



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**İNTRAVİTREAL OLARAK UYGULANAN BEVASİZUMABIN
SİSTEMİK ETKİLERİNİN HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Erdem DİNÇ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Özlem YILDIRIM**

Mersin–2011



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**İNTRAVİTREAL OLARAK UYGULANAN BEVASİZUMABIN
SİSTEMİK ETKİLERİNİN HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Erdem DİNÇ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Özlem YILDIRIM**

**Bu Tez, BAP BAP-TF CTB (ED) 2011-3 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birim
tarafından desteklenmiştir**

Mersin-2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve birikimini benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sayın Özlem YILDIRIM'a en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ ve Arş. Gör. Tuba ÖZCAN'a; Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Necmiye CANACANKATAN, Arş. Gör. Oğuz Emre GÜR ve Gonca TEKE'ye; Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Ana Bilim Dalı Öğr. Gör. Gülhan OREKİCİ TEMEL'e tezime olan bilimsel katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Oftalmoloji eğitimim boyunca bana her türlü emeği ve özeni gösteren hocalarım Doç. Dr. Ayça YILMAZ, Doç. Dr. M. Atila ARGİN, Doç. Dr. Ufuk ADIGÜZEL, Doç. Dr. A. Ayça SARI ile Yrd. Doç. Dr. Bahri AYDIN ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca değerli arkadaşlarım B. Tahir TAHİROĞLU ve Bülent ÖZKAN'a da destekleri için minnettarım.

Bilimsel bakış açısı kazanmamda katkıları büyük olan değerli hocalarım Prof. Dr. Derya U. ALTINTAŞ, Prof. Dr. Tuncay ÖZGÜNEN ve Dr. Kerem T. ÖZGÜNEN'e gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, her zaman yanımda olan annem Nevin DİNÇ, babam İsmail DİNÇ ve sevgili kardeşim Ergün DİNÇ ile hayat arkadaşım, bir tanem Reyhan DİNÇ'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	7
GİRİŞ ve AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	11
GEREÇ ve YÖNTEMLER	22
BULGULAR	33
TARTIŞMA	50
SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	58
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	67
ŞEKİLLER DİZİNİ	68
TABLolar DİZİNİ	70

ÖZET

Bevasizumab (Altuzan®, Roche, İsviçre) immünglobulin yapısında, humanize monoklonal bir antikör olup vasküler endotelyal büyüme faktörünü inhibe etmektedir. İlk olarak Amerikan Gıda ve İlaç Uygulamaları dairesi tarafından metastatik kolorektal kanserlerde intravenöz olarak kullanımına onay verilmiştir. Ancak son yıllarda, patofizyolojisinde vasküler endotelyal büyüme faktörünün rol aldığı çeşitli göz hastalıklarında endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır. İlacın lokal etkileriyle ilgili bir çok çalışma yapılmış olup göz içi dokular için güvenilir olduğu kabul görmüştür. Bununla birlikte intravitreal olarak uygulanan ilacın sistemik etkileri konusunda yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı intravitreal olarak uygulanan bevasizumab molekülünün uzak organ etkilerini deneysel hayvan modeli üzerinde değerlendirmektir.

Kırk adet erkek, genç erişkin, albino Yeni Zelanda tavşanı her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılarak çalışmaya alındı. Kontrol grubundaki deney hayvanlarına herhangi bir girişim uygulanmazken grup I, II, III ve IV'deki hayvanların sağ gözlerine intravitreal 1.25 mg (0.05 ml) bevasizumab (Altuzan®, Roche, İsviçre) enjeksiyonu yapıldı. Sonra sırasıyla 1. gün, 7. gün, 14. gün ve 28. günde beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve kan örnekleri toplandı. Serum örneklerinde vasküler endotelyal büyüme faktörü düzeyleri değerlendirilirken, organ homojenatlarında vasküler endotelyal büyüme faktörü, redükte glutatyon, malondialdehit düzeyleri ve süperoksid dismutaz aktivitesi değerlendirildi. Beyin, kalp ve böbrek örneklerinde bevasizumab boyaması yapıldı. Ayrıca böbrek dokuları kaspaz-3 boyaması ve elektron mikroskopi ile değerlendirildi.

Deney sırasında grup II ve grup IV'deki birer deney hayvanında ölüm izlendi. Grup II'de ölen hayvanda kalın bağırsak perforasyonu saptanırken diğer hayvanda herhangi bir neden bulunamadı. İntravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın beyin, kalp ve böbrek dokusuna geçtiğini tespit edildi. Serum, karaciğer ve böbrek dokusunda vasküler endotelyal büyüme faktöründe azalma saptandı. Aynı zamanda beyin, kalp, karaciğer ve böbrek dokusunda ilacın oksidatif strese neden olduğunu görüldü. Bununla birlikte böbrek dokusunda apoptozis izlenmezken elektron mikroskopi doğaldı.

Sonuç olarak çalışmamızda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın yalnızca göz dokusu içerisinde kalmadığı yaşamsal önemi olan beyin, kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlara dağılarak çeşitli etkilere neden olduğunu ortaya koyuldu. Bu sonuçlar ışığında, ilacın klinik kullanımı sırasında yan etkiler yönünden dikkatli olunmalıdır. Hastalara kullanım öncesinde detaylı bilgi verilmesi ve risk taşıyan hastalarda enjeksiyon öncesinde gerekli tetkiklerin yapılması büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: İntravitreal bevasizumab, uzak organ toksisitesi.

ABSTRACT

Bevacizumab (Avastin), Roche, Switzerland) has immunoglobulin structure and humanized monoclonal antibody that inhibits vascular endothelial growth factor. First, U.S. Food and Drug Administration authorized its use for metastatic colorectal cancer as intravenous. However, in recent years, Bevacizumab has off-label used in a variety of eye diseases in which pathophysiology of vascular endothelial growth factor involved. Lots of work made concerning the effects of bevacizumab and its efficacy recognized as safe for intraocular tissues. However, there is not enough clinic study about the systemic effects of drug intravitreally. The aim of this study was to evaluate the efficacy of Bevacizumab molecule applied intravitreally on distant organs in experimental animal model.

In the study, forty-male, young adult albino New Zealand rabbits were divided into five groups so that there were 8 animals in each of the group. While not any attempt in the control group, animals in group I, II, III, IV intravitreal 1.25 mg (0.05 ml) of bevacizumab (Avastin), Roche, Switzerland) injection was made in their right eyes. After this procedure, respectively, in 1st day, 7th day, 14th day and 28th day, their brain, heart, liver, kidney, and blood samples were collected. Serum vascular endothelial growth factor levels in assessing, the organ homogenates of vascular endothelial growth factor, reduced glutathione, malondialdehyde levels, and superoxide dismutase activity was evaluated. The brain, heart and kidney samples bevacizumab staining was made. Also, kidney tissues were assessed by caspase-3 staining and electron microscopy.

During the experiment, in group II and group IV, one experiment animal death was observed. While an animal, died in group II, had colon perforation, in other animal we could not found any reason. Applied as intravitreal, it was determined that bevacizumab passed into the brain, heart and kidney tissues. Decreasing was detected in vascular endothelial growth factor in serum, liver and kidney tissues. At the same time, it was seen that the drug causes oxidative stress in brain, heart and kidney tissues. However, in kidney tissue apoptosis not was observed and electron microscopy was natural.

As a result, in our study, applied as intravitreal the Bevacizumab does not only remain in eyes; however spreads into other vital organs such as brain, heart, liver and kidney and has several effects on those vital tissues. In this

respect, care should be taken in terms of side effects of the drug during clinical use. The patients should be informed about the drug before use and in patient at risk necessary examinations should be made prior to injection.

Key Words: Intravitreal bevacizumab, distant organ toxicity.

GİRİŞ VE AMAÇ

Bevasizumab (Altuzan®, Roche, İsviçre) 149 kd ağırlığında, immünglobulin G₁ (IgG₁) yapısında, humanize monoklonal bir antikor olup vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) inhibe etmektedir. Bu molekül nonselektif şekilde VEGF-A'nın tüm izoformlarını bağlayıp etkinlik göstermesini engellemektedir¹. İlk olarak Amerikan Gıda ve İlaç Uygulamaları dairesi (FDA) tarafından metastatik kolorektal kanserlerde intravenöz olarak kullanımına onay verilmiştir. Ancak son yıllarda koroidal neovasküler membran, diyabetik retinopati, retinal ven oklüzyonu ve VEGF artışına bağlı olarak gelişen diğer göz hastalıklarında endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır²⁻⁴.

İlacın intravitreal olarak kullanıldığı ilk dönemlerde bevasizumab molekülünün farmakokinetiği ve sistemik etkileri konusunda yeterli bir bilgi birikimi mevcut değildi. İntravitreal olarak uygulanan ilacın sistemik geçişinin olmayacağı, ayrıca kullanılan dozun sistemik doza göre çok düşük olması nedeniyle sistemik yan etkilerin görülmeceği düşünülüyordu. Ancak, yapılan çalışmalarda intravitreal olarak uygulanan ilacın sadece göz dokusu içerisinde kalmadığı, aynı zamanda sistemik dolaşıma da geçtiği deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir⁵⁻⁷. Tüm bu çalışmalarla beraber yayınlanan olgu serilerinde intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın sistemik kan basıncını yükseltebileceği ya da kan basıncı kontrolünü bozabileceği, aynı zamanda çeşitli dokularda iskemik olayları tetikleyebileceği belirtilmiş ve olası sistemik yan etkiler nedeniyle dikkatli kullanımı önerilmiştir^{8,9}.

Yapılan deneysel çalışmalarda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın histolojik ve elektrofizyolojik olarak retina dokusuna toksik olmadığı gösterilmiştir¹⁰⁻¹². Ancak tüm bu çalışmalarda sistemik dolaşıma geçen ilacın uzak organ etkileri değerlendirilmemiştir. Bununla birlikte VEGF sadece göz dokusunda değil vücudun başka bölgelerinde de yeni kan damarlarının gelişebilmesi için gereklidir. Örneğin, iskemik bir dokuda yeni damarların gelişebilmesi VEGF'ye bağımlılık gösterebilmekte ve ciddi VEGF inhibisyonu durumunda VEGF bağımlı olarak gelişen bazı fizyolojik olaylar etkilenebilmektedir¹³. Bu nedenle intravitreal olarak uygulanan ilacın sistemik etkilerinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Böylece ortaya çıkabilecek olası komplikasyonlar önceden tahmin edilebilecek ve ilaç uygulamaları öncesinde hasta ile ilgili gerekli önlemler alınabilecektir. Bu çalışmanın amacı intravitreal

olarak uygulanan bevasizumab molekülünün uzak organ etkilerini deneysel hayvan modeli üzerinde değerlendirmektir.

GENEL BİLGİLER

Dokuların normal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi kan damarları tarafından sağlanan oksijen desteğine bağlıdır. Bu desteğin devam edebilmesi, sağlıklı bir damar sisteminin devamlılığıyla gerçekleştirilebilmektedir. Ancak bu damar sisteminin hangi mekanizmalarla devamlılığını sağladığı ve ortaya çıkan hasarların nasıl fizyolojik sınırlar içerisinde tamir edilebildiği son yıllarda anlaşılmaya başlamıştır. Alta yatan bu mekanizmaların anlaşılmasıyla birlikte önemli morbidite ve mortalite nedeni olabilecek bazı hastalıkların tedavisi mümkün olabilecektir. Bu mekanizmalar içerisinde endotel hücrelerini etkileyen birçok moleküler faktör rol almakta ve son yıllarda bu moleküllere karşı geliştirilen çeşitli terapötik ajanlar ile yapılan çalışmalar ve tedaviler popüler hale gelmektedir.

Tüm bu mekanizmaların anlaşılabilmesi için iki temel kavramı birbirinden ayırmak gerekmektedir;

- Vaskülogenez
- Angiogenez.

Vaskülogenez

Vaskülogenez, angioblastlar olarak adlandırılan öncül hücrelerin farklılaşmasıyla yeni damarların oluşumunu ifade etmektedir. Farklılaşmamış bu öncül hücreler vasküler bir ağ şeklinde endotel hücrelerine dönüşmektedir¹⁴. Bu durum embriyogenezin erken dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. VEGF, vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü-2 (VEGFR-2), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) angioblastların farklılaşmasını uyaran temel faktörlerdir^{15,16}. Bununla birlikte vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü-1'in (VEGFR-1) angioblastlar üzerinde inhibe edici etkisi bulunmaktadır¹⁷. Geçmiş yıllarda endotel öncülü hücrelerin yalnızca embriyonik hayatta etkili olduğu düşünülürken erişkinlerden de bu hücreler izole edilebilmiş ve çeşitli moleküller tarafından hücrelerin uyarılabildiği gösterilmiştir¹⁸.

Angiogenez

Angiogenez, önceden var olan damarlardan yeni damarların gelişimini ifade etmektedir. Erişkinlerde yeni damarlar büyük oranda angiogenez yoluyla oluşmaktadır. Angiogenez normal doku fonksiyonlarının devamlılığında önemli bir rol almakla birlikte birçok hastalığın

fizyopatolojisinin temelinde de yer almaktadır. Bundan dolayı angiogenez fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki ayrı başlık altında toplanabilir.

Fizyolojik angiogenez fetüs gelişimiyle başlamakta ve erişkin dokulardaki normal damar ağını oluşturacak şekilde devam etmektedir. Ayrıca gebelik, kan basıncı düzenlenmesi, yara iyileşmesi, inflamasyon ve iskemik dokuların yeniden damarlanmasında rol almaktadır¹⁹. Ancak dokuya uygun damar yapısı meydana geldikten sonra süreç devam etmemektedir. Patolojik angiogenez ise kanser, ateroskleroz, psöriazis, romatoid artrit ve oküler neovaskülarizasyon gibi pek çok hastalıkta ortaya çıkmakta ve kontrol altına alınamamaktadır¹⁹. Fizyolojik ve patolojik angiogenez sonucu oluşan damarların dağılımları ve histolojileri de farklılık göstermektedir. Normal kan damarları düzenli bir dağılım göstermekte ve klasik damar hiyerarşisine uygun şekilde sıralanmaktadır. Ancak patolojik angiogenezde damarlar düzensiz yerleşimli ve dağılımlıdır²⁰. Ayrıca bazı bölgelerde arteriovenöz şantlar oluştururlar ve bu yolla klasik damar hiyerarşisi bozulur. Damarlar değişken ve farklı biçimli fenestrasyon yapısından dolayı oldukça geçirgen olup pek çok büyüme faktörü reseptörü taşımaktadır.

Vaskülogenez sonucu meydana gelen damarlar düşük derecede fonksiyonel bir yapıya sahipken angiogenezde yüksek derecede fonksiyonel damarlar meydana gelmekte ve bundan dolayı önde gelen terapötik hedef patolojik angiogenez olmaktadır.

Angiogenez 6 temel aşamadan oluşmaktadır;

1- Vazodilatasyon, vasküler geçirgenlik artışı

Angiogenez nitrik oksit (NO) bağımlı bir şekilde vazodilatasyon ve VEGF'e yanıt olarak ortaya çıkan vasküler geçirgenlik artışı ile başlar. Böylece o bölgedeki kan akımı artarak plazma proteinleri damar dışına çıkar. Damar dışına çıkan plazma proteinleri endotel hücreleri için iskelet görevi görmektedir.

2- Endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu

Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu çeşitli moleküller ile kontrol altında tutulmaktadır.

3- Lümen formasyonu

Bu aşamada kolon şeklinde sıralanan endotel hücrelerinin ortasında lümen yapısı ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik angiogenez sonucu oluşan

damarlarda düzgün bir kan akımı mevcut olup doku fonksiyonları için gerekli kan akımı sağlanabilmektedir. Ancak patolojik angiogeneizde damarlar anormal şekilde genişir ve içlerinde türbülant bir akım söz konusudur. Bundan dolayı metabolik ihtiyaçları karşılamada yetersiz kalmaktadır²¹.

4- Endotelial sağkalım

Endotel hücrelerinin yeni damarlar meydana getirdikten sonra canlılıklarını devam ettirmeleri gerekmektedir. Eğer bu hücreler canlılıklarını devam ettiremezlerse yeni oluşan damarlar regrese olurlar. Endotelial sağkalım birçok molekül tarafından kontrol altında tutulmaktadır.

5- Endotel differansiyasyonu

Bu aşamada endotel hücreleri lokal fizyolojik gereksinimlere uygun olarak bazı özel karakteristikler kazanırlar. Bu durum dokudan dokuya farklılık göstermektedir.

6- Yeniden şekillenme

Angiogenezi Etkiyen Faktörler

Angiogenez üzerinde birçok molekül etkili olup en önemli rolü oynayan VEGF ailesine mensup olan proteinlerdir (Tablo-1). Bu proteinler angiogenez ile birlikte vaskülogenez ve lenfangiogeneizde de esansiyel bir rol oynamaktadır²⁰.

Tablo-1

Angiogenez üzerine etkili olan endojen moleküller.

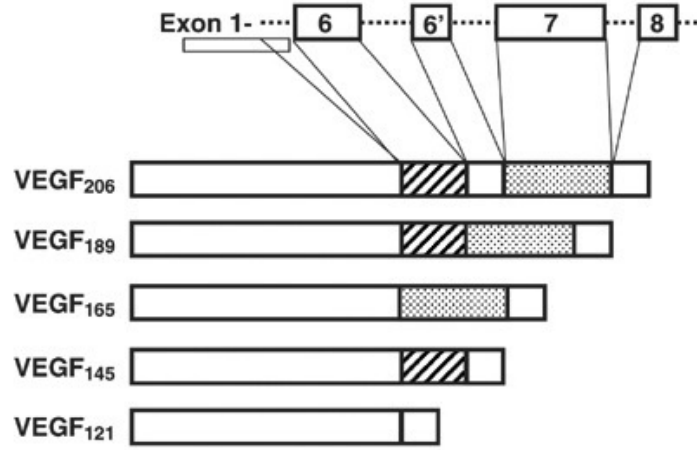
<u>Anjiogenez Aktivatörleri</u>	<u>Anjiogenez İnhibitörleri</u>
<ul style="list-style-type: none">➤ Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2)➤ İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (İGF-1)➤ Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF)➤ Nitrik oksit (NO)➤ Anjiopoetinler➤ Anjiotensin-2➤ Ekstraselüler Proteinazlar➤ Matris Metalloproteinazlar➤ Ürokinaz➤ İntegrinler➤ TGF-β➤ İnterlökin-8 (IL-8)➤ Prostaglandin E₁ ve E₂	<ul style="list-style-type: none">➤ Anjiostatin➤ Endostatin➤ Trombospondin-1➤ Pigment epitel kaynaklı faktör➤ Matris metalloproteinaz doku inhibitörleri➤ İnterferon-α, β (IFN-α,β)➤ İnterlökin 1, 12 (IL-1,IL-12)➤ Retinoik asit➤ Tümör nekrotizan faktör-α (TNF-α)➤ Bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF)

Vegf

İlk olarak 1983 yılında domuz hücrelerinden üretilmiş ve vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1989'da sığır hipofiz foliküler hücrelerinden endotel hücrelerine özgü mitojen bir ajan (VEGF) izole edilmiş ve yapılan genetik çalışmalarda VPF ile VEGF'nin aynı molekül olduğu anlaşılmıştır²². VEGF ailesi içerisinde VEGF-A, B, C, D ve E ile birlikte plasental büyüme faktörü (PIGF) bulunmaktadır²³. Angiogenez üzerinde en etkili olan izoformun VEGF-A olduğu düşünülmektedir. Ayrıca VEGF-A'nın endotel hücre bütünlüğünü antiapoptotik sinyaller aracılığıyla gerçekleştirdiği öne sürülmektedir²⁴. VEGF-B koroner arterlerin gelişiminde etkili olup C ve D izoformları lenfangiogenezde etkindir. PIGF ise ilk kez plasentada saptanmıştır

ve patolojik angiogenezde VEGF-A aktivitesini potansiyelize edebildiği gösterilmiştir²³. VEGF-A 36-46 kd ağırlığında homodimerik yapıda bir glikoprotein olup menstrüel siklusta, embiyonel gelişimde ve yara iyileşmesinde etkilidir. Ayrıca VEGF-A mRNA'sı sağlıklı erişkinlerde beyin koroid pleksus epiteli, böbrek glomerül epiteli, gastrointestinal mukoza ve saç folikülleri gibi normal şartlarda angiogenez izlenmeyen yapılarda eksprese edilmektedir. Gözde ise öncelikli olarak ganglion hücreleri, Müller hücreleri ve retina pigment epiteli (RPE) hücrelerinde tespit edilmiştir^{24,25}. VEGF-A'nın in vitro koşullarda RPE hücreleri tarafından bazal yüzeye doğru salgılandığı izlenmiştir. Ayrıca koryokapillaris endotelinin RPE hücrelerine bakan yüzeyinde VEGF'nin 3 reseptörünü de eksprese ettiği gösterilmiştir²⁶. Alternatif bölünmeler ile VEGF-A'nın aynı genden ekspre edilmiş izoformları açığa çıkmaktadır. VEGF-121, VEGF-165 (kemirgenlerdeki karşılığı VEGF-164), VEGF-189 ve VEGF-206 üzerinde en çok çalışılan ve bilgi edinilen izoformlardır (Şekil-1). Tüm bu izoformlar içerdikleri aminoasit sayısı ile ifade edilmektedir. Bu izoformlar içerisinde en güçlü olanı VEGF-165 olup kan-retina bariyerinin yıkılmasında ve patolojik neovaskülarizasyonda en önemli rolü oynayan formdur²⁷. VEGF-A'nın üretimi hipoksi ile indüklenmekte böylece epitel hücrelerinin fizyolojik şartlarda damar formasyonunu arttırarak yetersiz doku oksijenizasyonuna uyum sağlayabilecek bir geribildirim mekanizması sağlamaktadır. Bu geribildirim mekanizmasının herhangi bir şekilde bozulması kontrolsüz angiogeneze neden olmaktadır. VEGF angiogenezin pek çok basamağında rol almakta olup endotelial hücrelerde proliferasyon ve migrasyona neden olmakta, bazal membran hasarı ve kan damarlarının çevre dokulara invazyonu için gerekli matriks metalloproteinaz üretimini arttırmaktadır. Ayrıca patolojik angiogenezde önemli rolü olduğu gösterilen monosit kemotaksisini arttırmaktadır.

Endotel hücreleri üzerinde etki gösteren VEGF'nin son zamanlarda lökositler başta olmak üzere trombositler de dahil tüm enflamatuar hücre alt tiplerine bağlanarak etki gösterebildiği ve proinflamatuar bir ajan olduğu kabul görmüştür. Yeni elde edilen veriler enflamatuar hücrelerin neovaskülarizasyon süreçlerine katıldığını göstermektedir.



Şekil-1

VEGF-A'nın dört majör izoformu.

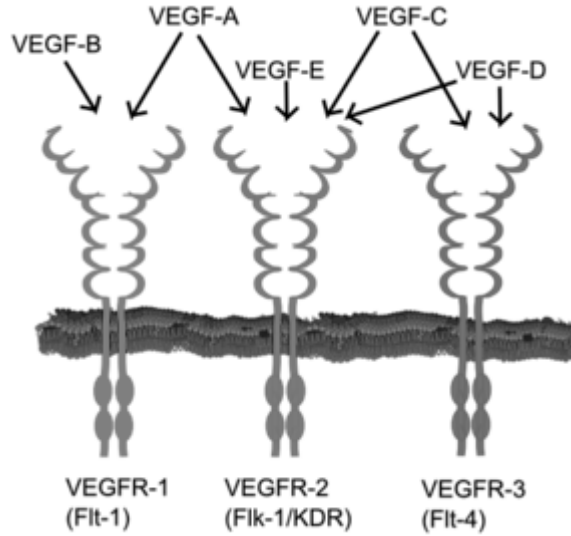
Vegf Geni

İnsanlarda VEGF geni 6. Kromozom (6p21.3) üzerinde yerleşmiştir. Sekiz ekzon içermekte ve 7 intron ile bölünmektedir^{28,29}. VEGF izoformları pre-mRNA'nın alternatif bileşimleri ile elde edilmektedir. Bugüne kadar 6 izoform tanımlanmış olup aminoasit sayıları 121 ile 206 arasında değişmektedir³⁰.

Vegf Reseptörleri

VEGF'nin VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olmak üzere 3 çeşit reseptörü bulunmaktadır (Şekil-2). VEGF ekstrasellüler olarak salınmakta ve genellikle iki ana reseptöre bağlanmaktadır; VEGFR-1 ve VEGFR-2. Ancak yapılan gen hedefleme çalışmaları her üç reseptöründe embriyonik gelişim için esansiyel olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte bu üç reseptörün endotel hücre proliferasyonu ve farklılaşmasındaki rolleri birbirinden farklıdır. VEGFR-1 yaklaşık 180 kd ağırlığında olup ilk tanımlanan reseptördür ve VEGF'ye karşı en yüksek afiniteye sahiptir³¹. Aynı zamanda bu reseptöre PlGF'de bağlanmaktadır. VEGFR-2, 200-230 kd ağırlığında VEGF'ye karşı yüksek afinite gösteren bir reseptördür³². Hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2 hücre içi sinyal iletim kaskatlarını aktive eden tirozin kinaz reseptörleridir. VEGFR-1 reseptörünün VEGF'ye karşı afinitesinin daha yüksek olmasına rağmen VEGFR-2'nin aktivasyonu VEGFR-1'ye göre daha önemli görünmektedir. Yapılan hayvan çalışmalarında VEGFR-2'ye selektif bağlanmanın

neovaskülarizasyona ve geçirgenlik artışına yol açtığı görülmüştür²². VEGFR-3 reseptörünün ise lenfangiogenezde etkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil-2

VEGF izoformları ve bağlandıkları reseptörler.

Oküler Patolojiler ve Vegf

Diyabetik Retinopati

Artmış VEGF-A düzeyi diyabetli hastalarda damarlardan sızıntılara neden olmakta, ayrıca mikroanevrizma ve kıvrımlanma artışı gibi yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Aynı zamanda VEGF sayesinde endotel hücrelerinin sağkalım süresi uzamaktadır. Buradaki VEGF düzeyi özellikle yeni gelişmekte olan damarlar için önem arz etmektedir. VEGFR-1'nin hipoksi ile uyarılmış ekspresyonu VEGF-A'ya duyarlılığı arttırabilecek bir mekanizma olarak öne sürülmüş olmasına rağmen bu reseptör normal retina damarlarında da gösterilmiştir³³. Diyabetin ilerlemesiyle birlikte VEGFR-2 reseptörlerinin eksprese olduğu alanlarda yüksek miktarda VEGF-A üretimi olmakta böylece neovaskülarizasyon gibi proliferatif bulgular ortaya çıkmaktadır. Proliferatif diyabetik retinopatili hastaların aköz hümör sıvılarında ve vitreuslarında VEGF-A düzeyinin artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Tekrarlanan VEGF-A enjeksiyonunda yaygın şekilde kapiller perfüzyon bozukluğu ortaya çıkmakta ve endotel hücrelerinde hipertrofiyle birlikte kapiller

lumeninde daralma izlenmektedir³⁴. Bu sayede retina iskemisi daha derinleşmekte ve kısır bir döngü olarak VEGF-A salınımı daha da artmaktadır.

Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu (YBMD)

Yaş tip YBMD'li hastalardan elde edilen koroid neovasküler membran (CNVM) örneklerinde diferansiye olmuş RPE hücrelerinde VEGF'nin artmış ekspresyonu izlenmiştir³⁵. Aynı zamanda monoklonal anti-VEGF antikoru olan rhu-FABV2'nin lazerle indüklenmiş CNVM oluşumunu intravitreal enjeksiyonlarla inhibe ettiği gösterilmiştir³⁶. Normal koşullarda RPE hücrelerinin bazal kısımlarından yapılan VEGF sekresyonu apikal taraftan yapılan sekresyondan daha fazladır²⁶. Hipoksik koşullarda her iki yüzey arasındaki fark daha da artmakta ve aynı zamanda VEGF reseptörleri ağırlıklı olarak koryokapiller endotele lokalize olmaktadır. Herhangi bir şekilde bruch membranının kalınlaşması ve hidrofobik yapısı VEGF'nin kapillerlere ulaşmasını engelleyip burada atrofiye neden olmakta, sonuç olarak hipoksi tetiklenmekte ve böylece bruch membranının yıkılmasıyla birlikte VEGF salgısı uyarılmakta ve bu durumun CNVM oluşumunu tetikleyebileceği düşünülmektedir³⁷.

Ven Oklüzyonu

Santral ya da ven dal tıkanıklıklarında tutulan bölgede hidrostatik basıncın artması nedeniyle doku perfüzyonu bozulmakta ve bu durum iskemiyi tetiklemektedir. Bunun sonucunda VEGF düzeyi artmaktadır. Özellikle neovaskülarizasyonla komplike olmuş olgularda daha belirgin olmak üzere VEGF'nin vitreus içerisindeki düzeyi artmış olarak tespit edilmiştir³⁸. Aynı zamanda bu hastalarda intraretinal VEGF mRNA ekspresyonunda arttığı izlenmiştir³⁹.

Prematür Retinopatisi (ROP)

Diyabette, YBMD'de ve ven oklüzyonlarında hipoksi önemli bir rol oynarken ROP gelişiminde hiperoksi önemli bir faktördür. Hiperoksiye bağlı olarak vasküler obliterasyon gelişmekte ancak bu durum ortadan kalktıktan sonra hipoksi meydana gelmekte ve böylece VEGF-A'nın ekspresyonu ciddi düzeyde artmaktadır. Bunun sonucunda ise anormal vasküler gelişim ortaya çıkmaktadır.

Anti-Vegf Ajanlar

Günümüzde rutin kullanımda yer alan 3 adet Anti-VEGF ajan mevcuttur;

- 1- Selektif İnhibitörler: Pegaptanib.

2- Nonselektif İnhibitörler: Bevasizumab, Ranibizumab.

Bevasizumab

Bevasizumab, VEGF-A'nın tüm izoformlarına nonselektif şekilde bağlanan humanize monoklonal bir antikor olup 149 kd ağırlığındadır. IgG₁ yapısında olan molekülün aminoasit diziliminin %93'ü insan geri kalan %7'lik kısmı ise fare kökenlidir⁴⁰. Bevasizumab VEGF'nin endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasına engel olarak endotel proliferasyonuna neden olan sinyal yollarının aktivasyonunu engeller. İlacın metabolizması endojen IgG₁'nin metabolizmasına benzer şekilde gerçekleşmektedir.

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda tümör boyutlarında küçülme sağlamış ve çeşitli kanser tiplerinde beklenen yaşam süresini uzattığı görülmüştür. Güvenlik ile farmakokinetik özellikleri genç erişkin maymunlarda değerlendirilmiş ve 50 mg/kg'ye ulaşan dozlarda, haftada 2 kez sistemik uygulamayla yalnızca epifizyal displazi, over ve uterus dokusunda ağırlık azalması olduğu izlenmiştir⁴¹. Ortaya çıkan bu bulgular ilacın kesilmesiyle düzelmiştir. Bununla birlikte yapılan klinik çalışmalarda en sık ortaya çıkan yan etkiler hipertansiyon, tromboembolik olaylar, kanama, proteinüri, yara iyileşmesi bozuklukları ve gastrointestinal perforasyon olarak bildirilmiştir⁴².

VEGF'nin yaş tip YBMD fizyopatolojisindeki etkin rolünden dolayı bu hastaların tedavisinde ilacın intravenöz olarak uygulanması gündeme gelmiştir. 2004 yılında başlatılan SANA (Systemic Avastin for Neovascular AMD) çalışmasında; 18 neovasküler YBMD'li hastaya 2 hafta ara ile 2 ya da 3 kez intravenöz bevasizumab uygulanmış ve 12 hafta sonunda ilacın kullanımıyla birlikte görme keskinliğinde artış ve anjiyografi ile optik koherens tomografi bulgularında gerileme olduğu bildirilmiştir⁴³. Çalışma sırasında herhangi bir oküler yan etki görülmemekle birlikte bazı hastalarda hipertansiyon ortaya çıkmıştır. Yine benzer şekilde yapılan çalışmalarda sistemik bevasizumab kullanımıyla birlikte başarılı sonuçlar alınmış ve ciddi bir yan etkiye rastlanmamıştır^{44,45}.

Sistemik uygulamalarda elde edilen başarılı sonuçlar, ilacın intravitreal olarak uygulanmasının daha etkin olacağı ve ortaya çıkabilecek sistemik yan etkilerin önüne geçilebileceği düşüncelerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Böylece 2005 yılından itibaren ilaç endikasyon dışı olarak intravitreal olarak uygulanmaya başlanmıştır. İlk uygulanan hasta grubu yaş tip YBMD'li hastalar

iken günümüzde kullanım endikasyonu oldukça genişlemiştir. Günümüzde bevasizumab yaş tip YBMD başta olmak üzere, diyabetik retinopati, ven tıkanıklıkları, maküla ödemi, neovasküler glokom, ROP, üveitler ve miyopik CNVM tedavisinde kullanılmaktadır^{2-4,45-72}.

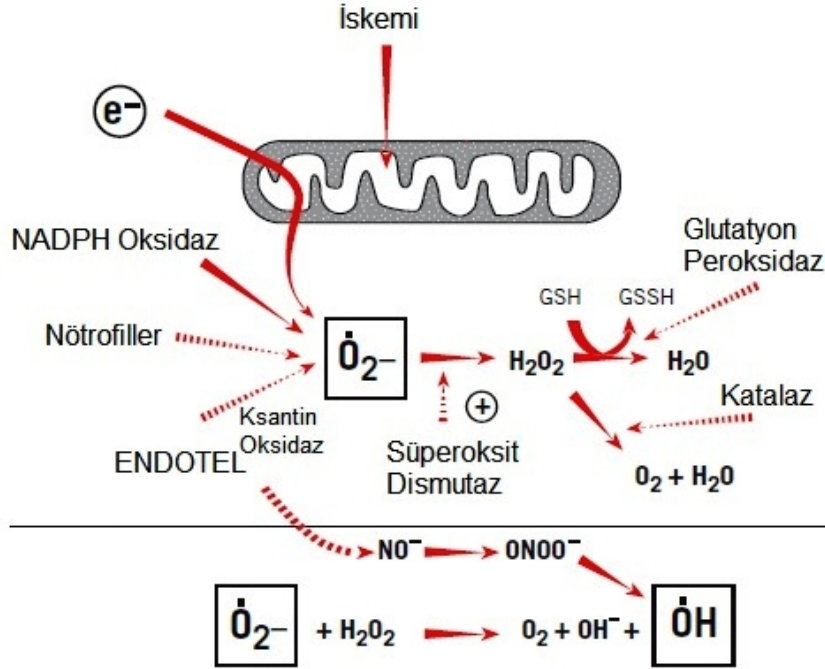
Deneysel hayvan çalışmalarında intravitreal olarak çeşitli dozlarda tek doz uygulanan bevasizumab'ın göz içi dokulara histolojik ve elektrofizyolojik olarak toksik olmadığı gösterilmiştir^{10,12,73-75}. Aynı zamanda tekrarlanan dozlarda bevasizumab uygulamasında oküler dokular için toksik olmadığı ortaya konulmuştur^{76,77}. Klinik uygulamalar sırasında ortaya çıkabilecek yan etkiler konusunda yapılan intravitreal bevasizumab güvenlik çalışmasında 12 ülkedeki 70 merkezden internet yoluyla veriler toplanmış ve yan etkiler değerlendirilmiştir. Beş bin iki yüz yirmi sekiz hastaya yapılan 7113 enjeksiyonda uygulamaya bağlı olarak korneal abrazyon, lens hasarı, endoftalmi ve retina dekolmanı bildirilmiştir. İlaça bağlı oküler yan etkiler ise inflamasyon, üveit, katarakt gelişimi, santral retinal arter tıkanıklığı, ani görme kaybı ve RPE yırtığı olarak tespit edilmiştir. Sistemik yan etkiler ise kan basıncında artış, geçici iskemik atak, serebrovasküler olay ve ani ölüm olarak bildirilmiştir⁷⁸.

Oksidatif Stres-Antioksidan Sistem

Oksidatif stres birçok hastalığın fizyopatolojisinde yer alan önemli bir etkidir. İnsan vücudunda meydana gelen serbest oksijen radikalleri (SOR), antioksidan sistem tarafından etkisizleştirilmekte böylece bir denge oluşmaktadır. Bu dengedeki bozulma sonucunda doku hasarı meydana gelebilmekte ve bu durum birçok hastalığı tetiklemektedir. İnsan vücudundaki fizyolojik süreçler sırasında ya da dış etmenlere bağlı olarak SOR'lar ortaya çıkmakta ve bu bileşikler dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron içermektedir. Bundan dolayı oldukça kararsız bir yapı gösteren bu bileşikler hücre bileşenleriyle etkileşime girebilmektedir⁷⁹.

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmesi için esansiyel bir elementtir. Ancak oksijen metabolizması sırasında bazı serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Bunlar süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^{\cdot}) radikalidir^{80,81}. Süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir. SOD aktivitesi ile oluşan H_2O_2

ise katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesi ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Glutatyon peroksidaz aktivitesi sırasında redükte glutatyon (GSH) okside hale (GSSG) dönüşmektedir (Şekil-3).



Şekil-3

Antioksidan sistem.

Malondialdehid (MDA), serbest oksijen radikallerine bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesidir⁸². MDA düzeyinin dokudaki yüksekliği artmış serbest oksijen radikallerine bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonunun artışı gösterir. Bunun sonucunda ise hücrelerin başta membranları olmak üzere çeşitli yapılarında hasar meydana gelmekte ve bu durumda hücrenin ölümüne neden olabilmektedir.

Serbest radikallerin oluşum hızı ile ortamdan uzaklaştırılma hızı dengede olduğu sürece ortaya çıkan bu bileşikler hücrelere zarar vermez. Bununla birlikte antioksidan sistem aktivitesinde düşüş ya da oksidan ajanların seviyesinde antioksidan kapasiteyi aşacak şekilde artış olursa doku hasarı ortaya çıkabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alındıktan sonra araştırmaya başlandı (Başvuru no: 2011/05). Kırk adet erkek, genç erişkin, albino Yeni Zelanda tavşanı (2.5-3 kg) her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılarak çalışmaya alındı. Çalışma sırasında su-yem kısıtlaması yapılmadı ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde ortam koşulları sağlandı. Kontrol grubundaki hayvanlara herhangi bir girişim yapılmadı. Grup I, II, III ve IV'deki hayvanların sağ gözlerine intravitreal 1.25 mg (0.05 ml) bevasizumab (Altuzan®, Roche, İsviçre) enjeksiyonu yapıldı ve günlük olarak enjeksiyon yapılan gözler kızarıklık, akıntı gibi semptomlar yönünden takip edildi. Daha sonra sırasıyla grup I'deki hayvanların 1. gün, grup II'dekilerin 7. gün, grup III'dekilerin 14. gün ve grup IV'dekilerin 28. gün anestezi altında intrakardiak kan alımıyla yaşamına son verildi. Gruplardan aynı gün beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve kan örnekleri toplandı (Tablo-2).

Tablo-2

Deney protokolünün uygulanışı.

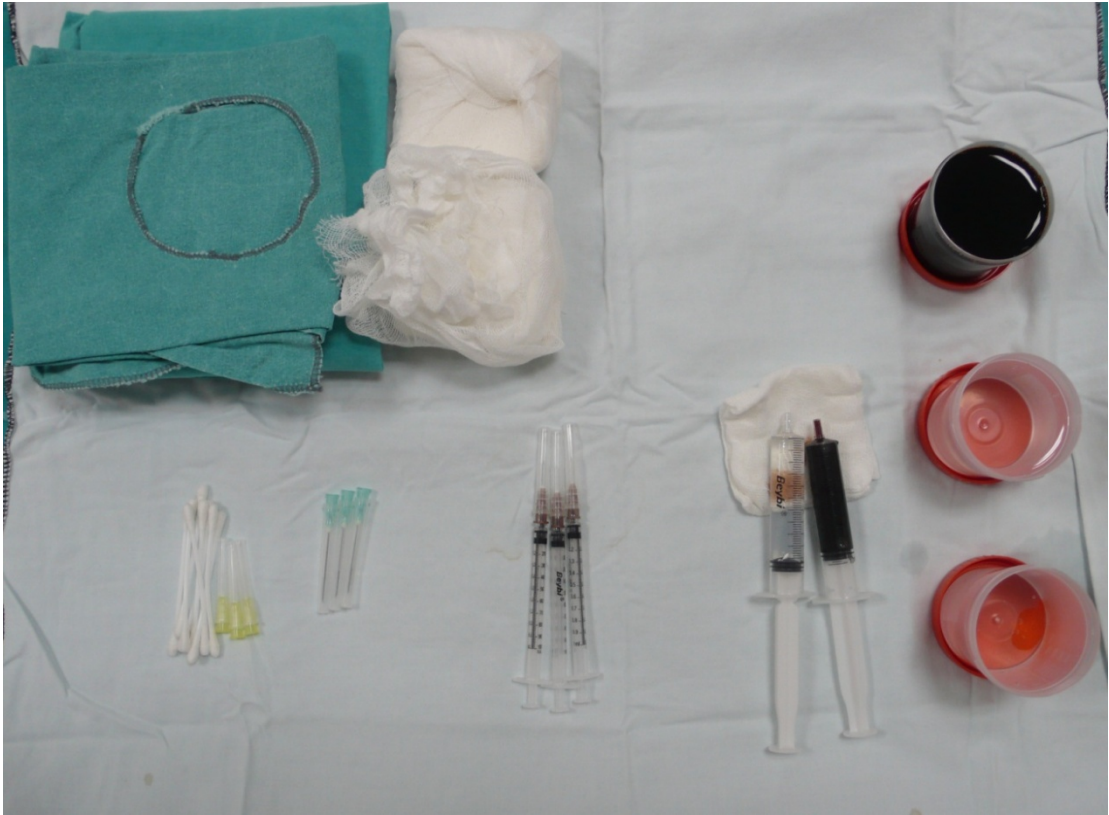
Grup No	0. Gün	1. Gün	7. Gün	14. Gün	28. Gün
Kontrol	Girişim Uygulanmayacak				Örneklerin Toplanması
Grup-1	IV-B	Örneklerin Toplanması	-	-	-
Grup-2	IV-B	-	Örneklerin Toplanması	-	-
Grup-3	IV-B	-	-	Örneklerin Toplanması	
Grup-4	IV-B	-	-	-	Örneklerin Toplanması

IV-B: İnvitreal Bevasizumab.

Kan örnekleri boş tüpler içerisine alındı ve 3000 rpm'de, 15 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı. Bu örnekler ependorflar içerisinde biyokimyasal ölçümler yapılincaya kadar -80 °C 'de saklandı. Beyin, kalp ve karaciğer örnekleri doku bütünlüğüne zarar vermeden iki ayrı parçaya ayrıldı. Bu örneklerin ilk parçası öncelikle -20 °C'de daha sonra biyokimyasal ölçümler yapılincaya kadar -80 °C 'de saklandı. Geriye kalan parçalar ise histolojik değerlendirme amacıyla %4'lük paraformaldehit içerisine alındı. Deney hayvanlarının her iki böbreği disseke edildi ve örneklerden birisi diğer dokulara benzer şekilde -80 °C 'de saklandı. Diğer böbreğin korteks kısmından elektron mikroskopik değerlendirme amacıyla 1 mm³'lük örnekler alındı ve %2.5'luk gluteraldehit içerisine fikse edildi. Kalan doku örnekleri ise diğer histolojik değerlendirilmeler amacıyla %4'lük paraformaldehit içerisine alındı.

İntravitreal Enjeksiyon

Enjeksiyon öncesinde kullanılacak tüm malzemeler steril şartlar altında açıldı ve enjeksiyon masası oluşturuldu (Resim-1).



Resim-1

Enjeksiyon masasının görünümü.

İntravitreal enjeksiyondan 10 dakika önce topikal olarak uygulanan 1 damla %2.5 fenilefrin (Mydrin®, Alcon, A.B.D.) ve 1 damla %0.5 tropikamid (Tropamid®, Alcon, A.B.D.) ile pupila dilatasyonu sağlandı. 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Rompun®, Bayer, Almanya) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Ketalar®, Pfizer, A.B.D.) ile genel anestezi, %0.5 proparakain (Alcaine®, Alcon, A.B.D.) ile topikal anestezi uygulandı. Göz kapağı ve çevresinin povidon iyot ile temizliğinden sonra steril bir delikli örtü örtüldü ve steril bir blefarosta ile kapakların ekartasyonu sağlandı (Resim-2).



Resim-2

Blefarosta ile kapakların ekartasyonu.

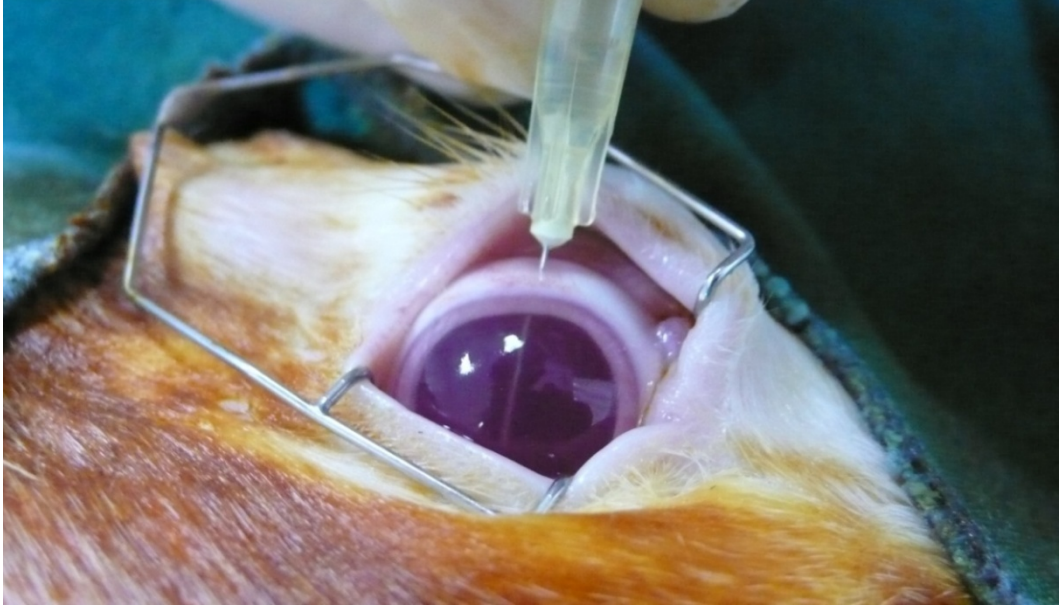
İntravitreal enjeksiyondan hemen önce %10'luk povidin iyodun 5 dakika boyunca kornea-konjonktiva yüzeyi ile teması sağlandıktan sonra %0.09'luk NaCl ile povidin iyot ortamdan uzaklaştırıldı (Resim-3).



Resim-3

Povidon iyot ile oküler yüzeyin yıkanması.

Daha sonra 1.25 mg (0.05 ml) bevasizumab (Altuzan®, Roche, İsviçre) üst temporal kadranda limbusun 3 mm gerisinden 30 gaujluk iğne ve insülin enjektörü ile vitreus içerisine enjekte edildi (Resim-4).



Resim-4

İntravitreal enjeksiyon uygulaması.

Enjeksiyon sonrasında ilacın geriye kaçışını önlemek amacıyla steril bir kulak çubuğu yardımıyla iğne giriş bölgesine baskı uygulandı (Resim-5).



Resim-5

Steril kulak çubuğu ile iğne giriş yerine baskı uygulanması.

Enjeksiyon sonrası örnekler toplanıncaya kadar 4x1 dozda, 1 hafta süreyle %0.5 moksifloksasin damla (Vigamox®, Alcon, A.B.D.) kullanılarak inflamasyon yönünden deney hayvanlarının gözü günlük olarak değerlendirildi.

İmmunhistokimya

Böbrek kesitlerinde apoptoz değerlendirilmesi amacıyla kaspaz-3 boyaması gerçekleştirildi. Mikrotomla adheziv lamlara 7µm kalınlığında alınan böbrek kesitlerine aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısında 3x10 dakika ksilolden geçirildi.
2. Rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı.
3. Fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için tripsin (pH:7,6) içinde 37°C (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika muamele edildi.
4. Bu işlemden sonra taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3x5 dakika yıkandı.
5. Distile suda %12,5'luk hazırlanmış H₂O₂ ile endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için 10 dakika inkübe edildi.
6. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
7. Kesitler lamlar üzerinde pap-pen ile çevrildi.
8. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için Novocasta™ Protein Block ile 8 dakika inkübe edildi.
9. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan PBS içinde %0.5'lik sığır serum albumin (BSA) ile 1/100 oranında dilüe edilmiş kaspaz-3 (Katalog no: 3015-100, Mountain View, CA BioVision) antikoru damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde oda ısısında 1 gece inkübe edildi.
10. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
11. Biotin ile bağlanmış kullanıma hazır polivalan sekonder antikor (Scytek®) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.
12. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
13. Streptavidin peroksidaz enzim reaktifi ile 10 dakika inkübe edildi.
14. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

15. Peroksidaz sübstratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkübe edildi.
16. Distile suda 5 dakika yıkandı.
17. Hematoksilen ile 5-10 saniye zıt boyama yapıldı.
18. Akar suda berraklaşana kadar yıkandı.
19. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildi.
20. Ksilolden 3x5 dakika geçirildi.
21. Entellan ile kapatıldı.

Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0,5 PBS-BSA damlatıldı ve protokole aynı şekilde devam edildi. Dokular, Olympus® BX50 (Olympus GmbH, Almanya) ışık mikroskobu ile incelenerek aynı mikroskoba eklenmiş Nikon® Coolpix5000 dijital kamera (Nikon Corp., Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

İmmunfloresan İşaretleme

Paraformaldehit (%4) çözeltisindeki böbrek, kalp ve beyin dokuları bir gece buzdolabında +4°C'de bekledikten sonra, 12 saat %20 sükröz, takiben %30'luk sükröz + %0,1'lik sodyum azid solusyonunda bekletildiler. Dokulardan kriyostat ile (Leica CM1900, Viyana-Avusturya) 10 µm kalınlığında kesitler adheziv kaplı lamlara alındı.

İşaretleme işlemi yapılmadan önce kesitler lamlar üzerinde pap-pen ile çevrildi. Daha sonra 7,4 pH'a sahip PBS solüsyonunda 10 saniye yıkandı. Goat anti-human Cy3-işaretleme IgG antikorunu (Katalog no:202-01-10-02, KPL Maryland, A.B.D.) PBS-BSA çözeltisi içerisinde 1/500 oranında dilüe edildi. Antikor solüsyonu damlatılan kesitler nemli ortamda 37°C'de iki saat inkübe edildiler. İnkübasyondan çıkarılan kesitler 3x2 dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Daha sonra kesitler 90 dakika 37°C'de karanlık ve nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler 3x2 dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Son yıkamadan sonra lamlar dikkatlice kurulandı ve çekirdeklerin boyanması için kesitler DAPI içerikli kapatma medyumu (UltraCruz Mounting Medium, Katalog no:sc-24941 Santa Cruz Biotechnology Inc. California A.B.D.) ile kapatıldı. Lamellerin etrafı, kesitlerin hava almaması için tırnak cilası ile izole edildi. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 floresan mikroskop (Olympus GmbH, Almanya) ile incelenerek fotoğraflandı.

Elektron Mikroskopi

Elektron mikroskopik inceleme için alınan böbrek örnekleri 1 mm³'lük parçalara bölündü ve 4-6 saat %2,5'lük gluteraldehit solüsyonunda bekletildi. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu ile yıkandıktan sonra elektron mikroskopik incelemeler için doku takip işlemi Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Viyana, Avusturya) cihazı kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı ve dokular rezin içine gömüldü.

1. %1' lik osmium tetraoksit 1 saat,
2. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dakika
3. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dakika,
4. Etil alkol (%50) 15 dakika,
5. Etil alkol (%60) 15 dakika,
6. Etil alkol (%70) 15 dakika,
7. Etil alkol (%80) 15 dakika,
8. Etil alkol (%90) 15 dakika,
9. Etil alkol (%100) 15 dakika,
10. Etil alkol (%100) 15 dakika,
11. Etil alkol (%100) 15 dakika,
12. Etil alkol (%100) 15 dakika,
13. Propilen oksit 15 dakika,
14. Propilen oksit 15 dakika,
15. Propilen oksit + rezin (2+1),
16. Propilen oksit + rezin (1+1),
17. Propilen oksit + rezin (1+2),
18. Saf rezin 12 saat,
19. Resin içine gömme işlemi,
20. Etüvde (60°C) polimerizasyon 24 saat.

İlk 11 basamak +4°C'de daha sonrakiler oda ısısında gerçekleştirildi. EMBED-812 Embedding Kit içine gömülen dokulardan Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom (Leica Microsystems GmbH, Viyana, Avusturya) ile 70 nm kalınlığında kesitler 300 gözenekli bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandıktan sonra Jeol JEM-1011 transmisyon elektron mikroskobuna (Jeol Ltd. Tokyo-Japonya) eklenmiş Megaview III dijital kamera (Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflanarak değerlendirildi.

Biyokimyasal Analiz

Antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacıyla beyin, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzimlerden SOD aktivitesi, bir serbest radikal temizleyici olan GSH miktarı ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak ise MDA düzeyi saptandı. SOD aktivitesi McCord yöntemi, GSH düzeyi Beutler yöntemi ile lld^{83,84}. MDA düzeyi ise tiyobarbütirik asit yöntemi ile saptandı⁸⁵. Beyin, kalp, karaciğer ve böbrek dokuları fosfat tamponunda homojenize edildi. Elde edilen homojenat, +4 °C'da 14000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra supernatan ayrıldı ve ayrılan supernatanda SOD enzim aktivitesi ile GSH, MDA ve VEGF düzeyleri saptandı.

Kan örneklere boş tüpler içerisine alınarak 3000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum örneklere biyokimyasal çalışma yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Oda sıcaklığında zlen serum örneklere VEGF düzeyleri lld.

Sod Aktivite lm

Çalışma 1 mL'lik kuvars küvette yapıldı. Ayıraçlar, küvette aşağıdaki tabloda gösterildiği Şekilde ilave edildi (Tablo-3).

Tablo-3

SOD aktivite ölümü.

Çözeltiler	alışma Kr	rnek
Doku Homojenatı (mL)	-	0,05
0.01 M Fosfat Tamponu (mL)	0,05	-
Günlük Substrat Karışımı (mL)	1,7	1,7
Karıştırma.		
Ksantin Oksidaz (mL)	0,25	0,25

Kuvars küvetin ağzı parafilmle kapatılıp birkaç kez alt-üst edildikten sonra oluşan rengin absorbands değerleri 30. saniyede ve daha sonra 3. dakikada 37°C, 505 nm dalga boyunda havaya karşı okundu. Saptanan absorbands değerleriyle SOD aktivitesi saptandı.

Gsh Ölçümü

Kör ve örneğe ait deney tüpleri aşağıda verilen şekilde hazırlandı (Tablo-4). Elde edilen optik dansite değerleriyle GSH düzeyi hesaplandı.

Tablo-4

GSH düzeyi ölçümü.

Çözeltiler	Çalışma Körü (mL)	Örnek (mL)
Doku Homojenatı	-	2
Saf Su	2	-
Çöktürücü	3	3
Karışım 5 dakika bekletildi, örnek filtre kağıdından süzüldü.		
Süzüntü	2	2
0,3 M Na ₂ HPO ₄	8	8
Örneğin absorbans değeri 412 nm'de köre karşı okundu. Daha sonra tüplere %0,04 DTNB ilave edildi.		
%0,04 DTNB	1	1
Örnek tüpte oluşan renk 412 nm'de köre karşı okundu.		

Mda Ölçümü

Çalışma için gerekli olan ayıraçlar tabloda belirtildiği şekilde tüplere kondu (Tablo-5). Tüplere konulan çözeltiler beyazlaşmaya kadar vortekslendikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbans değeri okundu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak değerlendirildi.

Tablo-5

MDA düzeyi ölçümü.

Çözeltiler	Kör	Standart	Örnek
Doku Homojenatı (mL) -	-	-	0,1
Standart (mL)	-	0,1	-
SDS (mL)	0,2	0,2	0,2
Asetik Asit (mL)	1,5	1,5	1,5
TBA (mL)	1,5	1,5	1,5
Saf Su (mL)	0,8	0,7	0,7
95 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve tüpler çeşmenin altında soğutuldu.			
Saf Su (mL)	1,0	1,0	1,0
nBu / pri	5,0	5,0	5,0

Vegf Ölçümü

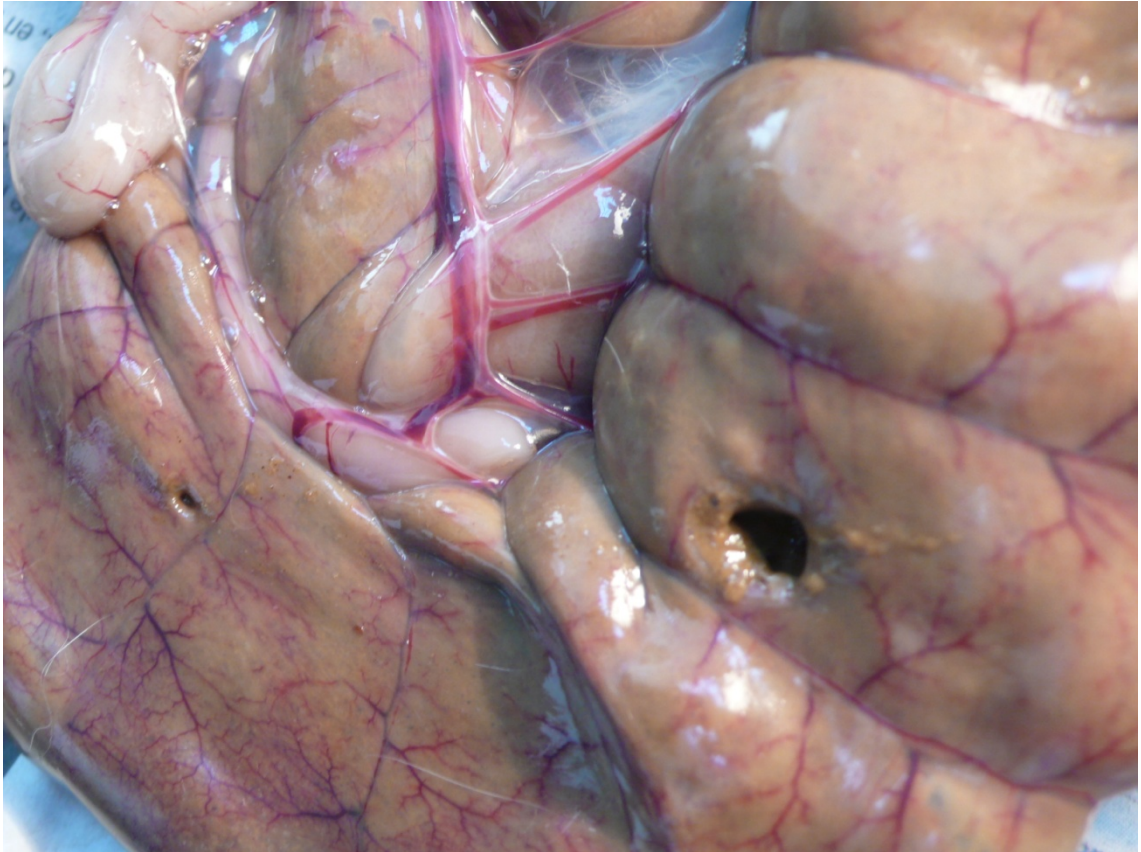
VEGF serum ve doku düzeyleri, sandviç prensibi ile çalışan enzim bağlı immunsorbent (ELISA) yöntemi ile tavşan VEGF ELISA kiti (Cusabio Biotech, Çin) kullanılarak saptandı. VEGF ölçümü ticari kit içeriğine uygun olarak uygulandı. Oluşan renk 450 nm'de mikrotiter plak okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) tespit edilerek kantitasyonu sağlandı.

İstatistiksel Analiz

Tüm dokulardaki GSH, MDA, SOD ve VEGF parametrelerinin normal dağılıma uygunluk kontrolleri Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi ve dağılım normal dağılıma uygun bulundu. Ölçümlerin tanımlayıcı istatistikleri olarak ortalama ve standart sapmaları verildi. Gruplar arasında parametrelerin ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında ANOVA testi kullanıldı. Grupların kontrol grubuna göre ikişerli karşılaştırılmasında Dunnet testi tercih edildi. Gruplardaki parametrelerin ortalama dağılımının grafik gösterimi için de error bar grafiği kullanıldı. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. İstatistik analizlerde MedCalc®v11.0.1 ve Statistica 6.0 paket programları kullanıldı.

BULGULAR

İntravitreal enjeksiyon sonrası yapılan takiplerde hiçbir deney hayvanının gözünde kızarıklık, akıntı gibi semptomlara rastlanmadı. Ancak deney sırasında grup II ve grup IV'de yer alan birer deney hayvanında ölüm izlendi. Grup II'de ilaç enjeksiyonu sonrası 6. günde ölüm izlenirken grup IV'de ilaç enjeksiyonunu takiben 2. günde ölüm izlendi. Grup II içerisinde ölen deney hayvanına yapılan otopside batin ön duvarında renk değişikliği ile birlikte yaygın peritonit tablosu mevcuttu. Batin içi incelemede kalın bağırsakta birden çok perforasyon alanı izleniyordu (Resim-6). Ancak diğer organlarda gross bir patoloji izlenmedi ve ölüm nedeni bağırsak perforasyonuna sekonder gelişen peritonit olarak değerlendirildi. Grup IV içerisinde ölen hayvanın yapılan otopsisinde ise herhangi bir gross patolojiye rastlanmadı.

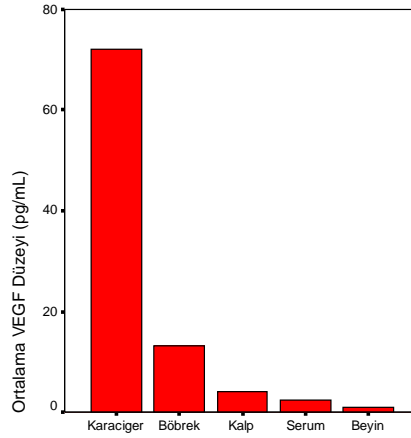


Resim-6

Kalın bağırsaktaki perforasyon alanları.

Biyokimyasal Parametreler

Kontrol grubunda yer alan hayvanların beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve serum örneklerindeki birim kütle başına düşen VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında en fazla VEGF düzeyinin karaciğer dokusunda olduğu izlendi. Karaciğer dokusunu sırasıyla böbrek, kalp, serum ve beyin dokuları izliyordu (Şekil-4).



Şekil-4

Kontrol grubundaki dokuların VEGF düzeyleri.

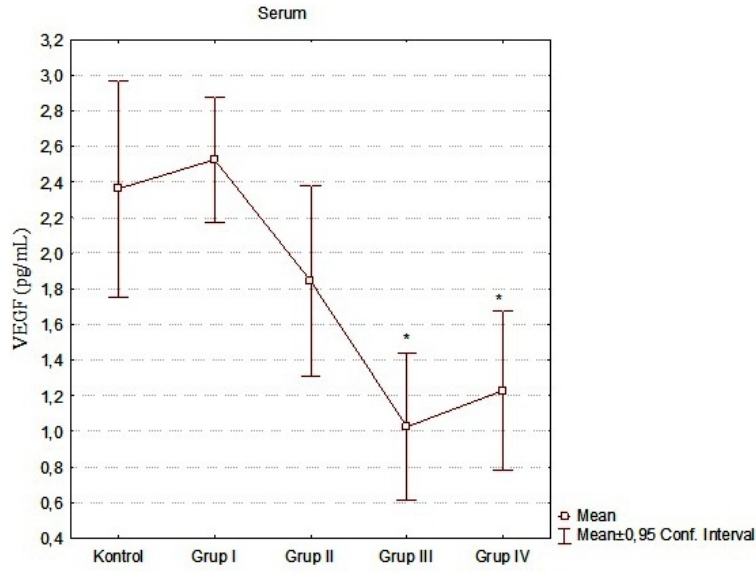
Serum VEGF düzeyleri değerlendirildiğinde grup I'deki VEGF düzeyinin kontrol grubuna benzer olduğu izlendi. Ancak grup II, III ve IV'deki VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre düşük olarak saptandı. Bu düşüş III. ve IV. grupta istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Tablo-6) (Şekil-5).

Tablo-6

Serum VEGF değerleri.

Gruplar	VEGF / Ort. \pm SS
Kontrol	2.3625 \pm 0.7269
Grup I	2.550 \pm 0.4003
Grup II	1.843 \pm 0.5798
Grup III	1.025* \pm 0.4920
Grup IV	1.2286* \pm 0.4820

Ort: Ortalama, SS: standart sapma, * $p < 0.05$.



Şekil-5

Serum VEGF düzeyleri, * $p < 0.05$.

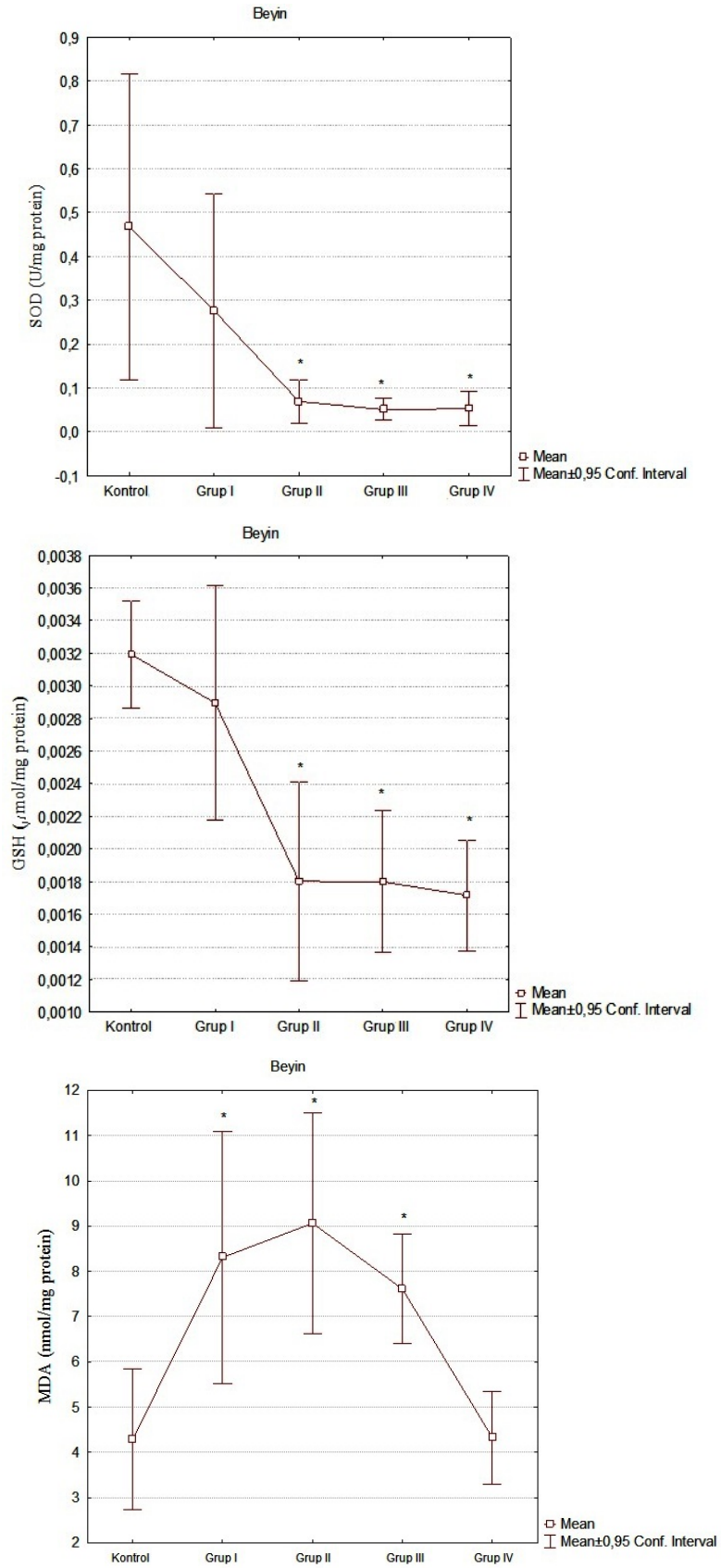
Beyin dokusunda VEGF düzeylerinin düştüğü ancak bu düşüşün kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı izlendi ($p > 0.05$). Aynı zamanda tüm gruplardaki SOD aktivitesi ve GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre düştüğü ve bu düşüşün II, III ve IV. gruplarda anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Bununla birlikte MDA düzeyleri tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre artmış olarak tespit edildi. Ancak bu artış grup I, II ve III'de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Tablo-7) (Şekil-6).

Tablo-7

Beyin dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri.

		Kontrol (n=8)		Grup I (n=8)		Grup II (n=7)		Grup III (n=8)		Grup IV (n=7)		p
		Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	
BEYİN	VEGF	0.8840	0.4376	0.7790	0.2603	0.8690	0.4109	0.6400	0.2620	0.8550	0.3226	>0.05
	GSH	0.0032	0.0004	0.0029	0.0009	0.0018*	0.0007	0.0018*	0.0005	0.0017*	0.0004	<0.05
	MDA	4.2840	1.8534	8.3060*	3.3339	9.0630*	2.6467	7.6090*	1.4523	4.3210	1.1158	<0.05
	SOD	0.4669	0.4169	0.2765	0.3192	0.0691*	0.0533	0.0505*	0.0298	0.0526*	0.0418	<0.05

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * $p < 0.05$.



Şekil-6

Beyin dokusundaki SOD aktivitesi, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi, *p<0.05.

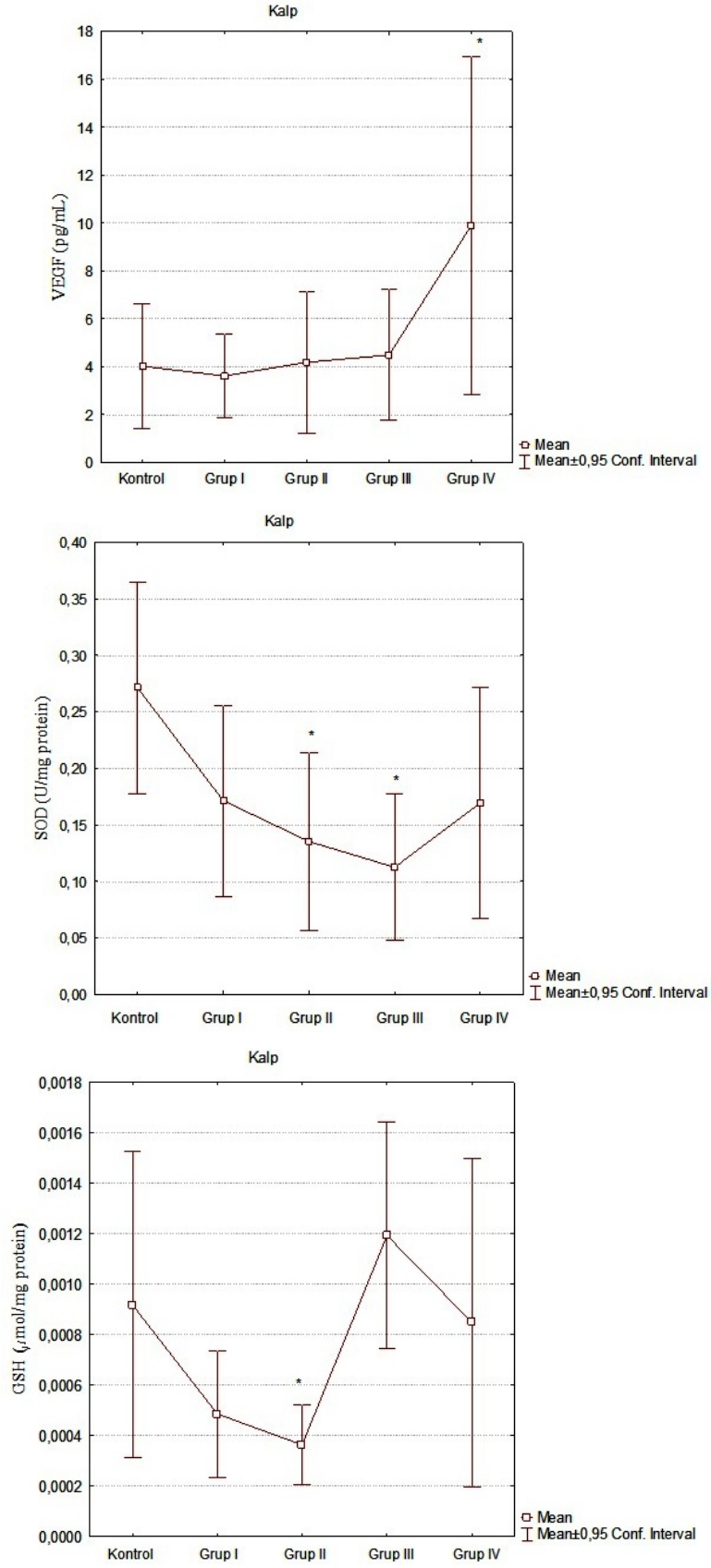
Kalp dokusunda grup I, II ve III'deki VEGF düzeylerinin kontrol grubu ile benzer olduğu izlendi. Ancak grup IV'de VEGF düzeyinde artış olduğu ve bu artışın kontrol grubuna göre anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). SOD aktivitesinde beyin dokusuna benzer şekilde tüm gruplarda düştüğü tespit edildi. Ancak bu düşüş II. ve III. grupta anlamlı olarak izlendi ($p<0.05$). GSH düzeyleri değerlendirildiğinde I. ve II. grupta kontrol grubuna göre azalma olduğu ve bu azalmanın II. grupta istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). Bununla birlikte III. grupta GSH düzeyinde artışın olduğu ve IV. grupta kontrol grubuyla benzer seviyelere geldiği tespit edildi. Ancak bu iki gruptaki değişiklik anlamlı değildi ($p>0.05$). MDA düzeyleri grup I, II ve IV'de kontrol grubuna göre azalmış olarak tespit edilirken, grup III'de artmış olarak tespit edildi. Ancak hiçbir çalışma grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark yoktu ($p>0.05$) (Tablo-8) (Şekil-7).

Tablo-8

Kalp dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri.

		Kontrol (n=8)		Grup I (n=8)		Grup II (n=7)		Grup III (n=8)		Grup IV (n=7)		p
		Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	
KALP	VEGF	4.025	3.0973	3.613	2.1088	4.186	3.2059	4.488	3.2599	9.900*	7.6232	<0.05
	GSH	0.0009	0.0007	0.0005	0.0003	0.0004*	0.0002	0.0012	0.0005	0.0008	0.0007	<0.05
	MDA	3.9000	1.7387	3.4060	1.1658	3.7500	1.4743	4.3340	1.7504	2.8070	0.9613	>0.05
	SOD	0.2714	0.1121	0.1714	0.1010	0.1353*	0.0853	0.1124*	0.0771	0.1695	0.1102	<0.05

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * $p<0.05$.



Şekil-7

Kalp dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF ve GSH düzeylerinin değişimi, *p<0.05.

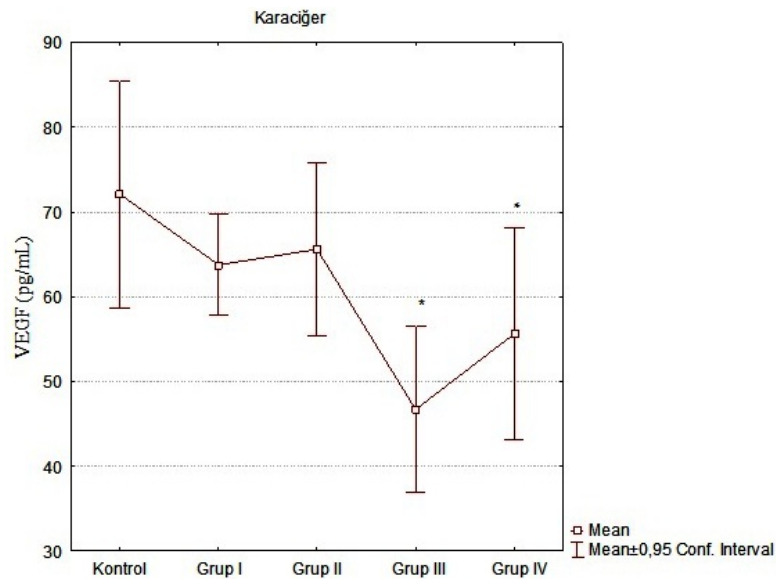
Karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre çalışma gruplarında VEGF düzeylerinin düştüğü ancak bu düşüşün III. ve IV. grupta anlamlı olduğu izlendi ($p<0.05$). Çalışma gruplarındaki SOD aktivitesi kontrol grubuna göre artmış olarak tespit edildi. Bu artış III. ve IV. grupta anlamlıydı ($p<0.05$). GSH düzeyleri grup I, II ve III'de kontrol grubuna göre artmış olarak saptandı. Ancak bu artış yalnızca grup III'de anlamlıydı ($p<0.05$). IV. grupta ise kontrol grubuna benzer düzeyde GSH saptandı. MDA düzeyleri çalışma gruplarında kontrol grubuna göre artmış olarak tespit edildi. Ancak bu artış yalnızca grup III'de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo-9) (Şekil-8).

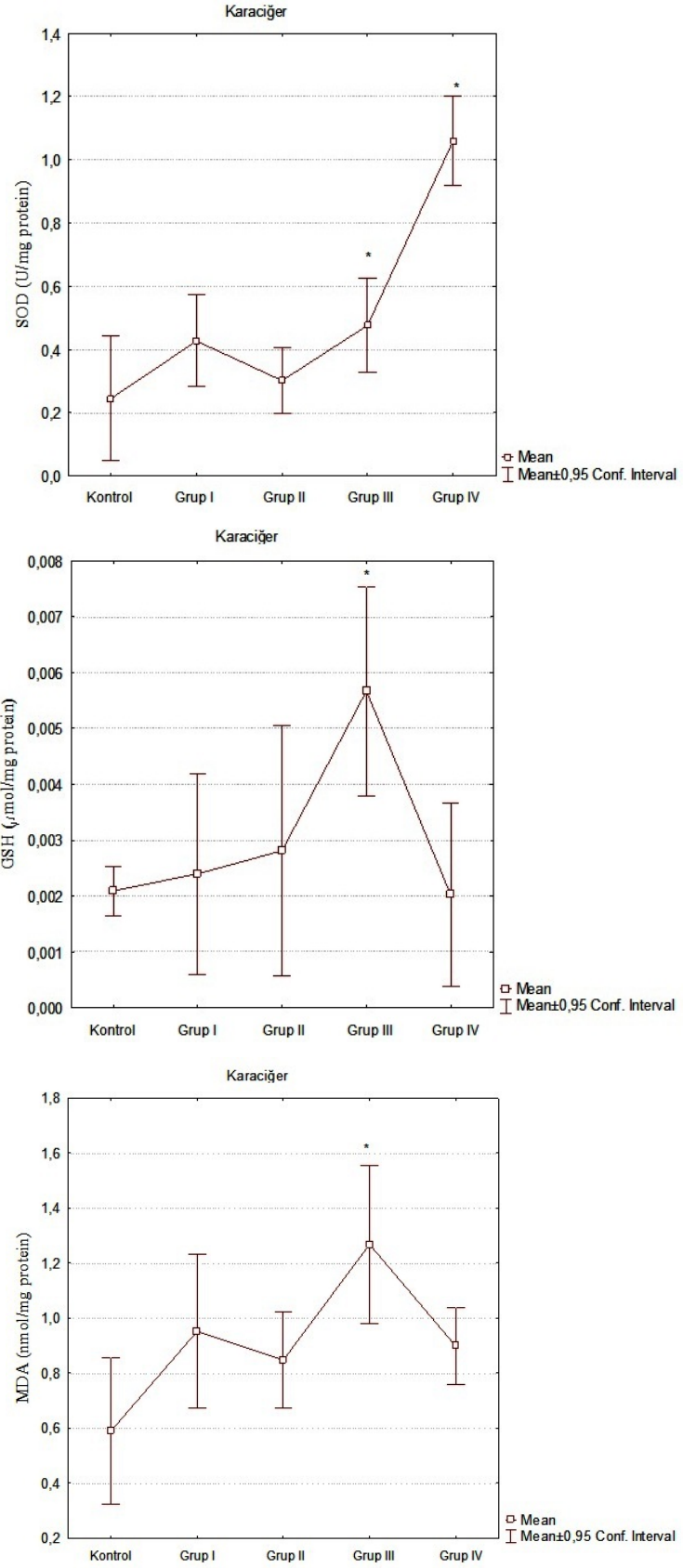
Tablo-9

Karaciğer dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri.

		Kontrol (n=8)		Grup I (n=8)		Grup II (n=7)		Grup III (n=8)		Grup IV (n=7)		p
		Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	
KARACİĞER	VEGF	72.081	15.9987	63.760	7.1274	65.601	10.9618	46.718*	11.7548	55.606*	13.5678	<0.05
	GSH	0.0021	0.0005	0.0024	0.0022	0.0028	0.0024	0.0057*	0.0022	0.0020	0.0018	<0.05
	MDA	0.5893	0.3189	0.9522	0.3335	0.8478	0.1907	1.2678*	0.3449	0.8979	0.1516	<0.05
	SOD	0.2446	0.2354	0.4271	0.1732	0.3016	0.1140	0.4768*	0.1774	1.0608*	0.1516	<0.05

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * $p<0.05$.





Şekil-8

Karaciğer dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi, * $p < 0.05$.

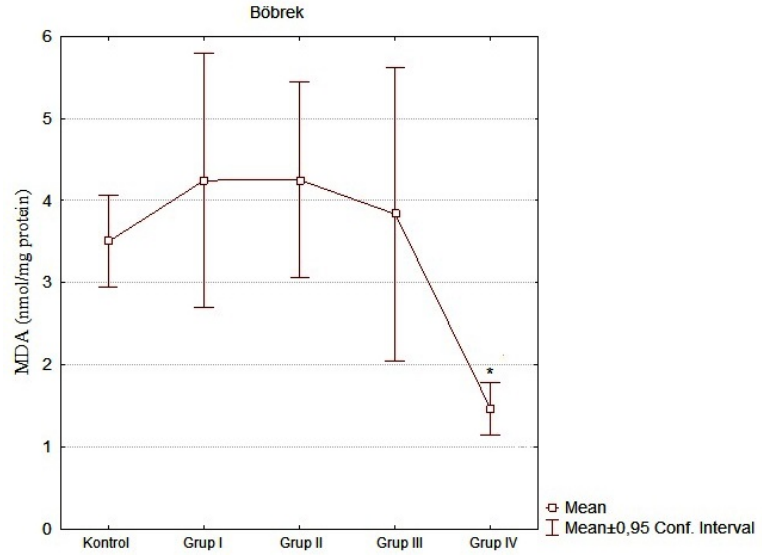
Böbrek dokusunda grup I, II ve III'de kontrol grubuna göre VEGF düzeylerinde düşme izlenirken, IV. grupta artışın olduğu izleniyordu. Ancak kontrol grubuyla çalışma grupları arasında anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). SOD aktivitesinde VEGF'nin tersine grup I,II ve III'de kontrol grubuna göre artış izlenirken, IV. grupta düşüş izleniyordu. Ancak çalışma grupları ile kontrol grubu arasında fark yoktu ($p>0.05$). GSH düzeylerine bakıldığında grup I ve III'deki GSH düzeylerinin kontrol grubuyla benzer olduğu bununla birlikte grup II ve IV'deki düzeylerin kontrol grubuna göre azalmış olduğu izlendi. Ancak aradaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). MDA düzeyleri grup I, II ve III'de kontrol grubuna göre artmış olarak tespit edilirken, grup IV'de azalmış olarak tespit edildi. Yalnızca grup IV ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo-10) (Şekil-9).

Tablo-10

Böbrek dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri.

		Kontrol (n=8)		Grup I (n=8)		Grup II (n=7)		Grup III (n=8)		Grup IV (n=7)		p
		Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	Ort.	SS	
BÖBREK	VEGF	13.088	6.0299	10.673	2.3844	9.737	1.5615	7.826	2.1691	17.296	12.7829	>0.05
	GSH	0.0013	0.0004	0.0013	0.0005	0.0009	0.0004	0.0014	0.0004	0.0011	0.0002	>0.05
	MDA	3.501	0.6718	4.2470	1.8511	4.2530	1.2930	3.8370	2.1400	1.4640*	0.3455	<0.05
	SOD	0.1191	0.0315	0.1194	0.1067	0.1963	0.1789	0.2071	0.2133	0.0163	0.0101	>0.05

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * $p<0.05$.

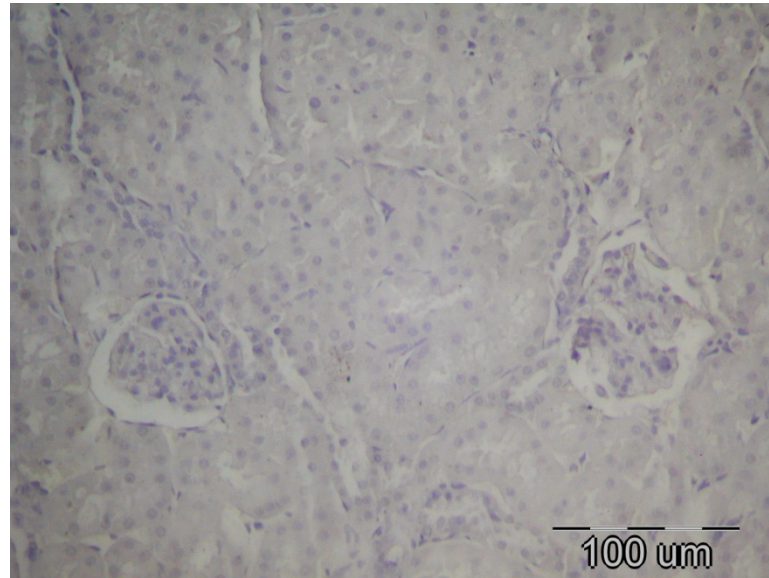


Şekil-9

Böbrek dokusundaki MDA düzeyinin değişimi, * $p < 0.05$.

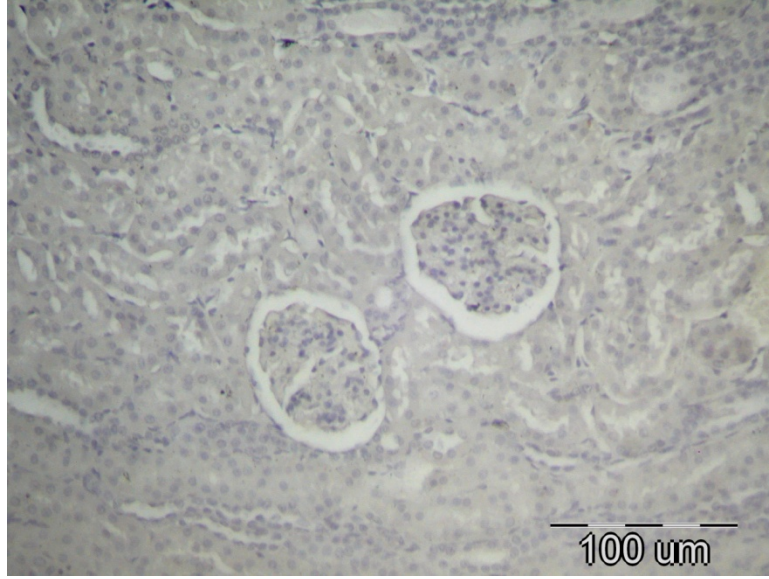
İmmunhistokimya

Kontrol grubu ve çalışma gruplarından alınan böbrek örneklerinde apoptotik hücreye rastlanmadı. Tüm örneklerde kaspaz-3 boyaması negatif olarak tespit edildi (Resim-7,8).



Resim-7

Kontrol grubundan alınan böbrek örneğinde kaspaz-3 boyamasının negatif olduğu izleniyor.

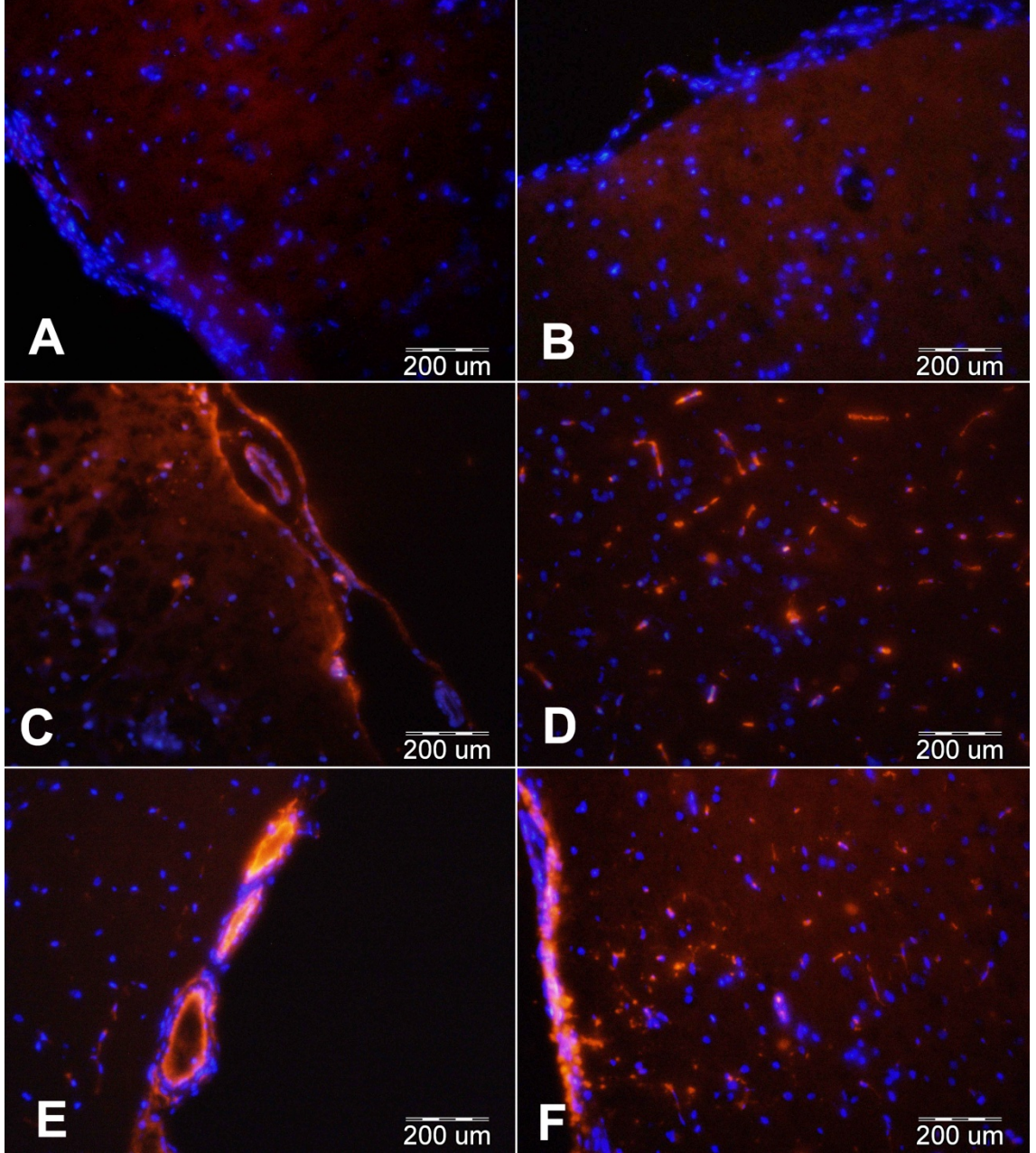


Resim-8

Grup 1'den alınan böbrek örneğinde kaspaz-3 boyamasının negatif olduğu izleniyor.

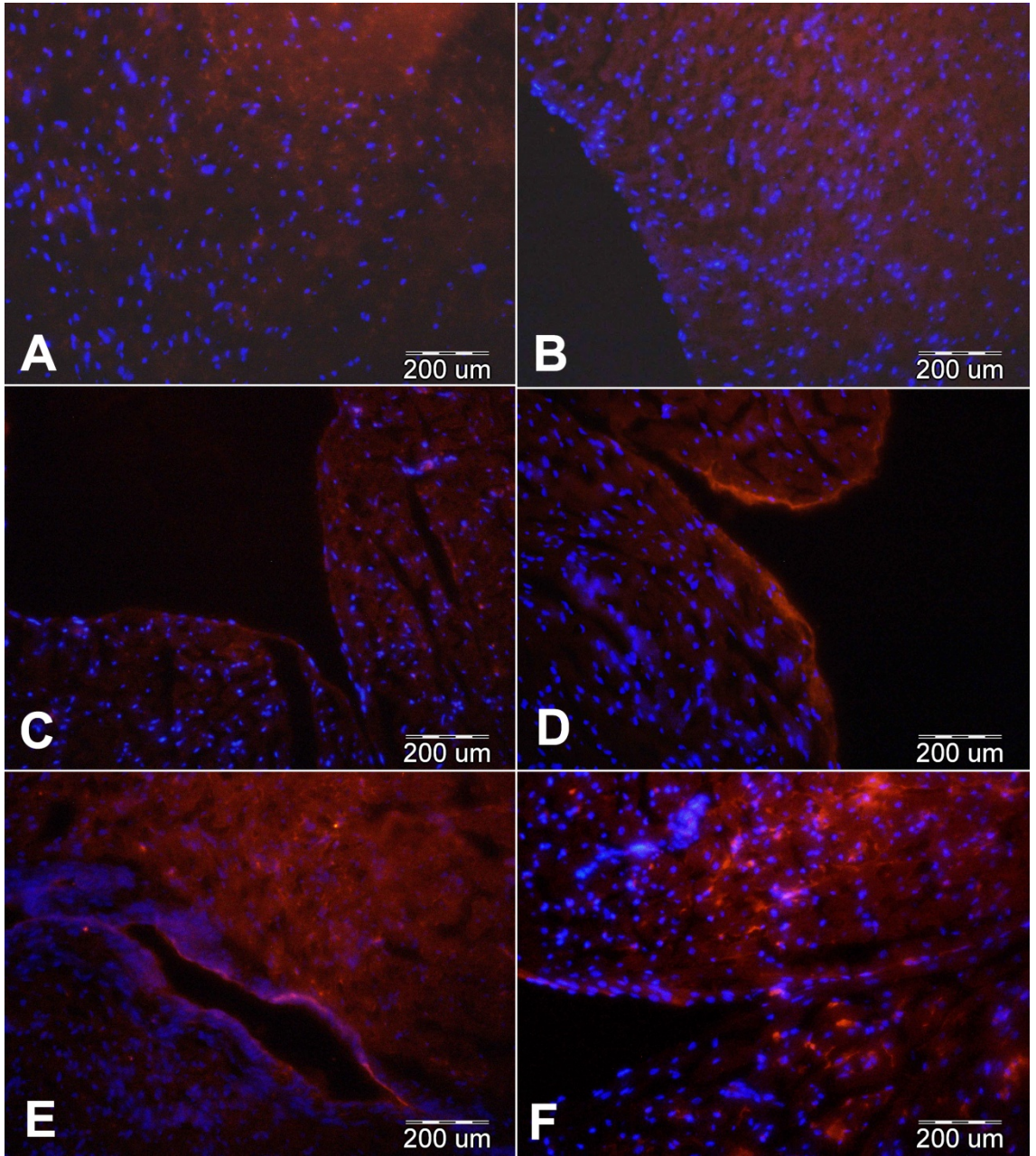
İmmü Floresan İşaretleme

Kontrol ve negatif kontrol kesitlerinde bevasizumab işaretlenmesi izlenmedi. Bununla birlikte beyin, kalp ve böbrek örneklerinde bevasizumab işaretlenmesi saptandı (Resim-9,10,11).

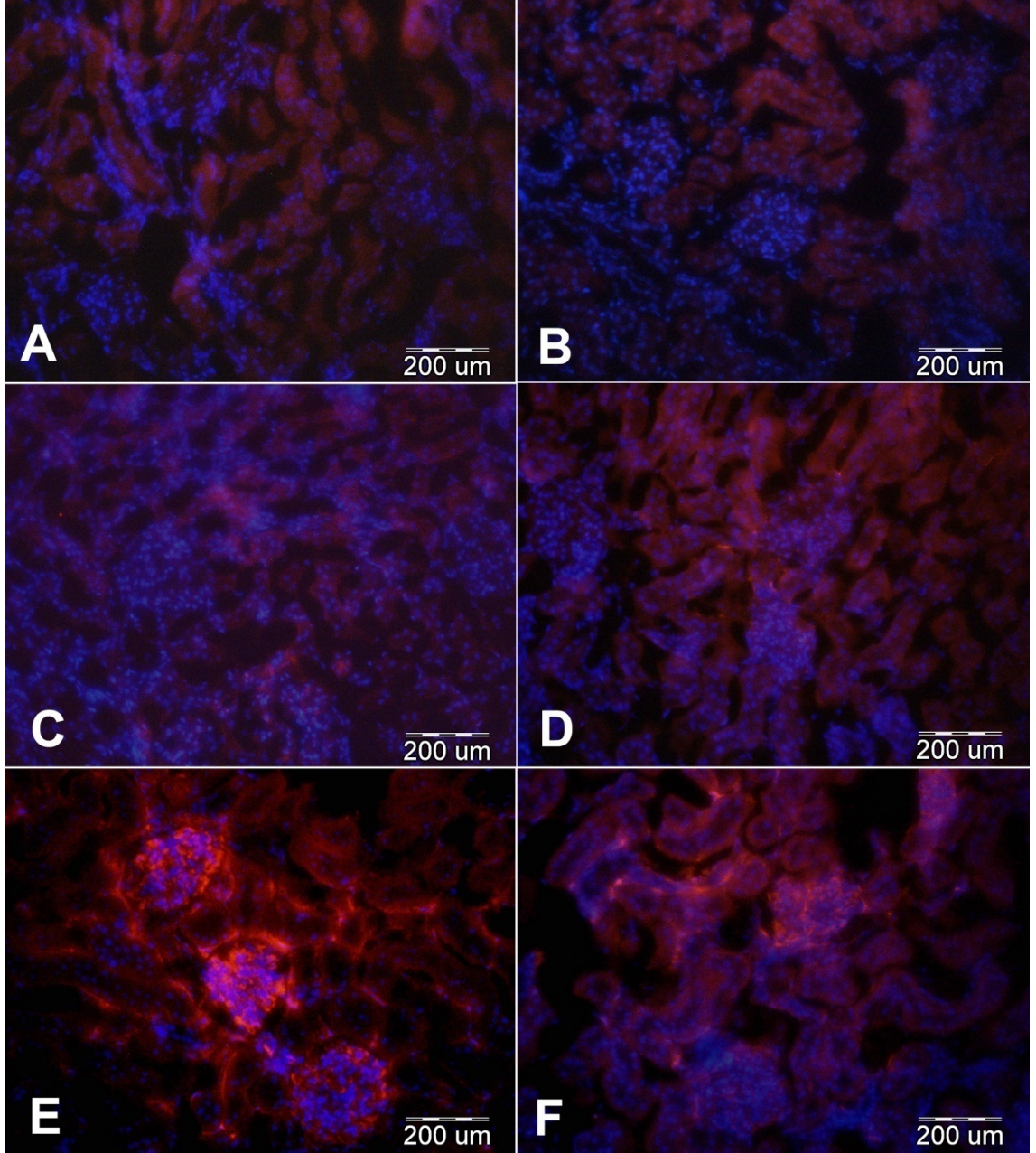


Resim-9

Beyin dokusunun immünofloresan boyanması. A-Kontrol grubu, B-Negatif kontrol boyama, C-Grup I, D-Grup II, E-Grup III, F-Grup IV.

**Resim-10**

Kalp dokusunun immünfloresan boyanması. A-Kontrol grubu, B-Negatif kontrol boyama, C-Grup I, D-Grup II, E-Grup III, F-Grup IV.



Resim-11

Böbrek dokusunun immüno Floresan boyanması. A-Kontrol grubu, B-Negatif kontrol boyama, C-Grup I, D-Grup II, E-Grup III, F-Grup IV.

Elektron Mikroskopi

Kontrol grubu ve çalışma gruplarından alınan böbrek örneklerinde elektron mikroskopik düzeyde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Resim-12,13,14,15,16).



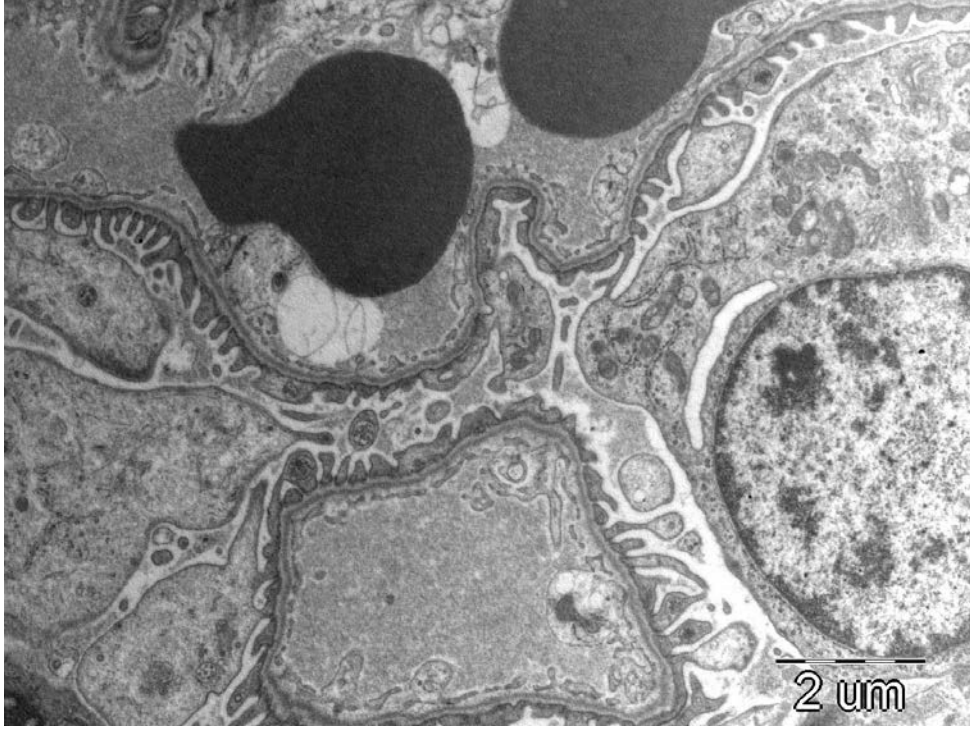
Resim-12

Böbrek elektron mikroskopik görünüm, kontrol grubu, x10000.



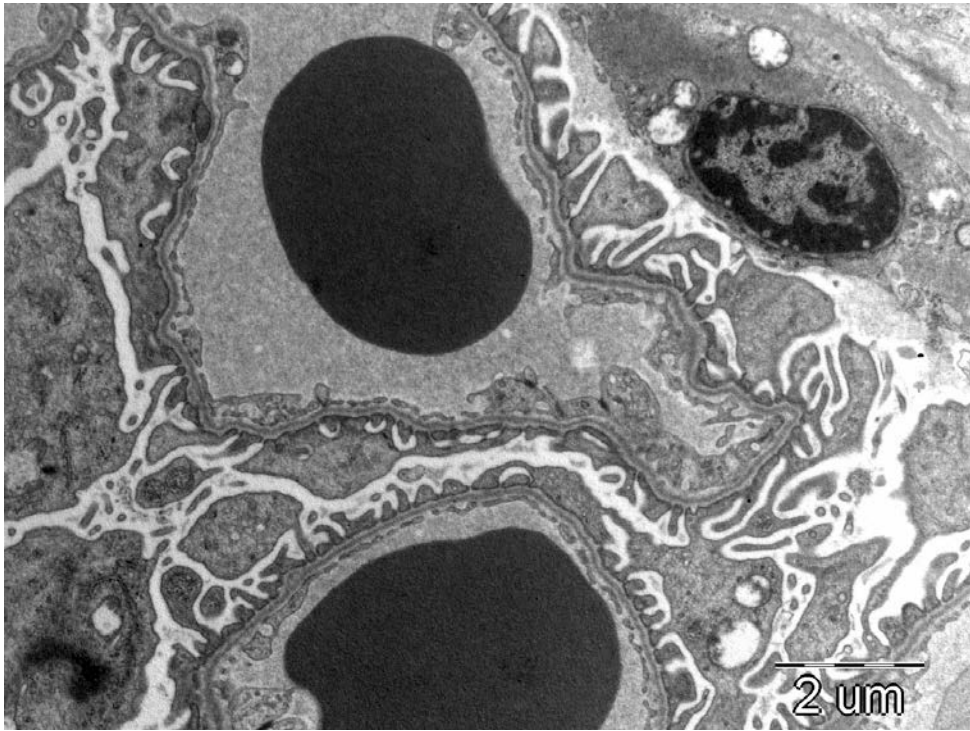
Resim-13

Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup I, x10000.



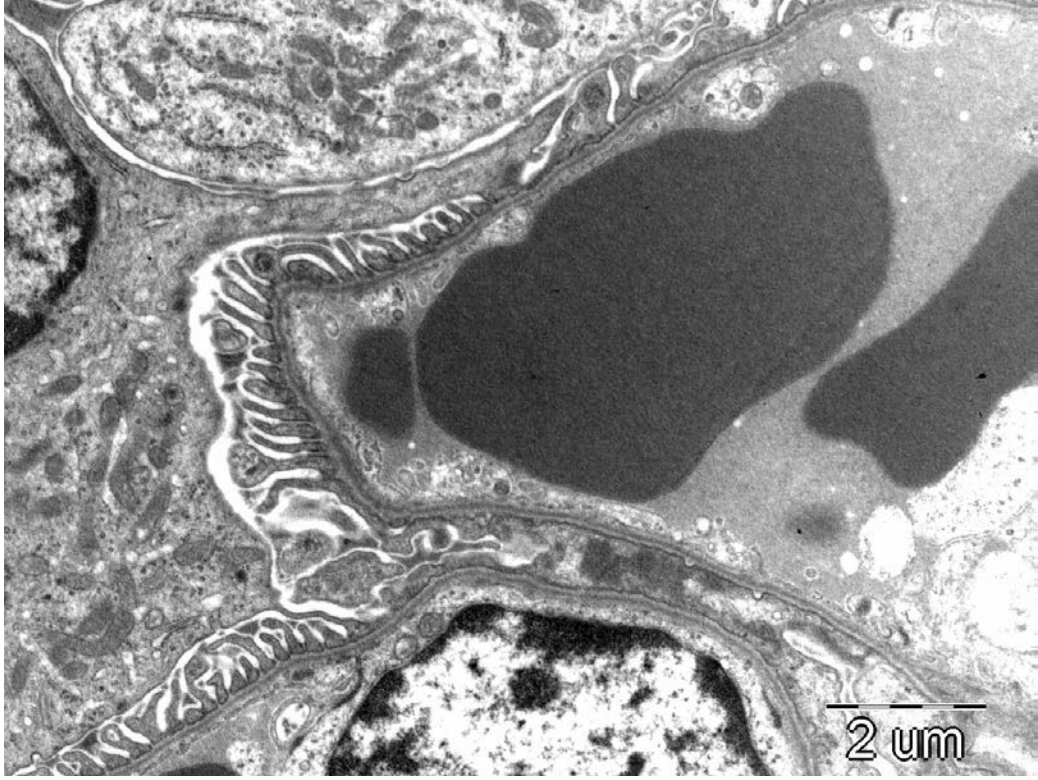
Resim-14

Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup II, x10000.



Resim-15

Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup III, x10000.



Resim-16

Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup IV, x10000.

TARTIŞMA

Bevasizumab, metastatik kolorektal kanserlerin tedavisi amacıyla geliştirilmiş, ancak günümüzde kullanım alanı oldukça genişlemiştir. Kolorektal kanserler dışında birçok kanser türünün tedavisinde kemoterapötik ajanlarla kombinasyonları denenmektedir. Tüm bu çalışmalar kanser tedavisinde umut vaat eden sonuçlar vermektedir. Aynı zamanda bevasizumab kanser tedavisi dışında oftalmoloji alanında da geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Endikasyon dışı olarak patofizyolojisinde VEGF'nin rol aldığı birçok göz hastalığı bevasizumab ile başarılı şekilde tedavi edilebilmektedir. İlacın bu kadar başarılı olmasına karşın temel sorun göz hastalıkları ile ilgili ilacın faz çalışmalarının yapılmamış olmasıdır. Bu nedenle ilaç göz hastalıklarında ruhsatlanmamış şekilde kullanılmaktadır. Faz çalışmaları yapılmadığı için ilaçla ilgili bilgiler deneysel ve birçoğu kontrollü olmayan klinik çalışmalara dayanmaktadır.

İlk olarak bevasizumab'ın sistemik kullanımının yaş tip YBMD'deki etkinliği değerlendirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır⁴³⁻⁴⁵. Alınan bu başarılı sonuçlar ilacın sistemik kullanımı yerine intravitreal olarak kullanımını gündeme getirmiştir. Böylece kullanılan ilaç dozunun düşürülebileceği ve olası sistemik yan etkilerin azaltılabileceği düşünülmüştür.

Intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın göz içi dokulara toksik olmadığı histolojik ve elektrofizyolojik olarak birçok çalışmada gösterilmiştir^{10,12,73-75}. Ancak ilacın klinik kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte bazı oküler yan etkileri bildirilmeye başlanmıştır. Enjeksiyon sonrası en sık bildirilen yan etkiler intraoküler inflamasyon, RPE yırtıkları, göz içi basınç artışı, endoftalmi, dekolman, subkonjonktival hemorajidir. Bu komplikasyonlardan bazıları ilacın kendisinden ziyade enjeksiyon işlemine bağlıdır. Bununla birlikte birkaç olgu sunumu şeklinde çeşitli nadir yan etkilere de rastlanmıştır.

İlacın göz hastalıklarında kullanıma girdiği ilk dönemde bevasizumab'ın sistemik dolaşıma geçmeyeceği ve önemli sistemik yan etkilere neden olmayacağı düşünülüyordu. Ancak yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın yalnızca göz dokusunda kalmadığı, sistemik dolaşıma da geçtiği gösterilmiştir^{5-7,86}. Bevasizumab'ın sistemik kullanımı sonucu en sık ortaya çıkan yan etkiler hipertansiyon, proteinüri, hemoraji ve tromboembolik olaylar olarak bildirilmiştir^{87,88}. Aynı zamanda ilacın sistemik kullanımının gastrointestinal perforasyon riskini de

arttırdığı ortaya konmuştur⁸⁹. Çalışmamızda grup II içerisindeki deney hayvanlarından birisi intravitreal bevasizumab enjeksiyonunu takiben 6. günde kalın bağırsak perforasyonuna sekonder gelişen peritonit nedeniyle ölmüştür. Bu durum rastlantısal ortaya çıkabileceği gibi ilaca bağlı olarak da gelişmiş olabilir. Aynı zamanda hayvandaki deney öncesi stres de bu tabloya katkıda bulunabilir. Ancak deney öncesi 10 gün boyunca tüm gruptaki hayvanlar genel sağlık durumları ve beslenmeleri yönünden kontrol edilmiş ve böylece stres düzeyleri olabildiğince azaltılmaya çalışılmıştır. Ayrıca deney öncesi yapılan gözlemlerde hayvanların genel sağlık durumlarıyla ve beslenmeleriyle ilgili herhangi bir bozukluk izlenmemiştir. Bununla birlikte deneysel ve klinik çalışmalarda intravitreal enjeksiyon sonrası böyle bir komplikasyon bildirilmemiştir. Tüm bunlara ek olarak ilaca verilen bireysel yanıtların da farklı olabileceği unutulmamalıdır. Sonuç olarak bu komplikasyon literatürde ilktir.

Grup IV'te ölen deney hayvanında herhangi bir gross patolojiye rastlanmamıştır. Yinede ilaç kökenli bir nedenden dolayı ölümün olabileceği akılda tutulmalıdır. Çünkü birçok kaynakta ilaca bağlı akut tromboembolik olayların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir^{87,88}. Bizim yaptığımız otopsi bu tabloyu ortaya koyamamış olabilir. Yapacağımız histolojik değerlendirmenin de ölüme bağlı patolojik değişiklikler nedeniyle yanıltıcı olabileceği düşünülmüş ve bu nedenle doku düzeyinde histolojik değerlendirme yapılması uygun görülmemiştir.

Kontrol grubunda yer alan hayvanların dokularındaki birim kütle başına düşen VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında en fazla VEGF düzeyinin karaciğer ve böbrek dokusunda olduğu izlenmiştir. Bu durum her iki dokunun normal homeostazi sırasında VEGF'nin önemli işlevlere sahip olduğunun göstergesi olabilir. VEGF'nin hepatosit proliferasyonunu arttırdığı ve bu şekilde karaciğer rejenerasyonunda etkili olduğu deneysel siroz modelinde gösterilmiştir⁹⁰. Ayrıca hepatik rezeksiyon sonrasında hastaların serumlarında VEGF düzeyinin arttığı saptanmış olup bu durumun doku iyileşmesinde rol aldığı belirtilmiştir⁹¹. VEGF'nin normal nefrojen ve kısmi olarak da glomerülogenezde etkili olduğu bilinmektedir⁹². Ayrıca glomerüler yapı ve fonksiyonun devam ettirilebilmesi için parakrin VEGF-VEGFR-2 sinyal yolağına ihtiyaç olduğu saptanmıştır⁹³. Bununla birlikte böbrek dokusunda lokal olarak VEGF artışının glomerüler hipertrofiye ve

proteinürine neden olduğu gösterilmiştir⁹⁴. Her iki doku için VEGF önemli işlevlere sahiptir.

Beyin ve kalp dokularında ise birim kütle başına düşen VEGF miktarının karaciğer ve böbrek dokusuna göre daha düşük olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum VEGF'nin beyin ve kalp dokusunun normal işlevlerinde karaciğer ve böbrekteki kadar etkin olmadığına göstergesi olabilir. Bununla birlikte beyin dokusunda iskemik olaylar sırasında VEGF düzeyinin arttığı, hipoksi ve oksidatif strese nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir⁹⁵⁻⁹⁹. Kalp dokusunda da beyin dokusuna benzer şekilde iskemi sonrasında (örneğin miyokard enfarktüsü) VEGF düzeyinin arttığı gösterilmiştir¹⁰⁰. Hem beyin hem de kalpte iskemik olaylar sırasında VEGF önemli bir rol oynamaktadır.

Deneysel ve klinik çalışmalarda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın serum VEGF düzeyini azalttığı gösterilmiştir^{6,7,86}. Bizim çalışmamızda da intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın serum VEGF seviyesini düşürdüğü izlenmiştir. Bu düşüşün 1. haftadan sonra ortaya çıktığı bununla birlikte enjeksiyon sonrası 1. günde VEGF düzeyinde değişiklik olmadığını saptanmıştır. Ancak Matsuyama ve arkadaşları ile Sato ve arkadaşları tarafından yapılan iki ayrı klinik çalışmada intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın ilk günden itibaren VEGF seviyesini azalttığı bildirilmiştir^{6,7}. Bu durum insan gözü ve tavşan gözü arasındaki anatomik farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Özellikle insan retinasının tavşan retinasına göre damardan daha zengin olduğu bilinmektedir. Böylelikle ilacın sistemik geçiş hızı yavaşlıyor olabilir. Ayrıca bildirilen iki klinik çalışmada da ilaç uygulanan hastaların retina damarlanmasının patolojik olarak arttığı ortadadır. Bu da ilacın daha hızlı sistemik dolaşıma geçmesini ve erken dönemde serum VEGF düzeyini düşürmesini açıklıyor olabilir. Bu hipotezi destekleyen başka bir deneysel çalışmada da ven dal tıkanıklığı oluşturulan deney grubunda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda seruma geçtiği gösterilmiştir⁷. Bu çalışma oküler patolojinin olduğu gözlerde ilacın farmakokinetiğinin değiştiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda oküler patolojisi olmayan gözlerle ilaç enjeksiyonu uygulanmıştır. Bakri ve arkadaşları tarafından tavşan modeli kullanılarak yapılan bir başka farmakokinetik çalışmada ilacın maksimum serum konsantrasyonuna 8. günde ulaştığı ve bu konsantrasyonun vitre konsantrasyonunun %0.8'i olduğu

saptanmıştır⁵. Aynı çalışmada ilacın serum yarı ömrü 6,86 gün olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda enjeksiyon sonrası ilk günde serum VEGF düzeyinin düşmemesine karşın ilacın dokulara geçtiğini ve çeşitli etkiler yarattığı görülmüştür. Bu durum erken dönemde ilacın dokulara dağıldığının ancak serum VEGF düzeyi üzerindeki etkinliğinin daha geç dönemde ortaya çıktığının göstergesi olabilir.

Sistemik olarak kullanılan ilaca bağlı ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle çalışmamızda öncelikli olarak beyin, kalp ve böbrek dokusunda biyokimyasal ve histolojik değerlendirmeler yapılması uygun görülmüştür. Bununla birlikte birçok ilacın metabolizmasında temel rol oynayan ve aynı zamanda birçok metabolik faaliyette önemli işlevler gerçekleştiren karaciğer dokusunda da biyokimyasal incelemeler yapılmasının yerinde olacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın ilk günden itibaren beyin dokusuna geçtiği saptanmıştır. Enjeksiyon sonrası ilk günde immüno floresan olarak pial damarlarda ve pia'da tespit edilen bevasizumab'ın ilerleyen zamanda beyin parankimine geçtiği görülmüştür. Biyokimyasal olarak VEGF düzeyinin çalışma gruplarında düşmesine karşın bu düşüş kontrol grubuna göre anlamlı değildi. Ancak SOD aktivitesinde ve GSH düzeyinde anlamlı bir düşme saptanırken MDA düzeyinde anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar ilacın kan-beyin bariyerini geçerek parankime ulaştığını ve VEGF düzeyinde ciddi bir değişiklik yapmamasına karşın beyin dokusunda oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.

Kalp dokusunda da beyin dokusuna benzer şekilde enjeksiyon sonrası ilk günden itibaren ilacın immüno floresan olarak dokudaki varlığı tespit edilmiştir. İlacın hem endokard hem myokard hem de damar duvarlarında bulunduğu görülmüştür. İlacın dokudaki varlığını tespit etmemize rağmen ilk üç çalışma grubunda VEGF düzeylerinde anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. Bununla birlikte immüno floresan olarak tutulumun arttığı IV. çalışma grubunda önemli düzeyde VEGF artışı tespit edilmiştir. Bu durumun kalp dokusu tarafından verilen rebound bir cevap olabileceği kanısındayız. İlacın ilk günden itibaren kalpteki SOD aktivitesini baskıladığı saptanmıştır. Ancak MDA düzeylerinde ciddi bir artış saptanmamıştır. Olasılıkla ilk iki çalışma grubunda GSH düzeyinin azalması ortamdaki serbest radikallerin GSH tarafından etkisizleştirildiğini ve SOD aktivitesinin azalmasına rağmen ciddi bir MDA artışının olmamasını

açıklamaktadır. III. grupta ise GSH artışının ilk iki gruptaki düşüşe yanıt olarak ortaya çıkan sentez artışı olabileceği düşünülmüştür. Aynı şekilde benzer bir artış karaciğer dokusunda da izlenmiştir. Bu durum karaciğer dokusunda GSH sentezinin arttığını ve seruma salınan GSH'ın kalp dokusuna geçişini de gösterebilir. Bilindiği üzere GSH'ın en yüksek oranda sentezlendiği organ karaciğerdir¹⁰¹. Karaciğer tarafından sentezlenen yüksek miktardaki GSH seruma salınmakta ve böylece bağırsaklar başta olmak üzere birçok organa yayılmaktadır. Bununla birlikte kalp dokusunun da GSH sentezleyebileceği unutulmamalıdır. IV. grupta ise SOD aktivitesi artarken, GSH düzeyinin azaldığı ve bunlara bağlı olarak da MDA düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak ilacın kalp dokusunda VEGF düzeyinde azalma yapmadığını ancak SOD aktivitesini önemli derecede baskıladığını, bununla birlikte bu durumun yoğun bir oksidatif strese neden olmadığını ve GSH tarafından bu durumun kompanse edilebildiği tespit edilmiştir.

İlacın uygulanmasını takiben karaciğer dokusunda VEGF düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Ancak karaciğer dokusunda histolojik bir inceleme planlanmadığı için ilaç varlığı da araştırılmamıştır. Bu çalışmanın en önemli eksiklerinden birisi bu olarak gözükmektedir. İlacın karaciğerde oksidatif stresi arttırdığını ve buna bağlı olarak MDA düzeyinin yükseldiği izlenmiştir. Olasıyla MDA düzeyinin yüksekliği SOD aktivite artışı ile kompanse edilmeye çalışılmış ancak başarılı olmayınca GSH sentezinin arttığı düşünülmüştür. Böylelikle III. gruptan IV. gruba geçişte GSH düzeylerinin düşmesiyle birlikte MDA düzeylerinde de düşme ortaya çıktığı görülmüştür.

Karaciğerde gerçekleşen bu biyokimyasal değişiklikleri başka bir hipotez ile açıklamakda mümkündür. VEGF yapımının SOR'lar tarafından arttırıldığı ve VEGF'nin SOR'lara karşı koruyucu olduğu bilinmektedir¹⁰². Lipid peroksidasyon ürünlerinin deride VEGF ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir¹⁰³. Aynı zamanda lipid peroksidasyon ürünlerinin ve lizozomal enzim blokajının RPE hücrelerinde VEGF-121 ile VEGF-165 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır¹⁰⁴. Tüm bu çalışmalardan yola çıkarak bevasizumab'ın karaciğer dokusundaki VEGF düzeyini düşürmesiyle birlikte bu düşüşü kompanse edebilmek için ortamda bulunan SOR'ların arttığı düşünülebilir. Artan bu SOR'ların ise VEGF yapımını uyarması olasıdır. Çünkü yapılan bir başka çalışmada VEGF'nin kendi sekresyonunu arttırabilmek için NADPH oksidaz aktivitesini arttırdığını,

böylelikle ortamda SOR'ların arttığı öne sürülmüştür¹⁰⁵. Aynı çalışmada VEGF'nin mangan bağımlı SOD'u hem inhibe edebileceği hem de ekspresyonunu arttırabileceği speküle edilmiştir. Ancak bu sistemin de dokuya zarar vermemek için denge içerisinde çalışması gerekmektedir. Bu nedenle ortamda artan SOR'lara karşı SOD aktivitesinin artması ve ilave olarak GSH yapımının arttığı düşünülebilir. Böylelikle MDA düzeyleri belli bir seviyede tutularak doku hasarının önüne geçilmiş olabilir.

Böbrek dokusunda da beyin ve kalp dokusuna benzer şekilde enjeksiyon sonrası ilk günden itibaren immünfloresan olarak ilacın dokudaki varlığı tespit edilmiştir. İlacın hem glomerüllerde hem de tübüllerde varlığı saptanmıştır. VEGF düzeylerinin I., II. ve III. grupta düştüğü ancak IV. grupta kalp dokusuna benzer şekilde ani bir yükselişin olduğu izlenmiştir. Bu durumun da kalp dokusunda olduğu gibi dokunun rebound cevabı olabileceği düşünülmüştür. GSH düzeylerinde önemli bir değişiklik olmazken SOD aktivitesinde ve MDA düzeyinde I., II. ve III. grupta artış dikkati çekiyordu. Ancak II. grup ile III. grup arasındaki GSH artış yanıtının kalp ve karaciğerdeki yanıtla benzer olduğu görülmüştür. Böbrek dokusunda da karaciğerde olduğu gibi VEGF düzeyinin düşmesiyle SOR'lar artmakta ve buna bağlı olarak hem MDA düzeyi hem de yanıt olarak SOD aktivitesi artmaktadır. Ancak III. gruptan IV. gruba geçişte VEGF'deki ani yükselmeye birlikte MDA düzeyi ve buna yanıt olarak da SOD aktivitesi düşmektedir. Bu da VEGF'in son ürün inhibisyonu yoluyla SOR'ları baskıladığının göstergesi olabilir. Aynı durum kalp dokusunda da geçerlidir. Böbrek dokusunda yapılan kaspaz-3 boyamasında kontrol grubu ve çalışma gruplarında apoptotik hücreye rastlanmamıştır. Aynı zamanda çalışma gruplarının elektron mikroskopik değerlendirmesinde herhangi bir patoloji izlenmemiştir. Bu durum tek doz enjeksiyon sonrası böbrekte hücresel düzeyde patolojik bir değişikliğin olmadığını göstergesidir. Bununla birlikte tekrarlanan dozlarda ilaç uygulamasında böbrek dokusunda çeşitli hücresel değişikliklerin ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır. Bizim çalışmamızda tek doz enjeksiyon uygulanmış ve kısa süreli VEGF baskılanması oluşturulmuştur. Ancak tekrarlanan dozlarla birlikte daha uzun süreli VEGF baskılanması ortaya çıkabileceği ve bu durumun böbrek homestazında etkili olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Bizim çalışmamızın önemli bir dezavantajı ise uzak organ toksisitesi çalışmak için seçtiğimiz hayvan modeli olabilir. Çünkü tavşanın beden lleri ve kan dağılım hacmi insan ile karşılaştırıldığında oldukça kk kalacaktır. Bu durumda göze uygulanan ilacın uzak organ etkilerinin daha fazla olması beklenebilir. Bununla birlikte tavşan ve insan göz anatomisinin farklılığından dolayı ilacın sistemik emilimi tavşanda daha yavaş olabilir. Bu durum ise ortaya çıkabilecek toksik etkilerin daha az olması sonucunu doğuracaktır. Tüm bunlara ilave olarak bizim çalışmamızda kullandığımız hayvanlar sağlıklı idi. Bununla beraber ilacın uygulandığı hasta grubuna bakıldığı zaman birden çok sistemik problemle karşılaşılması olasılığı yüksektir. Örneğin diyabetli bir hastaya intravitreal ilaç uygulaması pek çok açıdan risk taşımaktadır. Çünkü bu hastalarda birçok organı etkileyen mikrovasküler değişiklikler zaten mevcuttur. Bu nedenle hayvan modelinde ya da sağlıklı bir insanda ortaya çıkmayacak veya nadiren rastlanabilecek bir komplikasyon bu hastalarda daha sık ortaya çıkabilir. Aynı şekilde YBMD hastaları, damar tıkanıklığı hastaları, ROP'lu bebekler ekstra birçok risk faktörü taşımaktadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda intravitreal olarak uygulanan bevasizumab'ın yalnızca göz dokusu içerisinde kalmadığı, yaşamsal önemi olan beyin, kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlara dağılarak çeşitli etkilere neden olduğu ortaya koyulmuştur. Bu yönden bu çalışma literatürde ilktir. Ancak bevasizumab ve benzeri anti-VEGF ajanların pratikte kullanımına bakıldığında tekrarlanan dozlara ihtiyaç olduğu görülecektir. Bundan dolayı benzer bir model ile tekrarlanan dozlarda ilaç enjeksiyonunun etkilerinin değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Bu çalışmadan çıkarılacak esas sonuç ise ilacın klinikteki kullanımı sırasında yan etkiler yönünden dikkatli olunmasıdır. Hastalara kullanım öncesinde detaylı bilgi verilmesi ve risk taşıyan hastalarda gerekli tetkiklerin enjeksiyon öncesinde yapılması büyük önem taşımaktadır. Unutulmaması gereken nokta, ilacın göz hastalıklarında kullanımıyla ilgili ruhsatının olmayışı ve ortaya çıkabilecek ciddi medikolegal sorunlardır.

KAYNAKLAR

- 1.Cook HL, Patel PJ, Tufail A. Age-related macular degeneration: diagnosis and management. *Br Med Bull* 2008;85:127-49.
- 2.Spaide RF, Laud K, Fine HF, et al. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:383-90.
- 3.Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006;26:275-8.
- 4.Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short term study. *Retina* 2006;26:279-84.
- 5.Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007;114:855-9.
- 6.Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, et al. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Br J Ophthalmol* 2010;94:1215-8.
- 7.Chuang LH, Wu WC, Yeung L, et al. Serum concentration of bevacizumab after intravitreal injection in experimental branch retinal vein occlusion. *Ophthalmic Res* 2011;45:31-5.
- 8.Shima C, Sakaguchi H, Gomi F, et al. Complications in patients after intravitreal injection of bevacizumab. *Acta Ophthalmol* 2008;86:372-6.
- 9.Rasier R, Artunay O, Yuzbasioglu E, et al. The effect of intravitreal bevacizumab (avastin) administration on systemic hypertension. *Eye* 2009;23:1714-8.
- 10.Feiner L, Barr EE, Shui YB, et al. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbit eyes. *Retina* 2006;26:882-8.
- 11.Manzano RPA, Peyman GA, Khan P, et al. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab. *Retina* 2006;26:257-61.

12. Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, et al. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol* 2006;142:162-4.
13. Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, et al. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation* 2000;102:3098 –103.
14. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
15. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vascular endothelial growth factor allele. *Nature* 1996;380:435-9.
16. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-42.
17. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, et al. Increased hemangioblast commitment not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* 1999;126:3015-25.
18. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia and cytokine induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434-8.
19. Diaz Flores L, Gutierrez R, et al. Angiogenesis: an update. *Histol Histopathol* 1994;9:807-43.
20. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29:10–4.
21. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, et al. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997;3:177–82.
22. Lin RC, Rosenfeld PJ. Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 2007;47:117-37.
23. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575–83.
24. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1538-44.

25. Famiglietti EV, Stopa EG, McGookin ED, et al. Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina. *Brain Res.* 2003;969:195-204.
26. 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.
27. Schmidt-Erfurth UM, Pruenke C. Management of neovascular age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2007;26:437-51.
28. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
29. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996;93:1493-5.
30. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
31. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane M, et al. Nucleotide sequence and expression by of a novel human receptor type tyrosine kinase gene closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-24.
32. Terman BI, Dougher VM, Maglione D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579-86.
33. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:1-29.
34. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 1996;103:1820-8.
35. 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.

- 36.Husain D, Kim I, Gauthier D, et al. Safety and efficacy of intravitreal injection of ranibizumab in combination with verteporfin PDT on experimental choroidal neovascularization in the monkey. *Arch Ophthalmol* 2005;123:509-16.
- 37.Holz FG, Sheraidah G, Pauleikhoff D, et al. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 1994;112:402-6.
- 38.Pe'er J, Shweiki D, Itin A, et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases *Lab Invest.* 1995;72:638-45.
- 39.Pe'er J, Folberg R, Itin A, et al. Vascular endothelial growth factor upregulation in human central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 1998;105:412-6.
- 40.Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997;57:4593-9.
- 41.Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol* 1999;27:78-86.
- 42.Iu LP, Kwok AK. An update of treatment options for neovascular age-related macular degeneration. *Hong Kong Med J* 2007;13:460-70.
- 43.Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty-four-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2006;113:1-12.
- 44.Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112:1035-47.
- 45.Bolz M, Michels S, Geitzenauer W, et al. Effect of systemic bevacizumab therapy on retinal pigment epithelial detachment. *Br J Ophthalmol* 2007;91:785-9.
- 46.Aggio FB, Farah ME, Silva WC, et al. Intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration after multiple treatments. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:215-20.

47. Abrahám-Marín ML, Cortés-Luna CF, Álvarez-Rivera G, et al. Intravitreal bevacizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:651-5.
48. Aisenbrey S, Ziemssen F, Völker M, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:941-8.
49. Lazić R, Gabrić N. Intravitreally administered bevacizumab (Avastin) in minimally classic and occult choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:68-73.
50. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:331-5.
51. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-72.
52. Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, et al. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006;142:1-9.
53. Chen CY, Wong TY, Heriot WJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration: a short-term study. *Am J Ophthalmol* 2007;143:510-2.
54. Emerson MV, Lauer AK, Flaxel CJ, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2007;27:439-44.
55. Falkenstein IA, Cheng L, Morrison VL, et al. Standardized visual acuity results associated with primary versus secondary bevacizumab (avastin) treatment for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Retina* 2007;27:701-6.
56. Giansanti F, Virgili G, Bini A, et al. Intravitreal bevacizumab therapy for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: 6-month results of an open-label uncontrolled clinical study. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:230-7.

57. Goff MJ, Johnson RN, McDonald HR, et al. Intravitreal bevacizumab for previously treated choroidal neovascularization from age-related macular degeneration. *Retina* 2007;27:432-8.
58. Jonas JB, Harder B, Spandau UH, et al. Bevacizumab for occult subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol* 2006;16:774-5.
59. Jonas JB, Libondi T, Ihloff AK, et al. Visual acuity change after intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration in relation to subfoveal membrane type. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:563-5.
60. Mones JM, Lopez MA, Prieto JA, et al. Extrafoveal choroidal neovascularization secondary to wet age-related macular degeneration treated with intravitreal bevacizumab. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2007;38:226-8.
61. Rich RM, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Short-term safety and efficacy of intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:495-511.
62. Yoganathan P, Deramo VA, Lai JC, et al. Visual improvement following intravitreal bevacizumab (Avastin) in exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:994-8.
63. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:352-4.
64. Chung EJ, Kim JH, Ahn HS, et al. Combination of laser photocoagulation and intravitreal bevacizumab (Avastin(R)) for aggressive zone I retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1727-30.
65. Travassos A, Teixeira S, Ferreira P, et al. Intravitreal bevacizumab in aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2007;38:233-7.
66. Cordero Coma M, Sobrin L, et al. Intravitreal bevacizumab for treatment of uveitic macular edema. *Ophthalmology* 2007;114:1574-9.
67. Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina* 2006; 26:999-1005.
68. Hernández-Rojas ML, Quiroz-Mercado H, Dalma-Weiszhausz J, et al. Short-term effects of intravitreal bevacizumab for subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia. *Retina* 2007;27:707-12.

69. Yamamoto I, Rogers AH, Reichel E, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) as treatment for subfoveal choroidal neovascularisation secondary to pathological myopia. *Br J Ophthalmol* 2007;91:157-60.
70. Iliev ME, Domig D, Wolf-Schnurrbusch U, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of neovascular glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2006;142:1054-6.
71. Mason JO 3rd, Nixon PA, White MF. Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2006;142:685-8.
72. Rabena MD, Pieramici DJ, Castellarin AA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina* 2007;27:419-25.
73. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, et al. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab. *Retina* 2006;26:257-61.
74. Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL. Electrophysiologic findings after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:270-4.
75. Heiduschka P, Julien S, Hofmeister S, et al. Bevacizumab (avastin) does not harm retinal function after intravitreal injection as shown by electroretinography in adult mice. *Retina* 2008;28:46-55.
76. Stahl A, Feltgen N, Fuchs A, et al. Electrophysiological evaluation of retinal photoreceptor function after repeated bevacizumab injections. *Doc Ophthalmol* 2009;118:81-8.
77. Sari A, Adiguzel U, Canacankatan N, et al. Effects of intravitreal bevacizumab in repeated doses: an experimental study. *Retina* 2009;29:1346-55.
78. Fung AE, Rosenfeld PJ, Reichel E. The international intravitreal bevacizumab safety survey: using the internet to assess drug safety worldwide. *Br J Ophthalmol* 2006;90:1344-9.
79. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980;492:153-68.
80. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63:381-9.
81. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988;63:390-408.

- 82.Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:715S-724S; discussion 724S-725S.
- 83.Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
- 84.Beutler E. *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods.* 3th Ed. Grune & Stratton. Orlando.1984;72-3,105-6.
- 85.Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979;95:351-8.
- 86.Sato T, Wada K, Arahori H, et al. Serum concentrations of bevacizumab (Avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* (in press) 2011
- 87.Gordon MS, Cunningham D. Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. *Oncology* 2005;69:25-33.
- 88.Scappaticci FA, Skilling JR, Holden SN, et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1232-9.
- 89.Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5180-6.
- 90.Tekkesin N, Taga Y, Sav A, et al. Induction of HGF and VEGF in hepatic regeneration after hepatotoxin-induced cirrhosis in mice. *Hepatology* 2011;58:971-9.
- 91.Justing C, Schlüter C, Oliviera-Frick V, et al. Increased growth factor expression after hepatic and pancreatic resection. *Oncol Rep* 2008;20:1527-31.
- 92.Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: Glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest* 1997;99:2351-57.
- 93.Sison K, Eremina V, Baelde H, et al. Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1691-701.
- 94.Liu E, Morimoto M, Kitajima S, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2094-104.

95. Hayashi T, Abe K, Suzuki H, et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997;28:2039-44.
96. Cobbs CS, Chen J, Greenberg DA, et al. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett*. 1998;19:79-82.
97. Mu D, Jiang X, Sheldon RA, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiol Dis*. 2003;14:524-34.
98. Brockington A, Lewis C, Wharton S, et al. Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30:427-46.
99. Jin KL, Mao XO, Nagayama T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 2000;99:577-85.
100. Gu JW, Adair TH. Hypoxia-induced expression of VEGF is reversible in myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;273:628-33.
101. Wu G, Fang YZ, Yang S, et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* 2004;134:489–92.
102. Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sciences* 2000;67:1003-13.
103. Nakai K, Yoneda K, Ishihara Y, et al. Lipid peroxidation-induced VEGF expression in the skin of KKAy obese mice. *Exp Dermatol* 2011;20:388-93.
104. Bergmann M, Holz F, Kopitz J. Lysosomal stress and lipid peroxidation products induce VEGF-121 and VEGF-165 expression in ARPE-19 cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:1477-83.
105. Abid MR, Schoots IG, Spokes KC, et al. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox-dependent regulation of forkhead and I κ B/NF- κ B. *J Biol Chem* 2004;279:44030-8.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
IgG₁	:	İmmünglobulin G ₁
VEGFR	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
b-FGF	:	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
NO	:	Nitrik Oksit
VPF	:	Vasküler Geçirgenlik Faktörü
PIGF	:	Plasental Büyüme Faktörü
RPE	:	Retina Pigment Epiteli
YBMD	:	Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu
CNVM	:	Koroid Neovasküler Membran
ROP	:	Prematür Retinopatisi
SOR	:	Serbest Oksijen Radikalleri
O₂⁻	:	Süperoksid Anyonu
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksid
OH[·]	:	Hidroksil Radikali
SOD	:	Süperoksid Dismutaz
GSH	:	Redükte Glutasyon
GSSG	:	Okside Glutasyon
MDA	:	Malondialdehit
IVB	:	İntravitreal Bevasizumab
PBS	:	Fosfatlı Tuz Tamponu
BSA	:	Sığır Serum Albümini
DAB	:	Diaminobenzidin

ŞEKİL VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller

Şekil 1	(VEGF-A'nın dört majör izoformu)	15
Şekil-2	(VEGF izoformları ve bağlandıkları reseptörler)	16
Şekil-3	(Antioksidan sistem)	20
Şekil-4	(Kontrol grubundaki dokuların VEGF düzeyleri)	33
Şekil 5	(Serum VEGF düzeyleri)	34
Şekil 6	(Beyin dokusundaki SOD aktivitesi, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi)	35
Şekil 7	(Kalp dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF ve GSH düzeylerinin değişimi)	37
Şekil 8	(Karaciğer dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeylerinin değişimi)	39
Şekil 9	(Böbrek dokusundaki MDA düzeyinin değişimi)	41

Resimler

Resim 1	(Enjeksiyon masasının görünümü)	22
Resim 2	(Blefarosta ile kapakların ekartasyonu)	23
Resim 3	(Povidon iyot ile oküler yüzeyin yıkanması)	24
Resim 4	(İntravitreal enjeksiyon uygulaması)	25
Resim 5	(Steril kulak çubuğu ile iğne giriş yerine baskı uygulanması)	25
Resim 6	(Kalın bağırsaktaki perforasyon alanları)	32
Resim 7	(Kontrol grubundan alınan böbrek örneğinde kaspaz-3 boyamasının negatif olduğu izleniyor)	41
Resim 8	(Grup 1'den alınan böbrek örneğinde kaspaz-3 boyamasının negatif olduğu izleniyor)	42
Resim 9	(Beyin dokusunun immünfloresan boyanması. A-Kontrol grubu, B-Negatif kontrol boyama, C-Grup I, D-Grup II,	

	E-Grup III, F-Grup IV)	43
Resim 10	(Kalp dokusunun immünfloresan boyanması. A-Kontrol grubu, B-Negatif kontrol boyama, C-Grup I, D-Grup II, E-Grup III, F-Grup IV)	44
Resim 11	(Böbrek dokusunun immünfloresan boyanması. A-Kontrol grubu, B-Negatif kontrol boyama, C-Grup I, D-Grup II, E-Grup III, F-Grup IV)	45
Resim 12	(Böbrek elektron mikroskopik görünüm, kontrol grubu, x10000)	46
Resim 13	(Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup I, x10000)	46
Resim 14	(Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup II, x10000)	47
Resim 15	(Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup III, x10000)	47
Resim 16	(Böbrek elektron mikroskopik görünüm, grup IV, x10000)	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1	(Angiogenez üzerine etkili olan endojen moleküller)	13
Tablo 2	(Deney protokolünün uygulanışı)	21
Tablo 3	(SOD aktivite ölçümü)	29
Tablo 4	(GSH düzeyi ölçümü)	30
Tablo 5	(MDA düzeyi ölçümü)	31
Tablo 6	(Serum VEGF değerleri)	33
Tablo 7	(Beyin dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri)	34
Tablo 8	(Kalp dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri)	36
Tablo 9	(Karaciğer dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri)	38
Tablo 10	(Böbrek dokusundaki SOD aktivitesi, VEGF, GSH ve MDA düzeyleri)	40