

164447

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

RETİNAL İSKEMİ-REPERFÜZYON  
HASARINDA  
TALİDOMİDİN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Semih AYDOĞAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 1026)

ELAZIĞ 2005

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. .... Prof. Dr. Özge ARDIÇOĞLU  
Dekan

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ülke Selber

..... Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülker Çeliker

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ülker Çeliker

Yrd. Doç. Dr. Tamer Demir

Yrd. Doç. Dr. Turgut İlhan

Doç. Arize Bestas

Doç. Ferit KELEB

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>5</b>
<b>3.1. GENEL BİLGİLER</b>	<b>8</b>
3.1.a. Retina anatomisi ve kanlanması	8
3.1.b. Retinal İskemi ve Reperfüzyon Hasarı	9
<b>3.2. VEGF</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Tümör Nekroz Faktörü-<math>\alpha</math></b>	<b>18</b>
<b>3.4. Endostatin</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Talidomid</b>	<b>24</b>
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>30</b>
<b>5. BULGULAR</b>	<b>36</b>
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>44</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>58</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>78</b>

## TABLO LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo-1</b> Önemli anjiogenik faktörler ve etki mekanizmaları	16
<b>Tablo-2</b> Endojen anjiogenik ve antianjiogenik faktörler	23
<b>Tablo-3</b> Retinal VEGF düzeylerinin (pg/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri	37
<b>Tablo-4</b> Retinal TNF- $\alpha$ düzeylerinin (pg/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri	38
<b>Tablo-5</b> Retinal endostatin düzeylerinin (ng/ml) ortalama, standart sapma, minimum, maksimum değerleri	39
<b>Tablo-6</b> İç pleksiform tabaka kalınlıklarının (mikrometre) ortalama, standart sapma, minimum, maksimum değerleri	40
<b>Tablo-7</b> PNL infiltrasyonunun (adet olarak) ortalama, standart sapma, minimum, maksimum değerleri	41

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil-1.</b> İskemi-reperfüzyon sonrasında meydana gelen süperoksit radikalleri ve doku hasarı	12
<b>Şekil-2.</b> Talidomidin kimyasal yapısı	25
<b>Şekil-3.</b> Kobay gözünde iskemi-reperfüzyon hasarının basınçla indüklenmesi	32
<b>Şekil-4.</b> Retinal VEGF düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	37
<b>Şekil-5.</b> Retinal TNF- $\alpha$ düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	38
<b>Şekil-6.</b> Retinal endostatin düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	39
<b>Şekil-7.</b> İç pleksiform tabakanın ortalama kalınlığının gruplar arasında karşılaştırılması	40
<b>Şekil-8.</b> PNL infiltrasyonunun gruplar arasında karşılaştırılması	41
<b>Şekil-9.</b> Plasebo grubu kobay retinası sagittal kesiti	42
<b>Şekil-10.</b> Sham grubu kobay retinasında internal limitan membran (uzun ve kısa dikey ok) ve iç pleksiform tabakada (yatay ok) PNL infiltrasyonu	42
<b>Şekil-11.</b> Talidomid grubu kobay retinası sagittal kesiti	43

## KISALTMALAR

Tumor necrosis factor-alfa	TNF- $\alpha$
Polimorfonükleer lökosit	PNL
Messenger ribonükleik asit	mRNA
İnterlökin	IL
Deoksiribonükleik asit	DNA
Protein kinaz C	PKC
Basic fibroblast growth factor	bFGF
Platelet derived growth factor	PDGF
Vascular endothelial growth factor reseptor	VEGFR
Hypoxia-inducible transcription factor	HIF
Kilodalton	kD
Major histocompatibility complex	MHC
Granulosit monosit colony stimulating factor	GM-CSF
Transforming growth factor-beta	TGF- $\beta$
Nitric oksit	NO
Monosit cemotactic protein	MCP
Cyclic adenzin monofosfat	cAMP
İnterferon	INF
Adreno corticotropin hormon	ACTH
Platelet activating factor	PAF
Mitogen activated protein kinaz	MAPK
Lipid hidroperoksid	LHP
Ciliary neurotrophic factor	CNTF
İntracelluler adhesion molecule	ICAM

## 1.ÖZET

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı iskemi-reperfüzyon hasarına maruz bırakılan kobay retinalarında VEGF, TNF- $\alpha$  ve endostatin düzeylerini ölçerek talidomidin koruyucu rolünü araştırmaktır.

Çalışmada ağırlıkları 400-550 gram arasında değişen 21 kobay herbiri rastgale seçilen ve 7 kobaydan oluşan 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (Plasebo/noniskemik grup): Bu grupta iskemi-reperfüzyon yapılmadan plasebo olarak salin solüsyonu verilerek sadece normal değerlerin saptanması amaçlanmıştır. Grup 2 (Sham grubu): Bu gruba iskemi oluşturulmadan önce ve reperfüzyon periyodu boyunca salin solüsyonu verilmesi planlandı. Grup 3 (Talidomid grubu): Bu gruba iskemi-reperfüzyon periyodu öncesi ve sonrası sistemik talidomide verilmesi planlandı.

Deney sonrası her kobayın iki gözüne enükleasyon yapılarak bir göz biyokimyasal, diğer göz patolojik çalışmaya alınmıştır.

Plasebo grubu hariç bütün gruplarda anestezi ve analjezi indüksiyonu yapıldı. İkinci ve üçüncü gruplarda retinal iskemi oluşturmak amacıyla, göz içi basıncı 150 mmHg da 90 dakika süreyle tutulmuştur. İskemi sürecinin başlangıcından 24 saat önce üçüncü gruptaki deneklere 300 mg/kg oral talidomid verildi. İskemi periyodu 90 dakika sonra sona erdirilerek göz içi basıncı normal değerlerine düşürüldü ve 6 gün sürecek olan reperfüzyon periyodu başlatıldı. Talidomid grubuna reperfüzyon periyodu boyunca 24 saat aralıklarla 300 mg/kg oral talidomid verildi. Altı gün sonra gözler enükle edildi.

Retinal dokudaki VEGF ve TNF- $\alpha$  düzeyleri sham grubunda plasebo grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.002$ ,  $p=0.002$ ). Retinal dokudaki VEGF ve

TNF- $\alpha$  düzeyleri talidomid grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0.002$ ,  $p=0.009$ ). Retinal dokudaki endostatin düzeyleri sham grubunda plasebo grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunamadı ( $p=0.08$ ). Retinal dokudaki endostatin düzeyleri talidomid grubunda plasebo grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken( $p=0.08$ ), sham grubuna göre anlamlı yüksek bulunamadı ( $p=0.1$ ).

Histopatolojik değerlendirmede, her grubun iç pleksiform tabaka kalınlığı ölçülerek talidomidin istatistiksel olarak anlamlı bir koruyucu etkisinin olmadığı görüldü ( $p=0.08$ ). Ancak yine histopatolojik değerlendirmede talidomidin retinanın i tabakalarındaki (internal limitan membran ve iç pleksiform tabakalar) PNL infiltrasyonunu engelleneyerek koruyucu bir etkisi olduğu izlendi.

İskemi-reperfüzyon hasarına maruz bırakılan gözlerde retinal VEGF, TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçüldüğünde ve retinalar histopatolojik olarak değerlendirildiğinde talidomidin retinal VEGF, TNF- $\alpha$  düzeylerini düşürdüğü ve retinanın i tabakalarındaki PNL infiltrasyonunu engelleyerek koruyucu bir rolü olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Talidomid, iskemi-reperfüzyon, retina



## **2.ABSTRACT**

### **EFFECTS OF THALIDOMIDE IN RETINAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY**

This study was performed in the Ophthalmology Department of Firat University Medical School. The purpose of this study was to determine the protective effect of thalidomide in guinea pig retina that was exposed to ischemia-reperfusion injury.

Twenty-one male albino guinea pigs weighing 400-550 g were enrolled in the study and they were divided into 3 groups each having randomly selected 7 guinea pigs. In Group 1 (Placebo/nonischemic group) no ischemia-reperfusion was induced. In group 2 (Sham group) ischemia-reperfusion was induced and saline was administered as placebo. In group 3 (Thalidomide group) both ischemia-reperfusion was induced and thalidomide was administered.

Both eyes of each guinea pig were studied and one eye was used for biochemical assay and the other for pathological evaluation.

We induced anesthesia and analgesia in all guinea pigs except for the placebo group. Then retinal ischemia was induced in group 2 and 3 by increasing the intraocular pressure to 150 mmHg for 90 minutes.

We have administered 300 mg/kg oral thalidomide in group 3, 24 hours before the onset of ischemia. After 90 minutes of ischemia, intraocular pressure decreased to normal values and reperfusion was induced for 6 days. Thalidomide group was administered oral 300 mg/kg thalidomide every 24 hours during the reperfusion period. After 6 days the eyes were enucleated.

The mean retinal tissue values of VEGF and TNF- $\alpha$  in the sham group were statistically higher than those of the placebo group ( $p=0.002$ ,  $p=0.002$ ). The mean retinal tissue values of VEGF and TNF- $\alpha$  in thalidomide treated group were observed

to be significantly lower than those of the sham group ( $p=0.002$ ,  $p=0.009$ ). The mean retinal tissue value of endostatin in the sham group was not statistically higher than that of the placebo group ( $p=0.08$ ). The mean retinal tissue value of endostatin in the thalidomide group was statistically higher than placebo group ( $p=0.009$ ), but was not statistically higher than that of the sham group ( $p=0.1$ ).

Histopathologic analysis of each group indicated that thalidomide group had not significantly ( $p=0.08$ ) protective effect in the inner plexiform layer of retina. But also histopathologic analysis of each group indicated that thalidomide group had statistically significant ( $p=0.004$ ) protective effect in the inner layers of retina (internal limitan membran and inner plexiform layers) by preventing PNL infiltration in these layers.

Our results suggest that according to retinal VEGF, TNF- $\alpha$  levels and histopathological changes in eyes those were induced to ischemia-reperfusion, thalidomide have protective role by decreasing retinal VEGF, TNF- $\alpha$  levels and preventing PNL infiltration in the inner retinal layers of retina.

**Key words:** Thalidomide, ischemia-reperfusion, retina.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetik retinopati, retinal vasküler oklüzyon, glokom, prematüre retinopatisi gibi ciddi göz hastalıklarının gelişiminde ve progresyonunda retina iskemisinin önemi çok büyüktür (1). Retinal dokuda oluşan hasarın ve iyileşmenin düzenleyicisi olan moleküller yanında patolojik süreçte rol oynayan birçok faktörün varlığı gösterilmiştir. Retinada hücrelerin birbirleriyle etkileşimi, nörotransmitter olarak adlandırılan kimyasal araçlarla ve büyüme ve besleyici faktörler olarak bilinen peptidlerce sağlanmaktadır (2).

Retina, iskemi ve sonrasındaki reperfüzyon peryoduna son derece duyarlıdır. Her iki duruma bağlı olarak hücre hasarı ve ölümü kaçınılmazdır. Genel olarak reperfüzyon inflamatuvar mediatörlerin sentezini, oksijen kaynaklı serbest radikalleri, lipid mediatörlerini ve kan kaynaklı hücrelerin aktivasyonunu indüklemektedir (3,4).

Retinada yaygın şekilde perfüzyonun bozulması ile geniş hipoksik alanların teşekkülü ve anjiyogenik stimulus ile ilişkili olarak yeni damar oluşumları görülmektedir. Yeni damar yapımı (anjiogenez, neovaskülarizasyon) vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiyogenez ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopatiler ve psöriazis gibi hastalıklarda görülür (5). Anjiogenez çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçlerde ve anjiogenez patogenezinde çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Anjiyogenik sürecin başlamasında, anjiyogenik uyarıcılarla inhibitörler arasındaki net dengenin düzenleyici rol oynadığı öne sürülmektedir. Bir başka deyişle, inhibitörlerin aktivatörlere baskın olmasının anjiogenez sürecinin kapalı tutulmasını sağladığı, aktive edici uyarılarda bir artış olması durumunda ise anjiogenez sürecinin başladığı düşünülmektedir (6).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) in vitro olarak endotel hücresi mitojeni etkisi göstermekte, in vivo olarak da vasküler geçirgenliği ve anjiogenezi artırmaktadır (7).

VEGF mRNA hipoksik durumlarda fazlaca eksprese edilir. Vaskülarize tümörlerde, lösemi, endometriozis ve psöriazis gibi birçok hiperproliferatif hastalıklarda ekspresyon artışı gösterilmiştir . Birçok dokuda düşük doz VEGF'in normalde de üretildiği bilinmektedir. Gözün endotel hücreleri, perisitler, glia hücreleri ve gangliyon hücreleri de VEGF'i eksprese edebilirler (8). Proliferatif diabetik retinopatili hastalarda aktif intraoküler neovaskülarizasyon dönemlerinde intraoküler VEGF konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir (9).

İskemik hasarı takiben hücrel savunmanın endojen mekanizmaları hasarı en aza indirmek için harekete geçerler. İşte tam bu sırada retinal iskeminin tedavisi için uygulanacak potansiyel nöroprotektif stratejiler bu koruyucu mekanizmaları taklit ederek veya aktifleyerek iskemik hasarı önleyebilir. Böyle bir etkiyi yaratabilmek için koruyucu mekanizması tam olarak bilinen veya endojen benzerleri ile doyurularak etkisi kanıtlanmış bir takım savunma mekanizmalarını farmakolojik olarak taklit ederek veya aktifleyerek harekete geçirmek akla uygun gelmektedir. İnsan hücrel savunma mekanizmaları ısı şok proteinleri (Hsps), antiinflamatuvar sitokinler, antioksidan enzimler, nörotrofinler ve K-ATP kanallarını açarak inhibitör nörotransmitterler (GABA ve Adenozin) ile glukoz taşıyıcılarının salınımını arttırmak suretiyle harekete geçmektedir (10,11). Retinada iskemi sonrası Hsp-70 ve Hsp-27 değerlerinin arttığı (12-14) ve retinal iskemi sonrası elektriksel olarak uygulanan Hsp-27'nin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı gangliyon hücrelerindeki direnci arttırdığı bildirilmiştir (15). Ayrıca retinal iskemi öncesi intravitreal olarak

uygulanan interlökin-1 (IL-1) reseptör antagonist analoglarının iskemik hasarı azalttığı bildirilmiştir (16).

Endostatin, hemanjiyoendoteliyom tarafından üretilen bir anjiyogenik inhibitördür (17). Endostatin, özgül olarak endotel hücresi proliferasyonunu ve güçlü bir şekilde anjiyogenezi ve tümör büyümesini, ayrıca, umbilikal ve endotel hücrelerinin VEGF tarafından uyarılan göçünü inhibe eder (18).

Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), inflamatuvar ve immun fonksiyonlarda potent bir parakrin ve endokrin medyatördür. Endotel hücre fonksiyonlarını düzenler ve vücudu enfeksiyon hastalıklarına karşı korur (19). Retinada iskemi sonrası inflamasyon ile aktive olan makrofaj/mikroglia hücrelerinden salgılanan TNF- $\alpha$  tavşan modellerinde retinal neovaskülarizasyona yol açtığı görülmüştür. TNF- $\alpha$ 'nın bu etkisini mikrovasküler endotel hücrelerdeki interlökin-8 (IL-8), VEGF ve basic fibroblast growth factor (bFGF) gibi anjiyogenik faktörleri düzenleyerek yaptığı bilinmektedir (20).

Talidomid 1950 ve 60'larda hamile kadınlarda antiinflamatuvar ve sedatif etkisi için kullanıldıktan hemen birkaç yıl sonra teratojen etkisi ortaya çıkan ve uzun süre kullanımdan kaldırılmış bir ilaçtır. Ancak otoimmün ve inflamatuvar olaylarda etkin olması nedeniyle kullanımı tekrar gündeme gelmiştir (21). Esas etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte talidomid, TNF- $\alpha$  mRNA yapımını azaltarak TNF- $\alpha$  üretimini azaltmaktadır (22).

Biz çalışmamızda, deneysel olarak oluşturduğumuz retinal iskemi-reperfüzyon hasarında, sistemik olarak uygulanan talidomidin retina dokusu üzerindeki koruyucu etkisini retinal VEGF, TNF- $\alpha$ , endostatin düzeylerini ölçerek ve karşılaştırarak araştırdık.

### **3.1 GENEL BİLGİLER**

#### **3.1.a. Retina anatomisi ve kanlanması**

Santral sinir sisteminin göz içindeki devamı kabul edilen retina, embriyoda optik kapın iç ve dış tabakalarından farklılaşmış, ince, şeffaf yapıda, ışık sinyallerinin sinirsel iletiye dönüştürüldüğü, dolayısıyla görmenin sağlanması için en gerekli ve en önemli tabakadır (23).

Retina, içte duysal retina ve dışta pigment epiteli olmak üzere iki esas bölümden oluşan ve optik sinirden ora serrataya kadar uzanarak vitreus boşluğunun arka bölümünü çevreleyen transparan bir dokudur. Ön tarafta silyer cisim epiteli olarak devam eder. Kalınlığı optik disk kenarında 0.56 mm, ora serratada 0.1 mm olup fovea merkezinde en incedir. Geleneksel olarak ve ışık mikroskobu bulgularına dayanarak retina 10 ayrı kat olarak incelenir (24).

Retina damarları saydamdır ve oftalmoskopide sadece içlerindeki kan görülür. Yapı ve büyüklükleri göz önüne alındığında retina damarları arter ve ven olarak adlandırılrsa bile aslında arteriol ve venüldür. Ven çapları arter çaplarından yaklaşık 1.5 kere daha fazladır, kapillerler ise görülmezler. Retina santral sinir sisteminin özellikli bir komponenti olarak çift kan temini sistemine sahiptir. Retina beslenmesini iç karotis arterin dalı olan oftalmik arterden çıkan santral retinal arter (SRA) ve silier arterlerle sağlar (25). SRA terminal arter olduğundan tıkanıklığında retina infarktüsü gelişir. Hücre gövdeleri dış nükleer tabakada olan fotoreseptörler ve dış pleksiform tabaka arası indirekt olarak koroid kapillerlerinden difüzyonla beslenmektedir. İç retina tabakaları (iç limitan membranla iç nükleer kat arası) santral retinal arter dalları ile beslenmektedir. SRA globa 10 mm. kala optik sinire girer ve santral retinal vene yakın bir şekilde eşlik eder. Optik diski terkeden santral retinal arter düzensiz ama kendine özgü bir şekilde retinada yayılır. Ana damarlar internal limitan membranın

hemen arkasında sinir lifleri tabakasında yüzeyel olarak uzanırlar ve aynı seviyede ayrılan arterioller dallar verirler . Ayrıca popülasyonda % 15-30 oranında bulunan ve yalnızca maküler bölgeyi besleyen silier dolaşımdan köken alan silio-retinal arter veya arterioller vardır. Bu şekilde avasküler dış retina tabakaları (dış pleksiform ve fotoreseptörler arası) ve foveal avasküler zon hariç tüm retina kanlandırılır. Damarların etrafında bir ark oluşturdukları foveal avasküler zon 0,5 mm. çapındadır (26).

Ana retinal damarların oluşturduğu iki kapiller ağdan yüzeyel olanı sinir lifleri tabakasında yer alırken, derin kapiller ağ iç nükleer tabaka ile dış pleksiform tabaka arasındaki sınır düzleminde uzanmaktadır. Bu iki tabaka arasında anostomozlar bulunmasına rağmen ana retinal arterler end-arter şeklinde olup iç anostomozlar bulundurmazlar. Retinal arter dal oklüzyonu sadece arteriolün beslediği bölgedeki iç retinada iskemiye neden olurken, santral retinal arter oklüzyonu tüm iç retinada iskemiye neden olmaktadır. Dış retinal tabakalarda iskemi ancak koryokapillaris yetmezliği veya regmatojen retina dekolmanına bağlı retina pigment epiteli ayrışmasına bağlı ortaya çıkmaktadır . Tam kat retinal iskemi ve infarktusu dev hücreli arteritte olduğu gibi oftalmik arter oklüzyonuna sebep olan nadir durumlarda ortaya çıkar (27).

### **3.1.b.Retinal İskemi ve Reperfüzyon Hasarı**

Retinal iskemi, körlük ve görme bozukluğunun en sık sebeplerinden biridir. Hücresel seviyede iskemik retinal hasar kendi kendini destekleyen harap edici bir süreç olup, sinirsel depolarizasyon, kalsiyum akışı, enerji açığı ile başlayan oksidatif stres ve artmış glutamaterjik uyarı ile karakterizedir (28). Birçok hayvan modeli ve analitik teknikler uygulanarak retinal iskemi anlaşılmasına çalışılmış, iskemik süreci

durduracak ve retinal iskeminin verdiği zararı azaltacak birçok çalışma yapılmıştır. Ancak laboratuvar çalışmalarının başarısı kliniğe yansıtılamamıştır. Uygulama yöntemlerindeki zorluklar, dozaj, yan etkiler deneysel çalışmaların klinikte kullanılabilir özelliklerini engellemiştir (29-31).

İskemi kelimesi, Yunanca "iskho" yani geri alınma ile "haima" yani kan kelimelerinin birleşiminden meydana getirilerek ilk defa Virchow tarafından tıp literatürüne kazandırılmıştır. İskemi, bir dokuya kan akımının yetersizliğini ve hücrenel enerji ihtiyacının karşılanmasındaki yetersizliği ifade eden patolojik bir durumdur. İskemi, anoksi (tamamen oksijen yokluğu) ve hipoksi (oksijen azlığı) ile karıştırılmamalıdır çünkü iskemi her zaman hipoksi ve anoksi komponentleri ile birlikte görülmektedir ancak hipoksi ve anoksi her zaman iskemiye kapsamamaktadır (32).

İskemi dokuları  ihtiyacından yoksun bırakır:

1. Oksijen
2. Metabolik substratlar
3. Artık rnlerin uzaklaştırılması.

Bu ihtiyaçların giderilememesi hemostatik cevabı azaltacak ve zamanla doku hasarını artıracaktır. Eğer bu durum uzun sürerse doku ölecektir ( infarktus ) (32).

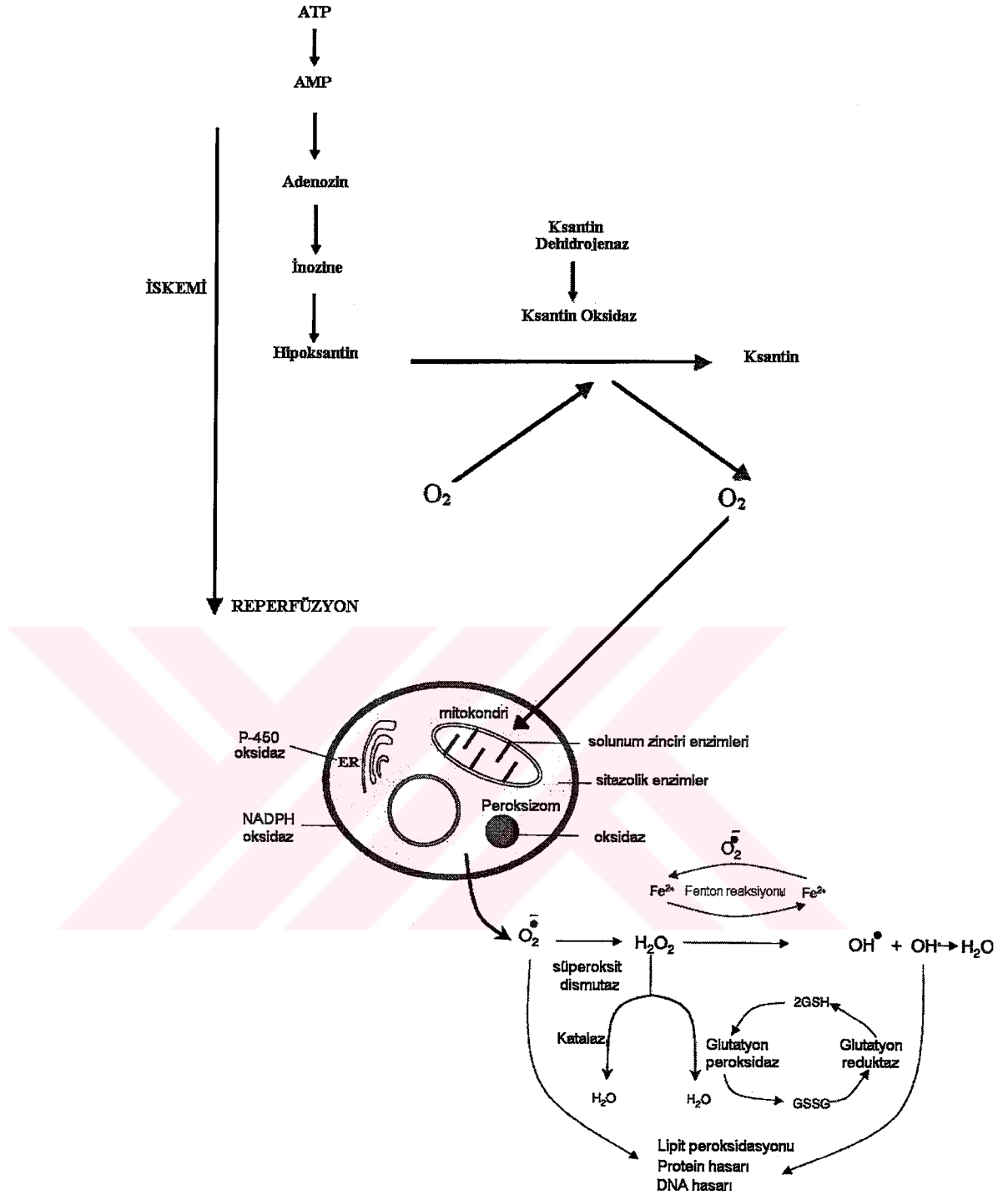
İskemi oluşmuş dokuda kan akımı yeniden sağlandığında ortaya çıkan hasara ise reperfüzyon hasarı denmektedir. İskemik dokudaki hasarın sadece iskemi tarafından oluşturulduğu düşünülürken, son yıllardaki çalışmalar reperfüzyonun bu hasarda önemli bir rol aldığını göstermiştir (33-35).

Hipokside ilk etkilenen mitokondrial oksidatif fosforilasyonla sağlanan hücrenin aerobik solunumudur. Bu esnada, adenozin trifosfat (ATP) yapımı yavaşlamakta ya da durmaktadır. Bu durum sodyum pompası yetersizliğine neden



olacak şekilde ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. İyon tutulumuna izo-ozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrel şişme meydana gelmektedir. Hücrede ATP azalınca adenozin monofosfat (AMP) birikmekte, bu da anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezini artırarak hücreye enerji sağlamaktadır. Glikolizis laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine yol açmakta ve bu durum hücre içi pH'ı düşürmektedir. Bunu izleyen süreçte, granüler endoplazmik retikulumdan ribozomları ayrılması ve polizomların bozulmasıyla monozomlar oluşmaktadır. Hipoksi devam ederse, membran geçirgenliği azalmakta ve sonuçta hücre yüzeyinde yerel şişkinlikler oluşmaktadır (36,37).





**Şekil 1- İskemi-reperfüzyon sonrasında meydana gelen süperoksit radikalleri ve doku hasarı. ER: Endoplazmik retikulum. GSH: İndirgenmiş glutasyon. GSSG: Okside glutasyon. NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat.**

İskeminin başlamasıyla birlikte hücrenin aerobik solunumu etkilenmekte ve doku hücrel ATP düzeyinde azalma olmaktadır. ATP yıkımı sonunda hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikmekte ve bir ön enzim olan ksantin dehidrogenaz enzimi, ksantin oksidaza dönüşmektedir. Bu nedenle reperfüzyon esnasında sistemde açığa çıkan aşırı oksijen nedeniyle endoplazmik retikulum, mitokondri, plazma membranı ve sitazolde aşırı süperoksid anyonu ( $O_2^-$ ) üretilmektedir. Süperoksid anyonunun oluşması ile zincirleme reaksiyonlar başlamakta ve endotel hücrelerinde diğer oksijen radikalleri ile birlikte hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşmaktadır. Daha sonra  $H_2O_2$ ,  $Fe^{3+}$ 'in  $Fe^{2+}$ 'ye dönüştüğü ve süperoksit anyonları tarafından katalizlenen fenton reaksiyonu ile  $OH^-$  anyonuna dönüşmektedir. Major antioksidan enzimler süperoksitdismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein ve DNA hasarına neden olmaktadır. Ayrıca anaerobik metabolizma sonucunda laktik asit oluşmakta, hücre membranı boyunca iyon gradienti kaybı ile hücrel mekanizmalar hasara uğramaktadır (37,38). (Şekil-1)

İskemi döneminde tekrar doku kan akımı sağlanırsa doku hasarı geri dönüşümlü olmakta, iskeminin devam etmesi halinde geri dönüşümsüz zedelenme oluşmaktadır. Geri dönüşümsüz zedelenme sonucu mitokondrilerde ileri derecede vakuolizasyon, hücre zarlarında aşırı yıkım, lizozomlarda şişme görülmektedir (32).

Retina, diensefalonun bir uzantısı olarak beyin ile birçok fonksiyonel ve yapısal benzerlikler içermektedir. Beyin ile karşılaştırıldığında retinanın kendine has ve özellikli çevresel yapısı ile iskemik hasara anlamlı bir şekilde bir doğal direncinin bulunduğu görülmektedir. Retinanın iskemiye gösterdiği rölatif direnç beyin ile retina arasındaki en göze çarpıcı farktır. Nöroproteksiyona dayalı tedavi stratejileri beyin iskemilerinde hayal kırıklığına uğraticı sonuçlar vermiştir. Beyin birkaç dakikalık

iskemiye çok geniş bir hasar veya ölümle cevap verebilirken retina 100 dakikalık iskemiye hasarsız yanıt verebilir (39). Retinada, hemoglobin ve miyoglobin ile uzaktan ilişkili, nörona özel solunumsal bir protein olan nöroglobin yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Beyindeki 100 katı kadar olan bu protein retinada özellikle fotoreseptörlere yerleşmiştir (40). Retinanın iskemik modellerinde fotoreseptörlerde, iç retinaya oranla daha az fonksiyonel ve yapısal hasar görülmesinin nedeni henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Ancak bu gerçeğin üç temel nedene dayandığı düşünülmektedir.

1. Lokal enerji substratları mevcuttur (vitreusda önemli miktarlarda glukoz, retinada glikojen deposu vardır.) (41).
2. Bu enerji substratları retinal iskemi periyodu boyunca boşalmaktadır (42,43).
3. İzole retina oksijen yokluğunda bile glukolizis ile glukozdan ATP sentezleyebilir (44).

Retinal iskeminin karışık patofizyolojisi retina ve vasküler desteği arasındaki dinamik ilişki ile alakalıdır. Koroid, retina ve optik sinir başı kan akımlarının tek tek veya hepsinin birden etkilenmesi retinada değişik patolojik durumlara yol açacaktır. Kan akımı kesildiğinde retinadaki değişik hücre tipleri farklı şekillerde bu durumdan etkilenecektir.

### 3.2 VEGF

İlk kez Ferrara ve Davis-Smyth tarafından tanımlanan VEGF yaklaşık 45 kilo dalton (kD) ağırlığında bir homodimerik glikoprotein olup, oldukça etkili damar endotel hücre mitojenidir (45). VEGF fizyolojik ve patolojik neovaskülarizasyondan sorumludur. Histaminden elli bin kez daha fazla damar geçirgenliği üzerine etkin olduğundan ilk tanındığında vasopermeabilite faktör olarak isimlendirilmiştir (46).

Tek bir VEGF allelinin kaybı erken embriyonik ölüme sonuçlandığından normal embriyogenezis için VEGF gereklidir. Yenidoğan farelerde VEGF inhibisyonu böbrek glomerüllerinde anormal gelişime, böbrek yetersizliğine, karaciğer gelişiminde geriliğe, anormal trabeküler kemik oluşumu ve korpus luteum yokluğuna yol açar (47).

VEGF spesifik olarak endotel hücrelerinden salınmaktadır. Birçok patolojik dokuda bulunduğu gibi, normal dokuların yapısında da yer almaktadır (48). VEGF'in A, B, C, D, E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF'nin aynı gen üzerinden 4 farklı (121, 165, 206, 145 aminoasit içeren) formu bulunmaktadır. İnsan VEGF'in çeşitli izoformlarının herbiri ayrı heparin bağlama yeteneğinde, çeşitli doku dağılımı gösteren ve hipokside artan, aynı zamanda etkili birer damar geçirgen faktördür (49).

VEGF fosfolipaz C'yi aktive ederek hücre içi kalsiyum miktarını artırır. Kalsiyum artışı proliferasyonda görev alan fosfolipit bağımlı kinaz ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna neden olur (50). Endotel hücre proliferasyonunda önemli yeri olan PKC'nin alfa , beta1, beta2, zeta, teta, epsilon gibi farklı izomerleri vardır. Vasküler endotel hücre plazma membranlarında PKC sigma izoformu hariç diğer tüm izoformlar bulunmasına rağmen VEGF aktivasyonunu gerçekleştiren kalsiyum bağımlı alfa ve beta 2 izoformlarıdır. PKC'nin endotel fonksiyonu, vasküler geçirgenlik ve anjiogenezis üzerine etkileri bilinmektedir. PKC beta 2 izoformunun aktivasyonu VEGF'in mitojenik etkisinden sorumlu olmakla beraber PKC alfanın adenoviral overekspresyonu endotel hücre migrasyonunu hızlandırmakta ve PKC sigmanın aktivitesini azaltmaktadır (51). Staurosporine, H-7 ve calphostin C gibi nonspesifik PKC inhibitörleri VEGF'in mitojenik ve anjiogenik etkilerini anlamlı olarak azaltmaktadır (52).

Anjiyenezde VEGF'in yanısıra Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2, bFGF), Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), Epidermal Growth Factor (EGF), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi birçok ajan rol alır. Bunlar; tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden ve kollajen matrisin yıkımı sonrasında açığa çıkabilirler (53). Diğer önemli anjiyjenik faktörler ve etki mekanizmaları Tablo 1'de görülmektedir.

**Tablo 1- Önemli Anjiyjenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları**

FAKTÖR	ETKİ MEKANİZMASI
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Endotelyal mitojen, Survival faktör, Permeabilite indükleyici
Basic Fibroblast Growth Faktör (bFGF / FGF-2)	Endotelyal mitojen, Anjiyenez indükleyici Survival faktör Flk-1 Ekspresyon indükleyici
FGF-1, FGF-3, FGF-4	Endotelyal mitojen Anjiyenez indükleyici
Transforming Growth Factor - $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Endotelyal mitojen Anjiyenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Epidermal Growth Factor	Zayıf endotelyal mitojen VEGF ekspresyonu indükleyici
Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor ( HGF/SF )	Endotelyal mitojen, mitojen Anjiyenez indükleyici
Transforming Growth Factor - $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Endotelyal büyüme inhibisyonu Anjiyenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Tumor Necrosis Factor - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Endotelyal mitojen Anjiyenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Platelet Derived Growth Factor ( PDGF )	Endotelyal mitojen Endotelyal motilite faktörü Anjiyenez indükleyici

VEGF etkisini tirozin kinaz (flt-1) ile “fetal liver kinase” 1’in insandaki karşılığı “kinase insert domain containing receptör” (flk-1/ KDR) olarak bilinen iki reseptörü aracılığıyla ortaya çıkarır (54,55). Bu reseptörler otofosforile olan tirozin kinaz proteinleri olup VEGF bağlarlar. VEGFR-1 endotel hücre proliferasyonundan ve anjiogenezisten sorumludur. VEGFR-2 (flk- 1 KDR) ise hematopoez ve endotel hücrelerinin başlangıç proliferasyonunda görev almaktadır (56). Son zamanlarda VEGFR-3/flt4 olarak tanımlanan ve lenfanjiogenezisin moleküler regülasyonundan sorumlu olduğu bildirilen bir başka reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-3/flt4 tümör metastazı, lenf ödem gibi birçok patolojik olayda yer alır (57). Renal mezankimal hücreler, monositler, kan hücreleri ve retinada da varolmalarına rağmen esas olarak endotel hücreleri bu reseptörleri ekspresse ederler. Bu reseptörler RPE’ye bakan koriokapiller endotelinde yüksek oranda bulunurlar. Reseptör uyarımının monosit ve vasküler düz kas göçü ile von Willebrand faktör salınımına yol açtığı gösterilmiştir (58,59). VEGF intravitreal verildiğinde retinal damarlarda dilatasyon oluşturur (60).

VEGF mRNA hipoksik durumlarda fazlaca ekspresse edilir. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (61). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda eritropoetinin retinada endojen bir koruyucu faktör olduğu gösterilmiştir (62,63). Hipoksik retinada salınımı artan eritropoetinin iskemik hasar başlamadan önce veya başladıktan hemen sonra sistemik olarak verilmesinin iskemik hasarı azaltacağı bildirilmiştir (64). Hipoksiye duyarlı faktör-1 bağlayan alanın gen sırasıyla yakın ilişkisinden dolayı eritropoetin de aynı mekanizma ile artar (63). VEGF’in salınımında en önemli iki faktör hipoksi ve inflamasyondur. Hipoksiye maruz bırakılan retinada, VEGF düzeyi anlamlı olarak artmaktadır (65).

Vaskularize tümörlerde, lösemi, endometriozis ve psöriazis gibi birçok hiperproliferatif hastalıklarda ekspresyon artışı gösterilmiştir. Özellikle glioma, pileositik astrositoma, menenjioma gibi beyin tümörlerinde miktarı artmaktadır (58).

Diyabetik proliferatif retinopati gelişiminde kan retina bariyerini bozarak etkili olan VEGF gözün kapiller endotel hücreleri, perisitler, glia hücreleri ve gangliyon hücreleri tarafından da ekspresse edilebilir. Retina kapiller endotel hücrelerinde in vitro olarak VEGF reseptörleri gösterilmiştir (66,67).

### 3.3 TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ ALFA

Polipeptid yapıda hormon olan kaşektin/tümör nekroz faktörü (TNF) infeksiyon, doku hasarı patogenezinde ve doku homeostazisi ile host defansında yer alan bir mediatördür (68). Kaşektin/TNF ismi molekülün ikili tarihçesini yansıtır. Kaşektin isimlendirilmesi, TNF'nin kaşeksinin moleküler temelinde önemli olduğunu düşünen araştırmacılar tarafından ilk olarak kullanılmıştır. TNF- $\alpha$  ise tümör hücre dizilerine karşı sitotoksik etkileriyle ilgilenen araştırmacılar tarafından izole edilmiştir. Kaşektinin amino asid dizisinin belirlenmesi ve kaşektin ile TNF- $\alpha$ 'yı kodlayan genler için c-DNA'nın klonlanması iki molekülün özdeş olduğunu doğrulamıştır (69,70). İnsan kaşektin/TNF 233 amino asidlik bir prohormon olarak üretilip, 76 rezidü amino asidin (sinyal peptidini oluşturan kısmın) ayrılmasıyla 157 rezidü amino asidden matür protein oluşur. Molekül ağırlığı 17 kD dir (71). Matür TNF polipeptidi bir başka sitokinle, lenfotoksin (TNF- $\alpha$ ) ile ortak bir 28 amino asidlik sekans homologluğu içermektedir. Böylece bazı biyolojik aktivitelerde ortak olmakta ve bu moleküller ortak bir reseptör için yarışmaya girebilmektedir. İnsanda kaşektin/TNF ve lenfotoksin, 6 no'lu kromozomun kısa kolu üzerindeki ayrı genler tarafından kodlanmaktadır (72,73).



TNF, çeşitli aktive fagositik ve nonfagositik hücrelerde sentezlenir. Bunlar arasında makrofajlar, monositler, lenfositler, NK (Natural Killer) hücreler, beyindeki astrositlerle, mikroglia hücreleri, karaciğerdeki Kupffer hücreleri yer almaktadır. İnfeksiyöz uyarının TNF sentezini tetikleyebilme kapasitesine sahip olması, molekülün infeksiyonda esas rolü oynadığını düşündürmektedir, çünkü bakteriyel endotoksinler/lipopolisakkaridler, enterotoksin, toksik şok sendromu toksini-1, mikobakteriyel kord faktörü, virusler, C5a, mantar ve parazit antijenleri, interlökin-1 (IL-1) ve otokrin bir şekilde kaşektin/TNF'nin kendisi TNF sentezini tetikleyebilen unsurlardır (74).

TNF- $\alpha$  reseptörleri iki tiptir: Tip 1(TNF-P 55), tip 2 (TNF-P 75). Bunlar TNF- $\alpha$ 'yı ve lenfotoksini fikse eden transmembraner proteinlerdir. Kortikosteroidler, pentoksifilin, talidomid ve metotreksat (MTX) TNF sentezini inhibisyona uğratar. En spesifik inhibisyonu TNF- $\alpha$  ve monoklonal antikorları (veya onun membran reseptörlerini) nötralize eden veya sitokin ile membran reseptörü arasındaki karşılıklı etkileşim kompetisyonuyla etki eden TNF'nin solubl-reseptörleri sayesinde elde edilmiştir. TNF karaciğer, kas, akciğer, bağırsak ve böbrek gibi normal dokulardaki yüksek afiniteli membran reseptörleriyle etkileşime girer (75).

TNF postreseptör düzeyde adipo sitlere spesifik mRNA sentezini suprese etmekte ve preadipo sitlerin morfolojik diferansiyonunu önlemektedir. Bu hormon etkisiyle lipoprotein lipaz sentezi transkripsiyon seviyesinde durdurulmaktadır. Kaşektin ayrıca Sınıf 1 major histokompabilite kompleksi (MHC) antijenlerinin, GM-CSF ve IL-1 sentez ve salınımını indüklemektedir (76).

TNF'nin uyardığı mediatörler şunlardır:

1. Peptid regülatuvar faktörleri: IL-1, IL-6, Granulositmonosit-koloni stimulatör faktör (GM-CSF), kaşektin / TNF, PDGF (platelet derivated growth factor), TGF- $\beta$
2. Eikozanoidler: Prostaglandinler, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör.
3. Hormonlar: Kortikotropin / kortizol, adrenalin, noradrenalin, glukagon (76,77)

Son çalışmalar göstermiştir ki; kaşektin damar endotelindeki hemostatik özellikleri değiştirmekte bunu da prokoagülan aktiviteyi indükleyerek ve hücre yüzeylerindeki trombomodulin ekspresyonunu inhibe ederek yapmaktadır. Bu etkilerle trombüsün büyümesini sağlar, DİK (Dissemine İntravasküler Koagülasyon) gelişebilir ve tümör damarlarında da oklüzyona neden olabilir. Endotel hücrelerinde antijenik ifadeyi değiştirebilir, IL-1 i sentezletir, hücrelerde yeniden düzenlenmeye neden olabilir (78,79).

TNF- $\alpha$ , lökositlere karşı, endotel hücre yüzeyini adezyon molekülleri aracılığıyla daha yapışkan hale getirerek, damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerini dışa salmalarına neden olur. İnflamatuvar lökositleri, özellikle nötrofilleri mikroorganizmaları öldürecek şekilde aktive eder. Viruslara karşı koruyucu interferon benzeri etki gösterir. TNF- $\alpha$  salgılandığında IL-1, IL-6, kemokinleri ve TNF-'nın kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir (80).

TNF ve TNF reseptör ailesi T hücrelerinin aktivasyonu, farklılaşması ve etkili yanıtında anahtar rol oynamaktadır. TNF'nin primer T hücreleri için mitojenik olduğu gösterilmiştir (81).

TNF- $\alpha$  iskemik retina hasarında önemli rol oynayan nitrik oksit (NO) sentezini uyarır. NO çok güçlü vasküler tonus düzenleyicidir (82,83). Önemli bir

mesajcı olan NO, arjininin sitrülline dönüşümü sırasında üç değişik izoformu olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenir. Fazla miktarda NO üretimi retinal iskemi sonrası nöronal hasara neden olmaktadır (84). NO sekresyonunu uyaran TNF- $\alpha$ 'nın inhibisyonu NO'in retina üzerindeki zarar verici etkilerini de azaltacaktır. Yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın inhibisyonu ile NOS aktivitesinin de azaldığı görülmüştür. Ek olarak sistemik TNF- $\alpha$ 'nın nötralizasyonu ile beyin iskemisi ve deneysel otoimmün uveoretinitlerde hedef organ hasarını engellediği izlenmiştir (82,85). Yenidoğan farelerde 7 gün boyunca % 75 oksijen ile oluşturulan retina hasarında makrofaj/mikroglia hücrelerinden sentezlenen TNF- $\alpha$ 'nın retinal düzeylerinin ve buna bağlı olarak MCP-1 (monosit kemotaktik protein -1), IL-8, bFGF (basic fibroblast growth factor) gibi anjiogenezisi düzenleyen faktörlerin hücrese mRNA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (20).

Geçici retinal iskeminin hızlı ve persistan TNF- $\alpha$  upregülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (86,87). Reperfüzyonun erken safhasında TNF- $\alpha$ 'nın kaynağı gangliyon hücreleri, amakrin hücreler ve Müller hücrelerini içeren iç retinadır. Burada salgılanan TNF- $\alpha$ 'nın zararlı veya yararlı bir etken olup olmadığını anlamak için birçok deneysel araştırma yapılmıştır (32,88). İskemiye maruz bırakılan glial hücrelerin TNF- $\alpha$  sentezleyerek retinal gangliyon hücrelerinin ölümünü hızlandırdığı bilinmektedir (82).

### **3.4 ENDOSTATİN**

Endostatin ilk kez 1997'de O'Reilly ve arkadaşları tarafından tanımlanan hemanjiyoendotelyom tarafından üretilen bir anjiyogenik inhibitördür (89). Endostatin, kollajen XVIII'in 20 kD ağırlığındaki karboksi terminal parçası olarak endotel hücresi proliferasyonunu ve güçlü bir biçimde anjiyogenezi ve tümör

büyümesini inhibe eder (90). Kollajen XV (Endostatin XV)'in C-terminal ucu Endostatin XVIII gibi anjiyogenezi inhibe etmektedir ancak birçok fonksiyonel farklılıklara sahiptir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda endostatinin vasküler ve epitelyal bazal membranın bir parçası olduğu görülmüştür (91).

Endostatin, trombospondin, interferon alfa ve beta, prolaktin, trombosit faktörü 4 ve anjiyostatin gibi birçok endojen anjiyogenez inhibitörü bildirilmiştir (89,92-95). Endostatin, büyüme faktörleri uyarısıyla tutulan heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanarak anjiyogenezi inhibe etmektedir (90). Endojen anjiyogenik faktörler ve anti-anjiyogenik faktörler Tablo 2'de görülmektedir.



**Tablo 2- Endojen Anjiogenik ve Anti-anjiogenik Faktörler**

<b>Anjiogenik Faktörler</b>	<b>Antianjiogenik Faktörler</b>
VEGF	Trombospondin-1 ve -2
bFGF	Endostatin
TGF- $\alpha$ ve $\beta$	Angiostatin
PDGF	Interferon- $\alpha$ , - $\beta$
HGF/SF	İnterlökin -12
TNF- $\alpha$	Platelet Faktör -4 fragmanı
EGF'ler	Angiopoietin-2
Plasental büyüme faktörü	İnsan makrofaj metalloelastaz
Tissue Factor	TIMP-1 ve -2
IL-6 ve IL-8	VEGF
Angiogenin	Vasostatin
Angiopoietin-1	Anti-trombin III fragmanı
Siklooksijenaz - 2 ( COX-2)	
Nitrik Oksit (NO)	

Endostatin, hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile apoptozisde etkili olan genlerin down-regülasyonunu yapmakta ve hücre kültürlerinde  $Ca^{2+}$  ve cAMP aktivitesini artırmaktadır (96).

Endostatinin esas etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte in vitro laboratuvar çalışmalarında tümör hücreleri , fibroblastlar, düz kas hücreleri gibi nonendotel hücrelere etkisinin olmadığı sadece endotel hücrelerine özel bir etkisinin olduğu bilinmektedir. Endostatin umbilikal ven endotel hücrelerinin VEGF tarafından uyarılan göçünü inhibe eder (97,98).

Endostatin solid tümörlerde yeni bir tedavi alternatifi olarak toksik olmayan ve ilaç direncinin izlenmediği bir ajandır (99).

Bazal membranın yapısında bulunan endostatin, insan gözünde kollajen gelişiminde ve vitre-retinal yapının devamlılığında çok önemli rol oynamaktadır (100).

### **3.5 TALİDOMİD**

Talidomid 1956 yılında bir Batı Alman firması tarafından Alman marketlerine sunulmuştur. Daha sonra 1958 yılında İngiltere ve diğer ülkelerde özellikle uykuya yardımcı olması, hızlı etkisi ve güvenli görünüşü nedeniyle marketlere girmiştir. Talidomid o dönemlerde FDA (Food and Drug Administration) onayı alamadığı için Amerikan marketlerine girememiştir (101).

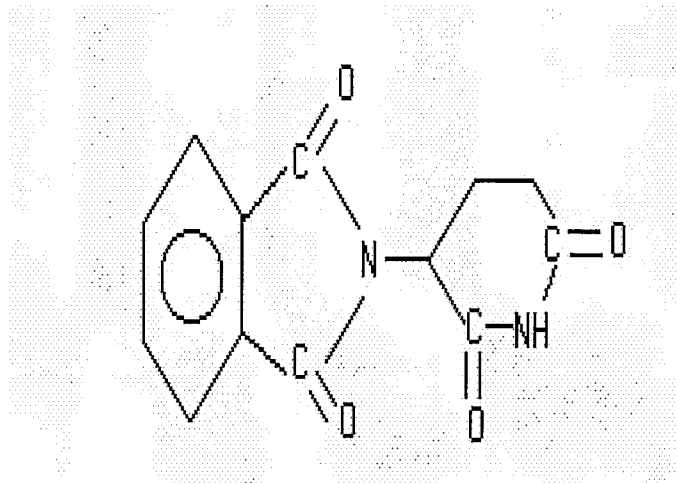
Uzun zaman talidomid kullanan hastalarda periferik nöropatiler bildirilmiştir. McBride ve Lenz 1960 yılında talidomid kullanan annelerin bebeklerinde infant kol ve bacak defektleri bildirmişlerdir. Tahminen 5000-6000 infantta thalidomide kullanımına bağlı fakomeli ve iç organlarda deformite bildirilmiştir (102).

Talidomid 1961 yılında sadece sınırları iyi tanımlanmış araştırma amaçlı kullanılmak üzere marketlerden kaldırılmıştır. Sheskin 1990'lı yıllarda erythema nodosum leprosum (ENL) üzerinde talidomid kullanımının dramatik tedavi edici etkilerini açıklayarak diğer otoimmün ve inflamatuvar tabanlı çalışmaların önünü açmıştır. Talidomid Amerika'da araştırma amaçlı yeni ilaç statüsünde kullanımdadır (103).

### **Farmakoloji:**

#### **Yapı ve Kimyasal Özellikler:**

Talidomid ya da  $\alpha$ -phthalimidoglutarimide, bir glutamik asit derivesi olup bemegrinde ( $\alpha$ -ethyl-  $\alpha$ -methyl-glutarimide) ve glutethimide ( $\beta$ -ethyl-  $\beta$ -phenyl-glutarimide) ile ilişkili ancak farklı farmakolojik özelliklere sahip bir ajandır (101). L halka sisteminin solunda phthalimide, sağında asimetrik karbon atomu ile glutarimide vardır (Şekil-2). Talidomid optik olarak aktif L- ve R-izomer formlarını içermekte ancak klinikte optik olarak inaktif rasemik karışımı kullanılmaktadır. Her enantiomer formunun farklı klinik özelliklerinin olup olmadığı açık değildir (102).



**Şekil 2- Talidomidin kimyasal yapısı.**

Talidomid benzen ve eterde çözünmez ancak su, metanol, aseton, glisyal asetik asitte az çözünürken, dioksan, dimetil formamid, piridin ve kloroformda süratle çözünür (101).

#### **Farmakokinetik:**

Talidomidin farmakokinetiği ve üriner ekskresyonu yüksek performanslı likid kromatografik analizi ile yapılmıştır. Gönüllü hastalarda yapılan çalışmalarda 8 gönüllünün 6'sında 200 mg oral alım sonrası  $4,39 \pm 1,27$  saat sonra  $1,15 \pm 0,2$  mg/ml olan pik değerlerine ulaşılmıştır. Absorbsiyon yarılanma ömrü  $1,7 \pm 1,05$  saat ve eliminasyon yarı ömrü  $8,7 \pm 4,11$  saattir. Total dozdan 24 saat sonraki üriner ekskresyon miktarı sadece  $0,6 \pm 0,22$  olup plazma ve idrar örneklerinde hiçbir metaboliti bulunamamıştır. Ancak 200 mg tek oral doz alım sonrası 24 saat sonra bile plazmada izlenebilmektedir (104).

#### **Metabolizma:**

İnsan çalışmaları yapılmamıştır ancak hayvan çalışmalarında nonenzimatik hidrolitik yolla parçalandığı izlenmiştir. Thalidomide, karaciğerde sitokrom p-450 ailesi tarafından metabolize edilir. Talidomid, nikotinamid- adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ile inkübe edildiğinde tümör hücrelerinin konkavalin-A kaplı polietilene yapışmasını önlemektedir. Hepatik mikrozomlarda p-450 inhibitörleri ile talidomid aktivasyonu engellenmektedir (105).

#### **Etki Mekanizmaları:**

##### **Hipnosedatif Etki:**

Talidomidin hipnosedatif etkisinin glutarimid halkasından kaynaklandığı bilinmektedir. Talidomid, barbitüratlardan farklı olarak ön beyindeki uyku merkezini aktive etmektedir. Çok yüksek dozlarda bile respiratuar depresyona yol açmaz (106).



### İmmunsupresyon:

Farelerde yapılan çalışmalarda donör ve alıcıda talidomid kullanımını takiben homografit ömürlerinin uzadığı izlenmiştir (107). Baboon ve rhesus cinsi maymunlarda yapılan çalışmalarda böbrek reddinin progresyon faktörü olan eritropoetin düzeylerini renal allogreftlerde düşürdüğü gözlenmiştir (108).

### Diğer etkiler:

Polimorfonükleer hücreler ile talidomidin preinkübasyonu kemotaksisi önlemekte fakat kemotaktik faktörlere direkt ilacın eklenmesi kemotaksisi önlememektedir (109). Talidomid 10 µg/ml dozunda sitotoksik etki olmaksızın anlamlı bir şekilde monosit fagositozunu önlemektedir (110). Sağlıklı gönüllülerde talidomide verilmesini takiben dolaşan T-helper hücrelerinde azalma T-supressör hücrelerinde anlamlı şekilde artış izlenmiştir (111).

Talidomid IL-1, IL-6, GM-CSF ve genel proteinleri etkilemeden TNF-α mRNA yapımını azaltarak TNF-α üretimini azaltmaktadır (112). İnsan periferik kan mononükleer hücre kültürlerine eklenen talidomid ile interferon gamma (INF-γ) üretimi azalmış, IL-4 ve IL-5 üretimi artmıştır (113). Bir başka çalışmada koyun kırmızı kan hücreleriyle immunizasyon öncesi 5-7 gün talidomid verilen farelerde IgM antikoru formasyonu azalmıştır (114).

Talidomid verilen AIDS (Acquired Immun Deficiency Syndrome) hastalarında HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) 'in latent aktivasyonunun baskılandığı izlenmiştir (115).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda anjiyogenezisin indüklendiği tavşan kornealarında basic fibroblast growth factor (bFGF) yapımının inhibe edildiği izlenmiş, Wallerian dejenerasyonu izlenen ratlarda talidomid kullanımını takiben

hücre proliferasyonunun, subperinöral ödemin ve miyelin fagositozunun azaldığı saptanmıştır (116,117).

#### **Teröpötik Kullanım:**

Talidomid eritema nodozum leprosum (ENL), prurigo nodularis, aktinik prurigo, diskoid lupus eritematozus (DLE), aftöz stomatit, Behçet ve greft-versus-host hastalığında etkili bulunmuştur (101).

#### **Yan Etki:**

##### **Teratojenite:**

Konsepsiyondan 34 ile 50 gün sonra alınan tek doz 100 mg talidomid (plazma konsantrasyonu 1mg/L) malformasyon oluşturmaya yetmektedir (102). Son üç dekaddır yapılan çalışmalara rağmen talidomidin hangi mekanizmayla embriyopati yaptığı anlaşılamamıştır. Kol ve bacak tomurcukları oluşurken kan damarlarının büyümesinde bir inhibisyon yaptığı varsayılmaktadır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda deforme embriyo dokuları ile talidomid tedavisi verilen tavşanlardaki korneal neovaskülarizasyonun inhibisyonunda görülen örneklerde ultrastrüktürel yapıların anjiyogenezis inhibisyonundaki yapılara benzer olduğu görülmüştür (118).

##### **Periferal nöropati:**

Talidomid kullanan hastalarda daha çok sensoriyel semptomlar izlenmekte, orta şiddette piramidal yol hasarına bağlı olarak hafif şiddette proximal kas güçsüzlüğü şikayetleri görülmektedir. İlacın kesilmesinden sonra kas güçsüzlüğü hızla azalmasına rağmen duyu bozukluklar devam edebilmekte, bazen de ilaç kesilmesine rağmen kötüleşmektedir (119).

Talidomid nöropatisi izlenen hastaların 4 ile 6 yıl arası takiplerinde %25 hastada tamamen iyileşme, %25 hastada hafif bozukluk, %50 hastada duysal semptom ve bulgularda hiç değişme izlenmemiştir (120).

Talidomide bağlı nöropati retrospektif çalışmalarda lepra tedavisi görenlerde %1, prurigo nodularis tedavisi alanlarda %70 oranında bildirilmiştir (121).

**Endokrin Etkiler:**

Talidomid diğer sedatif ilaçlar gibi çok az miktarda tiroid sekresyonunu azaltmakta ve bu etkisinin tiroid stimulan hormon yapımının azalmasına bağlı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ayrıca ACTH ve prolaktin üretim ve sekresyonunu stimule etmekte ve hipoglisemiye neden olmaktadır (101).

**Diğer yan etkiler:**

**İlaç Etkileşimleri**

Talidomid barbiturat, alkol, klorpromazin ve rezerpinin etkisini artırmaktadır. Histamin, serotinin, asetilkolin ve prostaglandinlerin etkisini antagonize etmektedir (102).

Sonuç olarak talidomid ile tedavi birçok mukokutanöz hastalıklarda iyiden mükemmele kadar değişik sonuçlar vermiştir. Ayrıca diğer tedavilere dirençli hastalarda iyi cevaplar alınmıştır. Çeşitli yan etki ve tehlikelerine rağmen uygun hastalarda rahatlıkla kullanılabilir (101).

#### 4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Biyokimya Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ile gerçekleştirildi. Ortalama 500 gram olan 21 adet albino kobay çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜTDAM) uygun besleme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile, hayvanların her iki gözü kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Denekler randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Her denek tartıldıktan sonra, plasebo ve sham grubu dışındaki gruplara, günlük tek doz 300 mg/kg oral talidomid verildi. Her gruba standart hazırlık, anestezi ve cerrahi teknik uygulandı.

##### Gruplar:

Kobaylar, her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize üç gruba ayrıldı.

1.Grup (Plasebo grubu): Bu gruptaki kobaylara çalışma süresince sadece nazogastrik sonda ile 2 cc. oral salin solusyonu verildi, yedi gün sonra hayvanlar dekapite edildi ve her iki göz enükle edildi (n=7).

2.Grup (Sham grubu) : Kobaylara iskemi oluşturmadan 24 saat önce ve reperfüzyon periyodu içerisinde nazogastrik sonda ile 2 cc. oral salin solusyonu verildi, yedi gün sonra hayvanlar dekapite edildi ve her iki göz enükle edildi (n=7).

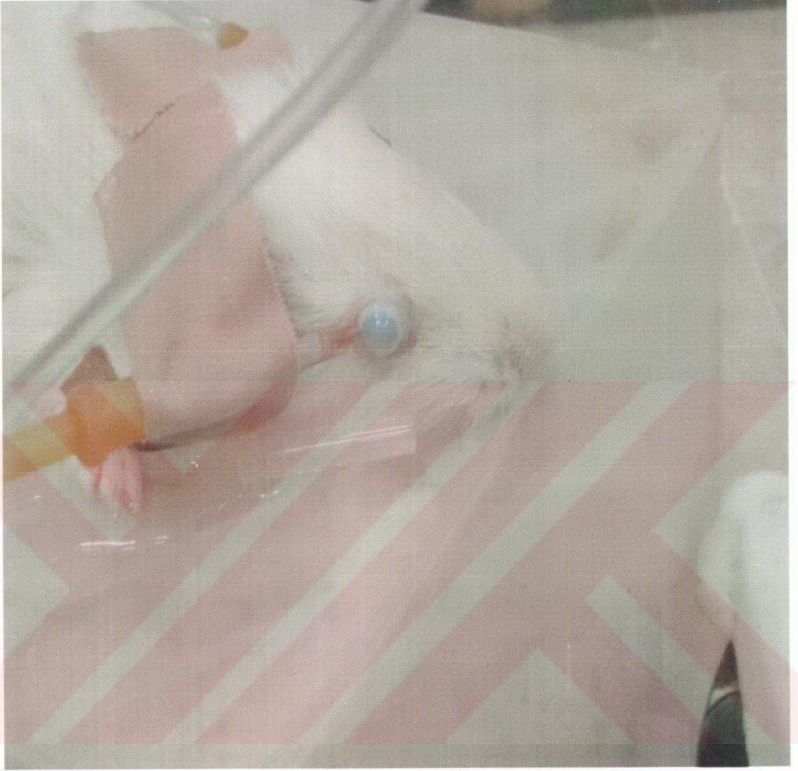
3.Grup (Talidomid grubu): Kobaylara her iki gözde 90 dakika basınçla indüklenen iskemi periyodundan 1 gün öncesi ve 6 günlük reperfüzyon süreci boyunca nazogastrik sonda ile 2 cc. salin solusyonu içinde 300mg/kg/gün oral thalidomide verildi, yedi gün sonra hayvanlar dekapite edildi ve her iki göz enükle edildi (n=7).

**Anestezi Tekniği:**

Anestezi ve analjezi uygulamasında intramüsküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0.5'lik propakain hidroklorid damlatıldı, deneklere solunum ve kan basıncı desteği sağlanmadı.

**İskemi-Reperfüzyon İndüksiyonu ve Cerrahi Teknik:**

Bütün deneklerin iki gözü çalışma kapsamına alınmış olup, her bir gruptaki deneklerin bir gözü biyokimyasal inceleme için, diğer yarısı ise histopatolojik inceleme için kullanıldı. İskeminin başlamasından 24 saat önce talidomid grubundaki deneklere 2 cc salin solüsyonu içinde 300 mg/kg oral talidomid nazogastrik sonda ile verilip, sham grubuna nazogastrik sonda ile sadece 2 cc salin solüsyonu verildi. Plasebo grubuna herhangi bir işlem yapılmadan 24 saat sonra diğer gruplardaki denekler laboratuvar masasına yatırılarak, anestezi ve analjezi uygulandı. Bu aşamadan sonra deneklerde retinal iskemi oluşturmak amacıyla, 1 litrelik salin solüsyonu şişesine ucunda insülin iğnesi olan serum seti takılıp bu insülin iğnesi ile temporal limbustan ön kamaraya girildi. Göz içi basıncı 150 mmHg olacak şekilde serum şişesi aniden 204 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edildi ve bu yükseklikte 90 dakika süreyle tutuldu. Doksan dakikalık basınçla indüklenmiş iskemi periyodu sonrası serum şişesi göz seviyesine indirilerek, göz içi basıncı normal seviyeye düşürüldü ve takiben iğne ön kamaradan çekildi.



**Şekil 3- Kobay gözünde iskemik hasarın basınçla indüklenmesi**

Doksan dakikalık iskemi peryodundan sonra denekler 6 gün reperfüzyon peryodunda bırakıldı. Talidomid grubuna reperfüzyon peryodunun başından itibaren 6 gün boyunca 24 saat aralıklarla 2 cc salin solüsyonu içinde nazogastrik sonda ile 300 mg/kg oral thalidomide verildi. Plasebo grubuna 6 gün boyunca 2 cc salin solüsyonu nazogastrik sonda ile verildi.

Altıncı günün sonunda tüm deneklere intrakardiyak 50 mg/kg thiopental sodyum (Pentothal Sodium, Abbot, Türkiye) verilerek kobaylar sakrifiye edildi ve gözler enükle edildi. Her grupta deneklerden enükle edilen gözlerden biri biyokimyasal işleme, diğer göz de histopatolojik işleme tabii tutulmuştur.

Histopatolojik inceleme için alınan gözler hızla % 10'luk formaldehid içine konularak patoloji laboratuvarına iletildi. Biyokimyasal için alınan gözler ise, enükleasyon sonrası buz kabı üzerine konup, bistüri yardımıyla pars plana bölgesinden ikiye ayrıldı. Vitreus dokusu sellüloz süngerler ile temizlendikten sonra, ameliyat mikroskobu yardımıyla retina dokusu koroidden ayrılarak tüplere kondu ve bu tüpler derin dondurucuda  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de biyokimyasal inceleme gününe kadar muhafaza edildi. Biyokimya ve patoloji laboratuvarına gönderilen gözlerin hangi gruba ait olduğu belirtilmedi.

#### **Biyokimyasal Değerlendirme:**

Biyokimyasal incelemede retina dokusundaki VEGF, endostatin, TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçülmüştür.

#### **Homojenizasyon:**

Derin dondurucudan çıkarılan dokuların tartımı yapıldı ve soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine 1/20 oranında dilüsyon olacak şekilde soğuk fosfat tamponu (0.2 M, pH:7.4) eklendi. Daha sonra dokular yine soğuklukları muhafaza edilerek, Ultra Turrax T25 Basic (IKA Labortechnik,



Germany) homojenizatöründe 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4°C'de soğutmalı santrifüjde 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantlar ile RayBio Rat VEGF ELİSA kiti (Cat. No:ELR-VEGF-001, USA) kullanılarak retinal VEGF düzeyleri (pg/ml) çalışıldı. Biosource Rat TNF- $\alpha$  immunoassey kiti (Cat. No: KRC3011, USA) kullanılarak retinal TNF- $\alpha$  düzeyleri (pg/ml) çalışıldı. ChemiKine Mouse Endostatin EİA kiti (Cat. No:CYT 160, USA) kullanılarak retinal endostatin (ng/ml) düzeyleri çalışıldı.

### **Histopatolojik Değerlendirme:**

Histopatolojik incelemeye alınan gözler % 10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi. Tespit sonrası optik sinir ve kornea tepesinden sagittal olarak bir bistüri yardımıyla tüm göz küresini içerecek şekilde ikiye bölündü. Elde edilen dokular rutin doku takip işlemine tabi tutuldu. Daha sonra dokular parafin bloklara gömülüp 5 mikronluk kesitler alındı. Kesitler Hemotoksilen-Eosin boyası ile boyandı. Preparatlar Olympus B x 50 marka ışık mikroskobu ile randomize olarak incelendi. Histopatolojik incelemede tüm preparatlarda optik diskin nazal tarafında diskden 2 mm mesafedeki iç pleksiform tabaka kalınlığı oküler mikrometre yardımıyla ölçüldü. Retinal tabaka boyunca internal limitan membran ve iç pleksiform tabakalarda 10 BBA (büyük büyütme alanı)' da PNL infiltrasyonu değerlendirilerek toplam sayıları adet olarak belirlendi, ortalama standart sapmaları hesaplandı ve 400X büyütmede fotoğrafları çekildi.

### **İstatistiksel Analiz:**

Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları ( $\pm$ ) alındı. Çalışmanın istatistiki analizi, 'SPSS for Windows (ver. 10.0 )' paket programı ile yapıldı. Her grubun kendi içinde birbirleriyle karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi



kullanıldı. Yapılan çalışmanın, her bir grup için anlamlı olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel değerlendirmede  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.



## 5. BULGULAR

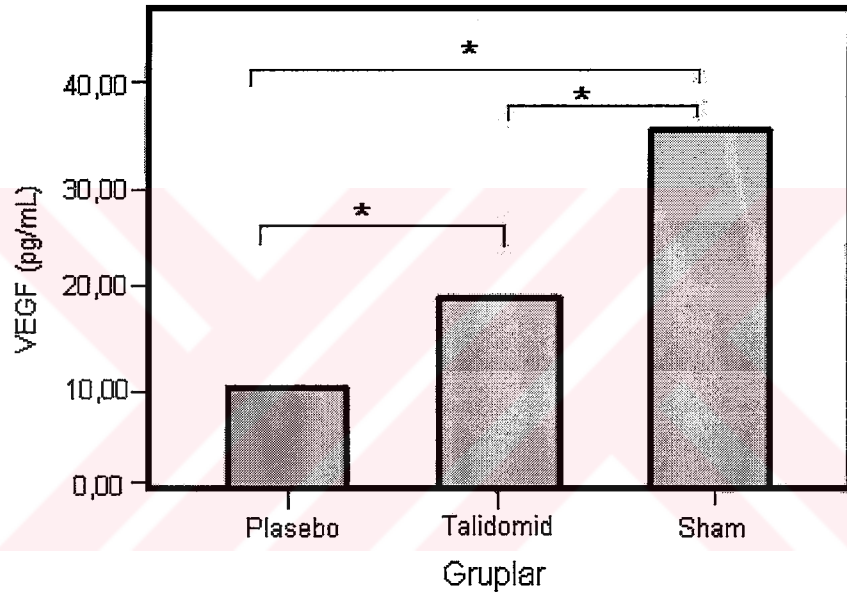
### Biyokimyasal Değerlendirme

Biyokimyasal incelemede, retina VEGF, endostatin, TNF- $\alpha$  düzeyleri her bir grup için ayrı ayrı değerlendirilerek ortalama ve SD değerleri tespit edildi.

Retinal VEGF düzeyleri plasebo grubuna göre sham grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.002$ ). Plasebo grubu ile talidomid grubu karşılaştırıldığında retinal VEGF düzeyleri talidomid grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu ( $P=0.003$ ). Talidomid grubunda VEGF düzeyleri sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0.002$ ).

**Tablo 3-** Retinal VEGF düzeylerinin (pg/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	Ortalama $\pm$ SD	Minimum	Maksimum
Plasebo	10,22 $\pm$ 2,58	8,13	15,60
Sham	35,80 $\pm$ 5,97	28,78	45,87
Talidomid	19,01 $\pm$ 3,01	14,72	22,75

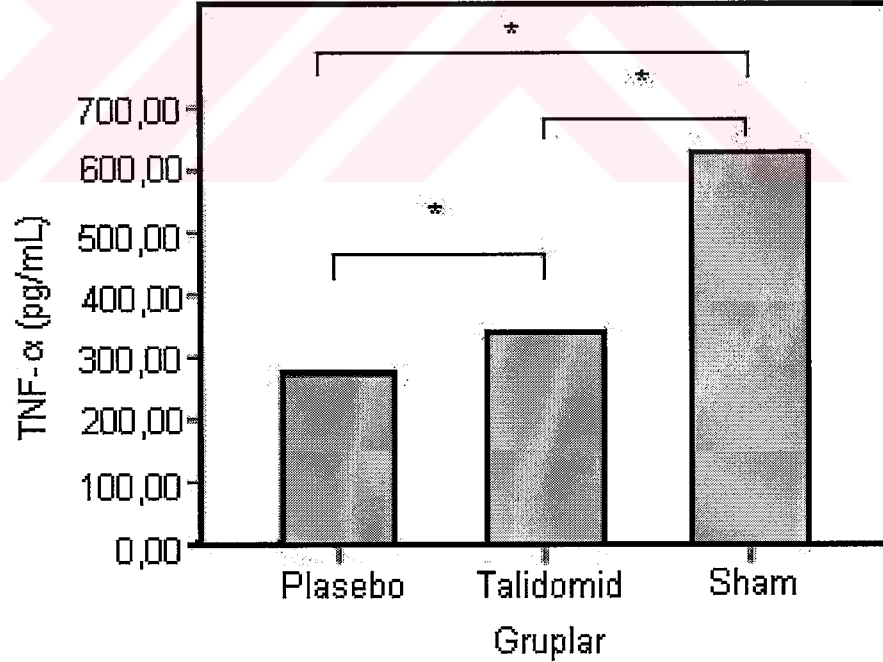


**Şekil 4-** Retinal VEGF düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.  
\*p<0.05

Retinal TNF- $\alpha$  düzeyleri plasebo grubuna göre sham grubunda anlamlı olarak yüksek bulunurken ( $p=0.002$ ), plasebo grubu ile talidomid grubu arasında anlamlı fark bulunamadı ( $P=0.5$ ). Talidomid grubunda TNF-  $\alpha$  düzeyleri sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0.009$ ).

**Tablo 4-** Retinal TNF- $\alpha$  düzeylerinin (pg/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	Ortalama $\pm$ SD	Minimum	Maksimum
Plasebo	270,41 $\pm$ 69,77	205,0	378,8
Sham	629,93 $\pm$ 146,41	479,3	850,9
Talidomid	340,93 $\pm$ 158,26	180,0	583,1

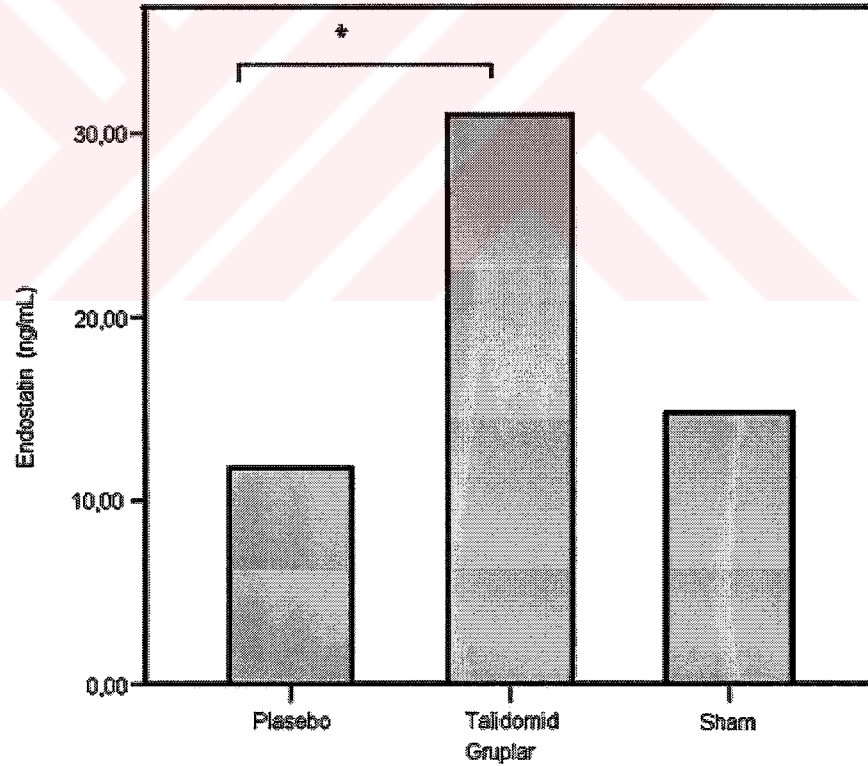


**Şekil 5-** Retinal TNF- $\alpha$  düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.  
\* $p<0.05$

Retinal endostatin düzeyleri plasebo grubuna göre talidomid grubunda anlamlı olarak yüksek bulunurken ( $p=0.009$ ), sham grubu ile talidomid grubu arasında anlamlı fark bulunamadı ( $P=0.1$ ). Plasebo grubu ile sham grubu arasında ise retinal endostatin düzeyleri açısından anlamlı fark bulunamadı. ( $p=0.08$ ).

**Tablo 5-** Retinal endostatin düzeylerinin (ng/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	Ortalama $\pm$ SD	Minimum	Maksimum
Plasebo	11,79 $\pm$ 7,36	6,2	27,72
Sham	14,70 $\pm$ 4,88	10,1	23,55
Talidomid	30,94 $\pm$ 15,59	10,0	50,35



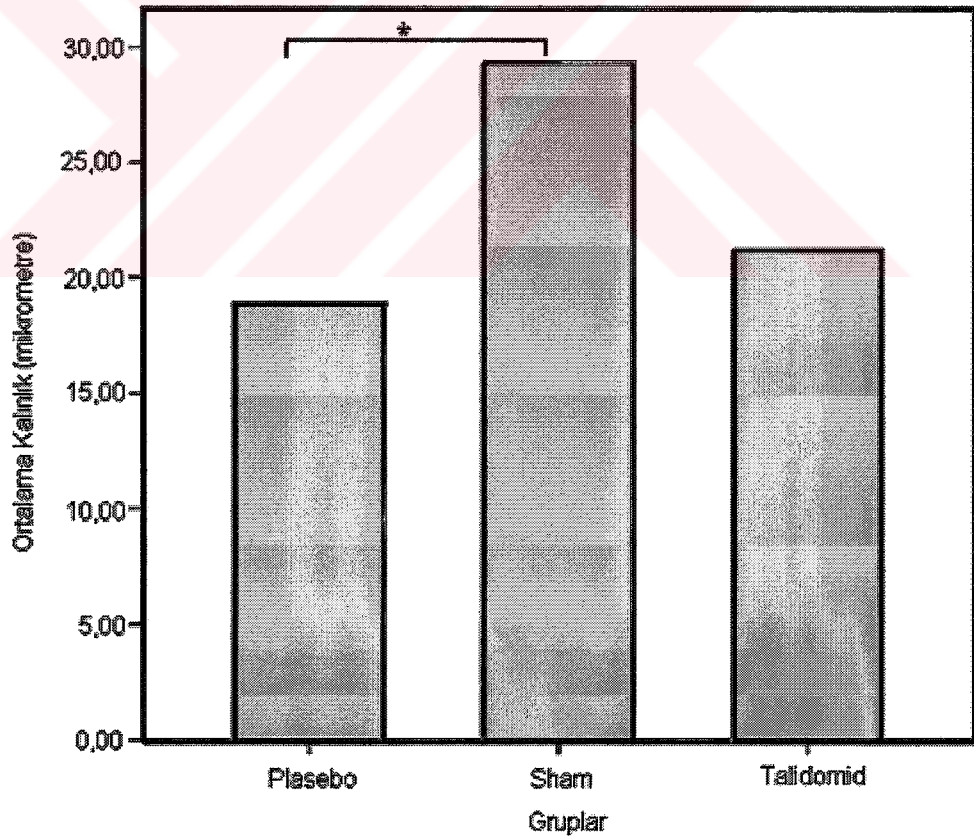
**Şekil 6-** Retinal endostatin düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması  
\* $p<0.05$

## Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik olarak incelediğimiz retina kesitlerinde iç pleksiform tabakanın kalınlığı, talidomid grubunda hem plasebo hem de sham grubuna göre anlamlı olarak farklı bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0.2$ ,  $p=0.08$ ). Ancak sham grubunda plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha kalın ölçülmüştür ( $p=0.003$ )

**Tablo 6-** İç pleksiform tabaka kalınlıklarının (mikrometre) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	Ortalama $\pm$ SD	Minimum	Maksimum
Plasebo	18,92 $\pm$ 3,18	15	25
Sham	29,28 $\pm$ 7,31	22,5	45
Talidomid	21,07 $\pm$ 3,49	15	45



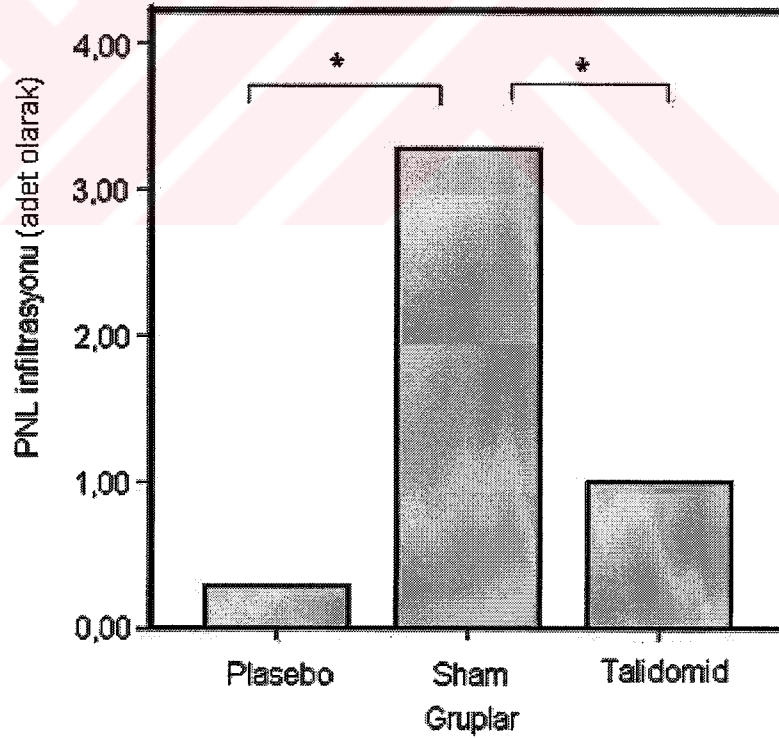
**Şekil 7-** İç pleksiform tabakanın ortalama kalınlığının gruplar arasında karşılaştırılması.

\* $p<0.05$

Retinanın iç tabakalarındaki (internal limitan membran ve iç pleksiform tabaka) polimorfonükleer lökosit (PNL) infiltrasyonu, sham grubunda plasebo grubuna göre anlamlı olarak fazla bulundu ( $p=0.001$ ). Talidomid grubunda sham grubuna göre PNL infiltrasyonu anlamlı olarak daha az bulunurken ( $p=0.004$ ), plasebo grubuna göre anlamlı bir fark bulunamadı.

**Tablo7-** Polimorfonükleer lökosit (PNL) infiltrasyonunun (adet olarak) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

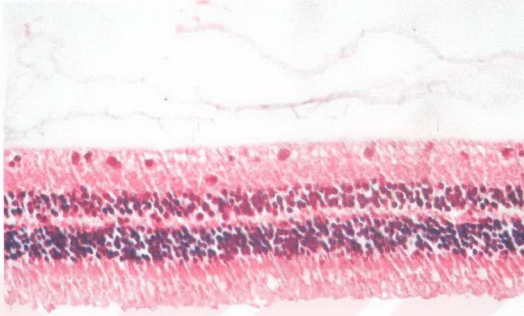
Gruplar	Ortalama $\pm$ SD	Minimum	Maksimum
Plasebo	0,28 $\pm$ 0,48	0	1
Sham	3,28 $\pm$ 2,28	0	7
Talidomid	1 $\pm$ 1,9	0	7



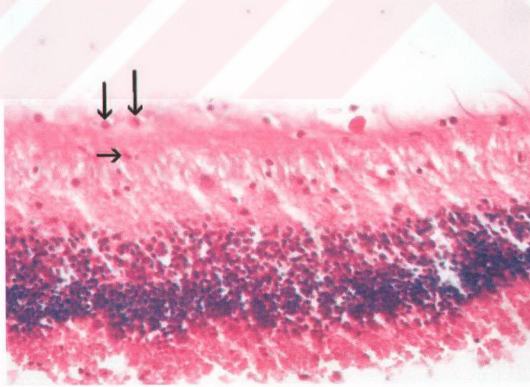
**Şekil 8-** PNL infiltrasyonunun gruplar arasında karşılaştırılması.  
\* $p < 0.05$



Histopatolojik incelemeye alınan gözlerin 400X büyütmede çekilmiş fotoğrafları Şekil 9-11' de izlenmektedir.

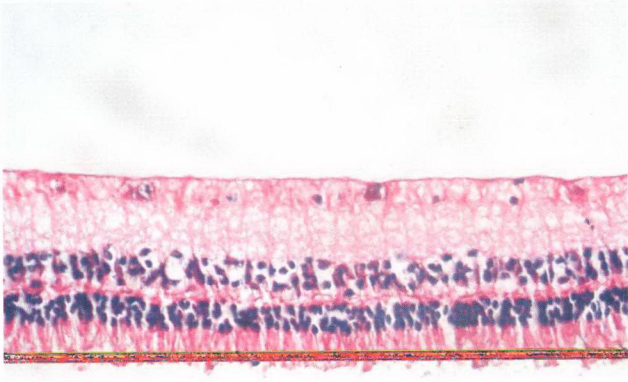


Şekil 9- Plasebo grubu kobay retinası sagital kesiti. Salim retina görünümü.



Şekil 10- Sham grubu kobay retinasında internal limitan membran (uzun ve kısa dikey ok) ve iç pleksiform tabakada (yatay ok) PNL infiltrasyonu.





**Şekil 11- Talidomid grubu kobay retinası sagital kesiti. PNL izlenmemektedir.**

## 6. TARTIŞMA

Retinal iskemi, görülme sıklığı ve rölatif olarak etkisiz tedavisi nedeniyle endüstriyel dünyada görme bozukluğu ve körlüğün en sık sebeplerinden biri olmaya devam etmektedir. İskemi, retinanın vazooklusif ve vazoproliferatif hastalıklarında önemli rol oynamaktadır. Diyabetes mellitus, retinal arter ve ven tıkanıklıkları, prematüre retinopatisi, orak hücreli anemi ve gözün enflamatuvar durumları retinada iskemik hasar oluşturmaktadırlar (122).

Herhangi bir dokuda meydana gelen iskemi sonucu plazma membranında meydana gelen değişiklikler sonucu sodyum kalsiyum iyon dengesi bozulmakta, asidoz, osmotik şok, kromatin kümeleşmesi ve nükleer piknoz meydana gelmektedir. Bu değişiklikler mitokondriyal fosfolipazı aktive ederek ATP üretimini azaltmakta, kalsiyumun artışı ile mitokondriyal membran disfonksiyonu meydana gelip geri dönüşümsüz hasarlar oluşmaktadır. Bu olayları endoplazmik retikulumda vesikülasyon, lizozomlarda şişme izlemekte, sonuçta protein ve enzim sızıntısı gelişerek ikincil otoliz oluşmaktadır (123).

İskemi ile birlikte reperfüzyon olduğu durumlarda 'reperfüzyon hasarı' olarak bilinen fenomen ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon hasarı sırasında enerji depoları yeniden oluşturulurken bu arada toksik metabolitler ortaya çıkar. Bu toksik metabolitlerin dolaşıma katılması ile hem sistemik hem de reperfüze olan dokuda lokal hasar ortaya çıkar. Sistemik dolaşıma katılan toksik metabolitler asidoz oluştururken, lokal olarak serbest oksijen radikallerine bağlı olarak lipit peroksidasyonu oluşur. Lipit peroksidasyonu, fosfolipit ve poliansatüre yağ asitlerinden oluşan hücre membranında toksik hasar meydana getirir. Ayrıca lokal ve sistemik olarak nötrofil birikimi olmakta ve nötrofillerden platelet aktive edici faktör

(PAF), lökotrienler, proteazlar ve reaktif oksijen partikülleri salgılanmaktadır. Bu ise organ yetmezliğine yol açmaktadır (124).

Serebral korteks, hippocampus ve retina insan ve diğer omurgalı canlılarda uyarıcı aminoasit reseptörleri açısından zengin bölgelerdir (125). İç retinal tabaka fonksiyonlarını düzenleyen aspartat ve glutamat gibi uyarıcı aminoasitler aynı zamanda fotoreseptörler ve retina pigment epiteli (RPE) fonksiyonlarında da rol oynamaktadırlar. İskemi- reperfüzyon hasarı nöronal dokularda serbest radikal aracılı uyarıcı aminoasitlerin salınımına neden olmakta ve bu aminoasitler hüce içi yoğun  $Ca^{2+}$  akımı sağlamakta ve nöronal hasar oluşmaktadır (32,126).

Retinada iskemi-reperfüzyon hasarına ilişkin 1974 yılından beri araştırmacılar tarafından çeşitli çalışmalar yapılmış ve birçok bilgi elde edilmiştir (127-130). Ayrıca iskemi-reperfüzyonun retinada oluşturduğu hasarı azaltmak ve önlemek için birçok farmakolojik ajanla değişik çalışmalar yapılmıştır. Bu konu ile ilgili birçok çalışma modeli tanımlanmıştır. Oftalmik arterin bağlanması, kısa süreli göz içi basıncının yükseltilmesi ve vertebral arterler ile birlikte birleşik karotid arter bağlanması sonucu tam beyin iskemisi oluşturulması bunlardan birkaçıdır. Oluşturulan iskemi modellerinin hepsinde amaç geri dönüşümlü olarak istenen sürede göz dolaşımının geçici olarak engellenmesidir (131-133).

Szabo ve arkadaşlarının oluşturduğu iskemi-reperfüzyon modelinde, oftalmik arter ve venin ipek sütür kullanılarak geçici süre bağlanması ile tam bir oküler iskemi gerçekleştirilmiş ve sütürün açılması ile de reperfüzyon sağlanmıştır (134). Ancak bu modelde bağlama ile sadece oftalmik damarlar değil, optik sinir de sıkışmaktadır . Optik sinirin sıkışması sonucu aksoplazmik akımın durması, iskemi dışında optik sinirde bazı aksonların kaybına neden olmaktadır. Bu duruma ek olarak Wallerian dejenerasyonu akson ve myelinlerin yıkılmasına neden olmakta ve olayın proksimale

doğru ilerleyerek boş sinir liflerinin kalmasına ve hasarın retina ganglion hücreleri gibi uzak noktalara ilerlemesine yol açmaktadır (134).

Pulsinelli ve arkadaşlarının tanımladığı dört damar bağlama yöntemi ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelinde, göz dokularında cerrahi yaralanmaya neden olmadan aynı anda her iki retina ve optik sinirde geri dönüşümlü ve tam bir iskemi oluşturulmasına olanak verilmektedir. Bu yöntemde vertebral arterler koterize edilip arka beyin dolaşımının engellenmesinden 48 saat sonra birleşik karotid arterler klemplenerek tam beyin iskemisi oluşturulur. Ancak bu yöntem ile karotis arterinin ortaya çıkarılması sırasında meydana gelen kanamalar ile denek kaybı olabilmektedir. Ayrıca beyin iskemiyeye dayanma gücünün kısa olması nedeniyle iskemi süresi kısıtlı tutulmaktadır (135).

Retinal iskemi oluşturmak amacıyla kullanılan bir başka yöntem ise ışığa duyarlı bir boya olan rose bengalin intravenöz olarak verilerek, noninvazif olarak retina damarlarının oklüde edilmesidir. Bu yöntem ile retinal damarlarda tromboz oluşturularak retinal arter dal obstrüksiyonu taklit edilmektedir. Ancak bu yöntem ile fototoksiteye de bağlı hasar oluşabilmektedir (136).

Retinal iskemi-reperfüzyon modelleri içerisinde yüksek göz içi basıncı ile indüklenmiş retinal iskemi metodu sık kullanılan bir yöntem olmuştur. Smith ve Baird bu yöntemi ilk kez 1952 yılında kullanmışlardır (32). En son hali ile bu yöntemde bir rezervuara bağlı iğne ile ön kamara parasentezi yapılarak göz içi basıncı (GİB) sistolik basıncın (110-120 mmHg ) üzerine çıkarılarak, oküler perfüzyon basıncının üzerine çıkılmıştır. Böylece retinal ve uveal dolaşımın obstrüksiyonuna bağlı olarak global iskemi oluşturulmuş ve bu durum ERG' nin düzleşmesi, fundusun beyazlaşması, irisin soluklaşması ile de kanıtlanmıştır. Bu metod ile santral retinal arter obstrüksiyonu veya akut açığı kapanmasındaki aynı patolojik durumlar ortaya

konmuştur. Göz içi basıncının geçici olarak yükseltilmesi ile oluşturulan iskemi modelinin, ön kamaraya giren kanülün oluşturabileceği iritis, hücre hasarına bağlı konjesyon, katarakt gelişimi veya kanülün çıkarılması ile ortaya çıkan ani göz içi basıncı düşmesi gibi dezavantajları vardır (137,138).

Biz de çalışmamızda retinal iskemi modelimizi, kobaylardaki göz içi basıncını sistolik basınç üzerine çıkartarak gerçekleştirdik. Bu metodu tercih etmemizin nedeni kolay uygulanabilir, geri çevrilebilir, reperfüzyonun kolay başlatılabilir ve kobaylarda rahat uygulanabilir olmasıdır.

Deney hayvanlarında iskemi-reperfüzyon hasarını araştıran birçok çalışma iskemi süresi ile orantılı olarak oluşan histolojik değişiklikleri incelemiştir. Szabo ve arkadaşları oftalmik arter bağlama yoluyla Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda yaptıkları deneyde; 30, 60, 90 dakikalık iskemi oluşturmuşlar ve ışık mikroskobu düzeyinde ilk değişiklikleri 60'ıncı dakikadan başlayarak saptamışlardır (134). Adachi ve arkadaşları Wistar cinsi sıçanlarda göz içi basıncını yükselterek oluşturdukları iskemi modelinde, en kısa iskemi süresini 45 dakika olarak gerçekleştirmişler ve bu sürede iskemiye bağlı histolojik değişikliklerin ortaya çıktığını görmüşlerdir (138).

Bugüne kadar retinal iskemiye değerlendirmek için in vivo ve ex vivo yapılan birçok hayvan çalışmasında vasküler dağılım paterni insanlara en çok benzeyen ratlar, kobaylar ve tavşanlar sık kullanılmıştır. Jampol ve Tielsch melanin pigmentinin iskemik hasarda ortaya çıkan serbest radikalleri temizlediğini ve böylece RPE, Bruch membranı, koroid ve dış retina tabakalarındaki dejeneratif değişiklikleri önleyerek koroid neovaskülarizasyonuna yol açacak bir takım predispozan faktörleri ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir (139). Retinal iskemiye bağlı hasar depigmente hayvanlarda pigmente hayvanlara oranla daha fazla olduğu için çalışmamızda albino kobay kullanmayı tercih ettik (140).

Yakın zamanlarda tanımlanan VEGF, vasküler geçirgenlik ve anjiyogenez üzerinde çok etkili bir büyüme faktörüdür. Aiello ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intravitreal VEGF enjeksiyonlarının retinadaki vasküler geçirgenliği artırarak intravenöz verilen sodyum floreseinin vitreusa geçiş hızını artırdığı görülmüştür (141). Yine Aiello ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda birçok iskemik retina hastalığında intraoküler VEGF konsantrasyonları ile neovaskülarizasyon arasında yakın bir ilişki olduğu görülmüştür. Bütün bu çalışmalarda retinal hücrelerde hipoksinin indüklediği VEGF artışının aynı zamanda endotel hücre proliferasyonuna da yol açtığı bildirilmiştir (142,143). Tüm bu sonuçlar birleştirildiğinde iskemik retina hastalıklarında VEGF'in neovaskülarizasyon gelişiminde çok önemli rolü olduğu ispatlanmaktadır. Biz çalışmamızda VEGF düzeylerini baskılayan, antiinflamatuvar ve immunsupressif bir ajan olan talidomid kullanarak iskemi-reperfüzyon hasarının ileri dönemlerinde retinal dokuda gelişebilecek neovaskülarizasyonları ve bunlara bağlı komplikasyonları azaltmayı düşündük.

Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2, bFGF) ise bir diğer heparine bağlanan anjiyogenik proteindir. bFGF, endotel hücrelerinde çoğalma ve epiplast hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar (144). Ayrıca, bFGF doğrudan veya dolaylı olarak endotel hücre aktivitesini düzenler. Potent bir endotel hücre stimülatörü olan bFGF; endotelde migrasyon, proliferasyon ve tüp formasyonundan sorumludur (145). bFGF ile VEGF'in anjiyogenez üzerinde sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir (146). Fakat farklı olarak bFGF'siz ortamda yapılan fare deneylerinde damar oluşumunun gözlenmesi bFGF'nin özellikle erişkin vasküler yapının korunması ve yara iyileşmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir (147). Bir başka büyüme faktörü olan PDGF (Platelet Derived Growth Factor) de heparine bağlı peptid yapıda büyüme faktörü olarak VEGF gibi tirozin kinaz reseptörleri üzerine etki ederek

dimerizasyon, otofosforilasyon ve neticede mitogen activated protein kinaz (MAPK) gibi intrasellüler kinazların aktivasyonunu sağlar. Böylece activator protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri uyarılarak mitojenik etkili genlerde cevap oluşturulur. PDGF'in özellikle yüksek dereceli glial tümörlerde overeksprese olduğu bilinmektedir (148). Bizde çalışmamızda yeni damar oluşumunda esas rol oynadığı bilinen ve retinal iskemi-reperfüzyon hasarında prognostik bir faktör (141-143) olarak kullanılan VEGF'i biyokimyasal olarak inceledik.

Retinanın vasküler gelişim sürecinde VEGF düzeylerinde değişimler olduğunda retinada bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Deneysel olarak neonatal farelere uzun süre verilen yüksek oksijenin VEGF düzeylerini düşürdüğü ve retinada vasküler gelişimin durarak vasküler regresyonun geliştiği izlenmiştir. Retinada perfüzyon olmayan alanlarda iskemi gelişince yüksek düzeylerde VEGF salınımı ve retinal neovaskülarizasyon gelişmektedir. Bu durum aslında insanlarda en sık görülen iskemik retina hastalığı olan proliferatif diabetik retinopatinin önemli yönleriyle benzerlik gösteren prematür retinopatisini anlatmaktadır (149).

Burgos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diabetik hastaların vitrektomi örneklerinde VEGF düzeyleri ile neovaskülarizasyon arasında korelasyon olduğu görülmüştür (150). Hofman ve arkadaşları tarafından maymun retinalarında retinal ven oklüzyonu modeli ile oluşturulan iskemik hasarda VEGF'in neovaskülarizasyondan esas sorumlu faktör olduğu, rekombinant VEGF'in normal maymun gözlerine enjeksiyonu ile irisde neovaskülarizasyon ve akabinde neovasküler glokom geliştiği görülmüştür. Yine bu çalışmada vitreusa VEGF antikoru verilen iskemik maymun retinalarında neovaskülarizasyon gelişiminin inhibe olduğu izlenmiştir. Ancak vitreusa VEGF antikoru vermek invaziv bir yöntem olup retina dekolmanı, vitreus hemorajisi, endoftalmi gibi riskler taşımaktadır (151).



VEGF reseptörlerini bloke eden veya VEGF bağlayan ajanlar ile yapılan çalışmalarda neovaskülarizasyonun baskılandığı görülmüş ve VEGF'in neovaskülarizasyonda anahtar rol oynadığına karar verilmiştir (152,153). VEGF reseptör kinaz inhibitörleri VEGF sinyalizasyonunu etkili şekilde önlemekte ve retinal neovaskülarizasyonu önlemektedir (154). VEGF sinyalizasyonunu önleyerek retinal neovaskülarizasyonu engellemek için birçok farmakolojik ajan denenmiştir. Kısmi olarak selektif kinaz inhibitörü olan PTK787, VEGF ile PDGF (platelet-derived growth factor) reseptör fosforilasyonunu bloke ederek oksijen ile indüklenmiş iskemik retinopatili mürin retinalarında neovaskülarizasyon gelişimini tamamen inhibe etmiştir. Subkutan olarak uygulanan bu ajan ile ilgili henüz insan çalışmaları yoktur (155).

Fare modellerinde yapılan çalışmalarda VEGF antagonistlerinin (çözünebilir VEGF-reseptör şimerik proteinleri, oligonükleotidler) iskemik retinopatilerdeki neovaskülarizasyonu en fazla % 50 oranında önleyebildikleri görülmüş (152,156). Lazer ile indüklenmiş retinal ven dal oklüzyonlu primatlarda intravitreal VEGF enjeksiyonlarının iris neovaskülarizasyonunu tamamen önlediği izlenmiştir, ancak bu tedavinin retinal neovaskülarizasyon tedavisi için ne kadar uygun olduğu bilinmemektedir (153). Birçok farmakolojik ajanla retinal neovaskülarizasyonun en fazla % 50 oranla inhibisyonu gerçekleştirilmekte ve farmakolojik ajanlarla bu değerden daha ötesine geçilip geçilemeyeceği akıllarda her zaman soru işareti oluşturmaktadır (157,158).

Armstrong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diabetik retinopatinin ileri evrelerinde, yani retinal iskeminin arttığı dönemlerde VEGF düzeylerinin arttığı ve proliferatif dönemde retinadaki bütün epiretinal membranlardan yüksek düzeylerde VEGF elde edildiği bildirilmiştir (159). Bizim çalışmamızda intraretinal VEGF



düzeyleri iskemi-reperfüzyon oluşturulup tedavisiz bırakılan grupta (sham grubu) plasebo grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.002$ ). Retina pigment epiteli (RPE), yaşa bağlı makula dejenerasyonunda görülen subretinal neovaskülarizasyondan esas sorumlu faktör olarak bilinmektedir. RPE hücreleri VEGF gibi büyüme faktörlerini salgılayarak koroid neovasküler membranlarının gelişmesini ve büyümesini uyarmaktadırlar (160). Talidomidin RPE hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine olan etkilerini bildiren henüz çok fazla çalışma yoktur. Ancak Spraul ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada talidomidin 10 µg/ml dozunda RPE hücreleri üzerinde optimum inhibitör etkili olduğunu ve RPE hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunun engellendiğini bildirmişlerdir (161). Bizim çalışmamızda Talidomid verilen grupta VEGF düzeyleri sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p=0.002$ ).

TNF- $\alpha$  retina gangliyon hücrelerinde apoptozisi indükleyen bir mesajcıdır. TNF- $\alpha$  pikogram düzeylerinde nonsitotoksik olarak düşünülmesine rağmen nörodejenerasyon sırasında yaşamsal sinyalleri susturarak hücre ölümünü indüklemektedir (162). TNF- $\alpha$ 'nın AIDS hastalarında optik sinirde izlenen aksonal dejenerasyon ve glial değişikliklerden de sorumlu olduğu bilinmektedir (163). TNF- $\alpha$ 'nın tavşanlara intravitreal verilmesi sonucu optik sinirde aksonal hasar meydana getirdiği izlenmiştir ve glokomatöz hasarda iskemik hasar teorisini benimseyen görüş sahiplerine göre TNF- $\alpha$  ve reseptörünün artmış glokomatöz optik sinir hasarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (82). Tüm bu görüşler doğrultusunda glial hücrelerden salgılanan TNF- $\alpha$ 'nın retinal nöronal dokuyu hedef alan önemli bir hasar verici mesajcı olduğu düşünülmektedir.

Fontaine ve arkadaşları, iskemi-reperfüzyon hasarına maruz bıraktıkları fare retinalarında TNF reseptör 1'in aktivasyonunun hücre ölümünü hızlandırdığını, TNF

reseptör 2' nin aktivasyonunun nöron koruyucu bir etkiye sahip olduğunu görmüşlerdir (164). Lipid hidroperoksid (LHP) ile tavşanlarda oluşturulan deneysel retina neovaskülarizasyonlarında retinal TNF- $\alpha$ , IL-1, VEGF ve PDGF düzeyleri yüksek bulunmuştur (165). Bizim çalışmamızda retinal iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası sham grubunda TNF- $\alpha$  düzeyleri plasebo grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.002$ ).

Retinal iskemi sonrası endojen koruyucu mekanizmaların bir parçası olarak bFGF, CNTF (ciliary neurotrophic factor) gibi bir takım büyüme faktörlerinin miktarlarının arttığı bilinmektedir (166). Buna ilaveten BDNF (brain derived neurotrophic factor) gibi bazı büyüme faktörlerinin intravitreal injeksiyonu sonucu retinal iskemik hasarın azaldığı görülmüştür (167). Ancak retinal iskemik hasarın önlenmesinde büyüme faktörlerinin rolünün geçici olduğu ve bu yüzden klinikte kullanım alanı bulamadığı bilinmektedir. Ayrıca  $\alpha$ 2-adrenoreseptör agonistleri ve  $\beta$ -adrenoreseptör blokörleri gibi retinal iskemide nöroprotektif rol oynayan ajanların bFGF, BDNF ve CNTF gibi büyüme faktörlerinin seviyesini arttırdığı bilinmektedir. Endojen koruyucu mekanizmalardan biri olan endostatin in vitro endotel proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe etmekte, in vivo olarak anjiyogenezis ve tümör büyümesini engellemektedir (168-170). Endostatinin insanlarda endostatin antikoru ile immün reaktivitesi incelendiğinde retinadaki büyük, geniş kan damarlarında, kapillerlerde ve özellikle internal limitan membranda immün boyanmanın en fazla olduğu izlenmiştir (171). Yapılan bir çalışmada endostatin salgılayabilen adenoviral vektörlerin intravitreal injeksiyonu ile koroid neovaskülarizasyonunun engellendiği görülmüştür (172). Bir başka çalışmada VEGF ile indüklenen retinal vasküler sızıntının endostatin seviyelerinin artırılması ile azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada VEGF ile indüklenen retinal

neovaskularizasyonun ve retina dekolmanının endostatin tarafından önlendiği bildirilmiştir (173).

İnsanlarda proliferatif diabetik retinopati gözler üzerinde yapılan çalışmada VEGF ve endostatinin vitreusdaki düzeyleri ölçülmüş ve posterior vitrektomi yapılan bu gözlerdeki prognoz VEGF ve endostatin düzeyleri ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Buna göre VEGF düzeyleri yüksek, endostatin düzeyleri düşük gözlerde prognoz daha kötü, VEGF düzeyleri düşük, endostatin düzeyleri yüksek olan gözlerde prognoz daha iyi seyretmiştir (174). Bizim çalışmamızda talidomid grubunda plasebo grubuna göre endostatin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken ( $p=0.009$ ), sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış elde edilememiştir ( $p=0.1$ ). Ancak çalışmamızda kullandığımız talidomid dozunun (300 mg/kg/gün) artırılması ile endostatin düzeylerinin de artmasını bekliyoruz.

Yapılan bir çalışmada ratlarda retinal iskemik hasarı serbest oksijen radikallerin sentezini engelleyerek önlemek için bir ksantin oksidaz inhibitörü olan Allopurinol oral olarak verilmiş ve iskemik hasarı önleyemediği görülmüştür. Aynı çalışmada lokal hipotermiye maruz bırakılan ratlarda vücut metabolizmasının yavaşlatılmasına bağlı olarak iskemik hasarın azaltılabildiği izlenmiştir (175). IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  ateş oluşumundan major olarak sorumlu sitokinlerdir (74). Bizim çalışmamızda kullandığımız talidomid ile TNF- $\alpha$  düzeyleri baskılanarak ısı artışı engellenmiş olabilir, bir miktar vücut metabolizması yavaşlatılarak reperfüzyon hasarının engellenmesine katkıda bulunulduğunu düşünmekteyiz.

Talidomidin hangi mekanizmayla anjiogenezisi inhibe ettiği tam olarak bilinmemektedir. Hücre kültürlerinde bFGF ile uyarılan endotel proliferasyonu üzerine talidomidin etkisinin olmaması, ancak tavşan kornealarında yine bFGF ile uyarılan anjiyogenezisin oral thalidomide kullanımı ile inhibe edilmesi üzerine

thalidomidin aktif bir metabolitinin esas etkilerinden sorumlu olduğunu düşündürmüştür (115). Talidomidin karaciğerde aktif bir metabolitinin oluşarak etkilerini gösterdiği ve sadece sistemik olarak kullanıldığında büyüyen damarlar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (176). Biz de çalışmamızda hem etki mekanizması hem de kullanım kolaylığı açısından talidomidi oral kullanmayı uygun gördük. Ayrıca antianjiyotik tedavinin uzun sürmesi nedeniyle oral kullanımın birçok avantajlarının olduğunu düşünmekteyiz.

Talidomid, VEGF ile uyarılan neovasküler büyümeye karşı önemli bir antianjiyotik etkiye sahiptir. Yapılan bir çalışmada tavşanlarda VEGF ile indüklenen korneal neovaskularizasyonun sistemik verilen talidomid ile engellendiği görülmüştür (177). Talidomidin antianjiyotik etkisini hangi mekanizmayla gösterdiği bilinmemekle beraber önemli bir proinflatuar sitokin olan TNF- $\alpha$  mRNA' sının sentezini azalttığı bilinmektedir (178). Bizim çalışmamızda da talidomid tedavisi alan grupta, sham grubuna göre TNF- $\alpha$  düzeyleri anlamlı olarak düşük ölçülmüştür ( $p=0.009$ ).

Retinal iskemik hasarı önlemeye yönelik bugüne kadar onlarca ajan (174,179-181) denenmiştir. Anjiyotensin II'nin retinal endotel hücrelerde VEGF düzeyini artırmasından yola çıkarak transgenik hayvan modellerinde prematür retinopatisine bağlı yeni damar oluşumunu engellemek amacıyla renin-anjiyotensin sistemini bloke edici ajanlar kullanılmıştır (182). Bu çalışmalarda lisinoprilin kan basıncından bağımsız olarak VEGF düzeylerini düşürdüğü görülmüştür (183). Retinal iskemik reperfüzyon hasarında önemli bir rol oynayan PKC izoformlarından özellikle PKC- $\beta$  ve PKC- $\gamma$ 'nın inhibitörleri ile VEGF salınımının inhibisyonu başarılı çalışmalar ile gerçekleştirilmiş ancak insan çalışmaları henüz sonuçlanmamıştır (141,184).

Retinal iskeminin yoğun olarak izlendiği proliferatif diabetik retinopatili hastalarda antiagregan ajanlar kullanılarak iskekiye bağı komplikasyonların önlenmesi amaçlanmıştır. Ancak Diabetik Retinopatide Erken Tedavi Çalışma Grubu (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, ETDRS)'nun açıklamalarına göre aspirin ve ticlopidine ile yapılan çalışmalarda diabetik retinopatiye bağı iskemik retina hasarının ve yeni damarlardan meydana gelen kanamaların önlenmesinde antiagregan ajanların rolü olmadığı bildirilmiştir (183,185).

Daha önce yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyonun retinada meydana getirdiği hasar retinanın kalınlığı değerlendirilerek ölçülmüştür (126,186). Hughes yaptığı çalışmada basınçla indüklenmiş iskemik retina hasarında iç retinal dolaşımın tamir mekanizmalarındaki yetersizlik nedeniyle iç retina tabakalarının (özellikle iç pleksiform tabaka) hasara daha duyarlı olduğunu bildirmiştir (186). İskemiye maruz bırakılan retinalar incelendiğinde ciddi ödem, vakuolize boşluklar ve lökosit infiltrasyonu daha çok retinanın iç tabakalarında izlenmiştir (187). Biz çalışmamızda retinal iskemi-reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak tüm gruplarda iç peksiform tabakanın kalınlığını veya bir başka deyişle retinal ödemi değerlendirdik. Buna göre sham grubunda plasebo grubuna göre iç pleksiform tabakayı daha kalın ölçtük ( $p=0.003$ ). Ancak talidomid grubunda sham grubuna göre iç pleksiform tabakanın kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık ( $p=0.08$ ). Bu durumda talidomidin retinal kalınlığı yani retinal ödemi azaltmadığını düşünmekteyiz.

Brouch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda streptozotosin ile indüklenmiş diabetik ratlarda ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin retinal lökositozu arttırdığı bildirilmiştir (188). Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada VEGF'in ICAM-1'i aktifleyerek retinal lökositozu arttırdığı bildirilmiştir (189). Retinanın iskekiye maruziyeti sonrası ortaya çıkan lökositler kan akımını bloke ederek, serbest

oksijen radikallerinin salgılanmasını sağlayarak ve birçok inflamatuvar molekülün ortaya çıkmasına neden olarak reperfüzyon hasarına katkıda bulunmaktadır. Reperfüzyon periyodu boyunca retinal venlerde ve kapillerlerde önemli miktarlarda lökosit birikmektedir (190). Reperfüzyondan 12 saat sonra lökosit kümelenmesi maksimum değerine ulaşmaktadır. Reperfüzyon hasarında nötrofil lökositlerden salgılanan proteolitik enzimler, PAF ve araşidonik asit metabolitleri doku zedelenmesine yol açmaktadır. Vasküler endoteldeki adhezyon molekülleri bloke edilerek lökosit-endotel iletişimi bozulabilmekte ve iskemi sonrası retinal atrofi önlenmektedir (191). Tsujikawa ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı çalışmada 60 dakika retinal iskemi sonrası reperfüzyon başlamadan 5 dakika önce P selektin veya ICAM-1 monoklonal antikoru uygulanarak lökosit infiltrasyonu araştırılmış ve her iki antikorun uygulandığı grupta lökosit birikiminin engellendiği gözlenmiştir (192). Yapılan bir başka çalışmada antiinflamatuvar bir ajan olan Takrolimus (FK 506) ile 60 dakikalık retinal iskemi sonrası gelişebilen lökosit birikiminin belirgin olarak azaldığı izlenmiştir (193). Baatz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada intraoküler inflamasyon oluşturdıkları gözlerde steroidlere göre talidomidin daha erken lökosit göçünü engellediğini ve bunu adezyon moleküllerinin sentezini, hücre membranlarına yapışmasını ve ligand bağlama kapasitelerini azaltarak yaptığını bildirmişlerdir (194). Çalışmamızda gruplar ışık mikroskobu ile histopatolojik olarak incelenmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Buna göre reperfüzyonun altıncı gününde retinal iç tabakalarda (iç limitan membran ve iç pleksiform tabakalar) talidomid grubunda sham grubuna göre lökosit infiltrasyonu anlamlı olarak az izlenmiştir (p=0.004).

Sonuç olarak antiinflamatuvar, antianjiyogenik bir ajan olan talidomid, retinal iskemi-reperfüzyon hasarında retinal VEGF ve TNF- $\alpha$  düzeylerini anlamlı olarak

düşürücü etkisi, retinal iç tabakalardaki PNL infiltrasyonunu önleyici özellikleri ile klinikte güvenle ve kolaylıkla kullanılabilir bir ajan gibi gözükmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Kuriyama H, Waki M, Nakagawa M, Tsuda M. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. *Ophthalmic Res* 2001; 33:196-202.
2. Ural E, Yararcan M, Küçükgül SC, Öziz E. Büyüme faktörleri ve retinopatiler. *T Oft Gaz* 2002; 32:552-60.
3. Conger JD, Weil JV. Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Invest Med* 1995; 43:4311-42.
4. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 1994; 307:284-92.
5. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-47.
6. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56:345-55.
7. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-5.
8. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:517-24.
9. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-09.
10. Sapolsky RM. Cellular defenses against excitotoxic insults. *J Neurochem* 2001; 76:1601-11
11. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev* 2002; 39:55-73.
12. Lewden O, Garcher C, Assem M, Morales C, Rochette L, Bron AM. Changes of the inducible heat shock protein 70 mRNA level in rat retina after ischemia and reperfusion. *Ophthalmic Res* 1998; 30:291-94.



13. Gohdo T, Ueda H, Ohno S, Iijima H, Tsukahara S. Heat shock protein 70 expression increased in rabbit muller cells in the ischemia–reperfusion model. *Ophthalmic Res* 2001;33:298–302.
14. Li Y, Roth S, Laser M, Ma JX , Crosson CE. Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 2003; 44:1299–304.
15. Yokoyama A, Oshitari T, Negishi H, Dezawa M, Mizota A, Adachi-Usami E. Protection of retinal ganglion cells from ischemia-reperfusion injury by electrically applied Hsp27. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:3283-86.
16. Yoneda S, Tanihara H, Kido N, Honda Y, Goto W, Hara H, Miyawaki N. Interleukin-1 beta mediates ischemic injury in the rat retina. *Exp Eye Res* 2001; 73:661-67.
17. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-85.
18. Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *Embo J* 1999; 18:4414-23.
19. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources , receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:742-80.
20. Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF- $\alpha$  in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242:409-13.
21. Eisenkraft A, Luria S, Robenshtok E, Hourvitz A. Using thalidomide against pathological neovascularization. *Harefuah* 2003; 142:212-16.
22. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177:1675-80.
23. Kayalı H. Gözün Gelişimi. Kayalı H (ed): İnsan Embriyolojisi. Renk Ofset Matbaacılık, Ankara; 1987: 282-90.

24. Miller SLH. Embryology and Anatomy. Miller SLH (ed): Parsons' Diseases of the eye. Churchill Living-stone, Edinbourg, 1984: 3-19.
25. Newell FW. Anatomy and Embryology. Newell FW (ed): Ophthalmology. The C. V. Mosby Company, St. Louis, 1986: 65-75.
26. Justice J, Lehmann LP. Cilioretinal arteries. A study based on review of stereo fundus photographs and fluorescein angiographic findings. Arch Ophthalmol 1976; 94:1355-58.
27. Snell RS. Development of the Eye and the Ocular Appendages. Snell RS (ed): Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell, Boston, 1989: 1-15.
28. Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, Zhang S, Kashii S, Honda Y, et al. Lomerizine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. Exp Eye Res 2000; 70:475-84.
29. Nayak MS, Kita M, Marmor MF. Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutaz and catalase. Invest Ophthamol Vis Sci 1993; 34:2018-22.
30. Matsubara A, Tomida K, Matsuda Y, Tamai K, Tashita A, Jomori T, et al. Protective effects of selectin ligands/inhibitör (SKK-60060) against retinal ischemia-reperfusion injury. Exp Eye Res 2000; 71:283-93.
31. Augustin AJ, Spitznas M, Koch F, Grus F, Lutz J. Effects of perfluorooctylbromide and vitamin E on ischemia induced retinal oxidative tissue damage. Exp Eye Res 1998; 66:19-24.
32. Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. Prog Retin Eye Res 2004; 23:91-147.
33. Chun MH, Kim IB, Ju WK, Kim KY, Lee MY, Joo CK, Chung JW. Horizontal cells of the rat retina are resistant to degenerative processes induced by ischemia-reperfusion. Neurosci Lett 1999; 260:125-28.

34. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53:135–59.
35. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:79-110.
36. Robbins SL, Kumar V. *Basic pathology* 4 th ed. Güneş kitabevi, Ankara 1990:1-350.
37. Barry MC, Grace PA. Ischemia reperfusion injury. *Surgery* 1997; 3:68-72.
38. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1.Baskı, Mimoza yayınları, Konya 1995:1-115.
39. Hayreh SS, Weingeist TA. Experimental occlusion of the central retinal artery of the retina: retinal tolerance time to acute ischemia. *Br J Ophthalmol* 1980; 64:818-25.
40. Schmidt M, Giessel A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem* 2003; 278:1932-35.
41. Kuwabara T, Cogan D. Retinal glycogen. *Arch Ophthalmol* 1961; 66:96–104.
42. Kaskel D, Hockwin O, Metzler U, Schedtler CM. Glycogen content in the rabbit retina in relation to blood circulation. *Ophthalmol Res* 1973; 5:177–85.
43. Johnson N. Retinal glycogen content during ischaemia. *Albrecht Von Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1977; 283:271–82.
44. Stone J, Maslim J, Kocsi KV, Mervin K, Bowers F, Chu Y, et al. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:689-735.
45. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25.
46. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-85.

47. Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994; 269:4355-59.
48. Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1252-96.
49. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:517-24.
50. Shizukuda Y, Tang SQ, Yokota R, Ware JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C activity. *Circ Res* 1999; 85:247-56.
51. Spyridopoulos I, Luedemann C, Chen D, Kearney M, Chen D, Murohara T, et al. Inhibition of protein kinase C suppresses VEGF-induced angiogenesis, but promotes VEGF-induced, No-dependent vascular permeability. *Arteriosclerosis, Trombosis, and Vascular Biology* 2002; 22:901.
52. Hidaka H, Kobayashi R. Use of protein (serine/threonine) kinase activators and inhibitors to study protein phosphorylation in intact cells. In: Hardie D (ed). *Protein Phosphorylation*. Oxford: Oxford University Press; 1993:123-25.
53. Klagsbrun M, D'Amore P. Vascular endothelial growth factors and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7:259-70.
54. Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255:989-91.
55. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1579-86.
56. Ferrara N, Houck K, Jakeman Leung D. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13:18-32.

57. Korpelainen E, Alitalio K. Signaling angiogenesis and lenfangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:159-64.
58. Aiello LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int* 2000; 58:113-19.
59. Wada M, Ogata N, Otsuji T, Uyama M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 1999; 18:203-13.
60. Ozaki H, Hayashi H, Viores SA, Moromizato Y, Campochiaro PA, Oshima K. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res* 1997; 64:505-17.
61. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Antiangiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5:237-56.
62. Becerra SP, Amaral J. Erythropoietin: an endogenous retinal survival factor. *N Engl J Med* 2002; 347:1968-70.
63. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 2002; 8:718-24.
64. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S ,et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10659-64.
65. Dorey KC, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak H, Brown L. Correlation of vascular permeability factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1210-17.
66. Nakagawa K, Chen Y, Ihibashi H, Yonemitsu Y, Murata T. Angiogenesis and its regulation:roles of vascular endothelial growth factor. *Seminars In Thrombos and Hemost* 2000; 26:61-66.

67. Jennifer L, Berka W, Kelly D, Gilbert R. The interaction between the renin-angiotensin system and vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of retinal neovascularization in diabetes. *J Vasc Res* 2001; 38:527-35.
68. Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol* 1999; 26:16-21.
69. Jaatela M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin. *Lab Invest* 1991; 64:724-42.
70. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320:584-88.
71. Balkwill F. Tumor necrosis factor or promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:135-41.
72. Kwon B, Youn BS, Kwon BS. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:340-45.
73. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104:487-501.
74. Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. Cytokines. *Cellular and Molecular Immunology Philadelphia: WB Saunders Company, 1994:240-61.*
75. Moreland LW. Inhibitors of tumor necrosis factor for R.A. *J Rheumatol* 1999; 57: 7-15
76. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr A (eds). *Basic and Clinical Immunology* 1993; 11:571-611.
77. Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler. *T Klin Tıp Bilimleri* 1997; 17:65-74.
78. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 1999; 169:175-94.

79. Bone RC. Immunologic dissonance : a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125:680-87.
80. Vassali P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-52.
81. Gravestien LA, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* 1998; 10:423-34.
82. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000; 20:8693-700.
83. Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:2340-43.
84. Sharma SH, Alm P, Westman J. Nitric oxide and carbon monoxide in the brain pathology of heat stres. *Prog Brain Res* 1998; 115:297-333.
85. Tezel G, Yang X, Yang J, Wax MB. Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res* 2004; 996:202-12.
86. Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, Mandai M, Honda Y. Role of nitric oxide during the initial phase of reperfusion after retinal ischemia in the rat. *Ophthalmic R* 1996; 31:16-23.
87. Hangai M, Yoshimura N, Honda Y. Increased cytokine gene expression in rat retina following transient ischemia. *Ophthalmic R* 1996; 28:248-54.
88. Moreland LW. Inhibitors of tumor necrosis factor for R.A. *J Rheumatol* 1999; 57: 7-15.
89. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-85.
90. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Embo J* 1998; 17:1656-64.

91. Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E, Timpl R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol* 2000; 301:1179-90.
92. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-84.
93. Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7799-803.
94. Griffioen AW, Damen CA, Mayo KH, Barendsz-Janson AF, Martinotti S, Blijham GH, Groenewegen G. Angiogenesis inhibitors overcome tumor-induced endothelial cell anergy. *Int J Cancer* 1999; 80:315-19.
95. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediated the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79:315-28.
96. Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J* 2001; 15:1044-53.
97. Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, Stillman IE, Lombardo M, Arispe L, et al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59:189-97.
98. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:68-75.
99. Deininger MH, Wybranietz WA, Graepler FTC, Lauer UM, Meyermann R, Schluesener HJ. Endothelial endostatin release is induced by general cell stress and modulated by the nitric oxide/cGMP pathway. *FASEB J* 2003; 17:1267-76.
100. Bhutto IA, Kim SY, McLeod DS, Merges C, Fukai N, Olsen BR, Luttj DA. Localization of collagen XVIII and the endostatin portion of collagen XVIII in aged human control eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:1544-52.



101. Gunzler V. Thalidomide in human immunodeficiency virus (HIV) patients: a review of safety considerations. *Drug Saf* 1992; 7:116-34.
102. Hendler S, McCarty M. Thalidomide for autoimmune disease. *Med Hypotheses* 1983; 10:437-43
103. Chen TL, Vogelsang GB, Petty BG, et al. Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of thalidomide after oral dosing in healthy male volunteers. *Drug Metab Dispos* 1989; 17:402-5.
104. Braun AG, Harding FA, Weinreb SL. Teratogen metabolism: thalidomide activation is mediated by cytochrome P-450. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82:175-79.
105. Koch HP. Thalidomide and congeners as anti-inflammatory agents. *Prog Med Chem* 1985; 22:165-242.
106. Hellman K, Duke DI, Tucker DF. Prolongation of skin homograft survival by thalidomide. *Br Med J* 1965; 2:687-89.
107. Murphy GP, Mirand EA, Groenewald JG, et al. Erythropoietin release in renal allografted baboons, with and without immunosuppression. *Invest Urol* 1970; 7:271-82.
108. Faure M, Thivolet J, Gaucherand M. Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide. *Arch Dermatol Res* 1980; 269:275-80.
109. Barnhill RL, Doll NJ, Millikan LE, et al. Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11:814-19.
110. Gad SM, Shannon EJ, Krotoski WA, et al. Thalidomide induces imbalances in T-lymphocyte sub-populations in the circulating blood of healthy males. *Lepr Rev* 1985; 56:35-39.
111. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173:699-703.

112. McHugh SM, Rifkin IR, Deighton J, et al. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2(Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:160-67.
113. Shannon EJ, Mirand RO, Morales MJ, et al. Inhibition of de novo IgM antibody synthesis by thalidomide as a relevant mechanism of action in leprosy. *Scand J Immunol* 1981; 13:553-62
114. Makonkawkeyoon S, Limson-Pobre RNR, Moreira AL, et al. Thalidomide inhibits the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5974-78.
115. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4082-85.
116. Schroder JM, Sellhaus B, Wohrmann T. Inhibitory effects of thalidomide on cellular proliferation, endoneurial edema and myelin phagocytosis during early Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol* 1995; 89:415-19.
117. Stephens TD. Proposed mechanisms of action in thalidomide embryopathy. *Teratology* 1988; 38:229-39.
118. Ochonisky S, Verroust J, Bastuji-Garin S, et al. Thalidomide neuropathy incidence and clinicoelectrophysiologic findings in 42 patients. *Arch Dermatol* 1994; 130:66-69.
119. Clemmensen OJ, Olsen PZ, Andersen KE. Thalidomide neurotoxicity. *Arch Dermatol* 1984; 120:338-41.
120. De Iongh RU. A quantitative ultrastructural study of motor and sensory lumbosacral nerve roots in the thalidomide-treated rabbit fetus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990; 49:564-81.
121. Aronson IK, Yu R, West DP, et al. Thalidomide-induced peripheral neuropathy. *Arch Dermatol* 1984; 120:1466-70.

122. Peachey NS, Green DJ, Ripps H. Ocular ischemia and effects of allopurinol on functional recovery in the rat retina if the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol* 1993; 34:58-65.
123. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J of Surg* 1994; 81:637-47.
124. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94:407-11.
125. Gupta LY, Marmor MF. Mannitol, dextrometorphan and catalase minimize ischemic damage to retina pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* 1993; 111:383-88.
126. Weber M, Said SM, Hicks D, Dreyfus H, Sahel JA. Monosialoganglioside GM1 reduces ischemia-induced injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:266-74.
127. Hearse DJ, Humprey SM, Cham EB. *Mol Cell Cardiol* 1973; 5:395-407
128. Mc Cord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985; 312:159-62.
129. Chiang SKS, Lam TT. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-Aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3210-14.
130. Lam TT, Ablter AS, Tso MOM. Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:967-75.
131. Muller A, Pietri S, Villain M, Frejaville C, Bonne C, Culcasi M. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res* 1997; 64:637-43.
132. Daugeliene L, Niwa M, Hara A, Matsuno H, Yamamoto T, Kitazawa Y, Uematsu T. Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2743-47.
133. Ophir A, Chevion M. A possible role of free radicals in the transplantation of retina pigment epithelial cells. *Ophthalmic Surg Apr* 1992; 23:284-87.

134. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina: demonstration of free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:1471-78.
135. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10:267-72.
136. Mosinger JL, Price MT, Bai HY, Xiao H, Wozniak DF, Olney JW. Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp Neurol* 1991; 113:10-17.
137. Osborne NN, Larsen AK. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem Int* 1996; 29:263-70.
138. Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, Miki H, Uyama M. High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234:445-51.
139. Jampol LM, Tielsch J. Race, macular degeneration, and the Macular Photocoagulation study. *Arch Ophthalmol* 1992; 110:1699-700.
140. Safa R, Osborne NN. Retinas from albino rats are more susceptible to ischaemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res* 2000; 862:36-42.
141. Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective  $\beta$ -isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 1997; 46:1473-80.
142. Aiello LP. Implications for novel growth factor therapies in diabetic retinopathy. *Current Opinion In Endocrinology and Diabetes* 1996; 3:307.
143. Aiello LP, Ferrara N, King GL. Hypoxic regulation and bioactivity of vascular endothelial growth factor: Characterization in retinal microvascular-pericytes and pigment epithelial cells (abstract). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:1868.

144. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 1992; 116:435-39.
145. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1:207-35.
146. Peeper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:824-31
147. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, et al. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000; 20:2260-68.
148. Mentlein R, Held-Feindt J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumor therapy? *Naturewissenschaften* 2003; 90:385-94
149. Campochiaro PA, Hackett SF. Ocular neovascularization: a valuable model system. *Oncogene* 2003; 22:6537-48.
150. Burgos R, Simo R, Audi L, Mateo C, Mesa J, Ramirez MG, Carrascosa A. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1997; 40:1107-09.
151. Hofman P, Blijswijk BC, Gaillard PJ, Vrensen GF, Schlingemann RO. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:861-66.
152. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10457-61.
153. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:66-71.

154. Seo MS, Kwak N, Ozaki H, Yamada H, Okamoto N, Yamada E, et al. Dramatic inhibition of retinal and choroidal neovascularization by oral administration of a kinase inhibitor. *Am J Pathol* 1999; 154:1743-53.
155. Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 2000; 156:697-707.
156. Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R, Smith LES. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4851-56.
157. Luna J, Tobe T, Mousa SA, Reilly TM, Campochiaro PA. Antagonists of integrin  $\alpha$ -v  $\beta$ -3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab Invest* 1996; 75:563-73.
158. Hammes H, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner K. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med* 1996; 2:529-33.
159. Armstrong D, Augustin AJ. Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ophthalmologica* 1998; 212:410-14.
160. Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1987; 31:291-306.
161. Spraul CW, Kaven C, Kampmeier J, Lang GK, Lang GE. Effect of thalidomide, octreotide, and prednisolone on the migration and proliferation of RPE cells in vitro. *Current Eye Res* 1999; 19:483-90.
162. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:185-91.
163. Wajant H. Death receptors. *Essays Biochem* 2003; 39:53-71.
164. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmeier K, Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in

- retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and receptor 2. *J Neurosci* 2002; 22:RC216.
165. Armstrong D, Ueda T, Ueda T, Aljada A, Browne R, Fukuda S, et al. Lipid hydroperoxide stimulates retinal neovascularization in rabbit retina through expression of tumor necrosis factor-alpha, vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor. *Angiogenesis* 1998; 2:93-104.
166. Chidlow G, Schmidt KG, Wood JP, Melena J, Osborne NN. Alpha -lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* 2002; 43:1015-25.
167. Zhang C, Takahashi K, Lam TT, Tso MO. Effects of basic fibroblast growth factor in retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3163-68.
168. Chao HM, Chidlow G, Melena J, Wood JPM, Osborne NN. An investigation into the potential mechanisms underlying the neuroprotective effect of clonidine in the retina. *Brain Res* 2000; 877:47-57.
169. Agarwal N, Martin E, Krishnamoorthy RR, Landers R, Wen R, Krueger S, et al. Levobetaxolol-induced up-regulation of retinal bFGF and CNTF mRNAs and preservation of retinal function against a photic-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 2002; 74:445-53.
170. Deininger MH, Wybraniec WA, Graepler FTC, Lauer UM, Meyermann R, Schluesener HJ. Endothelial endostatin release is induced by general cell stress and modulated by the nitric oxide/cGMP pathway. *FASEB J* 2003; 17:1267-76.
171. Bhutto IA, Kim SY, McLeod DS, Merges C, Fukui N, Olsen BR, Lutty GA. Localization of collagen XVIII and the endostatin portion of collagen XVIII in aged human control eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:1544-52.
172. Mori K, Ando A, Gehlbach P, Nesbitt D, Takahashi H, Goldstein D, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by intravenous injection of adenoviral vectors expressing secreted endostatin. *Am J Pathol* 2001; 159:313-20.

173. Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, Silva RL, Oshima S, Melia M, et al. Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment. *FASEB J* 2003; 17:896-8.
174. Noma H, Funatsu H, Ymashita H, Kitano S, Mishima HK, Hori S. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:1075-80.
175. Faberowski N, Stefansson E, Davidson RC. Local hypothermia protects the retina from ischemia. A quantitative study in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:2309-13.
176. Bauer KS, Dixon SC, Figg WD. Inhibition of angiogenesis by Thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:1827-34.
177. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, Becker MD, Volcker HE. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236:461-66.
178. Tseng S, Pak G, Washenik K, Pomeranz MK, Shupack JL. Rediscovering thalidomide: A review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35:969-79.
179. Kapin MA, Doshi R, Scatton B, DeSantis LM, Chandler ML. Neuroprotective effects of eliprofil in retinal excitotoxicity and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1177-82.
180. Block F, Schwarz M. Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction. *Exp Eye Res* 1997; 64:559-64.
181. Fontana AC, Guizzo R, Belebani RAM, Coimbra NC, Amara SG, Santos WF, Coutinho-Netto J. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1297-309.
182. Lonchampt M, Pennel L, Duhault J. Hyperoxia/normoxia-driven retinal angiogenesis in mice: a role for angiotensin II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:429-32.



183. Porta M, Allione A. Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacology and Therapeutics* 2004; 103:167-77.
184. Napgala P, Malik AB, Young PT, Lum H. Protein kinase C $\beta$ 1 overexpression augments phorbol ester-induced increase endothelial permeability. *J Cell Physiol* 1996; 166:249-55.
185. Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study Group, Effects of aspirin treatment of diabetic retinopathy. ETDRS Report No.8. *Ophthalmology* 1991; 98:786-806.
186. Hughes WF. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 1991; 53:573-82
187. Ishihara M, Nakano T, Ohama E, Kawai Y. Postischemic reperfusion in the eyes of young and aged rats. *Jpn J Physiol* 2000; 50:125-32.
188. Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, Fujita K, Bursell SE, Aiello LP, et al. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1153-58.
189. Lu M, Perez VL, Ma N, Miyamoto K, Peng HB, Liao JK, Adamis AP. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1808-12.
190. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:10836-41.
191. Ogura Y. In vivo evaluation of leukocyte dynamics in the retinal and choroidal circulation. *Jpn J Ophthalmol* 2000; 44:317-24.
192. Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Tojo SJ, et al. Retinal ischemia-reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1183-90.
193. Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Tojo SJ, et al. Discussion 1437-8 Tacrolimus (FK506) attenuates leukocyte accumulation after transient retinal ischemia. *Stroke* 1998; 29:1431-37.

194. Baatz H, Tönnessen B, Prada J, Pleyer U. Thalidomide inhibits leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis. *Ophthalmic Res* 2001; 33:256-63.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Malatya'da doğdum. İlk öğrenimimi Malatya'da tamamlayıp İstanbul Özel Ata Koleji'nde hazırlık sınıfını okuduktan sonra orta ve lise öğrenimimi Malatya Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1995 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nden 2001 yılında mezun olup, aynı yıl Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniği'nde asistan doktor olarak çalışmaya başladım. Aynı klinikte halen çalışmaktayım.

