

T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RETİNANIN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA BİR  
ANTI-VEGF AJAN OLAN BEVACİZUMAB'IN ETKİLERİ

Dr. Maryo Cenk KOHEN

GÖZ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Sinan Tatlıpınar

İSTANBUL-2012

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince tüm bilgi ve deneyimlerini aktaran, ihtiyaç duyduğum her anda ilgi ve desteğini esirgemeyerek, huzurlu bir çalışma ortamı yaratan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ferda ifti'ye başta olmak üzere bu tezin hazırlanmasında ve yönlendirilmesinde birikimiyle büyük katkı ve emek veren tez hocam Prof. Dr. Sinan Tatlıpınar'a sonsuz minnet ve Őükranlarımı sunarım.

ÇalıŐmamda histopatolojik incelemeleri yapan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Yard. Doç. Dr. Ünal Uslu'ya, Yard. Doç. Dr. Alev Cumbul'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr.Maryo Cenk KOHEN

*Anneannem'e*

**SİMGE VE KISALTMALAR**

DLM: Dış Limitan Membran

DNT: Dış Nükleer Tabaka

DPT: Dış Pleksiform Tabaka

EDBF: Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör

FDA: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)

GHT: Ganglion hücre tabakası

I&R: İskemi ve Reperfüzyon

I&R+Bev: İskemi ve Reperfüzyon ve bevacizumab

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1 (Hücreler Arası Adezyon Molekülü)

IL: İnterlökin

İLM: İç Limitan Membran

İNT: iç Nükleer Tabaka

İPT: iç Pleksiform tabaka

KNV: Koroid Neovasküler Membran

MDA: Malondialdehit

muMAbA.4.6.1 Murine anti-human VEGF monoklonal antibody (Sıçan anti-insan VEGF monoklonal antikor)

NMDA: N-metil D-aspartat

NO: Nitrik oksit

RPE: Retina pigment epiteli

ROS: Reaktif oksijen molekülleri

TIMPs: Tissue Inhibitor Metalloproteinases (Doku Mettalo proteinaz İnhibitörleri)

TNF: Tumor Nekrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

YBMD: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ
2. GENEL BİLGİLER
  - 2.1. Retina Anatomisi
    - 2.1.1. Retina Pigment Epiteli
    - 2.1.2. Duyusal Retina
    - 2.1.3. Glial Sistem
    - 2.1.4. Vasküler Elemanlar
    - 2.1.5. Kan Retina Bariyeri
  - 2.2. Retinada Otonom Kontrol Mekanizmaları
    - 2.2.1. Metabolik Kontrol
    - 2.2.2. Miyojenik Kontrol
    - 2.2.3. Damarların Nörojenik Kontrolü
    - 2.2.4. Endotelyal Mediyatörler
  - 2.3. Retinada İskemi ve Reperfüzyon
    - 2.3.1. İskemik Retina Histolojisi
      - 2.3.1.1. Erken Dönem
      - 2.3.1.2. Geç Dönem
    - 2.3.2. Retinanın İskemiye Direnci
    - 2.3.3. Retina İskemisinde Nörolojik Mekanizmalar
    - 2.3.4. İskemik Tolerans
    - 2.3.5. Retinal İskemideki Seçici Hücre Ölümü (Apoptozis)
  - 2.4. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)
    - 2.4.1. VEGF ve Oküler Neovasküler Hastalıklar
      - 2.4.1.1. VEGF ve Korneal Anjiyogenez
      - 2.4.1.2. VEGF ve Retinal Anjiyogenez
      - 2.4.1.3. VEGF ve Koroidal Anjiyogenez
  - 2.5. Bevacizumab
3. GEREÇ ve YÖNTEM
  - 3.1. Denekler
  - 3.2. Akut Retinal İskemi Modeli
  - 3.3. Sakrifikasyon ve Kardiyak Perfüzyon
  - 3.4. Ganglion Hücre Sayımı ve Steorolojik Hücre Değerlendirme
  - 3.5. TUNEL Metodu ile Apoptozis Analizi
  - 3.6. VEGF ve İmmünohistokimyasal Analiz
  - 3.7. İstatistiksel Değerlendirme
4. BULGULAR
5. TARTIŞMA
6. SONUÇ
7. ÖZET
8. SUMMARY
9. KAYNAKLAR
10. RESİMLERİN LİSTESİ

## 1. GİRİŞ

İskemi bir dokunun kanlanmasını sağlayan sistemin belli bir zaman dilimi içinde tıkanması sonucunda ortaya çıkan bir durumdur. İskemik hasarın düzelmesi için bu zaman dilimi içinde dokunun tekrar oksijen ile beslenmesi gerekmektedir.

İskemi oluşmuş dokuya kan akışının tekrar sağlanması reperfüzyon olarak isimlendirilmektedir. İskeminin kritik süresi dolmadan, doku reperfüze olursa hücreler kısmen de olsa canlılığını devam ettirebilir. İskemi süresinin artması reperfüzyona rağmen ölen hücrelerin sayısını artırır. Bu hücrelerde geri dönüşümsüz olarak doku hasarı olduğu için reperfüze edilseler bile nekroza giderler. Reperfüzyon hasarının büyük bölümünü serbest radikaller oluşturmaktadır. Eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller biyomolekülleri okside edip hücre ölümü meydana getirirler.<sup>29,14</sup>(Çelebi ve ark.,2002, Baykal ve Kocabalkan, 2000). Retinanın oksijenle etkileşimi oldukça fazladır. Retinada serbest radikalleri birikince lipit peroksidasyonunun bir yan ürünü olan malondialdehit (MDA) birikmeye başlar. MDA proteinler ile reaksiyona girerek yüksek moleküllü protein oluşumu (agregasyon), disülfid köprülerinin oluşumu, deamidasyon ve nonenzimatik glikozilasyon gibipostsentetik değişimler meydana getirir.

Organizmada serbest radikal hasarını engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri bulunur. Bu sistemin düzenli işlemesi sağlıklı yaşam açısından oldukça önemlidir. Ancak, iskemiye takiben sistemin yüksek miktarda oksijene maruz kalması sonucunda serbest radikal miktarında artış oluşur ve doğal savunma sistemleri yetersiz kalır; sonuçta hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik durum ortaya çıkar.<sup>102,11</sup> (Poli ve ark., 1993; Aydemir, 2002). Hücre apoptozisinden sorumlu önemli bir enzim olan Kaspaz-3 (apopain), 13 farklı üyesi bulunan interlökin  $\beta$  grubundan olup sistein proteaz enzimi olarak bilinir. Kaspaz-3'ün 17 ve 12 kDa molekül ağırlığına sahip iki alt

birimi bulunur. Aktif kaspaz-3 enzimi özellikle DNA tamir ve regülasyonunda, nükleer lamin gibi moleküllerin parçalanmasında ve sonuçta apoptozis (programlanmış hücre ölümü) olayında önemli rol oynar<sup>7</sup>(Andersson ve ark., 2003).Retinanın yüksek oranda oksijene ve doymamış yağ asitlerine sahip olması nedeni ile oksidatif hasar çok önemlidir.

Retinal iskemi, diyabetik retinopati ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıklarda neovaskülarizasyon ve makula bölgesinde ödem yaratarak görmeyi azaltmaktadır. Bu hastalıkların patofizyolojisinde vasküler bileşenler en önemli yeri tutsa da inflamasyon ve nörodejenerasyonda hasara önemli oranda katkıda bulunmaktadır. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda kompleman aktivasyonu ve diyabetik retinopatideki mikroglyal aktivasyon bunlara örnektir.<sup>2,9,31,57,96,134</sup> (Adams AP et al 2008, Antonetti DA et al 2006, Ding X et al 2009, Kern TS et al 2007, Patel N et al 2008, Zeng HY et al 2008) Bu retinopatilerin patofizyolojisindeki inflamatuvar, nöronal ve vasküler bileşenlerin fonksiyonel etkileşimi yeni araştırılmaya başlanan bir konudur. Örneğin bir hipoteze göre inflamasyon, lökostasis ve onu takip eden mikrovasküler oklüzyona yol açarak VEGF salınımına, vasküler permeabilite artışına ve vasküler hücre ölümüne sebep olacaktır<sup>9,25,58</sup> (Antonetti DA 2006, Chibber R et al 2007, Kern TS et al 2007). Bu vasküler oklüzyon ve hücre ölümünün nörodejenerasyon ve neovaskülarizasyon için başlatıcı faktör olabileceği düşünülmektedir<sup>56, 130</sup> (Kaur C et al 2008, Yeung L et al 2009).

VEGF birçok retinopati ile ilişkili olan vasküler anjiogenezis ve vasküler permeabilite artışına yol açar. Bu etkisi iskemik ve inflamatuvar retinopatilerin ele alındığı birçok vaka çalışması ve klinik deneylerde VEGF antagonistlerinin ödemi azaltması ve neovaskülarizasyonu önlemesiyle kanıtlanmıştır.<sup>49,66</sup>(Jardeleza MS et al 2009, Lott MN et al 2009). Fakat dikkate alınması diğer bir konu ise VEGF'in bir nörotrofik bir madde olmasından dolayı bu mediyatörün inhibisyonunun aynı zamanda nörodejenerasyona sebep olabileceğidir. VEGF antagonistlerinin apoptozise sebep olduğunu belirten çalışmalarda literatürde mevcuttur<sup>23,84,107,108,123,138</sup> (Cheng CK et al 2009, Nishijima K et al 2007, Ruiz de Almodavar C et al 2009, Saint-Geniez M et al 2008, Ueno S et al 2008, Ziemssen F et al 2008).

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Retina Anatomisi

Retina, içte duyuşal (nörasensoryal) retina ve dışta retina pigment epiteli(RPE) olmak üzere iki ana bölümden oluşan, optik sinirden ora serrataya kadar uzanarak vitreus boşluğunu arkadan çevreleyen transparan bir yapıdır. Retina topografik olarak üç bölümde incelenebilir.

1- Temporal damar arkının içi, arka kutup veya makula olarak adlandırılır ve dıştan içe parafovea, perifovea, fovea ve foveolayı barındırır.

2-Arka kutuptan ekvatora kadar olan bölümün adı midperiferdir. Bu bölge retina dejeneresanslarının sık görüldüğü bir bölge olup arka kısa siliyer arterlerle büyük iris arter çemberinin anastomoz yeridir bu yüzden beslenme yönünden koroidin en zayıf bölgesidir.

3- Ekvator ile ora serrata arası eksterm-periferdir.

Retina perifere gidildikçe, özellikle ora serratada 100 mikrona kadar incelir, arka kutup kenarında kalınlığı 230 mikrondur, ancak foveada yeniden incelir. Merkezi 400 mikronluk alanda retina kapillerleri bulunmaz. <sup>128,90</sup>

Histolojik olarak retina; içte 9 tabakadan oluşan nörosensoryal bölüm ve dışta retina pigment epiteli olmak üzere 10 farklı tabakadan oluşur ve hayat boyunca retinohipotalamik yol olarak bilinen bir yapı aracılığıyla ön beyin le ilişkide kalır. <sup>112</sup>

#### 2.1.1. Retina Pigment epiteli

RPE hücreleri, çoğunlukla altıgen şeklinde olup periferde küp şeklini alarak tek katlı hücreler halinde optik diskten ora serrataya uzanır. Ora serratada ise siliyer cismin pars planası pigment epiteli olarak devam eder. RPE, Bruch membranı ile koroidden ayrılır. RPE hücrelerinin bazal membranları Bruch membranına sıkıca yapışık olup apekslerinde villöz uzantıları vardır. Bu uzantılar koni ve basil dış segmentlerini çevreler.

#### 2.1.2. Duyusal Retina

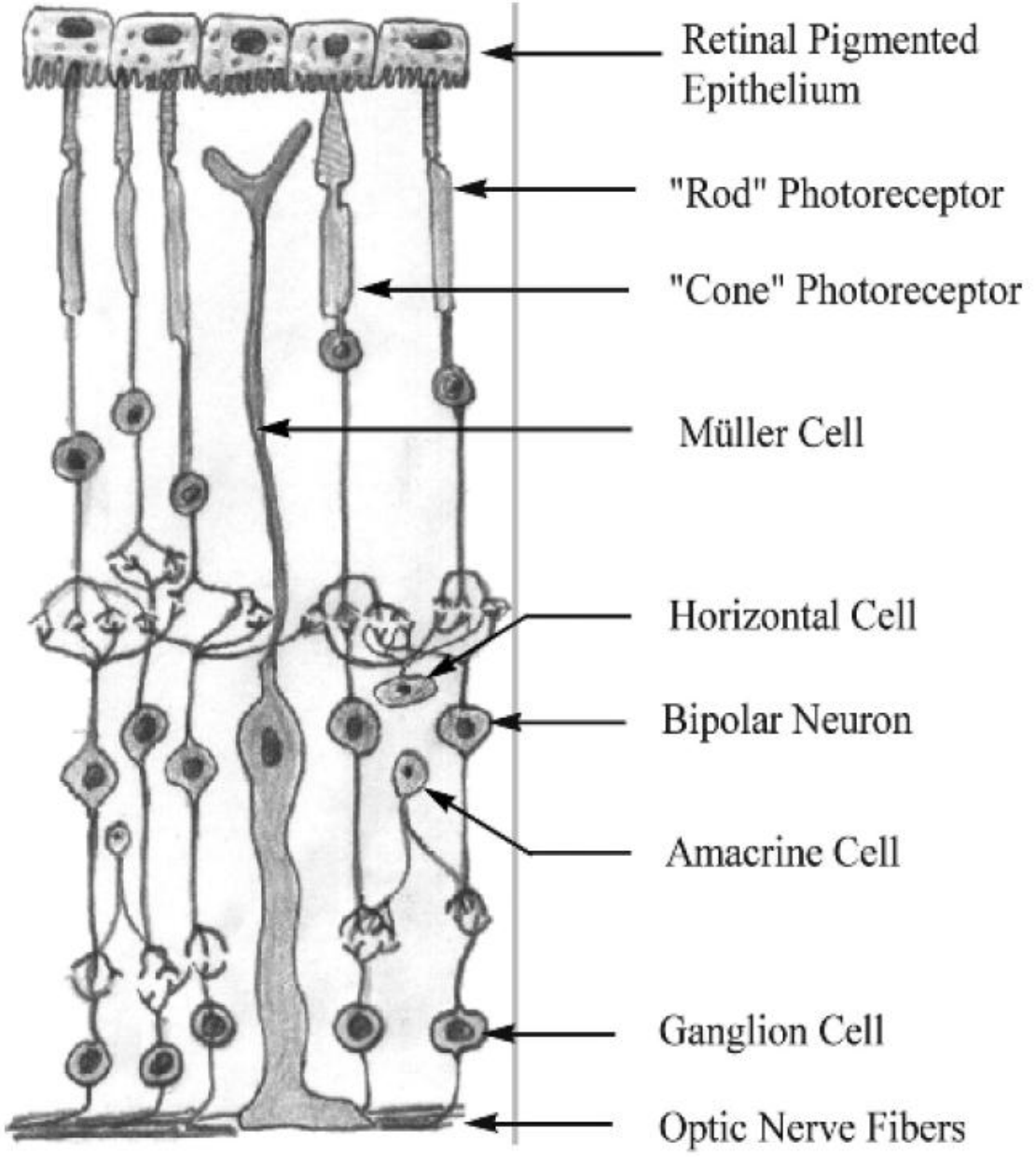
Duyusal retina 9 tabakadan oluşan ince, şeffaf ve hücresel bir membrandır. Nöronal, glial ve

vasküler olmak üzere üç tip hücre bu yapıda bulunur. Burada ışık sinyalleri sinir iletimine çevrilir ve horizontal, bipolar, amakrin ve ganglion hücreleri arasındaki etkileşimlerle bütünleştirilerek sinir lifleri tabakası ve optik sinir yoluyla beyne iletilir. En önemli glial elemanlardan biri Müller hücresi olup, retinanın tüm katmanları boyunca uzanır ve retinanın iskelet desteğini sağlar, bu hücreler glikojen sentez ve depolama özelliğine sahip hücrelerdir ve komşu nöronları beslemekle de sorumludurlar.<sup>99</sup> Diğer glial elemanlardan astrositler ise kan damarları ile ilişkilidir. İç pleksiform tabakadan içerde kalan retina, santral retinal arter dallarından, dışarıda kalan retina bölümleri ise koroidin koriokapillarisinden beslenir.

Duyusal retinanın dıştan içe doğru tabakaları (şekil-1);

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





### Rod (basil) ve Koni Tabakası (fotoreseptörler)

Fotoreseptörler son derece özelleşmiş hücreler olup, ışığı görme pigmenti içeren bir molekül içine hapsederler. Işık enerjisi bu moleküllerin yapısını değiştirerek sinir uyarısını oluşturur.

Dış limitan membranın dışında yer alan fotoreseptör tabakası rod ve konilerin iç ve dış segmentlerinden oluşur.

### Dış Limitan Membran (DLM)

DLM gerçek anlamda bir membran yapısı değildir. Komşu fotoreseptörlerin plazma membranları ile Müller hücrelerini birleştiren bir seri bağlantı cisimciğinin oluşturduğu bir yapıdır. Fotoreseptör tabakasını dış nükleer tabakadan ayırır.

### Dış Nükleer Tabaka (DNT)

DNT nükleus ve sitoplazmalarıyla birlikte fotoreseptör hücre gövdelerinden oluşur. Bu hücrelerin aksonları dış pleksiform tabakadaki horizontal ve bipolar hücreler ile sinaps bağlantılıdır.

### Dış Pleksiform Tabaka (DPT)

DPT fotoreseptörler (rod ve koniler ) ile birinci nöron (bipolar hücreler) arasındaki bileşme alanıdır. Kendi içinde dış, orta ve iç bölgelere ayrılır. Dış bölge fotoreseptörlerin aksonal uzantılarını (Henle lifleri tabakası) ve Müller hücrelerinin sitoplazmalarını, orta bölge fotoreseptör aksonlarını ve iç bölge ise bipolar, horizontal ve Müller hücre yapılarını bulundurur.

### İç Nükleer Tabaka (İNT)

İNT kabaca dört kat şeklinde hücre gövdelerinden oluşur. Bunlar içten dışa doğru amakrin, Müller, bipolar ve horizontal hücrelerin nükleuslarıdır. Bipolar hücreler birinci nöronu temsil ederler ve sinir iletilerini fotoreseptörlerden ganglion hücrelerine iletirler. Horizontal ve amakrin hücrelerin horizontal uzantıları muhtemelen devre tamamlama görevini yaparlar. Glial Müller hücreleri, esas olarak destek ve besleyici rol oynarlar ancak henüz bilinmeyen bir yol ile sinir iletilerinin taşınma ve modifikasyonunda da rol oynuyor olabilirler.

### İç Pleksiform tabaka (İPT)

İPT, İNT ile ganglion hücre tabakası arasında yer alır ve birinci nöron (bipolar hücreler) ile ikinci nöron (ganglion hücreleri) arasındaki sinapsları içinde barındırır. Bipolar, amakrin, ganglion ve Müller hücre yapılarını içerir. Az sayıda ganglion veya amakrin hücre gövdesi İPT'de bulunuyor olabilir.

### Ganglion hücre tabakası (GHT)

GHT ikinci nöron olan ganglion hücrelerinin gövdelerinden oluşur. Fotoreseptörlerde oluşturulan sinyaller bipolar hücreler ile ganglion hücrelerine iletilir. Ganglion hücrelerinin

aksonları ise sırasıyla sinir lifleri tabakasını, optik siniri ve optik traktusu oluşturur ve sonunda lateral genikulat cisimde sinaps yaparlar.<sup>115</sup> Birçok primatta ve insanda, birçok ganglion hücresi tipi vardır. Bunlar farklı bir fonksiyonlarla lateral genikulat cismin farklı bölgelerine gitmektedirler. Genel olarak üç akson grubu vardır: W, X ve Y ve bunlar da gama, beta ve alfa ganglion hücreleri olmak üzere üç ganglion hücresi grubuna aittir.

### Sinir Lifleri Katı (SLT)

Ganglion hücrelerinin aksonları optik sinir başında toplanarak optik siniri oluşturur. Makuladan kaynaklanan lifler yay şeklinde bir alan oluşturarak (makulopapiller demet) optik sinire doğru düz bir seyir gösterirler, temporal retinadan gelen liflerde bu makulopapiller demet etrafından dolaşarak papillaya ulaşırlar. Nazal retinadan çıkan liflerse düz bir seyir ile optik sinir başına girerler. Ganglion hücrelerinin aksonları retinada miyelinsiz, retrolaminer bölgeden sonra ise miyelin kılıf ile çevrilir. Embriyogenezis sırasında optik sinirin miyelinizasyonu lamina cribrosada durur. Ancak nadir olmayarak optik disk kenarında veya retinanın herhangi bir yerinde yama tarzında miyelinli lifler görülebilmektedir. Büyük alfa tipi ganglion hücrelerinin aksonları olan Y liflerinin çapları geniştir. Lateral genikulat ganglionun magnoselüler tabakasına uzanırlar. İletimi hızlıdır. Alfa hücreleri ise retinanın az sayıda bulunurlar(%10). Y hücreleri ve bunların alfa ganglionları glomda erken dönemde hasarlanırlar. Orta çaplı olan X lifleri, orta büyüklükteki beta hücrelerinden kaynaklanırlar, iletimi daha yavaştır. Beta hücreleri ve X lifleri retinadaki yoğunluğu % 40'tır.W lifleri sayıca yüksektir (% 50), daha incedirler, en küçük ganglion hücreleri olan gama hücrelerinden kaynaklanırlar. Lateral genikulat cismin parvosellüler tabakasına giderler. Bu gün için hangi işlevi yaptığı çok iyi bilinmemektedir.

### İç Limitan Membran (İLM)

İLM, orta kalınlıkta PAS (+) filamentöz bir bazal membrandır. Çoğu kısmı Müller hücrelerinden oluşur. Vitreal yüzü düz, retinal tarafı daha girintili çıkıntılıdır.

#### 2.1.3. Glial Sistem

### Müller Hücreleri

Müller hücresi en büyük boydaki retina hücresidir. Nerdeyse tüm retina katları boyunca

uzanır. hücreler, glikojen yapıp ve depolarlar. Bu nedenle nöronlar açısından besleyici fonksiyon görürler. Müller hücrelerinin gövdesi, İNT'nin iç bölümünde bulunur. İç retinal yüzey boyunca az sayıda astrositlerin bulunduğu alanlar hariç Müller hücre uzantıları sinir lifi tabakası İLM sınırını oluşturur.

### Aksesuar Glial hücreler

Bu grubun temel hücresi astrositlerdir, nadir olsa da oligodendrositler retinanın sadece SLT'da, GHT'da ve İPT'da bulunurlar. Mikroglialar ise makrofaj gibi çalışırlar ama yalnız fagositoz yaparsa ayırtedilebilir. Astrositler yıldız şeklindedir ve uzantılarını sinir hücreleri ve kan damarlarının etrafına gönderirler. Oligodendrositlerin fonksiyonu bilinmemektedir. Başka dokularda yaptıklarında farklı olarak retinada miyelin üretiminden sorumlu değillerdir.

#### 2.1. 4. Vasküler Elemanlar

Santral retinal arter ve venin her ikisi de, süperior ve inferior nazal ve temporal dallara ayrılır. İlk çatallanmadan sonra arterler musküler ve internal elastik lamina tabakalarını kaybederek arteriol halini alır. Arter kesitleri venlere göre daha yuvarlak ve daha kalındır.<sup>61</sup>

Optik sinir başını, radial peripapiller kapiller ağ adı verilen ayrı bir sistem besler.

#### 2.1.5. Kan- Retina Bariyeri

Nöral retina beyine benzer şekilde büyük molekül zehirli maddelerden koruyan bir yapı vardır. Nöral retinanın dış üçte bir kısmı retinanın pigment epitel hücreleri arasındaki zonula okludensler sayesinde korunurken, iç kısmı da retinal kapillerlerin endotelial hücreleri arasında bulunan zonula okludensler tarafından korunur.<sup>116</sup>

#### 2.2. Retinada Otonom Kontrol Mekanizmaları - Otoregülasyon

Retina ganglion hücre ve sinir lifi tabakasının yaşamsallığını sürdürebilmesi için retinanın kesintisiz ve düzgün bir şekilde perfüze olmasının önemi büyüktür. Bu önemli tabakalarda, besin ve oksijen desteğinin hep sürmesi ve metabolik artıkların uzaklaştırabilmesi için devamlı bir kan akımı olmalıdır. Retinanın iç kısmını besleyen damarlar santral retinal

arterden kaynaklanırlar. Retinanın dış kısımları ise ve koroidin damar ağından perfüze olur. Bu damar ağıysa kısa posterior silier arter kaynaklıdır. Santral retinal arter, retina sinir lifi tabakası boyunca uzanıp dallanarak, iç retina katlarını besler.

Bir dokunun vasküler yatağında kan akışının otoresülasyonu, o dokunun perfüzyon basıncındaki minimal değışimlerden etkilenmemesi için kan akımını sabit tutabilmeye çalışılması olarak tanımlanır. Retina ve optik sinir başının bu yeteneğini bulunmaktadır. Retina kan akımı arteriol duvarını ve/veya vasküler endoteli çevreleyen retinal dokudan vazoaaktif aminlerin salınmasıyla, miyojenik ve metabolik mekanizmaların harekete geçirilmesiyle otoresüle edilir.

### 2.2.1. Metabolik Otoresülasyon

Arteriyel kan akımında azalma, vazodilatatör ajanların lokal olarak salgılanmasına yol açar. Optik sinir mikrodamarlarında arterioler kontraksiyon, parsiyel oksijen basıncı ve arteriyel pCO<sub>2</sub> düzeyleri ile ilişkilidir. Yüksek CO<sub>2</sub> düzeyi optik sinirin kan akımını artırır. Hipoksik dokuda üretilen adenozinin, hipoksi ile indüklenen vazodilatasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nöral nitrik oksit (NO), hiperkapnik vazodilatatör yanıtın önemli bir mediyatörüdür.<sup>18</sup>

### 2.2.2. Miyojenik Otoresülasyon

Otoresülasyonun miyojenik hipotezine göre, arteriyoller transmural basınç artışını kasılma ile yanıtlarlar. Laplace bağıntısına göre; yükselmiş iç basınç damar duvarını gerdiği zaman duvar basıncı artar. Miyojenik otoresülasyonda, duvar basıncının yükselmesine, arteriyoller kasılma ile cevap verilir. Miyojenik kasılmayı başlatabileceği düşünülen en muhtemel mekanizmaların endotelial faktörler olduğu tahmin edilmektedir. Damar düz kasındaki sodyum ve kalsiyum kanallarının bu kasılmada rolü büyüktür. Damar düz kasında kasılmanın gerçekleşmesi için depolarizasyon gereklidir. Bu depolarizasyon hücre içinde Na<sup>+</sup>'un artması ile oluşur, artan Na<sup>+</sup> hücre dışına atılırken, Na<sup>+</sup>- Ca<sup>++</sup> değışim sistemiyle hücre içine Ca<sup>++</sup> alınır. Hücre içi Ca<sup>++</sup> artışı ise damar düz kasında kasılmayı başlatır. Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) gibi endotelial faktörler, damar düz kas hücrelerinde Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> pompasının

uyarılmasıyla hücre içindeki  $Na^+$  u azaltıp, hiperpolarize ederek damarın gevşemesine yol açar.<sup>56</sup>

### 2.2.3. Damarların Nörojenik Kontrolü

Retina ve optik sinirin prelaminer bölgesindeki damarlarda nöral innervasyon bulunmaz. Servikal sempatik zincirin uyarılması, uveada bir bir vazokonstriksiyon oluştururken, retina ve ön optik sinir kan akımı üzerine etkisizdir. Bununla birlikte, alfa ve beta adrenerjik reseptörler, retinal ve posterior silier damarlarında bulunmaktadır. Optik sinirin vazomotor kontrolünde bu reseptörlerin fizyolojik öneminin ne olduğu halen bilinmemektedir.

### 2.2.4. Endotelyal Mediyatörler

Prostanoidler, NO ve NO içeren bileşikler, düz kas hücre hiperpolarizasyon faktörleri ve Endotelinler vazoaaktif endotel türevi faktörlerdir. Damar duvarındaki lokal renin- anjiotensin sistemi de vazomotor kontrole katkıda bulunur. Prostaglandin ve NO vazodilatasyon sağlarlar. Damar endotel hücreleri vazokonstriktör maddeler de üretirler. Tromboksan A2 ve Prostaglandin H2 vasokonstriksiyon yaparlar. En güçlü vazokonstriktör bileşik ise endotelinlerdir. Endotelin-1, preproendotelin ve proendotelinden oluşur. Vazokonstriksiyon, fosfolipaz ara molekülü kullanılarak aktive edilen reseptörlerle yürütülür. Damar duvarındaki lokal renin-anjiotensin sisteminin de vazomotor sistemde oldukça etkilidir. Renin, anjiotensinojeni, anjiotensin-1'e çevirir. Anjiotensin-2 biyolojik olarak inaktif anjiotensin-1'in, endotelyal hücre anjiotensin- konverting enzimi ile çevrilmesiyle meydana gelir. Anjiotensin-konverting enzimi ayrıca bradikininini inaktive eder, bu da prostasiklin ve NO artışını sağlayan bir peptid transmitterdir.<sup>73</sup>

### 2.3. Retinada İskemi-Reperfüzyon

İskemi kelimesi ilk defa Yunanca "iskho" (engelleme) ve "hàima" (kan) kelimelerinde gelmektedir. İskemi, kan akımının dokuya gidememesi veya kan basıncındaki azalma sonucu glikoz ve oksijenin dokuya ulaşmasındaki ve metabolik artıkların dokulardan temizlenmesindeki zayıflama ile meydana gelen patolojik bir durumdur<sup>11</sup>(Aydemir, 2002). Kan akımının tekrar başlamasına ise reperfüzyon denir. İskemi, anoksi ve hipoksiden farklıdır. İskemi daima anoksi/hipoksiyi kapsar,

ancak anoksi/hipoksi oluşması için illa iskemi olması gerekmemektedir. Örneğin, yüksek rakımda O<sub>2</sub> basıncının düşmesiyle görme olayının azaldığı hipoksi oluşabilir fakat burada iskemi mevcut değildir. Benzer bir şekilde anemi (hemoglobulinin azalması), iskemide daima olurken bunun tersi söz konusu değildir<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

İskemide doku 3 gereksinimden yoksun kalır; oksijen, gerekli metabolik maddeler ve atıkların uzaklaştırılması. Bu üç gereksinimin tamamen ya da kısmen olmaması, hemostazinin bozulmasına ve zamanla da dokunun hasara uğramasına neden olacaktır. Eğer bu durum uzun sürerse doku ölecektir<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

İskeminin ilk etkisi mitokondrilerdeki ana enerji üretimi olan oksidatif fosforilasyonu bozar.

Oksijen basıncının azalması sonucu oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi azalır ve hücre içi ATP miktarı azalır. ATP miktarındaki azalmanın hücre içindeki birçok sistemin çalışmasını bozar. Örneğin sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre içinde oldukça düşük konsantrasyonda tutulur. İskemi ile meydana gelen ATP miktarındaki azalma sonucu, ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları çalışmaz ve hücre dışı kalsiyum plazma membranını geçerek hücre içinde kalsiyum konsantrasyonunu yükseltir. Bunu hücre içi kalsiyumun da serbest bırakılması takip eder. Artan sitoplazmik kalsiyum sırasıyla fosfolipazları, proteazları, ATPazları ve endonükleazları aktive eder. Bu enzimler de lipit, protein, ATP ve nükleik asitleri parçalayarak hücrenin ölümünü (apoptozis) başlatır.<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004). İskemik dokuda en büyük hasar reperfüzyondan sonra meydana gelir<sup>45</sup> (Ishihara ve Nakano, 2000) çünkü reperfüzyon sonrası hücreye aşırı miktarda Ca<sup>++</sup> girişi meydana gelir ve kalsiyuma bağlı yıkıcı enzimlerin aktive olmasıyla hücre yapı taşları zarar görür. Örneğin; fosfolipaz aktifleşerek hücre membran fosfolipitlerinden araşidonik asidi serbest kalmasını sağlar. Ayrıca iskemi sırasında ATP'nin yıkılmasıyla hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri oluşurken ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza çevrilir. Reperfüzyon esnasında sisteme yoğun O<sub>2</sub> girişi, birikmiş pürinlerin hızlıca oksidlenmesine ve urat ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olur. Oluşan süperoksit anyonu, endotelde demir tarafından katalize edilen reaksiyonlar ile toksisitesi yüksek hidroksil radikali üretimine sebep olur<sup>13</sup> (Barry ve Grace, 1997). Retina, oksijen ve doymamış yağ asidi bakımından oldukça zengin olduğu için aşırı miktarda serbest radikal etkisine çok

açıktır. Bu durum retinayı iskemik hasardan daha çok etkilenmesine sebep olur<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

### 2.3.1. İskemik Retina Histolojisi

#### 2.3.1.1 Erken Dönem

1- İnsanda retinanın retinal arteriollerce beslenen iç tabakalarında koagülasyon nekrozu meydana gelir. Arter tıkanıklığından sonraki ilk birkaç saatte nöronal hücreler ödemlenir. İntrasellüler şişme klinik olarak gri retinal opasitelerin sebebidir. Ganglion hücrelerinde piknozis meydana gelebilir.

2-Eğer koagülasyon nekroz alanı küçük ve sınırlı ise klinik olarak yumuşak eksudalara neden olur.

Klinikte atılmış pamuk manzarasını oluşturan yumuşak eksudalar, retinanın sinir lifleri

tabakasında lokalize aksoplazmik debris birikimidir. Ganglion hücrelerinde aksoplazmik akım

kesilmesi dolayısıyla oluşur. Retina sinir lifleri tabakasında aksonal akımın kesilip yumuşak

eksudanın oluşmasında en sık sebebi iskemidir. Ancak fokal olarak aksonal akımın kesilmesine sebep

olan herhangi bir neden de benzer birikimler meydana getirecektir. Mikroinfarktlar rüptüre olmuş ve şişerek büyümüş aksonların mikroskopik olarak görülen agregatlara (Cytoid bodies) dönüşmesine

neden olur. Akson içinde eozinofilik kitle görünmesi (nükleoid) hücre içindeki nükleusa benzediği için

cytoid terimi kullanılır. Cytoid cisimler internal limitan membranın hemen altında yer

bulunurlar. Cytoid cisimlerle birlikte lokalize ödem mikroinfarkt alanlarını belirler.

3-Eğer koagülasyon nekrozu alanı çok geniş ise klinik olarak retina gri renk alır ve

arkadaki koroidal paternin maskelenmesine sebep olur.<sup>128</sup>

#### 2.3.1.2. Geç Dönem (3.hafta)

1 -Retina dış yarısı korunmuştur.

2-Retina iç yarısı rölatif asellüler zon'a homojenize olmuştur. İç nükleer tabakada incelme meydana gelebilir.

Glial hücreler de diğer retina elemanlarla birlikte öldüğü için gliosis meydana gelmez. Retina iç yarısındaki farklı tabakalar arasındaki sınırlar belirsizleşir. Shakip ve Ashton glial hücrelerin retina iskemisine en dirençli hücreler olduğunu ve Yanoff ve Fine' in bulgularından farklı olarak deneysel



fokal iskemiden sonra 25. günde gliozis gördüklerini bildirmektedirler. Shakip ve Ashton histopatolojik çalışmalarında 7. günde basit şişmenin kaybolduğunu, makrofajların görülmeye başladığını, 2-4. haftalarda muhtemelen lokal proliferasyona bağlı makrofajların sayısında artışın dikkat çektiğini bildirmektedirler.<sup>114</sup>

### 2.3.2. Retinanın iskemiye direnci

Çeşitli hayvan modelleri ve türler arası varyasyonlar dikkate alınarak yapılan çalışmalarda iskemik tolerans süreleri bulunmuştur. (Çizelge 2.1.). Tabloda değerlere dayanılarak retina yaşamının beyinden önemli derecede daha uzun olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca retinanın dış tabakası iskemiye iç tabakasına göre daha dirençlidir. Dikkate alınması gereken önemli bir nokta da, miyogloblin ve hemoglobine benzer, sinire has bir solunum proteini olan nöroglobin retinada bol miktarda bulunmaktadır. Bu solunumu proteini kısmen retinal fotoreseptörlerde daha çok olup bu konsantrasyon ve beyindeki yüz katıdır<sup>111</sup>(Schmidt ve ark., 2003). Rat göz içi basıncının artırılması gibi retinal ve koroidal tıkanmayla oluşan halongiotik retinal iskemi modelinde, fotoreseptörler retinanın iç bölgesinden daha az yapısal ve fonksiyonel hasara uğrar. Bunun tersine, merangiotik tavşan retinasında tam tersi olur.<sup>88,89</sup> (Osborne ve Larsen, 1996; Osborne ve ark., 1996).

Vaskülerize olmuş retinada iskemiye direnç sürecinde gelişen olaylar net olmasa da fotoreseptörlerin nadir bir şekilde ortamdaki enerjiden anaerobik olarak faydalanmalarıyla bağlantılı olabileceği hipotez edilmektedir. Bu açıklama üç durumla açıklanabilir:

1. Lokal enerji substratlarının bulunması (vitreusta önemli miktarda glukoz bulunmaktadır ve retinada da türler arası değişimle beraber glikojen stoğu bulunmaktadır)<sup>59</sup> (Kuwabara ve Cogan, 1961)
2. Bu enerji substratları retina iskemisinde kullanılır<sup>126,54,125,51</sup>(Weiss, 1972; Kaskel ve ark., 1973; Wasilewa ve ark., 1976; Johnson, 1977).
3. İzole edilmiş retina, glukozun bol bulunduğu ortamda etkin bir şekilde glikoliz

yoluyla adenozin trifosfat (ATP) oluşturabilir.

Retinal iskemi modeli	Türler	Tolerans süresi	Referanslar
Hayvan sentrifügasyonu veya asfiksasyon	Rat	< 3 dakika	Turnbull (1948)
Merkezi retinal arter bölgesi	Rat	< 4-5 saat	Turnbull (1948)
Merkezi retinal arter oklüzyonu	Maymun	2-3.5 saat	Hamasaki ve Kroll (1968)
	Maymun	100 dakika	Hayreh ve Weingeist (1980)
Oftalmik damar ligature	Rat	< 30 dakika	Lafuente ve ark. (2002)
Optik sinir demetinin oklüzyonu	Rat	< 60 dakika	Faberowski ve ark. (1989)
Artmış intraoküler basınç (≤ sistolik kan basıncı)	Rat	15 dakika	Smith ve Baird (1952)
	Maymun	30-60 dakika	Hughes (1991)
	Maymun	< 30 dakika	Zhu ve ark. (2002)
	Tavşan	60-90 dakika	Popp (1955); Foulds ve Johnson (1974)
İnvitro iskemi	Kedi	< 90 dakika	Reinecke ve ark. (1962)
	Maymun	60-90 dakika	Fujino ve Hamasaki (1967)
	Tavşan	40 dakika	Shay ve Ames (1976)

Çizelge 2.1. Retinal tolerans, iskemide geri dönüşümsüz hasar için geçen süre. (Hayreh ve Weingeist (1980)'den uyarlanmıştır.)

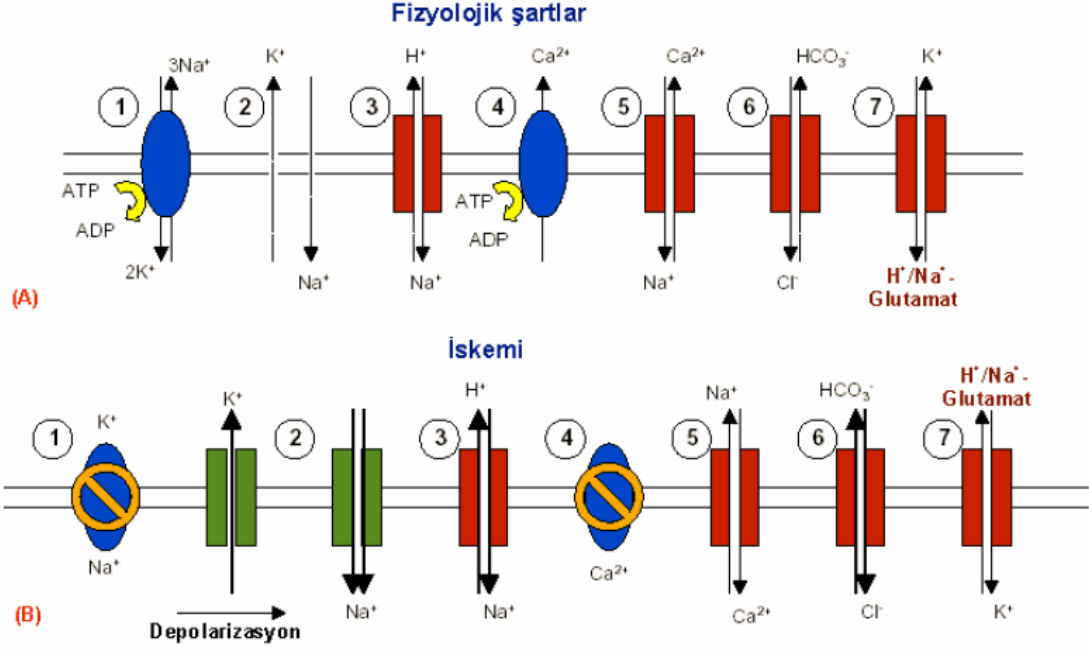
Buchi ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptığı bir çalışmada, göz içi basınç artışıyla ratlarda oluşturduğu iskemi modelinde, eğer % 0.9 NaCl yerine % 5 dekstrozu kullanılırsa retinadaki iskemi sırasındaki hasarın belirgin bir şekilde daha az olduğunu göstermiştir.<sup>87</sup>

(Osborne ve ark., 2004). Romano ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise, fototromboz kullanarak sıçanlarda oluşturduğu iskemi modelinde yalnızca intravitreal tuz enjekte edilmesinin, glukoz enjeksiyonuna göre daha erken iskemik hasar oluşturduğunu göstermişlerdir. Benzer bir şekilde, Romano ve arkadaşlarının 1998 yılında, izole edilmiş bir retina modeli kullanarak yaptığı başka bir çalışmada, glukozun belirgin bir şekilde eksitotoksik hasara neden olan N-methyl-D-aspartat (NMDA)'yı azalttığını göstermişlerdir<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

### 2.3.3. Retinal iskemideki nörolojik mekanizmalar

Memelilerdeki retinal iskemide geri dönüşümsüz morfolojik ve fonksiyonel değişimler meydana gelir. Bu değişimler; ATP stoklarının bitmesi, glukoz ve ATP'nin bulunmaması sebebiyle gerçekleşir, bu substratların azalması hemen ölüme neden

olmaz. Hücre ölümü, enerji kaybıyla meydana gelen karmaşık bir takım biyokimyasal olayların sonudur. Geçici iskemi periyodunu izleyen fonksiyonel zararlar ve doku hasarı, birbiriyle bağlantılı değişik etkileri yansıtır. Bu etkiler iyon hareketinde nörotransmitter ve metabolit konsantrasyonlarında çok ciddi değişiklikler oluşturur. (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. İskemideki iyon akışı<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

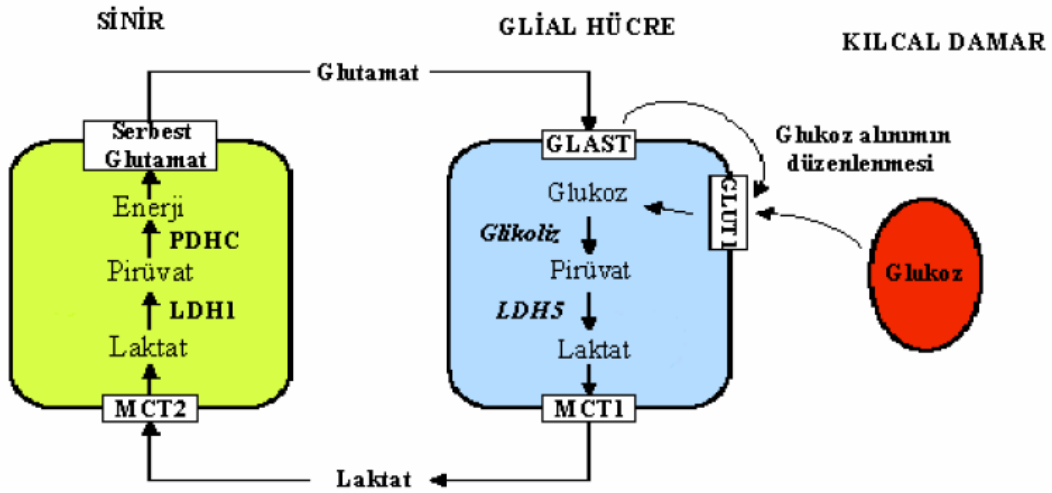
Reperfüzyon, iskemi sonrası geri dönüşümlü hasara uğrayıp kurtulan hücrelerin de zarar görmesine sebep olur. 1960'larda yapılan miyokardiyal çalışmalarda iskemik dokuya oksijen girişinin, oksijen eksikliğine direnç sırasında oluşan hasarı artırdığını göstermiştir<sup>50</sup> (Jennings ve ark., 1960).

Geçen on yıl içerisinde yapılan çalışmaların büyük bir kısmında, iskemik nöronal hasarın mekanizmasının aydınlatılmasına çalışılmıştır, ancak hala hasarın oluş süreci hakkında bir konsensus bulunmamaktadır. Bu tartışma konularından birisi, iskemi esnasında belirgin bir şekilde hücre dışı konsantrasyonu artan glutamat ve aspartat hakkındadır.<sup>33,39,30</sup> (Drejer ve ark., 1985; Hagberg ve ark., 1985; Davalos ve ark., 1997). Beyinde oluşturulan iskeminin erken fazında serbestleşen glutamatın, sadece oksijen

miktarının kritik olarak azaldığı bölgelerde değil, enerji metabolizmasının daha az bozulduğu bölgelerde de serbest bırakıldığı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte glutamat ve aspartatın, nöronal iskeminin patofizyolojisindeki rolleri hala tam olarak belirgin değildir. Ek olarak, nöronal bölge (gri madde) ve aksonlar (beyaz madde) iskemiden kesinlikle aynı şekilde etkilenmemektedir<sup>87</sup>(Osborne ve ark., 2004).

Retina hücrelerindeki besin/oksijen yetersizliğinin patolojik etkilerini sıralarsak, öncelikle fizyolojik şartlar altındaki bu dokunun metabolik fonksiyonunun akla getirilmesi gerekir. Retinadaki bütün hücreler glukoza yüksek derecede kullanılır, fakat metabolik aktiviteleri daha yüksek olan fotoreseptörler bu şekeri daha fazla kullanırlar<sup>16,40</sup> (Berman, 1991; Harding, 1997).

Yapılan bir çalışmada retinal Müller hücrelerinin öncelikle glukoza, bir monokarboksilik asit olan laktat ve pirüvata metabolize ettiği görüldü. Sinirler için laktat ve pirüvat, glikolize gerek duymadan, monokarboksilat taşıyıcıları tarafından oksidatif metabolizmanın devamını sağlar. (Şekil 2.6.)<sup>100,120,101</sup> (Poitry Yamate ve ark., 1995; Tsacopoulos ve ark., 1997, 1998; Poitry ve ark., 2000).



Şekil 2.6. Glutamat- Laktat mekanizması (Osborne ve ark., 2004).

Şekil 2.6. Glutamat- Laktat mekanizması<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

#### 2.3.4. İskemik tolerans

İskemik tolerans, dokunun iskemiye karşı daha ne kadar dayanıklı olduğunu gösteren bir süreçtir.

Tolerans, iskeminin hemen öncesinde oluşan bir ön uyarım olarak da tanımlanabilir. Bu olay ilk olarak kalpte tanımlanmış<sup>80</sup> (Murry ve ark., 1986) olup beyinde ve son zamanlarda retinada olduğu

görülmüştür. Retinanın iskemiye dayanıklılığı, iskeminin veya hipoksinin<sup>138</sup> (Zhu ve ark., 2002) kısa bir periyodunda in vivo olarak gösterilmiştir<sup>35,109,135</sup> (Ettaiche ve ark., 2001;

Sakamoto ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2002). Öldürücü olmayan düzeydeki

ve kısa süreli hipoksi in vitro şartlarda, retinal ganglion hücre ölümüne neden olan anoksiye karşı kısmen koruyucu rol oynar<sup>22</sup> (Caprioli ve ark., 1996). Bu sinirsel koruyucu mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamıştır<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004).

Roth ve arkadaşları 1998 yılında, bu sinirsel koruyucu mekanizmanın, bilinen

herhangi bir koruyucudan daha iyi koruyucu olduğunu bildirmiştir<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004). Daha

sonraki araştırmalarla, retinadaki ön uyarımın, merkezi sinir sisteminin diğer kısımlarındakinden farklı olmayan bir mekanizma ile meydana geldiğine dair veriler bildirilmiştir.<sup>63,64,35</sup> (Li ve Roth, 1999; Li ve ark., 2000; Ettaiche ve ark., 2001).

### 2.3.5. Retinal iskemideki seçici hücre ölümü (Apoptozis)

Retinada oluşan iskeminin bu dokudaki hücrelerin azalmasına neden

olduğu bilinmektedir<sup>87</sup> (Osborne ve ark., 2004). 1993 yılında, tavşan retinasında basınçla

oluşturulan iskemik hasarın retinanın her bölgesinde aynı olmayan etkiler gösterdiği bildirilmiştir<sup>70</sup>

(Marmor ve Dallal, 1993). Bu etki, oküler iç basıncın düzensiz etkisi ile değil daha çok retinanın

bölgesel olarak iskemiye farklı duyarlılık göstermesinin bir sonucudur. Bu farklılık, retinadaki lokal

hücrel metabolizmaların aynı olmayışından veya lokal hücrel iyileşme potansiyelinden

meydana gelir, fakat daha çok lokal damar ağı yapısındaki değişimden kaynaklanmaktadır. Tavşan

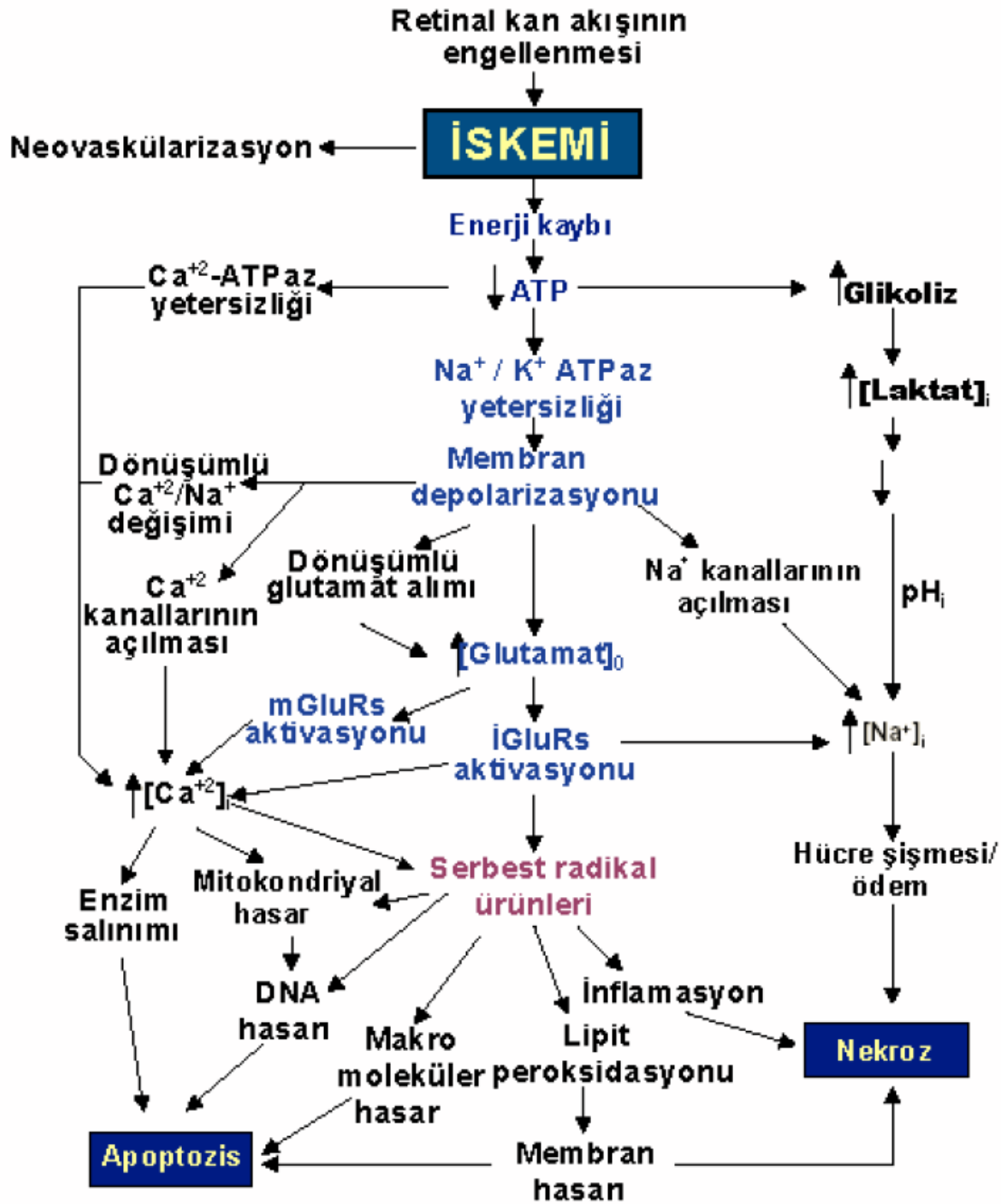
retinasının tek vasküler sisteme sahip olması<sup>103</sup> (Prince, 1964), basınçla oluşturulan düzensiz hasara

daha açık olmasına neden olur. Bu şartlar altında duyarlılık, kılcal damarlanmayla doğru orantılıdır.

Kılcal damarlar bakımından daha zengin olan retinal doku, daha yüksek oranda O<sub>2</sub>'ye ihtiyaç duyar ve

retinal kan akımının azalmasına karşı daha dayanıksızdır. İnce olan tavşan retinası, artan oküler iç

basınç ve bu yapısal sınırlamanın oluşturduğu hasardaki bölgesel farklılık nedeniyle, mekanik hasara daha duyarlıdır<sup>87</sup>(Osborne ve ark., 2004).



Şekil 2.7. İskemideki biyokimyasal süreç

İskemi-reperfüzyonu izleyen hücre ölümünde apoptozis önemli rol oynar. Hücrelerin yaşayabilmesi

için, reperfüzyonla glukoz ve oksijen stoklarının yenilenmesi ile sağlanır. Bununla birlikte, reperfüzyon aynı zamanda, apoptotik sürecin hızlanması ve apoptozisin gerçekleşmesi için gerekli enerjiyi de yeniler.(Şekil 2.7)<sup>34</sup>(Eefting ve ark., 2004) .

Sıçanlarda, iskeminin apoptoza ve nekroza neden olduğu bildirilmiştir. İki saatlik bir iskemi sürecindeki apoptoz ve nekroz oranları ölçülmüş ve apoptoz oranının nekroza oranla çok fazla olduğu gösterilmiştir. Hücre ölümünün %14'ü nekroz olmasına karşılık %86'sı apoptoz olmaktadır.

Apoptoz olarak başlayan hücre ölümünün nekroza dönüştüğü de görülmüştür<sup>34</sup>(Eefting ve ark., 2004).

Diğer çalışmalarda, apoptozun 45 dakikalık iskemiden sonra başladığı gösterilmiştir. İskemide apoptoz sonrası gelişen, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, sitokrom C'nin serbest bırakılmasına ve bunun da kaspaz aktivasyonunu başlattığını gösteren birçok delil elde edilmiştir<sup>17,34</sup>(Borutaite ve ark.,2003; Eefting ve ark.,2004).

#### 2.4. VEGF

VEGF ilk olarak 1983'de vasküler geçirgenliği artıran tümör kaynaklı bir molekül olarak bulunmuştur.

VEGF, PDGF ailesinin dahil olup patolojik anjiyogenez ve embriyonik vaskülogenezde etkilidir.

VEGF' nin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, viral VEGF homoloğu VEGF-E olmak üzere beş ayrı VEGF proteini vücutta mevcuttur.<sup>37</sup> Ayrıca plasental büyüme faktörü (PIGF) de VEGF ailesine dahil olup her birinin VEGF reseptörlerine bağlanma eğilimleri farklıdır. VEGF düzeyleri hipoksida artmakta ve düşük oksijen basıncında VEGF'ye bağlı anjiyogenik reaksiyonlar meydana gelmektedir.<sup>5</sup> VEGF-A neoplastik, enflamatuar ve vasküler göz ve diğer organ hastalıklarında patolojik anjiyogenezin oluşumunda temel faktördür. VEGF-A akciğer, meme, mesane, böbrek kanserleri ve gliyoblastoma multiforme gibi birçok tümörde yüksek miktarlarda salgılanmaktadır. Aynı olay iskemi sonrası kollateral kardiyak damar oluşumu ve romatoid artrit ve psöriasis gibi enflamatuar hastalıklarda da oluşur. VEGF-C ve VEGF-D proteinlerinin kanser anjiyogenezi ve lenfanjiyogenezindeki yaptıkları çeşitli araştırmalara konu

olmuştur.<sup>42</sup> PIGF ise artmış vasküler geçirgenlik, proliferasyon, kemotaksis ve anjiyogenezi uyarmakta ve birçok patolojik kaskatta VEGF-A ile beraber rol almaktadır.<sup>138</sup>

VEGF-A geninin alternatif mRNA bölünmesi ile biyolojik olarak aktif dört majör insan izoformu meydana gelir. Bu izoformlarda 121, 165, 189 ve 208 amino asit bulunmaktadır. VEGF 165 insan gözündeki en fazla olan izoformu olup heparin bağlayan komodimerik 45 kilo dalton ağırlığında bir glikoproteindir. Bu izoform salınabildiği gibi bir kısmı ise hücre yüzeyi ve hücre dışı matrikse bağlı bulunur. VEGF 189 ve VEGF 208 de güçlü heparin bağlayıcı özellikleri olup hücre dışı matrikste bağlı bulunur. VEGF 121 ise salgılanmakta ve heparine bağlanmamaktadır. VEGF 165' in patolojik neovaskülarizasyona sebep olduğu VEGF 121' in ise normal retinal vasküler fonksiyon için görev aldığı tahmin edilmektedir.<sup>96,47</sup> VEGF endotel hücrelerini selektif olarak iki farklı reseptörü aracılığıyla uyarır. VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörleri ligandın bağlanması ile sinyal iletim kaskadını başlatır. VEGFR-2' nin anjiyogenez sinyalini oluşturan ana reseptör olduğu düşünülmektedir.

Anjiyogenezi indüklemesi ile beraber VEGF-A vasküler endotel hücrelerinde porların oluşumuna yol açarak vasküler geçirgenliği de arttırmaktadır. Bu etkiyi endotel hücreleri arasındaki bağlantıların düzenini değiştirirerek yapar. Neovasküler oküler hastalıklarda yeni oluşmuş ve geçirgen vasküler yapı sebepli ödem retina anatomisini değiştirmekte ve görmeyi ciddi oranda azaltmaktadır. Buna ek olarak VEGF-A düzeyleri pro-enflamatuar sitokinler (TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL- 1 alfa, IL- 1 beta ve onkostatin M) uyarılarıyla yükselmekte ve lokal anjiyogenez ve enflamasyonun hızlanması ve güçlenmesiyle sonuçlanmaktadır. VEGF' nin özellikleri Tablo 1' de belirtilmiştir. VEGF'nin anjiyogenezi ve hücre mitozunu güçlü bir şekilde uyararak apoptozisi önler ve böylece endotel hücre sağ kalımını arttırır. Buna ek olarak VEGF endotel hücre prekürsörleri için bir kemoatraktan olup, kemik iliğinden hareketlenmelerini ve farklılaşmalarını uyarmaktadır. Kemik iliği kaynaklı endotel hücre prekürsörlerinin adenoviral vektör enjeksiyonu ile ekspres e olan VEGF 165' e cevap olarak bir araya gelmesinin tümör anjiyogenezi ve KNV oluşumu için yeterli ve gerekli olduğu fare modellerinde gösterilmiştir. VEGF vasküler geçirgenliğin güçlü bir uyarıcısı olduğu için KNV gelişiminde oldukça



önemlidir. VEGF'e cevap olarak mikrovasküler endoteldeki fenestrasyonların oluşumuyla vasküler geçirgenlik artar.<sup>72,132,105,77,46,6,36</sup> Retinal damarsal geçirgenlik artışının araştırıldığı bir hayvan modelinde intravitreal VEGF enjeksiyonunu sonrası VEGF'e yanıt olarak artan hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) yoluyla lökositlerin vasküler geçirgenliği arttırdığı ve kapiller nonperfüzyona sebep olduğu bildirilmiştir<sup>76</sup>. Lökositler kendileri de VEGF salgılayarak bu faktörün konsantrasyonunu arttırabilirler. Buna ilaveten VEGF' nin özellikle 164 izoformunun pro-enflamatuar aktivitesi patolojik oküler neovaskülarizasyonun artmasına yol açmaktadır.<sup>124</sup> VEGF' nin nöron ve çoğalan Schwann hücreleri yaşamını uzatma yeteneğiyle nöroprotektif özellikleri mevcuttur. Retinal iskemi ve reperfüzyon modelinde intravitreal olarak uygulanan VEGF 164 ve 120 apoptotik retina hücrelerinde doza bağımlı protektif etkisi izlenmiştir. Bu koruyucu etki tüm VEGF izoformlarının blokajı ile inhibe olurken, yalnız VEGF 164 bloke edildiğinde ise koruma devam etmektedir. VEGF 164 dışındaki VEGF izoformlarının nöroproteksiyonda önemli oldukları için tüm izoformları bloke eden oküler terapötik ilaçların kullanımından kaçınılmalıdır.<sup>117</sup> VEGF indirek mekanizmalar yoluyla da anjiyogenezin başlamasına yol açar. Endotel hücrelerince salgılanan hücre dışı matriksin yıkılmasını sağlayan doku metalloproteinazların düzeyi VEGF tarafından arttırılarak yeni damarların dokuyu invazyonuna izin verilir. Buna paralel olarak endotel hücreleri tarafından üretilen doku metalloproteinaz inhibitörlerinin (TIMPs) VEGF salınımı sonrası azaldığı görülmekte, bu şekilde anjiyogenik süreç hızlanmaktadır<sup>62</sup>. Son olarak VEGF nitrik oksit ekspresyonunun bir düzenleyicisi olan endotelial nitrik oksit sentetaz enziminin ki bu enzim endotel hücre proliferasyonunun önemli bir mediyatörüdür, üretimini indüklemektedir.

Tablo 2. VEGF'nin özellikleri .

Anjiyogenezin uyarılması
Vasküler geçirgenlik ve fenestrasyonda artma
Pro-enflamatuar etki
Nöron koruyucu etki Nörodejeneratif çalışmalarda hipoksi, oksidatif stres ve serum deprivasyonu durumlarında nöron koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır In vitro serebral iskemide hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir In vitro olarak hipokampal, kortikal, serebellar granül, dopaminerjik, otonomik ve duyuşal nöronları koruduğı gösterilmiştir.
Damar sağ kalımını artırıcı etki

#### 2.4.1. VEGF ve Neovasküler Oküler Hastalıklar

Preklinik ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler VEGF-A' nın neovasküler göz hastalıkları patogeneğinde çok önemli role sahip olduğunu göstermiştir. Kornea, iris, retina ve koroid neovaskülarizasyon modellerinde yapılan detaylı çalışmalar VEGF' nin neovaskülarizasyon ve artmış vasküler permeabilite ile karakterize olan göz hastalıklarının oluşmasındaki rolü belirtmektedir. Bu çalışmalar VEGF düzeylerinin oküler vaskülarizasyonda yükseldiğini, deneysel olarak artırılan VEGF miktarının ise oküler neovaskülarizasyon meydana getirdiğini ve VEGF etkisinin inhibisyonunun oküler neovaskülarizasyonu durduğunu yada azalttığını göstermiştir. Ayrıca bu araştırmalar sonucunda KNV gelişimini etkileyen VEGF ve diğere molekülerlerin rol aldığı proseslerin de incelenmesine sebep olmuştur. Klinik çalışmalarda yaş tip YBMD olan hastaların gözlerinden çıkarılmış KNV membranlarında artmış VEGF-A ekspresyonu bulunmuş olup, aynı gözlerin retina pigment epiteli ve subfoveal fibroblastlarında benzer duruma rastlanmıştır. VEGF-A, subretinal neovaskülarizasyonu, diabetik retinopati, santral retinal ven tıkanıklığı, retinal ven dal tıkanıklığı, iris neovaskülarizasyonu, retina dekolmanı ve prematürite retinopatisi olan gözlerde de yüksek miktarlarda bulunmuştur. VEGF düzeylerinin proliferatif diabetik retinopati ve iskemik santral retinal ven tıkanıklığı olan hastaların oküler sıvılarında yüksek miktarlarda bulunduğı, ancak oküler neovaskülarizasyonu olmayan kişilerde düzeyinin artmadığı görülmektedir.<sup>58,60,127,3,4,85,75</sup> Retina venlerinin laser yardımıyla

oklüzyonu sonrası oluşan iris neovaskülarizasyon modelinde VEGF düzeylerinin neovaskülarizasyon arttıkça aynı oranla yükseldiği gösterilmiştir.<sup>32</sup> Retina pigment epitelinin VEGF düzeylerini kontrol ettiği düşünülmektedir. İskemik retinal bozukluklarda oluşan hipoksi sonrası kültüre edilmiş retina pigment epiteli tarafından VEGF sekresyonunun önemli miktarda arttığı bildirilmiştir<sup>86</sup>.

#### 2.4.1.1. VEGF ve Korneal Anjiyogenez

Korneada VEGF epitel, stroma ve endotel tarafından salgılanır. Limbal damarların endotelinden ve yeni oluşan stromal damarlardan ve zayıf olarak keratositler tarafından da eksprese edilmektedir. Enflame olan bir korneanın üzerindeki skar dokusundaki makrofaj infiltratlarına komşu epitel hücreleri ve vasküler endotel hücrelerinde VEGF salınımı yüksek miktarda olmaktadır. VEGF-1 ve VEGF-2 reseptörlerinin ise enflame kornea stroması üzerinde oluşan yeni damarların endotel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir.<sup>97</sup>

#### 2.4.1.2. VEGF ve Retinal Anjiyogenez

Retinadaki birçok hücre tipi VEGF salgılar. Retina pigment epiteli, perisitler, endotel hücreleri, glial hücreler, Müller hücreleri, ganglion hücreleri bu hücreler arasında sayılabilir. Bunlar arasında Müller hücreleri ve retina pigment epitelinin retinadaki VEGF miktarını belirleyen ana kaynaklar olduğu tahmin edilmektedir. VEGF' nin primer hedef ise endotel hücreleridir. Normal yetişkin retinasında VEGF ganglion hücre tabakası, iç nükleer tabaka ve retina pigment epiteli tarafından çok düşük miktarlarda salgılanır. Oküler sıvılardaki VEGF düzeyleri de eser miktardadır. Son yıllarda VEGF' nin retinal neovaskülarizasyon gelişimindeki rolü diabetik retinopati, santral retinal ve retina ven dal tıkanıklıkları ve prematürite retinopatisi gibi hastalıkları içeren birçok farklı çalışmada bulunmaya çalışılmıştır. Diabetik retinopatideki görme kaybının sebebi retinal vasküler yüksek geçirgenlik sonucu oluşan diabetik makula ödemi ve retina neovaskülarizasyonlarıdır. Güçlü bir anjiyogenik uyarıcı ve

vasküler geçirgenlik faktörü olan VEGF bu durumların ana sorumlusudur. Birçok çalışmada diabetik retinopatili hastaların vitreus ve retinasında VEGF miktarının arttığı ve bu yükselmenin diabetik retinopati şiddeti ile doğru oranda olduğu bildirilmiştir.<sup>38,49</sup> Uygulanan laser fotokoagülasyon sonrası VEGF düzeylerinin düştüğü saptanmış olup, bu durum retina neovaskülarizasyonu gelişiminin ya da gerilemesinin VEGF düzeyleri ile çok yakın ilişkili olduğu tezini güçlendirmektedir. Aynı şekilde diabetik maküla ödeminin derecesi arttıkça aköz hümeördeki VEGF düzeylerinde de benzer şekilde yükseldiği gösterilmiştir.<sup>65</sup> Günümüzde retina neovaskülarizasyonu ile seyreden hastalıkların başında gelen diabetik retinopati ve retina ven tıkanıklıklarında anti VEGF tedavisi endikasyon dışı olarak uygulanmakta ve klinik kullanımda olan üç ilaç (bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib) ile değişik oranlarda da olsa başarılı sonuçlar bildirilmektedir.<sup>8</sup> Aynı zamanda prematüre retinopatisi, Coats hastalığı, familial eksüdatif vitreoretinopati, inkontinentia pigmenti gibi pediatrik vitreoretinal hastalıklarda kullanımının yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>65</sup>

#### 2.4.1.3. VEGF ve Koroidal Anjiyogenez

Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olan hastalardan cerrahi olarak çıkarılan subfoveal fibrovasküler membranlarda ve bu membranları çevreleyen doku ve retina pigment epiteli hücrelerinde VEGF ve VEGF reseptör miktarları yüksek olarak bulunmuştur. Deneysel çalışmalarda VEGF'in KNV gelişimi için ana faktör olduğu gösterilmiş olup KNV patogenezindeki bu önemli rolü bu hastalıkta anti-VEGF tedavilerinin artmasına yol açmıştır. Genetik vaka kontrol çalışmaları VEGF geninin bireyin YBMD hastalığına yakalanma oranını arttırabileceğini göstermiştir. Yaş tip YBMD ile ilişkili spesifik VEGF-A haplotipleri bulunmuştur. Patolojik oküler neovaskülarizasyon ile artmış VEGF-A ekspresyonu arasındaki kuvvetli ilişki koroid neovaskülarizasyonu ile ilişkili hastalıklarda anti- VEGF tedavilerin denenmesini gündeme getirmiş ve bu tedaviler ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Günümüzde

yaygın olarak kullanılan üç anti-VEGF ajan özellikle YBMD tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Bu ajanlardan ikisi olan pegaptanib ve ranibizumab bu hastalığın tedavisinde FDA onaylı kullanılmaktadır. Diğer bir anti-VEGF ajan olan bevacizumab ise endikasyon dışı olarak klinik kullanımda olup, etkinliği aynı olduğu gibi maliyetinin de az olması sebebiyle birçok hekim tarafından tercih edilmektedir.<sup>52</sup>

## 2.5.Bevacizumab

Judah Folkman'ın 1971 yılında anjiogenezin inhibisyonu ile ilgili hipotezinden sonra 1983 yılında Mass ve arkadaşlarının çalışmasında tümör dokularının vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor-VEGF) salgıladığı bildirilmiştir. 1989 yılında birtakım deneysel çalışmalar için laboratuvarında VEGF üretilmesi başlamıştır. Antianjiogenik ajanların kanser hastalarındaki tedavi edici etkisi ile ilgili ilk çalışmalar ise 1990'lı yıllarda başlamıştır. Bu çalışmalar VEGF'ye karşı monoklonal antikorların (mAB) kullanımının in-vivo olarak tümör büyümesini durdurduğunu ya da yavaşlattığını göstermiş, bu da bevacizumabın geliştirilmesine sebep olmuştur. Bevacizumabla ilişkili faz I çalışmalar 1997 yılında olurken, Şubat 2004'te FDA Genentech sponsorluğunda yürütülen faz III çalışma sonuçları sonrası metastatik kolorektal kanserli hastalarda standart kemoterapiye bevacizumabın da eklenmesine izin vermiş ve ayda iki kez infüzyon şeklinde, 5FU ile kombine kullanımının ilk tedavi seçeneği olmasını onaylanmıştır. Faz III klinik çalışmalarda bevacizumabın meme, akciğer ve böbrek kanserlerinde de etkisine de bakılmıştır. Hiçbir klinik çalışmada, antikora karşı immünojenik cevap oluşmamıştır.<sup>44</sup> Bevacizumab, VEGF'ne spesifik olarak bağlanan ve VEGF-A'nın tüm izoformlarını bağlayan rekombinant insan monoklonal antikorudur. Klinik olarak kullanıma giren ilk antianjiogenik moleküldür. Bevacizumab fare epitoplarının insanlara uygulanması sonrası

fareden VEGF'ye karşı meydana gelmiş bir molekül olup insan bağışıklık sistemine uygun hale getirilmiştir. Aminoasit diziliminin %93'ü insandan ve % 7'si fareden köken almaktadır. Üretildiği ajanla aynı biyokimyasal ve farmakolojik özellikleri aynı olmasına rağmen daha az immün cevap meydana getirir ve daha uzun ömürlüdür. İlacın farmakolojik ve farmokodinamik özelliklerinin tespit edilmesi ve ilacın oluşturulması aşamasında yapılan çalışmalar bevacizumab ve farelerde üretilen eşdeğeri olan muMAbA.4.6.1 (murine anti-human VEGF monoklonal antibody) üzerinden yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarda bevacizumab ve muMAbA.4.6.1'in insan VEGF'sinin bütün formlarını çalışmalardaki sırasıyla 1.1 ve 0.8 nmol/L (Kd) değerinde inhibe ettiği bildirilmiştir. İn vitro koşullarda VEGF ile uyarılmış endotel hücre proliferasyonu bevacizumab ve muMAbA.4.6.1 tarafından  $50 \pm 5$  ve  $48 \pm 8$  ng/ml değerinde inhibe edilmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda muMAbA.4.6.1, farelere aktarılmış rhabdomyosarkom ksenograft modelinde de araştırılmıştır. muMAbA.4.6.1, 2.5 mg/kg üzerindeki dozlarda neovaskülarizasyonu tamamen inhibe etmiş, damar geçirgenliğini, damar çapını, tümörlü dokuda damar yoğunluğunu ve kıvrımlanmasının düzeyini azaltmıştır. Hücreler arası sıvı basıncını düşürdüğü de bildirilmiştir. Bevacizumab ve muMAbA.4.6.1 insan hücrelerinde, dokularında ve insan VEGF formlarında karşılaştırıldığında farmakolojik olarak birbirine benzer bulunmuştur. Bu ajanlarla yapılan tek ilaç tedavisi ile tümör lokalizasyonundan bağımsız olarak yaklaşık yirmi değişik insan tümör hücresinin büyümesinin yavaşladığını ve tümör metastazlarının küçüldüğü ya da tamamen yok olduğu gösterilmiştir. Maksimum inhibisyon dozu haftada iki kez 1 - 2 mg/kg'dır. Bevacizumab, VEGF'nin endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek endotel hücrelerinin proliferasyonuna sebep olan reseptör dimerizasyonunu ve buna bağlı olarak transfosforilasyon yoluyla aktivasyonunu ve hücre içi aktivasyonu durdurmaktadır. Üzerinde iki adet antijen bağlanma alanı (Fab ve Fe – iki adet VEGF bölgesi) bulunur. Molekül ağırlığı 140 kDa'dur. Bevacizumabın molekül ağırlığı büyük olduğu için antikorun antijen bağlayan kısmının pepsin ayırma yöntemiyle parçalanmasıyla elde edilen monoklonal antikor parçasının intravitreal uygulanmasının daha etkili olacağı düşünülmüştür. Bu hipotezin ışığında insan VEGF'sine-karşı fareden elde edilen monoklonal antikorun antijen bağlayan parçasının ayrıştırılmasıyla ranibizumab

(Lucentis®) elde edilmiştir. Bevacizumab ile ranibizumab akraba olsalar da farklılıkları çoktur. Ranibizumabın molekül ağırlığı 48 kDa'dur. Bağlanma yeri monoklonal antikor prekürsörü olduğu için bevacizumaba göre çok küçüktür. İçerdiği aminoasit modifikasyonlarından dolayı, bevacizumabın Fab kısmı ile karşılaştırıldığında VEGF'ye affinitesi daha yüksektir(140 kat). Mordenti ve arkadaşları 70kD'den daha büyük molekül ağırlıklı moleküllerin (tam uzunluktaki antikorların) iç limitan membranı (İLM) geçip subretinal aralığa ulaşamadıklarını bildirmişlerdir.<sup>78</sup> Bevacizumabın molekül ağırlığı büyük olduğu için, vitreus içine verildiğinde retinaya veya retina altı boşluğa geçişi zor olmaktadır. Ancak yapılan deneysel çalışmalarda intravitreal enjeksiyon sonrası bevacizumabın da retinayı geçebildiği bildirilmiştir. Ayrıca zaten bevacizumabın klinik kullanımı sonrası hemen cevap alınması bu ilacın bir şekilde İLM'yi geçtiği hipotezini güçlendirmektedir. Bunun sebepleri düşünüldüğünde İLM geçirgenliğinin yaşla beraber artması, İLM penetrasyon çalışmalarında kullanılan 50 kat daha fazla bevacizumab kullanılması ve maküladaki İLM'nin perifer İLM'ye göre daha geçirgen olması akla gelmektedir. Ek olarak 76 kDa'dan daha büyük moleküllere karşı difüzyon bariyeri görevi gören iç pleksiform tabakanın yokluğu da, bevacizumabın foveadan geçişinin artmasına sebep olmaktadır. Bazı yazarlara göre ise sadece vitreustaki VEGF'nin önlenmesinin bile hastalığın tedavisinde yeterli olabileceğini belirtilmektedir.<sup>43</sup>

Bevacizumabın göz dokularına dağılımı ve farmakokinetiği ile ilgili çalışmalar Rhesus maymunlarında bevacizumab ve bevacizumabın Fab fragmanı ile yapılmıştır. Fab fragmanın vitreusta yarı ömrü 3.2 gün, bevacizumabın tamamı kullanıldığında ise yarı ömrü 5.6 gün olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada Fab fragmanının subretinal alana 1. haftada ulaşabilirken ve ortalama 1 hafta o bölgede bulunabildiği gösterilmiştir.<sup>78</sup> Yarılanma ömrünün uzun olduğu için bevacizumabın daha düşük dozlarda da başarılı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Molekül ağırlığının büyük olmasına rağmen antikorun tamamının intravitreal olarak kullandığı zaman sistemik dolaşımında çok küçük miktarlarda saptanabilirken, sadece Fab kısmı uygulandığında sistemik dolaşıma geçmediği bildirilmiştir. Göz içine verilen antikorun yıkılamaması sebebiyle antikorun biyolojik aktivitesi göz içindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Yapılan başka bir çalışmada tek bir bevacizumab enjeksiyonu ile

ortalama 27-38 gün süresince biyolojik bir etki elde edilebileceği gösterilmiştir. Tüm bu özellikleri bir araya getirildiğinde klinik uygulamalarda bevacizumabın 1.25 mg dozunun yeterli olabileceği hesaplanmış ve bu da birçok klinik çalışmada desteklenmiştir. Tekrar enjeksiyonun süresinin ise ilacın biyolojik aktivitesi göz önüne alınarak 4-5 hafta olduğu bildirilmiştir.<sup>69</sup>

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. DENEKLER

Bu çalışmada, 18 adet, Wistar cinsi, albino, 4- 6 aylık, yaklaşık 200-300 gr. ağırlığındaki sıçanlar kullanıldı. Denekler, standart kafeslerde 7'li gruplar halinde, standart yem ve su verilerek, ısı (21 ± 2 °C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00 – 18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

Denekler akut retinal iskemi uygulanan (12 adet denek) ve kontrol grubu (K) denekleri (6 adet denek) olarak önce iki gruba ayrıldı.

Altışar denekten oluşan üç grup;

1. Gözlerine sadece sham uygulanan (sadece ön kamaraya maintainer girişi yapıp, İ&R modeli oluşturulmayan), herhangi bir tedavi verilmeyen ve 2. gün sakrifiye edilen denekler (Kontrol grubu- K; 6 denek)
2. İskemi Reperfüzyon yapılan ve 2 gün sonra sakrifiye edilen denekler (retinal iskemi ve reperfüzyon grubu- İ & R; 6 denek)



3. İskemi Reperfüzyon uygulanmadan 2 gün önce intraokuler 1,25 mg (0,05ml) Bevicizumab infüzyonu tedavisi yapılan ve İ & R uygulandıktan 2 gün sonra sakrifiye edilen denekler (I&R + Bev grubu ; 6 denek)

İskemi - reperfüzyon oluşturulduktan 2 gün sonra kardiyak gluteraldehit perfüzyonu yöntemi <sup>15,74</sup> ile fikse edilip sakrifiye deneklerin sağ göz küreleri, enükleasyon işlemi uygulanarak, histolojik incelemeye alındı.

### 3.2. AKUT RETİNAL İSKEMİ MODELİ

Sıçanlara, ketamine (100 mg/kg) ve klorpromazine (25 mg/kg) karışımı anestezi madde intraperitoneal enjeksiyonla verildi. Gözlere de %0,5 proparacaine göz damlası damlatılarak topikal anestezi sağlandı. Gözler %0.5 tropikamid ve %2.5luk fenilefrin hidroklorid ile dilate edildi. Genel anestezi altında ön kamaraya 30 gauge kanülle girilerek tubing setle ön kamaraya saline solüsyonu verildi. Kanülle saline verilen gözün basıncı en az 90 mmHg olmasını sağlayacak şekilde serum şişesi denekten 100 cm yükseklikte 45 dakika bekletildi. Retinal iskemi, direkt oftalmoskopa retinanın beyazlamasının gözlemlenmesi ile doğrulandı. Reperfüzyon ise kanül çekildikten sonra retinal refleksine kendine özgü rengine dönmeler gözlemlenmesi ile doğrulandı <sup>110</sup>. Deneklerin 48 saat reperfüzyonuna izin verildi.

### 3.3. SAKRİFİKASYON VE KARDİAK PERFÜZYON

Perfüzyon ile tespitinin başlamasından 15 dakika önce, sıçanlara anestezi öncesi 150U/kg intraperitoneal heparin verilerek 10 dk. süreyle antikoagülan etkinin oluşması beklendi. Daha sonra intraperitoneal uygulanan 2 mg/kg Sodyum pentotal ile anestezi gerçekleştirildi. Anestezinin

gerçekleştirdiği doğrulandıktan sonra sıçanların ekstremiteleri ve kuyrukları kesim panelleri üzerine geniş yapışkan bantlarla tespit edildi. V kesi ile sternum kaldırılarak toraks boşluğu açıldı. Kalbin tepesinden 18 gauge kelebek iğne ile girilerek sol ventriküle dikkatli bir biçimde yerleştirildi. Daha sonra sağ atriyum kesildi ve üç yollu kanülden önce 10 dk süreyle %0,9 NaCl verildi. Perfüzyon aparatı bir litrelik iki adet serum şişesi ve bunlara bağlı üç yollu i.v. kanülden oluşmaktaydı. (Caire klemppli Venoset; 150 cm., 15 damla/ml). İntravenöz serum şişeleri sıçanların perfüze edileceği tezgâhın yaklaşık 120–125 cm yukarısına asıldı. Şişelerden birisinde %0,9 Na klorür diğesinde ise kakodilat tamponu içinde %2,5'lik glutaraldehit konuldu (0.05 M Na kakodilat; pH = 7,3–7,4) glutaraldehide (EM teknik derecesinde; pH 7.4). Üçlü vananın çıkışına, distal ucunda 18-gauge iğne bulunan, iç çapı 3.0 mm ve boyu 15–30 cm olan propilen bir boru bağlandı. Sağ atriyumdan akan sıvının berraklaştığı görüldüğünde kanülün vanası diğeri girişe çevrilerek fosfat tamponu içinde %2,5 glutaraldehid çözeltisi 35 damla/15 sn olacak şekilde verilmek suretiyle 25 dk. süreyle perfüzyon tespiti gerçekleştirildi. Her denek için yaklaşık 300 ml tespit sıvısı kullanıldı.

#### 3.4. GANGLİYON HÜCRE SAYIMI VE STEREOLOJİK DEĞERLENDİRME

Enükleasyonun ardından gözler bir gece fiksatifte bekletildikten sonra rutin doku takip işlemine alındı. Parafin aşamasında gözlerin korneası kaldırılarak lensleri çıkarıldı. Göz vitreus boşluğuna parafin verildi ve takip sürecine devam edildi. Dokular optik sinir kasetin alt yüzüne bakacak şekilde gömüldü. Retinanın ön ve arka bölümlerini kapsayacak şekilde 20 µm kalınlığında HM325 Microm marka rotari mikrotomla tüm bloktan seri kesitler alındı. Kesitler 1/10 oranında örneklendi. Örneklenen kesitlere rutin hematoksilin eozin boyama yapıldı. Sayımlar için; CCD Dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, USA), ATI FireGL görüntü yakalama kartı (Advance Micro Device, Camberly, UK), bilgisayar kontrollü Ludl X-Y-Z motorize preparat tablası (Bioprecision,

Howtrone, NY, USA), mikrokator (Heidenhein, Traunreut, Germany), Leica 4000B ışık mikroskobu (Leica, Wetzlar, Germany) ve Sterio Investigator 7,5 programı (Microbrightfield, Williston, VT, USA) yüklenmiş olan masaüstü bilgisayardan oluşan stereolojik çalışma istasyonu kullanıldı.

Toplam ganglion hücre sayısı optik parçalama yöntemi kullanılarak tahmin edildi. Toplam ganglion hücre sayısını tarafsız hesaplanmasını sağlayabilmek için sistematik rastgele örnekleme yöntemi kullanıldı (Gundersen ve Jensen, 1987). Örnekleme aralığı 1/10 olarak alındı. Adım aralığı alanı 200  $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ , sayım çerçevesi alanı 30  $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$  kullanıldı (Yang 2002). Takip sonrası ölçülen ortalama kesit kalınlığı 19,85  $\mu\text{m}$ , üstten ve altan alınan güvenlik sınırları 2  $\mu\text{m}$ , disektör yüksekliği 16  $\mu\text{m}$  olarak saptandı. Kesitler Leica Apo Plan (NA=1.40) objektif aracılığı ile tarafsız sayım kuralları uygulanarak sayıldı.

### 3.5. TUNEL METODU İLE APOPTOZİS ANALİZİ

Stereolojik analize katılmayan 20  $\mu\text{m}$  kalınlıktaki kesitler alınırken ön çalışma sonrası tespit edilen ortanca kesite ulaşıncaya bunların ardıllarından alınan 5  $\mu\text{m}$  lik kesitler TUNEL immunohistokimyasal boyama işlemine alındı. Boyama işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı.

Kesitler rutin deparafinizasyon ve dehidratasyon işleminden sonra Fosfat Tampon Tuzu (PBS) ile yıkandı. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end Labeling (TUNEL) karışımının etkili olabilmesi için kesitlere % 0.1'lik (w/v) (eşit ağırlıkta ve eşit hacimde) Triton X-100 (Acros Organics; Geel, Belgium) deterjanı uygulandı böylece hücre zarı permeabilize edildi. Triton X-100 % 0.1 (w/v) sodyum sitrat (Merck; Darmstadt, Germany) içinde hazırlandı. Uygulama buz üzerinde 2 dakika bekletilerek yapıldı. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında PBS ile iki kere yıkandı.

Antijen kurtarma işlemi için kesitler 0.01M sitrat tampona alınarak 2.45 GHz frekans ve 750 watta ayarlanan Bosch HMT 812C mikrodalga fırında 45 sn bırakıldı böylece tampon solüsyonun ısı oda

sıcaklığından 86 dereceye çıkartıldı. Böylece antijen kurtarma işlemi kesitlere uygulanmış oldu. Hızlı soğutma işlemi ile reaksiyonu durdurmak için mikrodalgada fırından alınan kesitler soğutulmuş 80 ml PBS doldurulmuş şaleye daldırıldı. Şaleye oda sıcaklığında distile su eklenerek bundan sonraki işlemlere hazırlandı. Kesitler bundan sonra da hızlıca oda sıcaklığındaki PBS içine alındı.

Tekrar PBS ile yıkanan kesitlerin zemin boyanmasının ve artefaktların azalması için bloklama solüsyonunda ve oda ısısında ve nemli odada 30 dakika tutuldu. Bloklama solüsyonu olarak Ready to Use (R.T.U.) VECTASTAIN Universal Quick Kit (Vector Labs. Burlingame, CA, USA Cat No: PK 7800) kullanıldı. Bloklama işlemi sonrası kesitler 2 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.

Bu işlemler sonrası kesitlerdeki kırık DNA' ları belirlemek için kesitlere In Situ Cell Detection Kit with POD (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany, Katalog No: 11 684 817 910) uygulanarak 37 derecede karanlık ve nemli ortamda 60 dakikada inkübe edildi. Daha sonra her bir kesit PBS ile 3 kere 5'er dakika boyunca durulandı.

Kesitleri ışık mikroskobunda görünür hale getirmek için POD (horseradish peroksidaz) çevirici eklenerek nemli oda içinde ve etüvde (37 OC) 30 dakika bekletildi. İşlem sonrası kesitler tekrar PBS ile 3 kere 5'er dakika boyunca yıkandı.

Daha sonra renklendirme için %0.05 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Thermo Scientific, CA, USA) ve substrat karışımı uygulandı. Renklenme işlemi gözle takip edilerek oda ısısında 5 dakika beklendi işlem sonrası kesitler PBS ile üç kez yıkandı.

Daha sonra karşıt boyama için Mayers Hemotoksilen kullanıldı ve çeşme suyunda boyanın mordanlaşması sağlandı.

Boyanan kesitler lamelle kapatılarak incelemeye alındı.

Kesitlerin Değerlendirilmesi:

Hazırlanan preparatlar Leica DM 4000 model ışık mikroskobu, tam motorize mikroskop tablası kullanılarak ve sterioinvestigator 7.5 versiyonu programı yardımıyla değerlendirildi.

Kesit 200x200 lük optik alanlara bölündü, her alanda 30x30'lık alan örneklem alanı rastgele seçildi.

Böylece kesitin tüm yüzeyinin % 2,25'lik bölümü rastgele ve eşit alanlı olarak sayıldı.

Sayım sırasında 2 farklı işaretleyici kullanıldı. Apoptik ve normal hücreler ayrı işaretleyiciler ile işaretlendi. Apoptotik hücre toplam hücre oranı kullanılarak apoptotik indeks çıkartıldı.

### 3.6. VEGF'in IMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

Stereolojik analize katılmayan 20 µm kalınlıktaki kesitler alınırken ön çalışma sonrası tespit edilen ortanca kesite yaklaşıncı bunların öncüllerinden alınan 5 µm lik kesitler VEGF immunohistokimyasal boyama işlemine alındı.

Kesitler rutin deparafinizasyon ve dehidratasyon işleminden sonra Fosfat Tampon Tuzu (PBS) ile yıkandı. Sitoplazmik VEGF'e anti VEGF bağlanabilmesi için % 0.1'lik (w/v) (eşit ağırlıkta ve eşit hacimde) sodyum sitrat (Merck; Darmstadt, Germany) içinde hazırlanmış Triton X-100 (Acros Organics; Geel, Belgium) deterjanı uygulanarak hücre zarı permeabilize edildi. Uygulama buz üzerinde 2 dakika bekletilerek yapıldı. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında PBS ile iki kere yıkandı.

Antijen kurtarma işlemi için kesitler 0.01M sitrat tampona alınarak 2.45 GHz frekans ve 750 watta ayarlanan Bosch HMT 812C mikrodalga fırında 45 sn bırakıldı böylece tampon solüsyonun ısı oda sıcaklığından 86 dereceye çıkartıldı. Antijen kurtarma reaksiyonu hızlı soğutma işlemi ile durduruldu. Bunun için mikrodalgada fırından alınan kesitler soğutulmuş 80 ml PBS doldurulmuş şaleye daldırıldı. Şaleye oda sıcaklığında distile su eklenerek bundan sonraki işlemlere hazırlandı. Kesitler bundan sonra da hızlıca oda sıcaklığındaki PBS içine alındı ve burada PBS iki kez değiştirilerek 5'er dakika bekletildi.

Avidin Biotin Peroksidaz yöntemi ile immunohistokimyasal olarak boyanacak kesitler için dokudaki peroksidaz aktivitesinin önlemesi gerekmektedir. Bu işlem için %0,3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peroxidaz) solüsyonunda (%30 luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 1 ml alınır ve 100 ml PBS'e tamamlanarak hazırlanır) kesitler 30 dk bekletildi.

İşlem sonrası PBS ile 5 dakika yıkandı.

Kesitlerin zemin boyanmasının ve artefaktların azalması için bloklama solüsyonunda ve oda ısısında ve nemli odada 30 dakika tutuldu. Bloklama solüsyonu olarak R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick Kit'in (Vector Labs. Burlingame, CA, USA Cat No: PK 7800) bloklama solüsyonu (RTU Normal Horse Serum %2,5) kullanıldı. Bloklama işlemi sonrası kesitler 2 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.

Bu işlemler sonrası kesitlerde VEGF i göstermek amacıyla primer antikor olarak VEGF Receptör 2 (Cell Signalling; Danvers, MA ,USA) tavşan monoklonal antikorunu 1/500 oranında dilüe edilerek uygulandı. Kesitler 4oC derecede karanlık ve nemli ortamda bir gece inkübe edildi. Daha sonra her bir kesit PBS ile 5 dakika durulandı.

Bu aşamada ikincil antikor uygulandı. İkincil antikor olarak R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick Kit'in Anti-Rabbit/Mouse IgG (H+L) antikorunu kullanıldı. Kesitler nemli odada 30 dakika tutuldu ve PBS ile 5 dakika yıkandı.

Örnekleri ışık mikroskopunda görünür hale getirmek için Vectastain RTU ABC Reagent eklendi ve nemli ortamda 30 dakika bekletildi ve 5 dakika PBS ile yıkandı.

Daha sonra renklendirme için %0.05 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Thermo Scientific, CA, USA) ve substrat karışımı uygulandı. Renklenme işlemi gözle takip edilerek oda ısısında 3 dakika beklendi işlem sonrası kesitler PBS ile üç kez yıkandı.

Zit boyama için Mayers Hemotoksilen kullanılarak çeşme suyunda boyanın mordanlaşması sağlandı.

Boyana kesitler lamelle kapatılarak Leica 6000B mikroskopunda değerlendirildi.

Kesitlerin değerlendirilmesinde Retina ganglion hücre tabakası ve koroid tabakası ayrı ayrı skorlandı. Skorlamada 0= VEGF ile boyanmamış, 1= VEGF ile az boyanmış, 2= VEGF ile orta düzeyde boyanmış, 3= VEGF ile yoğun boyanmış kriterleri kullanıldı.

### 3.7. İSTATİSTİKSEL DEğERLENDİRME

Çalışmanın istatistiksel analizleri Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Statistical Package For The Social Science (SPSS) paket programının 18,0 sürümü kullanılarak yapıldı. Tüm sayısal veriler Ortalama  $\pm$  Standart Hata olarak gösterildi. Toplam retinal ganglion hücre sayılarının ve apoptotik indeksin karşılaştırmasında tek yönlü varyans analiz testi ANOVA ve post test olarak Tukey testi kullanıldı.

VEGF ile boyanarak skorlanmış kesitler SPSS programı yardımıyla nonparametrik Mann Whitney U testi kullanılarak istatistiksel anlamlılık yönünden değerlendirildi. Veriler Ortanca  $\pm$  standart sapma olarak gösterildi

Gruplar arası karşılaştırmanın anlamlılık düzeyleri  $p < 0.001$ ; ileri düzeyde anlamlı,  $p < 0.01$ ; orta düzeyde anlamlı,  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4.BULGULAR

##### 4.1.STEREOLOJİK İNCELEME

##### 4.1.2.GANGLİON HÜCRE SAYIMI

Kontrol grubunda toplam hücre sayısı ortalama  $416615 \pm 21065$ ; İ&R ve İ&R+Bev gruplarında ise sırasıyla toplam hücre sayıları ortalama  $262493 \pm 13231$  ve olarak  $346578 \pm 4357$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda her iki gruba; İ&R+Bev grubunda ise İ&R grubuna göre hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

##### **Kontrol & İskemi Reperfüzyon Grupları arasında Total Ganglion Hücrelerinin Karşılaştırması**

Total Ganglion Hücre Sayısı	Kontrol	İskemi Reperfüzyon	p
<b>Ortalama</b>	416615	262493	0,0001
<b>SEM</b>	21065	13231	

Toplam ganglion hücre sayısı I & R grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

##### **Kontrol & İskemi Reperfüzyon Bevicizumab Grupları arasında Total Ganglion Hücrelerinin Karşılaştırması**

Total Ganglion Hücre Sayısı	Kontrol	İ & R Bev	p
<b>Ortalama</b>	416615	346578	0,010
<b>SEM</b>	21065	4357	

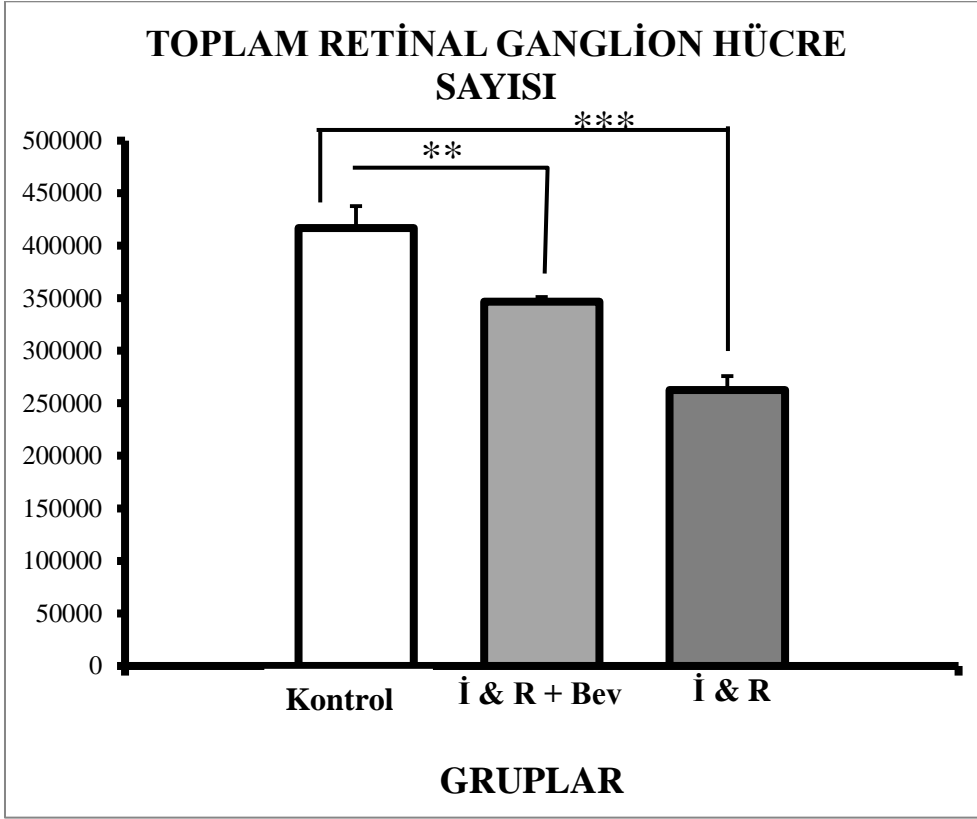
Toplam ganglion hücre sayısı İ & R Bevicizumab grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

##### **İskemi Reperfüzyon & İskemi Reperfüzyon Bevicizumab Grupları arasında Total Ganglion Hücrelerinin Karşılaştırması**

Total Ganglion Hücre Sayısı	İskemi Reperfüzyon	İ & R Bev	p
<b>Ortalama</b>	262493	346578	0,003
<b>SEM</b>	13231	4357	

Toplam ganglion hücre sayısı İ & R grubunda I & R Bevicizimab göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.





\*\* orta düzeyde anlamlı fark

\*\*\* ileri düzeyde anlamlı fark

Kontrol grubu herhangi bir manipülasyona maruz kalmadığı için en yüksek hücre sayısına sahip olması beklenen bir bulgudur. Bu karşılaştırmada önemli olan Bevacizumab uygulanan gruptaki hücre sayısının uygulamayan gruptakine göre daha yüksek olmasıdır. Bu bulgu Bevacizumabın iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etki gösterdiğinin önemli bir kanıtıdır.

## 4.2.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

### 4.2.1. APOPTOZ DEĞERLENDİRMESİ

Apoptotik hücre, nekrotik hücre, normal hücre ve toplam hücre sayıları her bir grup ve her bir denek için ayrı ayrı hesaplandı. Apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına bölümü ile apoptotik indeks hesaplandı (Apoptotik indeks= Apoptotik hücre sayısı/Toplam hücre sayısı).

Apoptotik indeks ortalama değeri kontrol grubunda 0.018; İ&R grubunda 0,647; ve İ&R+Bev grubunda 0,243 olarak saptanmıştır. Tüm grupların apoptotik indeks ortalama değerleri tablo 4-12'de gösterilmiştir.

**Kontrol & İskemi Reperfüzyon Grupları arasında  
Apoptotik İndeks Karşılaştırması**

Apoptotik İndeks	Kontrol	İskemi Reperfüzyon	p
Ortalama	0,018	0,647	0,0001
SEM	0,005	0,021	

Apoptotik index iskemi reperfüzyonda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

**Kontrol & İskemi Reperfüzyon Bevicizumab Grupları arasında  
Apoptotik İndeks Karşılaştırması**

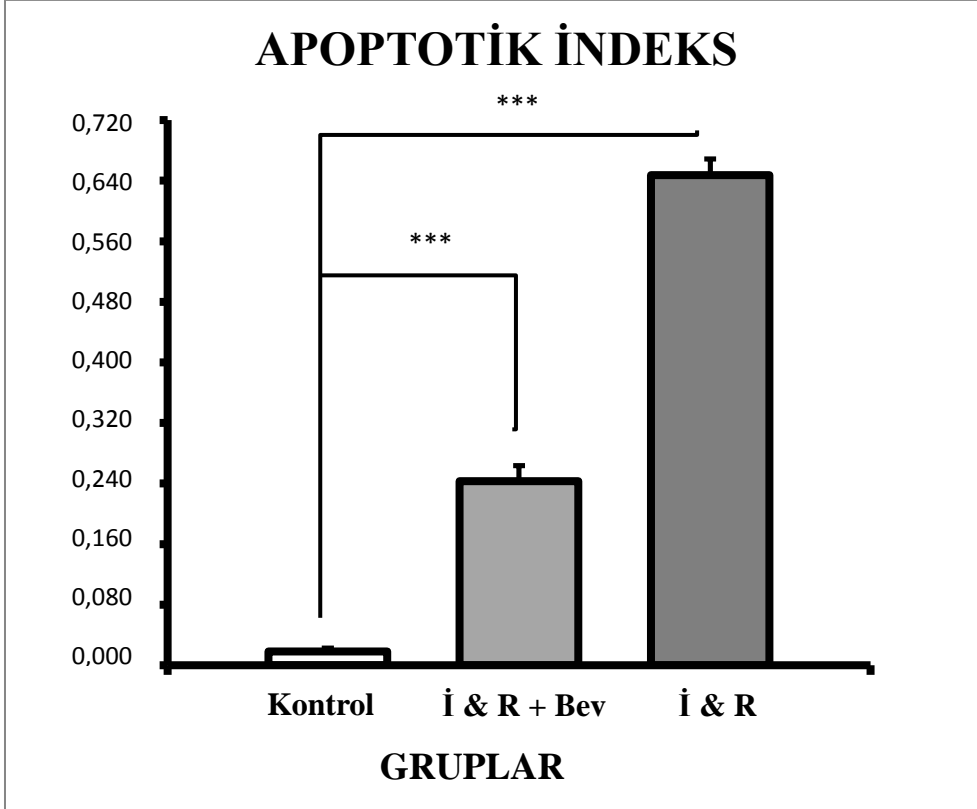
Apoptotik İndeks	Kontrol	İ & R Bev	p
Ortalama	0,018	0,243	0,0001
SEM	0,005	0,020	

Apoptotik index I & R Bevicizumab grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır

**İskemi Reperfüzyon & İskemi Reperfüzyon Bevicizumab Grupları arasında  
Apoptotik İndeks Karşılaştırması**

Apoptotic İndeks	İskemi Reperfüzyon	İ & R Bev	p
Ortalama	0,647	0,243	0,0001
SEM	0,021	0,020	

Apoptotik index I & R grubunda I & R Bevicizumab göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.



\*\* orta düzeyde anlamlı fark

\*\*\* ileri düzeyde anlamlı fark

Kontrol grubu herhangi bir manüplasyona maruz kalmadığı için apoptotik indeksin en düşük olması beklenen bir bulgudur. Bu karşılaşmada dikkate değer olan bevacizumab uygulanmış olan grubun uygulanmamış olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük apoptotik

indekse sahip olmasıdır. Bu bulgu da bevacizumabın iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkisine diğer bir önemli kanıttır.

#### 4.2.2. RETİNA GANGLİYON HÜCRE KATINDAN VEGF ANALİZİ

Retina ganglion hücre katı incelendiğinde I&R grubunda VEGF yoğunluk skoru 3,00, Kontrol grubunda 1,75 I&R+Bev grubunda ise 0,50 olarak hesaplandı. En yüksek VEGF yoğunluğu I&R grubundan en düşük ise I&R+Bev grubunda hesaplandı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu( $p<0,05$ ).

##### **Kontrol & İskemi Reperfüzyon Grupları arasında Retina Ganglion Hücre Katı VEGF Karşılaştırması**

VEGF Yoğunluk Skoru	Kontrol	İskemi Reperfüzyon	p
Median	1,750	3,000	0,004
SD	0,408	0,418	

Retina ganglion hücre tabakası VEGF boyanma yoğunluğu iskemi reperfüzyonda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ARTMIŞ

##### **Kontrol & İskemi Reperfüzyon Bevacizumab Grupları arasında Retina Ganglion Hücre Katı VEGF Karşılaştırması**

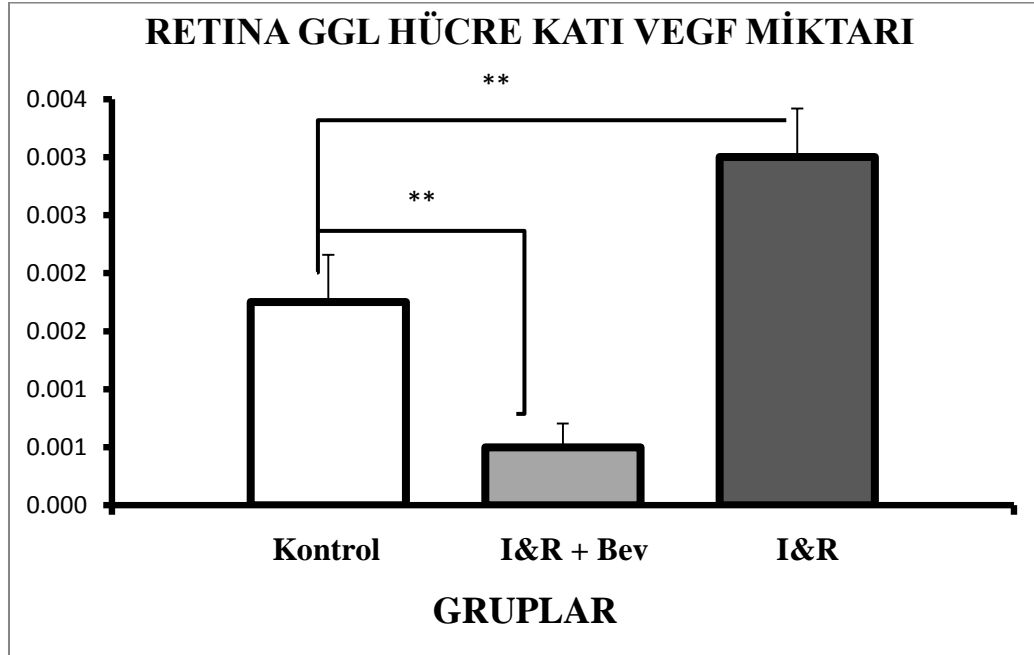
VEGF Yoğunluk Skoru	Kontrol	I & R Bev	p
Median	1,750	0,500	0,002
SD	0,408	0,204	

Retina ganglion hücre tabakası VEGF boyanma yoğunluğu I & R Bevacizumab grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede AZALMIŞ

**İskemi Reperfüzyon & İskemi Reperfüzyon Bevacizumab Grupları arasında Retina Ganglion Hücre Katı VEGF Karşılaştırması**

VEGF Yoğunluk Skoru	İskemi Reperfüzyon	İ & R Bev	p
<b>Median</b>	3,000	0,500	0,002
<b>SD</b>	0,418	0,204	

Retina ganglion hücre tabakası VEGF boyanma yoğunluğu I & R Bevacizumab grubunda I&R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede AZALMIŞ



\*\* orta düzeyde anlamlı fark

\*\*\* ileri düzeyde anlamlı fark

Bu karşılaştırmada en dokudaki VEGF miktarına baktığımızda bevacizumab uygulanan grupta VEGF'in güçlü bir şekilde baskılandığını görmekteyiz. Bu tablodaki diğer önemli bir bulgu ise iskemi-

reperfüzyon uygulanan ama bevacizumab uygulanmayan grupta VEGF'in önemli miktarda yüksek olmasıdır. Bu bulgu literatür bilgisiyle uyumlu olup iskemi-reperfüzyon hasarına cevap olarak VEGF salgılandığının güçlü bir kanıtıdır.

#### 4.2.3. KOROID KATI VEGF ANALİZİ

Koroid katı incelendiğinde I&R grubunda VEGF yoğunluk skoru 2,75, Kontrol grubunda 2,00 I&R+Bev grubunda ise 1,00 olarak hesaplandı. En yüksek VEGF yoğunluğu I&R grubundan en düşük ise I&R+Bev grubunda hesaplandı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu( $p<0,05$ ).

#### **Kontrol & İskemi Reperfüzyon Grupları arasında Koroid Katı VEGF Karşılaştırması**

<b>VEGF Yoğunluk Skoru</b>	<b>Kontrol</b>	<b>İskemi Reperfüzyon</b>	<b>p</b>
<b>Median</b>	2,000	2,750	0,041
<b>SD</b>	0,376	0,408	

Koroid tabakası VEGF boyanma yoğunluğu iskemi reperfüzyon grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

#### **Kontrol & İskemi Reperfüzyon Bevacizumab Grupları arasında Koroid Katı VEGF Karşılaştırması**

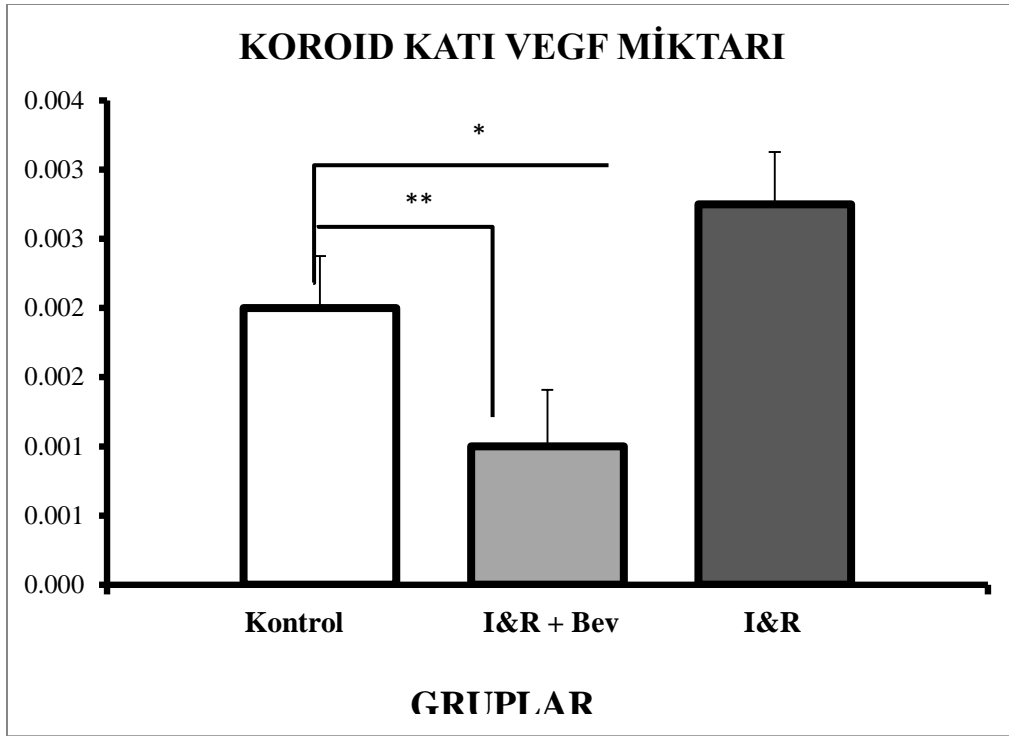
<b>VEGF Yoğunluk Skoru</b>	<b>Kontrol</b>	<b>İ &amp; R Bev</b>	<b>p</b>
<b>Median</b>	2,000	1,000	0,002
<b>SD</b>	0,376	0,376	

Koroid tabakası VEGF boyanma yoğunluğu iskemi reperfüzyon+Bevacizumab grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

**İskemi Reperfüzyon & İskemi Reperfüzyon Bevacizumab Grupları  
arasında Koroid Katı VEGF Karşılaştırması**

VEGF Yoğunluk Skoru	İskemi Reperfüzyon	i & R Bev	p
<b>Median</b>	2,750	1,000	0,002
<b>SD</b>	0,408	0,376	

Koroid tabakası VEGF boyanma yoğunluğu iskemik reperfüzyon+Bevacizumab grubunda I&R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.



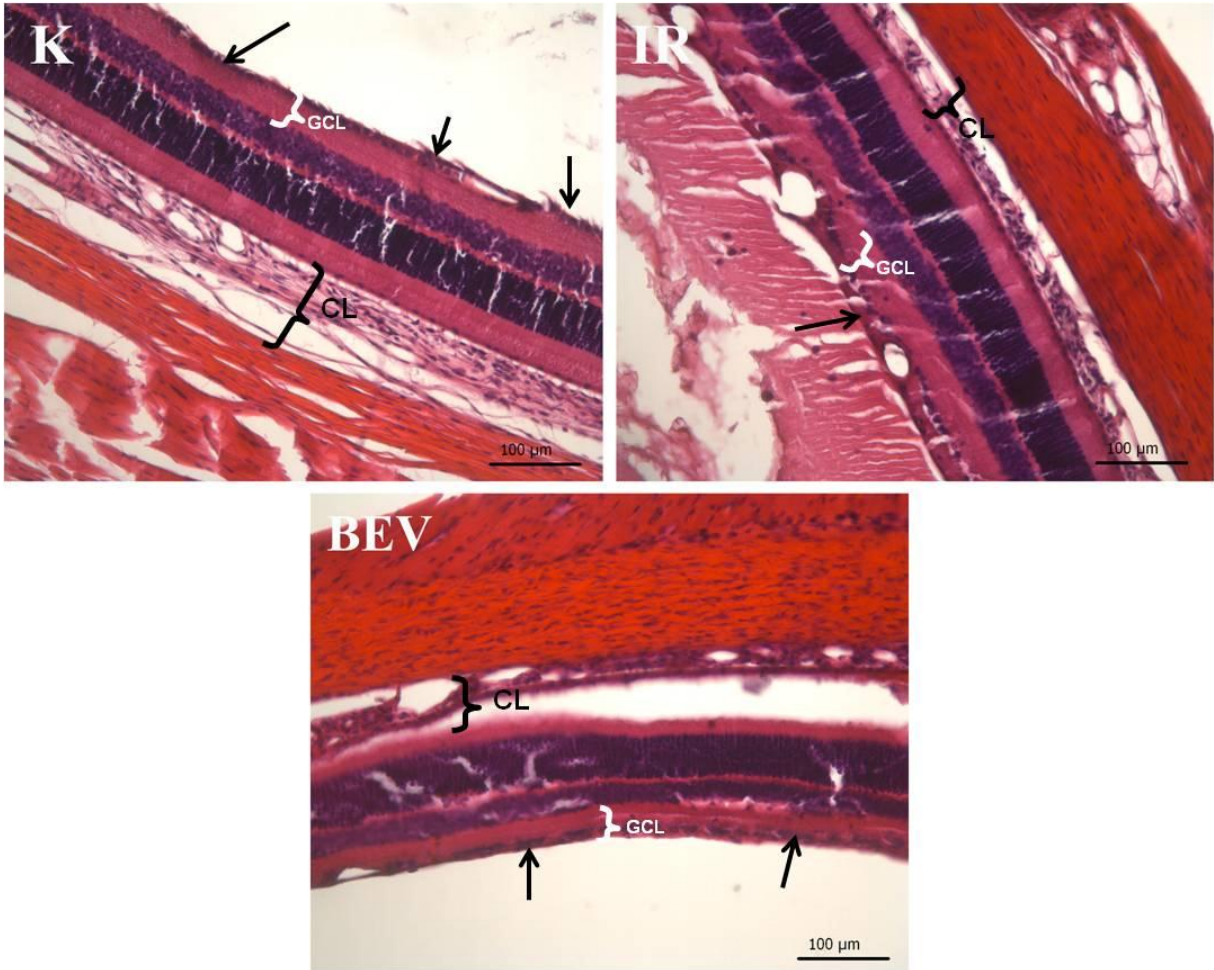
\*\* orta düzeyde anlamlı fark

\*\*\* ileri düzeyde anlamlı fark

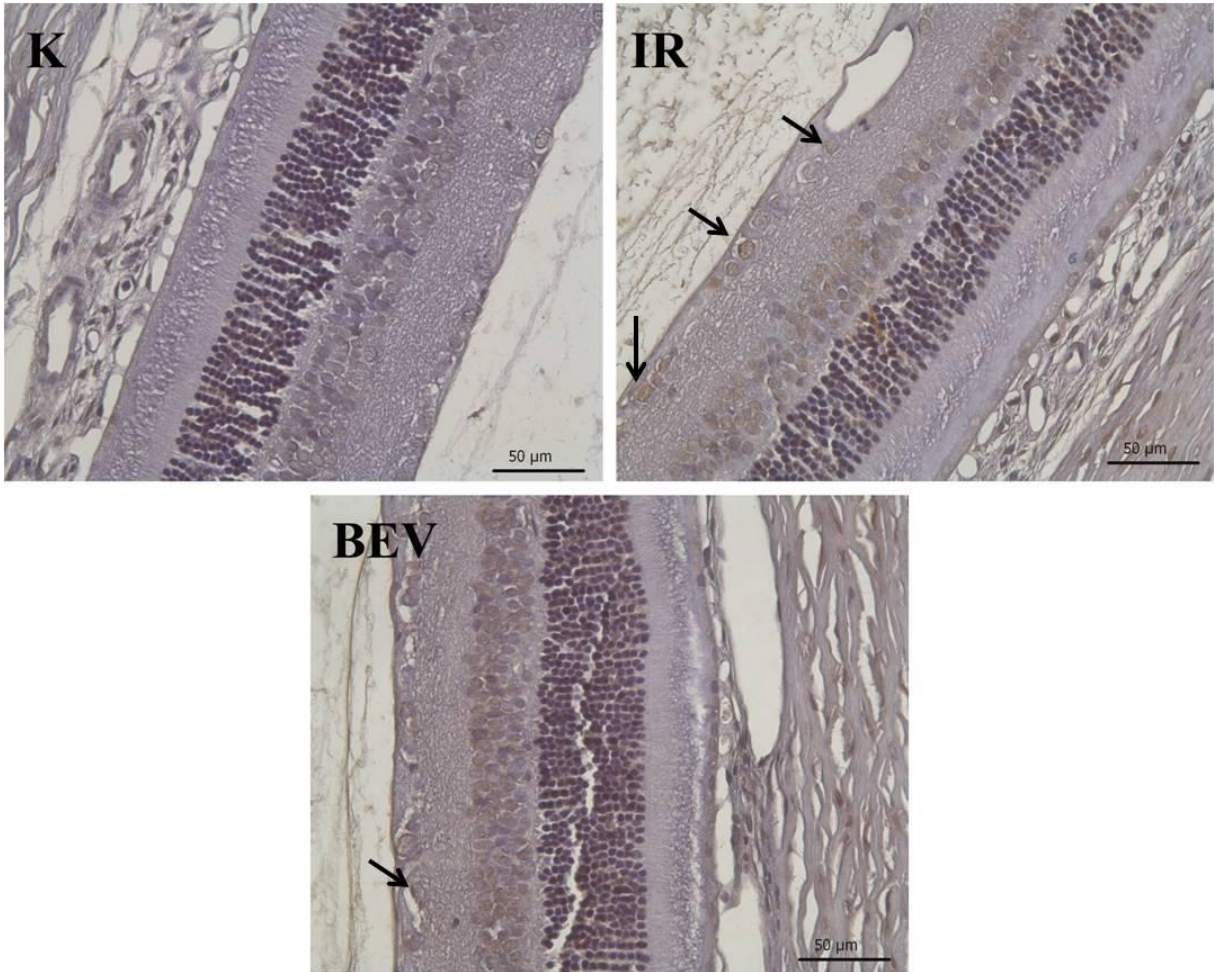
Bu tabloda da retina ganglion hücre katında olduğu gibi koroidde de bevacizumabın VEGF'yi baskıladığını görmekteyiz. Burada dikkati çekilmesi gereken noktanın baskılamanın retina ganglion



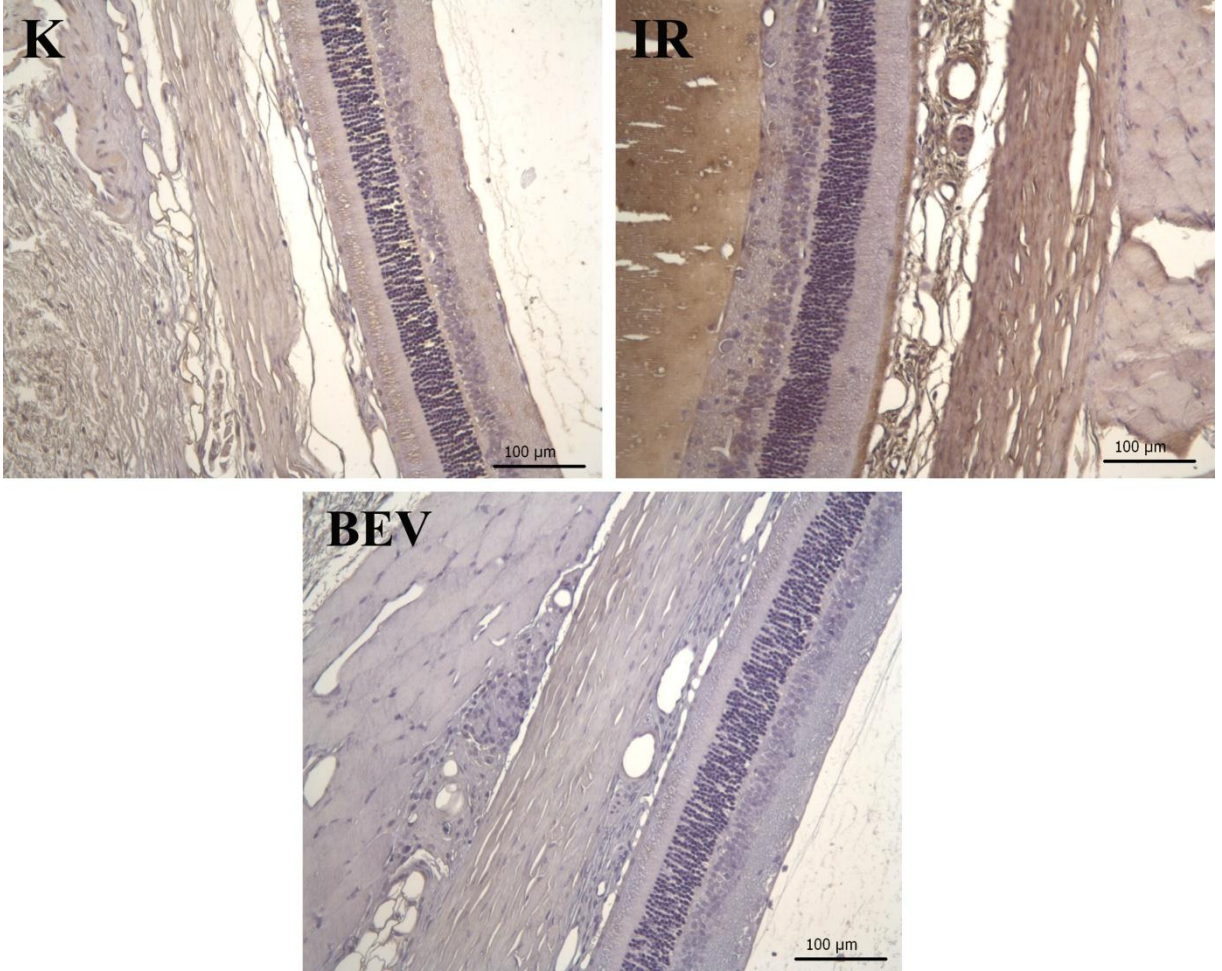
hücre katında olduğu kadar güçlü olmayışdır. Bu da literatür bilgisiyle uyumlu olup büyük bir molekül olan bevacizumabın penetrasyonunun içten dışa gittikçe azalmasından dolayı olabileceğini düşünebiliriz.



Şekil: K (Kontrol), IR (İskemi ve Reperfüzyon) ve Bev (Bevacizumab) gruplarına ait retina kesitlerinin histolojik olarak karşılaştırılması. GCL: Ganglion hücre tabakası, CL: Koroid tabakası ve siyah oklar ganglion hücrelerini göstermektedir. Boyama: Hematoksilen Eozin, Bar: 100 µm.



Şekil: K (Kontrol), IR (İskemi ve Reperfüzyon) ve Bev (Bevacizumab) gruplarına ait retina kesitlerinde, TUNEL boyaması ile gösterilen apoptotik ganglion hücrelerinin (siyah ok) karşılaştırılması. Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapılmıştır. Bar: 50 µm.



Şekil: K (Kontrol), IR (İskemi ve Reperfüzyon) ve Bev (Bevacizumab) gruplarına ait göz örneklerinde retina ve koroidin immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde VEGF boyama yoğunluğu karşılaştırılması. BEV grubunda VEGF yoğunluğu en az düzeyde görülmektedir. I& R grubunda ise VEGF artışı belirgin olarak saptanmıştır. Bar: 100 µm.

## 5.TARTIŞMA

İnsan retinası; diabetik retinopati, orak hücre anemisi, glokom, prematüre retinopati ve retinal arter ve ven tıkanıklığı gibi durumlarda iskemi-reperfüzyon hasarına uğramaktadır.<sup>133</sup> (Yoon ve Marfor, 1989). İskemi süresi arttıkça doku daha da fazla hasarlanır. Her dokuda farklı olmakla beraber iskeminin belirli bir süresine kadar doku, geri dönüşebilen doku hasarı fazına, iskemi süresi arttıkça ise geri dönüşümü olmayan doku hasarı fazına girer. Bu aşamadaki doku reperfüze edilse bile oluşmuş olan hasar iyileşmez<sup>28</sup>(Cotran ve ark., 1989). Retina için bu süre 30-90 dk bildirilmiştir.<sup>11,132</sup>(Aydemir, 2002; Yoneda ve ark., 2001). Reperfüzyon sonrası dokuya yeniden oksijen girmesiyle sistemde aniden artan oksijen miktarı, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olur. Bu da doku hasarının daha da artmasına yol açar<sup>19,71</sup>(Bozkurt,1997; Matsubara, ve ark., 2000). Tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla beraber dokuya gelen lökositlerin de serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı bilinmektedir. Lökosit kemotaksisinin inhibe edildiği bir çalışmada hasarın daha az olduğu bildirilmiştir.<sup>71</sup>(Matsubara, ve ark., 2000).

İskemi-reperfüzyon hasarının meydana geliş sırası, aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitlerin açığa çıkmasıyla başlayıp enerjiye bağlı taşıma sistemlerindeki bozulmaları takip eden özellikle hücre içi kalsiyum miktarının artmasıdır. Tüm bunların sonucu kalsiyum tarafından yürütülen

bazı süreçlerin başlaması ve serbest radikallerin oluşmasıdır<sup>28,11</sup>(Cotran, ve ark., 1989; Aydemir, 2002). Serbest radikaller; membran lipitlerini peroksidasyona uğratarak, hücrede proteinlerin, karbohidratların, nükleik asitlerin yapısını bozarak, kalsiyum dengesini değiştirerek, aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitleri uyararak zincirleme bir reaksiyon ile doku hasarı meydana getirmektedir. İskemi-reperfüzyon çalışmalarında, iskemi oluşturmak için sıklıkla göz içi basıncın (GİB) artırılması veya retinal arterin bağlanarak kan akımının durdurulması metotları kullanılmıştır. Kullanılan en güncel metot GİB'nin sistolik basıncın üzerine çıkarılması yöntemidir. Bu metot kolay uygulanabilir ve reperfüzyon evresinin kolaylıkla başlatılabilir olması nedeniyle sıklıkla iskemi reperfüzyon modeli oluşturmada kullanılır. Bizde çalışmamızda retina iskemisini GİB arttırarak gerçekleştirdik. GİB, sistolik basıncın üzerine çıkarılması ile retina kanlanmasından sorumlu olan hem koroidal hem de arteriyel kan akımı durdurulmaktadır. Retinada bu tip hasar sonrası inflamasyon ve nörodejenerasyon meydana gelir. Bu prosedür geçici damar tıkanıklıklarının olduğu hastalıkların yaptığı zararlara benzer nöronal hasar oluşturur. Yeni yapılan bir çalışmada iskemi-reperfüzyon modelinde oluşan anormalliklerin diyabetik retinopatidekine benzer olduğu bildirilmiştir.<sup>136</sup>

VEGF birçok retinopati ile ilişkili vasküler anjiogenezis ve vasküler permeabiliteden sorumludur. VEGF antagonistlerinin iskemik ve inflamatuvar retinopatilerde ödemi azalttığı ve neovaskülarizasyonu önlediğinin birçok vaka ve klinik çalışmalarla gösterilmesi bir önceki cümledeki bulguyu desteklemektedir.<sup>97,66</sup> Fakat VEGF'ün önemli bir nörotrofik bir madde olduğu da bilinmektedir.<sup>84,107</sup> Bu yüzden VEGF inhibisyonunun nörodejenerasyona sebep olabileceği düşünülebilir.<sup>108</sup> Bazı hayvan çalışmalarında bu bulguyu destekleyen kanıtlar elde edilmiştir.<sup>84</sup> Özellikle yüksek dozlarda uygulandığında VEGF antagonistlerinin nörodejenerasyona sebep olduğu artık bilinmektedir. Dozajın ayarladığı durumlarda ise oküler bu yan etki önemsiz miktarda bulunmuştur.<sup>138,122,123</sup> Bizim çalışmamızda da 0,05ml (1.25mg) olarak intravitreal uygulanan anti-VEGF ajanı bevacizumabın iskemi-reperfüzyon modelinde nörodejenerasyonu azalttığını gösterdik.

Çalışmamızdaki iskemi-reperfüzyonun uygulandığı fakat bevacizumabın verilmediği gruba baktığımız zaman dokudaki VEGF miktarının bevacizumab uygulanan ya da kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu belirledik. Bu bulgu hayvan deneylerinde oluşturulan iskemik retinopati modellerinde VEGF ekspresyonunun arttığına gösterildiği literatür ile uyumludur.<sup>91,3</sup> Sıçanlarda yapılan 90 dakika iskemi sonrası VEGF düzeylerinin 7 gün boyunca 2 kat artmış olarak bulunduğu bildirilmiştir.<sup>76</sup> Ayrıca yapılan başka bir çalışmada sıçanlarda uygulanan serebral iskemi sonrası VEGF mRNA ve protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.<sup>117,62</sup>

Çalışmamızın diğer önemli bir bulgusu ise bevacizumabın doku penetrasyonu ile ilgilidir. Mordenti ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 70kD'den daha büyük molekül ağırlıklı moleküllerin (tam uzunluktaki antikorların) iç limitan membranı (İLM) geçip subretinal aralığa ulaşamadıklarını bildirmişlerdir. Bu hipotezden yola çıkarak bevacizumabın molekül ağırlığı büyük olduğu için, vitreus içine verildiğinde retinaya veya retina altı boşluğa geçişi zor olacağını düşünebiliriz. Ancak yapılan deneysel çalışmalarda intravitreal enjeksiyon sonrası bevacizumabın da retinayı geçebildiği bildirilmiştir. Ayrıca zaten bevacizumabın klinik kullanımı sonrası hemen cevap alınması bu ilacın bir şekilde İLM'yi geçtiği hipotezini güçlendirmektedir. Bunun sebepleri düşünüldüğünde İLM geçirgenliğinin yaşla ilerledikçe artması, İLM penetrasyon çalışmalarında kullanılan 50 kat daha fazla bevacizumab kullanılması ve maküladaki İLM'nin perifer İLM'ye göre daha geçirgen olması akla gelmektedir. Ek olarak 76 kDa'dan daha büyük moleküllere karşı difüzyon bariyeri görevi gören iç pleksiform tabakanın yokluğu da, bevacizumabın foveadan geçişinin artmasına sebep olmaktadır. Bizim çalışmamızda da literatür bilgisiyle uyumlu olarak bevacizumabın retinayı geçtiğini ya da retina dışında etkili olduğunu koroiddeki VEGF miktarını azaltmasından yola çıkarak düşünebiliriz. Geçiş olduğunu bilmekle beraber kendi çalışmamızda gösterdiğimiz gibi koroiddeki VEGF düşüşünün retinadakinden daha az olmasıyla geçen miktar içten dışa doğru gittikçe azaldığı da düşünülebilir. Bunun sebepleri arasında retinanın geçişe izin verse de bevacizumaba karşı yarı geçirgen bir bariyer görevi yaptığı ya da anatomik olarak VEGF'in ilk önce retina ganglion hücreleriyle karşılaşmasından dolayı koroide geçen ya da etkileyen miktarın azalmasıdır.

VEGF'in iskemi-reperfüzyondaki rolü hakkında literatürde fazla bilgi yoktur. Bazı serebral iskemi reperfüzyon modellerinde VEGF inhibisyonunun permeabiliteyi azalttığı gösterilmiştir. KDR VEGF reseptör kinaz inhibisyonunun serebral iskemi sonrası ödemi azalttığı bildirilmiştir.<sup>66</sup> Literatürde ayrıca VEGF'in nöroprotektif etkisinden de bahsedilmektedir. Nishijima ve ark'larının yaptığı bir çalışmada optik kılıf oklüzyonu sonrası VEGF reseptör agonisti verilmesinin nöronal ölümü azalttığı gösterilmiştir.<sup>84</sup> Benzer olarak başka bir çalışmada ise adenovirus ilişkili VEGF ekspresyonunun arttırılmasının serebral iskemideki nöronal hasarın azalttığı gösterilmiştir.<sup>114</sup> Abocouwer ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise retinada oluşturulan iskemi ve reperfüzyon sonrası bevacizumab uygulanmasının apoptozisi değiştirmeden vasküler permeabiliteyi azalttığı belirtilmiştir.<sup>1</sup> Bizim çalışmamızda ise VEGF'in bevacizumabla blokajının iskemi-reperfüzyon hasarında gelişen apoptozisi azalttığını belirledik. Bunun sebeplerini incelediğimizde reperfüzyon sonrası gelen yüksek miktardaki oksijene bağlı oluşan oksijen radikallerinin bevacizumab uygulanmasını takiben gelişen vasküler permeabilitenin azalmasıyla dokuya daha az ulaşarak zararı azalttığı düşünülebilir. Ayrıca dokuya lökosit infiltrasyonunun da bu vasküler geçirgenliğin azalmasıyla düştüğü ve bu durumun hasarı arttıran inflamatuvar cevabın azalttığı hipotez edilebilir. Son olarak VEGF'in çeşitli hücrelerde farklı etkilere sebep olduğu bilinmektedir. Serebral iskemi sonrası infarkt bölgesi etrafında bulunan mikrogial hücrelerde eksprese edilen VEGF proteininin<sup>98</sup> nörotrofik etkili retinada endotel hücrelerinde iskemi sonrası artan VEGF proteini bağlanması<sup>86</sup> ise ödemi arttırarak nörodejeneratif etkili olduğu sonucu çıkarılabilir.

Tsuchihashi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada fare modellerinde iskemi ve reperfüzyon hasarı sonrası karaciğerde anti-VEGF özelliği olan bir serumun etkileri incelenmiştir. Çıkan sonuçlarda anti-VEGF uygulanan grupta apoptozisin ve anti inflamatuvar moleküllerin birikiminin azaldığı anti-apoptotik proteinlerin ise ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca anti-VEGF uygulamanın lökositlerin hasar bölgesine ulaşmasını engellediği bulunmuştur. Anti-VEGF serumun bu anti-inflamatuvar, anti-apoptotik ve lökosit hareketini azaltma özellikleriyle iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu olduğu sonuç olarak belirtilmiştir. Buna karşılık olarak Tsuru ve ark'larının yaptığı

başka bir çalışmada ise karaciğerin iskemi ve reperfüzyon hasarında sistemik verilen VEGF serumun sitoprotektif etkileri olduğu belirtilmiştir. Benzer bulguların miyokard iskemisinin oluşturulduğu bir hayvan modelinde de alındığı bildirilmiştir. Bu bulgulara temel olarak ise sistemik verilen VEGF'in dolaşan lökositlerin reseptörlerini doyurup inflamasyon alanından salgılanan VEGF'e karşı cevap vermesini engellediği hipotez edilmiş. Sonuç olarak ise hasarın oluşmasında hasar bölgesinden lokal olarak salgılanan VEGF'in daha önemli olabileceği düşünülmüş.

Klinikte anti-VEGF tedavileri retinopati tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.<sup>26,25</sup> Yapılan çalışmalarda diyabetik makula ödeminde bevacizumab ve ranibizumabın laser tedavisine göre vizyonu daha fazla arttırdığı gösterilmiştir<sup>116,81</sup> Benzer sonuçlar santral ya da ven dal tıkanıklığına bağlı ödemde de alınmıştır.<sup>104,48,118,27,21</sup> Bazı hayvan modeli çalışmalarında arka arkaya yapılan VEGF antagonistlerinin retina ganglion hücre kaybına yol açtığı bildirilse de<sup>84</sup> bazı hayvan çalışmalarında böyle bir bulguya rastlanmadığı da gösterilmiştir.<sup>23,123</sup> İnsanlarda ise bevacizumabın retina fonksiyonu üzerinde önemli bir negatif etki meydana getirmediği gösterilmiştir.<sup>138</sup>

## 6.SONUÇ

GİB'nin arttırılarak oluşturulan iskemi –reperfüzyon modeli sıklıkla glokoma bağlı oluşan hasarları incelemede kullanılmıştır ve kullanılmaktadır. Fakat artık yeni literatüre baktığımız zaman bu modelin aynı zamanda başka önemli bir problem olan iskemik retinopati için örnek oluşturabildiği gösterilmiştir. 34 Bizim çalışmamızda bu şekilde oluşturulmuş olup iskemik hasar sonrası bevacizumab etkinliği araştırılmıştır. Bir anti-VEGF antikoru olan bevacizumab kanser tedavisi sonrası oküler terapötik olarak ilk önce YBMD'nda kullanılmıştır. Daha sonraları iskemik hastalıklarda neovaskülarizasyonların gerilemesi ve ödemin çekilmesinde de aktif olarak kullanılmaya başlamıştır. Bizim çalışmamızda bu bulgulara ek olarak bevacizumabın ya da genelde VEGF antagonizminin



tahminen oksijen radikal hasarını ve inflamasyonu azaltmak yoluyla apoptozisi azaltarak nöroproteksiyon da yaptığını gösterdik. Literatürde bizim bulgularımızla çelişen bulgular olsa da VEGF'ün iskemik hasarda çok önemli bir rol oynadığı yadsınamaz. Gelecekte bu molekülün bir şekilde manüpülasyonunun iskemik hasarın önlenmesinde kullanılacak olmasını beklemek çok da uzak bir tahmin olmayacaktır.

## 7.ÖZET

**AMAÇ:** Geçici iskemi ve reperfüzyon yaratarak iskemik bir retina modeli oluşturmak ve bu modelde bir VEGF antagonistinin anti-apoptotik ve olası nörodejeneratif etkilerini incelemek.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Bu çalışmada, 18 adet, Wistar cinsi, albino, 4- 6 aylık, yaklaşık 200-300 gr. ağırlığındaki sıçanlar kullanıldı. Retina iskemisi derin anestezi sonrası göz içi basıncı yükseltilerek retinal arterden göze kan akımının engellenmesi ile sağlandı. Göz içi basıncı kornea yoluyla ön kamara girişi ile göze bağlanacak steril serum fizyolojik şişesinin yükseltilmesiyle artırıldı. Göz içi basıncının yeteri kadar arttığı portatif göz içi basıncı ölçer (Tono-Pen) ile ölçüldü. Hedeflenen göz içi basıncı 90 mmHg'di. Bu basınç 45 dakika boyunca devam ettirilip daha sonra reperfüzyona izin verildi.

Oluşturulacak üç gruptan bir tanesine sadece iskemi uygulandı fakat anti-VEGF ajanı verilmedi. İkinci gruba ise iskemi oluşturulmadan iki gün önce intravitreal yol ile en sık kullanılan anti-VEGF ajan olan bevacizumab 0,05ml(1.25mg) dozunda verildi ve daha sonra iskemi modeli oluşturuldu. Son grup ise kontrol grubu olarak bırakılarak sadece kornea yoluyla ön kamara girişi yapıldı ama göz içi basıncı yükseltilmedi. Bir göze yapılmış olan enjeksiyonun muhtemel sistemik yolla diğer gözü de etkileyebileceği literatürde bahsedildiğinden her sıçanın tek gözü kullanıldı. İntravitreal enjeksiyon limbusun 2mm posterioründen superotemporal kadrandan orta vitreus boşluğuna 30 gaugeluk iğne kullanılarak steril şartlarda uygulandı. Enjeksiyon öncesi pupil dilatasyonu %0.5 tropikamid ve %2.5luk fenilefrin hidroklorid, topikal anestezi propakain HCL, sterilizasyon ise %5'lik povidon iyot konjonktivaya damlatılarak sağlandı.

Ötanazi sonrası ise oluşturulmuş 6'şar üyeli 3 grup içinden her grup için ayrı ayrı 6 hayvan histomorfometrik 4 hayvan ise immünohistokimyasal ve histopatolojik incelemeye tabi tutuldu.

Histomorfometrik olarak retina ganglion hücre sayısı optik dissektör yöntemi ile sayıldı,

immünohistokimyasal olarak ise retina dokusunda hücre apoptozisi ve VEGF düzeyleri bakıldı.

**BULGULAR:** Bevacizumab iskemi reperfüzyon hasarında retina ganglion hücre ölümünü ve apoptozu azalttığı görülmüştür. Bevacizumab büyük bir molekül olsa da koroidde de etkili olduğu ve bu dokudaki VEGF miktarını azalttığı tespit edilmiştir.

**TARTIŞMA:** VEGF nörotrofik bir madde olsa da iskemi-reperfüzyon hasarında anti-VEGF bir molekül olan bevacizumab tedavisi apoptozisi azaltmaktadır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Bevacizumab, iskemi-reperfüzyon, VEGF

## 8.SUMMARY

**OBJECTIVE:** To create a model of ischemic retina by temporary ischemia and reperfusion and examine the possible anti-apoptotic and neurodegenerative effects of a VEGF antagonist.

**MATERIALS AND METHODS:** In this study, 18 Wistar, albino, 4 - 6 months, approximately 200-300 g. weighing rats were used. After deep anesthesia retinal ischemia was induced by raising intraocular pressure which stopped blood flow to the eye by retinal arteries. Intraocular pressure was increased by connecting a bottle of sterile saline to the anterior chamber through cornea. Intraocular pressure was measured by portable (Tono-Pen). Target intraocular pressure was 90 mmhg. This pressure was continued for 45 minutes and then reperfusion was allowed. For the first group ischemia was induced but an anti-VEGF agent was not given. For the second group two days before ischemia 0.05 ml (1.25mg)of the most commonly used intravitreal anti-VEGF agent, bevacizumab, was administered intravitreally and then ischemic model was created. The last group's intraocular pressure was not increased as being the control group , only a cannula was introduced into the anterior chamber through the cornea. In the in study only one eye of each rat was used because the

injection made to one eye was likely to affect the other eye by the systemic route as mentioned in the literature. Intravitreal injection was performed by a 30 gauge needle under sterile conditions into the mid-vitreous cavity from the superotemporal quadrant 2mm posterior to the limbus. Before injection pupil was dilatated by 2.5% tropicamide and phenylephrine hydrochloride 0.5%. For topical anesthesia HCL propakain was used and sterilization was achieved by dropping 5% povidone-iodine on the conjunctiva.

After euthanasia 6 animals from each group were subjected to histomorphometric and four were subjected to immunohistochemical and histopathologic examinations. For histomorphometric examination the number of retinal ganglion cells was counted by optical dissector method. For immunohistochemistry, VEGF levels and apoptosis were examined in the retinal tissue.

**RESULTS:** It was observed that in ischemia reperfusion injury bevacizumab reduces retinal ganglion cell death and apoptosis. It was also identified that although a large molecule bevacizumab effects the choroid and reduces the amount of VEGF in this tissue.

**DISCUSSION:** Even though VEGF is a neurotrophic molecule, in the ischemia-reperfusion injury bevacizumab treatment which is an anti-VEGF agent decreases apoptosis.

**KEY WORDS:** Bevacizumab, ischemia-reperfusion, VEGF

#### 9.KAYNAKLAR

- 1) Abcouwer Sf, Lin Cm, Wolpert Eb, Shanmugam S, Schaefer Ew, Freeman Wm, Barber Aj, Antonetti Da., Effects of Ischemic Preconditioning And Bevacizumab On Apoptosis And Vascular Permeability Following Retinal Ischemia-Reperfusion Injury, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51, 5920-33.
- 2) Adamis Ap, Berman Aj. Immunological Mechanisms In The Pathogenesis Of Diabetic Retinopathy. Semin Immunopathol. 2008;30: 65–84.

- 3) Adamis Ap, Miller Jw, Bernal Mt, Et Al. Increased Vaseular Endothelial Growth Factor Levels In The Vitreous Of Eyes With Proliferative Diabetic Retinopathy. Am J Ophthalmol 1994; 118: 445 - 50.
- 4) Aiello Lp, Avery Rl, Arrigg Pg, Et Al. Vascular Endothelial Growth Factor In Ocular Fluid Of Patients With Diabetic Retinopathy And Other Retinal Disorders. N Engl J Med 1994; 331; 1480 - 87.
- 5) Aillo Lp: Northrup Im, Keyt Ba, Takagi H, Iwamoto J Ma. Hypoxic Regulation Of Vascular Endothelial Growth Factor In Retinal Cells. Arch Ophthalmol1995; 113: 1538 -44.
- 6) Alon T, Hemo I, Itin A, Peer 1, Stone 1, Keshet E. Vascular Endothelial Growth Factor Acts As A Survival Factor For Newly Formed Retinal Vessels And Has Impiications For Retinopathy Of Prematurity. Nat Med 1995; 1: 1024 -8. 47  
And Research, 4(2), 75-78.
- 7) Andersson M, Honarvar A, Sjöstrand J, Peterson A, Karlsson JO. Decreased caspase-3 activity in human lens epithelium from posterior subcapsular cataracts. Exp Eye Res. 2003 76(2):175-82
- 8) Andriolo Rb, Puga Me, [Unior Rb, Atallah An. Bevacizumab For Oeular Neovascular Diseases: A Systematic Review. Sao Paulo Med J. 2009;127:84-91.
- 9) Antonetti Da, Barber Aj, Bronson Sk, Et Al. Diabetic Retinopathy: Seeing Beyond Glucose-Induced Microvascular Disease. Diabetes. 2006; 55:2401–2411.
- 10) Ayata A, Ünal M, Erşanlı D, Tatlipinar S, Bilge Ah.(2008), Potential Beneficial Effects Of Intravitreal Bevacizumab As An Adjuvant İn Bacterial Endophtalmitis. Medical Hypotheses
- 11) Aydemir, O., Ve Çelebi, S., 2002. Deneysel Retinal İskemi Ve Reperfüzyon Oluşturulan Kobaylarda Vitamin E Türevlerinin Glutatyon Düzeyineietkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 16(3-4): 257-261.

- 12) Aydogan S, Celiker U, Turkcuoglu P, Ilhan N, Akpolat N. The Effect Of Thalidomide On Vascular Endothelial Growth Factor And Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels İn Retinal İschemia/Reperfusion İnjury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246:363–368.R
- 13) Barry, M.C., And Grace, P.A., 1997. Ischemia-Reperfusion İnjury. *Surgery*, 11: 68-72.
- 14) Baykal, Y., Ve Kocabalkan, F., 2000. Serbest Radikaller Ve Hücre Hasarı Oluşturulabiyapma Mekanizmaları. *Sendrom*, S.31-38.
- 15) Beach Tg, Tago H, Nagai T. Perfusion-Fixation Of The Human Brain For İmmunohistochemistry: Comparison With İmmersion-Fixation *J Neurosci Methods*. 1987 19(3):183-92. 162
- 16) Berman, E.R., 1991. *Biochemistry Of The Eye*. Plenum Press, New York.
- 17) Borutaite, V., Jekabsone, A., Morkuniene, And R., Brown, G.C. 2003. Inhibition Of Mitochondrial Permeability Transition Prevents Mitochondrial Dysfonction, Cytochrome C Release And Apoptosis İnduced By Heart İschemia. *J. Mol. Cell Cardiol*. 35: 357-366.
- 18) Bouzas Ea, Pournaras Cj, Donati G. Distrubition And Regulation Ofthe Optic Nerve Head Tissue Poi. *Surv Ophthalmol* 1997;42:1-8.
- 19) Bozkurt, N., 1997. Tavşan Retinasının İskemi Reperfüzyon Hasarından Süperoksit Dismutaz Ve Katalaz İle Koruması. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İstanbul*, 54s.
- 20) Büchi Er, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-Induced Retinal Ischemia In Rats: An Experimental Model For Quantitative Study *Ophthalmologica*. 1991;203(3):138-47
- 21) Campochiaro Pa, Hafiz G, Shah Sm, Et Al. Ranibizumab For Macular Edema Due To Retinal Vein Occlusions: İmplication Of Vegf As A Critical Stimulator. *Mol Ther*. 2008;16:791–799.

- 22) Caprioli, J., Kitano, S., And Morgan, J.E., 1996. Hyperthermia And Hypoxia Increase Tolerance Of Retinal Ganglion Cells To Anoxia And Excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 2376-2381.
- 23) Cheng Ck, Peng Ph, Tien Lt, Cai Yj, Chen Cf, Lee Yj. Bevacizumab Is Not Toxic To Retinal Ganglion Cells After Repeated Intravitreal Injection. *Retina.* 2009;29:306–312. 9
- 24) Chibber R, Ben-Mahmud Bm, Chibber S, Kohner Em. Leukocytes In Diabetic Retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2007;3:3–14.
- 25) Ciulla Ta, Rosenfeld Pj. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy For Neovascular Ocular Diseases Other Than Age-Related Macular Degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009;20:166–174.
- 26) Ciulla Ta, Rosenfeld Pj. Antivascular Endothelial Growth Factor Therapy For Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009;20:158–165.
- 27) Costa Ra, Jorge R, Calucci D, Melo La Jr, Cardillo Ja, Scott Iu. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) For Central And Hemicentral Retinal Vein Occlusions: Ibevo Study. *Retina.* 2007;27:141- 149.
- 28) Cotran, R.S., Kumar, V., And Robins, S.L., 1989. Cellular Injury And Adaptation In: *Robins Pathologic Basis Of Disease.* Wb Saunders Company, P38.
- 29) Çelebi, S., Dilsiz, N., Yılmaz, T., Ve Kukner, A.S., 2002. Effects Of Melatonin, Vitamin E And Octreotide On Lipid Peroxidation During Ischemia- Reperfusion In The Guinea Pig Retina. *Eur J. Ophthalmol,* 12(2): 77-83.
- 30) Davalos, A., Castillo, J., Serena, J., Noya, M., 1997. Duration Of Glutamate Release After Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 28: 708-710.
- 31) Ding X, Patel M, Chan Cc. Molecular Pathology Of Age-Related Macular Degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28:1–18.
- 32) Dorey Ck, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak Hp, Brown Lf. Correlation Of Vas Cular Permeability Factor\Vascu Lar Endothelial Growth Factor With Extraretinal Neovascularization In The Rat. *Arc Ophthalmol* 1996; 114: 1210 - 7.

- 33) Drejer, J., Benveniste, H., Diemer, N.H., Schousboe, A., 1985. Cellular Origin Of Ischemia-Induced Glutamate Release From Brain Tissue In Vivo And In Vitro. *J. Neurochem.* 45; 145-151.
- 34) Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., Pannekoek, W.J., Liu, W.M., Cramer, M.J., Lips, D.J., And Doevendans, P.A., 2004. Role Of Apoptosis In Reperfusion Injury. *Cardiovascular Research* 61: 414-426.
- 35) Ettaiche, M., Heurteaux, C., Blodeau, N., Borsotto, M., Tinel, N., And Lazdunski, M., 2001. Atp-Sensitive Potassium Channel In Retina: A Key Role For Delayed Ischemic Tolerance. *Brain Res.* 890: 118-129.
- 36) Ferrara N, Houck K, Lakeman L, Leung DW Molecular And Biological Properties Of The Vascular Endothelial Growth Factor Family Of Proteins. *Endocr Rev* 1992; 13: 18 -32. 48
- 37) Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science And Clinical Progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581 - 611.
- 38) Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Mimura T, Yamashita T, Hori S. Increased Levels Of Vascular Endothelial Growth Factor And Interleukin-6 In The Aqueous Humor Of Diabetics With Macular Edema. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 70 - 7.
- 39) Hagberg, H., Lehmann, A., Sanderg, M., Nystrom, B., Jacobson, I., And Hamberger, A., 1985. Ischemia-Induced Shift Of Inhibitory And Excitatory Amino Acids From Intra- To Extracellular Compartments. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 413-419.
- 40) Harding, J.J., 1997. *Biochemistry Of The Eye*. Chapman & Hall Medical, London.
- 41) Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y. Rapid Induction Of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion In Rats. *Stroke.* 1997;28:2039-2044.
- 42) Homsy 1, Daud Ai. Spectrum Of Activity And Mechanism Of Action Of VEGF Inhibitors. *Cancer Control* 2007; 14: 285 - 94.

- 43) Hosseini H, Razeghinejad Mr. Anterior Ischemic Optic Neuropathy After Intravitreal Injection Of Bevacizumab. *J Neuroophthalmol* 2009;29: 160-1.
- 44) Hurwitz H, Fehrenbach L, Novotny V, et al. Bevacizumab Plus Irinotecan, Fluorouracil, And Leucovorin For Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal Of Medicine* 2004;350:2335-42.
- 45) Ishihara, M., And Nacano, T., 2000. Postischemic Reperfusion In The Eye Of Young And Aged Rats. *Jpn J Physiol*, 50; 125-132.
- 46) Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. Vegf 164 Is Pro-Inflammatory In The Diabetic Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2155 - 62.
- 47) Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano G, Gura Y, et al. Vegf 164 Mediated Inflammation Is Required For Pathological, But Not Physiological, Ischemia Induced Retinal Neovascularization. *Exp Med* 2003; 198: 483 - 9.
- 48) 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;26:279–284.
- 49) Jardeleza Ms, Miller Jw. Review Of Anti-Vegf Therapy In Proliferative Diabetic Retinopathy. *Semin Ophthalmol*. 2009;24:87–92. 16
- 50) Jennings, R.B., Sommers, H.M., Smyth, G.A., Flack, H.A., And Linn, H., 1960. Myocardial Necrosis Induced By Temporary Occlusion Of A Coronary Artery In The Dog. *Arch. Pathol.* 70: 68-78.
- 51) Johnson, N., 1977. Retinal Glycogen Content During Ischemia. *Albrecht. Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 283: 271-282.
- 52) Karaçorlu M., Karaçorlu Sa., Özdemir H. Göz Hastalıkları Ve Anti-Vegf Tedavi İstanbul Retina Enstitüsü İstanbul 2010 15-17
- 53) Karaçorlu M., Karaçorlu Sa., Özdemir H. Göz Hastalıkları Ve Anti-Vegf Tedavi İstanbul Retina Enstitüsü. İstanbul 2010 49-50



- 54) Kaskel, D., Hockwin, O., Metzler, U., Schedtler, C.-M., 1973. Glycogen Content in The Rabbit Retina in Relation To Blood Circulation. *Ophthalmol. Res.* 5: 177-185.
- 55) Kaur C, Foulds Ws, Ling Ea. Blood-Retinal Barrier in Hypoxic Ischaemic Conditions: Basic Concepts, Clinical Features And Management. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27:622-647.
- 56) Kayaalp Os. *Tibbi Farmakoloji* 7. Baskı Feryal Matbaacılık Ankara 1995;2. Cilt 1115-1125 12.
- 57) Kern Ts. Contributions Of Inflammatory Processes To The Development Of The Early Stages Of Diabetic Retinopathy (Review). *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:95103. 18
- 58) Kliffen M, Sharma Hs, Mooy Cm, Et Al. Increased Expression Of Angiogenic Growth Factor In Age-Related Macular Degeneration. *Br J Ophthalmol*1997; 81: 154 - 62.
- 59) Kuwabara, T., Cogan, D., 1961. Retinal Glycogen. *Arch. Ophthalmol.* 66: 96- 104.
- 60) Kvanta A, Aigvere Py, Berglin L, Seregard S. Subfoveal Fibrovascular Membranes In Age-Related Macular Degeneration Express Vascular Endothelial Growth Factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1929 - 34.
- 61) Lahey Jm, Tunç M, Kearney J, Modlinski B, Kao H, Johnson Rn, Tanaka S. Laboratory Evaluation Of Hypercoagulable States In Patients With Central Retinal Vein Occlusion Under Fifty- Six Year Of Age. *Ophthalmol* 2002; 109:126-131.
- 62) Lamoreaux Wj, Fitzgerald Me, Reiner A, Hasty Ka, Charles St Vascular Endothelial Growth Factor Increases Release Of Gelatinase A And Decreases Release Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases By Microvascular Endothelial Cells In Vitro. *Microvasc Res* 1998; 55: 29-42.
- 63) Li, B., Roth, S., 1999. Retinal Ischemic Preconditioning In The Rat: Requirement For Adenosine And Repetitive Induction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 1200-1216.
- 64) Li, B., Yang, C., Rosenbaum, D.M., And Roth, S., 2000. Signal Transduction Mechanisms Involved In Ischemic Preconditioning In The Rat Retina In Vivo. *Exp. Eye Res.* 70: 755-765.

- 65) Lin Kl, Hirose T, Kroll Aj, Lou Pl, Ryan Ea. Prospects For Treatment Of Pediatric Vitreoretinal Diseases With Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition. *Semin Ophthalmol* 2009;24:70-6.
- 66) Lott Mn, Schiffman Jc, Davis JI. Bevacizumab In Inflammatory Eye Disease. *Am J Ophthalmol*. 2009;4:4. 19
- 67) Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental Growth Factor (Pigf) And Its Receptor Flt-1 (Vegfr-L): Novel Therapeutic Targets For Angiogenic Disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 979: 80 -93.
- 68) Luo Z, Diaco M, Murohara T, Ferrara N, Isner J, Symes J: Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1997, 64:993–998
- 69) Manzano Rp, Peyman Ga, Khan P, Kivilcim M. Testing Intravitreal Toxicity of Bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26:257-61.
- 70) Marmor, N.F., And Dalal, R., 1993. Irregular Retinal And Rpe Damage After Pressure-Induced Ischemia Rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 2570-2575.
- 71) Matsubara, A., Tomida,K., Matsuda, Y., And Et Al., 2000. Protective Effect Of Selectin Ligands/Inhibitor (Skk 60060) Against Retinal Ischemiareperfuzyon Injury. *Academic Pres. Exp. Eye Res.* 71: 283-293.
- 72) Mccolm Ir, Geisen P, Hartnett Me. Vegf Isoforms And Their Expression After A Single Episode Of Hypoxia Or Repeated Fluctuations Between Hyperoxia And Hypoxia: Relevance To Clinical Op. *Mol Vis* 2004; 10: 512 - 20.
- 73) Meyer P, Flammer J,Wenk M, Lüscher Tf. Local Action Of The Renin Angiotensin System In Porcine Ophthalmic Circulation: Effects Of Ace Inhibitors And Angiotensin Receptor Antagonist. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 1995;36:555-562.
- 74) Miller Dc. Arch Comment On: Use Of Perfusion Fixation For Improved Neuropathologic Examination. *Pathol Lab Med.* 1998; 122(11):949.

- 75) Miller Jw, Adamis Ap, Shima Dt, Et Al. Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Is Temporally And Spatially Correlated With Ocular Angiogenesis In A Primate Model. *Am J Pathol* 1994; 145: 574-84.
- 76) Miyamoto K, Khosrof S, Bursell Se, Et Al. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf)-Induced Retinal Vascular Permeability Is Mediated By Intercellular Adhesion Molecule-1 (Icam-L). *Am J Pathol* 2000; 156: 1733 - 9.
- 77) Monsky Wl, Fukumura D, Gohongi T, Et Al. Augmentation Of Transvascular Transport Of Macromolecules And Nanoparticles In Tumors Using Vascular Endothelial Growthfactor. *Cancer Res* 1999; 59: 4129 - 35.
- 78) Mordenti J, Cuthbertson Ra, Et Al. Comparisons Of The Intraocular Tissue Distribution, Pharmacokinetics, And Safety Of 125 I-Labeled Full-length And Fab Antibodies In Rhesus Monkeys Following Intravitreal Administration. *Toxicologic Pathology* 1999;27:536-44. 89
- 79) Mu D, Jiang X, Sheldon Ra, Et Al. Regulation Of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha And Induction Of Vascular Endothelial Growth Factor In A Rat Neonatal Stroke Model. *Neurobiol Dis.* 2003;14: 524 –534.
- 80) Murry, C.E., Jennings, R.B., And Reimer, K.A., 1986. Preconditioning With ischemia: A Delay Of Lethal Cell Injury In Ischemic Myocardium. *Circulation.* 74: 1124-1136.
- 81) Nguyen Qd, Shah Sm, Heier Js, Et Al. Primary End Point (Six Months) Results Of The Ranibizumab For Edema Of The Macula In Diabetes (Read-2) Study. *Ophthalmology.* 2009;21:21.
- 82) Nguyen QD, Shah S, Tatlipinar S, Do DV, Anden EV, Campochiaro PA. Bevacizumab suppresses choroidal neovascularisation caused by pathological myopia. *Br J Ophthalmol.* 2005 89(10):1368-70
- 83) Nguyen QD, Tatlipinar S, Shah SM, Haller JA, Quinlan E, Sung J, Zimmer-Galler I, Do DV, Campochiaro PA. Vascular endothelial growth factor is a critical stimulus for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2006 142(6):961-9

- 84) Nishijima K, Ng Ys, Zhong L, Et Al. Vascular Endothelial Growth Factor-A Is A Survival Factor For Retinal Neurons And A Critical Neuroprotectant During The Adaptive Response To Ischemic Injury. *Am J Pathol.* 2007;171:53–67.
- 85) Noma H, Minamoto A, Funatsu H, Et Al. Intravitreal Levels Of Vascular Endothelial Growth Factor And Interleukin-6 Are Correlated With Macular Edema In Branch Retinal Vein Occlusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*2006; 244: 309 - 15.
- 86) Ogata N, Yamanaka R, Yamamoto C, Et Al. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor And Its Receptor, Kdr, Following Retinal Ischemia-Reperfusion Injury In The Rat. *Curr Eye Res.* 1998;17: 1087–1096.
- 87) Osborne Nn, Casson Rj, Wood Jp, Chidlow G, Graham M, Melena J. (2004), Retinal Ischemia: Mechanisms Of Damage And Potential Therapeutic Strategies. *Prog Retin Eye Res.* 23(1), 91-147.
- 88) Osborne, N.N., And Larsen, A.K., 1996. Antigens Associated With Specific Retinal Cells Are Effected By Ischemia Caused By Raised Intraocular Pressure: Effect Of Glutamat Antagonists. *Neurochem. Int.* 29: 263-270.
- 89) Osborne, N.N., Schwarz, M., And Pergande, G., 1996. Protection Of Rabbit Retina From Ischemic Injury By Flupirtine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 274-280.
- 90) Ovalı T. Retina Dekolmanı. Nobel Kitabevi, Ankara 2001; 5-10
- 91) Ozaki H, Yu Ay, Della N, Et Al. Hypoxia Inducible Factor-1alpha Is Increased In Ischemic Retina: Temporal And Spatial Correlation With Vegf Expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40: 182–189.
- 92) Önder İ. Olanzapinin Rat Retinasında NMDA ile Oluşturulan İskemide Nöroprotektif Rolü, Düzce Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Düzce. 2007
- 93) Özbay D, Özden S, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Yaylalı V, Yıldırım C, Tatlipinar S.(2004) Protective Effect Of Ischemic Preconditioning On Retinal Ischemia-Reperfusion Injury In

Rats Can J Ophthalmol, 39, 727-32.

- 94) Özden S, Müftüoğlu S, Tatlipinar S, Kaymaz F, Yıldırım C, Yaylalı V, Özbay D.(2005), Protective Effects Of Antithrombin III On Retinal Ischemia/Reperfusion Injury In Rats: A Histopathologic Study. European Journal Of Ophthalmology, 15(3), 367-373.
- 95) Park Le, Keller Ga, Ferrara N. The Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Isoforms: Differential Deposition Into The Subepithelial Extracellular Matrix And Bioactivityof Extracellular Matrix-Bound Vegf Mol Biol Cell 1993; 4: 1317 - 26.
- 96) Patel N, Adewoyin T, Chong Nv. Age-Related Macular Degeneration: A Perspective On Genetic Studies. Eye. 2008;22:768–776.
- 97) Philipp W, Speicher L, Humpel. C. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor And Its Receptors In Inflamed And Vascularized Human Corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 2514 - 22.
- 98) Plate Kh, Beck H, Danner S, Allegrini Pr, Wiessner C. Cell Type Specific Upregulation Of Vascular Endothelial Growth Factor In An Mca-Occlusion Model Of Cerebral Infarct. J Neuropathol Exp Neurol. 1999;58:654–666.
- 99) Podos Sm, Yanoffm. Textbook Ofophthalmology. Retina And Vitreous. London 1994, C:2 8.
- 100) Poitry Yamate, C.L., Poitry, S., And Tsacopoulos, M., 1995. Lactate Release By Muller Glial Cells Is Metabolized By Photoreceptors From Mammalian Retina. J. Neurosci. 15: 5179-5191.
- 101) Poitry, S., Poitry Yamate, C., Ueberfeld, J., Macleish, P.R., And Tsacopoulos, M., 2000. Mechanisms Of Glutamate Metabolic Signaling In Retinal Glial Cells. J. Neurosci. 20: 1809-1821.
- 102) Poli, G., Albano, E., And Dianzani, M.U., 1993. Free Radicals: From Basic Sience To Medicine. Birkhauser, Basel (Switzerland), P.47.

- 103) Prince, J.H., 1964. The Rabbit In Eye Resource. C. C. Thomas, Springfield, Il.
- 104) Rabena Md, Pieramici Dj, Castellarin Aa, Nasir Ma, Avery Rl. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) In The Treatment Of Macular Edema Secondary To Branch Retinal Vein Occlusion. *Retina*. 2007; 27:419–425.
- 105) Roberts Wg, Palade Ge. Neovasculature Induced By Vascular Endothelial Growth Factor Is Fenestrated. *Cancer Res* 1997; 57: 765 - 72.
- 106) Romano C, Chen Q, Olney Jw The Intact Isolated (Ex Vivo) Retina As A Model System For The Study Of Excitotoxicity. *Prog Retin Eye Res*. 1998 Oct;17(4):465-83.
- 107) Ruiz De Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role And Therapeutic Potential Of Vegf In The Nervous System. *Physiol Rev*. 2009;89:607–648. 29
- 108) Saint-Geniez M, Maharaj As, Walshe Te, Et Al. Endogenous Vegf Is Required For Visual Function: Evidence For A Survival Role On Muller Cells And Photoreceptors. *Plos One*. 2008;3:E3554. 31
- 109) Sakamoto, K., Kuwagata, M., Nakahara, T., And Ishii, K., 2001. Late Preconditioning In Rat Retina: Involvement In Adenosine And Atp Sensitive K Channel. *Eur. J. Pharmacol.* 418: 89-93.
- 110) Sasaoka, M., Taniguchi, T., Shimazawa, M., Ishida, N., Shimazaki, Ve A., Hara, H. Intravitreal Injection Of Endothelin-1 Caused Optic Nerve Damage Following To Ocular Hypoperfusion In Rabbits. *Experimental Eye Research* 2006;83: 629-637.
- 111) Schmidt, M., Giessel, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., And Burmester, T., 2003. How Deos The Eye Breathe? Evidence For Neuroglobin-Mediated Oxygen Supply In The Mammalian Retina. *J. Biol. Chem.* 278: 1932-1935.
- 112) Sezen F. Göz Hastalıkları. Palme Yayıncılık, Ankara 2001; 299-302.
- 113) Shakib M. Ashton N. Part 2. Ultrastructural Changes In Focal Retinal Ischemia. *Brit. J. Ophtal.* 1966;50:325-384.

- 114) Shen F, Su H, Fan Y, Et Al. Adeno-Associated Viral-Vector-Mediated Hypoxia-Inducible Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression Attenuates Ischemic Brain Injury After Focal Cerebral Ischemia In Mice. *Stroke*. 2006;37:2601–2606.
- 115) Snell Rs, Lemp Ma, *Clinical Anatomy Of The Eye*. Blackwell Scientific Publication 1989;159-167
- 116) Soheilian M, Ramezani A, Obudi A, Et Al. Randomized Trial Of Intravitreal Bevacizumab Alone Or Combined With Triamcinolone Versus Macular Photocoagulation In Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*. 2009;116:1142–1150.
- 117) Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular Endothelial Growth Factor Has Neurotrophic Activity And Stimulates Axonal Outgrowth, Enhancing Cell Survival And Schwann Cell Proliferation In The Peripheral Nervous System. *J Neurosci* 1999; 19: 5731-40. 61
- 118) Stahl A, Agostini H, Hansen LI, Feltgen N. Bevacizumab In Retinal Vein Occlusion-Results Of A Prospective Case Series. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245:1429–1436.
- 119) Şahaboğlu A. DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON OLUŞTURULMUŞ SIÇAN RETİNASINDA APOPTOZİSİN İNCELENMESİ Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, 2006
- 120) Tsacopoulos, M., Poitry Yamate, C.L., Macleish, P.R., And Poitry, S., 1997. Trafficking Of Molecules And Metabolic Signals In The Retina. *Prog. Retin. Eye Res*. 17: 429-442.
- 121) Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttill Rw, Briscoe Dm, Kupiec-Weglinski Jw. Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Modulates Leukocyte Trafficking And Protects Mouse Livers Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Am J Pathol*. 2006 Feb;168(2):695-705.
- 122) Tsurui Y, Sho M, Kuzumoto Y, Hamada K, Akashi S, Kashizuka H, Ikeda N, Nomi T, Mizuno T, Kanehiro H, Nakajima Y: Dual role of vascular endothelial growth factor in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2005, 79:1110–1115

- 123) Ueno S, Pease Me, Wersinger Dm, Et Al. Prolonged Blockade Of Vegf Family Members Does Not Cause Identifiable Damage To Retinal Neurons Or Vessels. *J Cell Physiol.* 2008;217:13–22
- 124) Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Et Al. Vegf 164(165) As The Pathological Isoform: Differential Leukocyte And Endothelial Responses Through Vegfr1 And Vegfr2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 368 -74.
- 125) Wasilewa, P., Hockwin, O., And Korte, I., 1976. Glycogen Concentration Changes In Retina, Vireous Body And Other Eye Tissues Caused By Disturbances Of Blood Circulation. *Albrecht. Von Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 199: 115-120.
- 126) Weiss, H., 1972. The Carbohydrate Reserve In The Vitreous Body And Retina Of The Rabbit's Eye During And After Pressure Ischaemia And Insülin Hypoglycaemia. *Ophthalmol. Res.* 1: 360-371.
- 127) Wells Ja, Murthy R, Chibber R, Et Al. Levels Of Vaseular Endothelial Growth Factor Are Elevated In The Vitreous Of Patients With Subretinal Neovascularization. *Br J Ophthalmol* 1996; 80: 363 - 6.
- 128) Yanoff M, Duker Js. *Ophthalmolgy.* Mosby International Ltd. London 1999; 17.1-8
- 129) Yanoff M, Fine Bs. *Ocular Pathology. A Text And Atlas* 3rd Ed. Philadelphia. J.D. Lippincolt, 1989;383-389.
- 130) Yeung L, Lima Vc, Garcia P, Landa G, Rosen Rb. Correlation Between Spectral Domain Optical Coherence Tomography Findings And Fluorescein Angiography Patterns In Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology.* 2009;116:1158–1167.
- 131) Yi X, Ogata N, Komada M, Et Al. Vascular Endothezial Growth Factor Expression In Choroidal Neovascularization In Ra Ts. *Graefes Arch Czin Exp Ophthalmol* 1997;235: 313-9.
- 132) Yoneda, S., Tanihara, H., Kido, N., Honda, Y., Goto, W., Hara, H., And Miyawaki, N., 2001. Interleukin-1 Beta Mediates Ischemic Injury In The Rat Retina. *Exp. Eye Res.* 73: 661-667.



- 133) Yoon, Y.H., Marmor, M.F., 1989. Dextromethorphan Protects Retina Against Ischemic Injury In Vivo. *Arch. Ophthalmol.* 107: 409-411.
- 134) Zeng Hy, Green Wr, Tso Mo. Microglial Activation In Human Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2008;126:227–232.
- 135) Zhang, C., Rosenbaum, D.M., Shaikh, A.R., Li, Q., Rosenbaum, P.S., Pelham, D.J., And Roth, S., 2002. Ischemic Preconditioning Attenuates Apoptotic Cell Death In Rat Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 3059-3066.
- 136) Zheng L, Gong B, Hatala Da, Kern Ts. Retinal Ischemia And Reperfusion Causes Capillary Degeneration: Similarities To Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:361–367.
- 137) Zhu, Y., Ohlemiller, K.K., McMahan, B.K., And Gidday, J.M., 2002. Mouse Models Of Retinal Ischemic Tolerance. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 1903-1911.
- 138) Ziemssen F, Luke M, Messias A, Et Al. Safety Monitoring In Bevacizumab (Avastin) Treatment: Retinal Function Assessed By Psychophysical (Visual Fields, Colour Vision) And Electrophysiological (Erg/Eog) Tests In Two Subgroups Of Patients. *Int Ophthalmol.* 2008;28:101–109. 39

## RESİMLERİN DİZİNİ

ŞEKİL 1: Duyusal Retinanın Tabakaları Sayfa 9

ŞEKİL 2: İskemideki İyon Akışı Sayfa 19

ŞEKİL 3: Glutamat ve Laktat Mekanizması Sayfa 20

ŞEKİL 4: İskemideki Biyokimyasal Süreç Sayfa 22

ŞEKİL 5: Kontrol, İskemi Reperfüzyon ve Bevacizumab Gruplarına ait retina kesitlerinin karşılaştırılması Sayfa 49

ŞEKİL 6: Kontrol, İskemi ve Reperfüzyon ve Bevacizumab gruplarına ait retina kesitlerinde, TUNEL boyaması ile gösterilen apoptotik ganglion hücrelerinin (siyah ok) karşılaştırılması Sayfa 50

ŞEKİL 7: Kontrol, İskemi ve Reperfüzyon ve Bevacizumab gruplarına ait göz örneklerinde retina ve koroidin immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde VEGF boyama yoğunluğu karşılaştırılması Sayfa 51

## TABLO VE GRAFİKLERİN DİZİNİ

TABLO 1: Retina toleransı, iskemide geri dönüşümsüz hasar için geçen süre Sayfa 18

TABLO 2: VEGF'nin özellikleri Sayfa 26

TABLO 3: Kontrol ve İskemi Reperfüzyon Grupları arasında Total Gangliyon Hücre Karşılaştırması Sayfa 40

TABLO 4: Kontrol ve İskemi Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Total Gangliyon Hücre Karşılaştırması Sayfa 40

TABLO 5: İskemi ve Reperfüzyon ve İskemi Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Total Gangliyon Hücre Karşılaştırması Sayfa 40

TABLO 6: Kontrol ve İskemi ve Reperfüzyon Grupları arasında Apoptotik İndeks Karşılaştırması Sayfa 43

TABLO 7: Kontrol ve İskemi ve Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Apoptotik İndeks Karşılaştırması Sayfa 43

TABLO 8: İskemi ve Reperfüzyon ve ve İskemi ve Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Apoptotik İndeks Karşılaştırması Sayfa 43

TABLO 9: Kontrol ve İskemi ve Reperfüzyon Grupları arasında Retina Gangliyon Hücre Katı VEGF Karşılaştırması Sayfa 45

TABLO 10: Kontrol ve İskemi ve Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Retina Gangliyon Hücre Katı VEGF Karşılaştırması Sayfa 45

TABLO 11: İskemi ve Reperfüzyon ve İskemi ve Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Retina Gangliyon Hücre Katı VEGF Karşılaştırması Sayfa 45

TABLO 12: Kontrol ve İskemi ve Reperfüzyon Grupları arasında Koroid Katı VEGF Karşılaştırması Sayfa 47

TABLO 13: Kontrol ve İskemi ve Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Koroid Katı VEGF Karşılaştırması Sayfa 47

TABLO 14: İskemi ve Reperfüzyon ve İskemi ve Reperfüzyon-Bevacizumab Grupları arasında Koroid Katı VEGF Karşılaştırması Sayfa 47

GRAFİK 1: Toplam Retina Gangliyon Hücre Sayısı Sayfa 41

GRAFİK 2: Apoptotik İndeks Sayfa 44

GRAFİK 3: Retina Gangliyon Hücre Katı VEGF Miktarı Sayfa 46

GRAFİK 4: Koroid Katı VEGF Miktarı Sayfa 48