikorlarıdır. Sertolizumab pegol, humanize monoklonal anti-TNF Fab fragmanıdır.⁸⁰ Bu ajanların farmakolojileri, özellikle monoklonal antikorlar ve Etanercept, birbirlerinden farklılıklar gösterir. Etanercept sadece trimerik solubl (s)TNF'yi bağlarken, İnfliksımab ve Adalimumab hem monomerik, hem trimerik sTNF'yi bağlar. Etanercept, sTNF'ye monoklonal antikorlardan daha yüksek afiniteyle bağlanır. Etanerceptin bağladığı TNF'nin %90'ı 2-3 saat içinde serbest hale gelirken, İnfliksımab çok daha stabil bir kompleks oluşturur.⁸¹ Etanercept'ten farklı olarak, İnfliksımab transmembran (tm) TNF'yi de oldukça güçlü bağlar. Yani, tmTNF'lerin Etanercept ile bağlanması İnfliksımab'a göre daha düşük afiniteli ve geri dönüşümlüdür. Buna bağlı olarak biyolojik aktivite inhibisyonu daha azdır.⁸² Monoklonal antikorlar TNF- α 'nın hem TNFR1 hem de TNFR2 reseptörüne bağlanmasını önlerken, Etanercept ise sadece TNFR2'ye bağlanmayı önleyebilir. Diğer bir fark da, Etanercept'in TNF- α 'nın yanı sıra makrofajlar ve T hücrelerinden salgılanan lenfotoksin- α 'yı (LT- α) da bağlamasıdır. Oysa

monoklonal antikorlar LT- α 'yı bağlayamaz.⁸¹ Anti-TNF- α ilaçları arasındaki, yapısal farklılıklar ve moleküler düzeydeki etki mekanizmalarındaki farklılıklar, bu ilaçların farklı hastalıklar üzerinde olumlu/olumsuz etkileri ve yan etki profillerindeki farklarını da açıklar niteliktedir. (Resim 9)

Molekül Adı	Infliximab (IFX)	Adalimumab (ADA)	Golimumab (GOL)	Humicade (HUM)	Etanercept (ETA)	Onercept (ONE)	Certolizumab Pegol (CET)
Yapısı							
FONKSİYONEL ÖZELLİKLER							
Lentikülin- α bağlanma	X	X	X	X	✓	✓	X
Serbest TNF'e bağlanma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Serbest TNF nötralizasyonu	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Membrana bağlı TNF'e bağlanma	✓	✓	✓	?	✓	?	✓
Membrana bağlı TNF antagonezmisi	✓	✓	✓	?	✓	?	?
FcR'e bağlanma	✓	✓	✓	X	✓	X	X
İnflamatuvar ARS'e bağlanma	✓	✓	✓	?	✓	X	X
Siklin sentez inhibisyonu	✓	✓	?	?	+/-	?	✓

Resim 9. Anti-TNF ilaçlar ve fonksiyonel özellikleri (<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1359610114000781-gr2.jpg> Erişim tarihi: 26 Kasım 2017)

Etanercept

Etanercept, insan IgG1'in Fc parçasına bağlanan ve 2 insan TNF reseptöründen oluşan bir rekombinant insan füzyon proteinidir. İnflamatuar hücrelerdeki sTNF- α ve LT- α reseptörlerini kompetitif olarak inhibe eder. Romatoid artrit (RA), poliartiküler juvenil idiopatik artrit (JIA), psöriazis, psöriatik artrit (PsA) ve ankilozan spondilit (AS) tedavisinde kullanımı ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmıştır. Crohn veya sarkoidoz gibi granülomatöz hastalıkların tedavisinde etkisizdir. Haftada 1-2 kez subkütan olarak uygulanır.

81,83

İnfliksimumab

İnfliksimumab, murin antijen bağlanma bölgesine bağlanan bir insan IgG Fc fragmentinden oluşan kimerik monoklonal antikordur. Hem solubl hem de hücre-bağlı TNF- α reseptörlerine bağlanabilir. RA, psöriazis, PsA, AS, erişkin ve pediatric ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı tedavilerinde ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafınca onaylanmıştır. Dört ila altı hafta aralıklarla intravenöz olarak uygulanır.^{81,84}

Adalimumab

Adalimumab, hem solubl hem de transmembran TNF- α reseptörlerine bağlanan, tamamiyle insandan izole edilen IgG1 monoklonal antikorudur. RA, poliaritiküler JIA, PsA, AS ve Crohn hastalığı tedavisinde kullanımı ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmıştır.

Ayrıca Adalimumab ülkemizde, kortikosteroidlere yetersiz yanıt vermiş olan, kortikosteroid kullanımının azaltılması gereken veya kortikosteroid tedavisinin uygun olmadığı yetişkin hastalarda enfeksiyöz olmayan orta, arka ve panüveit tedavisinde de endikedir. İki haftada bir subkütan enjeksiyon yoluyla uygulanır.^{81,85}

Sertolizumab

Sertolizumab, *Escherichia Coli*'den mikrobiyal fermentasyon yoluyla izole edilen insan monoklonal anti-TNF antikorunun Fab fragmentidir. RA, PsA, psöriazis, AS ve Chron hastalığı tedavisinde kullanımı ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafınca onaylanmıştır. İki haftada bir subkütan enjeksiyon yoluyla uygulanır.^{81,86}

Golimumab

Golimumab, hem solubl hem de transmembran TNF- α reseptörlerine bağlanabilen insan anti TNF- α monoklonal antikorudur. Erişkinde RA, PsA, psöriazis, AS ve ÜK, çocukluk çağında poliaritiküler JIA tedavisinde kullanımı ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafınca onaylanmıştır Ayda bir kez subkütan olarak enjekte edilir. RA, PsA ve AS'de tedavi etkinlik ve güvenilirliğinin 5 yıla kadar sürdürülebilir olduğu ve uzun dönem tolere edilebilirliğinin diğer anti-TNF ilaçlara benzer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca enjeksiyon sıklığını azaltması ile diğer ajanlardan ayrılır.^{81,87}

Tek başına ya da Metotreksat (MTX) ile kombine olarak RA, PsA ve AS hastalarında apolipoprotein C3, CRP, kompleman faktör 3, haptoglobulin, hyaluronik asit, ICAM, IL-6, IL-16, MMP-3 ve VEGF serum miktarlarını azalttığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir.⁸⁸⁻⁹¹

Golimumab tedavisi alan AS hastalarında bazal IL-6 ve MMP-1 düzeyi ve IL-6 ile C3 düzeyindeki değişim, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) spinal inflamasyonda azalma ile korele bulunmuştur.⁹⁰

Subkütan Golimumab 50-400 mg doz aralığında doza bağımlı farmakokinetik gösterir. Tek subkütan enjeksiyon sonrası maksimum plazma düzeyine ulaşma süresi 2 ila 6 gün iken,

kararlı-durum plazma konsantrasyonuna 12 hafta sonunda ulaşır. (4 haftada bir tekrarlanan doz ile). MTX ile kombine kullanımı, kleransını %36 azaltırken, diğer NSAID'ler, oral kortikosteroidler (KS) ve sulfasalazinle ile birlikte kullanımı kleransını değiştirmez.⁸⁷

Literatürde Golimumab'ın inflamatuvar artritte etkinliğinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur. GO-FORWARD çalışmasında MTX tedavisi altında aktif hastalıkları devam eden RA hastaları MTX+plasebo enjeksiyon (grup 1); plasebo+Golimumab 100 mg (grup 2); MTX+Golimumab 50 mg (grup 3) ve MTX+Golimumab 100 mg (grup 4) tedavi protokolleri alacak şekilde randomize edilmiş ve çalışma sonunda tedaviye Golimumab eklenmesinin RA'da fiziksel fonksiyon üzerinde de olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.⁹² Aynı grup, uzun dönem tedavi sonuçlarını bildirdikleri çalışmalarında, Golimumab tedavisi alan hastaların 24. haftada elde ettikleri cevap oranlarının 52. haftada da korunduğu ve güvenlik verilerinin diğer anti-TNF ajanlar ile benzer olduğu göstermiştir.⁹³ Tanaka ve ark.⁹⁴ ise Golimumab farmakokinetik özelliklerinin farklı etnik gruplarda benzer bulunduğu faz 1 çalışmasının ardından, GO-FORTH çalışmasında MTX tedavisine dirençli aktif Japon RA hastalarında Golimumab+MTX tedavisinin, MTX monoterapisi alan hastalardan 14. haftada anlamlı olarak daha yüksek oranda fiziksel fonksiyon iyileşmesi sağladığını göstermişlerdir. Smolen ve ark.⁹⁵ TNF- α inhibitör tedaviye dirençli RA hastalarına grup 1, plasebo; grup 2, Golimumab 50 mg ve grup 3 Golimumab 100 mg ile tedavi etkinliğini araştırdıkları çok merkezli, randomize, çift kör, plasebo kontrollü faz III GO-AFTER çalışmalarında, her iki doz ile de plaseboya göre yüksek remisyon (%35 ve %38 vs %18 sırasıyla, $p \leq 0.00$) elde edilmiş ve 24. haftaya kadar beklenmedik olay ile karşılaşılmamıştır. Aynı araştırmacılar GO-AFTER çalışmasının etkinlik ve güvenlik verilerini çalışmanın 160. haftaya uzatma döneminde (GO-AFTER LTE) de araştırmışlardır ve anti-TNF tedavisine devam edemeyen aktif RA hastalarında Golimumab 50 mg ve 100 mg tedavileri etkili bulunmuş ve tedavi almaya devam eden hastaların yaklaşık %57-67'sinde fiziksel fonksiyonlarda düzelme olduğu gözlenmiştir.

96

GO-RAISE çalışmasında aktif AS hastaları 24 hafta boyunca, 4 haftada bir Golimumab 50 mg, Golimumab 100 mg veya plasebo alacak şekilde randomize edilmiştir. 24 hafta sonunda klinik aktivite skorunda iyileşme ile Golimumab'ın AS tedavisindeki etkinliği gösterilmiştir.⁹⁷ PsA'da Golimumab etkinliğini değerlendiren GO-REVEAL çalışmasında, ilaç 24. haftada psöriyatik artrit belirti ve bulgularını plaseboya göre anlamlı daha iyi baskılamış, bu etki 52. haftada devam etmiştir. Golimumab'ı 50 veya 100 mg sabit dozda kullananlar 104. haftada da

yüksek yanıt oranlarını korumuşlardır. 50 mg'dan 100 mg'a geçen hastalarda da anlamlı iyilik görülmüştür.⁹⁸

Golimumab'ın Diğer Anti-TNF Ajanlardan Farkı Nedir?

Golimumab'ın (18 pM) çözünür insan TNF- α 'ya afinitesi Etanercept (11 Pm) ile benzer iken, İnfliksimab'dan (44 pM) ve Adalimumab'dan (127 pM) anlamlı olarak fazla bulunmuştur. (p = 0.018) Golimumab'ın insan endotel hücrelerinde TNF- α bağımlı E-selektin ekspresyonunu nötralize etmek için gerekli dozu, İnfliximab (3.2 kat; p = 0.017) ve Adalimumab'dan (3.3-kat; p = 0.008) %50 daha az iken, Etanercept dozuna benzerdir. Potansı Etanercept (İnhibitör konsantrasyon: IC50 : 2.5 ng/ML) ile benzer iken Adalimumab (IC50:12.7 ng/mL; p = 0.008) ve İnfliksimab'dan (IC50:12.3 ng/mL; p = 0.017) daha fazladır. Golimumab'ın diferansiyel tarayıcı kalorimetre ile ölçülen konformasyonel stabilitesi yani primer erime noktası (74.8°C); İnfliximab'dan (69.5°C) daha yüksektir. Ayrıca raf ömrü boyunca minimal agregasyon gösterdiği gözlenmiştir. In vivo TNF- α ilişkili fare artrit modelinde, tedavi verilmeyen gruba göre hastalık progresyonunu 1 ila 10 mg/kg doz aralığında anlamlı olarak yavaşlattığı; İnfliximab'ın ise aynı modelde 10 mg/kg dozdan itibaren etkili olduğu görülmüştür. Golimumab, kimyasal stabilitesi yüksek; insan TNF molekülüne in vivo ve in vitro koşullarda yüksek afinite bağlanarak nötralize edebilen ve yüksek potansı nedeniyle daha az sıklıkta enjeksiyon rejimleri ile tedavide kullanılabilen bir moleküldür. ²⁴

2.6.2 ANTİ-TNF AJANLARIN ENFEKSİYÖZ OLMAYAN ÜVEİTTE SİSTEMİK KULLANIMI

Etanercept

Foster ve ark.⁹⁹ düşük doz MTX ile hastalık kontrolü sağlandıktan sonra, tedavi azaltma döneminde relapsları önlemek için tedaviye Etacercept ya da plasebo ile devam etmiş; iki grup arasında relaps sayısı ve final görme keskinliği açısından farklılık görmemiştir.

Reiff ve ark.¹⁰⁰ konvansiyonel tedaviye dirençli 16 çocuk hastanın 10'unda Etanercept ile remisyon ve atakların kontrolünü sağlarken; Smith ve ark.¹⁰¹ 12 çocuk hastada tedavide plaseboya göre etkinlik farkı olmadığını bildirmiştir. Ancak çeşitli olgu raporlarında tedaviye bağlı üveit oluşumu gözlenmiştir.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Bu nedenle tedavide tercih edilmemektedir.

İnfliksimab

El-Shabrawi ve ark.¹⁰⁵ akut başlangıçlı HLA B27 ilişkili ön üveit tanılı 7 hastada tek doz İnfliksimab (yalnızca bir hastada 2 doz) sonrası ort. 8 ± 12 günde üveitte tam iyileşme görürken, 4 hastada relaps görüldüğünü bildirmiştir. Japonya'da 13 üniversite kliniğinde yapılan multisentrik araştırmada; en az 1 yıldır İnfliksimab kullanım öyküsü olan 164 Behçet tanılı hasta, görme keskinliği, oküler inflamasyon relapsı, yıllık oküler inflamatuvar atak sayısı ve yan etkiler açısından değerlendirilmiş ve görme keskinliğinde hastaların 55%'inde artış görülürken; oküler atak sayısında anlamlı azalma izlenmiştir. Relapsların 90%'ı topikal KS ve İnfliksimab sıklığının arttırılmasıyla tedavi edilmiştir.¹⁰⁶ İnfliksimab'ın çocuklarda yararı hakkında sınırlı sayıda yayın mevcuttur. Richards ve ark.¹⁰⁷ 6 JIA'lı hastada düşük doz immunosupresan tedavi ile birlikte İnfliksimab tedavisinin oküler inflamasyon ve göz içi basıncı kontrolünü tüm hastalarda sağladığını ve ciddi sistemik yan etki görülmediğini bildirmiştir. Beer ve ark.¹⁰⁸ İnfliximab'ın dilüe edilmiş dozlarının 4°C'de 6 hafta boyunca immünreaktivitesini koruduğunu; bu nedenle intravitreal enjeksiyon için bölünebilir dozlama uygun bir ilaç olduğunu göstermişlerdir.

Adalimumab

Enfeksiyöz olmayan intermediyer, arka ve panüveit hastalarında, steroide eklenen Adalimumab tedavisinin etkinliği iki uluslararası faz 3 çalışma ile değerlendirilmiştir. VISUAL-1 çalışmasında aktif üveiti olan ve günlük 10 ila 60 mg oral prednizolon (ya da eşdeğer dozda herhangi bir oral kortikosteroid) tedavisi alan hastalarda, steroid azaltılması döneminde hastalığın inaktif halde kalma süresi placebo grubuna göre (13 hafta), Adalimumab grubunda (24 hafta) anlamlı olarak fazla olarak bulunmuştur. Adalimumab grubunda ön kamara ve vitreus inflamasyonu plaseboya göre azalmış iken GK değerleri artmış olarak izlenmiştir. VISUAL-2 çalışmasında ise inaktif üveiti olan ve günlük 10 ila 35

mg oral prednizolon tedavisi alan hastalarda, steroid azaltılması döneminde placebo ya da Adalimumab tedavisi verilen hastalar karşılaştırılmıştır. Plasebo grubunda tedavi başarısızlığı %55 oranında iken, Adalimumab grubunda %39 olarak izlenmiştir. Hastalığın inaktif kaldığı süre placebo grubunda 8.3 ay iken; Adalimumab grubunda 18 aydan fazla olarak bulunmuştur. Adalimumab'ın uzun süreli güvenlik ve etkinliğinin araştırıldığı VISUAL-3 çalışmasında ise, çalışma başlangıcında aktif üveiti olan ve Adalimumab tedavisi verilen hastalarda, kontrol grubuna göre GK'de artış, üveit için alınan günlük kortikosteroid dozunda azalma ve hastalığın inaktif seyrettiği sürede artma görülmüştür. Çalışma başlangıcında inaktif üveiti olan hastaların büyük bir kısmı, sistemik kortikosteroid dozunda artışa gereksinim duymaksızın inaktif halde kalabilmişlerdir.¹⁰⁹⁻¹¹¹

JIA ilişkili refrakter üveit tedavisinde MTX tek ajan tedavisinin, Adalimumab ile kombine tedavi ile karşılaştırıldığı SYCAMORE çalışmasında, 3 ve 6. ayda tedavi yanıtı ve tedaviye cevap süresi açısından Adalimumab ile kombine tedavi grubu tekli tedaviye göre anlamlı üstünlük göstermiştir.¹¹²

Vazques-Cobian ve ark.¹¹³ konvansiyonel tedaviye yanıtı 14 çocuk hastanın (9 JIA ilişkili üveit, 5 idiopatik üveit) 26 gözünde yaptıkları çalışmada Adalimumab monoterapisi ya da MTX ile kombine tedavide 21 gözde inflamasyonda azalma, 4 gözde inflamasyonda stabilleşme ve 1 gözde kötüleşme görmüş ve hiçbir olguda ciddi sistemik yan etkiye rastlamamıştır. Interlandi ve ark.¹¹⁴ Behçet üveiti tanılı 22 gözü retrospektif olarak inceledikleri çalışmalarında geleneksel immünsupresif tedaviye ek olarak Adalimumab ile 21 aylık izlemde bir hasta hariç tüm hastalarda remisyon sağlamıştır. Yıllık atak sayısı 2'den 0.42'ye düşmüş; tüm hastalardan steroid dozu düşürülebilmüş; 7 hastada tamamen bırakılabilmıştır. Ciddi sistemik yan etkiye rastlanmamıştır.

Golimumab

Golimumab inflamatuvar artrite eşlik eden, konvansiyonel ilaçlar ya da biyolojik ajanlara yanıt alınamayan dirençli üveit tedavisinde bir seçenek olabilir. İspanya'da yapılan multisentrik bir çalışmada, spondiloartropatiye eşlik eden, tedaviye refrakter rekürren ön üveit ve kronik ön üveit tanılı 15 hastada, Golimumab monoterapi (n=7) ya da MTX ile kombine (n=8) olarak uygulanmış ve ön kamara hücre sayısı ve görme keskinliğinde 2 yılın sonunda

anlamalı iyileşme görülmüştür.¹¹⁵

Cordero-Coma ve ark.¹¹⁶ en az iki immünosupresan tedaviye yanıtızsız, immün aracılıklı üveit tanılı hastalarda en az 6 ay olacak şekilde monoterapi ya da kombinasyon tedavisi şeklinde aylık uygulanan Golimumab tedavisi sonrasında 13 hastanın 12'sinde (%92.3) inflamasyonda tam iyileşme görmüştür. Görme keskinliği 0.60'dan 0.68'e yükselirken (p=0.009), santral retina kalınlığı 317 µm'den 261.2 µm'ye düşmüştür. (p=0.05) Tedaviyle ilişkili majör yan etkiye rastlanmamıştır.

Miserocchi ve ark.¹¹⁷ biyolojik ajanlara dirençli aktif üveiti olan 13 JIA ve 4 HLA-B27+ spondiloartropati tanılı hastada aylık Golimumab tedavisi sonucu, 14 hastada tedaviye yanıt görmüştür. Görme keskinliği 26 gözde stabil kalırken, 7 gözde artmış, 1 gözde kötüleşmiştir. 1 hastada pulmoner enfeksiyon gelişmiştir.

Anti-TNF-α ilaçların önemli yan etkileri enfeksiyon oluşumu, lenfoma, konjestif kalp yetmezliği, lupus-benzeri sendrom, ilaca karşı oto-antikor oluşumu ve enjeksiyon yerinde meydana gelen cilt lezyonlarıdır.¹¹⁸ Bu yan etkilerden kaçınmak ve oküler dokularda daha yüksek tedavi dozuna ulaşabilmek için anti-TNF ajanlar intravitreal olarak denenmektedir.

2.6.3. ANTİ-TNF İLAÇLARIN ENFEKSİYÖZ OLMAYAN ÜVEİTTE İNTRAVİTREAL OLARAK KULLANIMI

Etanercept

Hayvan Modellerinde Etanercept

Deneysel hayvan modellerinde Etanercept intravitreal enjeksiyonu 2.5 mg'a kadar iyi tolere edilmiştir.

İnsan Çalışmalarında Etanercept

Tedaviye refrakter diyabetik makula ödemi olan 7 hastaya 2 hafta aralıklı olarak 2 kez intravitreal 2.5 mg/0.1 ml Etanercept enjeksiyonu yapılmıştır. 3 aylık takibin sonunda artan görme keskinliğine rağmen, fluorescein sızıntısında ve sert eksuda sayısında da artış olduğu; hemoraji miktarının stabil kaldığı gözlenmiştir. Herhangi bir yan etki görülmemiştir. Ancak bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.¹¹⁹

İnfliximab

Hayvan Modellerinde İnfliximab

Deneysel hayvan modellerinde intravitreal İnflksimab enjeksiyonun 2 mg'a kadar iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Ancak 3.3 mg'dan daha yüksek dozların, retina için toksik olabileceği belirtilmiştir.¹²⁰⁻¹²² Ayrıca lazer ile indüklenen koroidal neovaskülarizasyon modelinde İnflksimab'ın 10 ila 40 µg arasındaki dozları anti-anjiojenik iken, 320 µg gibi yüksek dozlarının proanjiojenik olduğu görülmüştür.¹²³ Deneysel EİÜ modelinde, tedavide intravitreal ile intravenöz İnflksimab karşılaştırılmış ve akut evrede intravenöz tedavinin daha etkin olduğu gözlenmiştir.¹²⁴ Kliniğimizde yapılan tavşanlarda EİÜ modelinde sistemik ve intravitreal İnflksimab tedavisinin etkinliğinin kıyaslandığı çalışmada, intravitreal 2mg/kg İnflksimab'ın enflamasyonu paradoksik olarak şiddetlendirdiği; sistemik 5 mg/kg İnflksimab'ın ise oküler inflamasyonu hızlı ve etkin şekilde geriletmediği gösterilmiştir.¹²⁵

İnsan Çalışmalarında İnflksimab

Theodossiadis ve ark.¹²⁶ Ranibizumab tedavisine cevapsız 3 eksudatif YBMD olgusuna 2 ay arayla 2 mg/0.05 ml intravitreal İnflksimab tedavisi uygulamış ve tüm olgularda görme keskinliğinde artış gözlenmiş, hiçbir olguda yan etkiye rastlanmamıştır. Ancak Giganti ve ark.²⁶ önceki tedaviye yanıtı olmayan 2 DMÖ ve 2 eksudatif YBMD hastasında düşük doz (0.5 mg/0.05 ml) İnflksimab sonrası hastalarda fonksiyonel ve anatomik başarısızlık olduğunu ve tedavinin immünojenik ve retinotoksik olabileceğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Arias ve ark.¹²⁷ eksudatif YBMD tanılı 4 hastada 2 mg/0.05 ml intravitreal İnflksimab tedavisinin anatomik ve görsel iyileşme sağlamadığını ve hastaların yarısında ciddi intraoküler inflamasyon geliştiğini göstermişlerdir. Bu konudaki en geniş seri Pan-Amerikan Ortak Retina Çalışma Grubu (Pan-American Collaborative Retina Study Group-PACORES) tarafından yapılmış olup, tedaviye yanıtı olmayan DMÖ hastalarına 1.0 mg/0.05 ml (15 göz) ya da 2.0 mg/0.10 ml (19 göz) intravitreal İnflksimab enjeksiyonu yapılmıştır. İzlem süresi sonunda anlamlı anatomik ya da fonksiyonel kazanç görülmemiş; hatta 2 mg enjeksiyon yapılan hastaların yarıya yakınında ciddi üveit izlenmiş, bunlardan 3 tanesine terapötik pars plana vitrektomi uygulanmıştır.¹²⁸ Aynı grup anti-VEGF tedaviye kısmi yanıt alan neovasküler YBMD'de intravitreal 1 mg/0.05 ml ve 2 mg/0.05 ml dozlarında intravitreal İnflksimab enjeksiyonu sonrası fonksiyonel kazanç izlenmediğini bildirmiştir. Hastaların %37.5'inde topikal tedaviyle düzelen üveit atağı izlenmiştir.¹²⁹ Farvardin ve ark.¹³⁰ kronik persistan infeksiyöz olmayan üveit tanılı 7 hastanın 10 gözüne 1.5 mg/0.15 ml tek doz

intravitreal İnflksimab enjeksiyonunun 4 hafta sonunda görme keskinliğinde artış ve makula ödeminde azalma sağladığını izlemiştir. Ancak aynı hastaları uzun dönem (6 ay) takip ettiklerinde, bu iyileşmenin geçici olduğunu ve makula ödemi ile vitreus bulanıklığının nüks ettiğini görmüşlerdir.¹³¹ Markomichelakis ve ark.²⁷ Behçet hastalığına sekonder tekrarlayan posterior üveit tanılı 15 hastada tek doz intravitreal 1.0 mg/0.05 ml İnflksimab enjeksiyonu sonrası 1 aylık izlemde hastalarda görme keskinliği, ön kamara ve vitreus bulanıklığı, retinit ve retinal vaskülitte anlamlı iyileşme olduğunu; santral makula kalınlığının tedavi grubunda anlamlı olarak azalmasına rağmen, bazı olgularda kistoid makula ödeminin persiste ettiğini bildirmiştir. Wu ve ark.¹³² tedaviye dirençli psödotakik kistoid makula ödeminde tek doz intravitreal 1.0 mg/0.10 mL İnflksimab enjeksiyonunun görsel ve anatomik başarı sağladığını bildirmiştir.

Adalimumab

Hayvan Modellerinde Adalimumab

Deneyisel hayvan modellerinde elektoretinografi (ERG) ve histolojik bulgulara bakılarak intravitreal Adalimumab enjeksiyonun 5 mg'a kadar iyi tolere edildiği gösterilmiştir.¹³³ Ancak 10 mg dozda erken retina toksitesi ve ERG'de bozulma görülmüştür.^{21,134}

İnsan Çalışmalarında Adalimumab

PACORES grubu tedaviye dirençli DMÖ tanılı 5 hastaya uygulanan aylık 2 mg/0.08 ml intravitreal Adalimumab enjeksiyonunun 3 ay sonunda görme keskinliğinde artış sağlasa da makula ödeminde azalmaya neden olmadığını bildirmiştir.¹²⁸ Aynı grup 2 mg/0.08 ml intravitreal Adalimumab tedavisi verilen 4 neovasküler YBMD hastasında da herhangi bir anatomik ya da fonksiyonel iyileşme gözlemlenmemiştir.¹²⁹ PACORES grubunun çeşitli oküler patolojilere ikincil gelişen KMÖ'de intravitreal Bevacizumab (1.25 mg/0.05 ml) ile kombine Adalimumab (2 mg/0.08 ml) tedavisini değerlendirdikleri 7 gözlük vaka serisinde 5 gözde tedaviye yanıt olduğunu bildirilmiştir.¹³⁵

Golimumab

Literatürde intravitreal Golimumab'ın oküler inflamatuvar hastalıklarda güvenlik ve etkinliğini değerlendiren hayvan ve insan çalışmasına rastlanmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

PROJE DESTEĞİ VE ETİK KURUL ONAYI

2017/042 numaralı Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi desteği ile yapılmıştır. 46/2015 Protokol numaralı ve “Tavşanlarda Intravitreal Golimumab (Anti-TNF Ajan) Uygulamasının Lokal Etkileri” başlıklı araştırma projesi kapsamında Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı almıştır.

HAYVAN DENEYİ

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Anabilim Dalı ve Romatoloji Anabilim Dalı’nın katkılarıyla, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Yerel Etik Kurulu’nun izni ile Aralık 2016- Aralık 2017 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmaya toplam 16 tavşan (Yeni Zelanda albino tavşan, 300-500 gr ağırlığında) dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen tavşanlar 3 gruba ayrıldı. Her bir tavşanın intravitreal ilaç uygulanan sağ gözü çalışma gözü, BSS (balanced salt solution- dengeli tuz solüsyonu) uygulanan sol gözü ise kontrol gözü olarak kabul edildi.

İlaç Grubu I (n:6): intravitreal 5 mg/0.05 ml Golimumab enjekte edilen grup	}	Grup I
Kontrol Grubu I (n:6): intravitreal 0.05 ml BSS enjekte edilen grup		
İlaç Grubu II (n:6): intravitreal 10 mg/0.1 ml Golimumab enjekte edilen grup	}	Grup II
Kontrol Grubu I (n:6): intravitreal 0.1 ml BSS enjekte edilen grup		
İlaç Grubu III (n:4): intravitreal 20 mg/0.2 ml Golimumab enjekte edilen grup	}	Grup III
Kontrol Grubu I (n:6): intravitreal 0.2 ml BSS enjekte edilen grup		

Hayvan laboratuvarı ameliyathanesinde, cerrahi aletlerin sterilizasyonu sağlandıktan sonra, tavşanlar 1 ml intramüsküler ketamin hidroklorid (35 mg/kg)(Ketalar®, Pfizer, USA) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg)(Rompun®, Bayer, Germany) karışımı ile uyutuldu. %0.5’lik tropikamid (Tropamid®, Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., Maslak, İstanbul) ve

%2.5'lik fenilefrin hidroklorür (Mydfirin®, Alcon Laboratuvarları Ticaret A.Ş., Beykoz, İstanbul), damla ile pupiller dilatasyon sağlandıktan sonra, %0,5'lik proparakain hidroklorür (Alcaine®, Alcon Laboratuvarları Ticaret A.Ş., Beykoz, İstanbul) damla ile topikal anesteziyi ve %5'lik povidon iodin uygulanmasını takiben, ön kamaradan verilecek olan ilaç volümü kadar aköz sıvı parasentezi yapılarak göz içi basıncının düşürülüp, enjeksiyon sonrası oluşan ilaç reflüsünün minimize edilmesi sağlandıktan sonra intravitreal enjeksiyon uygulandı. Enjeksiyonlar üst temporalden, cerrahi limbusun 1 mm gerisinden 27-gauge iğne ile yapıldı. Postoperatif dönemde ofloksasin %0.3 (Exocin®, Allergan) antibiyotik damla uygulaması alt konjunktival forniks içine günde 3 kez olacak şekilde 7 gün boyunca uygulandı ve tavşanlar 1 hafta süre ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda bakım altında izlendi. Bu dönem boyunca günlük olarak ön segment yapıları ışık kaynağı ile kontrol edildi. Birinci gün ve birinci haftada indirekt oftalmoskopi ile fundus muayenesi yapıldı. Ardından tavşanlar sakrifiye edildi. Gözleri enükle edildi.

Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, %10'luk formaldehit ile tespit edilen göz doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı (Tablo-2).

Tablo-2: Işık mikroskopik doku takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Tespit	%10 formalin	24-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dakika
	% 80 etil alkol	20 dakika
	% 95 etil alkol	20 dakika
	Aseton (4 değişim)	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dakika
	Ksilol	30 dakika
Emdirme %60°C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksislen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo-3).

Tablo-3: Hematoksislen-Eozin boyama prosedürü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
	Hematoksilen	10 dakika
	Akarsu	10 dakika
Şeffaflaştırma	Eosin	2 dakika
Kapama	Akarsu	5 dakika
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Entellan	

TUNEL Yöntemi

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick and Labelling) tekniği ilk defa 1992 yılında tanımlanmıştır. 'Nick end' nükleozomlar arasındaki DNA bölgelerinde endonükleaz aktivitesine bağlı olarak oluşan 3'-hidroksi gruplarını göstermektedir. Bu DNA fragmentasyonu apoptozisin bir karakteristiğidir. Tespitte dUTP'e bağlanan marker digoxigenindir. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi dUTP-digoxigenin taşıyan 3'-hidroksi DNA ucunda (nick ends) polimerik bir kuyruk oluşturmaktadır. İşaretleme sonrası antidigoxigenin antikör-peroksidaz konjugatı markır ucunda digoxigenin molekülüne bağlanır ve diaminobenzidin eklenir. Digoxigenine bağlı peroksidaz yoğun kahverengi bir sinyal oluşturur. Apoptotik hücreler ve nükleusları kahverengi boyanır, diğer hücreler mavi-mor olarak gözlenir.

TUNEL pozitif hücreleri göstermek amacıyla Roche (Kat. No: 11 684 795 910) kiti kullanıldı. Deparafinize edilen doku kesitleri azalan alkol serilerinden geçirilip distile su ile yıkandı. Proteinaz K solusyonu ile 15 dakika 37°C'de inkübe edilen kesitler yıkama sonrası TdT enzimi ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. PBS (Phosphate-Buffered Saline, Fosfatla Tamponlanmış Salin) ile yıkamanın ardından POD converter solusyonu 15 dakika 37°C'de bekletilip yıkamanın ardından Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kromojeni ile boyama yapıldı. Mayer's hematoksilin ile ard alan boyaması yapılan kesitler artan alkol serilerinden geçirilip ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskobu ile incelendi (Tablo-4).

Tablo-4: TUNEL yöntemi

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	PBS	3x5 dakika
Yıkama	Proteinaz K	15 dakika, 37°C
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	TDT Enzim solusyonu	1 saat, 37°C'de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	POD solusyonu	30 dakika, 37°C'de
Boyama	DAB	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Ard alan boyaması	Mayer's hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x10 dakika
	%80 alkol	1 dakika
	%95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol (2 değişim)	30 dakika
Kapama	Entellan	

İndirekt İmmunohistokimyasal Yöntem

Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla tavşan spesifik (Novus) antikoru kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C'lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. pH 6 ayarlı sitrat buffer ile 5 dakika yüksek ısıda mikrodalgada tutulan kesitler 20 dakika soğumaya bırakıldı, ardından doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain-Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan kaspaz-3 antikoru ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen-Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 15 dakika enkübe edildi. PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 15 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için DAB (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo-5).

Tablo-5: İmmunohistokimyasal yöntem

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Dehidratasyon	%95 alkol	2 dakika
	%80 alkol	2 dakika
	%70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	37°C 15 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Kaspaz-3	2 saat
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	5 dakika
	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

Elektron Mikroskopik Doku Takip Metodu

Diseksiyon ile alınan retina dokusundan 1 mm³ parçalar alınarak %2,5 fosfat tamponlu gluteraldehid içerisinde fikse edildi. Örnekler Sorenson fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandıktan sonra 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. (Ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon konuldu). Tüpler alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletildi. PBS ile 15–20 dakika yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için % 70 alkolde 10 dakika, %100 (Absolu) alkolde 2 değişim 10'ar dakika tutuldu. Propilen oksit ile iki değişim 15 dakika tutulan dokular infiltrasyon işlemi kurumayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek arada hafif hareketlerle karıştırıldı. Araldite CY212 Resin ve DDSA (dodecenyl suuccinic anhidride) (1:1) oranında karıştırılarak her şişeye 2 mL konuldu. Dokular yeni araldit karışımında yaklaşık 6-12 saat bekletildikten sonra Araldite CY212 Resin ve DDSA 1:1 oranında hazırlanan bu yeni karışıma (gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak) BDMA (Benzyl Dimethylamine) ilave edilerek gömme materyali hazırlandı. Bu karışım içine gömülen dokular 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildikten sonra yarı ince kesitleri alınarak toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi. Belirlenen alanlardan ince kesitler formvar kaplı gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapıldı ve trasmisyon elektron mikroskobunda değerlendirildi.

4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 21.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı. H&E boyamada hücre sayıları, TUNEL ve kaspaz-3 boyamada boyanma yüzdeleri kullanıldı. Tavşanların verileri için tanımlayıcı istatistikler olarak normal dağılan verilerde ortalama yüzde değerleri ile standart sapma; normal dağılmayan verilerde ortanca ve en büyük-en küçük değerleri kullanıldı. Parametrik koşullar karşılandığında gruplar arasındaki fark Student t test ile; parametrik olmayan koşullar sağlandığında ise Mann- Whitney U testi ile değerlendirildi. Sağ ve sol gözlerin artan doz ve/veya volümdeki değişimleri parametrik koşullar sağlanamadığından Kruskal-Wallis testi ile araştırıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Tavşanların Takip ve İzlemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda bakım altında izlenen tavşanların hiçbirinde, izlem süresince çalışmadan çıkarılmayı gerektirecek sistemik patoloji gelişmedi. Bir haftalık çalışma süresince ölen tavşan olmadı. Takip süresi boyunca tavşanların hiçbirinde; korneal ödem, ön kamarada fibrin reaksiyon, hipopiyon, lens kesafeti, vitreus içi hemoraji, retina dekolmanı ve endoftalmi gelişmedi. Enjeksiyon sonrası tavşanlardan dördünde konjonktival hiperemi, ikisinde ise subkonjonktival hemoraji geliştiği gözlemlendi.

Histopatolojik İnceleme

Histolojik preparatlar hazırlanırken makroskopik bakıda retina yapısı doğal olarak izlendi, retina katman kaybı ve ayrışması gibi anormal bulgulara rastlanmadı.

Tavşan gözlerine ait retina tabakaları incelemeye alındı (*Resim 10*)



Resim-10: Tavşan gözlerine ait retina tabakaları

Işık Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Hemotoksilen-Eozin ile boyanma sonrası yapılan ışık mikroskopik incelemelerde; grupların hepsinde bütün gözler normal görünümdeydi. Grup-I (5 mg/0.05 ml Golimumab), Grup-II (10 mg/0.1 ml Golimumab), Grup-III'te (20 mg/0.2 ml Golimumab) bulunan tavşanlardan birer tanesinin çalışma gözleri ve kontrol gözlerinin (BSS enjeksiyonu) ışık mikroskopik görünimleri *Resim-11*'de fotoğraflandı.

Tüm dozlarda (5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml), BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözlerine göre, Golimumab enjekte edilen gözlerde, H&E boyamada dış nükleer (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.044$ ve $p=0.045$) ve iç nükleer (sırasıyla $p=0.047$, $p=0.045$ ve $p=0.048$) tabakalarda azalmış hücre sayısı görülürken; ganglion hücre sayısında anlamlı farklılık gözlenmedi. (sırasıyla $p=0.11$, $p=0.067$ ve $p=0.20$) Çalışma gruplarının H&E boyamadaki dış nükleer tabaka, iç nükleer tabaka ve ganglion hücre tabakası hücre sayıları Tablo 6'da gösterildi.

Artan doz ve/veya volümde Golimumab enjekte edilen gözlerde, üç grup arasında hücre miktarı kıyaslandığında; dış nükleer, iç nükleer ve ganglion hücre tabakalarında artan dozlarda anlamlı farklılık saptanmadı. (sırasıyla $p=0.054$, $p=0.062$ ve $p=0.370$) BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözleri birbiri ile kıyaslandığında, üç grup arasında, her üç tabakadaki hücre sayısı arasında anlamlı farklılık görülmedi. (sırasıyla $p=0.068$, $p=0.072$ ve $p=0.49$) Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki hücre sayısı karşılaştırması Tablo 7'de verildi.

Tablo-6: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin H&E boyamada hücre sayıları

	Golimumab	BSS	p
	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (%)	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (%)	
5 mg/0.05 ml			
Dış Nükleer	382.50 $\pm$ 45.57	519.16 $\pm$ 52.13	0.001*
İç Nükleer	107.33 $\pm$ 33.33	142.5 $\pm$ 33.92	0.047*
Ganglion	9.5 $\pm$ 2.66	12.1 $\pm$ 3.61	0.11
10 mg/0.1 ml			
Dış Nükleer	410.00 $\pm$ 54.40	510.00 $\pm$ 65.11	0.044*
İç Nükleer	99.33 $\pm$ 16.30	111.66 $\pm$ 25.34	0.045*
Ganglion	8.16 $\pm$ 3.92	9.16 $\pm$ 3.97	0.067
20 mg/0.2 ml			
Dış Nükleer	335.00 $\pm$ 66.08	402.50 $\pm$ 73.65	0.045*
İç Nükleer	78.00 $\pm$ 14.35	88.00 $\pm$ 12.98	0.048*
Ganglion	6.50 $\pm$ 1.29	7.00 $\pm$ 1.63	0.20

Golimumab ve BSS grupları arası karşılaştırma Student t test ile yapılmıştır.

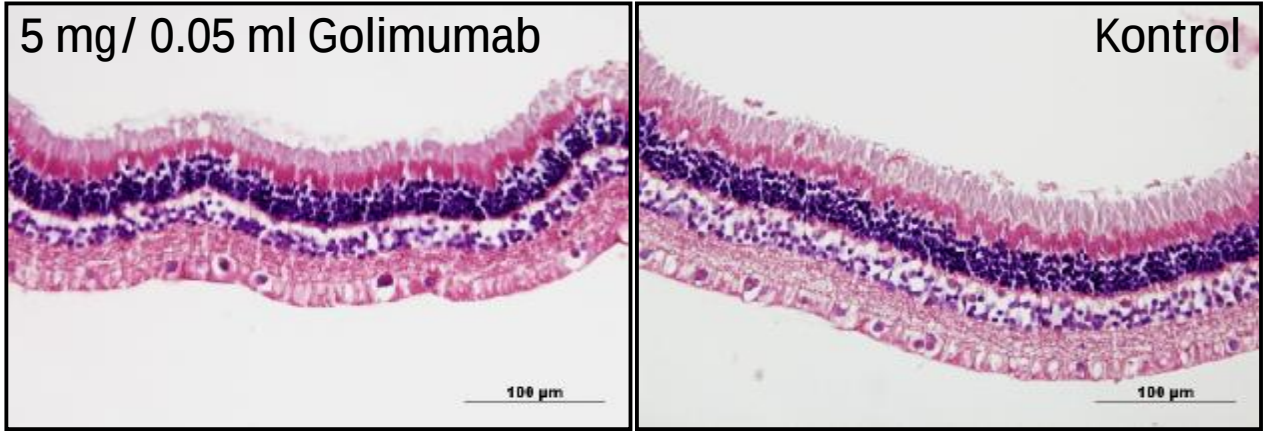
*p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo-7: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki hücre sayısı karşılaştırması

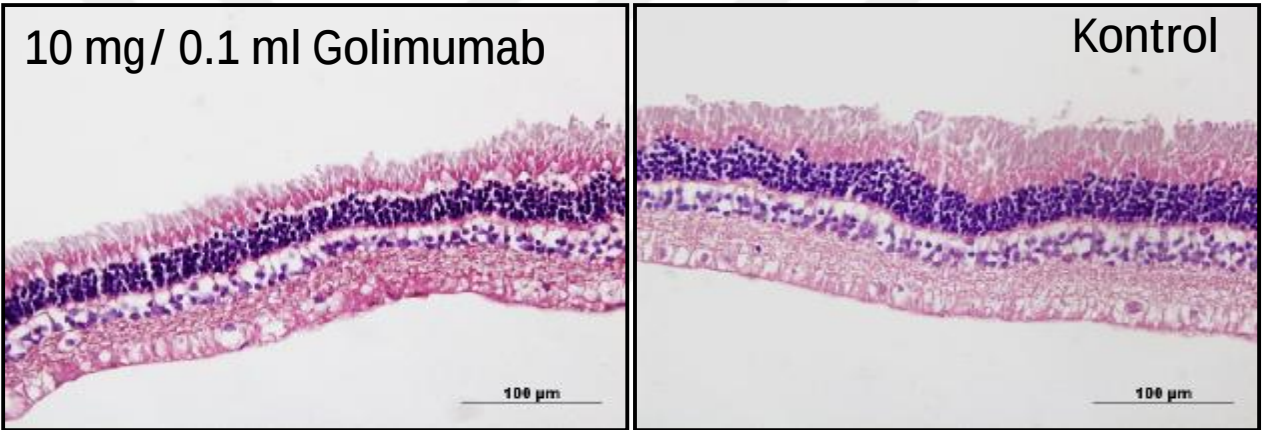
H&E Boyama	p
Golimumab (n=16)	
Dış Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.054
İç Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.062
Ganglion Hücre Tabakası Kıyaslaması	0.370
BSS (n=16)	
Dış Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.068
İç Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.072
Ganglion Hücre Tabakası Kıyaslaması	0.49

Üç grup arasındaki kıyaslama Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

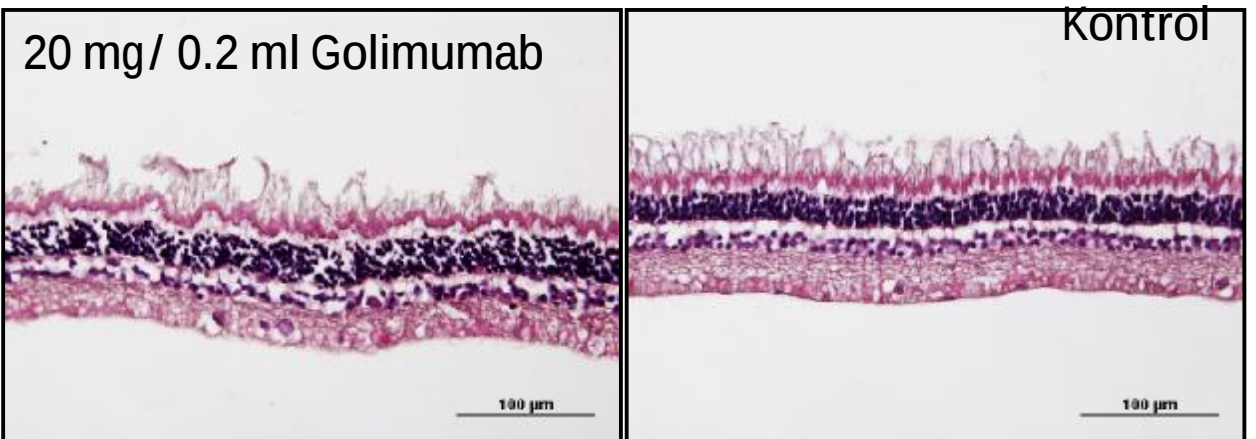
Grup-I



Grup-II



Grup-III



Resim-11: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin ışık mikroskopik görünimleri. H&E boyaması. X40 lık büyütme.

TUNEL Boyamasına Ait Bulgular

Apoptotik süreçteki DNA fragmentasyonunu gösteren TUNEL boyama tekniği ile yapılan incelemelerde 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml intravitreal Golimumab uygulanan gözlerde, iç nükleer tabakada TUNEL pozitif boyanan hücre yüzdesi BSS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla saptandı. (sırasıyla $p=0.018$, $p=0.020$ ve $p=0.029$) Dış nükleer tabakadaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi 5 mg/0.05 ml dozda, kontrol grubundan farklı değilken ($p=0.061$); 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml dozlarda kontrole göre artmış TUNEL pozitifliği izlendi. (sırasıyla $p=0.009$ ve $p=0.029$)

Ganglion hücre tabakasında TUNEL pozitif boyanan hücre yüzdesi, 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml Golimumab enjeksiyonu yapılan gözlerde, BSS yapılan kontrol gözlerine göre istatistiksel olarak farklı bulunmadı. (sırasıyla $p=0.937$, $p=1.00$ ve $p=1.00$)

TUNEL boyama ile ilaç ve kontrol gruplarındaki dış nükleer, iç nükleer ve ganglion hücre tabakalarındaki pozitif boyanma yüzdeleri Tablo 8’de verildi.

Artan doz ve/veya volümde Golimumab enjekte edilen gözlerde, üç grup arasında TUNEL pozitif boyanan hücre yüzdesi kıyaslandığında; dış nükleer tabakada anlamlı farklılık mevcutken ($p=0.014$), iç nükleer ve ganglion hücre tabakalarında artan dozlarda anlamlı farklılık saptanmadı. (sırasıyla $p=0.337$ ve $p=0.490$) Dış nükleer tabakadaki bu anlamlı farklılığın hangi iki grup arasındaki farklılıktan kaynaklandığını tespit etmek için gruplar Mann Whitney U testi ile kıyaslandı. 5 mg/0.05 ml grubu ile 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml grubu arasında TUNEL pozitif hücre yüzdesi açısından anlamlı fark mevcutken (sırasıyla $p=0.026$ ve $p=0.010$); 10 mg/0.1 ml ile 20 mg/0.2 ml grupları arasında TUNEL pozitif hücre yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. ($p=0.476$).

Enjekte edilen volümün artmasıyla TUNEL pozitif hücre yüzdesinde oluşan değişikliği incelemek amacıyla üç farklı volümde (0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml) BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözleri birbiri ile kıyaslandığında, üç grup arasında, dış nükleer, iç nükleer ve ganglion hücre tabakasında TUNEL pozitif hücre yüzdesinde anlamlı farklılığa rastlanmadı. (sırasıyla $p=0.063$, $p=0.106$ ve $p=0.491$) Bu bulgu, apoptozisin enjekte edilen sıvı volümünden bağımsız olduğunu gösterdiğinden; Golimumab enjekte edilen gözlerde apoptozisin, yalnızca ilacın kimyasal etkisine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi karşılaştırması Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo-8: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi

TUNEL	Golimumab		BSS		p
	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (%)	Ortanca (En küçük-en büyük) (%)	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (%)	Ortanca (En küçük-en büyük) (%)	
5 mg/0.05 ml (n=6)					
Dış Nükleer	72.18 $\pm$ 1.66	71.72 (67-78)	68.77 $\pm$ 1.71	70.13 (63-73)	0.061
İç Nükleer	72.92 $\pm$ 1.39	73.21 (69-76)	55.72 $\pm$ 3.66	57.83 (42-67)	0.018*
Ganglion	91.66 $\pm$ 5.27	100 (75-100)	90.27 $\pm$ 6.24	100 (66-100)	0.937
10 mg/0.1 ml (n=6)					
Dış Nükleer	83.74 $\pm$ 2.42	85.50 (72-88)	69.04 $\pm$ 2.83	69.79 (57-78)	0.009*
İç Nükleer	75.62 $\pm$ 1.84	76.12 (70-81)	66.09 $\pm$ 2.91	66.65 (57-76)	0.020*
Ganglion	94.44 $\pm$ 5.55	100 (66-100)	93.33 $\pm$ 6.66	100 (60-100)	1.000
20 mg/0.2 ml (n=4)					
Dış Nükleer	86.36 $\pm$ 0.96	87.22 (83-88)	72.24 $\pm$ 0.93	72.77 (69-73)	0.029*
İç Nükleer	73.31 $\pm$ 1.93	73.77 (63-77)	58.93 $\pm$ 3.98	60.87 (47-66)	0.029*
Ganglion	94.44 $\pm$ 5.55	100 (66-100)	91.66 $\pm$ 5.27	100 (60-100)	1.000

Sayısal değerler normal dağılıma sahip gruplar için Ortalama $\pm$ (Standart Sapma) şeklinde, normal olmayan dağılıma sahip gruplar için Ortanca - (En küçük-en büyük) şeklinde vurgulanmıştır.

Golimumab ve BSS grupları arası karşılaştırma normal dağılıma sahip gruplar için Student t test, normal olmayan dağılıma sahip gruplar için Mann Whitney U testi ile yapılmıştır.

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

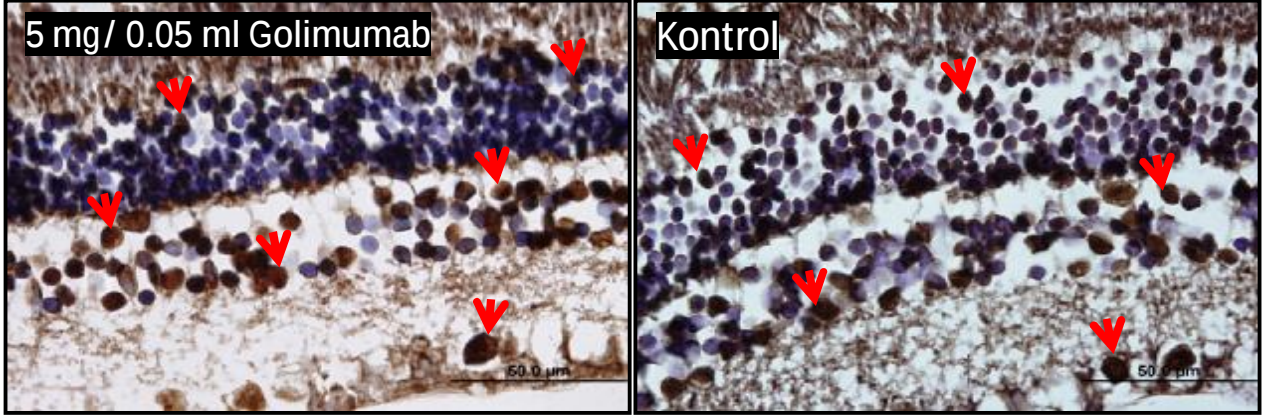
Tablo-9: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi karşılaştırması

TUNEL	p
Golimumab (n=16)	
Dış Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.014*
İç Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.337
Ganglion Hücre Tabakası Kıyaslaması	0.490
BSS (n=16)	
Dış Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.063
İç Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.106
Ganglion Hücre Tabakası Kıyaslaması	0.491

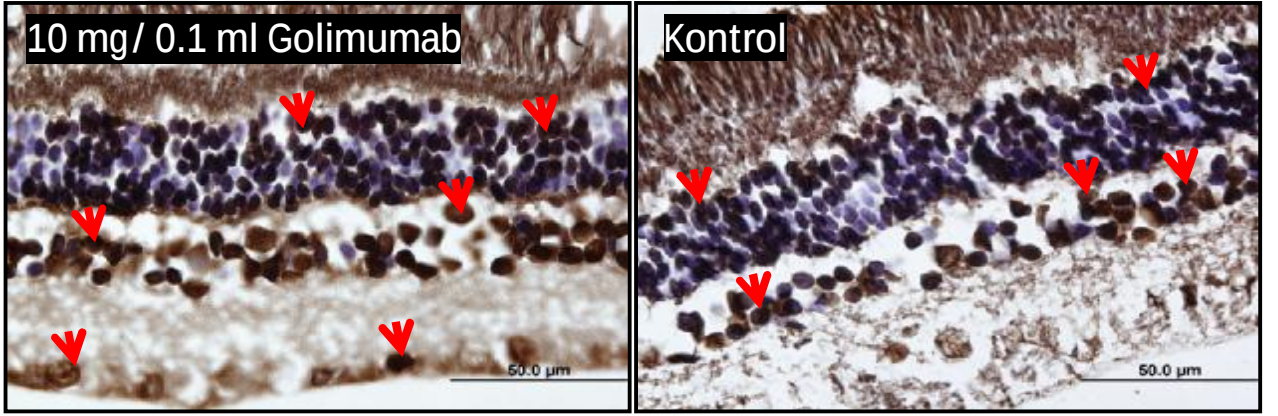
Üç grup arasındaki kıyaslama Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. Dış nükleer tabakalar arasındaki istatistiksel anlamlı farklılık, gruplar ikiye ayrılarak Mann-Whitney U testi ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

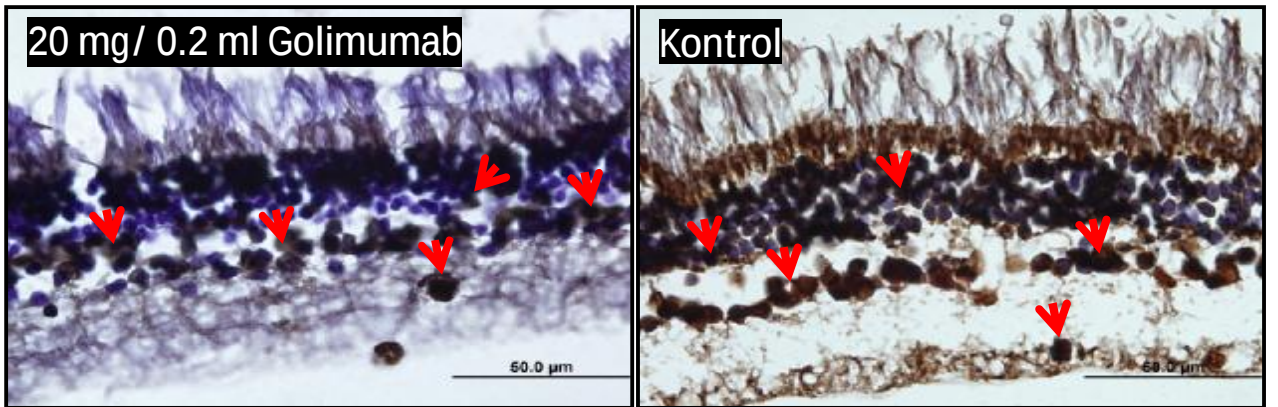
Grup-I



Grup-II



Grup-III



Resim-12: Tüm grupların TUNEL ile boyanma bulguları, kırmızı okla TUNEL pozitif boyanan hücreler gösterilmekte.X100'lük büyütme.

Kaspaz-3 Boyamasına Ait Bulgular

Kaspaz-3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesi olması nedeniyle kaspazlara karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak, sitoplazmik kaspaz ekspresyonu gösterildi.

Kaspaz-3 boyanma fotoreseptör hücrelerde, bipolar hücrelerde ve ganglion hücrelerinin sitoplazmalarında gözlemlendi. Tüm hücrelerden pozitif olan hücrelerin sayısı “%” olarak hesaplandı.

Kaspaz-3 ile yapılan immünohistokimyasal incelemede; 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml intravitreal Golimumab uygulanan gözlerde hem dış nükleer (sırasıyla $p=0.048$, $p=0.041$ ve $p=0.048$) hem de iç nükleer tabakada (sırasıyla $p=0.015$, $p=0.041$ ve $p=0.041$) kontrol grubuna göre apoptotik sürece gidişin göstergesi olan Kaspaz-3 tutulumunda istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi.

Ganglion hücre tabakasında Kaspaz-3 pozitif boyanan hücre yüzdesi, 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml Golimumab enjeksiyonu yapılan gözlerde, BSS yapılan kontrol gözlerine göre istatistiksel olarak farklı bulunmadı. (sırasıyla $p=0.064$, $p=0.163$ ve $p=0.198$)

Kaspaz-3 boyanmalarına ait bulgular Tablo-10'da özetlendi.

Artan doz ve/veya volümde Golimumab enjekte edilen gözlerde, üç grup arasında Kaspaz-3 pozitif boyanan hücre yüzdesi kıyaslandığında; dış nükleer, iç nükleer ve ganglion hücre tabakalarında artan dozlarda anlamlı farklılık saptanmadı. (sırasıyla $p=0.555$, $p=0.092$ ve $p=0.877$) TUNEL boyamada olduğu gibi volüm etkisini gözlemlemek için üç farklı volümde (0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml) BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözleri birbiri ile kıyaslandığında, üç grup arasında, dış nükleer, iç nükleer ve ganglion hücre tabakasında Kaspaz-3 pozitif hücre yüzdesinde anlamlı farklılığa rastlanmadı. (sırasıyla $p=0.155$, $p=0.236$ ve $p=0.955$) Farklı doz ve volümde Golimumab ve BSS enjeksiyonu yapılan üç grup Kaspaz-3 pozitif hücre yüzdesi açısından karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo-10: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki KASPAZ-3 pozitif hücre yüzdesi

KASPAZ-3	Golimumab		BSS		p
	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (%)	Ortanca (En küçük-en büyük) (%)	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (%)	Ortanca (En küçük-en büyük) (%)	
5 mg/0.05 ml (n=6)					
Dış Nükleer	56.58 $\pm$ 1.54	56.30 (52-63)	46.22 $\pm$ 7.11	48.00 (13-61)	0.048*
İç Nükleer	60.15 $\pm$ 4.44	57.53 (46-76)	39.83 $\pm$ 6.06	42.36 (11-54)	0.015*
Ganglion	76.66 $\pm$ 8.33	75 (50-100)	65 $\pm$ 11.18	63.54 (0-50)	0.064
10 mg/0.1 ml (n=6)					
Dış Nükleer	54.64 $\pm$ 3.16	55.27 (41-64)	44.70 $\pm$ 1.07	44.27 (41-49)	0.041*
İç Nükleer	59.51 $\pm$ 3.55	57.91 (51-74)	48.77 $\pm$ 2.90	46.81 (39-59)	0.041*
Ganglion	58.33 $\pm$ 20.00	75 (0-100)	23.33 $\pm$ 10.54	20 (0-50)	0.163
20 mg/0.2 ml (n=4)					
Dış Nükleer	54.02 $\pm$ 2.67	52.89 (49-61)	38.33 $\pm$ 6.55	38.49 (22-54)	0.048*
İç Nükleer	49.33 $\pm$ 1.97	50.28 (44-52)	37.74 $\pm$ 5.95	33.92 (28-55)	0.041*
Ganglion	58.33 $\pm$ 25.00	66.66 (0-100)	25.00 $\pm$ 14.43	25 (0-50)	0.198

* Sayısal değerler normal dağılıma sahip gruplar için Ortalama $\pm$ (Standart Sapma) şeklinde, normal olmayan dağılıma sahip gruplar için Ortanca - (En küçük-en büyük) olacak şekilde vurgulanmıştır.

** Golimumab ve BSS grupları arası karşılaştırma normal dağılıma sahip gruplar için Student t test, normal olmayan dağılıma sahip gruplar için Mann Whitney U testi ile yapılmıştır.

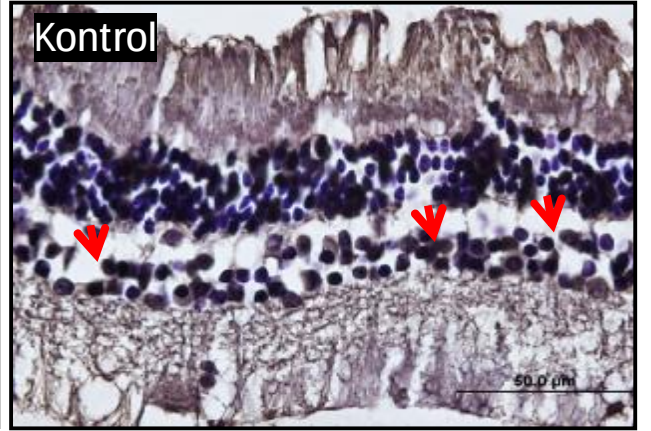
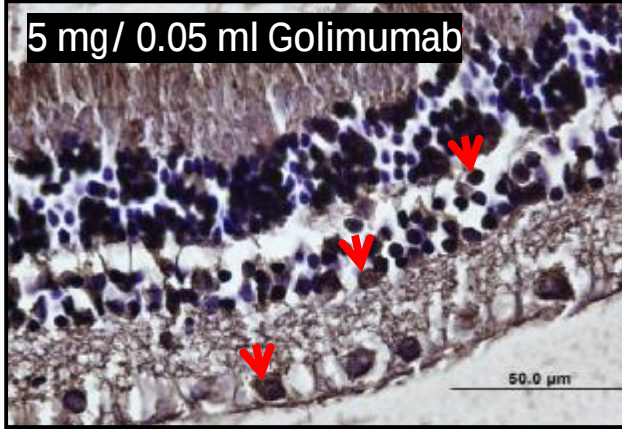
* $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 11: Tüm grupların çalışma ve kontrol gözlerinin üç retina tabakasındaki KASPAZ-3 pozitif hücre yüzdesi karşılaştırması

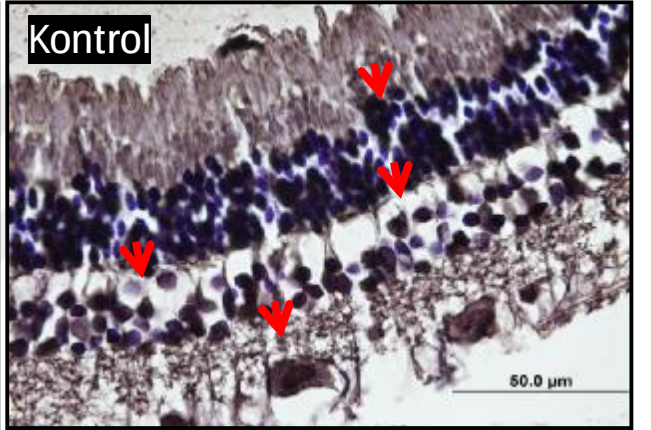
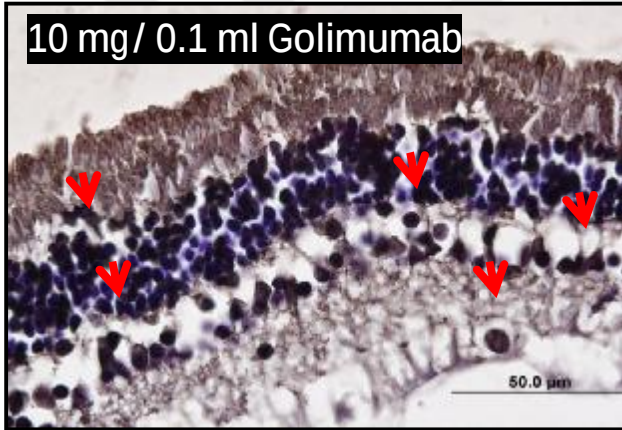
KASPAZ-3	p
Golimumab (n=16)	
Dış Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.555
İç Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.092
Ganglion Hücre Tabakası Kıyaslaması	0.877
BSS (n=16)	
Dış Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.155
İç Nükleer Tabakalar Kıyaslaması	0.236
Ganglion Hücre Tabakası Kıyaslaması	0.955

Üç grup arasındaki kıyaslama Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

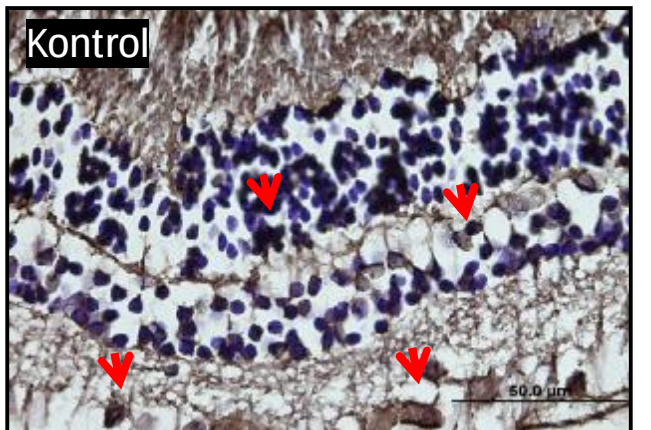
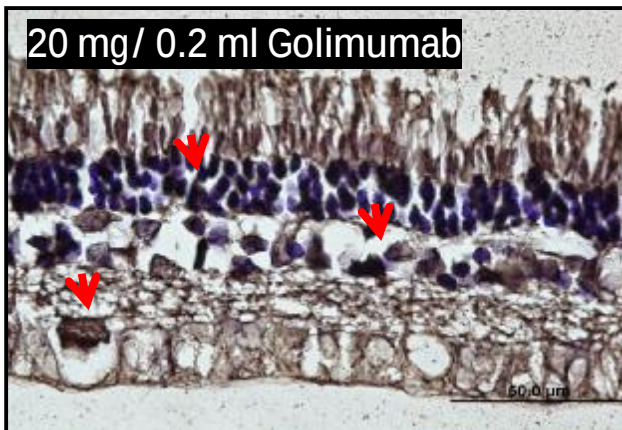
Grup-I



Grup-II

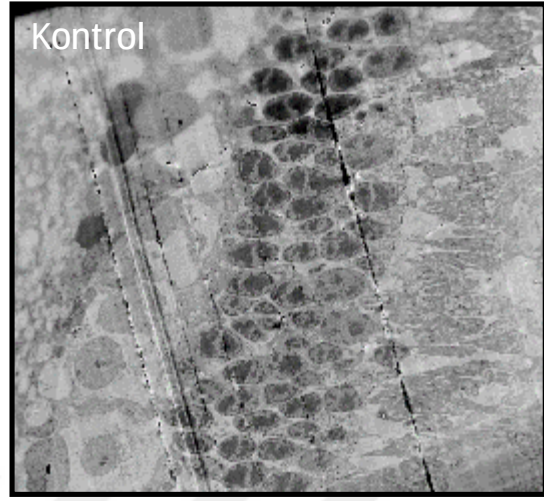
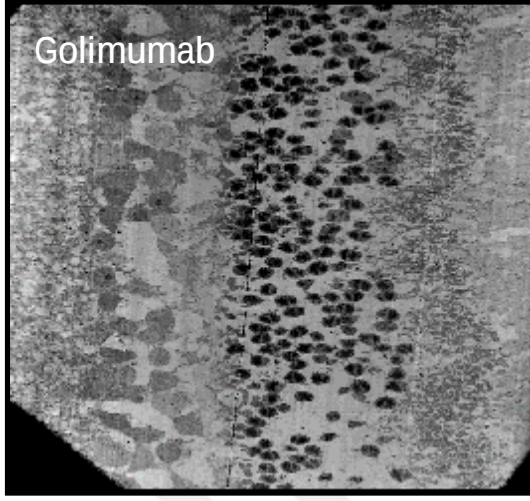


Grup-III

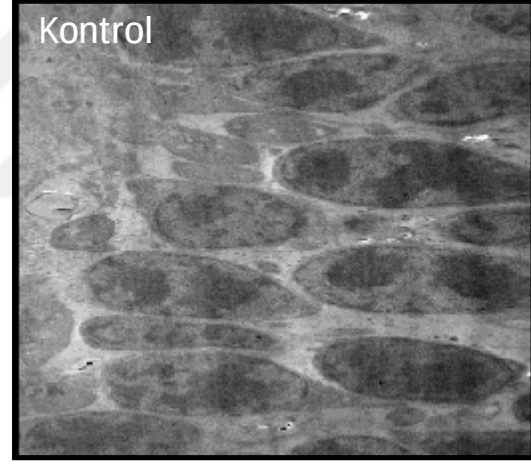
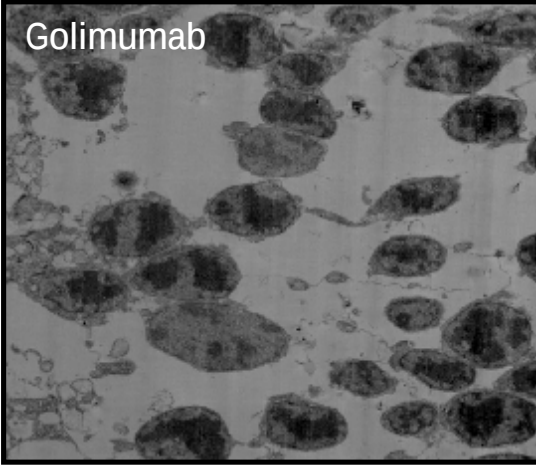


Resim-13: Tüm grupların aktive-Kaspaz-3 ile boyanma bulguları, kırmızı okla Kaspaz-3 pozitif boyanan hücreler gösterilmekte. X100'lük büyütmeye.

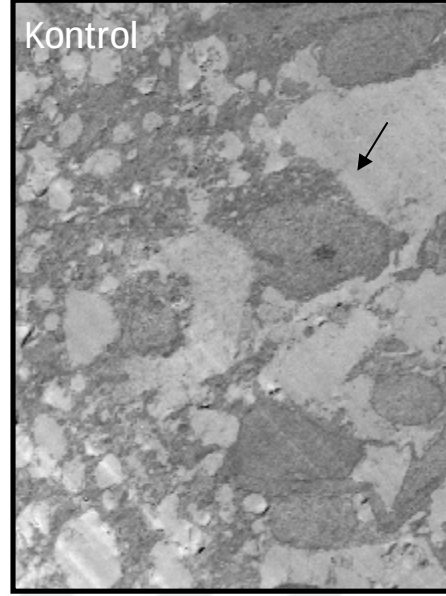
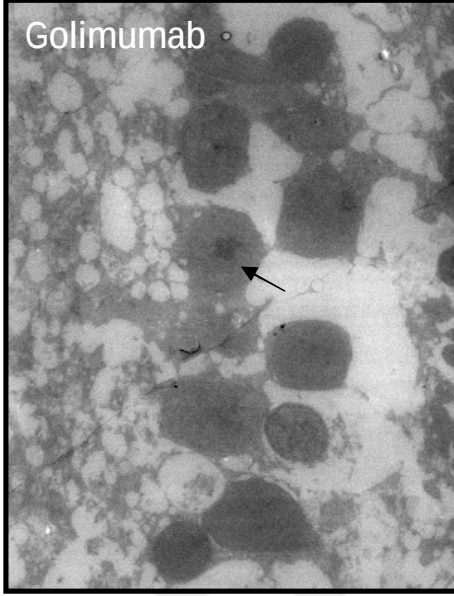
ELEKTRON MİKROSKOPİSİ BULGULARI



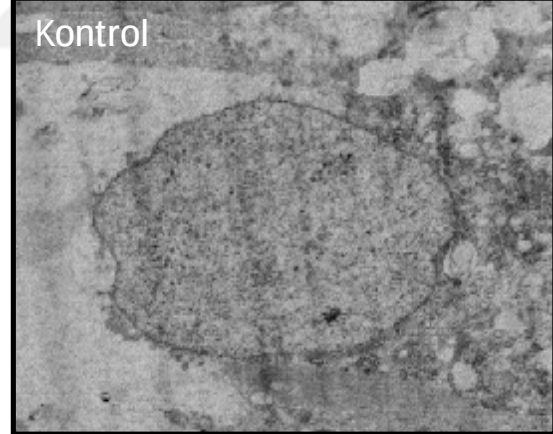
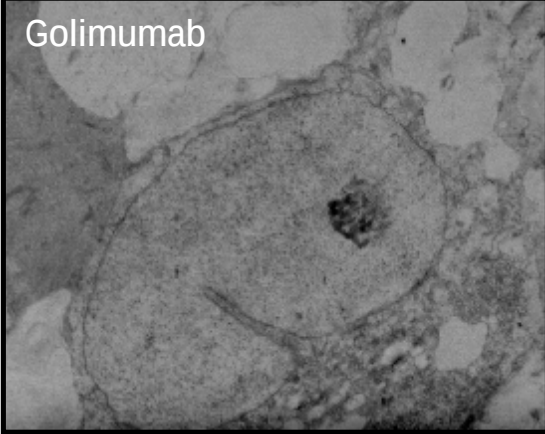
Resim-14: Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün retina katmanlarına ait ultrastrüktürel görünüm. TEM, Golimumab grubu X1700 , kontrol grubu X3000 büyütme



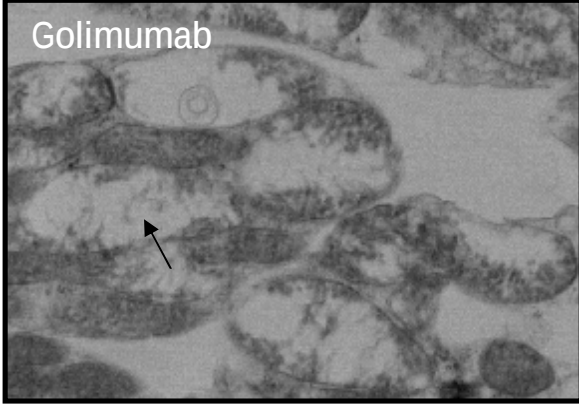
Resim-15: Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün dış nükleer tabakasındaki fotoreseptör hücre çekirdeklerine ait görünüm. TEM, Golimumab grubu X6930 , kontrol grubu X12.000 büyütme



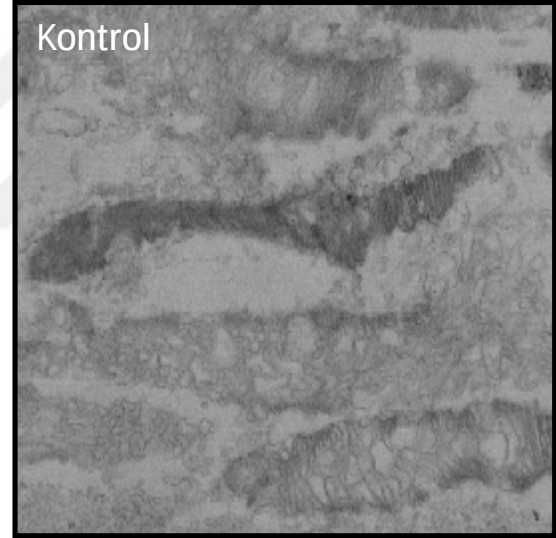
Resim-16: Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün iç nükleer tabakasındaki bipolar hücrelere (siyah ok) ait görünüm. TEM, Golimumab grubu X3900 , kontrol grubu X4110 büyütme



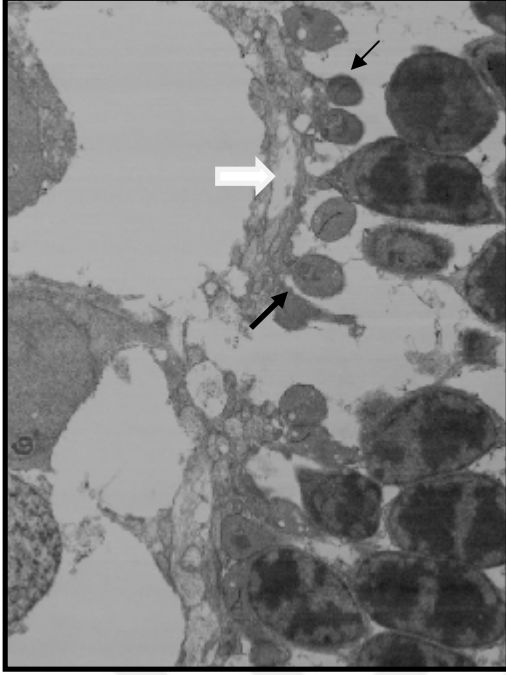
Resim-17: Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün ganglion hücre tabakasına ait görünüm. TEM, Golimumab grubu X9770 , kontrol grubu X9300 büyütme



Resim-18 Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün fotoreseptör iç segmentte mitokondrial kristalizis (siyah ok) bulgusuna ait görünüm. TEM, Golimumab grubu X31.300 , kontrol grubu X26.230 büyütme

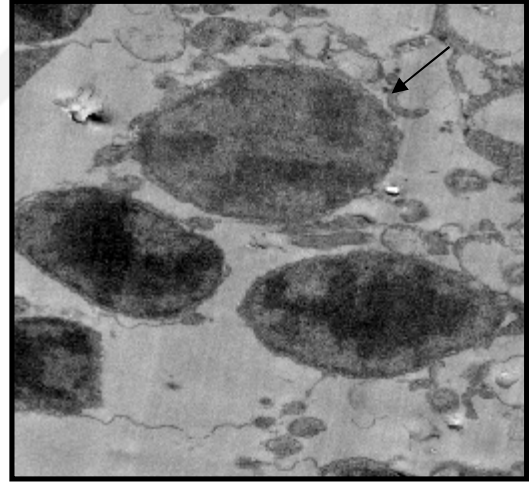


Resim-19: Golimumab ve kontrol grubuna ait birer gözün fotoreseptör dış segmentte disk yapısının bozulmasına ait görünüm. TEM, Golimumab grubu X17.130 , kontrol grubu X24.140 büyütme



Resim-20: Golimumab enjekte edilen gözde fotoreseptör sinaptik cismi içerisinde bulunan pediküller (siyah ok) ve sinaptik aralığa (beyaz ok) ait görünüm

Resim-21: Golimumab enjekte edilen gözde dış nükleer tabakada yer alan, çevre hücrelere göre daha translüsen görünümdeki fotoreseptör hücre çekirdeği ve karyoreksise ait görünüm (siyah ok)



Resim-22: Golimumab enjekte edilen gözde fotoreseptör iç segment tabakasında yer alan myelin figüre (siyah ok) ait görünüm

6. TARTISMA

TNF- α oküler dokularda inflamatuvar, ödematöz, neovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol aldığını gösterilen bir proinflamatuvar sitokindir.⁶ Deneysel retina neovaskülarizasyonu, proliferatif vitreoretinopati ve makula ödeminde aracı bir molekül olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.¹³⁶⁻¹³⁸ TNF'in üveitte proinflamatuvar rolü olduğu, intravitreal enjeksiyon sonrası tavşan gözlerinde üveit geliştiğinin görülmesi ile desteklenmiştir.^{72,74-76} Sadece arka segment değil, ön segmentte de inflamasyonu indüklediği, romatoid korneal ülserasyonu olan hastalarda keratositlerde artmış TNF- α ekspresyonu ve korneal transplant sonrası red reaksiyonlarında anti-TNF tedavinin etkinliğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır.^{14,79}

TNF antagonistleri ilk olarak 1990'lı yılların sonunda RA tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.⁶⁹ RA, AS, psöriazis gibi romatolojik hastalıklarda kullanımları esnasında, primer hastalığın göz bulgularında iyileşme sağladıkları görülmüştür.^{100,105,106,113,114} Ancak tüberküloz, Hepatit B gibi ciddi enfeksiyonlara yatkınlık yarattığı, atopik dermatit , raş gibi hipersensitivite reaksiyonlarını arttırdığı ve lenfoma gibi malignite insidansında artış oluşturduğu için, sadece oküler tutulumla giden inflamatuvar hastalıklarda intravitreal olarak kullanımı gündeme gelmiştir.²⁸ Böylece enfeksiyöz olmayan üveit, DMÖ, eksudatif YBMD ve post-operatif KMÖ gibi çeşitli hastalıklarda intravitreal TNF antagonistleri olan Etanercept, İnflksimab ve Adalimumab kullanılmaya başlanmıştır.^{119,126-128,132} Daha yeni bir molekül olan Golimumab'ın oküler inflamatuvar hastalıklarda sistemik kullanımı mevcutken, henüz intravitreal kullanımı söz konusu değildir.^{115,116} Çalışmamızda üç farklı dozdaki intravitreal Golimumab enjeksiyonunun retina hücrelerinde oluşturduğu morfolojik ve immünohistokimyasal değişiklikleri inceleyerek, ilaç toksisitesini araştırmayı amaçladık.

Literatürde intravitreal yolla verilen TNF- α antagonisti ilaçların histopatolojik ve elektrofizyolojik etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Kıvılcım ve ark.¹³⁹ intravitreal Etanercept enjekte ettikleri tavşanlarda, ilacın 2.5 mg doza kadar fundoskopik bulgular ve ERG testlerinde iyi tolere edildiğini ve histolojik kesitlerde vitreus, retina ve optik sinir anomalisine rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Chron hastalarında 5 mg/kg İnflksimab infüzyonu sonrası 24 saatte kolon lamina propria dokusunda TUNEL pozitif T hücre miktarında artış gözlenirken, periferik kan T lenfositlerinde apoptoziste artış görülmemiştir.¹⁴⁰ Steroide refrakter Chron hastalarında periferik kan T lenfositleri, 1-100 μ g aralığında artan dozlarda İnflksimab ile kültüre edilerek, annexin V ile immünohistokimyasal olarak artmış apoptozis tespit edilmiş ve ilacın monosit

ölümünü kaspaz bağımlı olarak indüklediği gösterilmiştir. Farklı dizayn ve ilaç dozları T hücreleri üzerine İnflksimab toksisitesi çalışmalardaki farklı sonuçların nedeni olarak gösterilmiştir.¹⁴¹

Melo ve ark.¹²² intravitreal 100 µg, 400 µg İnflksimab ya da BSS enjeksiyonu yaptıkları 10 parmak maymun (marmoset) gözünde ışık mikroskopisi ile retina anatomisini incelemiş ve gruplar arasında anlamlı farklılığa rastlamamıştır. İmmünohistokimyasal olarak anti-insan immunoglobulin G ile İnflksimab enjekte edilen gözlerde İLM, GHT, iç ve dış nükleer tabaka ve fotoreseptör hücre tabakasında İnflksimab varlığı gösterilmiş; kontrol gözlerinde immünohistokimyasal boyama negatif olarak izlenmiştir. Ayrıca İnflksimab ve kontrol grubu arasında ERG amplitüd değerleri açısından farklılık bulunmamıştır. Bu çalışmada iç ve dış retina tabakalarına difüze olan İnflksimab ile 1. ve 7. günde histolojik olarak retina hasarına rastlanmamıştır. Primat gözünün hacimsel olarak tavşan ve insan gözünden küçük olması nedeniyle, düşük doz ilaç enjekte edilmesi çalışmanın kısıtlılığı olarak belirtilmiştir.

Theodossiadis ve ark.¹⁴², 0.1 ml’de 1, 2, 5, 8, 10 ve 20 mg İnflksimab enjekte ettikleri tavşan gözlerinde, biyomikroskopik, fundoskopik, elektrofizyolojik ve histolojik bulguları sham enjeksiyon yapılan ya da enjeksiyon yapılmayan gözler ile karşılaştırmış ve 5 mg’a kadar gruplar arasında farklılık gözlemezken; 5 mg’dan itibaren ERG amplitüplerinde azalma gözlemlenmiştir. Histolojik olarak, fonksiyonel testlerle uyumlu şekilde 5 mg dozdan itibaren, diffüz retina ödemi ve GHT, İPT ve RSLT’de mikrokist oluşum ve DNT’de kalınlaşma gözlenmiştir. Ayrıca RSLT ve GHT’yi infiltrate eden plazma hücresi ve lenfositler görülmüştür. 8 mg ve üzerine dozlarda ise koroidde yoğun konjesyon olduğu izlenmiştir.

Lee ve ark. (IOVS 2007;48: ARVO E-Abstract 5171), tavşanda deneysel üveit modelinde intravitreal İnflksimab’ın etkin olduğunu göstermiştir. Minimal efektif doz 0.1 mg olarak bulunmuş, bunun 10 katı dozun ise toksik olabileceği belirtilmiştir. Oysa Giansanti ve ark.¹²¹ intravitreal 1.0 mg, 1.7 mg ve 3.3 mg İnflksimab enjekte ettikleri tavşan gözlerinde ışık mikroskopisinde kontrol grubuna göre ve gruplar arasında histolojik olarak anlamlı fark görmemiş, ancak 3.3 mg enjeksiyon yapılan 3 gözde iç retina tabakalarında ödemle karşılaşmışlardır. Dış retina katmanları ve RPE normal olarak izlenmiştir. İlacın gözdeki yarı ömrü 8.5 gün olarak bulunmuştur. Çalışmada 3.3 mg grubunda histolojik olarak retina anatomisinde bozulma görülse de fonksiyonel olarak ERG’de normal skotopik yanıt izlenmiştir.

Manzano ve ark.¹⁴³, intravitreal Adalimumab enjeksiyonu yapılan tavşanlarda, ilacın 5 mg doza kadar toksiste bulgusu göstermediğini ancak 10 mg doz ile hafif ön kamara reaksiyonu ve fotopik ERG amplitüdlerinde belirgin düşüş olduğunu gözlemiştir. Histolojik kesitlerde HE boyama ile kontrol grubuna göre enjeksiyon gruplarında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Benzer şekilde Tsilimbaris ve ark.¹³³, 0.5 mg ve 5 mg intravitreal Adalimumab enjekte ettikleri tavşan gözlerinde kontrole göre histopatolojik olarak farklılık gözlemlememiştir.

Paula ve ark.¹⁴⁴ tavşan gözlerinde intravitreal 0.5 mg/0.1 ml Adalimumab'ı, sham enjeksiyon (0.1 ml BSS) ve enjeksiyon yapılmayan (kontrol) grupla karşılaştırdığı çalışmada, enjeksiyon yapılan gözlerde akım sitometrisi ile erken ve geç apoptozu değerlendirmiş ve kontrol grubuna göre bir farklılığa rastlamamıştır. Retina hücrelerinde canlılık miktarının, enjeksiyon gruplarında kontrole göre düşük olduğu saptansa da, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 60 gün sonunda retina hücrelerinde %90'ın üzerinde canlılık mevcut olduğu görülmüştür. DNA hasarı tek-hücre jel elektroforezi ile değerlendirilmiş ve üç grup arasında benzer olarak bulunmuştur. Ayrıca kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile kaspaz 3 ve kaspaz 8 gen ekspresyonu değerlendirilerek, gruplar arasında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. Böylece moleküler teknikler kullanılarak yapılan sitotoksosite ve genotoksosite analizi sonucunda, 0.5 mg Adalimumab'ın intravitreal kullanımının güvenli olduğu sonucuna varılmıştır.

Vigna-Pérez ve ark.¹⁴⁵ konvansiyonel tedaviye dirençli 8 romatoid artrit hastasında 26 hafta boyunca iki haftada bir subkütan olarak uygulanan Adalimumab tedavisi sonrası, periferik kan örneklerinden izole ettikleri T lenfosit hücrelerinde TUNEL pozitifliğinin tedavi sonrası 15. günden itibaren arttığını görmüştür. Bu bulguyu in vitro olarak test etmek amacıyla sağlıklı bireyden alınan periferik kan mononükleer hücrelerini 24 saat boyunca 10 mg/ml Adalimumab ile enkübe ettikten sonra 5 hücreden ikisinde apoptotik aktivitede artış tespit etmişlerdir. Benzer yöntemle İnfliksimab'ın, kültüre edilen hücrelerin yaklaşık %50'sinde apoptozisi arttırdığını; Etanercept ile bu oranın daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir.

Shen ve ark.¹⁴⁶ periferik kan monositlerinde TNF- α inhibitörlerinin hücre membranı, mitokondri ve nükleus düzeyinde apoptotik etkisini akım sitometrisi yöntemiyle karşılaştırdıkları çalışmalarında, Adalimumab ve İnfliksimab'ın apoptozisi indüklerken, Etanercept'in indüklediğini gözlemişlerdir. Kültür ortamına eklenen pan-kaspaz inhibitörü

Z-VAD-FMK molekülünün apoptozisi azalttığını gözlemlediklerinden, sürecin kaspaz bağımlı olduğu sonucuna varmışlardır. 48 saat sonunda canlı hücre oranı Adalimumab ve İnfliksımab grubunda yaklaşık %50 iken, Etanercept grubunda %85 olarak bulunmuştur.

Ueda ve ark.¹⁴⁷ çalışmalarında TNF- α eksprese eden ölümsüz T hücre serisini 0.01 mg/mL, 0.1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL anti-TNF ajan ile 24 saat boyunca uyarmış ve bu hücrelerdeki apoptoz miktarını akım sitometrisi ile ölçmüştür. Ayrıca aynı hücrelerde ELISA ile aktif kaspaz-3 miktarı tespit edilmiştir. İnfliksımab ve Adalimumab'ın Golimumab'a göre aktif kaspaz-3 miktarını daha fazla arttırdığı, dolayısıyla daha fazla apoptotik DNA fragmentasyonuna yol açtığı görülmüş; Sertolizumab pegol ve Etanercept'te aktif kaspaz-3 miktarında kontrole göre artış olmadığı bildirilmiştir. Golimumab'ın hücre ölümünü İnfliksımab ve Adalimumab gibi antikora bağımlı hücresel toksisite ve komplemana bağımlı toksisite ile indüklediği; Sertolizumab pegol'un ise direk sitotoksik etki ile çalıştığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda tüm gruplarda BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözlerine göre, Golimumab enjekte edilen gözlerde, H&E boyamada dış nükleer ve iç nükleer tabakalarda azalmış hücre sayısı görülürken; ganglion hücre sayısında anlamlı farklılık gözlenmedi. Hücre sayısındaki azalmanın apoptotik hücre ölümü kaynaklı olduğunu test etmek amacıyla TUNEL ve Kaspaz-3 boyama metodları kullanıldı.

TUNEL metodu 'Nick end' nükleozomlar arasındaki DNA bölgelerinde endonükleaz aktivitesine bağlı olarak oluşan 3'-hidroksi gruplarını yani DNA yıkım ürünlerini göstermektedir. Doku kesitlerinde apoptozisi göstermede standart teknik haline gelmiştir.^{148,149} Ancak apoptozis, DNA zincir kırıklarının olduğu tek olay değildir. Nekroz, otoliz, sonradan tamir edilecek DNA zincir kırıkları ve aktif gen transkripsiyonu yapan non-apoptotik hücre nükleusu da TUNEL pozitif olarak boyanabilir.¹⁵⁰⁻¹⁵² Bunun aksine, apoptozis sonucu nükleozomal parçalar yerine daha büyük yıkım fragmanları oluşursa, TUNEL ile tespit edilebilen apoptotik hücre sayısı yanlışlıkla düşük bulunacaktır.¹⁵³

Kaspaz-3 boyama, aktive kaspaz içeren hücrelerde sitoplazmik lokalizasyona dayalı bir apoptoz belirteci olup oldukça spesifiktir. Apoptozisin erken evresinde işlev görmektedir. TUNEL ile boyanan DNA yıkım ürünleri ise apoptozisin geç bulgusudur.¹⁵⁴ Ancak unutulmamalıdır ki, apoptozis kaspaz aktivasyonu olmadan ya da kaspaz-3 dışındaki diğer kaspazlar vasıtasıyla da gerçekleşebilir. Bu durum Kaspaz-3 boyamanın sensitivitesini düşürmektedir.^{155,156}

De Boer ve ark.¹⁵⁷, konjestif kalp yetmezlikli hastalarda myokard dokusunda apoptozisi TUNEL ve Kaspaz-3 boyama ile araştırmış ve TUNEL pozitifliği %68 iken, Kaspaz-3 ile sadece birkaç myositin boyandığını görmüştür. Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda TUNEL boyanma yüzdesi, tüm gruplarda Kaspaz-3 boyanma yüzdesinden yüksek olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda sensitivite ve spesifiteyi arttırmak için TUNEL ve Kaspaz-3 boyama yöntemlerini birlikte kullanarak retinal hücrelerde apoptozu değerlendirdik. 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml intravitreal anti-TNF ilaç uygulanan gözlerde, iç nükleer tabakada pozitif boyanan hücre yüzdesi, BSS grubuna göre her iki boyama yönteminde de istatistiksel olarak anlamlı daha fazla saptandı. Dış nükleer tabakadaki TUNEL pozitif hücre yüzdesi 5 mg/0.05 ml dozda kontrol grubundan farklı değilken; 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml dozlarda kontrole göre artmış TUNEL pozitifliği izlendi. Kaspaz-3 boyamada ise her üç dozda da pozitif boyanan hücre yüzdesi kontrole göre anlamlı yüksek bulundu. Dış nükleer tabakadaki farklılığın bu tabakadaki hücrelerin henüz erken apoptotik evrede olduğundan Kaspaz-3 ile boyanırken, TUNEL ile boyanmamış olabileceğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Golimumab enjekte edilen gözlerin ganglion hücre tabakasında gerek TUNEL gerekse Kaspaz-3 boyamasında kontrol grubuna göre pozitif boyanan hücre yüzdesinde anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. Literatürde ganglion hücre tabakasının histolojik olarak incelenmesi genellikle glokom modellerinde çalışılmış olup, ganglion hücresi üzerine ilaç toksisitesinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Giansanti ve ark.¹⁵⁸, 2mg ve 3 mg İnfliksımab ile enjekte edilen ARPE-19 (retina pigment epiteli) ve RGC-5 (ganglion hücre) hücre serilerinde apoptozis göstergesi olan Kaspaz-3'ü Western Blot analizi ile incelenmiş ve artmış proteolitik aktiviteye rastlanmamıştır; ancak bu bulgunun apoptozu giren hücrenin doku fagositleri tarafından temizlenmesine bağlı olabileceği belirtilmiştir.

Chang ve ark.¹⁵⁹ tek doz ya da rekürren dozlarda intravitreal 125 mikrogram Bevacizumab enjeksiyonu yaptıkları rat çalışmasında ganglion hücre sayısında kontrole göre düşüş görmemişlerdir. Schnichels ve ark.¹⁶⁰, üç farklı oküler hücre kültürü (GHT, RPE, FT kültürü) üzerinde Aflibercept'in farklı dozlarda (0.125, 0.5, 2 mg) etkisinin değerlendirildiği çalışmada hücre morfolojisinin değişmediği ve hücrelerde apoptozun artmadığı gösterilmiştir.

Ganglion hücrelerinin kaspaz bağımlı apoptozu uğradığı optik sinir kesisi, geçici göz içi basıncı yaratılarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı ve oküler hipertansiyon gibi

hayvan modellerinde gösterilmiştir.¹⁶¹⁻¹⁶⁴ Tezel ve ark.¹⁶⁵ ganglion hücre ölümünde, kaspaz bağımsız yolların varlığını araştırdıkları in vitro rat GH kültürü modelinde, hücreleri hipoksi ile uyararak apoptozisi indüklemiş ve ortama verilen çeşitli kaspaz inhibitörleri sonrası apoptoz hızının azalmış olduğunu görmüştür. Ancak 48 saat sonunda hücrelerin %70'inden azında canlılık olduğunu tespit ederek, apoptozisin tamamen inhibe edilemediğini, dolayısıyla ganglion hücrelerinde kaspaz bağımsız bir yolak olabileceğini bildirmiştir.

Martínez-Fernández ve ark.¹⁶⁶ Zaprinast (Fosfodiesteraz 6 inhibitörü) ile domuz gözlerinde oluşturdukları deneysel retina dejenerasyonu modelinde, retina eksplantlarının kültür ortamında 2 µg/mL İnflksimab ile enkübasyonu sonrası, özellikle dış nükleer tabaka olmak üzere tüm retina katmanlarında TUNEL pozitif hücre sayısında azalma görülmüştür. Ayrıca özellikle iç nükleer tabakada kaspaz-3 pozitif hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Bu iki bulgudan yola çıkılarak TNF- α 'nın hücre ölümünü dış nükleer tabaka ve ganglion hücre tabakasında kaspaz-bağımsız, iç nükleer tabakada ise kaspaz bağımlı olarak indüklediği öne sürülmüştür.

Roh ve ark.¹⁶⁷ episkleral venöz koterizasyonla oluşturdukları akut glokom modelinde, göz içi basınç yüksekliğinin optik sinir başı ve retinada TNF- α ekspresyonunda artışa neden olduğunu gözlemlemiştir. TNF etkisi ile bölgeye göç eden makrofaj ve mikrogliaların aksonal hasar ile ganglion hücre ölümünü indüklediğini; sistemik olarak verilen Etanercept'in TNF- α 'yı bloke ederek ganglion hücre ölümünde azalmaya yol açtığını dolayısıyla nöroprotektif özelliği olduğunu bildirmiştir.

Martínez-Fernández ve ark.¹⁶⁸ murin otozomal resesif RP modelinde uygulanan intraperitoneal Adalimumab tedavisinin DNT'daki TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı olarak azalttığını, böylece fotoreseptör canlılığını koruduğunu göstermiştir.

Koizumi ve ark.¹⁶⁹, subkütan yolla lipopolisakkarit enjekte ederek üveit modeli oluşturdukları sıçanlarda TUNEL ve Kaspaz-3 boyama ile ganglion hücre, vasküler endotel hücre ve iç nükleer tabakada apoptotik hücrelerde kontrole göre artış saptamışlardır. Aynı hayvanlar Etanercept ile tedavi edildiklerinde apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma görülmüştür.

Çalışmamızda ganglion hücre tabakasındaki Kaspaz-3 pozitif hücre yüzdesinde kontrol grubuna göre farklılık saptanmaması, süreçte kaspaz bağımsız mekanizmaların etkin olabileceğini düşündürülebilir. Ancak böyle bir durumda, bulgularımızın aksine TUNEL

boyama yüzdelерinde iki grup arasında farklılık beklenmelidir. Çalışma grubu gözlerinde ganglion hücre miktarı kontrol grubuna göre azalmış olsa da, iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bu durum TNF antagonizmasının bahsedilen çalışmalarda gösterilen nöroprotektif etkisi ile açıklanabileceği gibi; ganglion hücrelerinin analiz edilen diğer tabakalardaki hücrelere göre (İNT ve DNT) normal retinada az sayıda bulunması ile de açıklanabilir.

H&E, TUNEL ve Kaspaz-3 ile boyamada artan doz ile hücre sayısında anlamlı azalma ya da apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı artış görülmemesi, intravitreal Golimumab'ın toksisitesinin test edilen 5 mg, 10 mg ve 20 mg için doz bağımlı olmadığını düşündürmektedir. Ancak bu bulgunun, daha geniş bir doz aralığında ilacın enjekte edildiği daha fazla sayıda grup ile kurgulanacak çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Literatürde intravitreal enjekte edilen ilaçların elektron mikroskopik düzeyde etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Melo ve ark.¹²² intravitreal 100 µg, 400 µg İnfliksimab ya da BSS enjeksiyonu (kontrol) yaptıkları 10 parmak maymun (marmoset) gözünde TEM incelemelerinde kontrol grubunda tüm retina katmanlarının normal olduğunu gözlemlemiştir. RSLT, fotoreseptörler, RPE, siliyer cisim epiteli ve optik sinir tüm gözlerde normal izlenmiştir. 1. ve 7. günde RPE hücrelerinin intraselüler yapısı ve hücreler arası bağlantılarının korunduğu gözlenmiştir. Ekstraselüler alanda vakuol oluşumu gözlenmiş ancak bu bulgunun gerek ilaç enjekte edilen gerekse kontrol gözlerinde mevcut olduğu vurgulanmıştır.

Yu ve ark.¹⁷⁰ intravitreal triamsinolon asetonid (TA) toksisitesini inceledikleri çalışmalarında 0.5 mg ve 1 mg TA gruplarında, salin enjekte edilen kontrol grubuna göre TEM ile hücresel yapıda farklılık görülmediğini; ancak 4 mg, 8 mg ve 20 mg TA enjekte edilen gruplarda fotoreseptör dış segment yapısının bozulduğunu ve subretinal aralıkta nekrotik debri birikimi olduğunu bildirmişlerdir. RPE hücrelerinde geniş lipid damlaları görülmüştür. İç retina katmanları normal izlenmiştir.

Avcı ve ark.¹⁷¹ 1.25 mg ve 3.0 mg intravitreal Bevacizumab'ın retina üzerine morfolojik etkilerini elektron mikroskopik olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, kontrol grubunda retina morfolojisini normal olarak izlerken, ilaç grubunda fotoreseptör iç segmentlerinde mitokondrial şişme ve krista yapısında düzensizleşme olduğunu

bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve Bax protein ekspresyonunda FT, DNT, DPT’de yoğun artış görülürken, kontrol grubunda minimal boyanma izlenmiştir.

Çalışmamızda Golimumab ve BSS enjekte edilen tavşan gözlerinde çeşitli retina katmanları ve hücreleri TEM ile değerlendirilmiştir. İlaç grubunda hücre hasarı bulgusu olan myelin figür ve karyoreksis gözlenirken, kontrol gözlerine göre hücreler arası boşluğun arttığı ve iç ve dış nükleer tabakalarda hücre sayısının azaldığı izlenmiştir.

Tavşanlarda retina daha az vasküler olup vitreus boşluğu daha küçük iken, lens daha büyük yapıdadır. Bu faktörler insanlara göre ilaçların farmakokinetiğinin farklı olmasına neden olabilir. Ancak literatürdeki karşılaştırmalı çalışmalar tavşan gözünün intravitreal farmakokinetikleri (klerans, dağılım volümü, yarı ömür) çalışmak için yararlı ve etkin bir hayvan modeli olduğunu göstermektedir.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Ancak uyguladığımız anti-TNF ilaç insan TNF'ine yönelik olduğundan, tavşan TNF'ine afinitesi değişkenlik gösterebilir. Bu durum ilaç toksisitesini değerlendirdiğimiz çalışmamızda önemli bir karıştırıcı etken olarak görünmese de, ileride yapılabilecek etkinlik çalışmalarında göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışma süremizin 1 hafta olması, uyguladığımız doz çeşitlerinin sınırlı olması, anatomik toksisite bulgularının fonksiyonel testler (ERG, OCT vb) ile desteklenmemiş olması çalışmamızın kısıtlılıkların oluşturmaktadır.

7. SONUÇLAR

1. Çalışmada intravitreal anti-TNF ilaç uygulanan tavşan gözlerinde, ışık mikroskopunda makroskopik olarak retina tabakalarında kayba rastlanmadı.
2. Tüm dozlarda (5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml), BSS enjeksiyonu yapılan kontrol gözlerine göre, Golimumab enjekte edilen gözlerde, H&E boyamada dış ve iç nükleer tabakalarda azalmış hücre sayısı görülürken; ganglion hücre sayısında anlamlı farklılık gözlenmedi.
3. Tavşan gözlerinin, apopitotik süreçteki DNA fragmentasyonunu gösteren TUNEL boyama tekniği ile yapılan incelemelerinde; 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml intravitreal anti-TNF ilaç uygulanan gözlerde, iç nükleer tabakada TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı BSS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla saptandı. Dış nükleer tabakadaki TUNEL pozitif hücre sayısı 5 mg/0.05 ml dozda kontrol grubundan farklı değilken; 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml dozlarda kontrole göre artmış TUNEL pozitifliği izlendi.
4. Dış nükleer tabakada 5 mg/0.05 ml grubuna göre, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml gruplarında TUNEL pozitif boyanan hücre yüzdesinde anlamlı artış mevcutken, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml gruplarının kendi arasında TUNEL pozitifliği açısından anlamlı farklılık saptanmadı.
5. Kaspaz-3 ile yapılan immünohistokimyasal incelemede; 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml intravitreal anti-TNF ilaç uygulanan gözlerde hem dış hem de iç nükleer tabakada, kontrol grubuna göre apopitotik sürece gidişin göstergesi olan Kaspaz-3 tutulumunda istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi.
6. Golimumab enjekte edilen gözlerin ganglion hücre tabakasında gerek TUNEL gerekse Kaspaz-3 boyamasında kontrol grubuna göre pozitif boyanan hücre yüzdesinde anlamlı farklılığa rastlanmadı.
7. İntravitreal Golimumab uygulamasının, 5 mg/0.05 ml, 10 mg/0.1 ml ve 20 mg/0.2 ml dozlarında retina fotoreseptör ve bipolar hücrelerine toksik etkisinin olduğu sonucuna varıldı.

REFERANSLAR

1. van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut*. 1997;40:443-448.
2. Davis JC, Van Der Heijde D, Braun J, et al. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (Etanercept) for treating Ankylosing Spondylitis: A Randomized, Controlled Trial. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3230-3236. doi:10.1002/art.11325.
3. Braun Jür, Bollow M, Neure L, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(4):499-505. doi:10.1002/art.1780380407.
4. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:397-440. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397.
5. Sartani G, Silver PB, Rizzo L V., et al. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy suppresses the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice by inhibiting antigen priming. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(11):2211-2218.
6. Rodrigues EB, Farah ME, Maia M, et al. Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(2):117-144. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.11.005.
7. Keadle TL, Usui N, Laycock KA, et al. IL-1 and TNF- α are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(1):96-102.
8. Odorcic S, Keystone EC, Ma JJK. Infliximab for the treatment of refractory progressive sterile peripheral ulcerative keratitis associated with late corneal perforation: 3-year follow-up. *Cornea*. 2009;28(1):89-92. doi:10.1097/ICO.0b013e318181a84f.
9. Yoshida M, Yoshimura N, Hangai M, et al. Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor gene expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(3):1107-1113.
10. Nakamura S, Yamakawa T, Sugita M, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(11):3884-3889.
11. De Vos AF, Van Haren MAC, Verhagen C, et al. Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis in the rat. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(3):1100-1106.

12. Santos Lacomba M, Marcos Martín C, Gallardo Galera JM, et al. Aqueous humor and serum tumor necrosis factor-alpha in clinical uveitis. *Ophthalmic Res.* 2001;33(5):251-255. doi:55677.
13. Franks WA, Limb GA, Stanford MR, et al. Cytokines in human intraocular inflammation. *Curr Eye Res.* 1992;11(S1):187-191. doi:10.3109/02713689208999531.
14. Prada J, Noelle B, Baatz H, Hartmann C, Pleyer U. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 gene expression in keratocytes from patients with rheumatoid corneal ulcerations. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(5):548-550.
15. Takase H, Futagami Y, Yoshida T, et al. Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1557-1561. doi:10.1167/iovs.05-0836.
16. Ali TK, El-Remessy AB. Diabetic retinopathy: Current management and experimental therapeutic targets. *Pharmacotherapy.* 2009;29(2):182-192. doi:10.1592/phco.29.2.182.
17. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J.* 2004;18(12):1450-1452. doi:10.1096/fj.03-1476fje.
18. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, et al. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;79(1):141-146. doi:10.1016/j.diabres.2007.07.011.
19. Gustavsson C, Agardh E, Bengtsson B, Agardh CD. TNF-alpha is an independent serum marker for proliferative retinopathy in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complicat.* 2008;22(5):309-316. doi:10.1016/j.jdiacomp.2007.03.001.
20. Jasielska M, Semkova I, Shi X, et al. Differential role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha receptors in the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3874-3883. doi:10.1167/iovs.09-5003.
21. Lichtlen P, Lam TT, Michael Nork T, Streit T, Urech DM. Relative contribution of VEGF and TNF-a in the cynomolgus laser-induced CNV model: Comparing the efficacy of bevacizumab, adalimumab, and ESBA105. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(9):4738-4745. doi:10.1167/iovs.09-4890.
22. Xu H, Chen M, Forrester J V. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(5):348-368. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.06.001.

23. Pascual-Camps I, Hernández-Martínez P, Monje-Fernández L, et al. Update on intravitreal anti-tumor necrosis factor alpha therapies for ocular disorders. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2014;4(1):1-5. doi:10.1186/s12348-014-0026-8.
24. Shealy DJ, Cai A, Staquet K, et al. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor alpha. *MAbs*. 2010;2(4):428-439. doi:10.4161/mabs.2.4.12304.
25. Agency EM. ASSESSMENT REPORT FOR Simponi. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000992/WC500052372.pdf. Published 2009.
26. Giganti M, Beer PM, Lemanski N, et al. Adverse events after intravitreal infliximab (Remicade). *Retina*. 2010;30(1):71-80. doi:10.1097/IAE.0b013e3181bcef3b.
27. Markomichelakis N, Delicha E, Masselos S, Sfikakis PP. Intravitreal infliximab for sight-threatening relapsing uveitis in Behçet disease: A pilot study in 15 patients. *Am J Ophthalmol*. 2012;154(3). doi:10.1016/j.ajo.2012.03.035.
28. Mirshahi A, Hoehn R, Lorenz K, Kramann C, Baatz H. Anti-tumor necrosis factor alpha for retinal diseases: current knowledge and future concepts. *J Ophthalmic Vis Res*. 2012;7(1):39-44.
29. Wybar K. Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. *Br J Ophthalmol*. 1977;61(4):302-302. doi:10.1136/bjo.61.4.302-a.
30. Rotsos TG, Moschos MM. Cystoid macular edema. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(4):919-930.
31. Hogan MJ, Alvarado JA, Wedell JE. *Histology of the Human Eye*.; 1971.
32. Morgan J, Wong R. Development of Cell Types and Synaptic Connections in the Retina. In: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*.; 1995.
33. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Curr Mol Med*. 2010;10(9):802-823.
34. Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):307-312.
35. Kolb H, Linberg KA, Fisher SK. Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol*. 1992;318(2):147-187. doi:10.1002/cne.903180204.
36. Chen L, Yang P, Kijlstra A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*. 2002;10(1):27-39.
37. Berson DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends*

- Neurosci.* 2003;26(6):314-320. doi:10.1016/S0166-2236(03)00130-9.
38. Curcio CA, Allen KA. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol.* 1990;300(1):5-25. doi:10.1002/cne.903000103.
 39. Kennedy MA. A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and Adaptive Response. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2010;40(3):369-379. doi:10.1016/j.cvsm.2010.01.003.
 40. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti F. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2011;7(Suppl 1):S1. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S1.
 41. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. In: *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.* ; 2012:55-78. doi:10.1007/978-1-62703-589-7_1.
 42. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;111(2):S460-S475. doi:10.1067/mai.2003.108.
 43. Opal SM, DePalo VA. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest.* 2017;117(4):1162-1172. doi:10.1378/chest.117.4.1162.
 44. Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat.* 1944;78(Pt 5):176-199.
 45. Hori J. Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2008;1(2-4):94-100. doi:10.1007/s12177-008-9010-6.
 46. Stein-Streilein J. Immune regulation and the eye. *Trends Immunol.* 2008;29(11):548-554. doi:10.1016/j.it.2008.08.002.
 47. Zhang J, Wu GS, Ishimoto S, Pararajasegaram G, Rao NA. Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38.
 48. Niederkorn J, Streilein JW, Shadduk JA. Deviant immune responses to allogeneic tumors injected intracamerally and subcutaneously in mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20(3):355-363.
 49. Taylor AW, Alard P, Yee DG, Streilein JW. Aqueous humor induces transforming growth factor-beta (TGF-beta)-producing regulatory T-cells. *Curr Eye Res.* 1997;16(9):900-908.

50. Streilein JW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18(3):357-370. doi:10.1016/S1350-9462(98)00022-6.
51. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.* 2002;(9):143-148.
52. Yazici P, Alizadehshargh S, Güner-Akdoğan G. Apoptoz: Düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptozu saptama yöntemleri. *Türkiye Klin J Med Sci.* 2009;29(6):1677-1686.
53. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi AH, ve Embriyoloji Anabilim Dalı H. Apoptosis ve hücre döngüsü Apoptosis and cell cycle. *Ege J Med.* 2014;53(1):60-64.
54. Apoptosis and autoimmunity. In: *Kopman WJ, Ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions.* Lippincott-Williams&Wilkins; 2001.
55. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337.
56. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383.
57. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1067-1074. doi:10.1038/sj.cdd.4400601.
58. Thornberry NA. Caspases: Enemies Within. *Science (80-).* 1998;281(5381):1312-1316. doi:10.1126/science.281.5381.1312.
59. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell.* 1993;75(4):641-652. doi:10.1016/0092-8674(93)90485-9.
60. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996;87(2):171.
61. Arama E, Agapite J, Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in Drosophila. *Dev Cell.* 2003;4(5):687-697.
62. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci .* 1975;72(9):3666-3670.
63. Haranaka K, Satomi N, Sakurai A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int J Cancer.* 1984;34(2):263-267.
64. Zamkoff KW, Newman NB, Rudolph AR, et al. A phase I trial of subcutaneously administered recombination tumor necrosis factor to patients with advanced

- malignancy. *J Biol Response Mod.* 1989;8(5):539-552.
65. Schwartz JE, Scuderi P, Wiggins C, Rudolph A, Hersh EM. A phase I trial of recombinant tumor necrosis factor (rTNF) administered by continuous intravenous infusion in patients with disseminated malignancy. *Biotherapy.* 1989;1(3):207-214. doi:10.1007/BF02170889.
 66. Negrier MS, Pourrea CN, Palmer PA, et al. Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by recombinant tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. *J Immunother.* 1992;11(2):93-102.
 67. Boynton JR, Purnell EW. Bilateral microphthalmos without microcornea associated with unusual papillomacular retinal folds and high hyperopia. *Am J Ophthalmol.* 1975.
 68. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1717-1725. doi:10.1056/NEJM199606273342607.
 69. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* 2001;19:163-196. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.163.
 70. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561-572. doi:10.1016/1074-7613(95)90001-2.
 71. Robertson M, Liversidge J, Forrester J V., Dick AD. Neutralizing tumor necrosis factor- α activity suppresses activation of infiltrating macrophages in experimental autoimmune uveoretinitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):3034-3041. doi:10.1167/iovs.02-1156.
 72. Kulkarni PS, Srinivasin BD. Cachectin: a novel polypeptide induces uveitis in the rabbit eye. *Exp Eye Res.* 1988;46(4):631-633.
 73. Rosenbaum JT, Howes EL, Rubin RM, Samples JR. Ocular inflammatory effects of intravitreally-injected tumor necrosis factor. *Am J Pathol.* 1988;133(1):47-53.
 74. Fleisher LN, Ferrell JB, McGahan MC. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor-alpha and endotoxin. *Inflammation.* 1990;14(3):325-335. doi:10.1007/BF00915816.
 75. de Vos AF, Van Haren MAC, Verhagen C, et al. Tumour necrosis factor-induced uveitis in the lewis rat is associated with intraocular interleukin 6 production. *Exp Eye Res.* 1995;60(2):199-207. doi:10.1016/S0014-4835(95)80011-5.
 76. Rosenbaum JT, Boney RS. Failure to inhibit endotoxin-induced uveitis with antibodies

- that neutralize tumor necrosis factor. *Reg Immunol.* 1994;5(5):299-303.
77. Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, et al. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(5):2184-2191. doi:10.1167/iovs.02-0589.
 78. Armstrong D, Ueda T, Aljada a, et al. Lipid hydroperoxide stimulates retinal neovascularization in rabbit retina through expression of tumor necrosis factor-alpha, vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor. *Angiogenesis.* 1998;2(1):93-104.
 79. Rayner SA, King WJ, Comer RM, et al. Local bioactive tumour necrosis factor (TNF) in corneal allotransplantation. *Clin Exp Immunol.* 2000;122(1):109-116. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01339.x.
 80. Lis K, Kuzawińska O, Bałkowiec-Iskra E. Tumor necrosis factor inhibitors – state of knowledge. *Arch Med Sci.* 2014;10(6):1175-1185. doi:10.5114/aoms.2014.47827.
 81. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(4):453-472. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.
 82. Dinarello CA. Differences between anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibodies and soluble TNF receptors in host defense impairment. *J RheumatolSuppl.* 2005;74:40-47. doi:03800903-74-40 [pii].
 83. ENBREL® 25 mg Enjeksiyonluk Solüsyon İçin Toz. Kısa Ürün Bilgisi. https://www.pfizer.com.tr/sites/g/files/g10026971/f/201608/Enbrel_25_mg_lyo_KUB_12.05.2016.pdf. Published 2016.
 84. REMICADE® 100 mg Konsantre i.v. İnfüzyon Çözeltisi Hazırlamak için Liyofilize Toz İçeren Flakon. Kısa Ürün Bilgisi. <https://www.ilacrehberi.com/pdfs/remicade-konsantre-iv-infuzyon-9def/kub/>. Published 2013.
 85. HUMIRA Enjeksiyonluk Çözelti İçeren (Adalimumab 40 mg/0.8 ml) Kullanıma Hazır Enjektör. Kısa Ürün Bilgisi. <https://www.ilacrehberi.com/pdfs/humira-enjeksiyonluk-cozelti-iceren-adalimumab-40-ec59/kub/>. Published 2015.
 86. CIMZIA 200 mg/ml S.C. steril kullanıma hazır enjektör. Kısa Ürün Bilgisi. <https://www.ilacrehberi.com/pdfs/cimzia-200-mgml-sc-steril-kullanima-hazir-enjekto-d5c3/kub/>. Published 2012.
 87. SIMPONI® 50 mg PEN enjeksiyonluk çözelti içeren kullanıma hazır kalem. Kısa ürün bilgisi. <http://pdf.ilacprospektusu.com/5161-simponi-50-mg-pen-enjeksiyonluk-cozelti->

- iceren-kullanima-hazir-kalem-kub.pdf. Published 2015.
88. Wagner C, Visvanathan S, Braun J, et al. Serum markers associated with clinical improvement in patients with ankylosing spondylitis treated with golimumab. *Ann Rheum Dis*. 2011;71(5):674-680. doi:10.1136/ard.2010.148890.
 89. Wagner CL, Visvanathan S, Elashoff M, et al. Markers of inflammation and bone remodelling associated with improvement in clinical response measures in psoriatic arthritis patients treated with golimumab. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):83-88. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201697.
 90. Inman RD, Baraliakos X, Hermann KGA, et al. Serum biomarkers and changes in clinical/MRI evidence of golimumab-treated patients with ankylosing spondylitis: Results of the randomized, placebo-controlled GO-RAISE study. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1). doi:10.1186/s13075-016-1200-1.
 91. Visvanathan S, Rahman MU, Keystone E, et al. Association of serum markers with improvement in clinical response measures after treatment with golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite receiving methotrexate: Results from the GO-FORWARD study. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6). doi:10.1186/ar3188.
 92. Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, et al. Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor α given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: The GO-FORWARD Study. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):789-796. doi:10.1136/ard.2008.099010.
 93. Keystone E, Genovese MC, Klareskog L, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: 52-week results of the GO-FORWARD study. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1129-1135. doi:10.1136/ard.2009.116319.
 94. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, et al. Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: Results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):817-824. doi:10.1136/ard.2011.200317.
 95. Smolen JS, Kay J, Doyle MK, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet*. 2009;374(9685):210-221. doi:10.1016/S0140-6736(09)60506-7.
 96. Smolen JS, Kay J, Landewé RBM, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis who have previous experience with tumour necrosis factor inhibitors: Results

- of a long-term extension of the randomised, double-blind, placebo-controlled GO-AFTER study through week 160. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(10):1671-1679. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200956.
97. Inman RD, Davis JC, Van Der Heijde D, et al. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3402-3412. doi:10.1002/art.23969.
 98. Kavanaugh A, McInnes IB, Mease P, et al. Clinical efficacy, radiographic and safety findings through 5 years of subcutaneous golimumab treatment in patients with active psoriatic arthritis: Results from a long-term extension of a randomised, placebo-controlled trial (the GO-REVEAL study). *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1689-1694. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204902.
 99. Foster CS, Tufail F, Waheed NK, et al. Efficacy of etanercept in preventing relapse of uveitis controlled by methotrexate. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(4):437-440. doi:10.1001/archophth.121.4.437.
 100. Reiff A. Long-term outcome of etanercept therapy in children with treatment-refractory uveitis [4]. *Arthritis Rheum*. 2003;48(7):2079-2080. doi:10.1002/art.11155.
 101. Smith J, Thompson DJS, Whitcup SM, et al. A randomized, placebo-controlled, double-masked clinical trial of etanercept for the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;53(1):18-23. doi:10.1002/art.20904.
 102. Fonollosa A, Artaraz J, Les I, et al. Sarcoid intermediate uveitis following etanercept treatment: A case report and review of the literature. *Ocul Immunol Inflamm*. 2012;20(1):44-48. doi:10.3109/09273948.2011.623212.
 103. Wang F, Wang NS. Etanercept therapy-associated acute uveitis: A case report and literature review. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(5):838-839.
 104. Kakkassery V, Mergler S, Pleyer U. Anti-TNF- α treatment: A possible promoter in endogenous uveitis observational report on six patients: Occurrence of uveitis following etanercept treatment. *Curr Eye Res*. 2010;35(8):751-756. doi:10.3109/02713683.2010.486520.
 105. El-Shabrawi Y, Hermann J. Anti-tumor necrosis factor- α therapy with infliximab as an alternative to corticosteroids in the treatment of human leukocyte antigen B27-associated acute anterior uveitis. *Ophthalmology*. 2002;109(12):2342-2346. doi:10.1016/S0161-6420(02)01292-7.

106. Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, et al. Evaluation of the long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behçet's disease: A multicenter study. *Ophthalmology*. 2014;121(10):1877-1884. doi:10.1016/j.opthta.2014.04.042.
107. Richards JC, Tay-Kearney ML, Murray K, Manners P. Infliximab for juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Clin Exp Ophthalmol*. 2005;33(5):461-468. doi:10.1111/j.1442-9071.2005.01062.x.
108. Beer PM, Wong SJ, Schartman JP, et al. Infliximab stability after reconstitution, dilution, and storage under refrigeration. *Retina*. 2010;30(1):81-84. doi:10.1097/IAE.0b013e3181b48fb4.
109. Jaffe GJ, Dick AD, Brézín AP, et al. Adalimumab in Patients with Active Noninfectious Uveitis. *N Engl J Med*. 2016;375(10):932-943. doi:10.1056/NEJMoa1509852.
110. Nguyen QD, Merrill PT, Jaffe GJ, et al. Adalimumab for prevention of uveitic flare in patients with inactive non-infectious uveitis controlled by corticosteroids (VISUAL II): a multicentre, double-masked, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2016;388(10050):1183-1192. doi:10.1016/S0140-6736(16)31339-3.
111. Suhler EB, Adán A, Brézín AP, et al. Safety and Efficacy of Adalimumab in Patients with Noninfectious Uveitis in an Ongoing Open-Label Study: VISUAL III. *Ophthalmology*. February 2018. doi:10.1016/j.opthta.2017.12.039.
112. Ramanan AV, Dick AD, Jones AP, et al. THU0213 Adalimumab in Combination with Methotrexate for The Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis Associated Uveitis: The Sycamore Trial. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(Suppl 2):264.3-265. doi:10.1136/annrheumdis-2016-eular.6053.
113. Vazquez-Cobian LB, Flynn T, Lehman TJA. Adalimumab therapy for childhood uveitis. *J Pediatr*. 2006;149(4):572-575. doi:10.1016/j.jpeds.2006.04.058.
114. Interlandi E, Leccese P, Olivieri I, Latanza L. Adalimumab for treatment of severe Behcet's uveitis: a retrospective long-term follow-up study. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(4 Suppl 84):S58-62.
115. Calvo-Río V, Blanco R, Santos-Gómez M, et al. Golimumab in refractory uveitis related to spondyloarthritis. Multicenter study of 15 patients. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46(1):95-101. doi:10.1016/j.semarthrit.2016.03.002.
116. Cordero-Coma M, et al. Golimumab as rescue therapy for refractory immune-mediated uveitis: A three-center experience. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.

doi:10.1155/2014/717598.

117. Miserocchi E, Modorati G, Pontikaki I, Meroni PL, Gerloni V. Long-term treatment with golimumab for severe uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2014;22(2):90-95. doi:10.3109/09273948.2013.844265.
118. Scheinfeld N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatolog Treat.* 2004;15(5):280-294. doi:10.1080/09546630410017275.
119. Tsilimbaris MK, Panagiotoglou TD, Charisis SK, et al. The use of intravitreal etanercept in diabetic macular oedema. *Semin Ophthalmol.* 2007;22(2):75-79. doi:10.1080/08820530701418243.
120. Olson JL, Courtney RJ, Mandava N. Intravitreal infliximab and choroidal neovascularization in an animal model. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(9):1221-1224. doi:10.1001/archophth.125.9.1221.
121. Giansanti F, Ramazzotti M, Vannozzi L, et al. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(3):1151-1156. doi:10.1167/iovs.07-0932.
122. Melo GB, Moraes Filho MN, Rodrigues EB, et al. Toxicity And Retinal Penetration Of Infliximab In Primates. *Retina.* 2012;32(3):606-612. doi:10.1097/IAE.0b013e3182252a23.
123. Regatieri C V., Dreyfuss JL, Melo GB, et al. Dual role of intravitreal infliximab in experimental choroidal neovascularization: Effect on the expression of sulfated glycosaminoglycans. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(11):5487-5494. doi:10.1167/iovs.08-3171.
124. Yuksel E, Hasanreisoglu B, Yuksel N, et al. Comparison of Acute Effect of Systemic Versus Intravitreal Infliximab Treatment in an Experimental Model of Endotoxin-Induced Uveitis. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014;30(1):74-80. doi:10.1089/jop.2012.0238.
125. Dönmez O. Tavşanlarda deneysel olarak endotoksin ile oluşturulmuş üveit modelinde intravitreal ve sistemik infliksimab tedavisinin karşılaştırılması. 2015. (AAO 2016 Scientific Posters - PO428)
126. Theodossiades PG, Liarakos VS, Sfikakis PP, Vergados IA, Theodossiades GP. Intravitreal Administration of the Anti-Tumor Necrosis Factor Agent Infliximab for Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(5).

- doi:10.1016/j.ajo.2008.12.004.
127. Arias L, Caminal JM, Badia MB, Rubio MJ, Catala J, Pujol O. Intravitreal infliximab in patients with macular degeneration who are nonresponders to antivascular endothelial growth factor therapy. *Retina*. 2010;30(10):1601-1608. doi:10.1097/IAE.0b013e3181e9f942.
 128. Wu L, Hernandez-Bogantes E, Roca J, et al. Intravitreal tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of refractory diabetic macular edema: a pilot study from the Pan-American Collaborative Retina Study Group. *Retina*. 2011;31(2):298-303. doi:10.1097/IAE.0b013e3181eac7a6.
 129. Wu L, Arevalo JF, Hernandez-Bogantes E, Regatieri C V, Roca JA, Farah ME. Intravitreal tumor necrosis factor-alpha inhibitors for neovascular age-related macular degeneration suboptimally responsive to antivascular endothelial growth factor agents: a pilot study from the Pan American Collaborative Retina Study Group. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013;29(3):366-371. doi:10.1089/jop.2012.0203.
 130. Farvardin M, Afarid M, Mehryar M, Hosseini H. Intravitreal infliximab for the treatment of sight-threatening chronic noninfectious uveitis. *Retina*. 2010;30(9):1530-1535. doi:10.1097/IAE.0b013e3181d3758a.
 131. Farvardin M, Afarid M, Shahrzad S. Long-term effects of intravitreal infliximab for treatment of sight-threatening chronic noninfectious uveitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2012;28(6):628-631. doi:10.1089/jop.2011.0199.
 132. Wu L, Fernando Arevalo J, Hernandez-Bogantes E, Roca JA. Intravitreal infliximab for refractory pseudophakic cystoid macular edema: Results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group. *Int Ophthalmol*. 2012;32(3):235-243. doi:10.1007/s10792-012-9559-8.
 133. Tsilimbaris M, Diakonis VF, Naoumidi I, et al. Evaluation of potential retinal toxicity of adalimumab (Humira). *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(8):1119-1125. doi:10.1007/s00417-009-1065-y.
 134. Manzano RPA, Peyman GA, Carvounis PE, et al. Toxicity of High-Dose Intravitreal Adalimumab (Humira) in the Rabbit. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2011;27(4):327-331. doi:10.1089/jop.2010.0174.
 135. Arevalo JF, Serrano MA, Wu L. Combined inhibition of tumor necrosis factor (TNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) for the treatment of macular edema of various etiologies: a short-term pilot study. *Eye*. 2013;27(4):569-571.

doi:10.1038/eye.2012.301.

136. Grant MB, Afzal A, Spoerri P, Pan H, Shaw LC, Mames RN. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13(10):1275-1293. doi:10.1517/13543784.13.10.1275.
137. Limb GA, Hollifield RD, Webster L, Charteris DG, Chignell AH. Soluble TNF receptors in vitreoretinal proliferative disease. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(7):1586-1591.
138. Theodossiadis PG, Markomichelakis NN, Sfrikakis PP. Tumor necrosis factor antagonists: preliminary evidence for an emerging approach in the treatment of ocular inflammation. *Retina*. 2007;27(4):399-413. doi:10.1097/MAJ.0b013e3180318fbc.
139. Kivilcim M, Peyman GA, Kazi AA, et al. Intravitreal toxicity of high-dose etanercept. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007;23(1):57-62. doi:10.1089/jop.2006.0083.
140. Van den Brande JMH, Braat H, Van den Brink GR, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1774-1785. doi:10.1016/S0016-5085(03)00382-2.
141. Lügering A, Schmidt M, Lügering N, et al. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1145-1157. doi:10.1053/gast.2001.28702.
142. Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfrikakis PP, et al. Intravitreal administration of the anti-TNF monoclonal antibody Infliximab in the rabbit. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(2):273-281. doi:10.1007/s00417-008-0967-4.
143. Manzano RPA, Peyman GA, Carvounis PE, et al. Ocular toxicity of intravitreal adalimumab (Humira) in the rabbit. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(6):907-911. doi:10.1007/s00417-008-0765-z.
144. de Paula AC, de Ávila MP, Isaac DLC, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of intravitreal adalimumab administration in rabbit retinal cells. *Arq Bras Oftalmol*. 2015;78(2):89-93. doi:10.5935/0004-2749.20150024 [doi].
145. Vigna-Perez M, Abud-Mendoza C, Portillo-Salazar H, et al. Immune effects of therapy with Adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):372-380. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02859.x.
146. Shen C, Assche GV, Colpaert S, et al. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: A comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21(3):251-258. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02309.x.

147. Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, et al. The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor α . *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(6):1224-1231. doi:10.1097/MIB.0b013e318280b169.
148. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol*. 1993;170(1):1-8. doi:10.1002/path.1711700102.
149. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119(3):493-501. doi:10.1083/jcb.119.3.493.
150. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, et al. In situ detection of fragmented DNA (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*. 1995;21(5):1465-1468. doi:10.1016/0270-9139(95)90071-3.
151. Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, et al. The nomenclature of cell death: Recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol*. 1999;27(4):484-490. doi:10.1177/019262339902700419.
152. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*. 1998;152(4):885-888.
153. Harrison DJ. Counting apoptosis—why and how? *Clin Mol Pathol*. 1996;49(5):M245-6.
154. Duan WR, Gamer DS, Williams SD, et al. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol*. 2003;199(2):221-228. doi:10.1002/path.1289.
155. Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ*. 1999;6(6):497-507. doi:10.1038/sj.cdd.4400525.
156. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(26):14376-14381. doi:10.1073/pnas.97.26.14376.
157. De Boer RA, Van Veldhuisen DJ, Van Der Wijk J, et al. Additional use of immunostaining for active caspase 3 and cleaved actin and PARP fragments to detect apoptosis in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. 2000;6(4):330-337.

- doi:10.1054/jcaf.2000.20457.
158. Giansanti F, Papucci L, Capaccioli S, et al. Ocular safety of infliximab in rabbit and cell culture models. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010;26(1):65-71. doi:10.1089/jop.2009.0035.
 159. Cheng C-K, Peng P-H, Tien L-T, Cai Y-J, Chen C-F, Lee Y-J. Bevacizumab is not Toxic To Retinal Ganglion Cells After Repeated Intravitreal Injection. *Retina.* 2009;29(3).
 160. Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, et al. Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(7):917-923. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303130.
 161. Kermer P, Klöcker N, Labes M, Bähr M. Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J Neurosci.* 1998;18(12):4656-4662.
 162. Chaudhary P, Ahmed F, Quebada P, Sharma SC. Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;67(1):36-45.
 163. Lam TT, Abler AS, Tso MO. Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(5):967-975.
 164. McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, et al. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1077-1087.
 165. Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(11):4049-4059. doi:10.1167/iovs.04-0490.
 166. Martínez-Fernández de la Cámara C, Olivares-González L, Hervás D, Salom D, Millán JM, Rodrigo R. Infliximab reduces Zaprinas-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina. *J Neuroinflammation.* 2014;11:172. doi:10.1186/s12974-014-0172-9.
 167. Roh M, Zhang Y, Murakami Y, et al. Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PLoS One.* 2012;7(7):e40065. doi:10.1371/journal.pone.0040065\ rPONE-D-12-11072 [pii].
 168. Martínez-Fernández De La Cámara C, Hernández-Pinto AM, Olivares-González L, et al. Adalimumab reduces photoreceptor cell death in a mouse model of retinal degeneration. *Sci Rep.* 2015;5. doi:10.1038/srep11764.

169. Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, et al. Contribution of TNF- α to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(5):2184-2191. doi:10.1167/iovs.02-0589.
170. Yu S-Y, Damico FM, Viola F, D'Amico DJ, Young LH. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide: a morphological study. *Retina*. 2004;26(5):531-536.
171. Inan UU, Avci B, Kusbeci T, et al. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(4):1773-1781. doi:10.1167/iovs.06-0828.
172. del Amo EM, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data. *Exp Eye Res*. 2015;137:111-124. doi:10.1016/j.exer.2015.05.003.
173. Del Amo EM, Vellonen KS, Kidron H, Urtti A. Intravitreal clearance and volume of distribution of compounds in rabbits: In silico prediction and pharmacokinetic simulations for drug development. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;95:215-226. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.003.
174. Dejneka NS, Wan S, Bond OS, Kornbrust DJ, Reich SJ. Ocular biodistribution of bevasiranib following a single intravitreal injection to rabbit eyes. *Mol Vis*. 2008;14:997-1005.