

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**METFORMİNİN İNVİTRO RETİNA PİGMENT EPİTELİ HÜCRELERİNDE
FİBROGENEZİSE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr.Rukiye ÇETİNKAYA

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Jülide Canan UMURHAN AKKAN

ARALIK 2019

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün numaralı Yüksek Lisans / Doktora Öğrencisi Rukiye ÇETİNKAYA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "METFORMİNİN İNVİTRO RETİNA PİGMENT EPİTELİ HÜCRELERİNDE FİBROGENEZİSE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Jülide Canan UMURHAN AKKAN**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Mehmet Hakan ÖZDEMİR**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç Dr. Ayşe Çiğdem ALTAN

İstanbul Beyoğlu Göz Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Doç. Dr. Jülide Canan UMURHAN AKKAN

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 01.12.2019

Savunma Tarihi : 05.12.2019

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca klinik ve cerrahi alandaki bilgi, birikim, tecrübeleri ile bana yol gösteren, bilimsel bakış açısını örnek aldığım, beraber çalışmış olmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr.Mehmet Hakan Özdemir'e; tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Jülide Canan Umurhan Akkan'a; eğitimimiz sırasında her daim bilgi, beceri ve tecrübelerini bize aktarmaya hazır olan, hem mesleki açıdan hem de kişilik olarak bize örnek teşkil eden kıymetli hocalarım Sayın Doç.Dr. İbrahim Arif Koytak'a, Doç. Dr. Betül Tuğcu'ya, Doç. Dr. Fadime Nuhoglu'na, Doç. Dr. Ahmet Elbay'a,Uzm. Dr. Cansu Ekinci'ye, Uzm. Dr. Furkan Kırık'a; tez çalışmamın biyokimyasal aşamalarında katkıda bulunan, bilimsel araştırmamın gerçekleşmesinde büyük emeği olan Sayın Prof. Dr. Abdurrahim Koçyiğit ve Dr. Eray Metin Güler'e; asistanlığım boyunca samimi bir aile ortamı kurduğumuz asistan arkadaşlarıma; huzurlu ve düzenli bir çalışma ortamının sağlanmasında büyük katkıları olan, her türlü problemde desteğini esirgemeyen klinik personelimize,

Eğitim hayatım boyunca bana büyük emekler veren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, annem, babam ve kardeşlerime; hayatın güzelliklerini olduğu kadar zorluklarını da benimle paylaşan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşime, varlığıyla hayatımı güzelleştiren kızıma

Sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarak teşekkür ederim....

Dr. Rukiye ÇETİNKAYA

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Rukiye ÇETİNKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	III
BEYAN.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR	VII
TABLO LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
ÖZET.....	X
SUMMARY	XII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	Error! Bookmark not defined.
2. GENEL BİLGİLER.....	Error! Bookmark not defined.
2.1. Retinanın Topografik Anatomisi	4
2.2. Retinanın Tabakaları	6
2.2.1.Fotoreseptör Tabakası	8
2.2.2.Dış Limitan Membran	9
2.2.3.Dış Nükleer Tabaka	9
2.2.4.Dış Pleksiform Tabaka	9
2.2.5.İç Nükleer Tabaka	10
2.2.6.İç Pleksiform Tabaka	10
2.2.7.Ganglion Hücre Tabakası.....	10
2.2.8.Sinir Lifi Tabakası.....	10
2.2.9.İç Limitan Membran	11
2.3. Vitreus	11
2.4. Retina Pigment Epiteli	12
3. PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ (PVR)	21
3.1.PVR Patogenezi	21
3.1.1. Büyüme Faktörleri ve Sitokinlerin Rolü	25
3.2.PVR İnsidansı ve Risk Faktörleri.....	29
3.3 PVR Sınıflandırması	30
3.4 PVR'da Tedavi	34
3.4.1 PVR'da Cerrahi Tedavi	34
3.4.2 PVR'da Farmakolojik Tedavi.....	35

3.4.2.1 Antiinflatuar İlaçlar	35
3.4.2.2 Antiproliferatif İlaçlar	36
3.4.2.3 Ekstraselüler Matriks Üretimini ve Kontraksiyonunu Önleyen İlaçlar	38
3.4.2.4 Büyüme Faktörleri ve Sitokinleri İnhibe Eden İlaçlar	39
3.4.2.4 Gen Tedavileri.....	41
4. METFORMİN	42
5.GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
5.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	44
5.2. Hücre Sayımı ve Ekimi	45
5.3. Hücre Canlılık Testi (Viabilite Testi, ATP Testi).....	45
5.4. α -SMA, Vimentin, ZO-1, Smad2 ve Smad3 proteinlerinin Western Blot ile Ekspresyon Analizi	45
5.5. Hücre Migrasyonunun Analizi.....	47
5.6. Kollajen Jel Kontraksiyon Testi.....	47
5. 7. Verilerin İstatistiksel Analizi	48
6.BULGULAR	49
6.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	49
6.2. Western Blot ile Hücre İçi Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi	51
6.2.1. ZO-1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	51
6.2.2. α -SMA ve Vimentin Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	52
6.2.3. SMAD2, SMAD3, pSMAD2 ve pSMAD3 Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	54
6.3. Hücresel Migrasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	56
6.4. Kontraksiyon Düzeyinin Değerlendirilmesi	58
7.TARTIŞMA	59
8.SONUÇ.....	67
KAYNAKLAR	68

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-FU	: 5-florourasil
Ag3340	: Prinomastat
AMPK	: Adenozin Monofosfat ile Aktive olan Protein Kinaz
C-HP	: Cis-hidroksiprolin
CRALBP	: Hücresel Retinaldehit-Bağlayıcı Protein
CRBP	: Hücresel Retinol-Bağlayıcı Protein
DMAH	: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
DMÖ	: Diyabetik Makula Ödemi
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMD	: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm
ESM	: ekstraselüler matriks
FAZ	: Foveal Avaskuler Zon
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
HSV-tk	: herpes simpleks virüs-timidin kinaz
IGF-1	: insülin Like Growth Faktör- 1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
ILM	: İç Limitan Membran
LFK	: Lazer Fotokoagulasyon
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
N-CAM	: Nöral Hücre Adezyon Molekülü
PAF	: Platellet Activated Growth Faktör
PDGF	: platelet Derive Büyüme Faktörü
PEDF	: Pigment Epitel Kaynaklı Faktör
PNH	: Polimorf Nüveli Hücreler
PVR	: Proliferatif Vitreoretinopati
RBP	: Retinol Bağlayıcı Protein
RD	: Retina Dekolmanı
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
RPE65	: Retina Pigment Epitel Duyarlı Protein 65kDa
RRD	: Regmatojen Retina Dekolmanı
RVO	: Retinal Ven Tıkanıklığı
SÇG	: Silikon Çalışma Grubu
TGF-β	: Transforming Growth Faktör-beta
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
YBMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
ZO-1	: Zonula Okludens-1
α-SMA	: α- Düz Kas Aktini

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 : Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesine Göre PVR Sınıflandırması

Tablo 2 : Silikon Çalışma Grubuna göre PVR Sınıflandırması

Tablo 3 : Retina Cemiyetine Göre PVR da Kontraksiyon Sınıflandırması

Tablo 4: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda ZO-1 protein ekspresyonu sonuçları

Tablo 5: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda α -SMA protein ekspresyonu sonuçları

Tablo 6: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda vimentin protein ekspresyonu sonuçları

Tablo 7: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD2 protein ekspresyonu sonuçları

Tablo 8: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD3 protein ekspresyonu sonuçları

Tablo 9: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda hücre migrasyonu sonuçları

Tablo 10: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda kollajen jel kontraksiyon deneyi sonuçları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Makulanın Topografik Anatomisi

Şekil 2: Retinayı Oluşturan Hücrelerin Organizasyonu

Şekil 3: Retina Tabakaları

Şekil 4: Dış pleksiform tabaka ve Henle tabakası

Şekil 5: Retina Sinir Liflerinin Dağılımı

Şekil 6 : Vitreus anatomisi

Şekil 7: Retina pigment epiteli fonksiyonları [169]

Şekil 8: PVR gelişim evreleri

Şekil 9: Farklı konsantrasyonlarda TGF- β 2 nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 10: Farklı konsantrasyonlarda Metforminin hücre canlılığına etkisi

Şekil 11: Farklı konsantrasyonlarda TGF- β 2+metformin kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

Şekil 12: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda ZO-1 protein ekspresyonu sonuçları

Şekil 13:Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda α -SMA protein ekspresyonu sonuçları

Şekil 14: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda vimentin protein ekspresyonu sonuçları

Şekil 15: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD2 protein ekspresyonu sonuçları

Şekil 16: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD3 protein ekspresyonu sonuçları

Şekil 17: Western Blot Protein Elektorforezi görüntüleri

Şekil 18: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda hücre migrasyonu sonuçları

Şekil 19: Yara iyileşme testi mikroskopik görüntüleri

Şekil 20: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda kollajen jel kontraksiyon deneyi sonuçları

METFORMİNİN İNVİTRO RETİNA PİGMENT EPİTELİ HÜCRELERİNDE FİBROGENEZİSE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

GİRİŞ: Proliferatif vitreoretinopati, retina dekolmanı cerrahisi sonrası nökslerin en önemli sebeplerinden biridir. Proliferatif vitreoretinopatinin patogenezi ile ilgili çalışmalarda, epitelyal mezenkimal dönüşüm sürecinin önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Epitelyal mezenkimal dönüşüm; epitel hücrelerinin farklı fenotiplerini kaybettiği ve mezenkimal benzeri hücelere dönüştüğü biyolojik bir süreçtir. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçiren retina pigment epiteli hücrelerinin proliferasyon, göç etme, migrasyon ve kontraksiyon yeteneklerinde artış görülür. Bu sürecin sonunda proliferatif vitreoretinopatinin önemli bir parçası olan fibrozis gelişir. Epitelyal mezenkimal dönüşümün ana tetikleyicisi TGF- β dır.

AMAC: Çalışmamızda daha önce farklı dokularda epitelyal-mezenkimal dönüşümü ve fibrogenezisi inhibe ettiği gösterilmiş olan metforminin, invitro retina pigment epiteli hücrelerinde TGF- β 2 ile indüklenen epitelyal mezenkimal dönüşüm sürecine olan etkisi incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM: İnvitro ortamda inkübe edilmiş insan retina pigment epiteli hücre grupları üzerine TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin uygulandı. Uygulama sonrası, ATP testi ile hücre canlılığı, Western Blot protein elektroforezi ile ZO-1, α -SMA, vimentin, SMAD2 SMAD3, pSMAD2, pSMAD3 protein ekspresyonu, yara iyileşmesi testi ile hücre migrasyon düzeyi, kollajen jel kontraksiyon testi ile kontraksiyon düzeyi değerlendirildi; veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

BULGULAR: Western Blot protein elektroforezinde epitelyal belirteç olan ZO-1 ekspresyonunun, TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı. Mezenkimal belirteç olan α -SMA ekspresyonunun, TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı olarak arttığı ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda bu artışın daha az olduğu ($p < 0.01$) izlendi. Mezenkimal belirteç olan vimentin ekspresyonunda, TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı arttığı ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda bu artışın daha az olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). TGF- β /SMAD sinyal yolunun aktif proteinleri olan pSMAD2 ve pSMAD3 ekspresyonu değerlendirildiğinde, pSMAD2' nin TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı arttığı ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). pSMAD3'ün TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı olarak arttığı ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı fark olmadığı saptandı. Yara iyileşmesi testi sonuçlarında; hücre migrasyon düzeyinde, TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı artış izlendi ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda kontrol grubuna göre fark izlenmedi. Kollajen jel kontraksiyon testi sonuçlarında; kontraksiyon düzeyinde TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı olarak artış

olduğu ($p<0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda bu artışın daha az olduğu saptandı ($p<0.05$).

SONUÇ: Metformin, epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçiren retina pigment epiteli hücrelerinde epitelyal belirteçlerin sentezini arttırmış , mezenkimal belirteçlerin sentezini ise azaltmıştır. TGF- β /SMAD sinyal yolundaki SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin fosforilasyonunu azaltarak bu sinyal yolunu baskılamıştır. Ayrıca metforminin, epitelyal-mezenkimal dönüşüm geçiren retina pigment epiteli hücrelerinin hücrel migrasyon düzeyini ve kontraksiyon düzeyini de azalttığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar, metforminin invitro retina pigment epiteli hücrelerinde epitelyal-mezenkimal dönüşümü ve fibrogenezis gelişimini baskıladığını göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Metformin, Proliferatif Vitreoretinopati, Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm, Retina Pigment Epiteli Hücreleri, TGF- β 2



SUMMARY

INTRODUCTION: Proliferative vitreoretinopathy is one of the most important causes of recurrence after retinal detachment surgery. In studies on the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy, “Epithelial-to-Mesenchymal Transition” has been shown to play an important role. Epithelial-to-mesenchymal transition; it is a biological process in which epithelial cells lose their differentiated phenotypes and become mesenchymal-like cells. Retinal pigment epithelial cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition; proliferation, migration and contraction ability increases. Fibrosis, an important part of proliferative vitreoretinopathy, develops at the end of this process. The main trigger of epithelial-to-mesenchymal transition is TGF- β .

PURPOSE: In our study, the effect of metformin which has been shown to inhibit epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenesis in different tissues previously, on TGF- β 2-induced epithelial-to-mesenchymal transition process in invitro retinal pigment epithelial cells was investigated.

MATERIALS and METHODS: TGF- β 2, metformin and TGF- β 2 + metformin were applied to human retinal pigment epithelial cell groups incubated in vitro. After the application; cell viability by ATP test, ZO-1, α -SMA, vimentin, SMAD2, SMAD3, pSMAD2 and pSMAD3 protein expression by Western Blot Protein Electrophoresis, cell migration level by wound healing test and contraction level by collagen gel contraction test were evaluated, the data were compared with the control group.

RESULTS: In Western Blot protein electrophoresis, the expression of ZO-1, which is an epithelial marker, decreased significantly in the TGF- β 2 group compared to the control group ($p < 0.05$), but there was no statistically significant difference in the TGF- β 2 + metformin group compared to the control group. It was observed that α -SMA expression, which is a mesenchymal marker, was significantly increased in the TGF- β 2 group compared to the control group ($p < 0.001$), whereas this increase was lower in the TGF- β 2 + metformin group ($p < 0.01$). The expression of vimentin, which is a mesenchymal marker, was significantly higher in the TGF- β 2 group than in the control group ($p < 0.001$), but this increase was less in the TGF- β 2 + metformin group ($p < 0.05$). When the expression of pSMAD2 and pSMAD3, the active proteins of the TGF- β / SMAD signaling pathway were evaluated, it was found that pSMAD2 increased significantly in the TGF- β 2 group compared to the control group ($p < 0.001$) and decreased significantly in the TGF- β 2 + metformin group compared to the control group. ($p < 0.05$). It was found that pSMAD3 increased significantly in TGF- β 2 group compared to the control group ($p < 0.001$), and there was no significant difference in TGF- β 2 + metformin group compared to control group. In wound healing test results; There was a significant increase in cell migration level in TGF- β 2 group compared to the control group ($p < 0.001$). There was no difference in TGF- β 2 + metformin group

compared to the control group. Collagen gel contraction test results; The level of contraction was significantly higher in the TGF- β 2 group than in the control group ($p < 0.001$), whereas this increase was less in the TGF- β 2 + metformin group ($p < 0.05$).

CONCLUSION: Metformin increased the synthesis of epithelial markers and decreased the synthesis of mesenchymal markers in retinal pigment epithelial cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. Metformin suppressed the TGF- β / SMAD signaling pathway by reducing phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 proteins. In addition, it has been observed that metformin reduces cellular migration and contraction levels of retinal pigment epithelial cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition.

These results show that metformin suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and development of fibrogenesis in invitro retinal pigment epithelial cells.

KEYWORDS: Metformin, Proliferative Vitreoretinopathy, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Retinal Pigment Epithelial cells, TGF- β 2



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Retina dekolmanının (RD) sıklığı çeşitli çalışmalarda 0.6-1.8/10.000 civarında verilmiştir [1]. Retina dekolmanının en sık görülen tipi, retinal yırtıklar ve vitreoretinal traksiyon sonucu meydana gelen regmatojen retina dekolmanıdır (RRD) [2]. Vitreoretinal cerrahi tekniklerindeki son gelişmelerle RD cerrahisinde başarı oranı büyük ölçüde artmış olmasına rağmen, bir grup hastada cerrahi başarısızlık ve rekürren RD izlenmektedir [3]. Özellikle ciddi ve uzun süreli RRD vakalarında ortaya çıkan proliferatif vitreoretinopati (PVR), cerrahi başarısızlığın en önemli nedenidir [4-5].

Retina pigment epiteli (RPE) hücreleri, koroidin koryokapillaris tabakası ile nöroretina arasında tek sıralı pigmente hücre tabakası olarak yer alır. Retina dekolmanını takiben, retinanın hasarlı bölgelerinden vitreusa ve subretinal aralığa geçen RPE hücreleri, fibrotik değişikliklere uğrar ve retinada ekstraselüler matriks (ESM) üretimine neden olur. Bu fibrotik süreç PVR olarak adlandırılır [6-8]. Dekole retinada oluşan bu değişiklikler sonucu retina esnekliği azalmakta, retinal yırtıklar cerrahi ile başarılı şekilde tedavi edilse bile tekrar açılmakta ve rekürren RD oluşmaktadır. Bu nedenle PVR ye neden olan mekanizmalar ve PVR yi önlemek için etkili olabilecek tedavilerin araştırılması önemli konular olmaya devam etmektedir.

Yapılan çalışmalarda, PVR li gözlerdeki fibrotik doku incelendiğinde, Müller hücreleri, astrositler, fibroblastlar, lenfositler, makrofajlar gibi birçok hücre türüne rastlanmasına karşın, ağırlıklı olarak RPE hücrelerinin bulunduğu görülmüştür[9-10]. Birçok çalışmada, RD da vitreus boşluğuna ve epiretinal boşluğa geçen RPE hücrelerinin fibroblastlara benzeştikleri ve fibrogenetik süreci başlattıkları gösterilmiştir. Epitel hücrelerinin normalde sahip oldukları epitelyal fenotipi kaybederek, mezenkimal hücrelere dönüştüğü süreç ‘epitelyal mezenkimal dönüşüm’ (EMD) olarak adlandırılır [11-13].

Mezenkimal hücrelere benzeşen RPE hücrelerinin yapışma, göç etme ve proliferasyonunda artış görülür. Bu aktivitelerin artması ile birlikte, epiretinal ve subretinal boşluklarda oluşan fibrotik membranlar PVR nin en önemli yapıtaşlarıdır [14].

PVR gelişiminde, platelet derive büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve sitokin rol oynamaktadır. Patogeneizde en önemli tetikleyici mediatörlerden birinin transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) olduğu saptanmıştır. TGF- β , ESM sentezinden sorumlu güçlü bir fibrotik mediatördür. Böbrek ve akciğerdeki fibrotik patolojiler de dahil olmak üzere birçok organ ve dokuda fibrogeniz ile ilişkisi gösterilmiştir[16]. Gözde de dokuların büyümesi, farklılaşması, EMT gelişimi, inflamasyon ve neovaskülarizasyon gibi farklı süreçlerde rol oynar. TGF- β nın gözün arka segmentindeki major izoformu TGF- β 2 dir [138].

TGF- β izoformları reseptörlerine bağlandığında, hücre içi iletim yolları ile SMAD2 ve SMAD3 proteinleri fosforile olur. Fosforile olan SMAD2 ve SMAD3 proteinleri birleşerek SMAD4' ü oluşturur ve nükleusta ilişkili genleri aktive ederek TGF- β nın hücre içi etkilerini başlatırlar[17]. Çalışmalarda TGF- β 2 ile indüklenen SMAD2 ve SMAD3 fosforilasyonu ile birlikte alfa-düz kas aktini (α -SMA) ve vimentin gibi mezenkimal proteinlerin yapımının arttığı, zonula okludens (ZO-1) gibi epitelyal proteinlerin ise azaldığı görülmüştür [18-19]

RPE hücre kültürü üzerinde yapılan bir çalışmada RPE aracılı retinal kontraksiyonun, TGF- β 2 yi nötralize edici antikorlarla azaltıldığı, ekzojen TGF- β 2 ile arttığı gözlenmiştir [20]. Bu bulgular, TGF- β 2 ile indüklenen EMD nin inhibe edilmesi ile, PVR patogenezinin baskılanabileceği fikrini doğurmuştur. Son zamanlarda antiinflamatuvar, antiproliferatif ajanlar, büyüme faktörü inhibitörleri bu amaçla çalışılmıştır [14].

Metformin, nitreonlar sınıfına ait, N'metilbiguanid yapısında bitkisel kaynaklı bir oral antidiyabetik ajandır. Tip 2 diyabetes mellitus (DM) tedavisinde yaygın olarak reçete edilir. Bunun dışında polikistik over sendromu, metabolik sendrom, insülin direnci gibi birçok farklı endikasyonu da vardır. Son yıllarda özellikle onkoloji alanında yapılan çalışmalarda kanser hücreleriyle savaşmada, metastazları önlemede etkin olduğu gösterilmiştir [21-24].

Metforminin bu etkileri; hücre büyümesi, hücre siklusu, apoptozis üzerindeki metabolik etkilerine ilaveten, EMD yi inhibe ederek kanser hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu önlemesi ile ilişkilendirilmiştir [25].

Bu çalışmanın amacı, metforminin insan RPE hücre kültürü üzerinde TGF- β 2 ile tetiklenen EMD ve fibrojeniz sürecini inhibe edici etkisinin araştırılmasıdır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Retinanın Topografik Anatomisi

Retina, post mortem gözlerde dekole edilmiş retinanın ağ yapısına benzer özellikler göstermesi nedeniyle Yunanca ağ anlamına gelen “rete” kelimesinden köken almıştır. Gözün en içteki tabakası olup nöroektoderm kökenlidir. Retinanın kalınlığı ora serratada 0.1 mm, ekvatorunda 0.2 mm, optik sinir çevresinde 0.56 mm dir. Retina; retina pigment epiteli (RPE) ve nörosensoryel retina olmak üzere 2 katmandan oluşur. Nörosensoryel retina periferde ora serrataya kadar uzanır, pars plana ile devam eder. Nörosensoryel retina ile RPE, ora serratada ve optik disk çevresinde birbirine sıkı yapışık iken, bu bölgeler dışında aralarında anatomik bir bağ yoktur [25-27]. Nörosensoryel retinanın iç yüzü vitreus ile temas halindedir.

Fundoskopik muayenede retinanın merkezinde yaklaşık 2×1.5 mm çapında oval şekilli beyaz bir alan halinde optik disk görülür. Optik disk kortikal görme yollarına ileti taşıyan ganglion hücre aksonlarını ve retinanın damarsal yapılarını içerir. Optik diskten çıkan damarsal yapılar temporal ve nazal vasküler arkadları oluştururlar [28].

Retina topografik olarak 3 bölgeye ayrılır;

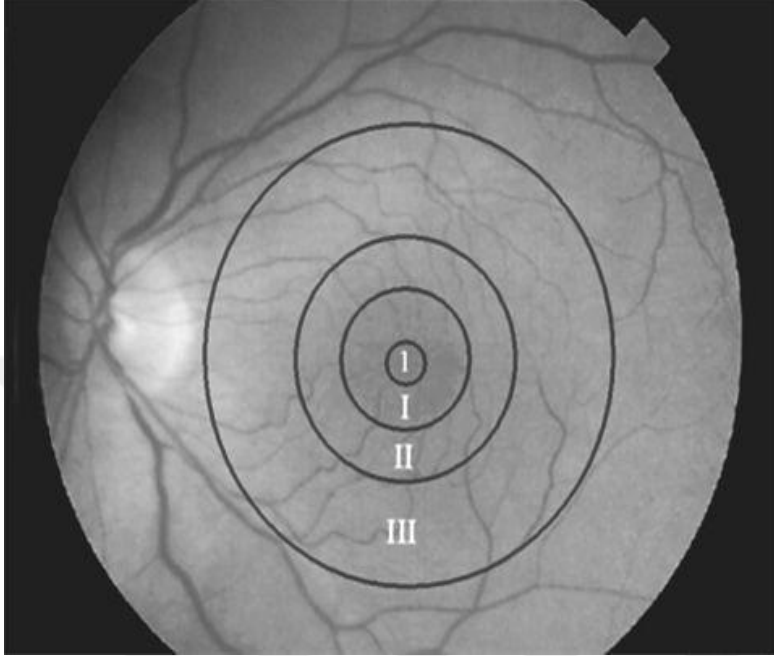
- a. Makula (arka kutup)
- b. Ekvator
- c. Ora serrata

a. Makula

Optik diskin yaklaşık 2.5 disk çapı uzaklığında, 4 mm temporal, 0.8 mm inferiorunda, temporal vasküler arkadların seyriyle uyumluluk gösteren, yaklaşık 5.5 mm çapında dairesel bir alandır. Periferik retinaya göre daha yoğun ksantofil pigmenti içeren bipolar ve ganglion hücrelerini bulundurduğu için sarı renktedir. Özellikle lutein ve zeaksantinden zengin karotenoidler burada toplanmıştır [25]. Sinir lifi

tabakasını içermemesi, buna karşılık iki veya daha fazla ganglion hücre tabakasına sahip olması nedeniyle diğer retina bölgelerinden histolojik olarak ayrılır [29].

Makula topografik olarak içten dışa doğru 4 konsantrik bölgeden oluşur; foveola, fovea, parafovea ve perifoveadır [Şekil 1].



Şekil 1: Makulanın Topografik Anatomisi:1. Foveola, I.Fovea II.Parafovea III.Perifovea

Fovea; makulanın merkezinde bulunan yaklaşık 1.5 mm (1500 µm) çapındaki alandır. Santralinde 22 derece konkaviteye ve 150-200 µm çapa sahip bir çukurluk olan umbo (klivus) bulunur. Bu çukurluk fundus muayenesi sırasında makulaya ait ışık reflesinin alınmasını sağlar. Foveada ortalama retina kalınlığı 0.25 mm dir.

Foveola; foveanın santralindeki 350 µm çapındaki alandır. Bu alan ganglion hücre tabakası ve iç nükleer tabakadan yoksundur. Merkezinde umboyu bulundurur. Bu bölgede yoğun miktarda koni bulunmaktadır, bu nedenle retinada en yüksek görme keskinliğinin olduğu noktadır. Bu bölge koroidden beslenir, vasküler yapı bulundurmaz.

Foveal avasküler zon (FAZ); foveanın santralindeki kapillerlerden yoksun bölgeyi tanımlar. İç nükleer tabaka seviyesindeki kapillerler 250-600 µm genişliğinde FAZ ın dış sınır hattını oluştururlar. FAZ foveanın içinde ama foveolanın dışında yer alır, çapı bireyler arasında değişkenlik gösterir.

Parafovea; fovea etrafında 0.5 mm genişliğinde yer alır ve bu alan ganglion hücre tabakası, iç nükleer tabaka ve dış pleksiform tabakanın en kalın olduğu alan olup koni-basil oranı 1:1 dir.

Perifovea; parafoveayı çevreleyen 1.5 mm genişliğinde periferik zondur, tek kat ganglion hücre tabakası ve 6 kat bipolar hücre tabakası içerir, koni-basil oranı 1:2 dir.

b. Ekvator

Makula ile ora serrata arasında kalan, basillerin çoğunlukta olduğu bölgedir. Ekvator ora serratanın 6-8 mm posteriorunda, makulanın 18-20 mm anteriorundadır [29].

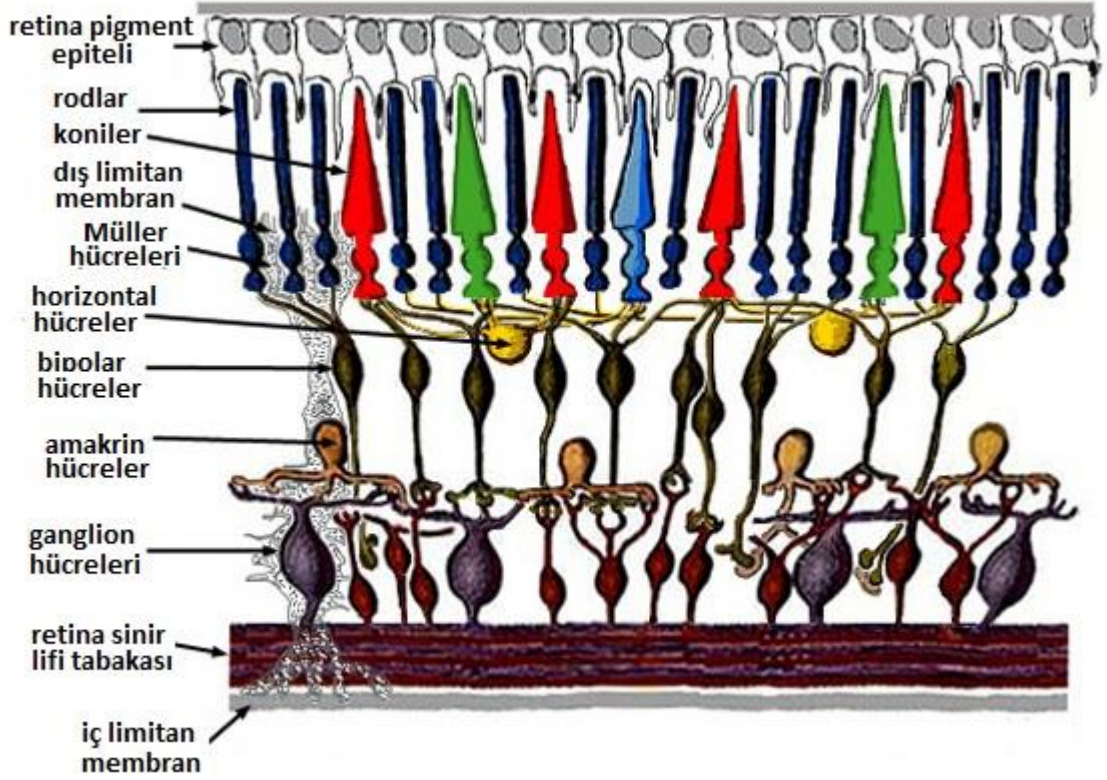
c. Ora serrata

Ora serrata; retina ve silyer cisim arasında yer alan dişli görünümde alan olup, temporalde nazal kadrana göre daha arkadadır ve nazalde 0.7-0.8 mm, temporalde ise 2.1 mm genişliğindedir. Üst rektus haricindeki rektus kasları insersiyon yerleri ora serrata yakınındadır. Ora serratanın optik sinire olan ortalama uzaklığı nazalde 27 mm, temporalde 32.5 mm, üst ve altta 31 mm'dir. Ora serratada fotoreseptör yoktur. Perifer retina ora serrataya doğru ilerledikçe inceler ve burada sonlanır [25].

2.2. Retinanın Tabakaları

Retina dokusu incelendiğinde RPE tabakası ve nörosensoryel retina olarak iki katmandan oluştuğu görülür. Bu iki tabaka arasında potansiyel bir boşluk bulunup aralarında anatomik bir bağ bulunmamaktadır. Nörosensoryel retina ise her biri farklı fonksiyona sahip ve belirli bir düzen içerisinde dizilmiş çeşitli hücre türlerini içeren tabakalardan oluşur. Nörosensoryel retinanın farklı tabakalarında bulunan hücreler şu şekildedir [Şekil 2];

- Fotoreseptörler
- Bipolar hücreleri
- Ganglion hücreleri
- Amakrin ve Horizontal hücreler
- Müller hücreleri

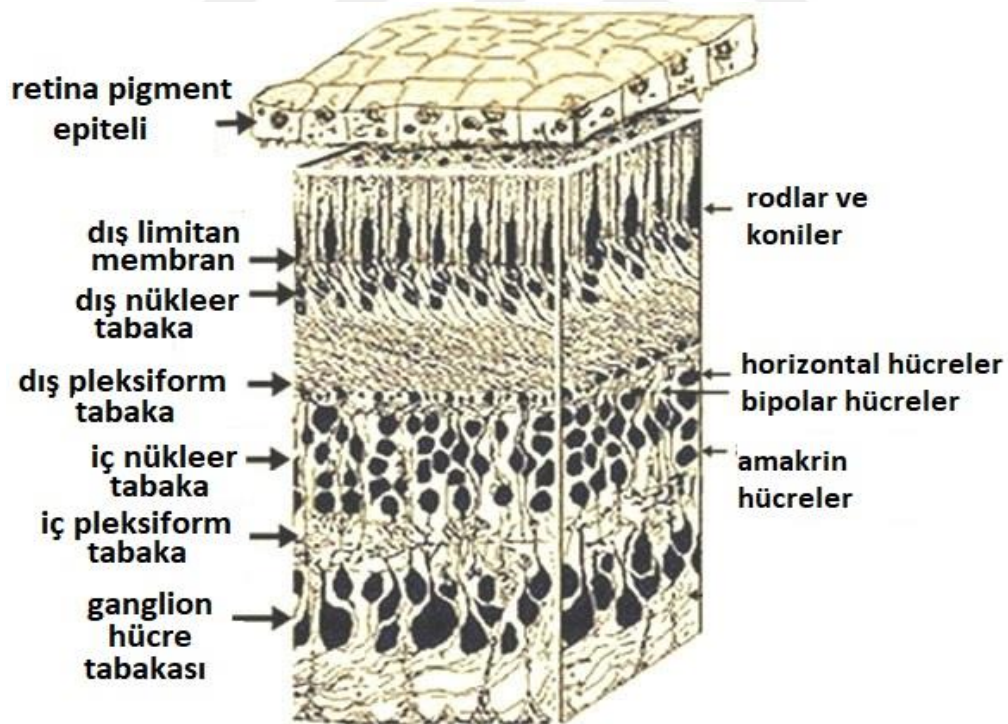


Şekil 2: Retinayı Oluşturan Hücrelerin Organizasyonu [167]

Nörosensöryel retinada fotoreseptörler en dışta, bipolar hücreler ortada, ganglion hücreleri ise en içte yer alır. Bu hücreler arasında bağlantıyı sağlayan sinaptik yapılar ise pleksiform tabakaları oluşturmaktadır. 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 [30].

Nörosensöryel retina, yapısında bulunan bu hücreler tarafından 9 tabakaya ayrılır. Bu tabakalar dıştan içe doğru (koroidden vitreusa doğru) şu şekildedir [Şekil 3];

1. Fotreseptör tabakası
2. Dış limitan membran
3. Dış nükleer tabaka
4. Dış pleksiform tabaka
5. İç nükleer tabaka
6. İç pleksiform tabaka
7. Ganglion hücre tabakası
8. Sinir lifi tabakası
9. İç limitan membran



Şekil 3: Retina Tabakaları

2.2.1. Fotreseptör Tabakası

Rod ve kon olarak isimlendirilen yüksek düzeyde özgünlüğe sahip gelişmiş nöroepitelyal hücrelerden oluşur. Fotreseptörlerin esas fonksiyonu, bir dizi karmaşık

kimyasal reaksiyonlar sonucunda fotopik uyarıyı elektriksel iletiye dönüştürerek (fototransduksiyon), görme fonksiyonunu sağlamaktır [29].

Tüm retinada yaklaşık 7 milyon kon ve 130 milyon rod vardır. Konlar yüksek ışık yoğunluğuna kolay adapte olurlar, merkezi görme ve parlak ışıktaki görmeden (fotopik görme) sorumludurlar. Rodlar ise düşük ışık yoğunluğunda uyarılırlar, loş ışıktaki görmeden (skotopik görme) sorumludurlar.

Konlar foveada en yüksek düzeyde iken, foveanın 350 µm çaplı merkezindeki foveolada rod bulunmaz. Rodların en yoğun bulunduğu bölge foveolanın etrafındaki parafoveal bölgedir. Periferik retinaya doğru rod sayısında azalma olur.

Fotoreseptör hücreler iç segment ve dış segment olmak üzere 2 kısımdan oluşmuştur. Fotoreseptör dış segment yapıları RPE ile temas halinde olup, bu bağlantı fonksiyonel açıdan önemlidir.

2.2.2. Dış Limitan Membran

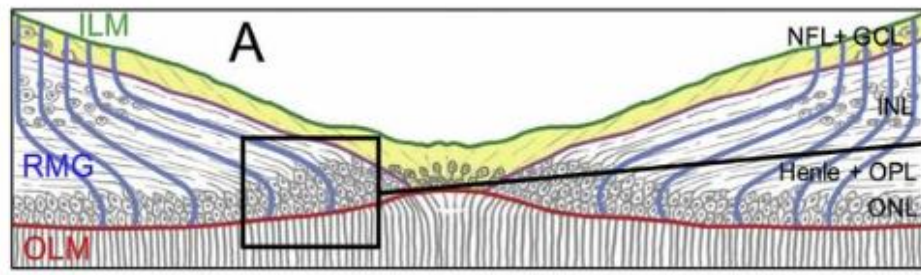
Gerçek bir membran yapısı olmayıp, komşu fotoreseptörler ve Müller hücreleri arasındaki zonüler bağlantılardan meydana gelir. Fotoreseptör dizilimi ve stabilizasyonunda rol oynar.

2.2.3. Dış Nükleer Tabaka

Fotoreseptör hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarından oluşan tabakadır.

2.2.4. Dış Pleksiform Tabaka

Birinci nöron olan fotoreseptörlerle ikinci sıra nöronlar olan horizontal ve bipolar hücrelerin bileşkesini oluşturur. Fotoreseptörlerin aksonları ile bipolar hücrelerin dendritleri bu tabakada sinaps yaparlar. Fovea santralinde, bu sinapsları oluşturan lifler foveadan dışa doğru oblik şekilde yayılarak Henle tabakasını oluştururlar [Şekil 4]



Şekil 4: Dış pleksiform tabaka ve Henle tabakası

2.2.5. İç Nükleer Tabaka

İkinci nöron olan bipolar hücreleri, bağlantı hücreleri olan amakrin ve horizontal hücreleri ve destek hücreleri olan Müller hücrelerinin çekirdek ve hücre gövdelerini içeren tabakadır.

2.2.6. İç Pleksiform Tabaka

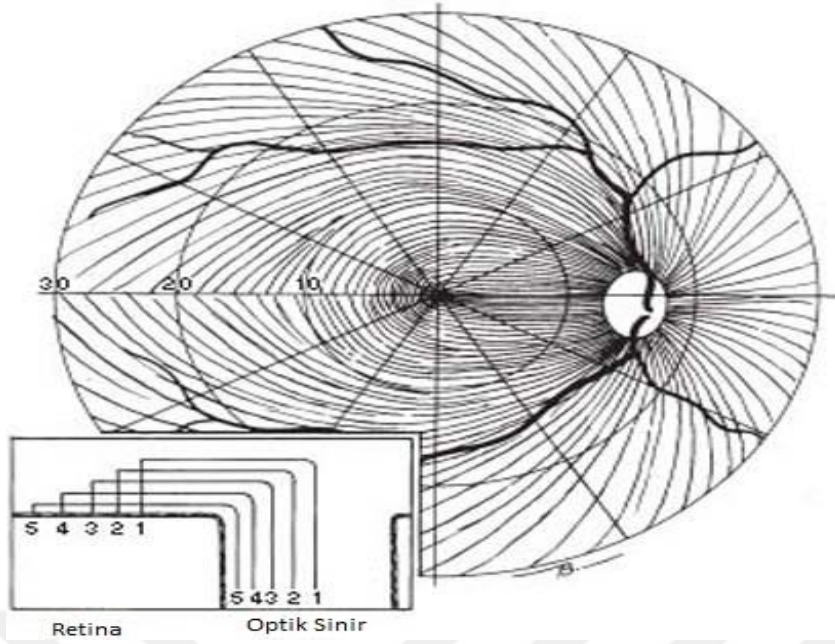
İkinci nöron bipolar hücrelerle üçüncü nöron olan ganglion hücrelerin ve bipolar hücreler ile amakrin hücrelerin sinaps yaptığı tabakadır. İçerdiği yoğun sinaptik ağ nedeniyle dış pleksiform tabakadan daha kalındır. Foveolada iç pleksiform tabaka bulunmaz.

2.2.7. Ganglion Hücre Tabakası

Üçüncü nöron olan ganglion hücrelerinin gövdelerinden ve destek fonksiyonu gören nöroglial hücrelerden (Müller hücreleri ve astrositler) oluşur. Foveolada ganglion hücresi bulunmazken, fovea kenarında yaklaşık 6-9 sıra ganglion hücresi bulunur. Periferde ise genellikle tek katlıdır. Makulada bir reseptör hücre ile bir ganglion hücresi sinaps yaparken, tüm retinada ortalama 130 reseptöre bir ganglion hücresi düşmektedir. Ganglion hücrelerin dendritleri bipolar ve amakrin hücrelerle sinaps yaparken, aksonları retina sinir lifi tabakasını oluştururlar [29].

2.2.8. Sinir Lifi Tabakası

Ganglion hücrelerinin aksonlarından oluşan tabakadır. Bu aksonlar retina yüzeyinde belli bir düzende seyrederek optik sinire katılırlar [Şekil 5] ve korpus genikulatum lateralede sonlanırlar. Sayıları 1.2 milyon civarındadır. Ayrıca retinal arter ve venler, nöroglial hücreler de bu tabakada bulunurlar.



Şekil 5: Retina Sinir Liflerinin Dağılımı

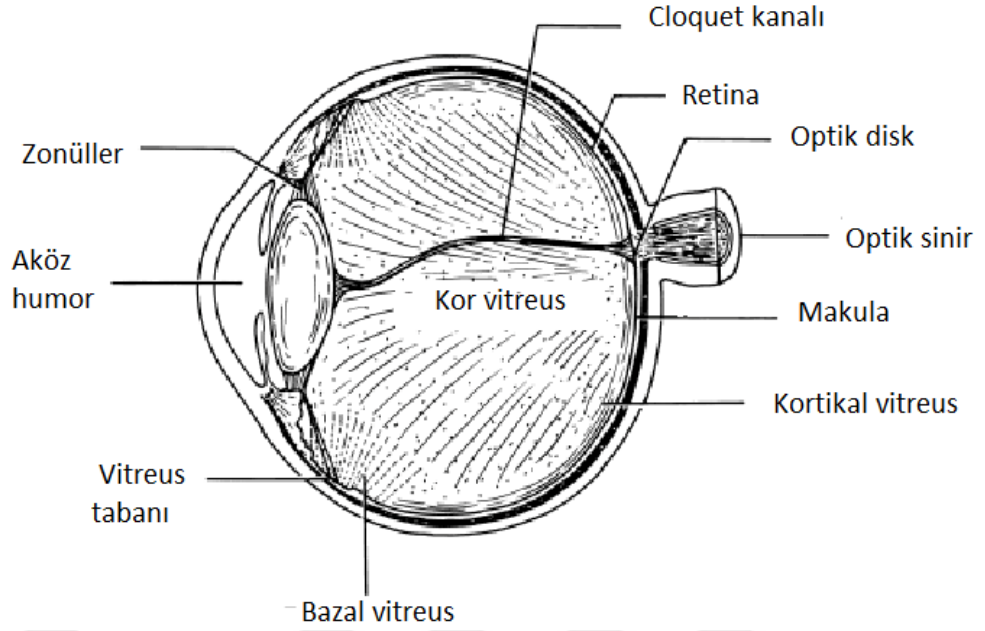
2.2.9. İç Limitan Membran

Retinanın en iç katıdır. Müller hücrelerinin hyaloid membrana olan bağlantıları ile oluşan dayanıklı bir membrandır ve retinayı vitreustan ayırır. Vitreus ince fibrilleri aracılığıyla iç limitan membran ile bağlantılıdır [29].

2.3. Vitreus

Gözün en büyük iç hacimli elemanı olup lens, siliyer cisim ve retina arasında yerleşir. Erişkinde göz hacminin %80' ini oluşturur, yaklaşık 4 mm hacindedir. Kollajen, hyaluronik asit ve su içeren şeffaf bir yapıdadır [31]. Lens, siliyer cisim ve retina tarafından kullanılan metabolik maddelerin geçişini sağlar.

Vitreus; vitreus tabanı, kortikal vitreus ve kor vitreus kısımlarından oluşur [Şekil 6]. Vitreusun ön yüzeyi lens arka kapsülü, zonuller, siliyer cisim, pars plana ile arkada ise retinanın iç limitan membran (İLM) tabakası ve optik disk ile temas halindedir. Vitreus, ön tarafta lens ile komşuluğu olan vitreopattellar fossa nedeniyle konkav şekilde iken, diğer yerleri sferik bir yapıdadır.



Şekil 6 : Vitreus anatomisi [168]

Vitreusun %99'u sudur. Geri kalan %1'lik kısmını düşük molekül ağırlıklı yağlar, inorganik tuzlar, proteinler ve hyalüronik asit oluşturur. Vitreus saydam olmasına rağmen homojen bir yapıda değildir. Kortikal vitreusta kollajen fibrilleri daha yoğunken, merkezi kısımda azalmaktadır. Kollajen lifler dallanma ve çapraz bağlanma yapmadan göz içinde ön-arka eksen boyunca retinaya paralel olarak vitreus tabanından papillaya doğru seyrederek. Vitreusun en önemli yapısal elemanı olan ve hyalositlerce sentezlenen hyalüronik asit, glikozaminoglikan yapıda bir moleküldür. Vitreusun saydamlığını ve elastik yapısını sağlar, stabilizasyonuna katkıda bulunur.

Vitreus ile iç limitan membran arasında sıkı bir bağlantı mevcuttur. Vitreusun kortikal yapısı ile İLM arasındaki en kuvvetli bağlantılar; optik disk çevresi, vitreus tabanı, fovea çevresi ve damar cidarlarıdır. Gençlerde vitreoretinal bağlantılar daha sıktır ve yaş ile birlikte azalmaktadır. Ayrıca gençlerde vitreusun %80'i jel formunda iken, yaşla birlikte vitreusta gerçekleşen likefaksiyon olayı nedeniyle bu oran azalır.

2.4. Retina Pigment Epiteli

Retina pigment epiteli, fotoreseptör dış segmentleri ile koroidin en yüzeyel tabakası olan koryokapillaris arasında dizili, tek sıralı, hegzagonal yapıda pigment hücrelerden oluşur. RPE'nin apikal mikrovillusları fotoreseptör dış segmentleri ile temas halindedir, bazal laminası ise Bruch membranının iç yüzeyi üzerine oturur [33].

İnfant gözünde 4.2-6.1 milyon arasında RPE hücresi bulunmaktadır. Yaş arttıkça gözün yüzey alanı genişlemesine rağmen hücre sayısında önemli artış olmaz. Erişkin gözünde normalde RPE içinde mitotik aktivite bulunmamaktadır. Erişkin gözünde sayıları yaklaşık 3.5 milyon olup, her bir RPE hücresi 30-50 fotoreseptör hücresi ile temas halindedir. Boyutları 10-60 µm civarlarındadır, tek sıralı bir tabaka halinde optik sinir başından başlayıp ora serrataya kadar devam eder. Yoğunluğunun en fazla olduğu yer foveadır. Foveadaki RPE hücreleri ince ve uzun yapılı, pigment yoğunluğu fazla hücrelerdir. Perifere doğru gidildikçe daha düz ve geniş hale gelirler ve pigment yoğunlukları azalır [29]. Melanin granüllerinin yaşlanmayla birlikte azaldığı bilinmektedir.

Retina ve RPE, subretinal boşluk olarak adlandırılan potansiyel bir aralık ile birbirinden ayrılır. RPE hücresinin apikal hücre membranı 3-7 µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillüs ile karakterizedir. Yaklaşık 5-7 µm uzunluğunda olan uzantılar fotoreseptörlerin dış segmentleri arasına girerken yaklaşık 3 µm uzunluğunda olan mikrovillüsler dış segmentlerin üçte bir dış kısımları etrafında bir kılıf yapar. Bu villüslerin fotoreseptörlerin dış segmentleri ile oluşturduğu parmaklı bağlantılar sayesinde, retina ile RPE arasında anatomik olmayan yapışıklık sürdürülmektedir. Retina ile RPE arasındaki bağlantının devamını sağlayan diğer etkenler ise ekstrasellüler matriks ve RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan nöral hücre adezyon molekülüdür (N-CAM). Retina ve RPE arasında anatomik bir bağlantı olmadığından ve ekstrasellüler matriks içinde laminin, fibronektin gibi adezyon molekülleri bulunmadığından dolayı patolojik durumlarda nörosensoryel RPE den kolayca ayrılmaktadır [34].

RPE hücreleri apikal membranında yerleşik olan Na^+/K^+ -ATPase pompa sistemi, RPE den koroide doğru aktif sodyum akımında rol oynar. RPE hücresinin bazal membran yüzünde yaklaşık 1 µm uzunlukta içe katlantılar oluşturan yapılar vardır. Bazal membran; Bruch membranına yapışıklıktan sorumlu olan integrinleri salgılar [35].

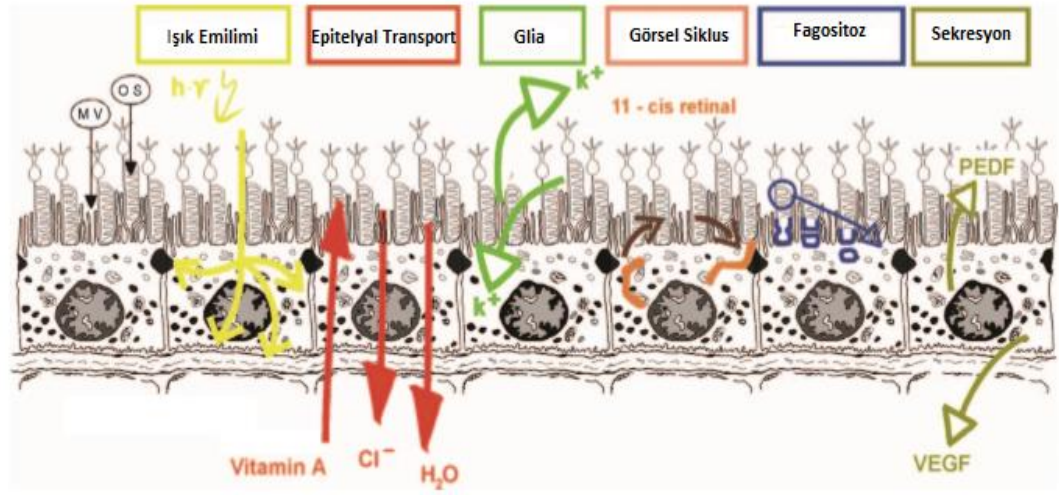
RPE hücrelerinin apikal yüzeyinin aksine, kendi aralarındaki yan yüzleri özelleşmiş anatomik bağlantılara sahiptir. Bitişik RPE hücrelerinin lateral yüzleri zonula okludens ve zonula adherens kavşakları ile birbirine sıkı yapışıklıktır. Bu kavşaklar makromoleküllerin koryokapillaris ile yer değiştirdiği bölge olan subretinal aralığı geçişlere kapatır ve Verhoeff membranı adını alır [36]. Bu bağlantı

moleküllerinin bir kısmı koroidden dış retina tabakalarına besin taşınması ve aksi yönde su, iyon ve atıkların atılmasından sorumludur. Bu bağlantılar aracılığıyla yüksek transeptelial direnç ve dış kan retina bariyeri oluşur. Sıkı kavşaklar aynı zamanda moleküllerin apikal ya da bazal plazma membran alanlarına hapsolmesine neden olur.

Normalde anatomik bağlantısı olmayan retina ile RPE arasındaki yapışıklık, aktif ve pasif güçler tarafından sağlanır ve devam ettirilir. Vitreus jelinin sağladığı endotamponat, transretinal sıvı gradienti, fotoreseptörler arası madde ve koroidin osmotik basıncı pasif güçleri oluşturur. RPE nin apeksinde yerleşik Na^+/K^+ -ATPase pompası ve sekonder olarak HCO_3^- transport sistemi ile RPE hücreleri, subretinal boşluktan su ve elektrolitleri aktif olarak dışarı pompalayarak retinanın yatışıklığının sağlanmasında rol oynar. RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan N-CAM, retinal yatışıklığın sağlanmasına katkıda bulunur.

RPE nin fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, gerek görme fonksiyonunun gerçekleşmesinde, gerekse retina hücrelerinin metabolizmalarının sürdürülmesinde çok önemli görevleri olduğu gösterilmiştir [Şekil 7]. Bu görevlerin başlıcaları şunlardır;

- a. Fotoreseptör dış segment fagositozu
- b. Kan- retina bariyeri ve transeptelyal transport
- c. Görsel siklus ve Vitamin A metabolizması
- d. Işığın emilimi ve fotooksidasyona karşı koruma
- e. Immün fonksiyon
- f. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı



Şekil 7: Retina pigment epiteli fonksiyonları [169]

a. Fotoreseptör Dış Segment Fagositozu

RPE nin en kritik fonksiyonlarından biri fotoreseptör dış segment fagositozudur. Fotoreseptörlerin dış segmentlerinde yoğun fotooksidasyon sonucu toksik madde birikimi olur. Dejenere olan dış segmentler distal uçtan RPE ye dökülürler ve fagosite edilirler. RPE hücrelerinin fagositoz fonksiyonunda iki ayrı mekanizma söz konusudur. Birincisi yavaş ve nonspesifik olup yabancı maddelerin fagositozunda etkindir. İkincisi ise dökülmüş olan dış segmentlerin hızlı ve reseptör aracılı alınmasında etkindir.

Dış segmentlerin fagositozu son derece özelleşmiş ve çok basamaklı bir işlemdir. Dış segmentlerin yapışma ve tanınması, hücre içine alınması ve hidrolitik enzimler ile degrade edilmesi basamaklarını içerir. İnternalizasyon basamağı ile hücre içine alınan segmentlere sindirici enzimler içeren lizozomlar yapışır ve fagolizozomlar oluşur. Pigment hücresi içindeki filamanlar ve mikrotübüller fagositik süreçte rol oynarlar. Fagolizozom içerisinde proteolitik ve lipolitik enzimler ile degradasyon başladığında, fagolizozom hücrenin bazaline doğru göç eder. Lizozomal enzimler fagolizozom içinde hapsedilmiş olan dış segmentleri hidrolize ederek küçük moleküllere dönüştürür. Bu küçük moleküller hücre içine dağılarak tekrar kullanılırlar. Sindirilemeyen materyal ise hayat boyu hücre içinde birikir ve birleşerek lipofuksin granüllerini oluşturur [37-39].

Hidroliz aşamasında dış segmentlerdeki en önemli glikozile protein olan rodopsinin parçalanmasında özellikle katepsin D rol oynar. Dış segmentlerin degradasyonunda rol oynayan diğer bir enzim katepsin S dir. RPE hücresi bu degradasyon süreci sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen ara ürünlerinin etkilerinden kendisini bir grup antioksidan enzimler ile savunur. Her bir fotoreseptör hücresi yaklaşık her 10 günde bir dış segmentini yeniler. Bazı RPE hücreleri 100 ile 200 arasında fotoreseptörü örtmektedir ve en az 100 fotoreseptörden dökülen dış segment parçasını fagosite etmek durumunda kalır [37,39].

b. Kan- Retina Bariyeri ve Transepitelyal Transport

Dış kan retina bariyeri anatomik olarak RPE hücreleri tarafından oluşturulur. RPE hücreleri hem bu bariyeri oluşturur hem de fenestre koryokapillaris ve dış retina katları arasındaki sıvı ve molekül alışverişini kontrol eder. RPE nin bariyer fonksiyonunun iki temel yapıtaşı vardır. Birincisi RPE hücreleri arasındaki sıkı kavşak-bağlantı kompleksleri, ikincisi ise RPE membran proteinlerinin polarize dağılımıdır. Kavşak bağlantılar üç kısımdan oluşur; *zonula adherens*, *gap junctionlar* ve *zonula occludens*. Fonksiyonları tam olarak açık olmasa da, bu yapılar RPE hücreleri arasındaki güçlü elektriksel bağlantıyı ve dış kan-retina bariyerini oluştururlar.

Sıkı bağlantılar hücreler arası sıvı difüzyonunu engeller, bu nedenle moleküllerin yer değişimi bizzat RPE hücrelerinin içinden gerçekleşir. Bununla birlikte bu sıkı bağlantı yapıları dinamik yapılardır ve geçirgenlikleri özel fizyolojik durumlardan veya bazı farmakolojik ajanlardan etkilenebilir. Retina hücrelerinden salınan faktörler veya RPE kaynaklı büyüme faktörleri, RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinin yapısı ve fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar. Hücrelerin içinden molekül transferinin düzenlenmesi, hücrel proteinlerin asimetrik dağılımına bağlıdır. Bu polarite esnek olup değişken yapı gösterebilir [40-41].

RPE hücrelerinin apeksindeki mikrovillüsler ve tabanındaki plazma membran katlantıları hücrenin yüzey alanını oldukça genişletir ve besin ve katabolitlerin değişimi görevinde önemli rol oynar [40]. RPE hücreleri koryokapillaristen gelen ve dış retinaya ulaşması gereken retinol ve retinol bağlayıcı protein gibi besinler için bazal ve lateral membranları üzerinde reseptörlere sahiptir. Ayrıca subretinal boşlukta biriken toksik metabolik artıkların temizlenmesinde görevli bir çok transport proteinini yapısında bulundurarak nörosensoryel retinayı koruyucu fonksiyon görür.

Retinanın RPE ne yapışık kalmasında, RPE hücrelerinin subretinal boşluktan sıvıyı çektiklerinde gelişen emme mekanizması rol oynamaktadır. Suda çözülmüş maddelerin RPE içinden aktif transportu, suyun gözden dışarı hareketine katkıda bulunur. Su ve elektrolitlerin subretinal aralıktan dışarıya aktif olarak pompalanması Na^+/K^+ -ATPase pompası ve HCO_3^- transport sistemi ile gerçekleştirilir. RPE apikal yüzünde bulunan Na^+/K^+ -ATPase sodyum ve potasyum iyonlarının plazma membranında dengede kalmasını sağlar ve bu şekilde membran potansiyellerinin oluşmasını sağlar. Işık, subretinal aralıktaki K^+ konsantrasyonunu azalttığı için Na^+/K^+ -ATPase aktivitesinin değişmesi ile RPE hücrelerinin transport fonksiyonunu etkilemektedir [40]. RPE hücresinin apikal yüzeyinde bu fonksiyonlar için uzmanlaşmış başka moleküler mekanizmalar da vardır. Bunlardan biri olan *aquaporin-1*, bir membran proteindir ve birçok dokuda suyun taşınması için kanal görevi görür. *Aquaporin-1*, insan RPE hücresinde de bulunmaktadır ve tek sıra RPE içinden suyun transportunu kolaylaştırmaktadır [42-44]. Retinadan koroide yoğun sıvı transportunda aminoasitler ve glikoz gibi iyonik olmayan maddelerin transportu da rol oynar. Örneğin; glikoz için *GLUT 1* ve *GLUT 3* gibi taşıyıcı proteinlerin, taurin ve metionin için aktif transport sistemlerinin varlığı bilinmektedir.

RPE hücrelerinin sağlamış olduğu transport işlemlerinin çoğu enerji bağımlıdır, ihtiyaç duyulan enerji miktarı oldukça yüksektir. Bununla birlikte RPE hücreleri enerji sağlayan glikoliz, krebs döngüsü ve pentoz fosfat yolağı gibi biyokimyasal yollarda görevli tüm enzimleri içermektedir [45].

c.Görsel Siklusu ve Vitamin A Metabolizması

Görme siklusu, fotoreseptör dış segmentlerinin disk membranlarında ışığa duyarlı pigmentlerin fotolizi ile başlar ve rejenerasyonu ile devam ettirilir. Fotoreseptörler ve RPE arasında gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ve transport mekanizmaları ile bu pigmentler dönüştürülür. Bu kompleks olaylar görsel siklusu oluşturur. Işığa duyarlı görme pigmentlerin tümünün içeriğinde A vitamini yer almaktadır. A vitamini, koryokapillaris yoluyla kan dolaşımından veya fagosite edilen dış segmentler ve fotoreseptörlerdeki görme pigmentlerinden salınarak RPE içine ulaşır. A vitamininin hem aldehid hem de alkol formu membranlar üzerinde litik etkiye sahip olduğundan proteinler aracılığı ile taşınır. RPE hücrelerinde retinol metabolizması için gerekli olan üç adet sitozolik retinoid-bağlayıcı protein bulunur. Bunlar all-trans-retinol için hücrel retinol-bağlayıcı protein (CRBP), 11-cis-retinal

için hücrel retinaldehit-bağlayıcı protein (CRALBP) ve all-transretinol için yüksek afinitesi olan retina pigment epitel duyarlı protein 65kDa (RPE65) proteindir [46-47]. Transport mekanizmaları kandan retinolün alınması yanında fotoreseptörler ile RPE arasında retinolün değişimi için kullanılır. Retinol kanda plazma retinol bağlayıcı proteine (RBP) bağlıdır. Karaciğerde sentez edilen ve kana salınan RBP, transtiretin ile kompleks oluşturur. Retinolün plazmadan RPE hücrelerine geçişi RPE taban yüzeyinde bulunan reseptör aracılı bir işlem ile olur. RPE hücre membranında serbest retinolün toksik etkilerinden korunmak için retinol başka bir taşıyıcı proteine bağlanır, RPE içinde bir protein-lipit kompleksi olarak retinolün yağ asidi esterleri şeklinde depolanır.

Işık enerjisinin elektriksel enerjiye dönüştürülmesini ifade eden fototransduksiyon olayı fotoreseptörlerde opsin proteinlerine bağlı bulunan ve A vitamininin duyarlı bir analogu olan 11-cis-retinal tarafından fotonun emilimi ile başlar. Işığın emilimi 11-cis-retinal formunu all-transretinal formuna dönüştürür. All-trans-retinal daha sonra all-trans-retinole metabolize olur ve RPE içine taşınır. RPE içinde 11-trans-retinolün 11-cis trans-retinole dönüşümündeki anahtar reaksiyonda, all-trans-retinil ester baskın retinoid olarak görev yapar. RPE içinde all-trans-retinol, cis-trans isomerase ile tekrar 11-cis-retinale izomerize olur ve fotoreseptörlere geri gönderilir. Retinoid bağlayıcı proteinlerden biri olan RPE65 proteini, all-trans-retinaldehidin fotoaktif formu olan 11-cis retinaldehide izomerizasyonundan sorumludur.

RPE ve fotoreseptörler arası boşluğu dolduran matriks kollajen, fibronektin ve laminin içermemektedir; ancak sialik asit (%25), proteoglikanlar (%15), hyaluronik asit (%15) ve kondroitin sülfat (%60) bakımından zengindir. Kondroitin sülfat kon fotoreseptörleri çevresinde bir kılıf oluşturmaktadır. İnterfotoreseptör matriksinin retinanın RPE üzerinde yatışık kalmasında görev yaptığı ve dökülmüş olan dış segmentlerin fagositozunu kolaylaştırdığı düşünülmekle birlikte rod fotoreseptörlerini çevreleyen bir kılıf oluşturması kon fotoreseptörlerinin mekanik ve elektriksel olarak çevresinden izolasyonunu sağlayan diğer fizyolojik işlevlere de sahip olduğunu düşündürmektedir [47-49].

d. Işığın Emilimi ve Fotooksidasyona Karşı Koruma

Retina ışığa doğrudan ve sık olarak maruz kalan tek nöral dokudur. Bu durum retinal hücrelere son derece toksik olan lipit peroksidasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca

retina vücudun nispeten en çok oksijen tüketen ve dolayısı ile yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açan bir dokudur. RPE hücreleri bu yüksek oksidatif stresin dengelenmesinde çok önemli rol oynar. RPE, melanin ve lipofuksin gibi ışığı emen pigmentleri yapısında bulundurarak retinayı fototoksik etkiden korumaktadır. Bir diğer savunma mekanizması da antioksidasyon kapasitesidir. RPE hücreleri enzimatik antioksidan olarak yüksek oranda süperoksit dismutaz ve katalaz içerir. İlaveten RPE de bol miktarda bulunan lutein, zeaksantin ve askorbat gibi karotenoidler, melanin ve glutatyon gibi moleküller RPE nin antioksidan kapasitesine katkıda bulunurlar.

RPE nin ana pigmenti olan melanin, redoks-aktif metal iyonlarına bağlanabilir ve onları inaktif durumda tutarak retinayı oksidatif hasardan korur. Melaninin ışığı absorbe etmesi etkili bir antioksidan görevi görerek RPE hücrelerini korur. Melanin granülleri ışığın saçılmasını azaltma ve sklera içinden ışığın emilimini engelleme fonksiyonu ile antioksidan kapasitenin yanında retinada oluşan görüntünün iyileştirilmesine de katkıda bulunur. Melanin içeriği zengin RPE hücrelerinde daha az lipofuksin oluşumu söz konusudur. Melanindeki yapısal veya fonksiyonel değişiklikler antioksidan kapasitenin kaybına neden olabilir [50-51].

e. Immün fonksiyon

Normal bir gözde immün cevabı kontrol etmek için bağışıklık baskılayıcı mekanizmalar çalışmaktadır. RPE sağladığı pasif bariyer yanında TGF- β gibi bağışıklık baskılayıcı sitokinlerin aktif sekresyonunu da yapar. Enflamatuvar bir cevap varlığında RPE, enflamatuvar mediatörlerin salınımını inhibe edebilir. RPE hücreleri aktif olarak tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) reseptörleri sekrete edebilir ve lokal olarak TNF- α etkisini inhibe edebilir. RPE hücreleri antijen sunucu hücreler ile ortak bazı özelliklere sahip olmasına rağmen antijen-spesifik T hücre proliferasyonunu güçlü olarak stimüle etmezler.

Gözün immün ayrıcalıklı bir alan olarak kalmasında hangi mekanizmaların çalıştığı tam olarak bilinmese de RPE hücrelerinin önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir. RPE hücreleri; Fc γ reseptörleri, CR3 reseptörleri ve C5a reseptörleri gibi birçok bağışıklık düzenleyici molekül ve IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, MCP-1 gibi birçok bağışıklık düzenleyici sitokin sentezlemektedir. Yine T lenfositlerini fagosite edebilme yetenekleri, T hücrelerinin saldırısına direnç

göstermeleri, T hücre aktivasyonunu baskılayabilmeleri, RPE hücrelerinin gözün immün ayrıcalığındaki önemini göstermektedir [52].

f. Büyüme Faktörleri ve Sitokinlerin Salınımı

RPE hücrelerinin fizyolojik ve patolojik koşullar altında pek çok büyüme faktörü ve sitokin sekrete ettiği bilinmektedir. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin, üretildikleri tek sıra pigment epitel hücresi üzerinde veya komşu hücre üzerinde otokrin veya parakrin etkileri yanında fotoreseptörler veya koroid hücreleri üzerinde de parakrin etkileri vardır. RPE hücreleri TGF- β 2, bFGF, aFGF, FGF-5, HGF ve PDGF-A gibi faktörleri ve bu faktörlere karşılık gelen reseptörleri sekrete edebilir.

TGF- β ; hücre büyümesi ve farklılaşması, antienflamatuar durumun devam ettirilmesi, fibrojenetik süreçler ve fagositozisin uyarılması gibi pek çok olayda etkin rol alır. Fibroblastik büyüme faktörleri tipik olarak RPE hücre proliferasyon ve migrasyonuna yardımcı olur.

RPE hücrelerinin, normal durumda koroid damar ağının sağlıklı olarak ayakta tutulması için bazal düzeyde anjiyojenik maddeler salgıladığı düşünülmektedir. RPE hücreleri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörlerini sekrete etmektedir. VEGF, endotelial hücre apoptozisini önler ve koryokapillarisin sağlam endotele sahip olması için gereklidir. Aşırı VEGF üretimi, diabetik retinopati ve koroid neovaskülarizasyonu gibi anjiyojenik göz hastalıklarında önemli rol oynar

Sağlıklı gözde RPE tarafından sekrete edilen pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF), retina ve koryokapillarisin yapısal bütünlüğünün sağlanmasında rol oynar. PEDF nöroprotektif faktör olarak tanımlanmıştır. Çünkü PEDF'nin glutamat veya hipoksi aracılı apoptozise karşı nöronları koruduğu gösterilmiştir. PEDF aynı zamanda antianjiyojenik faktör olarak görev yaparak endotelial hücre proliferasyonunu inhibe eder ve koryokapillaris endotelini stabilize eder. Bu fonksiyonu subretinal alanın avaskülaritesinin sağlanmasında önemlidir.

Sağlıklı bir gözde PEDF ve VEGF pigment epitelinin zıt yönlerinden sekrete edilir. PEDF apikal yüzden sekrete edilerek nöronlar ve fotoreseptörler üzerinde etki ederken, VEGF büyük oranda RPE hücresinin bazal yüzünden sekrete edilerek koroidal endotel üzerinde etkisini gösterir. VEGF gibi anjiyojenik ve PEDF gibi antianjiyojenik faktörler arasındaki denge anjiyojenik göz hastalıklarının gelişimi açısından çok önemlidir [53-55].

3. PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ (PVR)

3.1. PVR Patogenezi

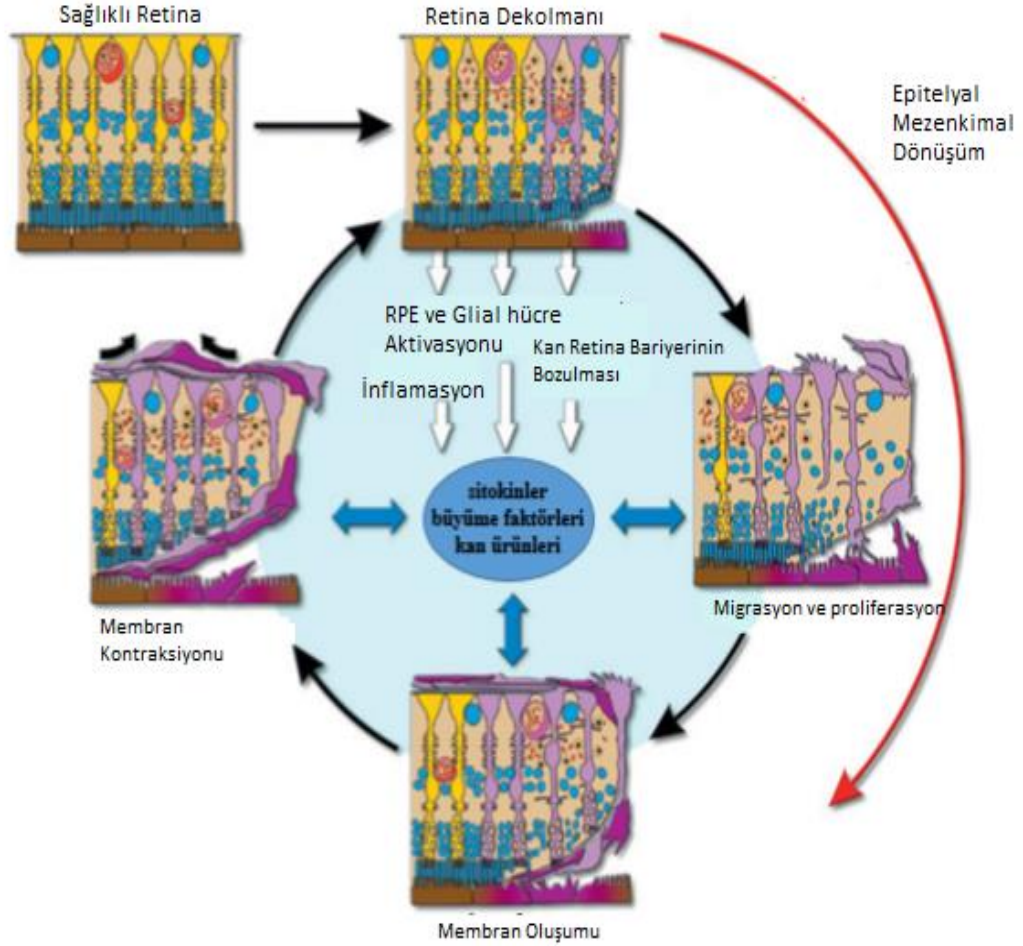
1983 yılında Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi tarafından yapılan tanımına göre PVR; retina dekolmanı sonrası vitreus ve/veya periretinal alanda, ektopik hücre tabakalarının membran formasyonu oluşturması ve bu membranların kontraksiyonuyla birlikte retinada traksiyon ve distorsiyonun meydana gelmesi ile karakterize patolojik bir süreçtir. Tüm retina dekolmanlarının yaklaşık %5-10' unda gerçekleşir. Retina dekolmanı cerrahisinde başarısızlığın en sık sebebidir [56]. Retinal hastalığın başlangıcıyla, primer PVR gelişimi arasında geçen ortalama sürenin iki ay olduğu gösterilmiştir [57].

PVR nin patogenezi skar oluşumu ile sonuçlanan yara iyileşme süreciyle benzerdir. Retinada yırtık oluşup kan retina bariyerinin bozulmasıyla birlikte, oluşan doku travmasının tamiri için zincirleme bir reaksiyon başlar ve bu reaksiyon üç evreden oluşur; bunlar enflamasyon, proliferasyon ve kontraksiyon evreleridir [Şekil 8] [58].

Enflamasyon Evresi

Retinal yırtık oluşumu ve doku travması sonrasında, bu bölgede kan-retina bariyeri bozulur. Kan-retina bariyerindeki bozulma ile birlikte RPE hücreleri; Bruch membranından ayrılırlar, serum faktörlerine maruz kalarak kemotaktik etkileşim gösterirler ve oluşan retina kırıklarından göç ederek vitreus içine ve subretinal boşluğa geçerler [59]. Ayrıca vitreus stimülasyonu da RPE hücrelerinin kemotaksis ve proliferasyonunu arttırıcı etki gösterir. Travmatik dokuda aktive olan trombositlerden, monosit ve makrofajları harekete geçiren platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve diğer sitokinler salınır. Doku travmasının oluşumundan birkaç saat sonra lezyon yerine polimorf nüveli hücreler (PNH) gelir. PNH ler makrofaja dönüşebilen dolaşımdaki kan monositlerini uyaran sitokinleri üretirler. Aktive olan makrofajlar TNF- α , IL-1,

IL-6, IL8, IL-10, PDGF, TGF- β , platelet aktive edici faktör (PAF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve EGF gibi büyüme faktörlerinin salınımına katkıda bulunur.



Şekil 8: PVR gelişim evreleri [170]

TGF- β ; fibroblastların kollajen ve fibronektin sentezlemesini uyarır, monositler için de bir kemoatraktandır. RPE üzerinde kompleks bir etki ağı vardır. Antagonistik ve sinerjistik, pozitif ve negatif cevaplara neden olabilir. RPE nin epitelyal karakterini kaybederek fibroblast benzeri özellikler kazanmasında etkilidir. PDGF ise hem RPE hem de glial hücreler için kemoatraktan ve mitojendir. Patogenezde önemli rol oynayan TGF- β ve PDGF ün, PVR li gözlerin vitreus örneklerinde yüksek düzeyde bulunduğu, inhibe edilmeleriyle PVR progresyonunun azaldığı gösterilmiştir [60,61].

Fibronektin PVR patogenezindeki rolü en iyi bilinen proteinlerden biridir ve iki formu vardır: serum kaynaklı fibronektin ve hücre sel fibronektin. Enflamasyon evresinde serum kaynaklı fibronektin, geçici bir ekstraselüler matriks oluşumunu

sağlamakla birlikte; RPE, fibroblast ve makrofajlar üzerinde de kemotaktik etkilidir. Bu mikroçevrede birçok sitokin ve büyüme faktörüne maruz kalan RPE hücreleri fibroblast benzeri kontraktıl özellik kazanır; glial hücreler, fibroblast ve makrofajları da ortama çekerek PVR gelişimini hızlandırır ve PVR nin ikinci evresi olan proliferasyon evresini başlatırlar.

Proliferasyon Evresi

PVR nin ana patolojik yapısını oluşturan epiretinal membranların hücresele bileşeni incelendiğinde büyük çoğunluğunun RPE hücrelerinden oluştuğu görülmüştür. Retina pigment epiteli ve intraretinal glial hücreler normalde dinlenme evresindedirler ve aktif olarak çoğalmazlar. Bununla birlikte iskemik, termal veya mekanik hasarlara cevap olarak hızlı bir şekilde çoğalmaya ve kontraktıl membranlar oluşturmaya başlarlar.

Retina pigment epitel hücreleri PVR gelişiminde anahtar rolü oynamaktadır. Bu hücreler ortamdaki fibrin ve sitokinlerin (TGF- β 1 ve TGF- β 2) etkisi ile morfolojik değişikliğe uğramakta ve myofibroblast benzeri mezenkimal özellikler kazanmaktadır. Bu değişim, epitelyal fenotipin kaybı, hücre iskeletinde değişiklikler ve alfa düz kas aktini (α -SMA), vimentin, glial fibriler asidik protein (GFAP) gibi mezenkimal hücre ürünlerinin sentezini kapsar [9]. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) olarak tanımlanan bu süreç sonunda RPE hücrelerinin migrasyon ve proliferasyon kapasitelerinde ve ESM sentezleme yeteneğinde artış görülür. RPE hücrelerindeki değişimin yanında kandan geçen monositler de makrofajlara dönüşürler ve başta FGF olmak üzere birtakım sitokinler salgırlarlar.

FGF, fibroblast proliferasyonunu uyarır; fibroblastlar geçici ESM yerine kalıcı matriksi oluşturan hücresele fibronektin ve kollajeni sentezlerler. PVR deki epiretinal membranların immünohistokimyasal analizinde, bu dokularda interstisyel kollajenler olan Tip I ve II kollajen ve değişken miktarlarda da Tip III (vitreusa özgü) kollajen varlığı gösterilmiştir [9].

Doku travmasının tamirine yönelik bu proliferasyon süreci kontrolden çıkarak retina ön/arka yüzeyinde ve vitreusta patolojik boyutlara ulaşır. Vitreus kollajeni bu hücrelerin üreyip fibroblastik reaksiyon oluşturmaya iskelet görevi yapmaktadır [62].

Kontraksiyon evresi

Yara iyileşmesinin üçüncü evresinde önceden oluşturulmuş doku yeniden düzenlenir. ESM reorganize olur, hücreler azalır ve sonuçta fibroblastların kontrakte olmasıyla granülasyon dokusu skar dokusu haline dönüşür [58].

PVR ye neden olan hücrelerin kökeni çok çeşitli tiplerde olsa da, elektron mikroskopi incelemelerinde bu hücrelerin hem fibroblast hem de düz kas hücrelerine benzer özelliklerde olduğu görülmüştür. Bunların organizmadaki olası görevi, yara yerlerinin yaklaştırılarak belli bir süre sonunda fibroblastlara dönüşüp aradaki boşluğu doldurmaktır. Aynı zamanda kollajen yığılımına yol açarak lifleri kendilerine doğru çekip üçüncü evre olan kontraksiyona neden olurlar.

Proliferatif vitreoretinopati membranları ilk oluştuğu zaman sahip oldukları hücresel yoğunluğu zamanla kaybederek bu hücrelerden salgılanan matriks proteinlerince daha zengin bir yapı kazanırlar. PVR gelişiminde hem subretinal, hem epiretinal membranların oluşur ve bu membranlar esas olarak RPE hücreleri, glial hücreler ve fibroblastları içerir. Glial hücreler, preretinal membranların non-kontraktıl komponentlerinin oluşumundan sorumludur. Retinal hasarı takiben oluşan basit epiretinal membranlar kontraktıl özellik taşımazlar, ancak retina dekolmanının gelişmesi ve uzun süre devam etmesi, diğer hücre tiplerinin ve matriks komponentlerinin de membran yapısına katılması sonucu kompleks epiretinal membranlar oluşur. Matriks metalloproteinazların (MMP), hücre aracılı kollajen kontraksiyonunda ve dolayısı ile PVR patogeneğinde görev aldıkları gösterilmiştir [63]. PVR li insan gözlerinde bunlardan MMP-2 ve MMP-9 yüksek miktarlarda tespit edilmiştir [64]. RPE hücreleri ve fibroblastlar bu membranların kontraksiyonu için gereklidir ve bu kontraksiyonu sağlayan Tip I kollajeni sentezlerler. Bu kontraksiyonların klinik görünümü; retinal kırışıklık, vasküler tortuosite, yırtık kenarlarında rulo görünümü, yıldızsı şekilde retinal katlantılar, tam kat retinal katlantılar ve huni biçiminde retina dekolmanıdır. Bunun sonucunda da traksiyonel retina dekolmanı gelişir. Sonuç olarak PVR gelişimi yırtıklı RD nın traksiyonel RD na dönüşümüne yol açarak ve vitreoretinal cerrahi sonrası kapanan retinal yırtıkların traksiyonla birlikte açılmasına neden olarak tedaviyi güçleştirmektedir.

3.1.1. Büyüme Faktörleri ve Sitokinlerin Rolü

Büyüme faktörleri ve sitokinlerin PVR patogenezinde önemli rol oynadığı; kemotaksis, proliferasyon, migrasyon ve ESM yapımı gibi önemli hücresel yanıtları indüklediğini gösteren çok sayıda kanıt vardır [65]. Büyüme faktörleri; hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan proteinlerdir. Transmembran glikoproteini yapısındaki ilgili reseptörlerine bağlanan büyüme faktörleri, DNA sentez fazını uyararak hücresel çoğalmayı ve farklılaşmayı aktive ederler. Sitokinler; spesifik olarak hücresel iletişimde yaygın olarak kullanılan sinyalleme proteinlerini belirtir, hormonlar gibi otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterebilirler. İnterlökinler, spesifik olarak lökositlere yönlendirilen sitokinlerdir. PVR patofizyolojisinde de birçok büyüme faktörü ve hücre rol oynamaktadır. Özellikle vitreus ve subretinal sıvıdan alınan örneklerde RPE hücrelerinin proliferasyonunda aktif rol alan büyüme faktörlerinin FGF, PDGF, IGF-1, TGF- β ve EGF olduğu gösterilmiştir

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) 36-46 kDa ağırlığında, homodimerik glikoprotein yapıda, hücresel proliferasyondan ve vasküler geçirgenlikten sorumlu bir moleküldür. İnsanda en yaygın ve anjiogenez için de en önemli alt formu VEGF-A dır. Retinada; RPE, vasküler endotel hücreleri, perisitler, retinal nöronlar, Müller hücreleri ve astrositler VEGF üretme yeteneğine sahiptir. VEGF, iskemik retinal bozukluklara karşı gelişen hipoksi yanıtında RPE ve retinal hücreler tarafından salgılanır. VEGF nin aşırı üretimi anjiyogenez, artmış vasküler geçirgenlik ve pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi ile sonuçlanır. PVR li hastaların vitreuslarındaki VEGF konsantrasyonları, PVR olmayan RD lı hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur [66].

Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Platelet kaynaklı büyüme faktörü; sistein bağlı, 35 kDa ağırlığında, A ve B zincirlerinden oluşmuş dimer yapısındadır. PDGF nin AA, AB, BB izomerleri vardır ve reseptörü heterodimerik ve monomerik formlarda bulunur. PDGF nin reseptörüne bağlanması mitojenik etkileri indükler. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF salgırlar. PDGF, makrofajlar ve polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini uyarırken fibroblast ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksisi hem de mitogenezi uyarır. PDGF; kollajen, hyalüronik asit ve fibronektin

sentezini indükler, ayrıca kollajenaz aktivitesini artırır. PDGF fibroblastların TGF- β ya olan çoğalma cevabını artırır [67]. PDGF önemli bir mitojen, kemoatraktan ve hücrel kontraksiyonda rol alan bir mediatördür. PVR deki epiretinal membranların yapısında hem PDGF, hem de PDGF reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir [171-172]. Hayvan modellerinde de PVR li gözlerin vitreusunda yüksek düzeyde PDGF varlığı saptanmıştır [61]. Bu özellikleriyle PVR'nin patogenezinde önemli rol oynamaktadır.

Transforme Edici Büyüme Faktörü beta (TGF- β)

TGF- β ailesi; TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 izoformlarından oluşan, yaklaşık 25 Da ağırlığında ve birçok doku tarafından üretilen polipeptidlerdir. Ana izoform TGF- β 2 dir. TGF- β 2 dimerik, inaktif biçimde salgılanır ve ESM e bağlanır. Gerektiğinde ESM e bağlı enzimlerle aktif hale getirilir. TGF- β hücre içindeki etkinliğini, temel olarak SMAD sinyal yolu ile göstermektedir.

Retina ve vitreusta üretilen TGF- β 2; RPE hücrelerinin EMD geçirerek miyofibroblastlara dönüşümü, ESM aktivasyonu ve üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur. TGF- β nın fibroblast, monosit ve makrofajlar üzerinde kemotaktik etkisi de vardır. TGF- β nın, proliferatif diyabetik retinopati ve PVR de dahil olmak üzere farklı dokulardaki fibrotik hastalıklarda doku kontraksiyonunda etkili olduğu görülmüştür [68]. TGF- β düzeyleri PVR li gözlerin vitreusunda yüksek düzeylerde bulunmuştur ve seviyesi intraokuler fibrozisin şiddetiyle ilintili olarak yükselir [60].

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF, epitel hücreleri için potent bir mitojendir ve 6 kDa ağırlığında bir polipeptittir. Birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır. EGF ün reseptörüne bağlanması tirozin kinazı aktive eder. Fibronektin, hyaluronik asit gibi ESM proteinlerinin salgılanmasına ve hücre proliferasyonuna neden olan deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini uyarır. Reseptör fosforilasyonu, hücre göçüne yardımcı olan hücre iskeletindeki aktinin yeniden düzenlenmesini de sağlar. Epitel hücreleri, endotel ve fibroblastlar için kemotaktik etki gösterir. Anjiogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyarıcı özelliğe sahiptir.

PVR patogenezinde EGF, RPE hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu artırarak ve EMD yi indükleyerek etkili olur [69].

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF ailesi; ortalama 18 kDa ağırlığında olan, 20 kadar proteinden oluşan, birçok dokuda çoğalma, farklılaşma, göç, ESM depolanması ve anjiogenez gibi olayları düzenleyen protein grubudur. Genel olarak asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF) hem de bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) olmak üzere iki tip FGF tanımlanmıştır. PVR vitreusunda özellikle bFGF düzeyleri yükselmekte ve fibrotik epiretinal membranlar bFGF yi içermektedir [70]. PVR patogenezinde diğer büyüme faktörleri ile birlikte bFGF önemli rol oynamaktadır.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü - 1 (IGF-1)

IGF-1; 70 aminoasitten yapılmış, 7649 Da ağırlığında polipeptid yapıda bir moleküldür. IGF-1 in karaciğer ve perifer dokulardan salınımı büyüme hormonu (GH) aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca doku hasarına cevap olarak lokal salınımı da mevcuttur. Lokal salınımı direkt olarak veya EGF, FGF, PDGF gibi diğer büyüme faktörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir [71].

IGF-1 ile ilgili farelerde yapılan bir çalışmada prematüre retinopatisinin proliferatif fazında etkili olduğu gösterilmiştir [173]. IGF1 in diğer proliferatif vitreoretinal hastalıklarda PDGF ile birlikte, Müller hücrelerinin ve RPE nin kontraksiyonu stimüle edici etkisini uyardığı bilinmektedir[72].

Kollajen ve Ekstrasellüler Matriks

PVR gelişiminde RPE ve ESM arasındaki etkileşimler önemlidir [73]. Kollajen ve ESM, PVR deki epiretinal membranların yapısal iskeletini oluştururlar. Kollajenin kaynağı esas olarak RPE olmakla birlikte, fibroblast ve glial hücrelerin de kollajen üretiminde rolleri olduğu saptanmıştır. Epiretinal membranlarda en sık Tip I ve Tip III kollajen saptanırken; Tip II, IV ve V e de rastlanmıştır.

PVR membranlarında fibronektinin de yüksek düzeyde var olduğu saptanmıştır. Fibronektin bir ESM proteindir, RPE için kemoatraktandır. RPE hücrelerine geçici bir matriks sağlar, RPE hücrelerinin fibroblastik fenotipe dönüşümünü uyarır. PVR nin başlangıcında kandan köken alırken daha ileri evrelerde RPE tarafından sentezlenir.

PVR membranlarında tespit edilen diğer ESM proteinleri ise vitronektin, laminin, trombospondin-1, tenaskin ve osteonektindir [74]. Bu proteinlerin özelliği PVR

membranlarında tespit edilmelerine rağmen normal retina dokusunda bulunmamalarıdır. PVR patogenezindeki rolleri halen tam olarak bilinmemekle birlikte ESM oluşumuna katkıları gösterilmiştir. ESM nin bir başka bileşeni olan matriks metalloproteinazların (MMP), özellikle MMP2 ve MMP9 un düzeylerinin epiretinal membranlarda yüksek olduğu tespit edilmiştir [64].

Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

TNF, inflamasyonda rol alan temel sitokinlerden birisidir. TNF ün aynı reseptöre bağlanan TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki ayrı formu vardır. Aralarındaki en önemli fark kaynaklandıkları hücrelerdir. TNF- α esas olarak monosit/makrofaj ve Kupffer hücrelerinde, TNF- β ise aktive T lenfositlerde yapılmaktadır. İnterlökin-1 (IL-1) ve TNF- α sıklıkla simültane olarak sentezlenip salgılanırlar. IL-1 ve TNF mezenkimal hücrelere etkiyle IL-6, IL-8 ve kollajen sentezini başlatırlar. TNF nin doğal bağışıklık ve akut iltihap yanıtının oluşumunda önemli rolü bulunmaktadır. TNF- α nın direkt antiviral etki, immünomodülatör aktivite, virüsle enfekte hücrelere sitotoksik etki gösterdiği; enflamasyon ve hücre sel immün cevapta önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle fibroblast ve mezenkimal hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi PVR patogenezinde önemlidir [9].

İnterlökin-1 (IL-1)

Başlıca aktive mononükleer fagositlerce üretilen bir polipeptiddir. Çok az oranda yapısal olarak bulunur ve genellikle bir uyarı sonucu salgılanırlar.

TNF- α , bakteriyel lipopolisakkaritler ve mikroorganizmalar gibi birçok uyarı; IL-1 yapımını arttırmaktadır. IL-1 in salınımını kortikosteroidler ve TGF- β engellerken, lökotrienler ise arttırmaktadır. Aynı genler tarafından kodlanan IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki ayrı formu vardır. Dolaşımdaki IL-1 aktivitesinin çoğu IL-1 β ye aittir. IL-1 ve TNF- α düşük dozlarda lokal inflamasyonun mediatörleri iken, yüksek dozlarda salgılandıklarında dolaşıma geçerek endokrin etkiler oluştururlar ve akut faz yanıtının en önemli uyarıcılarıdır. IL-1; damar endotel hücrelerinde E-selektin, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerinin artmasına yol açarak nötrofil ve eozinofillerin endotele yapışmasını sağlar [14].

İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, çeşitli hücrelerde birçok biyolojik aktivitesi olan 26 kDa ağırlığında bir sitokindir. IL-1 ve TNF α nın etkisiyle mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar, epitel hücreleri ve aktive T lenfositler tarafından sentezlenir. IL-6 inflamatuvar ve immün yanıtta akut faz reaksiyonunun önemli bir mediatörüdür. Fibrinojen, hemopeksin, α -1 kimotripsin, α -2 makroglobulin gibi akut faz yanıtına katkıda bulunan birçok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olmaktadır. T hücrelerinin çoğalma ve farklılaşması, sitotoksik T lenfositlerin farklılaşması gibi etkileri vardır. PVR li hastaların serumunda IL-6 düzeyi yüksek bulunmuş ve bunun hastalığın şiddetiyle ilgili olabileceği düşünülmüştür [75].

Trombin

Kan-retina bariyerinin bozulması ile birlikte retinaya ve vitreusa temas eden serum, mitojenik sinyallerin hem glial hücrelere hem de RPE hücrelerine iletilmesinde rol oynar. Serum bileşeni olan trombin, retinal glial hücrelerin ve RPE hücrelerinin proliferasyonunu uyarır. Trombin seviyeleri, PVR li hastaların vitreusunda belirgin olarak daha yüksektir. Proinflamatuvar ve profibrotik yolların aktivasyonunda rol alır [76]. Trombinin PDGF reseptör sinyalizasyonunun otokrin aktivasyonu yoluyla RPE hücrelerinin migrasyonunu düzenlediği bilinmektedir.

3.2. PVR İnsidansı ve Risk Faktörleri

Vitreoretinal cerrahide son dönemdeki ileri teknolojik gelişmelere rağmen, RD cerrahisinde başarısızlık halen önemli bir sorundur. Bu başarısızlığın en önemli sebebi de PVR gelişimidir. PVR, bütün yırtıklı retina dekolmanlarının %5-10 unda görülür. Genel insidansı %7dir [77]. PVR gelişiminde; RD bölgesinin boyutu, büyük, çok sayıda veya bulunamayan yırtıklar, afaki, vitreus hemorajisi, cerrahi öncesi koroid dekolmanının varlığı, üveit, dekolmanın süresi ve genç hasta yaşının risk faktörü olduğu bilinmekteydi. Son yapılan çalışmalarda; cerrahi esnasında ve sonrasında vitreus hemorajisi, koroid dekolmanı, hava veya gaz ile tamponad yapılması, kriyoterapi, diatermi, ışık koagülasyonu, nüks nedeniyle tekrarlayan cerrahi, subretinal sıvı drenajı esnasında vitreus kaybı, inkomplet arka vitreus dekolmanı, cerrahinin uzun sürmesi, vitreusta protein konsantrasyonunun fazla olması, skleral depresyon ile muayene gibi risk faktörleri de listeye eklenmiştir [62].

Proliferatif vitreoretinopatide önemli bir nokta da, hastalığın süresidir. Bu süre, retinal yırtık ve doku hasarının başlaması ile PVR nin yerleşmesi arasında geçen süredir. PVR, RD cerrahisinden ortalama 2 ay sonra oluşur. Bu süre hastalığın profilaksisi ve tedavisi için önemlidir [78].

3.3. PVR Sınıflandırması

İlk kez 1934'de RD sonrası retina yüzeyinin membranlar tarafından işgal edilmesi olarak tanımlanan patoloji, preretinal organizasyon kavramı ile ifade edilmiştir [79]. Machemer ve Laqua; maymunlarda yırtıklı retina dekolmanını inceledikleri çalışmada, RD olan gözlerde RPE ve glial hücre proliferasyonunu, bu proliferasyonun vitreusta, iç ve dış retinal yüzeyde membranlar oluşturduğunu, retinal katlantıların meydana geldiğini göstermişlerdir [80]. Esas patolojinin vitreusta olduğunu düşünerek bu durumu masif vitreus retraksiyonu (MVR) veya masif preretinal retraksiyon (MPR) olarak isimlendirmişlerdir. Sonraki süreçte preretinal membran oluşumu göz önünde tutularak bu isimlendirme masif preretinal proliferasyon (MPP) olarak değiştirilmiştir. Günümüzde de yaygın olarak kullanılan PVR tanımı ve sınıflaması ilk olarak 1983 yılında Retina Cemiyeti tarafından oluşturulmuştur [81].

Retina Cemiyeti, PVR görünümünü klinik bulgulara ve coğrafi dağılıma göre dört grupta sınıflamıştır [Tablo 1] [81]. Ancak bu sınıflamadan sonra yapılan çalışmalar PVR yi oluşturan membranların yapı ve yerleşim yeri bakımından farklılıkları olduğunu göstermiştir. Membranların farklı özelliklerinin ortaya konulması retina yüzeyinde ortaya çıkan değişik traksiyon güçlerini de daha iyi ortaya koymuştur. Bu verilere göre membranların preretinal veya subretinal gelişmesi, fokal veya diffüz olması, ekvatorun önünde veya gerisinde yer alması, vitreus tabanının sürece katılıp katılmaması; dekolmanın klinik görünüm ve seyrini etkilemektedir. PVR nin daha iyi tanımlanarak detaylandırılması, cerrahi tedavinin başarılı olma şansını da arttırmıştır. 1983'te kabul edilen PVR sınıflamasının bu ayrıntıları içermemesi nedeniyle, 1989'da Silikon Çalışma Grubu (SSG) tarafından yeniden sınıflandırılmıştır [Tablo 2] [82]. 1991 yılında ise Retina Cemiyeti tarafından güncelleme yapılmıştır.

Retina Cemiyetinin sınıflandırmasına göre; Evre A veya minimal PVR; pigmentli hücre proliferasyonunun sebep olduğu vitreus içinde pigment birikimi ile karakterizedir. Buna tanı koymak pek çok hastada zordur. Evre B veya orta derecede PVR de; retina yüzey kırıklığı oluşur ve retina yırtıklarının kenarları bükülür veya

düzensizdir. Evre C de; tam kalınlıkta sabit retinal katlantılar oluşur. Evre D de oluşan bu sabit retinal katlantılar dört kadranı da kaplar, ileri dönemde fundus görüntüsü kapalı huni görünümünü alır ve optik sinir başı görülemez.

Tablo 1: Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi'ne göre PVR sınıflandırması [81].

PVR Evresi	Klinik Bulgular
Evre A	Vitreusta bulanıklık ve pigment kümelenmeleri
Evre B	Retinada kırışıklıklar ve sertleşme Yırtık kenarında kıvrılma Retina damarlarında kıvrım artışı
Evre C	Tam kalınlıkta sabit retina katlantısı C1: Bir kadranda C2: İki kadranda C3: Üç kadranda
Evre D	Dört kadranda retinal katlantı D1: Geniş huni D2: Dar huni D3: Kapalı huni (Optik disk görülemez)

SSG nun sınıflandırmasında, Retina Cemiyetinin sınıflandırmasındaki A ve B evreleri değişmemiş, C evresi geliştirilmiş ve D evresi ise kaldırılmıştır. SSG nun sınıflandırmasında, PVRnin anterior ve posterior tutulumuna göre ayrı ayrı sınıflandırılmış ve her form 3 tipe bölünmüştür. Posterior formun birinci tipinde; postekvatoryal retinada lokalize olarak fokal kontraksiyonlar görülür. Radyal düzenli katlanmalar ve PVR sahasına doğru traksiyon gelişir. Posterior formun ikinci tipinde, retinada düzensiz katlanmalar ile diffüz kontraksiyon görülür. Retina anteroposterior yönde büzüşür. Retinanın konveks yüzeyi çevresel yönde düzleşir. Ön retinada ora serrataya doğru pek çok radyal katlanmalar oluşur. Traksiyonlar vitreusun merkezine doğru retinaı çeker ve dekole retina optik disk üzerinde huni şeklinde daralır. Posterior formun üçüncü tipinde ise subretinal kontraksiyonlar vardır. Subretinal membranlar optik disk etrafında halka şeklinde daralmalara sebep olur.

Tablo 2: Silikon Çalışma Grubu'na göre PVR Sınıflandırması [82].

PVR Evresi	Yayılım (Saat kadranı 3-6-9-12)	Kontraksiyon tipi	Klinik Bulgu
Evre A			Vitreusta bulanıklık, pigment kümelenmeleri
Evre B			Retinada kırışıklıklar ve sertleşme, yırtık kenarında kıvrılma, retina damarlarında kıvrım artışı
ARKA (P)	P1 (1 kadran) P2 (2 kadran) P3 (3 kadran) P4 (4 kadran)	Fokal (Tip 1) Diffüz (Tip 2) Subretinal (Tip 3)	Yıldız şeklinde kıvrımlanma Çok sayıda katlanmalar, retinanın arkaya doğru çekilmesi Disk yakınında anüler lifler, güve yeniği görünümü
ÖN (A)	A1 (1 kadran) A2 (2 kadran) A3 (3 kadran) A4 (4 kadran)	Çevresel (Tip 4) Perpendiküler (Tip 5) Anterior (Tip 6)	Ön retinada düzensiz kıvrımlanmalar, vitreus tabanı ile birlikte retinanın merkeze çekilmesi Periferik retinanın vitreus tabanı boyunca öne çekilmesi, siliyer cismin çekilmesi, iris retraksiyonu

Anterior formun ilk tipinde, posterior formun üçüncü tipinde olduğu gibi subretinal membranlar vardır. Anterior formun ikinci tipi veya perpendiküler anterior PVR de (Retina Cemiyeti Sınıflandırmasında Tip 4 PVR) ise; vitreus tabanının hemen arkasında diffüz retinal büzüşmelerin oluşturduğu çevresel kontraksiyonlar vardır ve PVR sahasının arkasındaki retinada posterior hyaloidin yapışma yeri boyunca dik kontraksiyonlar oluşur. Bu koronal planda çevresel katlanma yapar. Anterior formun

üçüncü tipi veya anterior tip PVR (Retina Cemiyeti Sınıflandırmasında Tip 5 PVR); tipik olarak vitrektomili veya penetran yaralanma geçiren gözlerde oluşur ve anterior kontraksiyonlar mevcuttur. Posteriyor hyaloidin anteroposterior kontraksiyonu sebebiyle ön retina öne doğru çekilir . Ayrıca anterior ve posterior komponentleri içine alan mikst tipler de vardır. Retina Cemiyetinin 1991’ de yaptığı güncellemede ise anterior-posterior tanımları sınıflandırmaya eklenmiş ve kontraksiyon tipi tanımlanmıştır [Tablo 3] [83].

PVR nin anterior formunun tanımı, SSG nin en önemli katkısıdır. Çünkü anterior PVR nin prognozu ve tedavisi posterior PVR den farklıdır. Retina Cemiyeti ve SSG nin sınıflandırması esas olarak anatomiktir. PVR nin biyolojik aktivitesi hakkında veya PVR nin ilerlemesinde rol oynayan risk faktörleri hakkında bilgi vermez.

Tablo 3: Retina Cemiyetine göre PVR da kontraksiyon sınıflandırması (1991) [83].

Kontraksiyon Tipi	Yerleşim Yeri	Klinik Bulgu
Fokal	Posterior	Vitreus tabanında yıldız şeklinde katlantı
Diffüz	Posterior	Vitreus tabanının posteriorunda devam eden çok sayıda yıldız şeklinde katlantı
Subretinal	Posterior/Anterior	Subretinal proliferasyon, optik disk etrafında retinanın halka şeklinde kabarıklığı
Sirkumferensiyal	Anterior	Posterior vitreus boyunca retinanın kontraksiyonu ve santrale çekilmesi, periferik retinada gerginlik, posterior retinada düzensiz katlantılar
Anterior	Anterior	Proliferatif doku nedeniyle vitreus tabanının öne çekilmesi, siliyer cisimde gerginlik , siliyer cismin membranlarla örtülmesi, iris retraksiyonu

3.4. PVR'da Tedavi

3.4.1. PVR da Cerrahi Tedavi

Vitreus traksiyonu sonucu gelişen retina yırtığının yol açtığı retina dekolmanının ve PVR nin tedavisinde temel prensip traksiyonun ortadan kaldırılması ve normal retina anatomisinin tekrardan sağlanması ve retinal yırtığın kapatılmasıdır. Genelde hafif ve orta derecedeki PVR li olgularda yırtığın bulunup skleral çökertme ile kapatılmasıyla başarı sağlanabilir. Skleral çökertme yöntemi ile sklera PVR nedeniyle kısalmış ve kalınlaşmış olan retinaya yaklaştırılır ve retinal yırtık kapatılır.

Ciddi PVR li olgularda pars plana vitrektomi ve intraokuler tamponad yöntemlerinin kullanılması gerekir. Pars plana vitrektomide öncelikle vitreusun özellikle vitreus tabanının olabildiğince temizlenmesi önemlidir. Anatomik başarı için özellikle ön vitreusun temizliği de son derece önemlidir. Daha sonraki aşamada mevcut retinal traksiyonel kuvvetler ortadan kaldırılmalıdır. Bunun için öncelikle retina önü ve arkasındaki membranların temizlenmesi gerekmektedir. İleri PVR li olgularda ne kadar çaba sarf edilse de periferik retinadaki tüm traksiyonların rahatlatılması mümkün olmayabilir, skleral çökertme ile dokunun desteklenmesi gerekebilir. Bazı olgularda retina, parankim değişikliklerine bağlı yoğun bir kontraksiyon sonucu kısalmış ve kalınlaşmıştır. Bu durumda retinayı yatıştırmak için skleral çökertme yanısıra gevşetici retinotomi veya retinektomilere ihtiyaç duyulur. Retinotomi retinada delik açmak anlamına gelmektedir. Subretinal sıvının boşaltılması amacıyla veya retinanın yatıştırılmasına engel olan subretinal membranın temizlenmesi amacıyla retinotomi uygulanır. Retinektomi ise bir retina parçasının cerrahi olarak çıkartılması demektir. Traksiyonların giderilmesine engel olan yoğun şekilde fibrotik retina bölgelerinin varlığında, mümkün olduğunca periferden, sirkumferensiyel tarzda retinektomi yapılabilir. Genel prensip olarak retinotomi ve retinektomilerden olabildiğince kaçınılmalı ve diğer yöntemlerle retina yatıştırılmıyorsa bu yöntemlere başvurulmalıdır.

Retinadaki traksiyonel kuvvetler ortadan kaldırıldıktan sonra retinanın yatıştırılıp yırtık çevrelerine retinopeksi uygulanmasına sıra gelmektedir. Bu aşamada dekolle retinanın yatıştırılmasında değişik yöntemler kullanılabilir. Arka kutupta retinal yırtığı olan olgularda mevcut yırtıktan veya yırtık olmadığında optik disk üst nazalinden yapılacak retinotomiden uzun silikon uçlu kanülle girilerek hava sıvı değişimi yapılır

ve subretinal sıvı bu retinotomilerden aspire edilerek retina yatıştırılır. Daha sonra tespit edilen bütün yırtıkların çevresine retinopeksi yapılmalıdır. Retinopeksi genellikle lazer fotokoagulasyon (LFK) ile yırtık çevresine 2-3 sıra olacak şekilde uygulanır. Retinal traksiyonlar tamamen rahatlatıldıysa 2-3 sıra LFK koryoretinal yapışma için yeterli olacaktır. Aşırı LFK uygulanması postoperatif nüks PVR gelişimi açısından risklidir [84]. Sonraki aşamada intraokuler tamponadlar kullanılarak yırtık çevrelerinde kalıcı yapışıklık oluşana kadar retinanın yatışık kalması sağlanır. İntraokuler tamponad olarak genleşebilen uzun süreli gazlar veya silikon yağı kullanılır . Silikon yağı kullanımı ile başarılı anatomik sonuçlar elde etmek mümkündür.

PVR de cerrahi tedavi basamakları karmaşık ve güç olmasına rağmen son yıllardaki teknolojik gelişmelerle birlikte cerrahi başarı oranı artmıştır. Yine de yapılan çalışmalara göre anatomik başarı oranı %60-80, fonksiyonel başarı oranı ise %40-80 civarındadır [5]. Bir grup hastada ise nüksler görülmektedir. PVR gelişim sürecinin karmaşıklığı, cerrahi tedavi sonuçlarının yetersizliği göz önüne alındığında, PVR patogenezinin farklı aşamalarını hedef alan yardımcı farmakolojik ajanların profilaksi ve tedavide kullanımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla pek çok farklı molekül PVR tedavisi için çalışılmıştır.

3.4.2. PVR da Farmakolojik Tedavi

3.4.2.1 Antiinflamatuvar İlaçlar

Kortikosteroidler

PVR nin gelişim sürecinin başlangıcında, doku travması ve kan-retina bariyerinin bozulması ile ortaya çıkan inflamasyon süreci yer alır. Bu nedenle antiinflamatuvar ajanların tedavide kullanımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla denenilen ilk ajanlardan biri de kortikosteroidlerdir. Kortikosteroidler; TNF- α ve IL-1 ekspresyonunu ve T-lenfosit proliferasyonunu önleyerek antiinflamatuvar etkinlik gösterirler, ayrıca fibroblast büyümesini de inhibe ederler [85]. Buradan yola çıkarak intravitreal kortikosteroid uygulamalarının inflamasyonu ve hücre proliferasyonunu azaltarak PVR oluşumunu önleyebileceği yorumu yapılmıştır.

Yapılan hayvan modeli bir çalışmada intravitreal triamsinolon uygulamasının, PVR oranını %90'dan % 56'ya düşürdüğü bildirilmiştir [86]. Pars plana vitrektomi

cerrahisi sonunda intravitreal olarak uygulanan 10-20 mg kristalin kortikosteroidin etkinliğini inceleyen kontrollü bir klinik çalışmada kortikosteroid verilen grupta intraoküler inflamasyonun daha az olarak gözleendiği ve PVR tedavisinde potansiyel ek bir ilaç olabileceği belirtilmiştir [87]. Kortikosteroidlerle ilgili yapılan hayvan modelli çalışmalardaki belirgin başarıya rağmen klinik çalışmalarda aynı başarı saptanamamıştır.

3.4.2.2. Antiproliferatif İlaçlar

PVR gelişim sürecinde inflamasyon evresini takiben proliferasyon evresi gelir. Antineoplastik ilaçların hücre siklusunu ve proliferasyonu inhibe edici etkisi, PVR nin bu aşamasında etkili olabilme potansiyeline sahiptir. Bu amaçla 5-florourasil (5-FU), daunorubisin, taksol, kolşisin, retinoik asit, vinkristin, sisplatin, adriamisin, mitomisin gibi pek çok antiproliferatif ajan PVR tedavisi için çalışmalarda denenmiştir.

5-Florourasil (5-FU)

5-FU en çok test edilen antineoplastiklerden biridir. Bir antimetabolit olan 5-FU, bir pirimidin analogudur ve geri dönüşümsüz olarak timidilat sentetaz enzim inhibisyonu yolu ile DNA sentezini inhibe eder. Hücre siklusunun özellikle S fazında etkilidir. Özellikle hızlı proliferen olan hücreler üzerinde belirgin etki gösterir. Bununla birlikte geniş yan etki profili nedeniyle klinikte kullanımı sınırlıdır. Yüksek dozlarda 5-FU'nun kornea opasifikasyonu, fotoreseptör dış segment ve ribozom kaybı ve elektroretinografide b-dalga kaybı gibi yan etkileri mevcuttur [88]. Tavşan modelli bir çalışmada, intravitreal serbest 5-FU enjeksiyonu ile traksiyonel RD gelişme oranının %90'dan %55'e indiği gösterilmiştir [89]. İnsan çalışmalarında ciddi PVR li gözlerde vitrektomi ile kombine intraoküler ve perioküler 5-FU kullanımı, %60 oranında anatomik başarı (retina yatışıklığı) ile sonuçlanmıştır [90].

Daunorubisin

Bir antrasiklin türevi olan daunorubisin, hücre siklusundan bağımsız olarak DNA ve RNA sentezini inhibe eden topoizomeraz inhibitörüdür. RPE hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir [91]. PVR tedavisinde etki potansiyeli yüksek olmasına rağmen güvenli doz aralığı dardır. Tavşan modelli bir çalışmada, intravitreal 9 nmol daunomisin RD insidansını %50 azalttığı, ancak 30 nmol ve üzerindeki dozlarda retinal toksisitenin ortaya çıktığı ve hatta 9 nmol ile dahi fotoreseptör dış segmentlerinde değişiklikler olduğu görülmüştür [92]. Kontrollü, multisentrik,

randomize klinik bir çalışmada ise; ciddi PVR li 282 olguda, cerrahi ile birlikte adjuvan daunorubisin uygulanan tedavi grubunun %62.7' sinde, kontrol grubunun ise % 54.1' inde ilk operasyon sonunda anatomik başarı sağlandığı, istatistiksel olarak fark saptanmadığı bildirilmiştir. Olguların postoperatif görme keskinlikleri ve komplikasyonlar yönünden farklı olmadıkları, bununla beraber tedavinin reoperasyon sayılarını azaltmada etkili olduğu görülmüştür [93].

Taksol

PVR gelişiminde epiretinal membranların gelişimini takiben ortaya çıkan kontraksiyon, retina dekolmanının esas sebebidir. Taksol ve kolşisin gibi mikrotübül formasyonunu inhibe eden ajanlar bu aşamada etkili olabilir. Taksol hücre siklusunu G2 ve M fazlarında durdurarak replikasyon ve migrasyonu etkin bir biçimde önler ve fibroblast kontraksiyonunu inhibe eder. Çözünürlüğü düşük olduğu için silikon yağı içinde verilebilir. Deneysel PVR modellerinde traksiyonel RD nı azalttığı gösterilmiştir [94]. Yüksek dozlarda optik nöropatiye neden olabilir.

Mitomisin C

Mitomisin-C nin insan RPE hücre proliferasyonu üzerinde doza bağımlı bir antiproliferatif etkisi vardır. DNA'yı çapraz bağla alkilleyerek sentezini bozar. Hücre siklusunu S ve G2/M fazında durdurur. Daha yüksek dozlarda apoptotik hücre ölümünü indükler. Hayvan deneylerinde RPE hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir [95]. Tavşanlarda 1 mg dozunda toksik olmadığı gösterilmiştir, ancak hücre yaşayabilirliği üzerindeki belirgin etkileri nedeniyle retinal toksisitesinin yüksek olabileceği düşünülmektedir.

Retinoik asit

Retinoik asit, vitamin A'nın lipofilik bir türevi ve fotoreseptör yolunun bir metabolitidir. RPE hücre proliferasyonunu ve transformasyonunu önleyici etkisi vardır. Tavşan PVR modelinde silikon yağı içinde verilen all-transretinoik asidin (atRA) traksiyonel retina dekolmanı gelişim riskini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmada ise vitreoretinal cerrahi sonrası dört ay boyunca her gün 2x40 mg oral 13-cis-RA verilen hastalarda sadece cerrahi yapılanlara göre daha yüksek başarı bildirilmiştir [96].

3.4.2.3. Ekstraselüler Matriks Üretimini ve Kontraksiyonunu Önleyen Ajanlar

PVR gelişiminde proliferasyon evresinden sonra ESM üretimi ve kontraksiyon meydana gelir. ESM üretimi, kollajen, trombin, fibronektin, MMP ve tübüllere etki eden ajanlar; PVR tedavisinde potansiyel olarak araştırılmıştır

Kolşisin

Mikrotübül depolimerizasyonu ile hücrelerin migrasyonunu, kontraksiyonunu ve proliferasyonunu engelleyen bir ajandır. Tavşanlarda oral kolşisinin RD gelişimini %74'den %30'a düşürdüğü gözlenmiştir [97].

D-Penisilamin

Ekstraselüler alanda prokollajen molekülünün kollajene çapraz bağlanmasını inhibe eder. Metal zehirlenmelerinde şelatör olarak kullanılır. Deneysel travmatik PVR modelinde intaoküler inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [98].

Argatroban

Spesifik bir trombin inhibitörüdür. Tavşan modeli bir çalışmada vitrektomi ve lensektomi sonrası infüzyon ile ön kamara, pupil ve ön vitreusta postoperatif fibrin oluşumunu azalttığı gözlenmiştir [99].

Cis-Hidroksiprolin (C-HP)

Cis-hidroksiprolin (C-HP) bir prolin analogu olup prokollajen yapımını inhibe eder. C-HP nin in vitro RPE proliferasyonunu, kollajen sentezini ve migrasyonu önlediği gösterilmiştir [100].

Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin (DMAH)

RD cerrahisi sonrası kan-retina bariyerinin yıkılması sonucu fibrin oluşumu meydana gelmektedir. Fibrin ise PVR deki epiretinal membranlar için iskelet görevi görür. Düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH), hücre migrasyonu ve proliferasyonu için stimulan etkisi olan fibrin formasyonunu önler. Ayrıca büyüme faktörlerine bağlanarak skleral fibroblastların ve RPE hücrelerinin proliferasyonunu önler. İntravitreal heparin infüzyonu ile postoperatif fibrin oluşumu önlenilmekte, ancak intraoperatif hemoraji insidansı artmaktadır [101]. İnsanlarda yapılan bir çalışmada 5-FU ile DMAH kombine edildiğinde kontrol grubuna göre postoperatif PVR insidansının azaldığı gösterilmiştir [102].

Prinomastat (Ag3340)

Prinomastat (Ag3340) matriks metalloproteinazlardan MMP-2 ve MMP-9 u selektif olarak inhibe eder ve RPE aracılı kollajen jel kontraksiyonunu bloke eder. Deneysel PVR modellerinde PVR yi engelleyici etkisi olduğu gösterilmiştir [103].

3.4.2.4. Büyüme Faktörü ve Sitokin İnhibitörleri

Büyüme faktörlerinin inhibisyonu ile fizyolojik yara iyileşmesi süreci korunurken, anormal hücresel proliferasyon selektif olarak inhibe edilebilir. PDGF, TGF- β , TNF- α , IGF-1 gibi büyüme faktörü ve sitokinleri inhibe eden ajanlar; PVR tedavisi için önemli birer potansiyel olarak araştırılmıştır.

İnfliximab

İnfliksımab, TNF- α yı hedef alan spesifik bir IgG1k monoklonal antikorudur. Ortalama molekül ağırlığı 149100 daltondur. TNF- α nın hem çözülebilir hem de transmembranöz formlarına yüksek affinite ile bağlanır, böylece reseptörlerinin TNF- α ya bağlanmasını inhibe ederek etkisini nötralize eder. İlaveten infliksımabın kompleman fiksasyonu ya da antikor bağımlı sitotoksitate yoluyla, TNF- α üreten hücrelerin lizisine neden olduğu in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. TNF- α blokajı nedeniyle IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeyini azaltır, endotelial hücre geçirgenliğini inhibe ederek lökosit göçünü önler, lökosit ve endotelial hücrelerden adezyon moleküllerinin sentezini inhibe eder ve nötrofil ile eozinofil aktivasyonunu engeller. Fibroblast, endotel hücreleri, nötrofiller, T ve B lenfositler ve epitelyal hücrelerin bioaktivitesini inhibe eder [104].

İnfliksımab, FDA tarafından ankilozan spondilit, Crohn hastalığı, çocukluk çağı Crohn hastalığı, psöriazis, psöriatik artrit, romatoid artrit (RA) ve ülseratif kolit için endikasyon onayı almış bulunmaktadır. Tedaviye refrakter üveitte, Behçet hastalığı ile ilgili panüveitlerde, RA, psöriazisde, sistemik vaskülitlerde, sarkoidozda ve Crohn hastalığında intravenöz infüzyon şeklinde kullanılır. TNF- α inhibisyonu farelerde iskemik retinopatide neovaskülarizasyonu azaltır [105]. Anti-VEGF ilaçlara cevapsız neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonunda tekrarlayan intravitreal infliksımab enjeksiyonu ile hastalarda düzelme görülmüştür [106].

Belirgin antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkileri olması sebebiyle PVR tedavisinde de kullanımının söz konusu olabileceği düşünülen infliximab, deneysel bir PVR modelinde denenmiş ve PVR yi önlemede etkili olduğu görülmüştür [107].

Oktreotid

Somatostatinin sentetik bir analogudur. Oktapeptid yapısındadır. Doğal hormona göre etki süresi daha uzun ve potansiyel etkisi daha yüksektir. Somatostatin ise büyüme hormonu ve IGF-1 in doğal inhibitörüdür. Oktreotid, büyüme hormonu sekresyonunun inhibisyonunda somatostatinden 20 kez daha güçlüdür ve akromegalinin tedavisindeki kullanımı iyi bilinmektedir. Oktreotid ayrıca T hücre proliferasyonunu azaltarak mitozu inhibe etmekte ve immun sistemi baskılamaktadır. Somatostatinin lokal veya sistemik olarak uygulanmasında doku proliferasyonunu, migrasyonunu, fibrozisi, yeni damar oluşumunu ve yara iyileşmesini engellediği bildirilmiştir; antiproliferatif etkisi in vitro ve in vivo koşullarda pek çok çalışma ile gösterilmiştir [108-110]. PVR etiopatogenezinde de bahsedildiği gibi kabaca anormal bir yara iyileşmesi süreci olarak kabul edilirse lokal olarak uygulanan (intravitreal) oktreotidin bu süreçte olumlu etkisi olabileceği düşünülmüş ve deneysel PVR modelinde etkileri incelenmiş, PVR nin tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir [107].

Aflibercept

Aflibercept, VEGF reseptör 1 ve 2 nin antijen bağlayan kısımlarıyla, IgG' nin Fc parçalarının birleştirilmesiyle oluşturulmuş çözünebilir bir humanize füzyon proteindir. Son yıllarda, VEGF yi bloke etmek için intravitreal farmakoterapi kullanımı yaygınlaşmış ve neovasküler yaşa bağlı makuler dejenerasyonu (YBMD), diyabetik makula ödemi (DMÖ) ve retinal ven tıkanıklığına (RVO) bağlı makuler ödemi olan hastalarda görsel sonuçlara önemli ölçüde fayda sağlanmıştır [111-113]. Bu retinal hastalıklar, artmış intraoküler VEGF düzeyleri ve makuler ödem gelişimi ile karakterize olup, merkezi ve keskin görme işlev bozukluğu ile sonuçlanır. VEGF aynı zamanda bu koşullarda neovaskülarizasyon gelişimine aracılık eder ve ciddi irreversible görme kaybına yol açabilir. Bu bozuklukları olan hastaların vitreus boşluğuna bir antiVEGF ajanı verilmesi intraoküler VEGF yi düşürür, yeni damar oluşumunu ve vasküler kaçığı azaltır. Pigmente tavşanlara intravitreal RPE ve fibroblast uygulayarak oluşturulan deneysel PVR modelinde afliberceptin etkisi

incelenmiş, aflibercept uygulanan grupta retina katlarının yapısının korunduğu ve ERGde sonuçların anlamlı olarak bozulmadığı görülmüştür [114].

3.4.2.5. Gen Tedavileri

Yapılan bir çalışmada insan RPE hücreleri herpes simpleks virüs-timidin kinaz (HSV-tk) geni ile transdüksiyona uğratılmış ve ardından gansiklovir tedavisi uygulanmıştır. Gansiklovir HSV-tk geni taşıyan hücreleri doz ve zamana bağlı olarak öldürmüştür. Bu çalışma gen tedavisinin PVR de uygulanabilirliğini göstermesi açısından önemlidir [115].

Ikuno ve Kazlauskas; PVR patogenezinde rol alan PDGF reseptörünün (PDGFR), α PDGFR olduğunu ve dominant negatif PDGFR geninin retroviral yolla verilmesinin kollajen jel kontraksiyonunu ve retina dekolmanını azalttığını göstermişlerdir [116].

TGF- β sinyal yolunda rol alan proteinlerin gen tedavileri yoluyla inhibisyonu çalışılmıştır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada bu sinyal yolunun aktif proteinlerinden biri olan SMAD 3 geninin baskılanması ile PVR nin hafiflediği gösterilmiştir [156].

4.METFORMİN

Günümüzde tip 2 diyabetes mellitus (DM) tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir oral antidiyabetik olan metformin (N,N-dimetilimidodikarbonimidik diamid - IUPAC), nitrilon sınıfına ait olan bir N'-dimetilbiguaniddir. Galega officinalis (keçi sedefi, Fransız leylağı) bitkisinden elde edilmiştir. Bu bitkinin özütü ortaçağda poliüri tedavisinde kullanılmıştır. Metformin, tip 2 diyabet hastaları için çok yaygın kullanılan bir ajandır ve 1970' lerde Avrupa'da, 1995' te ise ABD' de onaylanmıştır. Polikistik over sendromu, metabolik sendrom yönetimi ve yüksek riskli popülasyonlarda diyabetin önlenmesi gibi çok çeşitli endikasyonlara sahiptir. Molekül, 'N',N'-dimetilguanidin'' sentezinin Werner ve Bell tarafından üretildiği bir ürün olarak tanımlanmıştır [117].

Metforminin primer etkisi; neoglukojenez inhibisyonu, periferik dokularda insülin direncinin azaltılması ve daha sonra iskelet kası içindeki artmış glikoz alımıdır. Hücrel stres sırasında neoglukojenezi inhibe edebilen AMP-aktifleştirilmiş protein kinazın (AMPK) aktivasyonu ile etkilerini gösterir.

Metforminin diyabetes mellitustaki etkilerinden bağımsız olarak, son zamanlarda onkolojideki terapötik özellikleri dikkat çekmiştir. Farmakolojik etkilerinin yeniden değerlendirilmesi, sinyal yollarının ve daha yeni klinik çalışmaların tanımlanmasıyla desteklenmiştir [118-122]. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma, diyabet hastalarında çeşitli kanser türleri ve kanser ölümleri riskinin arttığını göstermiştir. Kanser ve tip 2 diyabet arasındaki karmaşık ilişkinin araştırılması ve son gözlemler sonucunda metforminin kanser hücreleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu, ancak diğer anti-diyabetik ajanların böyle bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Evans ve arkadaşları, diğer diyabet ilaçları yerine metformin ile tedavi edilen tip 2 diyabet hastalarında birçok kanser için daha düşük bir risk olduğunu göstermiştir [123].

Kanser insidansı ve diyabet ile ilgili önceki epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra yeni sonuçlar; metforminin, metformin ile tedavi edilen hastalarda, kanser risklerini azaltabileceği ve kemoterapinin etkinliğini arttırdığı sonucuna varmıştır.

Jiralerspong ve arkadaşları, erken evre meme kanseri hastalarının neoadjuvan kemoterapi ve metformin aldığıında, metformin almayan gruba göre daha yüksek bir patolojik tam yanıt oranı gösterdiğini bildirmiştir [124]. Neoadjuvan meme kanseri tedavisindeki sonuçlar, metforminin klasik kemoterapiyi güçlendirebileceğini göstermiştir [125]. Tüm bu veriler bir antikanser ajanı olarak metforminin klinik gelişimini kuvvetle destekler. Halen devam etmekte olan çok sayıda klinik çalışma vardır.

Bu çalışmalar ışığında metforminin etki ettiği sinyal yolları ve kanser hücreleri üzerindeki potansiyel mekanizmaları incelendiğinde, metforminin kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılımındaki birkaç aşamayı birden bloke ettiği görülmüştür. Rapor edilen mekanizmalar; ilacın hücre büyümesi, hücre döngüsü, mTOR yolu, kan insülin seviyesi ve son olarak kanser hücrelerinin proliferasyon ve invazyonu için önemli bir anahtar olan epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMD) üzerindeki etkilerini içerir.

Metforminin kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırılırken ortaya konan en önemli mekanizmalardan birisi EMD üzerine olan etkisidir. EMD; epitel hücrelerinin normalde sahip oldukları epitelyal fenotipi kaybederek, mezenkimal hücrelere dönüşmesidir [11-13]. Mezenkimal hücrelere benzeşen hücrelerin adezyon, göç etme, proliferasyon ve invazyonunda artış görülür. EMD süreci, kanser hücrelerinin çoğalması ve yayılımında ve birçok doku ve organdaki fibrozis sürecinin gelişiminde rol oynamaktadır. Aynı zamanda PVR patogeneziindeki en önemli basamaklardan biridir.

TGF- β ; kanser, organ fibrozisi, kardiovasküler hastalıklar gibi pek çok patolojide önemli rol oynayan bir sitokindir. Aynı zamanda EMD sürecindeki en önemli mediyatörlerden biridir. Yapılan çalışmalarda metforminin TGF- β sinyal yolu üzerinden EMD ve fibrozisi inhibe edici etkisi; meme, uterus, prostat, böbrek, karaciğer ve kalp gibi dokularda gösterilmiştir [126-131]. Ancak metforminin RPE dokusu ve PVR süreci üzerine olan etkileri daha önce çalışılmamıştır.

5.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı' nda 01.06.2019 - 01-09.2019 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın temel yapısı, RPE kültür hücreleri üzerine uygulanan TGF- β 2 ile EMD sürecinin indüklenmesi ve metforminin bu süreçteki fibrogenezisi önleyici etkisinin biyokimyasal testlerle değerlendirilmesidir.

Çalışmada invitro RPE hücre kültür plakları (ARPE-19) üzerine; TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin kombinasyonu farklı dozlarda uygulanmıştır. Uygulama sonrası; hücre popülasyonlarının hücre canlılığı, Western blot analizi ile protein ekspresyon düzeyi, hücresel migrasyon düzeyi ve kollajen jel kontraksiyon testi ile kontraksiyon düzeyi değerlendirilerek sonuçlar gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

5.1.Hücre Kültürü Çalışmaları

Laboratuvarda kullanılacak Göz Retina Pigment Epitel Hücre Hattı (ARPE-19) ticari olarak kültür bankalarından temin edildi ve prospektüslerinde belirtilen özel besiyerinde [(DMEM)F12 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% Penisilin/Streptomisin] 37°C' de %5 CO₂ ve % 95 hava bulunan inkübatörde çoğaltıldı. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar akım steril ortamda gerçekleşti. Hücreler temin edildikten sonra 37°C'de 1 dakika içinde eritilip, laminar akımda hazırlanan özel besiyeri ile karıştırılıp, steril falkonda 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Dipteki kalan pellet pipetaj yapılarak içinde önceden hazırlanan özel besiyeri olan 25 cm² hücre kültürü flaskına ekildi. Hücreler bu flaskta konflue olduktan sonra besiyeri ortamdan alındı ve dPBS ile yıkandı. Hücrelerin üstüne 0,5 mL Tripsin-EDTA çözeltisi (0,25%) eklendi ve Tripsin-EDTA'nın iyi etki edebilmesi için hücreler kalkıncaya kadar inkübatörde 2-5 dakika arası inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için flaskın içine hazırlanan 5 ml özel besiyeri eklendi ve oluşan

hücre süspansiyonu 15 ml steril falkon tüplere aktarılıp 800xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelleti 2 ml taze besiyeri eklendi ve steril pipetle süspansiyon haline getirilip, daha önceden inkübatörde bulunan içinde besiyeri olan 75 cm² hücre kültürü flaskına eklendi. Hücre pasajlama sirkülasyonuna bu şekilde devam edilip çoğaltılan hücreler birkaç kere pasajlanıp, hücre sayımı yapıldıktan sonra *cryopreservation* ile -80°C ve azot tankında stok yapıldı.

5.2.Hücre Sayımı ve Ekimi

Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan alınan 10 µL hücre, 10 µL tripan mavisi solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışımın 10 µL' si Thoma lamına pipetlenerek hücreler mikroskop altında sayıldı ve hücre sayısı belirlendi. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 ml lik falkon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu hazırlandı. Hücre canlılığı için 96lık beyaz kuyulara kuyu başı $1,5 \times 10^4$ hücre/100 µL, protein ekspresyon çalışmaları için 6'lık *well*'lere kuyu başı 5×10^4 hücre/2 mL ekim yapıldı. Platelardaki hücrelere 5 ng/mL, 10 ng/mL ve 20 ng/mL TGF-β₂; 5mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 60 mM metformin ve bu dozların kombinasyonları şeklinde TGF-β₂+metformin eklenmesinden sonra 37°C' de inkübe edildi.

5.3.Hücre Canlılık Testi (Viabilite Testi, ATP Testi)

Metformin, TGF-β₂ ve TGF-β₂ + metformin kombinasyonlarının; farklı konsantrasyonlarına karşı 24 saatte hücre üstündeki canlılığa etkisini tespit etmek için luminometrik ATP testi (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay) ile Thermo Varioskan Multireader'da canlılık ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu olarak %0,1 olacak şekilde DMSO kullanıldı.

5.4. Alfa-SMA, Vimentin, ZO-1, Smad2 ve Smad3 proteinlerinin Western Blot ile Ekspresyon Analizi

EMD sürecinin incelenmesinde epitelyal belirteç olan ZO-1, mezenkimal belirteç olan α-SMA ve vimentin proteinlerinin ekspresyonları; TGF-β'nin ana sinyal yolunu oluşturan SMAD2, SMAD3 proteinlerinin ve bunların fosforile ve aktive olmuş

formlarının (pSMAD2 ve fosforile pSMAD3) ekspresyonları Western Blot analizi değerlendirildi.

6'lık hücre kültürü *well*'lerindeki ARPE-19 hücrelerine TGF- β 2 ve Metformin ile uygulama yaptıktan 24 saat sonra Tripsin-EDTA ile kaldırılıp +4°C'de 1000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dPBS ile süspanse edilip 1000xg'de 5 dakika 3 kere yıkama yapıldı. Süpernatant alındıktan sonra pellete RIPA tamponu eklenerek hücre vortekslenip 10.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantlar (hücre lizatları) ayrı bir ependorfa alınıp Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı [134]. Hücre lizatları için 80 μ g içeren homojenatlar 1 mM Tris-HCl, % 40 gliserol, % 8 SDS, % 20 2- β -merkaptoetanol, % 0.03 bromfenol mavisi içeren jel yükleme tamponu ile 1:4 oranında sulandırıldı ve 95°C'de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Sonrasında ise % 5 yükleme jeline (1 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0,05 (w/v) APS ve % 0,05 (w/v) TEMED eklenerek pH 6.8'de hazırlandı) ve %12 ayırma (1.5 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0.05 (w/v) APS, % 0.05 (w/v) TEMED) yüklendi. Elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Bio-Rad, Mini-PROTEAN 3 Cell, Hercules, Kaliforniya, ABD). Protein standardı olarak Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, Hercules, Kaliforniya, ABD) kullanıldı. Ayrıştırılan proteinler, *immunoblotting* ile ortam sıcaklığında 100 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol içeren, pH 8.3'lük transfer tamponunda 2 saat sürede 0.2 μ m kalınlıktaki PVDF membrana aktarıldı. Daha sonra membran ponceau S boyası ile muamele edilip proteinlerin transfer edildiği kontrol edildi, membran antikorlar ile muamele edilene kadar PBS içerisinde +4°C'de bırakıldı. Antikor ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile spesifik α -SMA, Vimentin, ZO-1, Smad2 ve Smad3 primer antikorlar ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların PBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında sulandırılmış horseradish peroksidaz (HRP) işaretli sekonder antikor (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, ABD) ile 1 saat inkübe edildi ve yıkandıktan sonra *kemiluminesans* kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, ABD) *kemiluminesans* bir reaksiyon gerçekleştirildi ve oluşan ışımaya membrana geçirilerek bantların görünmesi sağlandı.

Bant yoğunlukları Vilber Lourmat Görüntüleme cihazı (Collégien, Fransa) kullanılarak saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu Vilber Lourmat'ın görüntüleme programı ile eşit büyüklükte alanlarda ölçüldü [135].

5.5. Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi

Hücre migrasyonunun değerlendirilmesi için yara iyileşmesi deneyi yapıldı. RPE kültür hücreleri kültür plakalarına kaplandı. Tek sıra halindeki hücre tabakaları üzerine 200 µL lik pipet ucuyla birer çizik oluşturuldu. Daha sonra plakalar TGF-β2, metformin ve TGF-β2+metformin ile inkübe edildi. Hücrelerin oluşturulan çizik alanını geçme ve kapatma yetenekleri gözlenerek belirli sürelerde ışık mikroskobu ile değerlendirildi ve fotoğraflandı. Sonuçlar göç eden hücrelerin bulunduğu alan olarak ölçüldü ve değerlendirildi.

5.6. Kollajen Matriks Kontraksiyon Testi

Kollajen matriks kontraksiyon testi ile TGF-β2, metformin ve kombine grubu içeren RPE hücrelerinin kontraksiyon düzeyinin ölçümü amaçlandı. Tip I kollajen (Sigma-Aldrich) steril damıtılmış su içinde %0.1 asetik asit ortamında eritildi, 4°C' de saklandı. Hücre kültürü plakaları, spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için gece boyunca % 2 FBS ile önceden inkübe edildi. ARPE-19 hücreleri, DMEM-F12 içerisinde yeniden süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 5.0 mL 3 mg/mL tip I kollajen ve glutamin, antibiyotikler (100 U / mL penisilin ve 100 mg / mL streptomisin) ve 391 µL 1 mM NaOH içeren 3.0 mL konsantre edilmiş serumsuz minimal esansiyel ortam ile karıştırıldı. Hücre-kollajen karışımı 24 oyuklu plakaya (oyuk başına 350 uL) aktarıldı ve polimerizasyonu sağlamak için 37 ° C'de 1 saat inkübe edildi. Kollajen jel, 1.5 saat sonra oyukların dibinden ayrıldı ve matrisler, %10 FBS içeren 1 mL DMEM-F12 içerisinde yüzdürüldü. 24 saat sonra medium çıkarıldı ve jeller, serumsuz DMEM-F12 ile yıkandı, DMEM-F12 içinde 3 gün daha 37°C' de inkübe edildi. Ortamlarda her geçen gün kontraksiyon artarak değişiklik meydana geldi. Bazal kontraksiyonu hesaplamak için RPE hücreleri olmayan kollajen jelleri kullanıldı. Her matrisin yüzey alanı, 3 günde bir dijital kamera ile gözlemlendi, kaydedildi ve ölçüldü.

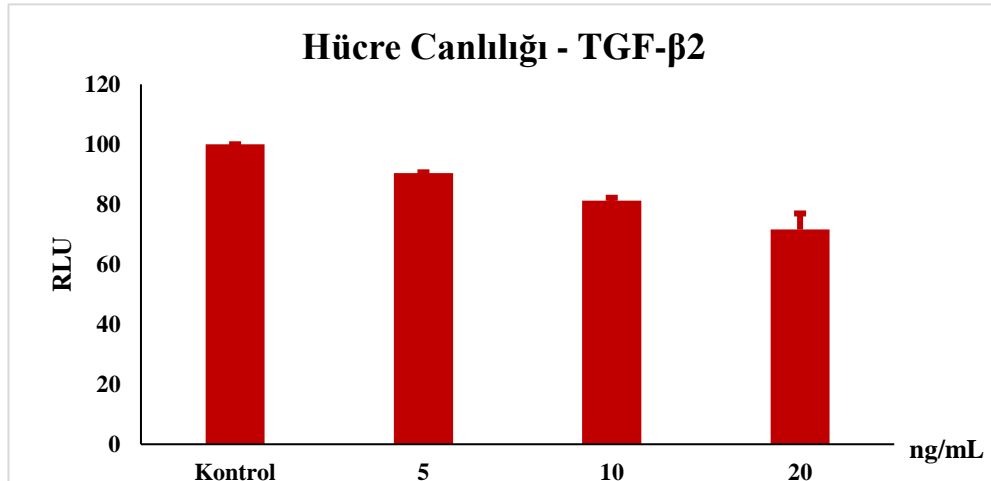
5.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

Deneyle sonucunda toplanan veriler Excel (Microsoft Office 2013) programına kaydedildi. İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Science) (SPSS Inc. Chicago, IL, USA, v.20.0) paket programı ile yapıldı. Değişkenler ortalama \pm standart sapma şeklinde belirlendi. Tüm deneylerdeki veriler istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Metforminin IC50 değeri tüm hücre hatlarında lineer olmayan regresyon analizi ile hesaplandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

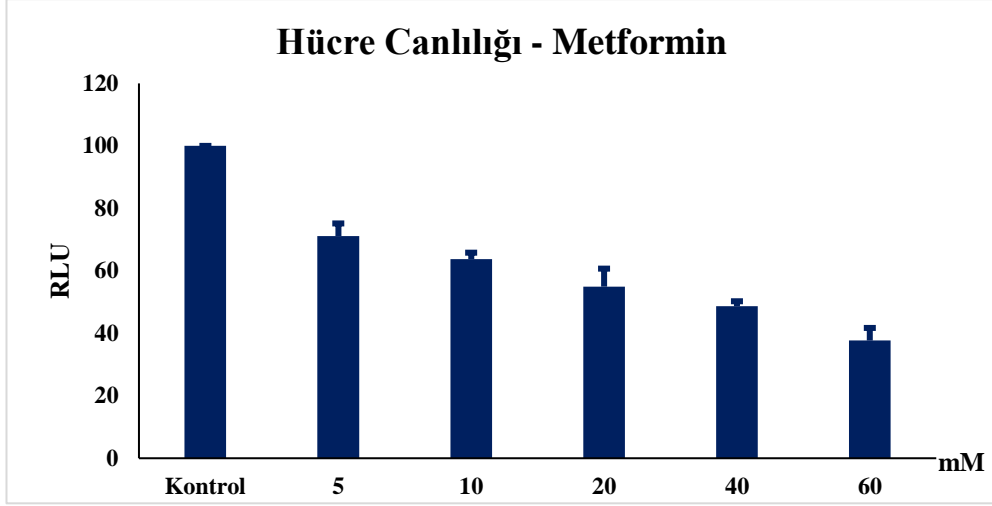
6.BULGULAR

6.1.Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

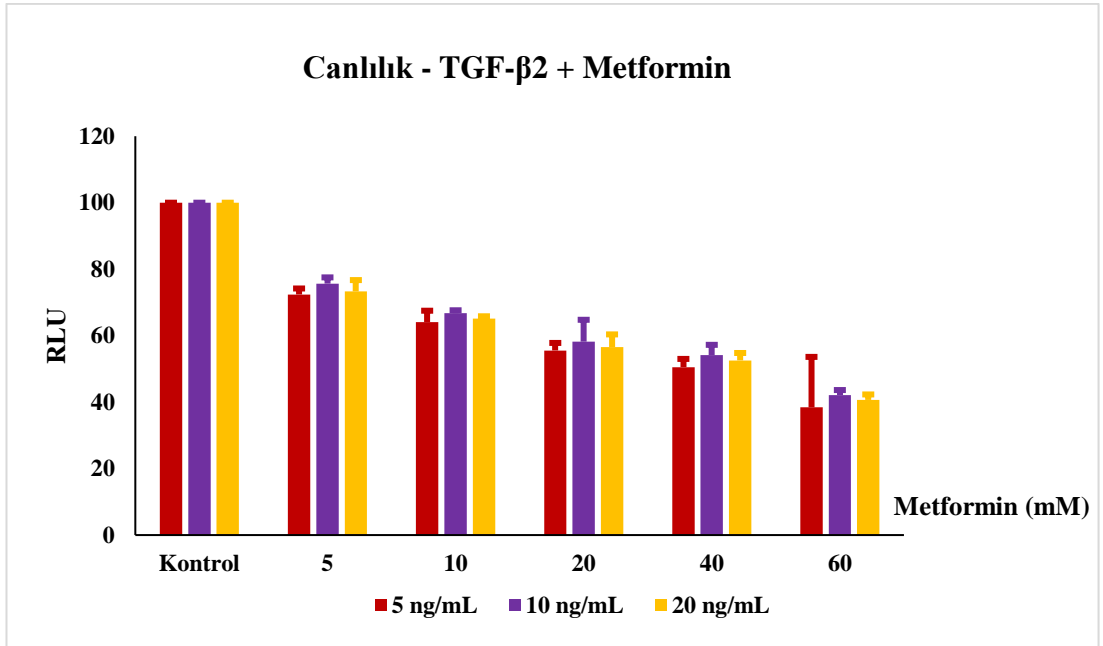
24 saat süreyle farklı dozlarda TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin uygulanan ARPE-19 hücre gruplarının canlılığını değerlendirmek üzere yapılan luminometrik ATP testi sonuçları; sırasıyla Şekil 9, Şekil 10 ve Şekil 11 de gösterilmiştir. Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon değeri, diğer ifadeyle IC 50 dozu; TGF- β 2 için 10 ng/mL, metformin için 10 mM olarak belirlendi ve diğer deneylere bu konsantrasyonlar ile devam edildi.



Şekil 9:Farklı konsantrasyonlarda TGF- β 2'nin hücre canlılığına etkisi



Şekil 10: Farklı konsantrasyonlarda Metforminin hücre canlılığına etkisi



Şekil 11: Farklı konsantrasyonlarda TGF- β 2+metformin kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi

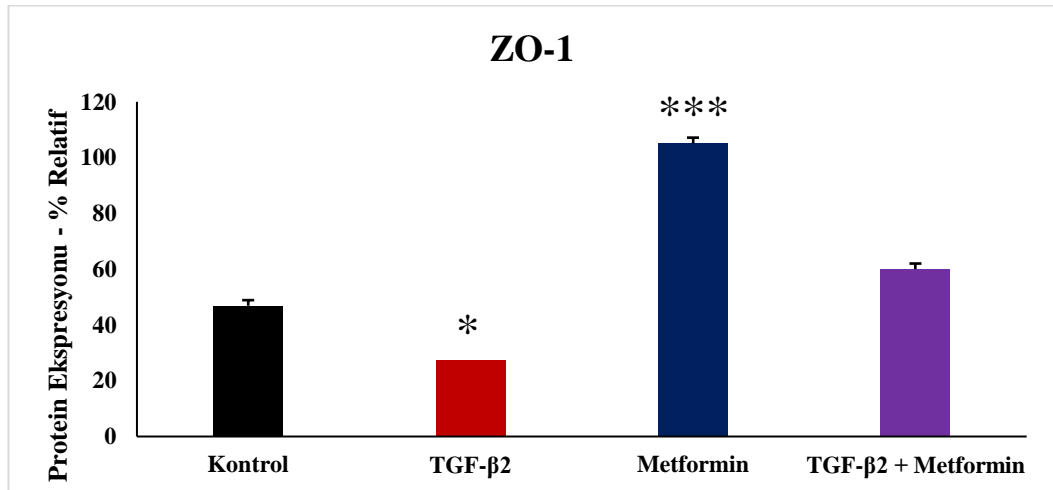
6.2. Western Blot ile Hücre İçi Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

6.2.1. ZO-1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Epitelyal belirteç olan ZO-1 proteininin ekspresyonunu incelemek için yapılan Western blot sonuçlarına Tablo 4 te gösterilmiştir. TGF- β 2 grubunda ZO-1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), metformin grubunda ise yüksek düzeyde anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0.001$). TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ZO-1 düzeyinde artış olduğu görüldü [Şekil 12].

Tablo 4: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda ZO-1 protein ekspresyonu sonuçları

ZO-1		
	Alan	P*
Kontrol	47	
TGF- β 2	32	$p < 0.05$
Metformin	105	$p < 0.001$
TGF- β 2 + Metformin	60	



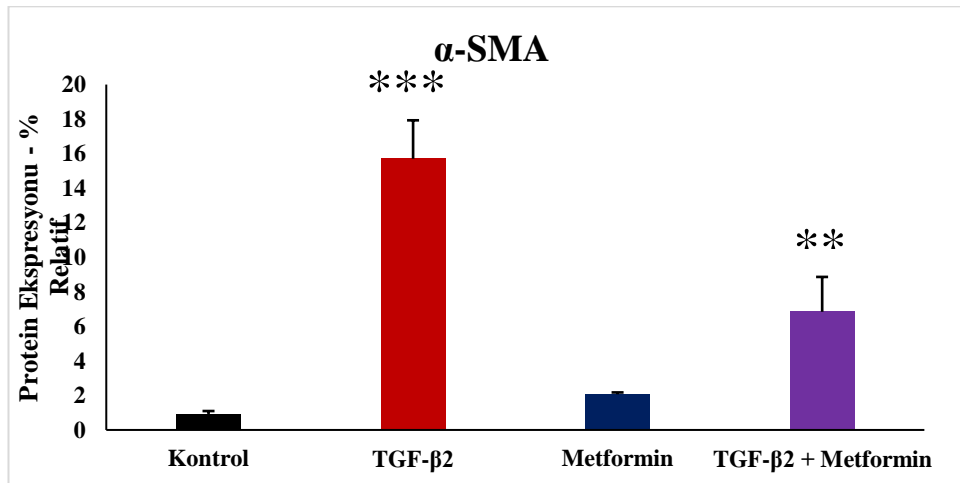
Şekil 12: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda ZO-1 protein ekspresyonu sonuçları ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$)

6.2.2. α -SMA ve Vimentin Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Mezenkimal belirteçler olan α -SMA ve vimentinin Western blot ekspresyon sonuçları Tablo 5 te gösterilmiştir. TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna kıyasla artmış α -SMA ekspresyonu olduğu görüldü ($p < 0.001$). Metformin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış α -SMA ekspresyonu olmakla birlikte ($p < 0.01$), TGF- β 2 grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu görüldü [Şekil 13].

Tablo 5: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda α -SMA protein ekspresyonu sonuçları

α -SMA		
	Alan	P*
Kontrol	1	
TGF- β 2	16	$p < 0.001$
Metformin	2	
TGF- β 2 + Metformin	7	$p < 0.01$

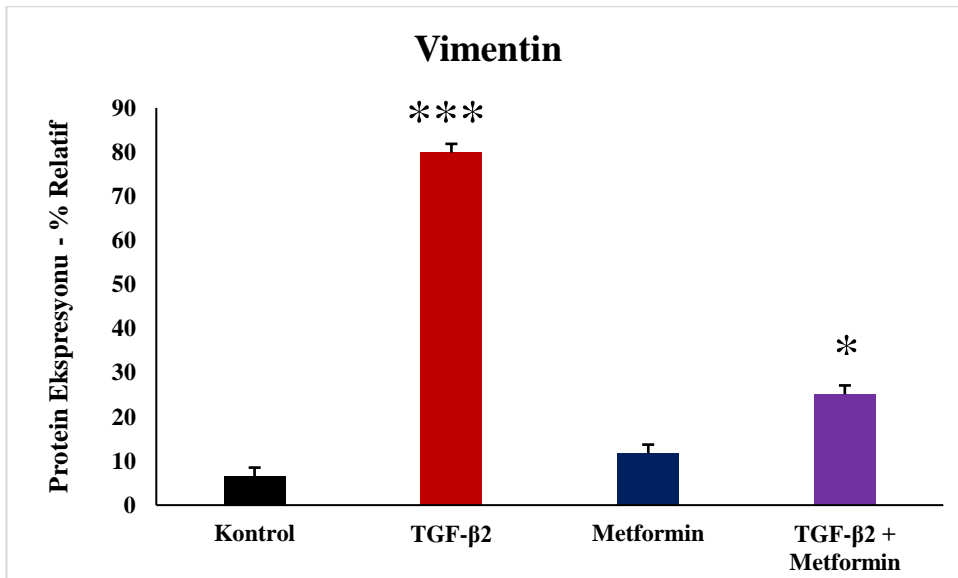


Şekil 13: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda α -SMA protein ekspresyonu sonuçları ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$)

Vimentin ekspresyonu sonuçları Tablo 6 da gösterilmiştir. Vimentin ekspresyonunun TGF- β 2 grubunda yüksek düzeyde anlamlı olarak artmış olduğu, metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı fark olmadığı saptandı. TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış vimentin ekspresyonu olmakla birlikte ($p<0.05$), TGF- β 2 grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu görüldü [Şekil 14].

Tablo 6: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda vimentin protein ekspresyonu sonuçları

Vimentin		
	Alan	P*
Kontrol	7	
TGF-β2	80	p<0.001
Metformin	12	
TGF-β2 + Metformin	25	p<0.05



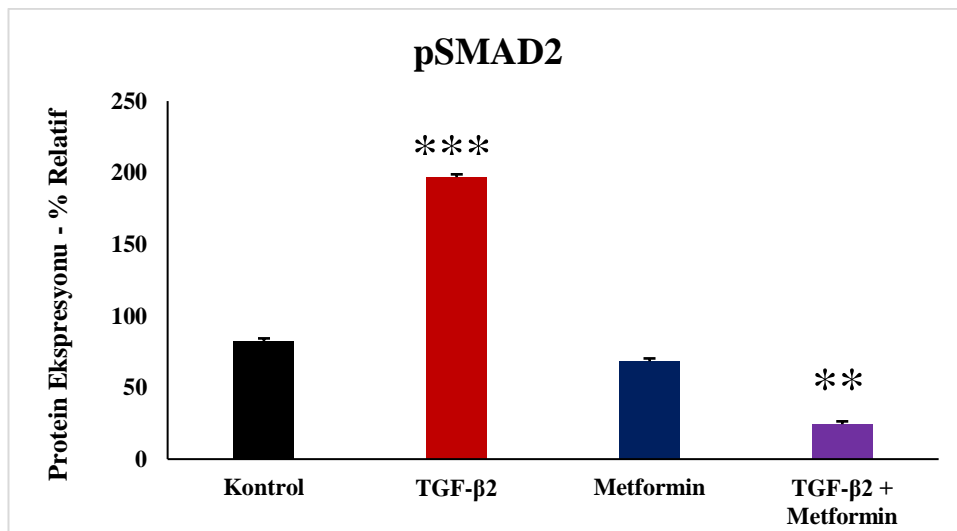
Şekil 14: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda vimentin protein ekspresyonu sonuçları ($p^*<0.05$, $p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$)

6.2.3. SMAD2, SMAD3, pSMAD2 ve pSMAD3 Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

SMAD2 ekspresyonunun, TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı, ancak metformin grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlemlenmedi. Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda SMAD2 nin TGF- β 2 tarafından fosforile edilerek aktive olmuş formu olan pSMAD2 nin ekspresyon düzeyi sonuçları Tablo 7 de gösterilmiştir. pSMAD2 ekspresyonunun TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü ($p < 0.05$) [Şekil 15].

Tablo 7: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD2 protein ekspresyonu sonuçları

pSMAD2		
	Alan	P*
Kontrol	82	
TGF- β 2	197	$p < 0.001$
Metformin	68	
TGF- β 2 + Metformin	24	$p < 0.01$

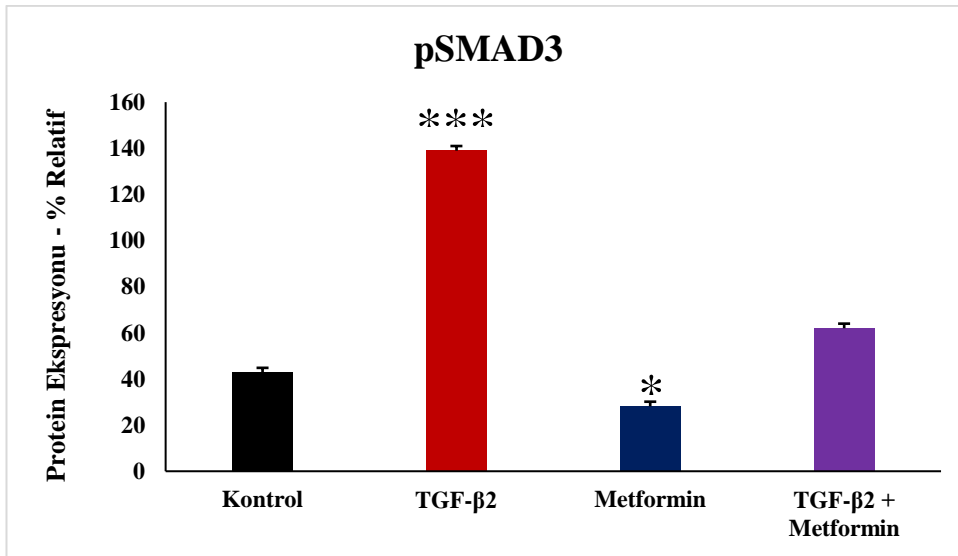


Şekil 15: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD2 protein ekspresyonu sonuçları ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$)

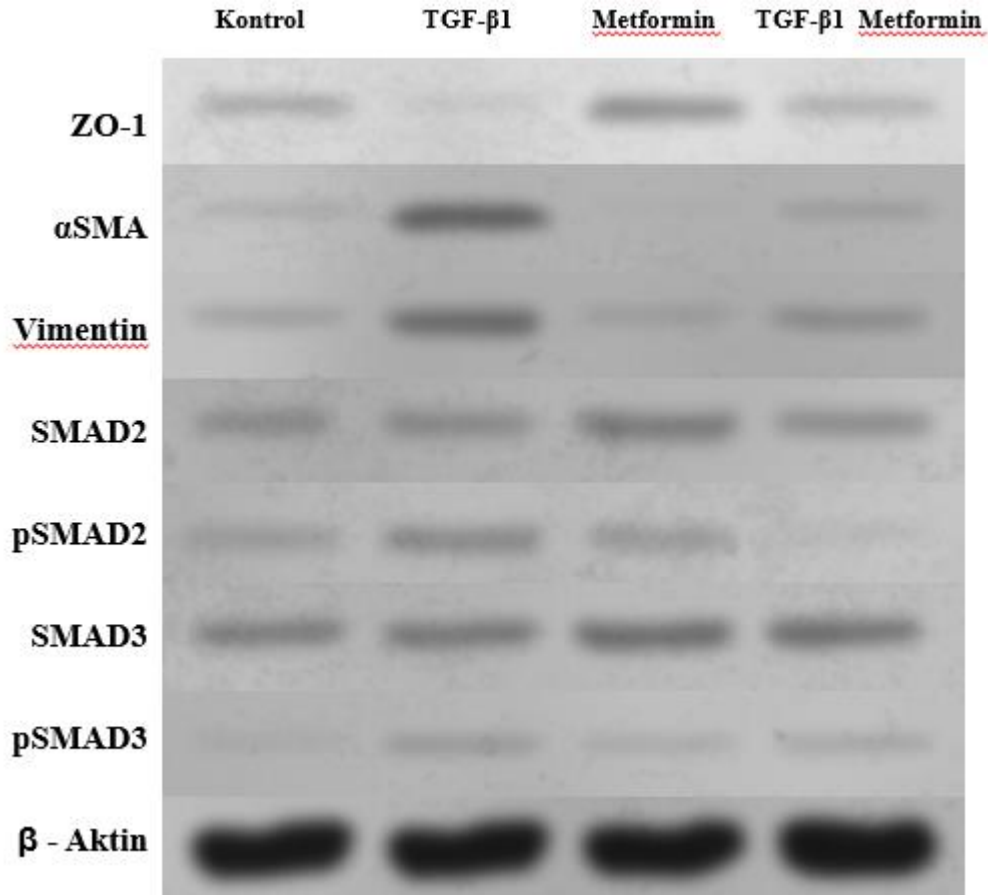
SMAD3 ekspresyonunun, TGF- β 2 grubunda ve metformin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$). TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmedi. SMAD3 ün aktif formu olan pSMAD3 ün ekspresyon düzeyi sonuçları Tablo 8 de gösterilmiştir. pSMAD3 ekspresyonunun TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.001$), metformin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmese de TGF- β 2 grubundan daha düşük düzeyde pSMAD3 ekspresyonu olduğu görüldü [Şekil 16]

Tablo 8: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD3 protein ekspresyonu sonuçları

pSMAD3		
	Alan	P*
Kontrol	43	
TGF-β2	139	$p<0.001$
Metformin	28	$p<0.05$
TGF-β2 + Metformin	62	



Şekil 16: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda pSMAD3 protein ekspresyonu sonuçları ($p^*<0.05$, $p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$)



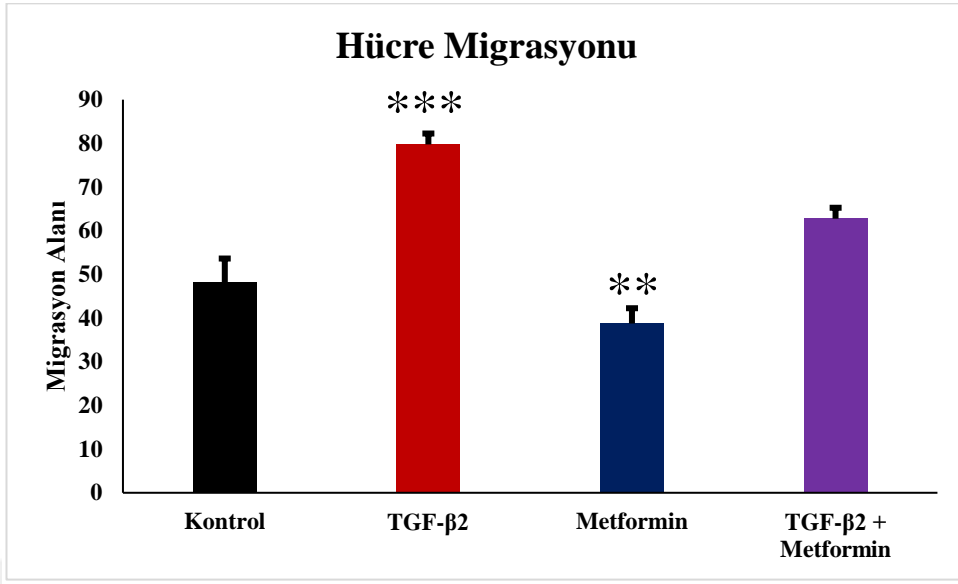
Şekil 17: Western Blot Protein Elektorforezi görüntüleri

6.3. Hücresel Migrasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

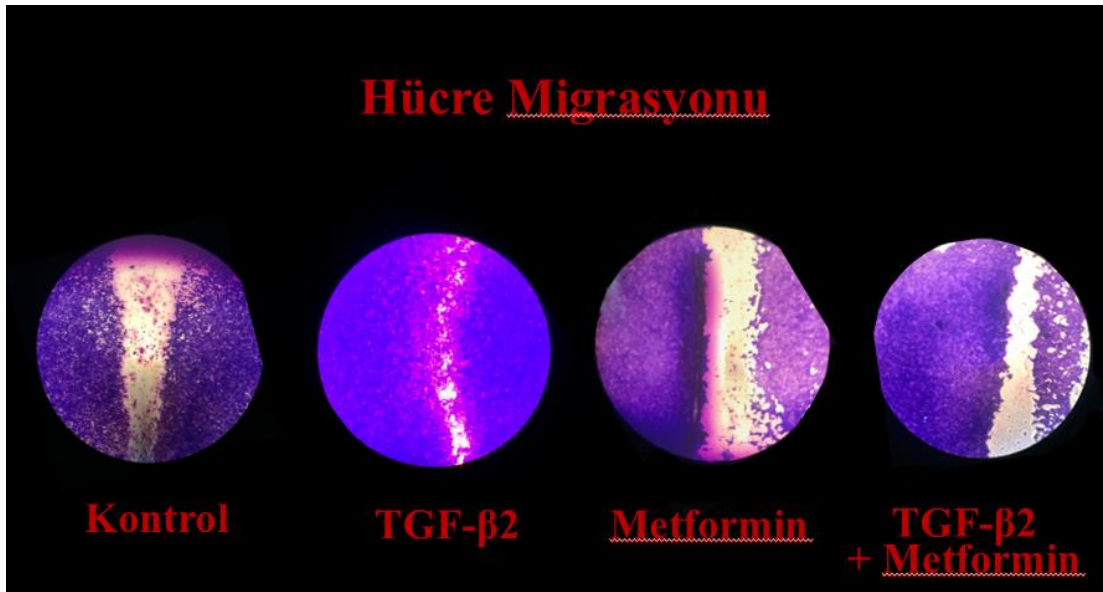
Hücresel migrasyon düzeyinin değerlendirilmesi için yapılan yara iyileşmesi testinin sonuçları Tablo 9 da gösterilmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde hücresel migrasyon düzeyinin TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p < 0.001$), metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü ($p < 0.001$). TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmedi [Şekil 18]

Tablo 9: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda hücre migrasyonu sonuçları

	Ortalama	P*
Kontrol	48,25	
TGF-β2	79,75	$p < 0.001$
Metformin	38,75	$p < 0.01$
TGF-β2 + Metformin	62,75	



Şekil 18: Kontrol, TGF-β2, metformin ve TGF-β2+metformin grubunda hücre migrasyonu sonuçları ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$)



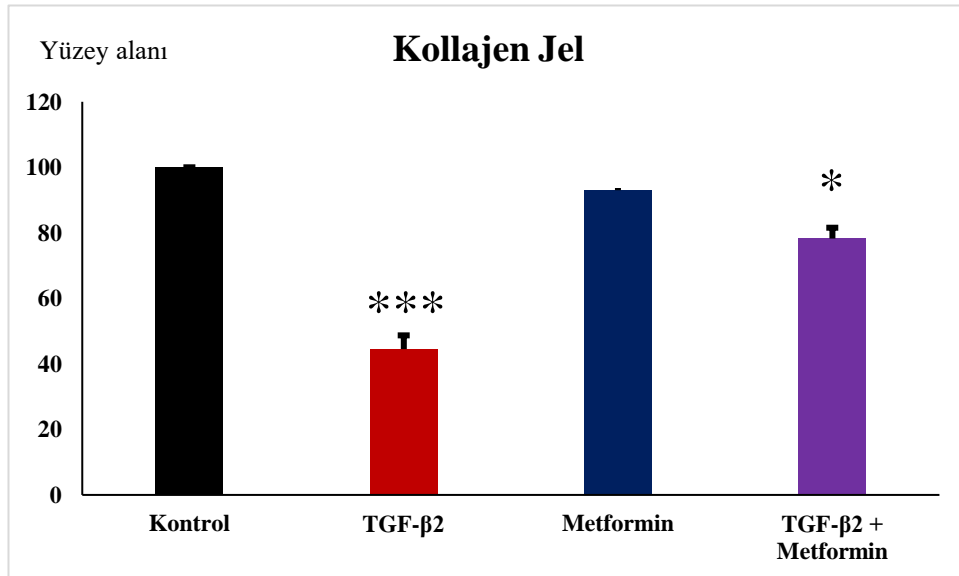
Şekil 19: Yara iyileşme testi mikroskobik görüntüleri

6.4. Kontraksiyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

Doku düzeyinde kollajen jel kontraksiyonunun değerlendirilmesi için yapılan kollajen matriks kontraksiyon testi sonuçları Tablo 10 da gösterilmiştir. Kontrol grubunda %100 olan yüzey alanı; TGF- β 2 grubunda ortalama %44.5, metformin grubunda %93, TGF- β 2+metformin grubunda ise %78.25 olarak saptandı. Bu veriler değerlendirildiğinde yüzey alanında, TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.001$). Metformin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. TGF- β 2+metformin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.05$), ancak yüzey alanındaki azalma oranı TGF- β 2 grubuna göre daha düşüktü [Şekil 20].

Tablo 10: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda kollajen jel kontraksiyon deneyi sonuçları

	Ortalama Alan	P*
Kontrol	100	
TGF-β2	44,5	$p<0.001$
Metformin	93	
TGF-β2 + Metformin	78,25	$p<0.01$



Şekil 20: Kontrol, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin grubunda kollajen jel kontraksiyon deneyi sonuçları ($p^*<0.05$, $p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$)

7.TARTIŞMA

Vitreoretinal cerrahi ve RD tedavisindeki tüm gelişmelere ve teknolojik ilerlemelere rağmen, PVR gelişimi nedeniyle ortaya çıkan RD nüksleri halen büyük bir sorun teşkil etmektedir. PVR nedeniyle nüks gelişen olgularda tekrarlayan cerrahi girişimlere ihtiyaç duyulmakta, bu girişimlerle birlikte anatomik başarı oranları da daha düşük olmaktadır. Bu nedenle cerrahi teknikler ve ekipman alanındaki araştırmalara ilaveten, PVR gelişiminin önlenmesi ve tedavisi konusunda birçok çalışma yapılmakta, proflaktik tedavi arayışları sürmektedir. Bu alanda birçok invitro hücre kültürü ve invivo hayvan deneyleri yapılmış, ancak henüz tedavi etkinliği yüksek, toksisite düzeyi düşük, güvenli bir protokol oluşturulamamıştır.

PVR nin farmakolojik tedavisine yönelik yapılan çalışmalardan önce, PVR gelişimindeki basamakların detaylı olarak incelenmesi ve bu süreçte rol oynayan moleküler bileşenlerin aydınlatılması gerekmektedir. PVR gelişim basamaklarını oluşturan; enflamasyon evresi, proliferasyon evresi ve kontraksiyon evresinde birçok hücre, sitokinler ve büyüme faktörleri aktive olmakta ve bu aktivasyonlar sonucunda PVR patogenezinde önemli bir basamak olan EMD olayı gerçekleşmektedir.

Yapılan çalışmalarda, PVR lı gözlerdeki fibrotik doku incelenmiş ve bu dokuyu oluşturan esas hücre komponentinin RPE hücreleri olduğu görülmüştür. Birçok çalışmada RD esnasında vitreus boşluğuna geçen RPE hücrelerinin fenotipinin epitelyal karakterini kaybederek mezenkimal yönde değiştiği, fibroblastlara benzer özellikler kazanan RPE hücrelerinin adezyon, göç etme ve proliferasyonunda artış olduğu gözlenmiştir [11-13]. Aynı zamanda EMD ye uğrayan RPE hücrelerinin mezenkimal belirteçler ve kollajen sentezlediği, bu moleküllerin de kontraksiyon evresinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. EMD olarak adlandırılan bu süreç sonucunda epiretinal ve subretinal boşluklarda oluşan fibrotik membranlar PVR nin en önemli yapıtaşlarını oluştururlar ve kontrakte olarak RD na yol açarlar [14].

Charteris ve ark., PVRde uygulanabilecek yardımcı tedaviler için çeşitli hedefler önermiştir. Bunlar; fibrin birikiminin önlenmesi, hücrel göç ve proliferasyonun önlenmesi, ESM sentezinin inhibe edilmesi ve EMD sürecinde etkili olan büyüme faktörleri ve sitokinlerin inhibisyonudur [9]. Son zamanlarda PVR nin proflaktik tedavisi için yapılan araştırmalar EMD sürecinde rol alan moleküllerin inhibisyonuna yönelmiş, pek çok ajan bu amaçla incelenmiştir. Bu çalışmalarda invitro hücre kültürü veya in vivo hayvan deneyi ortamlarında çeşitli yöntemlerle PVR modelleri oluşturulmuş , farmakolojik ajanın PVR ve EMD sürecini önlemedeki etkinliği değerlendirilmiştir.

PVR daki EMD sürecinde PDGF, FGF, EGF, IGF-1, IL-6- IL-8, IL-10 gibi birçok büyüme faktörü ve sitokin rol oynamakla birlikte, esas EMD mediatörünün TGF- β olduğu üzerinde durulmaktadır. Güçlü profibrotik etkileri olan TGF- β , PVR sürecinde RPE hücrelerinin EMD ye uğramasını tetikler, sonuçta RPE hücrelerinin proliferasyon, göç etme ve ESM salgılama ve kontrakte olma yeteneğinde belirgin bir artış gözlenir. TGF- β 2 ile fibrozis düzeyi arasındaki ilişkinin araştırıldığı klinik bir çalışmada, PVR si olan ve olmayan RD lı hasta gruplarından vitreus örnekleri alınmış ve TGF- β seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlarda TGF- β seviyesinin PVR li hastalarda 3 kat daha yüksek olduğu ve fibrozis ciddiyetiyle ilişkili olarak arttığı görülmüştür [15]. TGF β ile tetiklenen sinyal kaskadı, akciğer ve miyokard fibrozu veya kanser metastazı dahil olmak üzere bir dizi patofizyolojik olayda EMD indüksiyonu için kritik bir yolu yansıtmaktadır [135,136]. Oküler dokularda TGF- β 2 ile indüklenen EMD; lens epiteli, kornea epiteli ve RPE gibi dokularda çalışılmış ve TGF- β nın baskılanması ile EMD sürecinin inhibe olduğu gösterilmiştir [137-140].

TGF- β nın etkilerini gerçekleştirdiği temel sinyal yolu, SMAD sinyal yoludur. SMAD sinyal yolunda TGF- β , tip 1 ve tip 2 reseptörüne bağlanır. Bu reseptörler serin/treonin kinaz aktivasyonu ile SMAD2 ve SMAD3 proteinlerini fosforile eder. Fosforile olan SMAD2 ve SMAD3 proteinleri (pSMAD2 ve pSMAD3), SMAD4 ile birleşir ve bu kompleks, TGF- β 'nın hücre içi etkilerini gerçekleştirmek için hücre nükleusuna hareket eder [141]. Bu sinyal yolunda yer alan moleküllerin inhibisyonu EMD nin önlenmesinde önemli terapötik hedefler olarak yer alır. TGF- β /SMAD sinyal yolunu modifiye eden bileşenler; reseptör-ligand etkileşimini, reseptörle aktive olan fosforilasyonu, SMAD-SMAD etkileşimini, SMAD ların hücre çekirdeğine taşınmasını ve transkripsiyon aşamasını etkileme potansiyeli olan ajanlardır.

Metforminin antineoplastik ve antifibrotik etkilerinin patofizyolojisi araştırıldığında güçlü bir EMD inhibitörü olduğu görülmüş, bu etkisi öncelikle onkolojik çalışmalar ile meme kanseri, malign melanom, prostat kanseri ve akciğer kanseri hücreleri üzerinde gösterilmiştir [142-145]. Metformin aynı zamanda kalp, böbrek ve karaciğer dokularında fibrozisi önlemesi nedeniyle organ fibrozisinde de çeşitli çalışmalarla etkisi araştırılan bir ajan konumundadır [146-149]. Mevcut çalışmalara göre metforminin hücre içindeki temel etki mekanizması adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinazı (AMPK) aktive etmesidir. Bu etkisini, mitokondriyal solunum zincirini inhibe edip, hücre içi adenosin monofosfat düzeyini arttırarak yapar. AMPK yolunun, TGF- β ile indüklenen EMD ü inhibe etmek için standart bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir [150]. TGF- β , AMPK 1 aktif bölgesi thr172 nin fosforilasyonunu azaltarak inaktive eder. Bunun sonucunda mezenkimal belirteçler olan α -SMA ve vimentin artar, epitelyal belirteç olan e-cadherin ise azalır. AMPK nın farmakolojik ve genetik aktivasyonu ile TGF- β nın EMD yi indükleyici bu etkileri tersine çevrilir. Metformin ise AMPK nın en iyi bilinen aktivatörü olması sebebiyle EMD inhibisyonu ile ilgili çalışmalarda yer almaktadır. Kolorektal kanserli ve diyabetik hastalarda metforminin EMD üzerindeki etkisinin araştırıldığı klinik bir çalışmada; tanı almadan önce en az 6 ay oral metformin tedavisi alan ve almayan hastalar seçilmiş ve cerrahi eksizyon sonrası tümoral doku incelenmiştir. Metformin alanlarda diğer gruba göre daha yüksek *e-cadherin*, daha düşük vimentin, daha düşük oranda EMD geçirmiş hücre ve daha düşük EMD dereceli tümoral doku olduğu gözlenmiştir [151].

İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı renal fibrozisin önlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, fareler üzerinde metforminin EMD ü inhibe edici etkisi gösterilmiş, intraperitoneal olarak uygulanan metformin tedavisi ile TGF- β ve IL-6 ekspresyonu azalmıştır [152].

PVR nin önemli bir basamağı olan EMD ün inhibe edilmesinde birçok yeni molekül çalışılmaktadır, ancak bu konuda antifibrotik etkileri diğer birçok organ ve dokuda kanıtlanmış olan metforminle ilgili bir çalışma yoktur. Bu nedenle çalışmamızda RPE üzerinde EMD ü tetiklemek için güçlü bir profibrotik sitokin olan TGF- β 2, bu etkileri tersine çevirmek için ise metformin kullanıldı. Çalışmamızda öncelikle RPE hücre kültürü üzerinde uygulanacak TGF- β 2 ve metformin dozlarını belirlemek üzere hücre canlılığı testi yapıldı. ARPE-19 hücrelerinin yer aldığı hücre kuyuları, TGF- β 2, metformin ve TGF- β 2+metformin kombinasyonunun farklı

konsantrasyonlarıyla 24 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında hücre canlılığı değerlendirilmek üzere luminometrik ATP testi uygulandı. Test sonuçlarına göre hücre proliferasyonunda %50 oranında azalmaya neden olan maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) belirlendi ve sonraki çalışmalarda bu dozlar kullanıldı. TGF- β 2 nin IC50 değeri 10 ng/mL, metforminin IC50 değeri ise 10 mM idi. Metformin temel etkilerini mitokondriyal solunum zincirini inhibe ederek göstermektedir. Bu nedenle, in vitro çalışmaların çoğunda metformin, etkinliğini göstermesi için gerekli olan optimal mitokondriyal dozlara ulaşmak için 1-10 mM aralığında kullanılır [153]. Hücre canlılığı testi ile belirlenen ve uygulanan metformin konsantrasyonu, daha önce bildirilmiş olan bu veri ile de uyuşmakta idi

Çalışmamızın sonraki basamağında EMD belirteçleri olarak kabul görmüş olan *zonula okludens-1* (ZO-1), α -SMA ve vimentin protein ekspresyonlarını Western Blot testi ile değerlendirdik.

ZO-1, hücreler arası sıkı kavşak bağlantılarının önemli bir elemanıdır. Epitel hücreleri genellikle tek sıralı bir hücre tabakası halindedir. Düzenli hücre-hücre bağlantıları, komşu hücreler arası yapışıklıklar onları birarada tutar. Bu hücreler arası bağlantıların ve bu bağlantıları oluşturan ZO-1, *e-cadherin* gibi epitelyal belirteçlerin kaybı; epitel hücrelerinin normalde çok düşük olan göç etme kapasitesini arttırmaktadır.

α -SMA, hücre iskeletini oluşturan ve hücre hareketliliğinde rol alan kontraktıl bir protein ve aynı zamanda mezenkimal belirteçdir [154]. Vimentin ise yine bir mezenkimal belirteç olup, mezenkimal hücrelerin majör intermediate filamentidir. Hücre göçü sırasında hücre iskeletini stabilize eder [155]. Sağlıklı RPE dokusunda çok az miktarda sentezlenen bu proteinlerin yapımı EMD süreci ile birlikte artmakta, epitel hücrelerinin normal fenotiplerini kaybederek dinamik bir göç etme kapasitesi kazanmalarına yol açmaktadır. Aynı zamanda bu proteinler EMD nin güçlü birer göstergesi olarak çalışmalarda yer almaktadır. Farklı dokularda EMD ile ilgili yapılan çalışmalarda TGF- β 2, EMD yi indüklemek amacıyla kullanılmış ve TGF- β 2 etkisiyle EMD belirteçleri olan α -SMA ve vimentinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [140]. PVR olgularından cerrahi olarak çıkarılmış kontraktıl membranlarda yüksek oranda α -SMA ve vimentin bulunduğu görülmüştür [5]. Bu durum α -SMA ve vimentinin yalnız hücre göçü aşamasında değil, epiretinal membranların kontrakte olması ve sekonder retina dekolmanının gelişiminde de yer aldığını gösterir.

Western Blot protein ekspresyonu analizine göre bir epitelyal belirteç olan ZO-1 ekspresyonu, yalnız TGF- β 2 uygulaması ile anlamlı oranda azalmış ($p<0.05$), TGF β 2+metformin uygulaması ile bu azalma hafiflemiştir. Mezenkimal belirteçler olan α -SMA ve vimentinin ekspresyonu ise, TGF- β 2 uygulaması ile çok yüksek oranda anlamlı olarak artmış ($p<0.001$), TGF- β 2+metformin uygulaması ile bu artış hafiflemiştir. Sonuçlar, deneyimizde invitro RPE hücrelerinde TGF- β 2 ile EMD indüklemesinin gerçekleştiğini, metforminin ise EMD yi inhibe edici etkilerinin ortaya çıktığını göstermektedir.

TGF- β 2 nin temel sinyal yolunda yer alan SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin fosforilasyonu, RPE nin EMD yi tetiklemekte ve mezenkimal belirteçleri artırırken epitelyal belirteçleri azaltmaktadır [139-140]. Daha önce yapılan bir çalışmada TGF- β /SMAD sinyal yolunun RPE hücrelerinin EMD si için gerekli olduğu ve SMAD3 inhibisyonu ile PVR gelişiminin baskılandığı fareler üzerinde gösterilmiştir [156]. Çalışmamızda TGF- β 2/SMAD sinyal yolunun metformin ile inhibisyonunu değerlendirmek için Western blot analizi ile SMAD2, SMAD3, ve bu proteinlerin fosforile olmuş aktif formları olan pSMAD2, pSMAD3 ekspresyonlarını değerlendirdik. Sonuçlara göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TGF- β 2 uygulaması ile çok yüksek düzeyde anlamlı olarak artan SMAD2 fosforilasyonu ($p<0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.01$). SMAD3 fosforilasyonu değerlendirildiğinde ise; TGF- β 2 grubunda istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı artış olduğu ($p<0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda bu artışın hafiflediği görülmüştür. Sonuçlarımız metforminin, invitro RPE hücre kültürü ortamında SMAD2 ve SMAD3 ün fosforilasyonunu azaltarak TGF- β 2/SMAD sinyal yolunu baskıladığını göstermektedir.

Connor ve arkadaşları yaptıkları hayvan temelli bir çalışmada, RD ve PVR de kollajen depolanması, fibrozis ve EMD nin özellikle SMAD-3 ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [15]. SMAD-3, bir DNA bağlanma ve aktive etme alanına sahip olması nedeniyle, TGF- β ile indüklenen sinyal yolunun transkripsiyon aşamasında etkili SMAD proteini olarak konumlandırılmaktadır. Fibroblastlarda SMAD3 ün TGF- β 1 ile indüklenmiş kollajen gen ekspresyonunda etkili olduğu gösterilmiştir [157].

EMD geçiren hücrelerin kazandığı önemli bir yetenek de migrasyon kapasitesinde artıştır. Çalışmamızda TGF- β 2 ve metforminin, ARPE-19 hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerindeki etkisini değerlendirmek için yara iyileşmesi testi uygulandı. Bu testte hücre kültürü plakaları üzerinde bir pipet ile çizik oluşturulmakta, oluşturulan bu çizik geçiren hücrelerin toplam alanı, çizik alanına oranlanmaktadır [138]. Sonuçlar değerlendirildiğinde, hücresel migrasyon düzeyinin TGF- β 2 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü ($p < 0.001$). TGF- β 2+metformin grubunda ise migrasyon düzeyi, TGF- β 2 grubuna göre daha düşüktü.

TGF- β 2/SMAD sinyal yolu, EMD yi başlatmakta önemli rol oynamakta; özellikle kontraktıl membranlarda yer alan ESM nin ana bileşeni olan fibronektin ve tip I kollajenin sentezini arttırmaktadır. Subretinal ve epiretinal membranların büyümesi ve kontraksiyonu PVR nin önemli bir basamağı olup, sekonder RD gelişimine neden olur. Kollajen jel kontraksiyonu PVR deki patolojik yara iyileşmesi sürecinin bir elemanıdır ve bu işleme fibroblastlar ve farklılaşmış RPE hücreleri katılır. PVR li gözlerde kollajen jel kontraksiyonu ile vitreustaki TGF- β seviyesi arasında yüksek ilişki olduğu bulunmuş, TGF- β inhibisyonu ile kollajen jel kontraksiyonu dramatik olarak baskılanmıştır [158-159]. Kollajen jel kontraksiyon testi, jel boyutunu ölçerek kollajen jel matrislerine gömülü hücrelerin kontraksiyon kapasitesini değerlendiren bir yöntemdir. Bu model, belirli agonist ve antagonistlerin matris yüzey alanındaki daralma hızı ve derecesi üzerindeki etkisinin araştırılmasına olanak sağlar [160].

Çalışmamızda metforminin, EMD nin kontraksiyon basamağına olan etkisini incelemek için kollajen jel kontraksiyon testi uygulandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubunda %100 olan yüzey alanı TGF- β 2 grubunda %44.5 ($p < 0.001$), TGF- β 2+metformin grubunda ise %78.25 ($p < 0.05$) olarak ölçüldü. TGF- β 2 etkisiyle ortaya çıkan belirgin kontraksiyon, TGF- β 2 ve metforminin birlikte uygulanması ile azalma gösterdi. Bu bulgular metforminin, EMD ile birlikte ortaya çıkan RPE hücrelerinin kontraksiyon düzeyindeki artışı inhibe ettiğini göstermektedir.

Metforminin TGF- β sinyal yolağı üzerindeki etki mekanizması araştırılmaktadır. Yakın tarihli çalışmalarda AMPK nın TGF- β sinyal yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir, ancak bu etkinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır [161-162]. İyi bilinen bir AMPK aktivatörü olan metforminin de bu yolla TGF- β sinyal

yolunu inhibe ettiği düşünülmektedir [163]. Ancak metforminin bu etkisinin, AMPK yolundan bağımsız olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, yüzey plazmon temelli bir test kullanılarak metforminin TGF- β 1 e direkt olarak bağlandığı ve TGF- β 1 in reseptörüne bağlanmasını inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Atomik kuvvet spektroskopisi ile yapılan değerlendirme sonucunda, metforminin TGF- β 1 reseptörüne bağlanma olasılığını azalttığı ancak bağlanma kuvvetini etkilemediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar AMPK yolundan bağımsız olarak metforminin TGF- β ile etkileşime girdiğini, reseptör-ligand bağlanmasını inhibe ettiğini ve sinyal akışını inhibe ettiğini göstermektedir [132]. Aynı zamanda metformin, AMPK yolundan bağımsız olarak, TGF- β sinyali ile indüklenen kollajen sentezini de azaltmaktadır [133].

Büyüme faktörleri ve sitokinler, PVR patogenezindeki hücrelerin çoğalma yeteneğini, adezyon ve göç kapasitesini, ESM yapımını ve kontraksiyonunu düzenler. RPE hücreleri ve glial hücrelerin büyüme faktörü ve sitokinlere ve bunları inhibe eden ajanlara cevabı incelenmektedir. Ancak bizim çalışmamızda da olduğu gibi bu çalışmaların büyük bölümü invitro ortamda yapılan çalışmalar olduğu için, sonuçları tartışmalıdır. Bu çalışmalardaki kanıtların sağlamlaştırılması için in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Potansiyel olarak büyüme faktörleri ve sitokinlerin, PVR deki dengesiz patolojik yara iyileşmesi sürecinde anahtar rol oynadığı ortadadır. Ancak bu durum PVR nin çeşitli aşamalarında çok karmaşık bir büyüme faktörü ve sitokin ağı olması nedeniyle belirsizliğini korumakta ve elde edilen bilgilerin genellenmesini zorlaştırmaktadır.

PVR ve EMD sürecinde önemli bir sitokin olan TGF- β ya karşı geliştirilen terapötik stratejiler; *antisense* oligonükleotidleri kullanılarak translasyon düzeyinde inhibisyon, antireseptör antikoları ile ligand-reseptör etkileşiminin inhibisyonu ve TGF- β reseptör kinaz inhibitörleri aracılığıyla reseptör aracılı sinyal yolunun inhibisyonu şeklindedir. Özellikle *antisense* oligonükleotidlerin ve antireseptör monoklonal antikoların dokuya geçişi yetersizdir. TGF- β reseptör kinaz inhibitörlerinin ise yan etkileri fazladır [132].

Metforminin TGF- β sinyal yolağı üzerindeki belirgin etkileri, bu yolağın önemli rol oynadığı patolojilerde yeni endikasyonlar sağlamaktadır. Aynı zamanda dokuya

geçişi kolay olan küçük bir molekül olması ve yan etkilerinin az olması da avantaj olarak ortaya çıkmaktadır.

PVR patogenezinde yer alan süreçlerin ve faktörlerin inhibisyonu üzerinde etkili olabileceği düşünülen ajanların uygulanma metodları üzerinde de çalışılmakta, intravitreal ve subkonjonktival enjeksiyonlardaki kısa yarılanma ömrü nedeniyle solid implantlar, lipozomal kaplamalı ilaçlar, uzun salınımlı sistemlerin uygulaması araştırılmaktadır.

Metforminin diğer retinal patolojilerdeki antiinflamatuvar, antiapoptotik ve nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı hayvan modeli çalışmalarda; oral, subkutan enjeksiyon ve intravitreal enjeksiyon gibi farklı uygulama yöntemleri denenmiştir [165-166]. Bu çalışmalarda metforminin kan-beyin bariyerini geçip retinaya ulaşan ve plazmada olduğu gibi retinadan da belirli bir süre sonra temizlenen bir molekül olduğu gözlenmiştir [166]. Metforminin PVR nin yardımcı tedavisindeki yerinin belirlenebilmesi için özellikle ilaç uygulama şekli ve toksisite ile ilgili invitro ve invivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

8.SONUÇ

Gelişen cerrahi yöntemlere rağmen RD cerrahisinde nüksün en önemli sebeplerinden biri olan PVR, karmaşık patofizyolojik süreçleri beraberinde barındırmaktadır. PVR nin yardımcı tedavisinde bu süreçlerin aydınlatılması, etkili olan büyüme faktörü ve sitokinlerin araştırılması ve bunların inhibisyonu ile ilişkili çalışmalar yol gösterici olacaktır.

Yaptığımız çalışmada diğer birçok organ ve dokuda fibrogenezisi önleyici etkileri gösterilmiş olan metforminin, invitro ortamda RPE hücrelerinde TGF- β 2 ile indüklenen EMD süreci üzerinde inhibe edici etkilerini gözlemledik. Metformin EMD geçiren RPE hücrelerinin mezenkimal proteinleri sentez yeteneğini, hücresel migrasyon düzeyini ve kontraksiyonunu azaltmıştır. Yine çalışmamızda ulaştığımız diğer önemli bir sonuç da, metforminin TGF- β 2/SMAD sinyal yolunda yer alan SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin fosforilasyonunu baskıladığıdır.

KAYNAKÇA

1. Mitry D, Charteris DG, Fleck BW, Campbell H, Singh J. The epidemiology of rhegmatogenous retinal detachment: geographical variation and clinical associations. *Br J Ophthalmol*. 2010;94: 678–684.
2. Colucciello M. Rhegmatogenous retinal detachment. *Phys Sportsmed* 2009;37:59–65.
3. Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Surv Ophthalmol*. 1998;43(1):3–18.
4. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, Di Lauro S, Gonzalez-Buendia L, Delgado-Tirado S. Proliferative vitreoretinopathy: a new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Prog Retin Eye Res*. 2016;51:125–155.
5. Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21 : 127-44
6. Hiscott PS, Grierson I, McLeod D. Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol*. 1984;68(10):708–715.
7. Hiscott P, Morino I, Alexander R, Grierson I, Gregor Z. Cellular components of subretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Eye (Lond)*. 1989;3(pt 5):606–610.
8. Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 2017;13(17): 21:127-44
9. Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. *Br J Ophthalmol*. 1995;79:953.
10. Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, et al. Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:329–342.
11. Lee SC, Kwon OW, Seong GJ, Kim SH, Ahn JE, Kay ED. Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells. *Ophthalmic Res*. 2001;33(2):80–86.
12. Li H, Wang H, Wang F, Gu Q, Xu X. Snail involves in the transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 2011; 6 : e23322
13. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420–1428.
14. Sadaka A, Giuliari GP. Proliferative vitreoretinopathy: Current and emerging treatments. *Clin Ophthalmol* 2012; 6 : 1325-33

15. sjTB Jr, Roberts AB, Sporn MB, et al. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1661–1666.
16. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 1990; 346:371-4.
17. Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(5):265–273
18. Liang CM, Tai MC, Chang YH, et al. Glucosamine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of retinal pigment epithelium cells in culture and morphologic changes in a mouse model of proliferative vitreoretinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2011;89(6):e505–e514.
19. Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C, Kane R. The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4291–4299
20. Carrington L, McLeod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF-beta2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1210-6.
21. Ben Sahara, I.; Le Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J.F.; Bost, F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol. Cancer Ther.*, 2010, 9(5), 1092-1099.
22. Kourelis, T.V.; Siegel, R.D. Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med. Oncol.*, 2011, DOI: 10.1007/ s12032-011-9846-7.
23. Vazquez-Martin, A.; López-Bonet, E.; Cufí, S.; Oliveras-Ferraro, C.; Del Barco, S.; Martin-Castillo, B.; Menendez, J.A. Repositioning chloroquine and metformin to eliminate cancer stem cell traits in pre-malignant lesions. *Drug Resist. Updat.*, 2011, 14(4-5), 212-223.
24. Menendez, J.A.; Cufí, S.; Oliveras-Ferraro, C.; Vellon, L.; Joven, J.; Vazquez-Martin, A. Gerosuppressant metformin: less is more. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(4), 348-362
25. Barrière G., Tartary M., Rigaud M. Metformin: A Rising Star to Fight the Epithelial Mesenchymal Transition in Oncology. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2012, 12, 000-000
26. Albert D, Jakobiec FA. *Clinical Practice Principles and Practice of Ophthalmology.* W.B. Saunders Company; 1994.
27. Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology.* Second ed. Mosby: St.Louis; 2004.
28. Kolb H, Fernandez E, Nelson R. *Gross Anatomy of the Eye.* 1995-. 2005 May 01 [updated 2007 May 01]
29. Özdemir H., Arf S., Karaçorlu M. *Makula Hastalıklarında Optik Kohorens Tomografi* 2015
30. 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.
31. Tasman W. *Clinical Ophthalmology*, vol. 3, JB Lippincott, Philadelphia, 1994, pp. 1–18.
32. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Curr Mol Med.* 2010;10(9):802-823

33. Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija M.: Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. *Am J Ophthalmol.* 1996;12:181-189.
34. Thumann G, Hoffman S, Hinton DR.: Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. In: Ryan SJ. *Retina. Volume 1. Basic Science and Inherited Retinal Diseases.* Fourth edition. Elsevier&Mosby. 2006:137-152.
35. Gundersen D, Orłowski J, Rodriguez-Boulan E.: Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1991;112:863-872.
36. Spaide RF, Curcio CA. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina.* 2011;31(8):1609-19
37. Bosch E, Horwitz J, Bok D.: Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *JHistochem Cytochem.* 1993;41:253-41263.
38. Steinberg RH.: Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol.* 1985;60:327-346.
39. Nguyen-Legros J, Hicks D.: Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Intern Rev Cytol.* 2000;196:245-13.
40. Simo R, Villarroel M, Corraliza L, et al.: The Retinal Pigment Epithelium: Something More than a Constituent of the Blood-Retinal Barrier-Implications for the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Biomed Biotech* 2010.
41. Strauss O.: The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev.* 2005;85:845–881.
42. Hamann S.: Molecular mechanisms of water transport in the eye. *International Review of Cytology.* 2002;215:395-431.
43. Ban Y, Rizzolo LJ.: Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol.* 2000;279:C744-C750.
44. Stamer WD, Bok D, Hu J, et al.: Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2803–2808.
45. Retinal Pigment Epithelium. *Fundamental and Principles of Ophthalmology.* AAO Basic and Clinical Science Course. The Foundation of American Academy of Ophthalmology. San Francisco. 2000-2001;366-371
46. Baehr W, Wu SM, Bird AC, et al.: The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 2003;43:2957-2958
47. Roof DJ, Heth CA.: Photoreceptors and retinal pigment epithelium; transduction and renewal mechanisms. In Albert DM, Jacobiec FA, Robinson NA: *Principles and Practice of Ophthalmology, Basic Sciences.* WB. Saunder, Pennsylvania. 1994;309-332.
48. Hargrave PA.: Rhodopsin structure, function, and topography: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:3-9.
49. Okajima TIL, Pepperberg DR, RippsH, et al.: Interphotoreceptor retinoid-binding: role in delivery of retinol to the pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 1989;49:629-644.

50. Beatty S, Koh H.-H., Phil M, et al.: The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2000;45:115-134.
51. Newsome DA, Miceli MV, LilesMR, et al.: Antioxidants in the retinal pigment epithelium. *Prog Ret Eye Res.* 1994;13:101-123.
52. Fukuoka Y, Strainic M, Medof ME.: Differential cytokin expression in human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation with C5a. *Clin Exp Immunol.* 2003;131:248-253.
53. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al.: Pigment epitheliumderived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 1999;285:245-248.
54. King GL, Suzuma K.: Pigment-epithelium-derived factor-a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *NEJM.* 2000;342:349-351.
55. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, et al.: Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophysical Res Comm.* 1993;193:631-638.
56. Pennock, S., Haddock, L.J., Elliott, D., Mukai, S., Kazlauskas, A., 2014. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy *Prog. Retin Eye Res.* 40, 16e34.
57. Mietz H, Heimann K. Onset and recurrence of proliferative vitreoretinopathy in various vitreoretinal disease. *Br J Ophthalmol.* Oct 1995;79(10):874-877.
58. Wilkins KB, Kulwin DR. Wound healing. *Ophthalmology* 1979; 86: 507-510.
59. Chiba, C. 2014. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. *Exp. Eye Res.* 123, 107e114.
60. Limb GA, Little BC, Meager A, Ogilvie JA, Wolstencroft RA, Franks WA, et al. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 1991; 5: 686-93.
61. Lei H, Hovland P, Velez G, et al. A potential role for PDGF-C in experimental and clinical proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(5):2335–2342.
62. O'dwyer PA, Akova YA. (editörler). *Temel Göz Hastalıkları. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara* 2011: 611-645
63. Kon CH, Occleston NL, Charteris D, Daniels J, Aylward GW, Khaw PT. A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1524-1529.
64. Sethi CS, Bailey A, Luthert PJ, Chong NHV. Matix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 654-666.
65. Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Survey of ophthalmology.* Mar-Apr 1992;36(5):373-384
66. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* Jun 2002;133(6):851-852.
67. Jones SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 2000; 19: 5558-5567.
68. Saika S, Yamanaka O, Okada Y, et al. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci (Schol Ed).* Jun 1 2009;1:376-390.

69. Yan F, Hui YN, Li YJ, Guo CM, Meng H. Epidermal growth factor receptor in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmologica*. 2007;221(4):244-250.
70. Asaria RH, Kon CH, Bunce C, et al. Silicone oil concentrates fibrogenic growth factors in the retro-oil fluid. *Br J Ophthalmol*. Nov 2004;88(11):1439-1442.
71. Wang HS, Chard T. The role of insulin like growth factor 1 and Insulin like growth factor binding protein in the control of human fetal growth. *J Endocrinol* 1992; 132: 11-16.
72. Guidry C. Tractional force generation by porcine Muller cells. Development and differential stimulation by growth factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Feb 1997;38(2):456-468.
73. Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, et al. Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology*. Jun 1989;96(6):801-810.
74. Machemer R, Laqua H. Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol*. Jul 1975;80(1):1-23.
75. Kauffmann DJ, van Meurs JC, Mertens DA, Peperkamp E, Master C, Gerritsen ME. Cytokines in vitreous humor: interleukin-6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 900-906.
76. Bastiaans J, van Meurs JC, Mulder VC, et al. The role of thrombin in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul 11 2014;55(7):4659-4666.
77. Girard P, Mimoun G, Kurpouzas I, Montefiore G. Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina* 1994; 14: 417-424.
78. Mietz H, Heimann K. Onset and recurrence of proliferative vitreoretinopathy in various vitreoretinal diseases. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 874-877.
79. Wolfensberger TJ. Jules Gonin. Pioneer of retinal detachment surgery. *Indian J Ophthalmol*. Dec 2003;51(4):303-308.
80. Machemer R, Sugita G, Tano Y. Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1979;77:171-180.
81. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. Feb 1983;90(2):121-125.
82. Lean JS, Stern WH, Irvine A, Azen SP. Classification of proliferative vitreoretinopathy used in the Silicone Study. The Silicone Study Group. *Ophthalmology* 1989; 96: 756-771.
83. Machemer R, Aaberg TM, Freeman M, Irvine AR, Lean JS, Michels RM. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 1991; 112: 159-165.
84. Yoshizumi MÖ, Kreiger AF, Sharp DM. Massive peri-retinal proliferation following prophylactic treatment of retinal breaks. *Trans Ophthalmol Soc NZ* 1983; 35: 33-36.
85. Guo CM, Wang YS, Hu D, et al. Modulation of migration and Ca²⁺ signaling in retinal pigment epithelium cells by recombinant human CTGF. *Curr Eye Res*. Oct 2009;34(10):852-862

86. Chandler DB, Rozakis G, de Juan E, Jr., Machemer R. The effect of triamcinolone acetonide on a refined experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*. Jun 15 1985;99(6):686-690.
87. Jonas JB, Hayler JK, Panda-Jonas S. Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 1064-1067.
88. Stern WH, Guerin CJ, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH, Fisher SK. Ocular toxicity of fluorouracil after vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 1983; 96: 43-51.
89. Joondeph BC, Peyman GA, Khoobehi B, Yue BY. Liposome-encapsulated 5-fluorouracil in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Surg* 1988; 19: 252-25
90. Blumenkranz M, Hernandez E, Ophir A, Norton EWD. 5-fluorouracil: new applications in complicated retinal detachment for an established antimetabolite. *Ophthalmology* 1984; 122-130.
91. Hueber A, Weller M, Welsandt G, Kociok N, Kirchhof B, Esser P. Characterization of daunorubicin-induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells: modulation by CD95L. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2851-2857.
92. Steinhorst UH, Hatchell DL, Chen EP, Machemer R. Ocular toxicity of daunomycin: effects of subdivided doses on the rabbit retina after vitreous gas compression. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; 231: 591-594.
93. Wiedemann P, Hilgers RD, Bauer P, Heimann K. Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: results of a multicenter clinical trial. Daunomycin Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998; 126: 550-559.
94. Daniels S, Coonley K, Yoshizumi M. Taxol treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990; 228: 513-516.
95. Kang SG, Chung H, Yoo YD, Lee JG, Choi Yi, Yu YS. Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: apoptosis and cell cycle arrest. *Curr Eye Res* 2001; 22: 174-181.
96. Fekrat S, de Juan E Jr, Campochiaro PA. The effect of oral 13-cis-retinoic acid on retinal redetachment after surgical repair in eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. 1995;102(3): 412-418.
97. Lemor M, Yeo JH, Glaser BM. Oral colchicine for the treatment of experimental traction retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 1226-1229.
98. McGuigan LJ, Quigley HA, Luttly G, Enger C, Young E. The effects of Dpenicillamine and daunorubicin on conjunctival fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 112-118.
99. Maeno T, Tano Y, Mano T, Takenaka H. Argatroban inhibits intraocular fibrin formation after vitrectomy in rabbits. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 1401-1405.
100. Yoo JS, Sakamoto T, Spee C, Kimura H, Harris MS, Hinton DR, Kay EP, Ryan SJ. Cis-hydroxyproline inhibits proliferation, collagen synthesis, attachment and migration of cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 520-528.

101. Del Vecchio PJ, Bizios R, Holleran LA, Judge TK, Pinto GL. Inhibition of human scleral fibroblast proliferation with heparin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 1272-1276
102. Asaria RHY, Kon CH, Bunce C, Charteris DG, Wong D, Khaw PT, Aylward GW. Adjuvant 5-fluorouracil and heparin prevents proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 2001; 108:1179-1183.
103. Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Cheng L, Chaidhawangul S, Keefe K, McDermott CD, et al. The effect of prinomastat (AG3340), a potent inhibitor of matrix metalloproteinases, on a subacute model of proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 2000; 20: 447-453.
104. Prescribing information for Remicade for IV injection. Malvern, USA 1999: 136-146
105. Gardiner TA, Gibson DS, de Gooyer TE, de la Cruz VF, McDonald DM, Stitt AW. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 2005; 166: 637-644
106. Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfikakis PP, Vergados IA, Theodossiadis GP. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2009; 147: 825830.
107. Savur F, Aydemir O. Deneysel Proliferatif Vitreoretinopati Modelinde Oktreotid ve İnfliksımabın Sitokin Düzeylerine Etkisi. 2013
108. Mallet B, Vialettes B, Haroche S, Escoffier P, Gastaut P. Stabilization of severe proliferative diabetic retinopathy by long-term treatment with SMS 201-995. *Diabet & Metabolism* 1992; 18: 438-444
109. Chen F, O'Dorisio MS, Herman G, Hayes J, Malarkey WB, O'Dorisio TM. Mechanism of action of long-acting analogs of somatostatin. *Regulatory Peptides*. 1993; 44: 285-295.
110. Danesi R, Agen C, Benelli U, Di Paulo A, Nardini D. Inhibition of experimental angiogenesis by somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995). *Cancer Res* 1997; 3: 265-272.
111. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. Oct 5 2006;355(14):1419-1431.
112. Ogura Y, Roeder J, Korobelnik JF, et al. Intravitreal aflibercept for macular edema secondary to central retinal vein occlusion: 18-month results of the phase 3 GALILEO study. *Am J Ophthalmol*. Nov 2014;158(5):1032-1038.
113. Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U, et al. Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. Nov 2014;121(11):2247-2254
114. Pennock S, Haddock LJ, Elliott D, Mukai S, Kazlauskas A. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? *Progress in retinal and eye research*. May 2014;40:16-34.
115. Schubert CA, Kimura H, Spee C, Hinton DR, Gordon EM, Anderson WF, Ryan SJ. Retrovirus-mediated transfer of the suicide gene into retinal pigment epithelial cells in vitro. *Curr Eye Res* 1997; 16: 656-662.
116. Ikuno Y, Kazlauskas A. An in vivo gene therapy approach for experimental proliferative vitreoretinopathy using the truncated platelet-

- derived growth factor alpha receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul 2002;43(7):2406-2411.
117. Werner, E.; Bell, J. The preparation of methylguanidine, and of β dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J. Chem. Soc., Transactions*, 1921, 121, 1790-1795.
 118. Ben Sahra, I.; Le Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J.F.; Bost, F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol. Cancer Ther.*, 2010, 9(5), 1092-1099.
 119. Kourelis, T.V.; Siegel, R.D. Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med. Oncol.*, 2011, DOI: 10.1007/s12032-011-9846-7.
 120. Vazquez-Martin, A.; López-Bonet, E.; Cufí, S.; Oliveras-Ferraros, C.; Del Barco, S.; Martin-Castillo, B.; Menendez, J.A. Repositioning chloroquine and metformin to eliminate cancer stem cell traits in pre-malignant lesions. *Drug Resist. Updat.*, 2011, 14(4-5), 212-223.
 121. Menendez, J.A.; Cufí, S.; Oliveras-Ferraros, C.; Vellon, L.; Joven, J.; Vazquez-Martin, A. Gerosuppressant metformin: less is more. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(4), 348-362.
 122. Gonzalez-Angulo, A.M.; Meric-Bernstam, F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16(6), 1695-1700.
 123. Evans, J.M.; Donnelly, L.A.; Emslie-Smith, A.M.; Alessi, D.R.; Morris, A.D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, 2005, 330(7503), 1304-1305
 124. Jiralerspong, S.; Palla, S.L.; Giordano, S.H.; Meric-Bernstam, F.; Liedtke, C.; Barnett, C.M.; Hsu, L.; Hung, M.C.; Hortobagyi, G.N.; Gonzalez-Angulo, A.M. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2009, 27(20), 3297-3302.
 125. Cazzaniga, M.; Bonanni, B.; Guerrieri-Gonzaga, A.; Decensi, A. Is it time to test metformin in breast cancer clinical trials? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18(3), 701-705.
 126. Cufí S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Joven J, Menendez JA. Metformin against TGFbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis. *Cell Cycle* 2010; 9:4461-8; PMID:21088486; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.22.14048>
 127. Zhang X, Zhang C, Shen S, Xia Y, Yi L, Gao Q, Wang Y. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod* 2013; 28:3074-85; PMID:23980058; <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/det341>
 128. Zhang J, Shen C, Wang L, Ma Q, Xia P, Qi M, Yang M, Han B. Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells: involvement of the tumor suppressor miR30a and its target gene SOX4. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452:746-52; PMID:25201727; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.154>

129. Lu J, Shi J, Li M, Gui B, Fu R, Yao G, Duan Z, Lv Z, Yang Y, Chen Z, Jia L, Tian L. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF β -induced collagen production in mouse renal fibroblasts. *Life Sci* 2015; 127:59-65; PMID:25744403; <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.042>
130. Jung GS, Jeon JH, Choi YK, Jang SY, Park SY, Kim MK, Shin EC, Jeong WI, Lee IK, Kang YN, Park KG. Small heterodimer partner attenuates profibrogenic features of hepatitis C virus-infected cells. *Liver Int* 2015; 35:2233-45; PMID:25976932; <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12871>
131. Wang XF, Zhang JY, Li L, Zhao XY. Beneficial effects of metformin on primary cardiomyocytes via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Chin Med J* 2011; 124:1876-84; PMID:21740847
132. Han Xiao¹, Jianshu Zhang¹, Zhonghe Xu², Yenan Feng¹, Mingliang Zhang¹, Jianli Liu³, Ruifei Chen¹, Jing Shen¹, Jimin Wu¹, Zhizhen Lu¹, Xiaohong Fang³, Jingyuan Li² & Youyi Zhan. Metformin is a novel suppressor for transforming growth factor (TGF)- β 1. *ScRep.* 2016; 6: 28597. PMID:27349853
133. Xiao, H. et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 87, 504–513 (2010).
134. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), pp. 248-254.
135. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K and Imaizumi T: Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106: 130-135, 2002. 22. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L525-L534, 2007.
136. Heldin CH, Vanlandewijck M and Moustakas A: Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Lett* 586: 1959-1970, 2012
137. Saika S. TGF β pathobiology in the eye. *Lab Invest.* 2006;86(2): 106–115.
138. Ishikawa K, He S, Terasaki H, et al. Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy. *Sci Rep.* 2015;5:16386.
139. Liang CM, Tai MC, Chang YH, et al. Glucosamine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of retinal pigment epithelium cells in culture and morphologic changes in a mouse model of proliferative vitreoretinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2011;89(6):e505–e514
140. Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C, Kane R. The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4291–4299.
141. Chen CL, Chen YH, Tai MC, Liang CM, Lu DW, Chen JT. Resveratrol inhibits transforming growth factor- β 2-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelial cells by suppressing the Smad pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2017 Jan 11;11:163-173. doi: 10.2147/DDDT.S126743. eCollection 2017
142. A.Vazquezmartin, C.Oliverasferraros, S.Cufí, S.DelBarco, B. Martin-Castillo, and J. A. Menendez, “Metformin regulates breast cancer stem cello

- ntogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status,” *Cell Cycle*, vol. 9, no. 18, pp. 3807–3814, 2010,
143. M. Cerezo, M. Tichet, P. Abbe et al., “Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53dependent manner,” *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 12, no. 8, pp. 1605–1615, 2013. .
 144. Y. Wang, B. Yao, Y. Wang et al., “Increased FoxM1 expression is a target for metformin in the suppression of EMT in prostate cancer,” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 33, no. 6, pp. 1514–1522, 2014
 145. Z. Zhao, X. Cheng, Y. Wang et al., “Metformin inhibits the IL6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, article e95884, 2014
 146. El Messaoudi S, Rongen GA, de Boer RA, et al. The cardioprotective effects of metformin. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:445–453.
 147. Lin A, Sekhon C, Sekhon B, et al. Attenuation of ischemia– reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation. *Transplantation*. 2004;78:654–659.
 148. Seo-Mayer PW, Thulin G, Zhang L, et al. Preactivation of AMPK by metformin may ameliorate the epithelial cell damage caused by renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301:F1346–F1357
 149. de Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2008;38:159–165
 150. S. Thakur, S. Viswanadhapalli, J. B. Kopp et al., “Activation of AMP-activated protein kinase prevents TGF- β 1–induced epithelial-mesenchymal transition and myofibroblast activation,” *American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 8, pp. 2168–2180, 2015.)
 151. Yaodu Wang, Zhiyang Wu, and Likuan Hu. Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype, Metformin, and Survival for Colorectal Cancer Patients with Diabetes Mellitus II. *Gastroenterology Research and Practice* Volume 2017, Article ID 2520581, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2017/2520581>)
 152. Wang M, Weng X, Guo J, Chen Z, Jiang G, Liu X. Metformin alleviated EMT and fibrosis after renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail*. 2016;38(4):614-21. doi: 10.3109/0886022X.2016.1149770. Epub 2016 Feb 26.
 153. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, and Fujii N et al. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167–1174
 154. Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of smooth muscle actin in mechanotransduction. *Ex Cell Res*. 2006;312:205–214
 155. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 1980;283:249–25
 156. Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, et al. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice. *Lab Invest*. 2004;84(10):1245–1258
 157. Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semrl S, Takagawa S, Mori Y et al. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J Biol Chem* 2006;281:21183–21197.

158. Kita T, Hata Y, Arita R, et al. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(45):17504–17509
159. Hirayama K, Hata Y, Noda Y, et al. The involvement of the rhokinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(11): 3896–3903.
160. Ngo P, Ramalingam P, Phillips JA, Furuta GT . Collagen gel contraction assay. *Methods Mol Biol*. 2006;341:103-9.
161. Cufí S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Joven J, and Menendez JA (2010) Metformin against TGFb-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis. *Cell Cycle* 9:4461–4468
162. Lim JY, Oh MA, Kim WH, Sohn HY, and Park SI (2012) AMP-activated protein kinase inhibits TGF-b-induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *J Cell Physiol* 227:1081–1089
163. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. & Viollet, B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 20, 953–966 2014
164. Han J, Li Y, Liu X, Zhou T, Sun H, Edwards P, Gao H, Yu FS, Qiao X.. Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2018 Mar 7;13(3):e0193031. doi: 10.1371/journal.pone.0193031. eCollection 2018
165. Xu L, Kong L, Wang J, Ash JD. Stimulation of AMPK prevents degeneration of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Oct 9;115(41):10475-10480. doi: 10.1073/pnas.1802724115. Epub 2018 Sep 24.
166. Luodan A, Zou T, He J, Hen X, Sun D, Tang X, Xu H, .Rescue of Retinal Degeneration in rd1 Mice by Intravitreally Injected Metformin. *Front. Mol. Neurosci.*, 26 April 2019 | <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00102>
167. Kolb H. *Simple Anatomy of Retina*. 1995
168. P. N. Bishop, “Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 19, pp. 323–344, 2000.
169. Strauss, O. (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, 85(3), 845–881. doi:10.1152/physrev.00021.2004
170. Wiedemann P, Yandiev Y, Hui Y-N. *Ryan's Retina*. 3rd ed: Elsevier; 2018
171. Cui J, Lei H, Samad A, Basavanthappa S, Maberley D, Matsubara J, Kazlauskas A. PDGF receptors are activated in human epiretinal membranes. *Exp Eye Res* 2009; 88:438-44. [PMID: 19032953].
172. Lei H, Velez G, Cui J, Samad A, Maberley D, Matsubara J, Kazlauskas A. N-acetylcysteine suppresses retinal detachment in an experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Pathol* 2010; 177:132-40. [PMID: 20489144])
173. Smith L.E.H. IGF-1 and Retinopathy of Prematurity in the Preterm Infant. *Biol Neonate* 2005;88:237–244. <https://doi.org/10.1159/000087587>

