



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONLU HASTALARDA
MİKRORNA DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
SAĞLIKLI BİREYLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. SEVDA ERTEKİN
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. ÖZLEM YILDIRIM**

MERSİN – 2013



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

**YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONLU HASTALARDA
MİKRORNA DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
SAĞLIKLI BİREYLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. SEVDA ERTEKİN
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. ÖZLEM YILDIRIM**

**Bu tez BAP-TF CTB (SE) 2012-5 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir.**

MERSİN – 2013

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Atila ARGİN, Prof. Dr. Ayça YILMAZ, Doç. Dr. Ufuk ADİGÜZEL ve Doç. Dr. Ayşe Ayça SARI'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tezimin oluşumu, yapımı ve yazımı aşamasında yanımda olan; değerli zamanından fedakarlık etmekten kaçınmayan, eğitimimin her safhasında büyük katkıları olan tez hocam sayın Prof.Dr. Özlem YILDIRIM'a,

Biyokimya anabilim dalından sayın Prof. Dr. Lülüfer GÜMÜŐ, Yrd. Doç. Dr. Lokman AYZ ve Arş. Gör. Dr. Ayşegöl GÖRÜR'e ve

Beş yıl boyunca sevgi, saygı ve anlayışı paylaştığım asistan arkadaşlarıma, klinik hemşirelerimize ve personeline teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hayatımın hiçbir döneminde beni yalnız bırakmayan, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili aileme tüm kalbimle ve içtenlikle minnet ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Sevda ERTEKİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu	
Tarihçe ve Tanımı	9
Epidemiyolojisi	14
Risk Faktörleri	15
Patofizyolojisi	18
MikroRNA Yapısı ve Keşfi	23
MikroRNA Oluşumu	24
MikroRNA Fonksiyonu	26
Göz ve MikroRNA	27
Anjiogenez ve MikroRNA	27
Oküler Anjiogenez ve MikroRNA	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
BULGULAR	38
TARTIŞMA	43
SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	68
ŞEKİLLER DİZİNİ	69
TABLolar DİZİNİ	70

ÖZET

Yaşa bağı makula dejenerasyonu, retina pigment epiteli, Bruch membranı ve koriokapillarisin ilerleyici, dejeneratif bir hastalığıdır. Altmışbeş yaş ve üzerindeki popülasyonda geri dönüşümsüz görme kayıplarının en sık nedenidir.

Yaşa bağı makula dejenerasyonu'nun fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak birçok molekülün etkin rol oynadığı patolojik anjiogenezin önemli olduğu bilinmektedir. Son yıllarda insan vücudunda mikroRNA olarak adlandırılan küçük moleküller tespit edilmiş ve başta onkolojik hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıklarda serum ve doku düzeyindeki seviyelerinde değişiklikler saptanmıştır. Aynı zamanda bazı mikroRNA subtiplerinin anjiogenez ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak yaşa bağı makula dejenerasyonu fizyopatolojisinde bu moleküllerin rol oynadığı düşünülebilir.

mikroRNA ile yaş tip yaşa bağı makula dejenerasyonu ilişkisini araştırma amacıyla, Eylül 2012-Nisan 2013 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve yaş tip yaşa bağı makula dejenerasyonu tanısı alan 22'si erkek, 11'i kadın toplam 33 hasta çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu 17'si erkek, 14'ü kadın olmak üzere 31 sağlıklı bireyden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundan alınan periferik kan örneğinden sık olarak eksprese olduğu saptanan mikroRNA (Panel A-384 subtip) düzeyleri bakıldı. Bakılan mikroRNA'lardan 51 tanesinin artan ya da azalan düzeyde eksprese olduğu ancak bunlardan 17 tanesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Bununla birlikte 10 tane miRNA subtipinin yalnızca hasta grubunda eksprese olduğu izlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar, hastalığın patofizyolojisinde bu moleküllerin etkin olabileceğini gösterebilir. Aynı zamanda daha fazla hastanın katılımıyla yapılacak çok merkezli çalışmaların bu moleküller ile hastalık arasındaki ilişkiyi daha anlaşılır ve net bir şekilde ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Erken tanı, mikroRNA, tarama, yaş tip yaşa bağı makula dejenerasyonu.

ABSTRACT

Evaluation of microRNA levels in patients with age-related macular degeneration, and compared to healthy controls

Age-related macular degeneration is progressive and degenerative disease of the retinal pigment epithelium, Bruch's membrane and choriocapillaris. It is the most common cause of central vision loss in people over the age of 65. Pathophysiology of age-related macular degeneration is not been fully understood. However, pathological angiogenesis in which many molecules plays an active role, is known to be important. In recent years, microRNA, called small molecules, have been identified in human body. At various diseases, including oncological diseases, changes at serum and tissue levels of microRNA were determined. At the same time, some of the microRNA subtypes were associated with angiogenesis. Based on this thought, these molecules can play a role at the pathophysiology of age-related macular degeneration. In order to study the relationship between microRNA and wet age-related macular degeneration, 33 patients (22 male, 11 female) with wet age-related macular degeneration, referred to Mersin University Department of Ophthalmology in the period of September 2012– April 2013, were included into the study. The control group consist of 31 healthy people (17 male, 14 female). Peripheral blood samples of the patient and the control group were analyzed for levels of microRNA (Panel A-384 subtype), frequently expressed. microRNA expression of them was 51, increasing or decreasing, and 17 of expressed microRNA have been found to be significant compared with the control group ($p < 0.05$). However, 10 microRNA subtype was found to be expressed only in the patient group. Our results may show effectiveness of these molecules about the disease pathophysiology. We also think that a multicenter study with the participation of more patient will help us to reveal relationship between these molecules and the disease more clear and understandable.

Key words: Early diagnose, microRNA, screening, wet age related macular degeneration.

GİRİŞ VE AMAÇ

Geri dönüşümsüz körlüklerin başlıca nedenleri arasında yer alan YBMD, retina pigment epiteli (RPE), Bruch membranı ve koriokapillarisin ilerleyici ve dejeneratif bir hastalığıdır¹. Altmışbeş yaş ve üzeri popülasyonda santral görme kaybının en sık nedenidir². Özellikle gelişmiş toplumlarda yaşlı nüfusun artması nedeniyle YBMD insidansı artış göstermekte ve bu da günümüzde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır.

YBMD, kuru (nonneovasküler veya atrofik) ve yaş (neovasküler veya eksudatif) form olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Kuru tip YBMD olguları, büyük çoğunluğu oluşturmalarına rağmen, YBMD'ye bağlı yasal körlüklerin büyük çoğunluğunu yaş tip YBMD oluşturmaktadır³. Kuru tip YBMD druzen veya atrofi, RPE anomalileri ile, yaş tip YBMD ise koroidal neovaskülarizasyon ile kendini gösterir⁴.

Yaş tip YBMD, patolojik anjiogenezin önemli rol oynadığı hastalıkların başında gelmekte olup hastalık sürecinde birçok molekülün etkin olduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerin başında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gelmektedir. Yaş tip YBMD'li hastalardan elde edilen koroid neovasküler membran (KNVM) örneklerinde diferansiye olmuş RPE hücrelerinde VEGF'in artmış ekspresyonu izlenmiştir⁵. Bununla birlikte bu süreç yalnızca VEGF'e bağlanamamaktadır. Son yıllarda anti-VEGF ilaçların kullanıma girmesiyle bir grup hastanın başarı ile tedavi edilmesine karşın bir grup hastada da başarısız sonuçlar alınmıştır. Bu durum hastalığın fizyopatolojisinde yalnızca VEGF'nin rol oynamadığının ve başka faktörlerin de etkili olabileceğini göstermektedir.

MikroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 21–23 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli, kısa RNA molekül türleri olup dokular arasında farklı şekilde eksprese oldukları ve kan dolaşımında saptanabildikleri gösterilmiştir. Aynı zamanda tek bir miRNA'nın farklı fonksiyonları olan yaklaşık 200 hedef gene bağlandığı saptanmıştır. Bu nedenle tek bir miRNA, hücrenin yüzlerce fonksiyonunu etkileyebilmektedir. Bu moleküllerin fonksiyonları arasında, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, metabolik regülasyon, hafıza ve sinaptik gelişim, embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyüme kontrolü, anjiogenez, tümörögenез yer almaktadır. Tüm bu fonksiyonlardan yola çıkarak miRNA'ların birçok hastalık ile bağlantılı olması sürpriz değildir. Bu moleküller hücrelerin normal fonksiyonlarında görev aldıkları için meydana gelen miRNA

kusurlarında çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kas bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile ilişkileri ortaya konulmuştur. Tüm bu ilişkiler nedeniyle miRNA'ları hedefleyen tedavi yaklaşımları araştırılmaya başlanmıştır. Benzer şekilde YBMD tedavisinde miRNA'ların potansiyel bir terapötik hedef olduğu öne sürülmüştür⁶. Son yapılan çalışmalarda birçok vasküler hastalığın gelişiminde miRNA'ların önemli fonksiyonlara sahip olduğu ortaya konmuştur. Lin ve arkadaşları tarafından YBMD'li hastalardan elde edilen hücrelerle yapılan deneysel çalışmada miR-23a'nın RPE hücrelerini oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir⁷. Aynı zamanda yapılan bir başka çalışmada miRNA23, 27, 24'ün anjiogenez ve koroidal neovaskülarizasyonda etkin olabileceği saptanmıştır⁸.

Bu çalışmalardan yola çıkarak yaş tip YBMD'de ortaya çıkan patolojik anjiogenezin birçok faktörün katılımıyla ortaya çıktığı düşünülebilir. Bu potansiyel faktörlerden birisi de miRNA ailesinin üyeleridir. Ancak yaş tip YBMD ile miRNA'lar arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışma sayısı oldukça az olup deneysel çalışmaların ilerisine geçememiştir. Bu çalışmanın amacı yaş tip YBMD'li hastalardaki miRNA profilini çıkarmak ve bu sonuçları sağlıklı bireylerden elde edilen miRNA profili ile karşılaştırmaktır. Bilindiği üzere çeşitli kanser türlerinde erken teşhis amacıyla kandaki miRNA düzeylerinin ölçümleri yapılmakta ve erken teşhis-tarama testleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Benzer şekilde bu tarama ve erken teşhis yöntemi yaş tip YBMD hastaları için de geliştirilebilir. Aynı zamanda bu hastalarda anlamlı şekilde artış gösteren miRNA tipleri tespit edilebilirse yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilir.

Çalışmamızda miRNA ile yaş tip YBMD ile arasında bir ilişki olup olmadığının tanımlanması, YBMD'de genetik yatkınlığın belirlenmesi ve erken tanı konulması ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU

Tarihçe ve Tanım

YBMD ilk kez 1905'de Oeller tarafından tanımlanmıştır⁹. Hastalık; Gass'ın 1967'de, makulanın dissiform dekolmanı ile sonlanan koriokapillarisdeki eksudatif reaksiyona, koroide ait dejeneratif, iltihabı ve neoplastik hastalıkların sebep olabileceğini ifade etmesi ile 'senil makula koroid dejeneresansı' adıyla anılmaya başlanmıştır¹⁰.

YBMD makula bölgesinde nöroretina-RPE, Bruch membranı ve koriokapillaris kompleksi dejenerasyonu ile seyreden, santral görme kaybına yol açan, makular alanda druzen oluşumu, retinal ya da subretinal hemorajiler, subretinal ve intraretinal sıvı birikimi, RPE' nin atrofisi, dekolmanı ve/veya fibröz skar oluşumu ile karakterize dejeneratif bir retina hastalığıdır¹¹⁻¹³.

Sınıflandırma

YBMD'nin atrofik (kuru, non-neovasküler) ve eksüdatif (yaş, neovasküler) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Kuru tip, YBMD'li olguların %90'ını oluşturmaktadır. Hastalığın ana klinik bulgusu RPE'de metabolik ürünlerin birikmesine bağlı olarak gelişen druzen ve RPE atrofi- hipertrofisidir. YBMD'ye bağlı ileri görme kayıplarının %10-20'sinden atrofik tip sorumludur. Eksüdatif tip, YBMD'nin %10'unu oluşturmasına karşın, legal körlüklerin %80-90' ından sorumludur. Koroidden kaynaklanan yeni damarların Bruch membranını geçerek subretinal aralığa doğru ilerleyip bu bölgede fibrovasküler kompleks oluşturmasıyla karakterizedir¹⁴⁻¹⁷.

ATROFİK (KURU) TİP YBMD

Druzen, RPE değişikliği, RPE'nin coğrafik atrofisi ve fokal hiperpigmentasyonu atrofik tip YBMD'nin karakteristiğidir. Atrofik (kuru) tip, YBMD'nin %90'ından sorumlu iken hastaların ancak %10'unda ağır görme kaybı oluşturur. Görme kaybının yıllar içinde yavaş bir ilerleme gösterdiği kuru tip, yaş tipe dönüştüğü takdirde ani görme azalması gelişebilir¹⁴.

Druzen

İlk defa 1854'de Donders tarafından tanımlanmıştır^{18,19}. YBMD'nin erken bulgusu olarak kabul edilir. Çok sayıda, sarı renkli, hafif kabarık, değişik büyüklükteki birikintiler olarak tanımlanır. Bu birikintiler Bruch membranının iç kollajenöz tabakası

ile RPE bazal membranı arasında (bazal laminar druzen) ya da RPE ile RPE bazal membranı arasında (bazal lineer druzen) yerleşen hücre dışı materyalden oluşur²⁰.

Druzen boyut ve görünümüne göre sınıflandırılabilir:

Boyuta Göre:

- 1- Küçük druzen: <63 mikron,
- 2- Orta druzen: 63- 125 mikron,
- 3- Büyük druzen: >125 mikron.

Klinik Görünümüne Göre:

Sert Druzen: En sık görülen druzen tipidir. Çapı 63 mikrondan küçük, sınırları belirgin, sarı-gri renkte görülür. Bruch membranının iç yüzeyinde periodik asit-schiff (PAS) pozitif hyalin materyal ve RPE'deki lipid birikimlerinden oluşur. Fundus floresein anjiografide (FFA) sert druzenin hiperfloresansı erken ve parlaktır, pencere defekti olarak görülür. İndosiyenin yeşil anjiografide (İSYA) keskin sınırlara sahip hiperfloresan noktalar şeklinde görülür²¹.

Orta yaşı geçkin insanların %83'ünde, 40 yaş üzeri postmortem gözlerin %87'inde görüldüğü bildirilmiştir²¹⁻²³. Koroid neovaskülarizasyonu (KNV) gelişimi için risk oluşturmadıkları kabul edilmektedir²⁴.

Yumuşak Druzen: Yumuşak druzen 43-54 yaş arasında %1,9; 75 yaş üzerinde ise %24 oranında görülmüştür.²⁵ Çapı 63 mikrondan büyük, sarı, sınırları belirsiz farklı büyüklük ve şekilde olabilen amorf yapıda bazal lineer birikimlerdir. Genellikle birleşme ve kümeler oluşturma eğilimindedirler. Bin mikronun üzerine çıktıklarında drusenoid pigment epitel dekolmanı (PED) olarak tanımlanırlar. FFA'da zayıf gecikmiş hiperfloresan, İSYA'da ise tüm fazlarda hipofloresan özellik gösterirler. Konfluent ve büyük yumuşak drusende KNV gelişme riski oldukça fazladır^{20,26}. Hem insidansı hem de prevalansı yaşla ilişkilidir. Makular fotokoagülasyon çalışma (MPS) grubunun diğer gözlerle ilgili 5 yıllık prospektif çalışmasında bir gözde neovaskülarizasyon geliştikten sonra diğer gözde KNV gelişme olasılığı büyük yumuşak drusenli gözlerde %30 olarak verilmektedir^{21,26-29}.

Gerileyen ve Kalsifik Druzen: Keskin sınırlı, beyaz, kalsifiye, pigment birikimleri ile RPE incilmesi veya atrofisinin de görülebildiği lezyonlardır. FFA'da pencere defektlerinin olduğu hiperfloresan görünüm varken kalsifik druzende ise hipofloresans izlenir. Bu lezyonlar, İSYA'da hiperfloresans görünüm verirler²⁶.

Druzenin gerilemesiyle, incelmış RPE veya fokal jeografik atrofi alanları ortaya çıkar. Jeografik atrofiden önce görülebilen form 'nonjeografik atrofi' olarak tanımlanır ve pigment birikintileri, hiperpigmentasyon ve üzerindeki nörosensoryal retina da incelme ile karakterizedir. Batı ülkelerinde görülme sıklığı erişkinlerde %8-10 düzeyindedir²⁷. MPS grubunda fotokoagulasyon uygulanan KNV'li gözlerde diğer gözde nonjeografik atrofi olduğunda neovaskülarizasyondaki nüks oranı daha yüksek bulunmuştur³¹⁻³³.

Retiküler Psödodruzen: Retiküler psödodruzen, makulada, en çok üst temporal ark boyunca görülen sarımtırak, sınırları belirsiz, yuvarlak ya da oval, 125-250 mikron büyüklüğünde düşük koroidal perfüzyona bağlı geliştiği düşünülen lezyonlardır. Başlangıçta ayrı ayrı duran bu noktalar daha sonra dallar oluşturacak şekilde birleşir ve sınırları belirsiz bir ağ tabakası halini alır. FFA'da genellikle görülmezken, İSYA' da erken fazda büyük koroid damarlarının keskinliği kaybolmakta, geç fazda ise hipofloresan noktalardan oluşan bir görünüm ortaya çıkarmaktadır²⁶. Kırk yaş üstü prevalansı %0.7 olarak bulunmuştur. Retiküler psödodruzenli gözler, KNV için risk taşırlar . Retiküler psödodruzenli ve üç yıl takip edilen hastaların %66'sında bir veya iki gözde KNV geliştiği bildirilmektedir³¹⁻³³.

RPE Değişiklikleri: YBMD'de RPE hücrelerinde azalma, atrofi, hacim kaybı, fokal hiperpigmentasyon gelişebilir. Fokal RPE hiperpigmentasyonu kuru tip YBMD'nin önemli bir bulgusudur. Tek taraflı neovasküler YBMD gelişen hastaların diğer gözlerinde yumuşak druzen ve fokal RPE hiperpigmentasyonu varlığında 5 yıllık KNV gelişim riski %58-73 olarak bulunmuştur²⁶.

Noncoğrafik Atrofi: Keskin sınırlı ve alttaki koroidal damarların seçilebildiği RPE'nin fokal atrofisidir. Başlangıçta fovea dışında belirip zamanla foveayı da etkileyebilir. RPE ve fotoreseptör kaybı ile birlikte koriokapillariste vasküler yetmezlik söz konusudur. Zamanla atrofik alanlar içinde büyük koroidal damarlar belirgin hale geçer. FFA'da erken dönemde pencere defektine uyacak şekilde lekeli hiperfloresans özellik gösterirken, geç dönemde hiperfloresans giderek azalır.

Coğrafik Atrofi: Kuru tip YBMD'nin son evresidir. RPE'de geniş atrofi alanları ile beraber sensoriyal retina ve koriokapillarisin atrofisi de izlenir. En az 175 µm çapında bir sahada koroid damarlarının görünmesine yol açan, keskin sınırlı yuvarlak veya oval, hipopigmentasyon-depigmentasyon ya da RPE'nin tam kaybı ile

karakterize alan olarak tanımlanmıştır. Beraberinde sensoryel retina ve koriokapillaris atrofi de mevcuttur. Atrofi genellikle, fovea çevresinde mikoretiküler hiperpigmentasyon bandında başlar ve at nalı şeklinde ilerler. YBMD'nin %12-21'inde coğrafik atrofiye bağlı ciddi görme kaybı gelişmektedir³⁴. Coğrafik atrofi, 5-10 yıl içerisinde körlüğe yol açmakta ve bilateral olmaya meyil göstermektedir^{35,36}. Bilateral olması durumunda koroid neovaskülarizasyonu gelişme riski 2 yılda %2, 4 yılda %11 olarak bulunmuştur³⁷. FFA' da erken fazda koriokapillaris atrofisine bağlı hiperfloresans izlenmezken, geç dönemde koroid ve skleranın boyanması nedeniyle hiperfloresans izlenir³⁸.

EKSÜDATİF (YAŞ) TİP YBMD

YBMD'nin %10'luk kısmını oluşturur. Bunun yanında ileri görme kayıplarının %80-90'ından sorumludur. Eksüdatif tip YBMD'de KNV için en spesifik semptom metamorfopsidir. Hastalar metamorfopsinin yanı sıra ani, ilerleyici görme azalması, santral veya parasantral skotom, kontrast hassasiyetinde azalma gibi şikayetlerle başvurabilir. MPS grubu KNV'yi FFA'daki görünümüne göre **klasik** ve **gizli KNV** olmak üzere iki ana başlık altında tanımlamıştır^{14,39,40}.

A) Klasik KNV: Bruch membranındaki bir çatlaktan koroid kapillerinin proliferasyonu sonucu, angiogramın erken fazında, sınırları son derece iyi belirlenen, komşu dokulardan ayırt edilebilen parlak hiperflöresans veren ve giderek flöreseinin sızması sonucu geç göllenme tarzında çevresindeki subsensoryal retinal alanı sızıntı ile dolduran membranlardır. YBMD'lerin %12'si yaş tiptedir ve bunların %13'ü klasik KNV özellikleri gösterir.

Klasik KNV foveal avasküler zon (FAZ) merkezi ile olan mesafesine bağlı olarak 3'e ayrılır⁴¹.

Subfoveal KNV: FAZ merkezini tutanlar,

Ekstrafoveal KNV: FAZ merkezine 200 mikrondan uzak olanlar,

Jukstafoveal KNV: FAZ merkezine 200 mikrondan daha yakın olup merkezi tutmamış olanlar.

Klasik KNV içerdiği klasik komponentin miktarına göre ise saf klasik, baskın klasik ve minimal klasik lezyon olarak 3'e ayrılabilir:

Saf Klasik KNV: Klasik KNV alanının lezyonun tamamını kaplaması,

Baskın Klasik KNV: Klasik KNV alanının, tüm lezyon alanının %50 veya üzerini kaplaması,

Minimal Klasik KNV: Klasik KNV alanının, tüm lezyon alanının %50'sinden daha azını kaplaması,

B) Gizli (Okült) KNV: Klasik dışı tüm görünümleri kapsayan subretinal pigment epitelyum lezyonudur. FFA'da flöresein göllenmesinin kesin odağı net olarak izlenmeyebilir. Koroidal flöresansın görülmesini engellemeye yetecek kalınlıkta kanama olması, hiperplastik pigment, RPE'nin seröz dekolmanları, KNV'nin yavaş kan akımı veya fibröz doku nedeniyle organize olmuş kabarık alanda flöresansın blokajına bağlı olarak, KNV sınırlarını maskeleyen özellikler ortaya çıkar⁴²⁻⁴⁴. FFA'daki görüntüsüne göre 2 tip gizli KNV paterni mevcuttur.

Bunlar pigment epitel dekolmanı ve kaynağı belirsiz geç kaçaktır²⁵.

1- Pigment Epitel Dekolmanı: RPE'nin düzensiz elevasyonu mevcuttur. Sınırları belirsiz, granüler tarzda minimal hiperfloresans ardından giderek artan ancak klasik KNV kadar parlak izlenmeyen hiperfloresans verir. PED;RPE altındaki materyalin özelliklerine göre hemorajik, seröz, druzenoid ve fibrovasküler gibi alt tiplere ayrılabilir^{25,40}.

Hemorajik PED: KNV'nin pigment epiteli veya nörosensöryel retina altındaki boşluğa kanamasıyla gelişir. Başlangıçta koyu renklidir ve koroid melanomuyla karışabilir. FFA'da koroidal floresansı bloke eder, zamanla rengi açılır ve sarılaşır. Bazen bu kanama çok masif bir hal alır ve hemorajik retina dekolmanına veya vitreus hemorajisine yol açabilir.

Seröz PED: Erken fazdan itibaren giderek artan parlak, keskin sınırlı bir hiperloresans şeklinde görülür. Geç dönemlerde sızıntı yoktur ya da azdır.

Druzenoid PED: FFA'da hafif bir floresans verir ve tüm angiogram boyunca değişmez. Çok sayıda yumuşak druzenin birleşmesinden oluştuğu için girintili-çıkıntılı kenarlara sahiptir.

Fibrovasküler PED: KNV'de FFA'daki floresans hafiftir ve dolması yavaş ve lekelidir. Tüm angiogram boyunca hiperplastik pigment veya fibröz dokuya bağlı floresans blokajı değişmez.

2- Kaynağı Belirsiz Geç Kaçak: FFA'nın erken fazlarında kaynağı belirlenemeyen, zayıf hiperfloresans veren, geç fazda ise RPE düzeyinde sınırları

belirsiz benekli hiperfloresans ve boyanın sensoryal retina altında göllenmesine bağlı yaygın sızıntı ile karakterizedir⁴⁵.

Bunların dışında yaş tip YBMD'de görülebilecek diğer bulgular ise şunlardır:

Vitreus Hemorajisi: KNV'den kaynaklanan kanın, vitreusa geçmesi ciddi görme kaybı ile beraber, ciddi merkezi ve periferel görme alanı kaybına da yol açar.

Ağır Subretinal Hemoraji: Ender bir tablodur. Çok nadir olarak total hemorajik dekolman ve sekonder açı kapanması glokomuna yol açabilir. Antikoagülan tedavinin bu tabloya yol açabileceğine dair çelişkili sonuçlar mevcuttur⁴⁶.

RPE Yırtığı: Fibrovasküler veya seröz PED varlığında ya da laser fotokoagülasyon uygulamasından sonra gelişebilir. RPE'nin alttaki sıvının veya fibrovasküler dokunun gerilme gücüne dayanamaması sonucu gelişir. Nadiren seröz retinanın akut dekolmanı da gelişebilir.

Diskiform Skar: YBMD'nin doğal seyri diskiform skar ile sonlanır. Genellikle sarı-beyaz renktedir. Lezyondaki aktif KNV komponenti veya eşlik eden pigment epitel atrofisine bağlı olarak klinik ve angiografik görüntüler farklılık gösterir. Genellikle lezyonun ortasında skar, periferinde aktif KNV gözlenir. Diskiform skarın fibrotik kısmı geç fazda boyanırken, aktif kısmı sızıntıya neden olur. Hiçbir floresein sızıntısı yoksa saf diskiform skar olarak, aktif KNV ile birlikte lezyonun dörtte birinden az kısmını kaplayan skar dokusu varsa 'neovasküler skar' olarak adlandırılır. Skar dokusunda RPE hiperplazisinin derecesine göre hiperpigmentasyon görülür. Skar çevresinde veya üzerinde hemoraji ya da lipid bulunabilir. Diskiform skarın üzerinde retina atrofiktir²³.

YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU EPİDEMİYOLOJİSİ

Topluma dayalı yapılan çalışmalarda YBMD prevalansı değişiklik göstermektedir^{14,47-51}. Bu değişikliklerin nedeni YBMD tanımlamasının farklılık göstermesi, sınıflamanın farklı yapılması ve çalışma kapsamındaki grupların yaş, sosyodemografik ve genetik farklılıklar göstermesine dayanmaktadır. Beaver Dam çalışması, Blue Mountain çalışması ve Rotterdam çalışmalarında aynı standarda sahip renkli fundus fotoğraflarının değerlendirilmesine göre YBMD prevalansı belirtilmiştir.^{48,50} Beaver Dam çalışmasında YBMD prevalansı % 1.7 olarak belirtilirken, bu oran Rotterdam çalışmasında % 1.2, Blue Mountain çalışmasında %

1.4 olarak bildirilmiştir. Bu üç çalışma grubu ortak yöntem olarak stereoskopik çekilen makula fotoğraflarını temel almışlar ve lezyonu Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System (WARMGS)'ine göre evrelendirmişlerdir⁵².

YBMD'nin görülme sıklığı yaşla beraber anlamlı şekilde artmaktadır. Genellikle bilateral görülmekle birlikte tutulum zamanı ve şiddeti açısından gözler arasında farklılıklar görülebilir. Gözlerden birinde KNV varlığı durumunda diğer gözde 5 yıl içerisinde KNV gelişme riski %50-60 civarındadır²⁶. YBMD insidansını belirlemek adına birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların ortak noktaları yaşla birlikte insidansın arttığıdır^{21,53}. Beaver Dam çalışmasında erken YBMD'nin 5 yıllık insidansı 43-54 yaşları arasında %3,9; 75 yaş ve üzerinde %22,8; geç YBMD'nin 5 yıllık insidansı tüm yaş gruplarında %0,9; 75 yaş ve üzerinde %5,4 olarak bildirilmiştir²¹. POLA çalışmasında ise YBMD'nin tüm yaş gruplarında 3 yıllık insidansı %0,49 iken 80 yaş üzerinde %3,41'e ulaştığı saptanmıştır⁵.

YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU RİSK FAKTÖRLERİ

YBMD için topluma dayalı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmış risk faktörleri yaş, etnik köken, heredite ve sigaradır.

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu gelişiminde muhtemel risk faktörleri ise şöyle sıralanabilir: Cinsiyet, sosyoekonomik durum, iris rengi, maküladaki pigment yoğunluğu, katarakt ve cerrahisi, refraktif kusur, kardiovasküler hastalıklar, hipertansiyon, serum lipidleri ve diyetdeki yağ miktarı, vücut kitle indeksi, bel çevresi uzunluğu, antioksidan enzimler, güneş ışığı maruziyeti, diyetle balık tüketimi, ilaçlar, alkol tüketimidir.

Kanıtlanmış Risk Faktörleri:

1) Yaş: İlerleyen yaş YBMD için en kesin risk faktörüdür ve yaş ilerledikçe görülme sıklığı artmaktadır. Özellikle 90 yaş üzeri tüm bireylerde YBMD bulguları izlenmektedir⁵⁶. Framingham Eye çalışmasında herhangi bir evredeki YBMD prevalansı 52-64 yaş arasında %2, 65-74 yaş arasında %11 iken, 75 yaş ve üzerinde %28 bulunmuştur⁴⁹. Diğer iki büyük epidemiyolojik çalışma olan Beaver Dam Eye ve Rotterdam çalışmalarında eksüdatif YBMD prevalansı sırasıyla 55-64 yaş arası %0.6 ve %0.1, 75 yaş ve üzerinde %7.1 ve %7.4 olarak tespit edilmiştir^{21,53}.

2) Sigara: Sigara kullanımı YBMD'nin herhangi bir formu için tartışmasız, önlenemez bir risk faktörüdür^{21,49}. YBMD ile sigara arasında içilen paket yıla bağımlı

olan bir ilişki mevcuttur. Sigara içiminin bırakılması ile risk giderek azalır. Sigara içimine bağlı serum antioksidan seviyesi azalmakta, endotelial hücre aktivasyonu ve lökosit adezyonu artmakta ve vazokonstriksiyona bağlı koroid kan akımında azalma, trombosit agregasyonunda artma olmaktadır. Tüm bu faktörlere bağlı RPE sayısında azalma ve RPE detoksifikasyon mekanizmasında bozulmaya sekonder YBMD riskinin arttığı düşünülmektedir⁵⁷⁻⁵⁹.

3) Irk-Etnik Faktörler: Erken ve ileri YBMD'nin beyazlarda siyah ırka göre daha sık olduğu bildirilmiştir^{60,61}. Bu durum, zencilerdeki melanin pigmentinin, serbest radikalleri temizleme etkisi veya pigment epitelini, Bruch membranını, koroidi ve dış retinayı predispozan faktörlere karşı koruyucu etkisi ile açıklanmaktadır^{39,48,49}. Bazı toplumlarda coğrafik atrofi daha sık görülürken, bazı toplumlarda neovasküler YBMD daha sık görülmektedir ve bu değişikliğin nedeni tam olarak bilinmemektedir⁶².

4) Genetik Faktörler: Ailesel yatkınlık YBMD gelişiminde bir diğer kesin risk faktörüdür. Özellikle ikiz kardeşler üzerinde yapılan çalışmalarda YBMD'de genetik predispozisyonun olduğu gösterilmiştir⁵¹. YBMD riski aile öyküsü varlığında 2.4 kat, özellikle yaş tip YBMD riski 3.1 kat artmaktadır⁶³.

Olası Risk Faktörleri:

1) Cinsiyet: Bazı çalışmalarda cinsler arasında belirli bir fark olmadığı belirtilse de, diğer bir çok çalışmanın ortak noktası kadınlarda erkeklere göre hafifçe daha yüksek oranda görüldüğüdür^{49,53,64}. YBMD'nin özellikle 75 yaş üstü kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmesi, kadınların nispeten daha uzun yaşaması ve menopoz sonrası östrojenin koruyucu etkisinin ortadan kalkmasına bağlanmaktadır^{57,66,67}. Östrojen tedavisi alan postmenapozal kadınlarda neovasküler YBMD riskinin düşük olduğunu gösteren pek çok çalışma olduğu gibi⁶⁷, arada hiçbir ilişkinin bulunmadığını belirten çalışmalar da vardır⁶⁸.

2) Sosyoekonomik Faktörler: Bazı çalışmalarda, eğitim düzeyi ile YBMD riskinin ters orantılı olduğu belirtilirken,⁶⁹ bazı çalışmalarda ise makulopati sıklığı ile eğitim düzeyi, maddi kazanç, iş durumu ve medeni hal arasında ilişki bulunmadığı gösterilmiştir^{24,70}.

3) Alkol Kullanımı: Bazı çalışmalarda alkol ile YBMD arasında ilişki bulunmazken,⁶⁹ bazılarında ilişki bulunmuştur⁷⁰.

4) Güneş Işığı Maruziyeti: İleri YBMD riskinin yaz aylarında açık havada kalma süresinin artması ile iki katına çıktığını²⁴, 5 ve 10 yıllık erken YBMD insidansının ve progresyonunun da güneş ışığına maruziyet ile arttığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur^{69,71}. Beaver Dam çalışmasında, UV ışınlarının YBMD riskini arttırdığı belirtilmiştir⁵⁷.

5) Vücut-Kitle İndeksi: Vücut-kitle indeksinin (VKİ) normal oranların dışında olması ve diyetle fazla miktarda doymuş yağ asidi ve kolesterolün tüketilmesi, aterosklerotik sürecin hızlanmasına ve Bruch membranının yapısının bozulmasına yol açarak YBMD riskini arttırdığına dair yayınlar mevcuttur^{72,73}.

6) Sistemik Hastalıklar: Kardiyovasküler hastalık YBMD ile ilişkili bulunmuştur. Karotis arter bifurkasyon noktasında aterom plağı varlığının ileri YBMD riskini 4.5 kat; ortak karotis arterde aterom plağı varlığının ise 2 kat artırdığı gösterilmiştir⁷⁴. Yüksek kan basıncı ile YBMD arasında hafif-orta düzeyde bir ilişki olduğu ve hipertansiyonun süresinin değerlendirilmesinin gerektiği belirtilmiştir⁷⁵. Dislipideminin YBMD gelişim riskini artırıcı faktörler arasında olduğu kabul edilmektedir⁷⁶. Diyabet ve hiperglisemi ile YBMD ilişkisine dair ise çok az sayıda çalışma mevcuttur⁷⁷. Koroid vasküler yatağındaki ateroskleroz, YBMD gelişimi için risk faktörüdür. Hiperhomosistinemi de trombozise yatkınlık yaratarak, koriokapillarisin damar duvarlarında kalınlaşma oluşturarak, koroidde ekstrasellüler matriks artışı yaparak iskemi oluşturur. Bu patolojinin oluşturduğu iskemi sebebiyle özellikle yaş tip YBMD gelişim riskinin arttığı bildirilmiştir⁷⁸.

7) İlaçlar: Antiasitler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, hidroklorotiazid, tiroid hormonları, beta bloker, östrojen ve progesteronun 5 yıldan uzun kullanımı risk faktörü olarak bulunurken, statin ve aspirin kullanımının YBMD gelişim riskini azalttığı gösterilmiştir. Statinlerin ve aspirinin de özellikle YBMD hasta grubu içerisinde KNVM oluşma riskini azalttığı bildirilmiştir. Statinlerin bu etkilerinin, kan lipid seviyelerini düzenleyici etkilerinin yanı sıra, antiinflamatuvar etkilerine ve antioksidan özelliklerine bağlı olduğu öne sürülmüştür. Aspirinin de antiaterosklerotik etkisi ile KNVM gelişiminde önleyici rol oynayabileceği bildirilmiştir⁷⁹.

8) Antioksidanlar, Vitaminler, Mineraller: Antioksidan enzimler (Glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz), C vitamini, E vitamini, karotenoidler (alfa ve beta karoten, kriptoksantin, lutein, zeaksantin), ayrıca selenyum, çinko, bakır,

magnezyum gibi eser elementler retinanın antioksidan fonksiyonunda rol oynamaktadır. Antioksidanlar, fotooksidasyon ve lipid peroksidasyonuna bağlı serbest radikallerin yol açtığı fotoreseptör hasarını önler ve tamir ederler⁸⁰. Serum karotenoid seviyesinin (lutein ve zeaksantin) yüksekliği ile neovasküler YBMD riskinin azaldığı saptanmıştır⁸¹. Bazı çalışmalarda oral çinko alımının YBMD gelişimini geriletmediği gösterilse de hastalıkla ilişkili olarak serum çinko seviyelerinde azalma tespit edilememiştir. Yapılan son çalışmalarda, kandaki A vitamini miktarının artması ile RPE'deki lipofuskinin arttığı, E vitamini seviyesinin artması ile de azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Meyve ve yeşil yapraklı sebze tüketen, serum antioksidan seviyeleri yüksek olan kişilerde, YBMD gelişme riskinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunduğu bildirilmiştir⁸²⁻⁸³. Omega 3 yağ asitlerinin de YBMD patogenezinde koruyucu olabileceği düşünülmektedir. Haftada en az iki kez balık tüketimi ileri YBMD riskini anlamlı olarak azaltmaktadır⁸⁴.

9) Refraktif Kusur: Hipermetropik refraktif kusuru olanlarda daha yaygın drusen ve neovasküler YBMD olduğu saptanmıştır^{24,69}. Ancak bütün çalışmalar bunu desteklememektedir^{71,85}.

10) İris Rengi: İris renginin YBMD ile ilişkisine dair çelişkili sonuçlar mevcuttur^{61,86}. Bazı çalışmalarda, açık renk irisi olan hastalarda YBMD'nin daha sık olduğu bildirilmiştir⁸⁷. Oküler melaninin, antioksidan ve belki de antianjiogenik etkilerinin olması nedeniyle; ışık nedeniyle oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmektedir⁶¹.

11) Katarakt: YBMD ile ilişkili olduğu düşünülen bir diğer faktör de kataraktır. Kataraktın ışık hasarını önleyerek koruyucu olduğunu savunan çalışmaların⁷⁶ yanı sıra, kataraktın YBMD için herhangi bir koruyucu etkisi olmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur⁵⁰. Katarakt cerrahisinin neovasküler YBMD sıklığını artırdığı ileri sürülmektedir^{88,89}. Patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber, kataraktöz lensin ultraviyole ışınlarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve ayrıca cerrahi sonucu gelişen inflamatuvar olayların etkisinin olabileceği düşünülmektedir⁸⁹.

YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU PATOFİZYOLOJİSİ

Yaşlanma, oksidatif stres, iskemi, inflamasyon ve anjiogenez patofizyolojide yer alan mekanizmalardır.

1.Yaşlanma

a) RPE Hücreleri: RPE, fotoreseptörler için hayati önemi olan metabolik ve destekleyici fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca kan-retina bariyerinin bütünlüğünün sağlanmasında ve vitamin A bağımlı vizüel siklusta önemli yeri vardır. Fotoreseptörlerin dökülen apikal dış segmentleri de RPE tarafından fagosite edilir. Yaşla beraber RPE hekzagonal morfolojisini kaybederek sayıca azalmaya başlar ve melanozomlarını kaybeder^{90,91}. Melanin kaybı oksidatif hasarı artırır⁹². Yaşla birlikte mitoz göstermeyen RPE hücrelerinin sindirme kapasitesi oksidatif strese bağlı olarak azalır ve sindirilemeyen hücre elemanları lipofuksin ve melanolipofuksin olarak lineer granüller şeklinde RPE bazal yüzeyinin altında birikmeye başlar. Perokside lipidlerden oluşmuş sitoplazmik yıkım ürünü olan sindirilemeyen lipofuksin, RPE lizozomlarında zamanla aşırı birikime uğrar ve RPE'nin fagositoz yeteneğini bozarak RPE ve fotoreseptör hücre apoptozunu uyarır⁹³. Artık maddeler, RPE sitoplazmasının ilk dekada %1'ini, 80 yaşında ise %19'unu işgal etmektedir⁹¹. Böylece yaşlanma ile fonksiyonel sitoplazma azalır ve RPE fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar. Lipofuksin, RPE hücrelerinde oksidatif hasara ve lizozomal enzimatik faaliyetin azalmasına neden olabilir^{94,95}. Lipofuksinin toksisitesi ve oluşan reaktif oksijen radikalleri apoptozisi indükleyerek RPE kaybına neden olurlar⁹⁶. Fotoreseptörler ve koriokapillaris için oldukça önem taşıyan RPE hücrelerinin ölümünü fotoreseptör kaybı ve koriokapillaris atrofisi izler⁹⁷.

b) Bruch Membranı: RPE ile koroid arasında bulunan Bruch membranı 5 tabakadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; RPE bazal membranı, iç kollajen tabaka, elastik tabaka, dış kollajen tabaka ve koriokapillarisin bazal membranıdır. Bruch membranı kalınlığı yaşam boyunca artarak doğumdaki 2 µm'den, 10.dekada 4-6 µm'ye ulaşır⁹⁸. Bu temel yapı bu haliyle yalnızca genç insanlarda izlenmekte ve yaş ilerledikçe de birtakım birikintilerin toplanması ve eşlik eden birtakım yapısal değişiklikler ile bu normal görünümünü kaybetmektedir. Bruch membranındaki ilk dejenerasyon belirtileri bazal lineer depozit adı verilen veziküler, granüler ve filamantöz yapıdaki materyalin, iç ve dış kollajen tabakada birikmesidir. Birçok araştırmacı bazal lineer depozitlerin, RPE kaynaklı olduğunu ve fotoreseptör hücrelerin dış segment materyallerinin RPE tarafından fagositozu ile oluştuğunu düşünmektedir⁹⁹. Matriks metalloproteinazlar ekstrasellüler matriks yıkımında görev

alırlar. Yaşla birlikte Bruch membranında inaktif MMP2 ve 9 birikir^{100,101}. Koriokapillaris dansitesi ve lümen çapında azalma da, Bruch membranındaki atıkların temizlenmesini azaltır. Yaşlanmayla birlikte Bruch membranında Tip 1 kollajen artar¹⁰²⁻¹⁰⁵. Proteinler arası çapraz bağlar ve glikozaminoglikan boyutlarında artış olur. İleri glikozilasyon ürünleri birikerek makromoleküllere bağlanır. Membranöz atıklar, filamentöz ve veziküler materyaller birikir. Makula altı Bruch membranında kollajen dışı proteinler de artar, bu durum fotoreseptör yoğunluğunun makulada daha fazla olması ile ilişkilendirilmektedir¹⁰⁵. Tüm bunların sonucu olarak, Bruch membranının hidrolik iletkenliği düşer¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Küçük ve büyük moleküllerin geçirgenliği azalır. Yaşlanma ve bazal lamina depozit birikimi ile birlikte Bruch membranındaki kalınlık artışı, Bruch membranının fibröz tabakalarındaki kollajen ve elastik liflerde sayıca artış, dizilimlerinde bozulmalar, lipid içeriğinde artış, su permeabilitesi ve oksijen difüzyonunun azalması ile besin-atık değişiminin bozulmasına sebep olur^{99,108}. Bruch membranının ekstrasellüler matriksinde ve biyofiziksel özelliklerinde meydana gelen dalgalanmalar RPE ve fotoreseptörlerin fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır.

c) Koriokapillaris: Koroid kalınlığı yaşla azalır. Ramrattan ve arkadaşları, koroidin doğumda 200µm'den, 90 yaşında 80µm'ye incelendiğini göstermişlerdir⁹⁸. Koriokapillaris yoğunluğu ve lümen çapı azalır. Subfoveolar koroidal kan akımı azalır⁹⁹. Koriokapillaris ve koroidde gözlenen değişikliklerin YBMD'yi başlatan mı yoksa hastalığa sekonder değişiklikler mi olduğu henüz kesinlik kazanmamıştır. Sağlıklı kişilerde arka kutupta yer alan koriokapillaris tabakası, lobüler bir yapıda organize olmuş sinuzoidal kapiller damar yumaklarından oluşmaktadır¹⁰⁹. YBMD'de ise bu sinusoidal yapının değişerek yerini tübüler karakterde bir ağ yapısına bıraktığı gözlenmektedir. Bu tübüler kapiller ağın, vücudun herhangi bir yerinde olması normal kabul edilebilir bir bulgu olmasına rağmen bu yapının makula bölgesinde yer alması patolojik bir değişim olarak yorumlanmaktadır¹¹⁰. Bu morfolojik değişikliklerin yanı sıra makula bölgesindeki koriokapillaris yapısında yaşlanma ile birlikte birtakım fonksiyonel değişikliklerin de olduğu gösterilmiştir. Bu arada bu bölgenin hemen üzerinde yer alan fotoreseptör tabakası metabolik olarak RPE ve koriokapillarisle bağımlıdır ve bu hücrelerde bu metabolik etkileşimin bir uzantısı olarak belirgin bir kayıp gözlenmektedir¹¹¹. RPE'nin hasarlanması ile birlikte hasarlı bölge tamir edilmek

üzere anormal hücreler tarafından işgal edilmektedir. İşte bu anormal hücrelerin fonksiyonları belki de koriokapillaris atrofisinde önemli rol oynamaktadır. Çünkü normal RPE hücreleri, normal fonksiyonunu sürdürmek üzere koriokapillarisle salgıladığı sitokinler aracılığı ile yakın ilişki içindedir¹¹². Fotoresptör-RPE Bruch membran kompleksinin fonksiyonlarını tam olarak yapabilmesi için sağlam bir koriokapillaris gerekmektedir. Çünkü koriokapillarisin esas fonksiyonlarından biri, bu bölgeye besinleri ve bu bölgenin metabolik fonksiyonlarının devamı için gerekli maddeleri taşımanın yanısıra bu bölge fotoresptör hücreler tarafından oluşturulan ve RPE tarafından fagosite edilmiş olan metabolik artıkları uzaklaştırmaktır¹¹³. Bütün bu bulgular koriokapillarisin, metabolik olarak çok aktif bir tabaka olan RPE tabakası ile hem fonksiyonel hem de anatomik ve fizyolojik açıdan sürekli etkileşim içinde olduğunu ve her iki tabakada olan değişikliklerin diğerini direkt olarak ilgilendirdiğini düşündürmektedir.

2.Oksidatif Stres

Yaşlanma, oksidatif hasarın artmasına neden olur. Plazma glutatyon, vitamin C ve E düzeyleri azalır, lipid peroksidasyonu artar. RPE hücrelerinin katalaz aktivitesi ve vitamin E düzeyi düşer, hücre içi lipofuksin artışı da RPE hücrelerini oksidatif strese açık hale getirir^{114,115}. Fotoresptör dış segmentlerindeki yağ asitleri, fotoresptör RPE düzeyindeki oksijen düzeyinin yüksek olması ve retinanın yüksek irradyasyona maruz kalması, yaş, inflamasyon, sigara kullanımı lipid peroksidasyonu için uygun ortam oluşturur¹¹⁶. Lipid peroksidasyonu en fazla makulada gerçekleşir¹¹⁷. Serbest radikallere bağlı RPE hücre membranı lipid peroksidasyonu, membranda bleblerin oluşumuna ve bunların RPE altında bazal laminar depozit benzeri depozitler halinde birikmelerine yol açar¹¹⁸.

3.İskemi

YBMD için temel bir risk faktörü olan sigara kullanımı, kan damarlarını daraltıp kan akışını sınırlandırarak iskemiye katkı sağlamaktadır. İlerleyen yaşla birlikte, RPE'ye kan akışını sağlayan koroidal kan damarlarının çapında ve sayısında azalma görülür. Bruch membranının geçirgenliğinin azalması, koroidden RPE'ye difüzyonu bozabilir. Koroid kan akımında değişiklikler, oksijen difüzyonunda azalma ve iskemi görülmektedir¹¹⁹.

4. İnflamasyon

Gelişen neovaskülarizasyonda tek etkenin iskemi olmadığı, gelişen dokunun histopatolojisi incelendiğinde lenfosit, makrofaj, yabancı cisim dev hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin bulunduğu gösterilmiştir¹²⁰. Böylece bölgede kronik bir enflamasyon tetiklenmiş olur. İnflamasyon sonucu gelişen hipoksi ve iskemiye bağlı anjiogenezis uyarılmakta ve bu da KNV gelişimi ile sonuçlanmaktadır.

5. Anjiogenez

Anjiogenez, yeni damar oluşumu ile karakterize çok basamaklı ve karmaşık bir süreçtir. Fizyolojik anjiogenez, embriyonun gelişmesi ve büyümesi, yara iyileşmesi ve iskemik dokuların yeniden vaskülarizasyonunda kritik bir rol oynarken, patolojik anjiogenez kanser, ateroskleroz, romatoid artrit gibi pek çok hastalıkla ve oküler neovaskülarizasyonla birlikte olabilir¹²¹. Kimyasal yanıklar, neovasküler glokom, prematürite retinopatisi, diabetik retinopati, retina arter/ven tıkanıklıkları ve YBMD anjiogenezin görülebildiği oküler patolojilerdir¹²². Retinal ve koroidal anjiogenez görme kaybının önemli nedenleri arasındadır. Retinal dolaşımdan köken alan neovaskülarizasyon genellikle diabetik retinopati, retina ven oklüzyonu, prematür retinopatisi ve orak hücre retinopatisinde görülür. Koroidal dolaşımdan kaynaklanan neovaskülarizasyon YBMD, oküler histoplazmosis, dejeneratif miyopi ve travmaya bağlı olabilir¹²³.

Anjiogenezisi aktive ve inhibe eden faktörler arasındaki dengenin bozulması sonucu KNV oluşur. Anjiogenez, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonu, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi, endotel hücre göçü ve kapiller tüp oluşumu ile meydana gelmektedir. Bu süreç, büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks ve hücresel komponentlerin kompleks etkileşimleriyle kontrol edilmektedir ve net sonuç anjiogenetik ve anjiostatik elemanlar arasındaki denge tarafından belirlenmektedir¹²⁴. Anjiogenezisi uyarıcı en önemli faktör VEGF iken angiogenezisi inhibe eden en önemli faktör pigment epitel kaynaklı faktördür (PEDF)¹²⁵.

Druzenin üzerindeki RPE'de iskemi görülmesi VEGF salınımını tetiklemekte ve KNV formasyonuna neden olmaktadır. Bruch membranında lipofilik materyalle meydana gelen kalınlaşma sonucunda oksijenin koroidden RPE'ye ve retinaya difüze olmasının azaldığıda öne sürülmüştür. RPE'den VEGF sekresyonu polarize bir sekresyondur, normoksik koşullarda bazal sekresyon apikal sekresyondan 2–7 kat

daha fazladır¹²⁶. Hipoksik koşullarda aradaki bu fark daha da artmaktadır. Koroidal damarlardan köken alan yeni oluşmuş damarlar ve bu damarlara eşlik eden kan ve sıvı, Bruch membranını parçalayıp geçerek subretinal pigment epiteli boşluğuna ve/veya subretinal boşluğa girerek retina yüzeyinde düzensiz elevasyonlara sebep olur. Yatay olarak RPE ve Bruch membranı arasında gelişen yeni damarlar, organize olarak koroidin besleyici damarları ile birleşirler. Yeni damar endotelinin bariyer fonksiyonu gelişmediğinden, retina içi tabakalara sıvı, protein ve lipid sızdırırlar ve kanama eğilimleri fazladır¹²⁶.

MikroRNA

Tanım

miRNA'lar, endojen küçük RNA'ların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir^{127,128}. Yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli miRNA'ların sayısı insanlarda bini geçmektedir^{129,130}. Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNA'ların hücrel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir¹³¹. mRNA'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNAlar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir^{132,133}.

MikroRNA' Keşfi

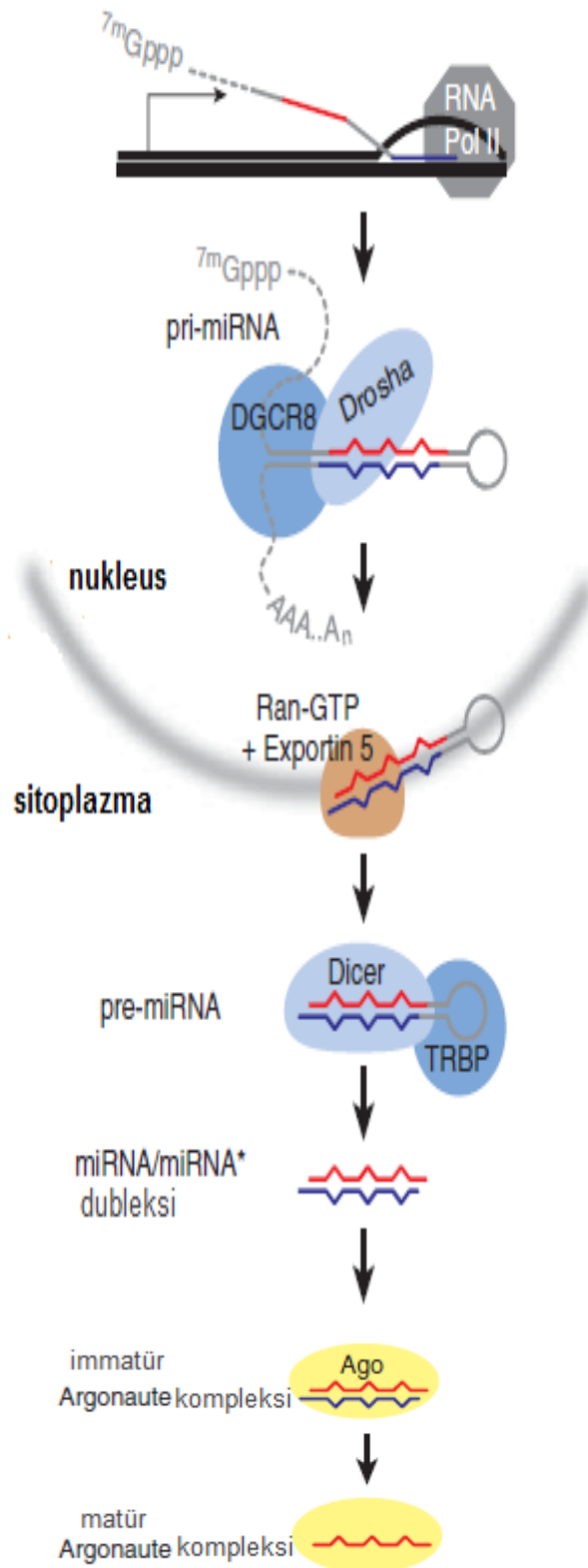
Lee ve arkadaşları, 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini incelediklerinde, protein kodlamayan lin-4 olarak isimlendirdikleri genin, 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini bildirmişlerdir. O sıralar bir nematodun yapısal özelliği sanılan ve yaşam döngüsünün zamanlaması ile ilerlemesini kontrol ettiği düşünülen lin-4 keşfedilen ilk miRNA'dır¹³⁴. Reinhart ve arkadaşları, 2000 yılında *C. elegans*'da, let-7 olarak isim verdikleri 22 nükleotid uzunluğunda, canlıda gelişim basamaklarını düzenleyen farklı bir miRNA daha keşfetmişlerdir. İnsanlar ve bazı türler arasında let-7'nin kaydedeğer bir biyolojik fonksiyona sahip olmasından dolayı korunduğu gösterilmiştir^{135,136}. Bu çalışmalar ışığında birçok miRNA en basit canlılardan insana kadar yüksek oranda korunurlar ve genom içerisinde miRNA'ları kodlayan birçok gen bölgesinin varlığı bilinmektedir. Bu durum bize miRNA'ların tüm canlılarda önemli görevleri olduğunu gösterir^{127,134-}

MikroRNA'ların Oluşumu

Hücre döngüsü ve büyüme üzerine düzenleyici etkileri olan küçük, protein kodlamayan RNA türü olan miRNA'lar, RNA polimeraz II (pol II) tarafından sentezlenmektedir. Yapılan son çalışmalar ile birçok farklı miRNA lokusunda RNA polimeraz III (pol III) ile ilişkili tekrar dizilerinin gösterilmesi pol III'ün de miRNA transkripsiyonunda önemli yeri olduğunu göstermiştir¹³⁷⁻¹⁴⁷.

MikroRNA'ların sentezi DNA'dan RNA pol enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pahsa'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür^{128,133,147-151}.

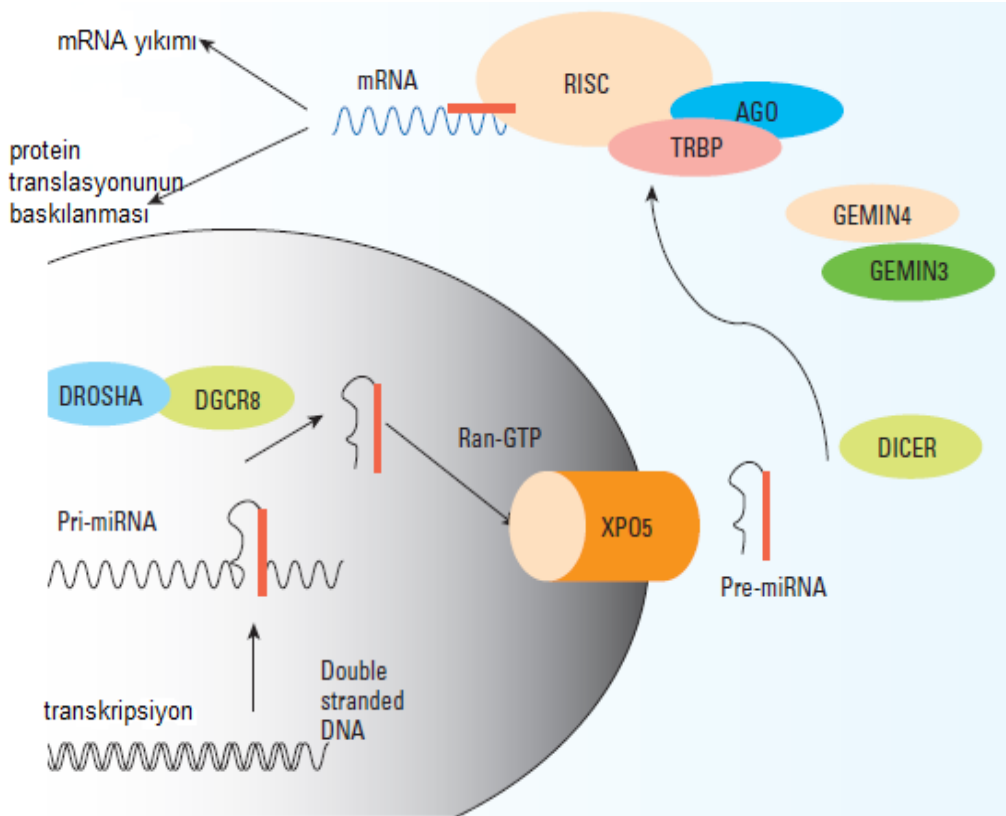
Bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır¹⁵². RNAaz III enzimi ailesinden bir endonükleaz olan Dicer, TAR RNA bağlayan protein (TRBP) veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aktive eden protein (PACT) ile etkileşimde bulunarak sitoplazmada pre-miRNA'ı parçalayarak çift zincirli, 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA dubleksine dönüştürürler¹⁵³. Dicerin diğer fonksiyonu da RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi; RISC) oluşumunda kilit rolü olmasıdır¹⁵⁴. Pre-miRNA'nın saplı, ilmikli yapısı dicer tarafından kesildikten sonra miRNA dubleksinden sadece bir tanesi RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksine katılır. RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksinin ihtiva ettiği RNAaz olan Argonaute'un yardımı ile bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse katılır. Bu komplekse dahil olan yapı kılavuz iplik (guide iplik) olarak isimlendirilir. Diğer kılavuz olmayan ve yolcu iplik olarak adlandırılan iplik RISC kompleksi tarafından sindirilir. miRNA'lar aktif RISC kompleksine katıldıktan sonra, ya Argonaute proteinleri aracılığıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun engellenmesine neden olurlar (Şekil 1)¹⁵⁵.



Şekil 1. MikroRNA oluşumu ¹⁵⁵.

MikroRNA'ların Fonksiyonu

Olgun miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. miRNA'lar kendi nükleotid dizilerini tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur¹⁵⁷. miRNA'ların herbirinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların herbirinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği saptanmıştır (Şekil 2)^{155,156}.



Şekil 2. MikroRNA oluşumu ve fonksiyonu¹⁵⁵.

MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (Untranslate Region-UTR) ya da hedef mRNA'nın ORF (Open Reading Frame- açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Translasyona uğramayan bölgesine bağlandığında; kusurlu, eksik tamamlayıcılıkla ve translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır.

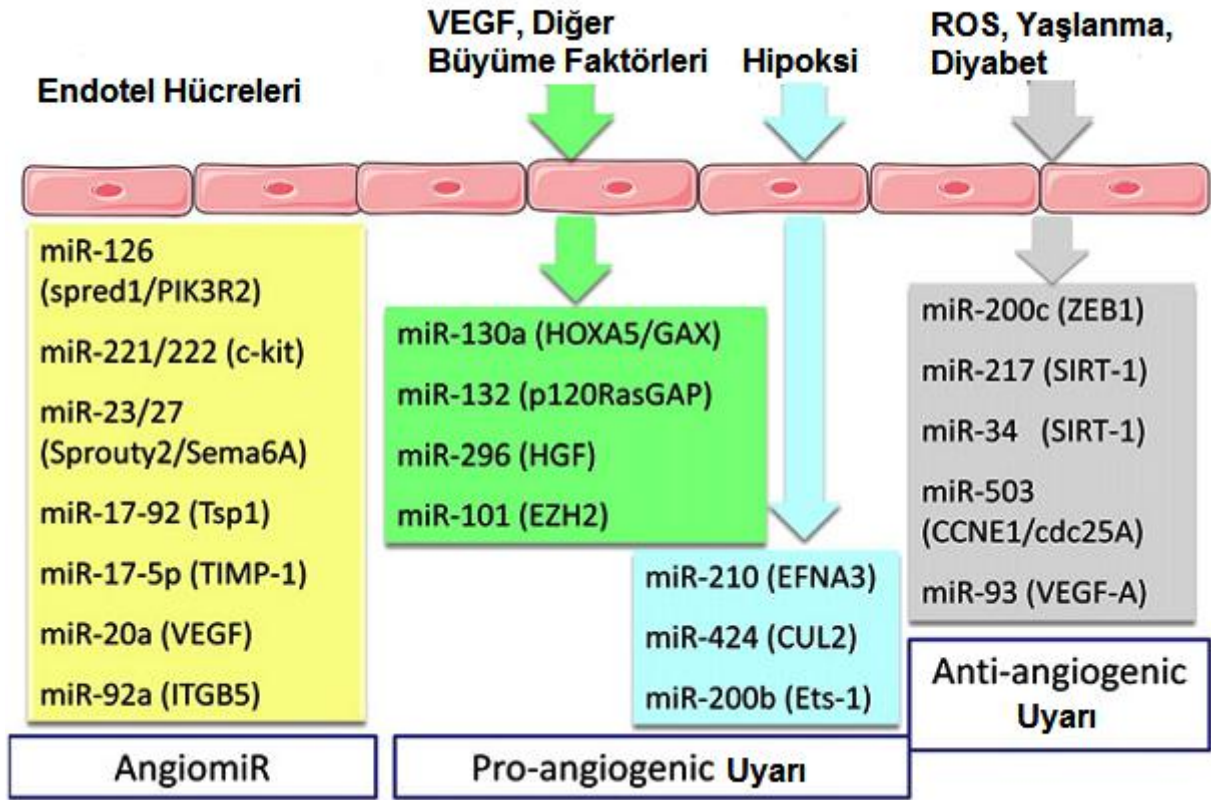
ORF bölgesine bağlandığı takdirde bağlanma kusursuz, eksiksiz tamamlayıcılığı gösterir ve sonuçta Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı gerçekleşir^{157,158}.

Göz ve miRNA

Birçok hücreyel olayda önemli fonksiyonları olan miRNA'ların kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve dejeneratif göz hastalıklarında yeni terapötik ajanlar olabileceği düşünülmektedir¹⁵⁹⁻¹⁶². Çeşitli çalışmalarda miRNA'ların gözün gelişmesinde ve farklılaşmasında rol aldığı gösterilmiştir^{163,164}. Frederiske ve ark. miR-124, miR-7, miR-125b ve let-7a'yı, Ryan ve ark. ise miR-184, miR-125a ve b, miR-31, miR-204, miR-26a ve b, miR-181a ve b, miR-30a, b, c ve d, miR-23 a ve b, miR-450 ve let-7f'i farelerde lens gelişimi ile ilişkili bulmuşlardır^{165,166}. Ryan ve ark. fare kornealarında 31 çeşit miRNA'nın eksprese olduğunu rapor etmişler ve bunların çoğunun retinada da eksprese olduğunu göstermişlerdir¹⁶⁶. Xu ve ark. miRNA-184'ün hem kornea hem de retinada eksprese olduğunu ve diğer inceledikleri birçok dokuda olmadığını görmüşlerdir. Bu yüzden miRNA-184'ün oftalmik dokulara spesifik olduğunu düşünmüşlerdir¹⁶⁷. miR-96, miR-182, miR-183, miR-184, miR-210 ve miR-140 Xu ve ark. tarafından sadece retinada eksprese olan miRNA'lar olarak bulunmuştur¹⁶⁸. Deo ve ark. miR-181a, -182, -183, -204, -125b, -26a ve -124a'nın fare retinalarına spesifik eksprese olduğunu göstermişlerdir¹⁶⁹.

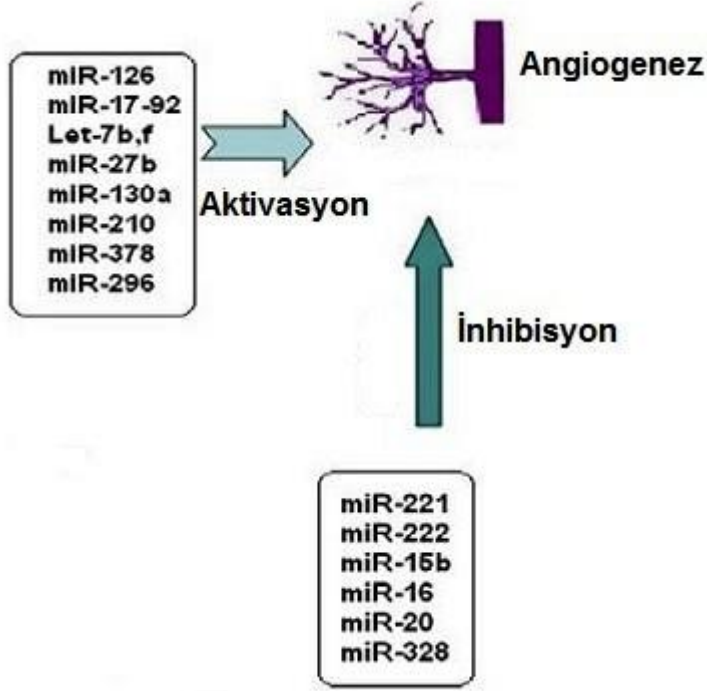
Anjiogenez ve miRNA

Caporali ve ark. yaptıkları çalışmada endotelde yer alan miRNA'ları anjiogenezde hedef gen olan miRNA'lar (anjiomiRler), proanjiogenik uyarı ile stimule olan miRNA'lar ve antianjiogenik uyarı ile stimule olan miRNA'lar olarak sınıflamıştır (Şekil 3)¹⁷⁰.



Şekil 3. Anjiogenez ile ilişkili mikroRNA'lar¹⁷⁰.

Wu ve ark. angiogenez ile ilgili yaptıkları benzer çalışmada miRNA'ları angiogenezi inhibe ve aktive edenler olarak sınıflamıştır (şekil 4).¹⁷¹



Şekil 4. Angiogenezi inhibe ve aktive eden mikroRNA'lar¹⁷¹.

Oküler Angiogenez ve miRNA

Hipoksi ile indüklenen retinal ve koroidal neovaskülarizasyon; diabetik retinopati, KNVM gibi birçok retinal hastalıkla ilişkilendirilmiştir^{172,173}. Shen ve arkadaşlarının oluşturduğu retinal iskeminin indüklendiği farelerde miR-451, -424, -146, -214, -199a, -181 ve -106a ekspresyonunda artış miR-31, -150, ve miR-184 ekspresyonunda da azalma izlenmiştir¹⁷⁴.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'nde Eylül 2012- Nisan 2013 tarihleri arasında başvuran daha önce tedavi almamış, yeni YBMD tanısı alan 22'si erkek, 11'i kadın olmak üzere toplam 33 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubunu 17'si erkek, 14'ü kadın olmak üzere 31 sağlıklı kişi oluşturmuştur. Hasta grubundaki bireyler, kliniğimize yaş tip YBMD ön tanısı ile referans edilmiş ve genel oftalmoloji polikliniğimize başvurup retina birimine yönlendirilmiş hastalardan seçilmiştir. Hastalara tam oftalmolojik muayenenin yanı sıra, FFA ve optik kohorens tomografi (OKT) tetkikleri uygulanmıştır. Klasik ve gizli KNVM tanısı konan hastalar çalışma kapsamına alınmıştır. Kontrol grubundaki bireyler herhangi bir göz şikayeti olmayan gönüllülerden seçilmiştir. Tam oftalmolojik muayeneleri yapılarak oftalmolojik patoloji saptananlar çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır. Kontrol grubundaki hastalara OKT tetkiki uygulanarak kuru ve yaş tip YBMD dışlanmıştır.

Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri;

Hasta grubu:

- 50-80 yaş aralığında olma
- Sistemik hastalık öyküsünün olmaması (Diabetes Mellitus ve Kanser)
- Yeni tanısı konup, daha önce tedavi almamış olmak

Kontrol grubu:

- 50-80 yaş arasında olma
- Sistemik problemi olmaması (Diabetes Mellitus ve Kanser)

Mersin Üniversitesi Klinik Araştırma ve Etik Kurulu'ndan 19.07.2012 tarih ve 255 sayılı kararı ile onay alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalar ve sağlıklı bireyler bir tanık gözleminde çalışmaya katılmaya istekli olduklarını belirtmişler ve bunu bilgilendirilmiş onam formu imzalayarak göstermişlerdir.

Hastaların yaşı, cinsiyeti, tanısı, tanı sırasında uygulanan tetkikler kayıt altına alındı.

Daha sonra çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin 2 ml'lik periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplerde toplanarak, serumları santifrj ile ayrıldı. Ardından ayrılan bu serum örneklerinde sık olarak eksprese olduğu saptanan miRNA (Panel A-384 subtip) düzeyleri saptandı.

Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan Cihazlar

- -80 °C Soğutucu (Heto Ultrafreeze)
- Buzdolabı (Indesit)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- 8 kanallı pipet (Gilson)
- 16 kanallı pipet (Gilson)
- Dynamic Array 96.96, Katalog no: (Fluidigm)
- Yüksek kapasiteli RT-PCR Sistemi, Katalog No: (Fluidigm, Biomark, USA)
- LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied science)
- Santrifüj (Sigma k-15-1, Almanya)

Kullanılan Malzemeler

- High Pure miRNA Isolation Kiti: Katalog no: (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Tüp (2×50), toplama tüpleri (2×50)
- 1.5 ml'lik ependorf (DNase, RNase Free)
- 0.5'lik ependorf (DNase, RNase Free)
- 96 Well PCR Plate, Katalog no (USA Scientific)
- PCR Plate Film, Katalog No: (USA Scientific)
- DNA süspansiyon buffer
- TaqMan PreAmp Master Mix, 2X Katalog no: (Applied Biosystem)
- MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool A v2.1 Katalog no: (Applied Biosystem)
- MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool B v3.0 Katalog no: (Applied Biosystem)
- 8'li strip tüp
- MegaPlex RT Primers Human, Pool A v2.1, Katalog no: (Applied Biosystems)
- MegaPlex RT Primers Human, Pool B v3.0, Katalog no: (Applied Biosystems)

- TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, 200 Katalog no: (Applied Biosystems)
- Reverse Transcriptase (ABI)
- RNase Inhibitor
- DNase, RNase Free Water
- MgCl₂
- Sample & Assay LoadingKit, Katalog no: (Fluidigm)
- RNU48

Yapılan çalışma, üretici firmanın (Fluidigm PN:100-1616 B2) önerdiği yol izlenilerek gerçekleştirilmiştir.

MikroRNA Analizi

Serum Eldesi

Kan örnekleri 10µl'lik normal tüplere alınarak en geç 2 saat içerisinde işleme alındı.

1. Tüpler 15 dk süreyle 4000 rpm de santrifüj edildi.
2. Santrifüj işleminin ardından tüpler sarsmadan santrifüjden çıkarıldı. Tüpün üst kısmında toplanan serum temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Mikrosantrifüj tüpleri ait oldukları hastaların bilgileriyle numaralandırıldıktan sonra -80°C de işleme alınacağı güne kadar beklemesi amacıyla dondurucuya kaldırıldı.

MikroRNA İzolasyonu

MikroRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, Manheim, Germany) kullanılarak toplanılan serumlardan miRNA izolasyonu yapıldı.

1. Serum örneklerinden 150µl'lik kısım DNase, RNase free mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
2. Her bir mikrosantrifüj tüpüne 312 µl' lik Binding buffer ve 200ml Binding Enhancer eklenerek karıştırıldı.
3. Filtreli tüp toplama kabına aktarılan örnekler 1 dk süreyle 13000g de santrifüj edildi ve ardından toplama kapları atıldı.

4. Filtreli tüpler temiz toplama kaplarına alınarak üzerine 500 ml Wash Buffer eklendi ve 30 sn süreyle 13000 g de santrifüj edildi. Toplama kapları atıldı.
5. Filtreli tüpler temiz toplama kaplarına alındı ve üzerine 300 µl Wash Buffer eklendi. Bu işlemi takiben önce 30 sn ardından 1 dk olmak üzere 13000 g' de santrifüj edildi.
6. DNase, RNase free mikrosantrifüj tüplerine aktarılan filtreli tüplerin üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi. Örnekler 1dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 13000 gde 1 dk santrifüj edildi.
7. Bu işlemler sonucunda elde edilen total RNA bir sonraki işleme kadar -80 °C de saklandı.

MikroRNA Taqman cDNA Protokolü

1. RNA örnekleri -80 °C den çıkarıldı ve erimeye bırakıldı. Ardından 30 sn santrifüj edilerek cDNA protokolü hazırlanana kadar soğuk blok üzerinde bekletildi.
2. Aşağıdaki karışım hazırlanarak temiz 8'li strip tüplerin (0.3ml) her bir kuyusuna 42 µl olarak pipetlendi.

Karışım: (Kullanılan Kit: Applied Biosystems (PN 4444750, 4366596)

- MegaPlex RT Primers (10X) A (Applied Biosystems, PN 4401009) veya B (Applied Biosystems, PN 4401010) 60.00 µl
- dTTP'li dNTP (100mM) 15.30 µl
- MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ µl) 115.00 µl
- 10X RT Buffer 61.30 µl
- MgCl₂ (25mM) 69.00 µl
- RNase Inhibitor (20U/ µl) 7.60 µl
- Nükleazlardan arındırılmış su 16.80 µl

Toplam: 345.00 µl

3. 8'li strip tüplere aktarılan bu karışımdan 3 µl, 8 kanallı pipet kullanılarak 96 kuyuluk PCR plate dağıtıldı.

4. RNA örneklerinin bulunduğu 96 kuyuluk platen, 8 kanallı pipet 2 µl'ye ayarlanarak RNA örnekleri alındı ve cDNA karışımları üzerine eklendi. 5-6 kez pipetajlanarak RNA örneklerinin cDNA karışımı ile iyice karışması sağlandı.
5. Platein yüzeyi yapışkanlı film sağlam bir şekilde örtülerek 1 dk santrifüj yapıldı ve ardından 5 dk süreyle inkübasyon için buz üzerine bırakıldı.
6. miRNA TaqMan cDNA Thermal Protokülü üstten ısıtma özelliği olan bir thermal cycler da aşağıda bahsedilen programa göre çalıştırıldı.

-miRNA TaqMan cDNA Termal Program

• 16 °C	120 sn	} 40 döngü
• 42 °C	60sn	
• 50 °C	1 sn	
• 85 °C	300sn	
• 4 °C	∞	

MikroRNA TaqMan PreAmplifikasyon Protokolü

1. cDNA örneklerinin bulunduğu 96 kuyuluk plate -80°C'den çıkarılarak erimeye bırakıldı ve ardından 30 sn santrifüj edildi.
2. 8 kanallı pipet kullanılarak 2 µl cDNAörneği yeni bir 96 kuyuluk plate aktarıldı. Üzerine 8 µl DNA Suspansion Buffer eklenerek pipetaj yapıldı.
3. PCR karışımı 96 örnek (95 cDNA örneği+1 Negatif kontrol) için aşağıdaki reaktifler hazırlandı ve 8'li strip tüpün her bir kuyucuğuna 62 µl pipetlendi.

Kullanılan Kit: Applied Biosystems (PN 4444750, 4391128)

-TaqManPreAmpMaster Mix,2x (AppliedBiosystems, PN4391128)
287.50 µl

-MegaPlexPreAmpPrimers (110X) (AppliedBiosystems, PN4401009-PN4401010)
57.50 µl

Toplam: 345.00 µl

4. 8 kanallı pipet 3 µl'ye ayarlanarak yukarıdaki karışım temiz bir 96 kuyuluk plate aktarıldı. 96 kuyucuğun her birine işlem tekrarlandı.

5. Dilüe edilmiş cDNA örnekleri az önce hazırlanan PCR karışımı üzerine 2 µl şeklinde 8 kanallı pipet kullanılarak aktarıldı. Pipetaj yapılarak iyice karışmaları sağlandı.
6. Platein üzerine yapışkanlı film ile kaplanarak 1 dk süreyle santrifüj edildi ve ardından 5 dk süreyle inkübasyona bırakıldı.
7. miRNA TaqMan PreAmp Thermal Protokolü aşağıda belirtildiği şekilde üstten ısıtma özelliği olan bir thermal cycler da çalıştırıldı.

-PreAmp Thermal Program

- 95 °C 600sn
 - 55 °C 120sn
 - 72 °C 120 sn
 - 95 °C 15sn
 - 60 °C 240sn
 - 99.9 °C 600sn
 - 4 °C ∞
- } 18döngü

8. PreAmplifikasyon sonunda 2 µl PreAmp cDNA'ları temiz bir 96 kuyuluk plate aktarıldı. Üzerine 18 µl DNA suspension Buffer koyularak 1:10 olacak şekilde sulandırıldı.
9. PreAmp cDNA'lar aynı gün kullanılacaksa 4°C'ye, fakat kullanılmayacaksa -80°C'ye saklandı.

Bu protokol Pool A ve B preamp primerleri için ayrı ayrı olmak üzere cDNA A ve B olarak iki panel şeklinde uygulanmıştır.

miRNA Analizi

cDNA'lar Dynamic Arrayler üzerinde 714 miRNA için Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR sistemi (Fluidigm, Biomark, USA) kullanılarak analiz edildi.

Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması

Bir adet Dynamic Array 96.96 olarak paketi açıldı. Üst ve alt kısımlarında bulunan küçük hücrelere her hücreye bir enjektör olmak koşuluyla Control Fluid'lar

yüklendi. Dynamic Array 96.96 yı IFC Controller'a yerleştirildi ve PRIME edildi. Bu işlem 20 dk kadar sürmektedir, bu süre esnasında aşağıdaki işlemler yapıldı:

Örnek ve PCR Karışımının Hazırlanması

1. Aşağıdaki karışım 96 örnek için (95 cDNA örneği+1 Negatif kontrol) hazırlandı (ölü hacimler hesaba katılmıştır)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG) 490.00 µl
 - GE Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN85000746) 49.00 µl
-
- Toplam: 539.00 µl**

2. Yukarıdaki karışımdan 8'li strip tüpe her bir kuyucuğa 65µl olacak şekilde pipetlendi.
3. Temiz bir 96 kuyuluk plate alındı ve yukarıdaki karışımdan 3.85 µl her bir kuyucuğa pipetlendi. Daha sonra 8 kanallı pipet kullanılarak 3.15 µl dilüe preamplifiye cDNA'lar alınarak karışım üzerine pipetlendi. Her pipetlemede pipetaj yapılarak örneklerin iyice karışması sağlandı.
4. Bütün örnekler bu şekilde karıştırıldıktan sonra Master mix+ diluted PreAmplified cDNA'nın her birinden 5 µl alarak dikkatli bir şekilde Dynamic Array 96.96da SAMPLE şeklinde işaretli bölüme pipetlendi.

ASSAY Karışımının Hazırlanması

1. Çalışmaya başlamadan önce A ve B assay plateleri, toplamda 30 µl DNase/RNase free su ve Assay Loading Reagent ile 1:1 olacak şekilde çözüldü.
2. Çözülen assaylerden 4.5 µl alınarak Dynamic Array 96.96 da ASSAY şeklinde işaretli bölüme pipetlendi.
3. Assay plate aynı gün içinde kullanılacaksa 4 °C'de aksi taktirde -20 °C'ye kaldırıldı.
4. Dynamic Array 96.96 IFC Controller'a konularak LOAD program çalıştırıldı.

MikroRNA TaqMan Dynamic Array Protokolü

1. Load ve Mix işlemi bitince BioMark Data Collection software de Start'a New Run'a tıklandı. Bu arada BioMark üzerindeki ışıkların ikisinin de yeşil olmasına dikkat edildi. Çünkü bu lambanın aşıldığını ve cihazın hazır

olduğunu gösterir. Dynamic Array 96.96 BioMark'a yerleştirildi ve Load'a tıklandı.

2. Chip Run File ekranında 'This is a new chip run'a tıklandı. Dosyayı nereye kaydedeceğimiz ve dosyanın isminin ne olacağı seçildi ve Next'e tıklandı.
3. Application, Reference and Probes ekranında Application bölümünde Gene Expression'u Passive Reference bölümünde ROX ve Assay bölümünde ise Single Probe işaretlendi ve aşağıda açılan kısımdan FAM-MGB I seçildi ve Next'e tıklandı.
4. Protokol olarak GE 96.96 Standart V1 thermal protokolü seçildi ve Auto Exposure'un seçili olduğundan emin olundu ve Next'e tıklandı.
5. Start Run'a tıklayarak çalışma başlatıldı.

İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol gruplarında parametrelerin normal dağılıma uygunluk kontrolleri Shapiro Wilks testi ile test edilmiştir. Normal dağılıma uyan gruplarda sürekli yapıdaki veriler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma, uymayan gruplarda ise medyan ve yüzdelik değerleri verilmiştir. Kategorik yapıdaki parametreler için sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. İki grup arasında ortalama farklılıkların testinde dağılımın şekline bağlı olarak Student t testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İki farklı grup arasında fark olup olmadığının kontrolüne ANOVA testi ile bakıldı. Grupların ikişerli karşılaştırması için TUKEY testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin analizine ki kare testi ile bakılmıştır. İki sürekli yapıdaki parametre arasındaki ilişkinin kontrolünde Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasındaki grafiksel gösterim için normal dağılan parametrelerde Error Bar grafiği, dağılmayan parametreler için ise BoxPlot grafikleri tercih edildi. İstatistik anlamlılıkta $p < 0.05$ alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya, hasta grubundan 33 (%50.8) kontrol grubundan 31(%49.2) kişi dahil edildi. Çalışma hastalarının yaş ortalaması $72,12 \pm 8,7$ yıl iken, kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin yaş ortalaması $62,67 \pm 7,1$ yıl idi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0.001$) (Tablo 1).

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları.

	Grup	N	Ort.	S. Sapma	P
Yaş	Hasta	33	72,1212	8,74556	<0,001
	Kontrol	31	62,6774	7,13390	

Hasta grubunda 33 bireyin 11'i kadın (%33,3), 22'si erkek (%66,7), kontrol grubunda yer alan 31 sağlıklı bireyin ise 14'ü kadın (%45,2), 17'si erkekti (%54,8). İki grup arasında cinsiyet dağılımları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarındaki cinsiyet dağılımı.

Cinsiyet	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Toplam	p Değeri
Kadın	11 (%33,3)	14 (%45,2)	25 (%39,1)	0,443
Erkek	22 (%66,7)	17 (%54,8)	39 (%60,9)	
TOPLAM	33 (%100,0)	31 (%100,0)	64 (%100,0)	

Hasta ve kontrol gruplarından alınan periferik kan örneğinden toplam 384 miRNA analizi yapıldı. Bunlardan 51 tanesinin artan ya da azalan düzeyde eksprese olduğu, ancak 17 tanesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Hasta ve kontrol gruplarında serum miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

miRNA	Hasta Δ Ct (Ort \pm SD)		Kontrol Δ Ct (Ort \pm SD)		FC	p
miR-19a-3p	6,20	0,93	5,76	1,16	-1,35	0,252
miR-140-3p	7,22	0,86	5,73	2,11	-2,81	0,029
miR-19b-3p	-0,23	1,31	-0,26	1,11	-1,02	0,800
miR-20a-5p	0,06	0,94	1,07	1,50	2,02	0,035
miR-20b-5p	5,98	1,27	6,24	1,29	1,20	0,487
miR-103a-3p	6,05	2,18	6,74	2,11	1,62	0,770
miR-130a-3p	4,53	1,09	3,17	1,16	-2,57	0,125
miR-21-5p	8,29	1,42	6,66	1,05	-3,09	0,045
miR-30c-5p	1,46	1,17	0,87	0,96	-1,50	0,114
miR-106a-5p	1,44	1,27	3,23	1,38	3,45	0,001
miR-106b-5p	1,43	1,45	2,12	1,04	1,62	0,141
miR-133a	6,68	2,07	4,93	0,96	-3,34	0,182
miR-146a-5p	3,42	1,37	2,82	1,71	-1,52	0,201
miR-24-3p	-0,66	0,90	0,00	1,06	1,58	0,045
miR-122-5p	6,18	2,43	4,60	2,43	-2,98	0,240
miR-25-3p	0,20	1,28	-0,68	0,90	-1,84	0,021
miR-146b-5p	7,79	1,44	4,67	1,11	-8,68	0,006
miR-26a-5p	6,82	1,56	6,10	1,10	-1,65	0,409
miR-92a-3p	-2,57	0,98	-2,33	1,62	1,18	0,924
miR-93-5p	4,35	1,09	4,58	1,05	1,17	0,369
miR-148a-3p	6,89	1,47	8,49	1,34	3,02	0,245
miR-27a-3p	5,37	2,09	4,90	1,41	-1,38	0,610
miR-125b-5p	4,75	1,99	2,91	1,21	-3,59	0,527
miR-16-5p	1,61	0,92	1,23	1,10	-1,30	0,155
miR-126-3p	1,23	0,96	1,09	1,39	-1,10	0,290
miR-17-5p	0,49	1,23	1,96	0,95	2,77	0,001
miR-139-5p	4,62	1,43	3,19	1,80	-2,71	0,092
miR-192-5p	7,93	1,01	6,11	2,22	-3,54	0,007

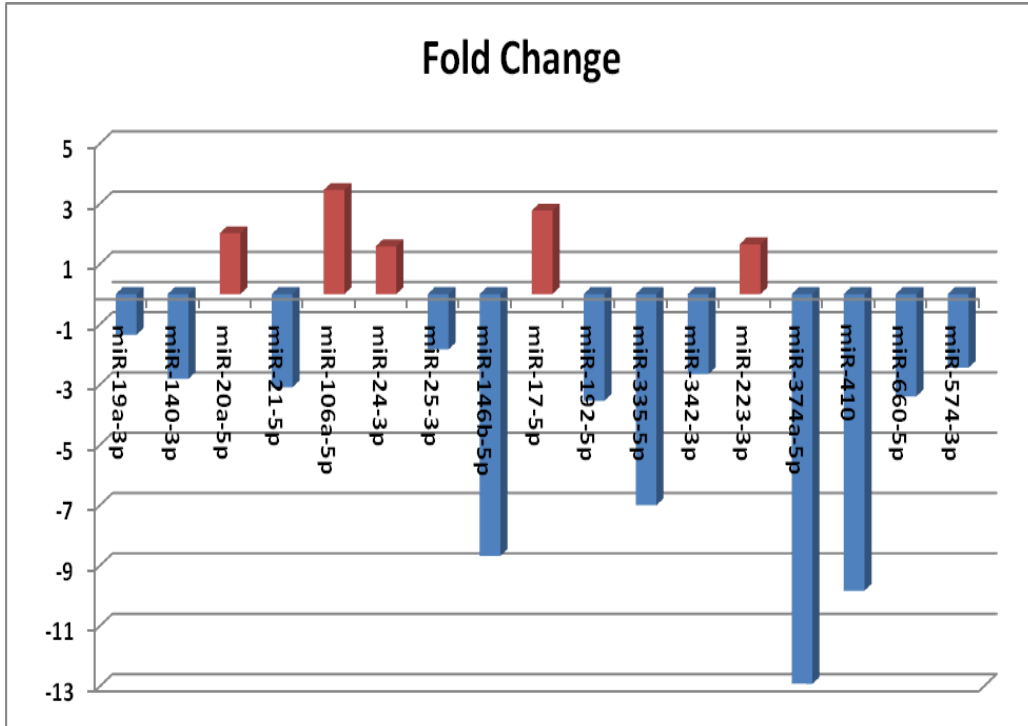
Tablo 3. Hasta ve kontrol gruplarında serum miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması (devamı)

miRNA	Hasta Δ Ct (Ort \pm SD)		Kontrol Δ Ct (Ort \pm SD)		FC	p
miR-203	4,93	2,92	3,49	0,96	-2,72	0,465
miR-296-5p	7,13	1,29	5,78	1,44	-2,55	0,111
miR-150-5p	-0,94	1,40	-1,03	1,49	-1,06	0,661
miR-152	3,71	1,33	4,56	1,22	1,81	0,380
miR-193b-3p	5,65	1,81	3,40	1,98	-2,76	0,063
miR-331-3p	5,57	1,17	5,65	1,79	1,05	0,655
miR-335-5p	7,59	1,63	4,78	0,80	-7,00	0,019
miR-197-3p	7,28	1,58	5,97	1,14	-2,47	0,089
miR-320a	-0,24	1,59	0,00	1,14	1,18	0,304
miR-221-3p	3,45	2,96	4,73	1,71	2,43	0,309
miR-342-3p	5,42	1,06	4,01	1,49	-2,65	0,001
miR-190a	2,33	1,09	2,68	1,75	1,28	0,427
miR-223-3p	-2,61	2,24	-1,89	1,04	1,65	0,013
miR-191-5p	2,89	1,08	3,02	1,83	1,10	0,797
miR-374a-5p	1,81	6,41	-1,89	2,60	-12,92	0,026
miR-484	-1,01	1,71	-0,85	1,43	1,12	0,569
miR-375	5,37	2,00	2,64	1,89	-2,66	0,134
miR-520d-5p	5,60	1,47	4,11	2,08	-2,81	0,193
miR-451a	-3,31	1,04	-2,91	1,19	1,32	0,104
miR-410	0,63	2,97	-2,67	2,54	-9,84	0,001
miR-660-5p	6,06	1,39	4,30	1,13	-3,39	0,002
miR-574-3p	4,42	0,97	3,13	1,54	-2,44	0,007

Hasta grubunda ekspresyonları anlamlı olarak artan miRNA subtipleri; miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-24-3p, miR-17-5p, miR-223-3p iken, ekspresyonları anlamlı olarak azalan suptipler miR-19a-3p, miR-140-3p, miR-21-5p, miR-25-3p, miR-146b-5p, miR-192-5p, miR-335-5p, miR-342-3p, miR-374a-5p, miR-410, miR-660-5p, miR-574-3p olarak saptandı. Diğer miRNA subtiplerinde ise herhangi bir anlamlı ekspresyon farklılığı izlenmedi (Tablo 4) (Şekil 5).

Tablo 4. Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA subtipleri ve ekspresyon oranları.

miRNA	FC
miR-19a-3p	-1,35
miR-140-3p	-2,81
miR-20a-5p	2,02
miR-21-5p	-3,09
miR-106a-5p	3,45
miR-24-3p	1,58
miR-25-3p	-1,84
miR-146-5p	-8,68
miR-17-5p	2,77
miR-192-5p	-3,54
miR-335-5p	-7,00
miR-342-3p	-2,65
miR-223-3p	1,65
miR-374a-5p	-12,92
miR-410	-9,84
miR-660-5p	-3,39
miR-574-3p	-2,44



Şekil 5. Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA subtipleri ve ekspresyon oranlarının grafiksel ifadesi.

Bununla birlikte bazı miRNA subtiplerinin yalnızca hasta grubunda eksprese olduğu saptandı. Bu miRNA subtipleri tablo 5’de liste halinde verilmiştir.

Tablo 5. Sadece hasta grubunda eksprese olan miRNA subtipleri.

miR-29a-3p
Let-7c
miR-26b-5p
miR-27b-3p
miR-139-3p
miR-324-3p
miR-324-5p
miR-532-3p
miR-744-5p
miR-212-3p

TARTIŞMA

YBMD'nin görülme sıklığı özellikle gelişmiş toplumlarda yaşlı nüfusun artışına paralel olarak artmaktadır. Bununla birlikte hastalığın patogenezi tam olarak anlaşılammıştır. Yapılan çalışmalarda VEGF'nin hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiş ve son yıllarda anti-VEGF ilaçların kullanımıyla birlikte tedavide önemli bir yol alınmıştır. Buna karşın bazı olgularda anti-VEGF tedavi uygulanmasına rağmen istenilen düzeyde yanıt alınamamaktadır¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Bu da hastalığın fizyopatolojisinin düşünüldüğünden daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Bu nedenle daha farklı moleküller ve mekanizmalar üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Biz de çalışmamızda yaş tip YBMD gelişiminde etkin rol oynayabileceğini düşündüğümüz küçük genetik materyal olan miRNA'lara odaklandık.

Son yıllarda üzerinde bir çok araştırma yapılan miRNA'ların fonksiyonları arasında, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, metabolik regülasyon, hafıza ve sinaptik gelişim, embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyüme kontrolü, anjiogenez, tümörögenез yer almaktadır. Tüm bu fonksiyonlardan yola çıkarak miRNA'ların birçok hastalık ile bağlantılı olması sürpriz değildir. Bu moleküller hücrelerin normal fonksiyonlarında görev aldıkları için, meydana gelen miRNA kusurlarında çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kas bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile ilişkileri ortaya konulmuştur¹⁷⁹. Tüm bu ilişkiler nedeniyle miRNA'ları hedef alan tedavi yaklaşımları araştırılmaya başlanmıştır. Benzer şekilde YBMD tedavisinde miRNA'ların potansiyel bir terapötik hedef olduğu öne sürülmüştür⁶.

Yapılan çalışmalarda, sağlıklı bireylerde dolaşımda bazı ortak miRNA'lar olduğu bildirilmiştir^{180,181}. Bu bilgiden yola çıkarak farklı fizyolojik durumlarda ve bazı hastalıklarda çeşitli miRNA tiplerinin serum düzeylerinin değişmesi, dolaşımdaki miRNA'ların tanısasal amaçlı kullanılmasını sağlayabilir. Aslında miRNA'lar hücre içerisinde işlev göstermektedirler. Fakat, miRNA'ların serum, plazma, tükürük, idrar ve anne sütü gibi örneklerde ekstrasellüler olarak da bulunabildikleri gösterilmiştir¹⁸¹⁻¹⁸⁶. Normalde serumda yüksek RNAaz aktivitesi olmasına rağmen miRNA'lar oldukça

kararlı molekülüdür. Aynı şekilde miRNA'ların yüksek ısı, yüksek pH gibi koşullara da oldukça dirençli olduğu bilinmektedir¹⁸¹. Eksozom, vezikül ve protein-miRNA komplekslerinin, hücreler arasında transfer edilebileceği düşünülmektedir. Bazı yayınlarda, miRNA'ların eksozom ve apoptotik cisimler gibi küçük membranöz veziküller içinde, bazı yayınlarda ise protein-miRNA kompleksleri oluşturarak serumda RNAaz aktivitesinden korunduğunu belirtilmiştir¹⁸⁷⁻¹⁹³. miRNA'lar serumda çoğunlukla HDL, AGO2 ve NPM1 moleküllerine bağlanmaktadır. miRNA'ların bu yapılarla bağlı şekilde hücrelerden aktif yolla sekresyona uğrayıp ekstrasellüler alana geçerek hedef mRNA'yı içeren hücreler tarafından alındığı düşünülmektedir. Son derece stabil olan bu küçük RNA'ların serumda saptanabilmesi ile hastalıkların tanı ve takibinde miRNA'ların marker olarak kullanılması mümkün olabilir¹⁹⁴.

Literatür incelendiğinde miRNA ile YBMD ilişkisini irdeleyen çalışmaların hücre kültürleri ya da hayvan deneyleri olduğu dikkati çekmektedir. Bu çalışmalardan önemli sonuçlar çıkarılabilmektedir. Ancak elde edilen sonuçlar her zaman klinik uygulamaya tam olarak uyarlanamamaktadır. Buradan yola çıkarak bu tür çalışmalardan elde edilen ön veriler ile klinik çalışmaların yapılması uygun olacaktır. Biz de çalışmamızda yaş tip YBMD hastalarında sık olarak eksprese oldukları daha önceki çalışmalarda gösterilen miRNA subtiplerini (Panel A) incelemeyi planladık. Bu amaçla hastaların serum örneklerini kullandık. Çalışmamızın doku düzeyinde olmayışı bir dezavantaj yaratabilir. Başta diyabet ve onkolojik hastalıklar olmak üzere bazı hastalıklar serum miRNA ekspresyonlarını değiştirebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda diyabet ya da onkolojik hastalık öyküsü olan hastaları çalışma dışında bırakarak çelişkili sonuçlar elde edilmesini engellemeye çalıştık. Ancak unutulmaması gereken önemli bir nokta, şu ana kadar miRNA'lar ile ilişkisi ortaya konmamış birçok farklı hastalığın da ekspresyon düzeylerini değiştirebilme olasılığıdır. Bu nedenle özellikle KNV örneklerinde ekspresyon düzeylerinin çalışılması daha güvenilir sonuçlar verecektir. Hastalık ile ilgili doku ve serum örneklerinin beraber elde edilememesi nedeni ile ortak miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılamaması da yine çalışmanın dezavantajları arasındadır.

Yaptığımız çalışmada iki grubun yaş ortalamasını birbirlerine yakın seçmeye çalıştık, ancak çalışma grubunun yaş ortalamasının kontrol grubu yaş ortalamasına göre daha yüksek olduğunu ve aradaki farkında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu

gördük. Bu durum da çalışmamız için bir dezavantaj olabilir. Ancak bilindiği üzere yaşın artışıyla beraber YBMD görülme sıklığı artmakta ve böylelikle daha ileri yaşlarda hem oküler hem de sistemik yönden sağlıklı bireylerden kontrol grubu oluşturabilmek güçleşmektedir. Bununla birlikte cinsiyet dağılımı yönünden iki grup arasında herhangi bir fark saptamadık. Bu sayede olası bir cinsiyet faktörünü dışlamış olduk.

Literatürde miRNA'lar ve hastalıklar arası ilişkiler araştırıldığında, ilk defa 2002 yılında Calin ve ark. tarafından kronik lenfositik lösemi ile ilişkilendirildiği dikkati çekmektedir¹⁹⁵. Rosefeld'in çalışmasında 253 örnek miRNA mikroarray analizi ile incelenmiş ve 22 kanser tipi 48 miRNA ile %90'dan fazla doğrulukla sınıflandırılmıştır¹⁹⁶. Takamiza Wa ve ark. akciğer kanseri üzerine yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarında, azalmış let-7 ekspresyonu gözlemlemiştir. Azalmış let-7 seviyesi ameliyat sonrası kısalmış sağ kalım süresi ile ilişkilendirilirken, hastalığın evresi ile bağlantılı bulunmamıştır¹⁹⁷. Meme kanseri ile ilişkili olarak ise İori o ve ark. miRNA düzeylerinin normal ve neoplastik meme dokusu arasında büyük farklılık gösterdiğini, özellikle miR-125b, miR145, miR-21 ve miR-155'in meme kanseri dokusunda oldukça azalmış olduğunu göstermiştir¹⁹⁸. Michael ve ark. kolon adenokarsinomu ve normal mukozada miRNA profillerini karşılaştırdıklarında, farklı 28 miRNA belirlemiş, miR-143 ve miR-145'in kolorektal neoplazilerde azalmış olduğunu bildirmişlerdir¹⁹⁹.

miR-15/107 grubu, miR-17~92 dizisi, miR-21, miR-132, miR-296, miR-378 ve miR-519c tümör anjiogenezinde yer alan miRNA' lardır. Ayrıca diğer anjiogenez süreçlerinde de rolleri olabilir^{195,200-206}. Bu miRNA' lardan miR-132 normal endotelde bulunmazken, VEGF ile uyarılmakta, miR-296 ise VEGF ya da tümör hücreleri ile salınımı artmaktadır^{202,203}. Hipoksi ve inflamasyonda ise miR-210'nun bütün hücre tiplerinde hipoksi ile indüklendiği gösterilmiştir²⁰⁷. Yang ve ark. miRNA maturasyonu için gerekli Dicer enzimi defektli farelerde anjiogenezin geciktiğini ve farelerin 12.5-14.5 gün arasında öldüğünü bildirerek miRNA' ların anjiogenezdeki rolünden bahsetmişlerdir²⁰⁸. miRNA fonksiyonunun kalpteki global rolünün anlaşılması için fare kalbinde miRNA olgunlaşması engellenmiş ve miRNA'nın bu organın gelişmesinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür^{209,210}. miR-23~27~24 dizisinin kardiyak iskemi ile ilişkisi gösterilmiştir²¹¹. İnflamasyon, iskemi ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmiş

miRNA'larla yapılmış bu çalışmalar, patogenezinde benzer mekanizmaların olduğu yaş tip YBMD'de de miRNA'larında kritik rol oynayabileceğini göstermektedir.

Caporali ve ark. endotel hücrelerinde miRNA'ları inceleyerek anjiogenez ile ilişkili genlerde yerleşenler, anjiogenik ve antianjiogenik uyarı ile eksprese olanlar olarak üçe ayırmışlardı¹⁷⁰. Bizim sonuçlarımızda miR-17-5p *,miR-20a-5p* artan, miR-27a-3p azalan (p:0,610) (FC:-1,38) ve miR-27b-3p sadece hastalarda eksprese olan miRNA'lardı. Bu miRNA'lar anjiogenez ile ilişkili genlerde yerleşen miRNA'lar ile aynı sınıftaydı.

Wu ve ark. ise miRNA'ları anjiogenezi aktive ve inhibe edenler olarak sınıflamıştı. Bu sınıflamaya göre let 7b,f, miR-27b, miR17 anjiogenezi aktive edenler, miR-20 anjiogenezi inhibe edenler sınıfındaydı¹⁷¹. Bizim çalışmamızda let 7c, miR-27b-3p sadece hasta grubunda eksprese olurken, miR-27a-3p ekspresyonu azalan (p:0,610) (FC:-1,38), miR-17-5p* ve miR20a-5p* ise ekspresyonu artan miRNA'lardı.

Bai ve ark.'ları iskemi ile indüklenen retinal neovaskülarizasyonun patofizyolojisinde yer aldığı diabetik retinopati, retinal vasküler tıkanıklar ve prematür retinopatisininin ciddi görme kayıplarına yol açabileceğini vurgulamışlar. İskemik retina oluşturdukları farelerde, miR-126'nın anjiogenez regulasyonunda rol aldığını göstermişlerdir²¹². Biz de çalışmamızda miR-126-3p'nin ekspresyonunun azaldığını gözlemledik (p:0,290) (FC: -1,10).

Hsieh ve ark.'ları da hücre kültüründe miR-146a' nın insan mikrovasküler endotelial hücrelerinde bulunduğu ve anjiogenez ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir²¹³. Bizim çalışmamızda ise miR-146a-5p'nin* ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.

Shen ve ark' nın oluşturduğu retinal iskeminin indüklendiği farelerde miR-451, -424, -146, -214, -199a, -181 ve -106a ekspresyonunda artış, miR-31,-150 ve miR-184 ekspresyonunda da azalma izlenmiştir¹⁷⁴. Bizim çalışmamızda ise Shen ve ark'na benzer şekilde miR106a-5p* ve miR-106b-5p'de artma (p:0.141) (FC:1.62), miR-150-5p'de azalma (p:0,661) (FC:-1,06), Shen ve ark.'nın sonuçlarına ters olarak ise miR-451a (p:0,104) (FC:1,32), miR-146a-5p (p:0,201) (FC:-1,52) ve miR-146b-5p'de* azalma izlenmiştir.

*: p<0,05

Laser ile indüklenmiş KNV modellerinde miR-21, miR-31 ve miR-150' nin ekspresyonunun arttığı görülmüştür^{174,214}. Yine laser ile indüklenmiş başka bir KNV fare modelinde miR-23~27~24 dizisinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir⁸. Bizim çalışmamızda ise miR-24-3p' nin* ekspresyonunun arttığı, miR-21-5p'nin* ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca miR-27a-3p'nin ekspresyonunun azaldığı (p:0,610) (FC:-1,38), miR-27b-3p ekspresyonunun ise sadece hasta grubunda olduğu görülmüştür. Lin ve arkadaşları tarafından YBMD'li hastalardan elde edilen hücrelerle yapılan deneysel çalışmada miR-23a'nın RPE hücrelerini oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir⁷.

Fare ve insanda yapılan miRNA profillemeye çalışmaları, her iki canlıda da %50'ye yakın miRNA' nın doku spesifik gen ifadesini göstermiştir^{215,216}.

Yang ve ark. tarafından yapılan hücre kültürü çalışmasında mir-29a'nın hipoksi ile birlikte hücrelerde yüksek düzeyde eksprese olduğu ve angiogenez kontrolünde etkin olduğu gösterilmiştir²¹⁷. Biz de yaptığımız çalışmada mir-29a-3p'nin yalnızca hasta grubunda eksprese olduğunu gördük. Yaş tip YBMD'de hipoksinin önemli bir faktör olduğu düşünülürse bu ekspresyon artışının hipoksi ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Benzer şekilde mir-27b'nin angiogenez kontrolünde etkin olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Ancak miR-27b'nin angiogenezi hem tetiklediği hem de inhibe edebildiğine dair sonuçlar yayınlanmıştır²¹⁸⁻²²⁰. Biz de miR-27b'nin yalnızca hasta grubunda eksprese olduğu saptadık. Ancak yalnızca buradan yola çıkarak mir-27b'nin yaş tip YBMD patogenezinde nasıl bir etkinlik gösterdiğini söyleyebilmek oldukça güçtür.

Çalışmamızda yukardaki 2 miRNA subtipine benzer şekilde Let-7c, miR-26b-5p, miR-139-3p, miR-324-3p / 5p, miR-532-3p, miR-744-5p ve miR-212-3p'nin yalnızca hasta grubunda eksprese olduğunu izledik. Bununla birlikte bu miRNA subtiplerinin angiogenez ile ilişkileri şu ana kadar net olarak saptanamamıştır ve yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Ancak her bir subtipin çeşitli hücre gruplarının proliferasyonu üzerinde etkili olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle fizyopatolojisi yalnızca hipoksi ve patolojik angiogeneze indirgenemeyecek olan yaş tip YBMD gelişiminde bu moleküllerin şu ana kadar ortaya konamayan etkinlikleri olabilir.

*: p<0,05

Bu durumu daha detaylı irdelemenin en iyi yolu KNV dokuları üzerinde yeni çalışmaların yapılması olacaktır. Fakat aynı zamanda yalnızca çalışma grubunda eksprese olan miRNA subtiplerinden yola çıkarak yeni bir tarama testinin geliştirilebileceği gözardı edilmemelidir. Yaptığımız çalışmadan yola çıkarak daha fazla hastanın katılımı ve kadavra çalışmalarıyla sonuçların güvenilirliğinin test edilmesi uygun olacaktır. Ayrıca riskli miRNA ekspresyonlarının olduğu bireylerin hastalık gelişimi yönünden uzun süreli takibi aradaki ilişkiyi net olarak ortaya koyabilecektir.

Yaş tip YBMD hastalarından alınan serumlarla, kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasından elde ettiğimiz sonuçlarla, hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile yaş tip YBMD'de eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma niteliğinde olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda;

Hasta ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında; kontrol grubuna göre hastalarda

miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-24-3p, miR-17-5p, miR-223-3p'nin anlamlı olarak artan bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu ($p \leq 0.05$),

miR-19a-3p, miR-140-3p, miR-21-5p, miR-25-3p, miR-146b-5p, miR-192-5p, miR-335-5p, miR-342-3p, miR-374a-5p, miR-410, miR-660-5p, miR-574-3p 'nin anlamlı olarak azalan bir ekspresyon seviyesinin olduğu bulunmuştur ($p \leq 0.05$).

miR-29a-3p, let-7c, miR-26b-5p, miR-27b-3p, miR-139-3p, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-532-3p, miR-744-5p ve miR-212-3p sadece hasta grubunda eksprese olan miRNAlardır.

Elde ettiğimiz bu sonuçlarla, hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile yaş tip YBMD'de eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122:477-85.
2. The Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122:477-485.
3. Gitter KA. Age-related macular degeneration. In: Yannuzzi LA eds. *Chibret International Journal of Ophthalmology*. Philadelphia. J.B. Lippincott Company, 1989:15-25.
4. Ngai LY, Stocks N, Sparrow JM, et al. The prevalence and analysis of risk factors for age-related macular degeneration. 18-year follow-up data from the Speedwell eye study, United Kingdom *Eye* 2011;25:784–93.
5. Otani A, Takagi H, Oh H, et al. Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1912-20.
6. Wang S, Koster KM, He Y. miRNAs as potential therapeutic targets for age-related macular degeneration. *Future Med Chem* 2012;4:277-87.
7. Lin H, Qian J, Castillo AC, et al. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6308-14.
8. Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN, Wang S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:8287-92.
9. Maumenee AE. Symposium: Diseases of the macula, clinical manifestation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryn* 1965;69:605-13.
10. Gass JDM. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium: I. General concepts and classification. II. Senile disciform macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1967;63:573-85.
11. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies, *Survey of Ophthalmol* 2003;48 257–293.
12. De Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1474–1485.

13. Stamper RL, Grossniklaus HE, Kincaid MC. Pathogenesis dynamics of age-related macular disease at the choroid- retinal pigment epithelium photoreceptor complex. In: Loeffler KU et al, (eds). Macular disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993:345-74.
14. Van Leeuwen R, Klaver CCW, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Epidemiology of age-related maculopathy: a review. *European journal of epidemiology* 2003;18:845-54.
15. Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of choroidal neovascularisation in age related macular degeneration with verteporfin: One year results of two randomized clinical trials-TAP Report No.I. *Arch Ophthalmol* 1999;117: 1329-45.
16. El-Amir AN, Sagoo MS, da Cruz L. Age-related macular degeneration. *Br J Hosp Med* 2005;66:677-81.
17. Miller JW, Schmidt-Erfurth U, Sickenberg M, et al. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of a single treatment in a phase 1 and 2 study. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1161- 73.
18. Donders FC. Beitrage zur pathologischen Anatomie des Auges. *Arch Ophthalmol* 1854;1:106–18.
19. Curcio CA, Messinger JD, Sloan KR, McGwin G, Medeiros NE, Spaide RF. Subretinal drusenoid deposits in non-neovascular age-related macular degeneration: morphology, prevalence, topography, and biogenesis model. *Retina* 2013;33:265-76.
20. Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA. Drusen in age related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser-photociagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol* 1999;44:1-29.
21. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol* 1992;99:933-43.
22. Coffey AJ, Brownstein S. The prevalence of macular drusen in postmortem eyes. *Am J Ophthalmol* 1986;102:164-71.
23. Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmol* 1985;92:615- 627.

24. Age Related Eye Disease Study Group: Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmol* 2000;107:2224-2232.
25. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1995;39:367-374.
26. Bressler NM, Maguire MG, Bressler SB, Fine SL. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration: the Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1442-7.
27. Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy Study Group; Verteporfin in Photodynamic Therapy Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization with verteporfin: fluorescein angiographic guidelines for evaluation and treatment-TAP and VIP report No. 2. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1253-1268.
28. Mukesh BN, Dimitrof PN, Leikin S, Wang JJ, Michel P, McCarty CA. Five-year incidence of age-related maculopathy: The Visual Impairment Project. *Ophthalmol* 2004;111:1176-1182.
29. Arnold JJ, Quaranta M, Soubrane G, Sarks SH, Coscas G. Indocyanine green angiography of drusen. *Am J Ophthalmol* 1997;124:344-356.
30. Sarks SH, Sarks JP. Age-related macular degeneration: Atrophic form. In Ryan SJ, Schachat AP, Murphy RB (eds): *Retina*, Vol 2. St Louis, Mosby- Year Book, 1994:1071-1102.
31. Mimoun G, Soubrane G, Coscas G. Macular drusen. *J Fr Ophthalmol* 1990;108:825-831.
32. Arnold JJ, Sarks SH, Killimsworth MC, Sarks JP. Reticular pseudodrusen: A risk factor in age-related maculopathy. *Retina* 1995;15:183-191.
33. Klein R, Meuer SM, Knudtson MD, Iyengar SK, Klein BE. The epidemiology of retinal reticular drusen. *Am J Ophthalmol* 2008;145:317-326.

34. Sunness JS, Applegate CA, Haselwood D, et al. Fixation patterns and reading rates in eyes with central scotomas from advanced atrophic age-related macular degeneration and Stargardt's disease. *Ophthalmol* 1996;103:1458-1466.
35. Sunness JS, Rubin GS, Applegate CA, et al. Visual function abnormalities and prognosis in eyes with age-related geographic atrophy of the macula and good visual acuity. *Ophthalmol* 1997;104:1677-1691.
36. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth M. Evolution of geographic atrophy of the retina pigment epithelium. *Eye* 1988;2:552-577.
37. Maguire P. Geographic atrophy of the retina pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 1986; 621-625.
38. Sunness JS, Rubin GS, Applegate CA, et al. Enlargement of atrophy and visual acuity loss in geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmol* 1997;106:1768-79.
39. The Age-Related Eye Disease Study Research Group. The age-related eye disease study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: The Age-Related Eye Disease Study Report No.6. *Am J Ophthalmol* 2001;132:668-81.
40. Macular Photocoagulation Study Group. Subfoveal neovascular lesions in age related macular degeneration: guidelines for evaluation and treatment in the Macular Photocoagulation Study. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1242-57.
41. Schmidt-Erfurth U, Miller J, Sickenberg M, et al. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization: Clinical and angiographic examples. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236:365-74.
42. Yanuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA. Digital indocyanin green videoangiography and choroidal neovascularisation. *Retina* 1992;12:191.
43. Akbatur HH: Subretinal neovasküler membranlar. *Ret-Vit* 1998;6:74-9.
44. Gass JDM: Serous retinal pigment epithelial detachment with notch: a sign of occult choroidal neovascularization. *Retina* 1984;4:205-220.
45. Macular Photocoagulation Study Group: Occult choroidal neovascularization. Influence on visual outcome in patients with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1996;114:400-412.
46. Submacular Surgery Trials (SST) Research Group. Surgery for hemorrhagic

- choroidal lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings. SST report no.13. *Ophthalmol* 2004;111:1993-2006.
47. Friedman DS, Kotz J, Bressler NM, Rahmani BJ, Tielsch JM. The Baltimore Eye Survey. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration. *Ophthalmol* 1999;106:1049-1055.
48. Mitchell P, Smith W, Wang JJ. Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmol* 1998;105:1359-63.
49. Vingerling JR, Dielemans I, Hofmann A, et al. The prevalence of age-related maculopathy in Rotterdam eye study. *Ophthalmol* 1995;102:205-10.
50. Evans JR. Risk factors for age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2001;20:227-253.
51. Tuo J, Bojanowski C, Chan C. Genetics factors of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Res* 2004;23:229-49.
52. Jonasson F, Arnarsson A, Sverrisson T, et al. 5- year incidence of age-related maculopathy-Reykjavik Eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3083.
53. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR. The Framingham Eye Study Monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol* 1980;24:335-610.
54. Delcourt C, Lacroux A, Carriere I, POLA Study Group. The three- year incidence of age- related macular degeneration: The " Pathologies Ocularies Liees a Page" (POLA) Prospective Study.
55. Hirvela H, Luukinen H, Lic EL, Laatikainen L. Risk factors of age-related maculopathy in a population 70 years of age or older. *Ophthalmol* 1996;103:871-7.
56. You QS, Xu L, Yang H, et al. Five-year incidence of age-related macular degeneration: The Beijing Eye Study. *Ophthalmol* 2012;8:23.
57. Klein R, Klein BE, Jensen SC, et al. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol* 1997;104:7-21.
58. Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FL, et al. Senile macular degeneration: a case control study. *Am J Epidemiol* 1983;118:213-27.
59. Klein R, Klein BE, Linton KL, et al. The relation of age-related maculopathy to smoking. The Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol* 1993;137:190-200.

60. Bressler SB, Muñoz B, Solomon SD, West SK; Salisbury Eye Evaluation (SEE) Study Team. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Arch Ophthalmol* 2008;126:241-5.
61. Frank RN, Puklin JE, Stock C, Canter LA. Race, iris color, and age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000;98:109-15.
62. Ergin MH, Koçak N. Yaşa bağlı makula dejeneresansında epidemiyoloji ve etyopatogenez. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006;41:1-6.
63. Seddon JM, Gensler G, Milton RC, et al. Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA* 2004;291:704-710.
64. Vinding T. University Eye Clinic and Copenhagen City Heart Study. Age-related macular degeneration. Macular change, prevalence and sex ratio. An epidemiological study of 1000 aged individuals. *Acta Ophthalmol* 1989;76:609-16.
65. Smith W, Mitchell P, Wang JJ. Gender, oestrogen, hormone replacement and age related macular degeneration: results from the Blue Mountains Eye Study. *Aust NZ J Ophthalmol* 1997;25:13-5.
66. Vingerling JR, Dielemans I, Witteman JR, et al. Macular degeneration and early menopause: a case study. *BMJ* 1995;310:1570-1.
67. Klein R, Klein BEK, Moss SE. Diabetes, hyperglycemia and age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol* 1992;99:1527-1534.
68. Snow KK, Cote J, Yang W, et al. Association between reproductive and hormonal factors and age-related maculopathy in postmenopausal women. *Am J Ophthalmol* 2002;134:842-848.
69. Eye Disease Case-Control Group. Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1701-1708.
70. Klein R, Klein B, Jensen Sc, et al. The relation of socioeconomic factors to age-related cataract, maculopathy and impaired vision. *Ophthalmol* 1994;101:1969-1979.
71. Cruickshanks K, Klein R, Klein B. The Beaver Dam Eye Study. Sunlight and age related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1993;11:514-518.
72. Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD, et al. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1191-9.

73. van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Cholesterol and age-related macular degeneration: Is there a link? *Am J Ophthalmol* 2004;137:750-2.
74. Klein R, Klein BEK, Jensen SC, et al. Medication use and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1354-1359.
75. Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, et al. Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 1995;142:404-409.
76. Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR. Epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004;137:486-95.
77. Snow KK, Seddon JM. Do age-related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents? *Ophthalmol Epidemiol* 1999;6:125-143.
78. Axer-Siegel R, Bourla D, Ehrlich R , et.al. Association of neovascular age-related macular degeneration and hyperhomocysteinemia. *Am J Ophthalmol* 2004;137:84-89.
79. Wilson HL, Schwartz DM, Bhatt HRF, et al. Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004;137:615-24.
80. Suner IJ, Espinosa-Heidmann DG, Marin-Castano ME, et al. Nicotine increases size and severity of experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:311-317.
81. Mozaffarieh M, Sacu S, Wedrich A. The role of carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence. *Nutr J* 2003;2-20.
82. Cho E, Hung S, Willett WC and et al. Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 2001;73:209-218.
83. Seddon JM, Cote J, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts and fish intake. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1728- 1737.
84. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Relationship of Dietary Lipid Intake and Age Related Macular Degeneration in a Case Control Study: AREDS Report No 20. *Arch Ophthalmol* 2007;125:671-9.

85. Ulvik O.S, Seland J, Wentzel-Larsen T. Refraction, axial length and age related maculopathy. *Acta Ophthalmol Scand* 2005;83:419-423.
86. Ikram MK, van Leeuwen R, Vingerling JR, et al. Relationship between refraction and prevalent as well as incident age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3778-3782
87. Tomany SC, Klein R, Klein BE. The relationship between iris color, hair color, and skin sun sensitivity to the 10-year incidence of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol* 2003;110:1526-33.
88. Wang JJ, Klein R, Smith W, Klein BE, Tomany S, Mitchell P. Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy: pooled findings from the Beaver Dam and Blue Mountains eye studies. *Ophthalmol* 2003;110:1960-7.
89. Bockelbrink A, Roll S, Ruether K, Rasch A, Greiner W, Willich SN. Cataract surgery and the development or progression of age-related macular degeneration: a systematic review. *Surv Ophthalmol* 2008;53:359-67.
90. Dorey CK, Wu G, Ebenstein D, Garsd A, Weiter JJ. Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1691-1699.
91. Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:195–200.
92. Wilcox DK. Vectorial accumulation of cathepsin D in retinal pigmented epithelium: effects of age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1988;29:1205-1212.
93. Kwak N, Okamoto N, Wood JM, Campochiaro PA. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3158-3164.
94. Sundelin SP, Wihlmark U. Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Curr Eye Res* 1998;17:851-57.
95. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retina pigment epithelium: A review. *Eye* 1995;9:763-771.
96. Suter M, Reme C, Grimm C, Wenzel A, Jäätela M, Esser P. Age-related macular degeneration. The lipofuscin component n-retinyl-n-retinyliden ethanolamine

- detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 39625–39630.
97. Cour M, Kiilgaard J, Nissen M. Age-related macular degeneration. Epidemiology and optimal treatment. *Drugs aging* 2002;19:101-133.
98. Ramrattan RS, van der Schaft TL. Morphometric analysis of the Bruch's membrane, the choriocapillaris and the choroid in ageing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2857-64.
99. Guymer R, Bird A. Age Changes in Bruch's Membrane and Related Structure. *Retina Volume 2*. Ryan S.J. Los Angeles. Mosby 2001;1051-1063.
100. Ruiz A, Brett P, Bok D. TIMP 3 is expressed in retina pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:467-74.
101. Leu ST, Batni S. Drusen are cold stops for proteolysis: Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor proteins in age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2002;74: 141-154.
102. Sarks SH. Aging and degeneration in the macular region: A clinicopathologic study. *Br J Ophthalmol* 1976;60:324-41.
103. Bailey TA, Alexander RA, Dubovy SR, Luthert PJ, Chong NH. Measurement of TIMP expression Bruch's membrane thickness in human macula. *Exp Eye Res* 2001;73:851-58.
104. Starita C, Hussain AA, Patmore A, Marshall J. Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:762-67.
105. Zarbin MA. Current Concepts in the Pathogenesis of Age Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* 2004;122:598-614.
106. Starita C, Hussain AA, Pagliarini S, Marshall J. Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: Implications of macular disease. *Exp Eye Res* 1996;62:565-72.
107. Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. Age related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1290-97.
108. Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2009;28:1-18.

109. Flower RW, Hochheimer BF. A clinical technique and apparatus for simultaneous angiography of the separate retinal and choroidal circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12:248-261.
110. Tso MOM: Pathogenetic Factors of Aging on Foveal Choroidal Circulation. *Arch Ophthalmol* 1998;116:150-154.
111. Young RW. Pathophysiology of age related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1987;31:291-306.
112. Campochiaro P. Cytokine production by retinal pigmented epithelial cells. *Int. Rev Cytol* 1993;146:75-82.
113. Marshall J. The aging retina: physiology or pathology. *Eye* 1987;1:282-295.
114. Liles MR, Newsome DA. Antioxidant enzymes in the human RPE. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1285-88.
115. Friedrichson T, Kalbach H, Buck P, van Kuijk FJ. Vitamin E in macular and peripheral tissues of the human eye. *Curr Eye Res* 1995;14:693-701.
116. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age related macular degeneration *Surv Ophthalmol* 2000;45:115-34.
117. de La Paz M, Anderson RE. Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:3497-99.
118. Schütt F, Davies S, Kopitz J, Holz FG, Boulton ME. The phototoxicity of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:s129.
119. Luty G, Grunwald J, Wavre-Shapton ST, et al. Changes in choriocapillaris and retinal pigment epithelium in age related macular degeneration. *Mol Vis* 1999;5:35-38.
120. Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration. The involvement of gaint cells in atrohy of retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:364-71.
121. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. Angiogenesis: an update. *Histol Histopathol* 1994;9:807-843.

122. Jampol LM, Ebroon DA, Goldbaum MH. Peripheral proliferative retinopathies: an update on angiogenesis, etiologies and management. *Surv Ophthalmol* 1994;38:519-540.
123. D'Amore PA. Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3974-3979.
124. Alfaro DV, Liggett PE, Mieler WF, et al. Etiology of late age-related macular disease. In *Age-related macular degeneration*. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006:23-29.
125. Kulkarni AD, Kuppermann BD. Wet age-related macular degeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;13:57.
126. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, et al. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999;155:421-8.
127. Zhang L, Huang J, Yang N, et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:9136-41.
128. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncol* 2010;4:230-41.
129. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing (Reprinted from *Cell*, vol 123, pg 631-640, 2005). *Cell* 2007;131:63-73.
130. Djuranovic, S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Sci* 2011;331:550–553.
131. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007;1:367.
132. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350-5.
133. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281297, 2004). *Cell* 2007;131:1129.
134. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-854.
135. Pasquinelli EA, Reinhart JB. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;408:86-89.

136. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403:901–906.
137. Goodfellow SJ, White RJ. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle* 2007;6:2323-2326.
138. Felton-Edkins ZA, Kenneth NS, Brown TR, et al. Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle* 2003;2:181-184.
139. Scott PH, Cairns CA, Sutcliffe JE, et al. Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J Biol Chem* 2001;276:1005-1014.
140. White RJ, Gottlieb TM, Downes CS, Jackson SP. Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 1995;15:6653-6662.
141. Costanzo G, Camier S, Carlucci P, et al. RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes in vivo: TFIIIB occupancy and promoter opening. *Mol Cell Biol* 2001;21:3166-3178.
142. Young LS, Rivier DH, Sprague KU. Sequences far downstream from the classical tRNA promoter elements bind RNA polymerase III transcription factors. *Mol Cell Biol* 1991;11:1382-1392.
143. Besser D, Gotz F, Schulze-Forster K, et al. DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett* 1990;269:358-362.
144. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Sci* 2004;303:83-86.
145. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097-1101.
146. Hess J, Perez-Stable C, Wu GJ, et al. End-to-end transcription of an Alu family repeat. A new type of polymerase-III-dependent terminator and its evolutionary implication. *J Mol Biol* 1985;184:7-21.
147. Gu TJ, Yi X, Zhao XW, et al. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics* 2009;10:563.
148. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* Publication of the Rna Society 2004;10:185-91.

149. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Sci* 2004;303:95-8.
150. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 2003;17:3011-6.
151. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nat* 2003;425:415-419.
152. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-269.
153. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002;21:5875-5885.
154. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123:631-640.
155. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:369-378.
156. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005;11:1753-1761.
157. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*, 2011;18:1104-1110.
158. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006;12:580-7.
159. Divakaran V, Mann DL. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res* 2008;103:1072-1083.
160. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010;140:652-665.
161. Martello G, Rosato A, Ferrari F, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 2010;141:1195-1207.
162. Loscher CJ, Hokamp K, Wilson JH, et al. A common microRNA signature in mouse models of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2008;87:529-534.
163. Karali M, Peluso I, Marigo V, Banfi S. Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48: 509-515.

164. Li X, Carthew RW. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 2005;123:1267–1277.
165. Frederikse PH, Donnelly R, Partyka LM. miRNA and Dicer in the mammalian lens: expression of brain-specific miRNAs in the lens. *Histochem. Cell Biol* 2006;126:1-8.
166. Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Mol. Vis* 2006;12:1175–1184.
167. Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J. Biol. Chem* 2007b;282:25053–25066.
168. Xu S, Sunderland ME, Coles BL, et al. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev. Biol* 2007;304:713–721.
169. Deo M, Yu JY, Chung KH, Tippens M, Turner DL. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Dev Dyn* 2006;235:2538–2548.
170. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2011;55:79-86.
171. Wu F, Yang Z, Li G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:549-53.
172. Frank RN. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350, 48–58.
173. Green WR. Histopathology of age-related macular degeneration. *Mol. Vis* 1999;5,27.
174. Shen, J., Yang, X., Xie, B., Chen, Y., Swaim, M., Hackett, S.F., Campochiaro, P.A. MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Mol Ther* 2008;1208-1216.
175. ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1432-1444.
176. MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1419-1431.
177. Amrite A, Pugazhenti V, Cheruvu N, Kompella U. Delivery of celecoxib for treating diseases of the eye: influence of pigment and diabetes. *Expert Opin Drug Deliv* 2010;7:631-645.

178. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 2005;14:207-221.
179. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011;469:336-342.
180. Sun W, Li YSJ, Huang HD, et al. MicroRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:1-27.
181. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18,997-1006.
182. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour associated microRNAs in serum of patients with diffuse large Bcell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672-675.
183. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513–10518.
184. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009;15:5473–5477.
185. Chen X, Gao C, Li H, et al. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res* 2010;20:1128-1137.
186. Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA–126 and microRNA–182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28:655-661.
187. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285:17442-17452.
188. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9,654-659.

189. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009;2:ra81.
190. Zhang YJ, Liu DQ, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010;39:133-144.
191. Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:4402-4407.
192. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;39:7223-7233.
193. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423-433.
194. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 2012;3:28-37.
195. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99:15524e15529.
196. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Bio technol* 2008;26:462-9.
197. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004;64:3753-6.
198. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-70.
199. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1:882-91.
200. Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2010;107:6334-6339.
201. Dews M, Homayouni A, Yu D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet* 2006;38:1060-1065.

202. Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, et al. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med* 2010;16:909–914.
203. Wurdinger T, Tannous BA, Saydam O, et al. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 2008;14:382–393.
204. Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007;104:20350–20355.
205. Cha ST, Chen PS, Johansson G, et al. MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 α expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2010;70:2675–2685.
206. Liu LZ, Li C, Chen Q, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS ONE* 2011;6:e19139.
207. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. miR-210: more than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life* 2011;63:94-100.
208. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J. Biol. Chem* 2005;280:9330-9335.
209. Chen JF, Murchison EP, Tang R, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;12;105:2111-6.
210. Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007;20;129:30317.
211. Bang C, Fiedler J, Thum T. Cardiovascular importance of the microRNA-23/27/24 family. *Microcirculation* 2012;19:208-14.
212. Bai Y, Bai X, Wang Z, Zhang X, Ruan C, Miao J. MicroRNA 126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. *Exp Mol Pathol* 2011;91:471-7.
213. Hsieh CH, Rau CS, Jeng SF, et al. Identification of the potential target genes of microRNA146a induced by PMA treatment in human microvascularendothelial cells. *Exp Cell Res* 2010;316:1119-26.

214. Sempere LF, Free mantle S, Pitha-Rowel, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 2004;5:R13.
215. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuo -vo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, celllines, and tumors. *RNA* 2008;14:35-42.
216. Sabatell C, Malvaux L, Bovy N, et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS ONE* 2011;6:e16979.
217. Yang Z, Wu L, Zhu X, et al. MiR-29a modulates the angiogenic properties of human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;26:434.
218. Urbich C, Kaluza D, Frömel T, et al. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A. *Blood* 2012;9:1607-16.
219. Ye J, Wu X, Wu D, et al. miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *PLoS One* 2013 ;12:8.
220. Muñoz-Chápuli R. Evolution of angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011;55:345-51.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- YBMD: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
RPE: Retina Pigment Epiteli
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
KNVM: Koroid Neovasküler Membran
miRNA :MikroRNA
PAS: Periodik asit kayma
FFA: Fundus Floresein Anjiyografi
İSYA :İndosiyenin Yeşil Anjiyografisi
KNV: Koroid Neovaskülarizasyonu
MPS: Makular Fotokoagulasyon Çalışma Grubu
FAZ: Foveal Avasküler Zon
PED: Pigment Epitel Dekolmanı
WARMGS: Wisconsin Yaş İlişkili Maculopati Sınıflama Sistemi
VKİ: Vücut Kitle İndeksi
PEDF: Pigment Epitel Kaynaklı Faktör
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TRBP: TAR RNA bağlayan protein
PACT: PZR aktive eden protein
RISC: RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi
UTR: Kodlanmayan Bölge
ORF: Açık okuma çerçevesi
OKT: Optik koherens tomografi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 mikroRNA oluşumu	25
Şekil 2 mikroRNA oluşumu ve fonksiyonu	26
Şekil 3 Anjiogenez ile ilişkili mikroRNA'lar	28
Şekil 4 Anjiogenezi inhibe ve aktive eden mikroRNA'lar	29
Şekil 5 Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA'lar	42

TABLolar DİZİNİ

TABLO		Sayfa No
Tablo 1	Hasta ve kontrol grubunun yaş ortalamaları	38
Tablo 2	Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı	38
Tablo 3	Hasta ve kontrol grubunda plasma miRNA salınımı karşılaştırması	39-40
Tablo 4	Kontrol grubuna göre hastalarda anlamlı bulunan miRNA ekspresyon oranları	41
Tablo 5	Sadece hasta grubunda eksprese olan miRNA ekspresyon oranları	42