



KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İDİYOPATİK EPİRETİNAL MEMBRANI OLAN HASTALARDA VİTREUS
ÖRNEKLERİNİN PROTEOMİX YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. FATMA SÜMER

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

2019

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İDİYOPATİK EPİRETİNAL MEMBRANI OLAN HASTALARDA VİTREUS
ÖRNEKLERİNİN PROTEOMİK YÖNTEMİYLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr.FATMA SÜMER
Göz Hastalıkları Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. V.LEVENT KARABAŞ**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. NURŞEN YÜKSEL**

Etik Kurul Onayı: KOU-GOKAEK 2018/58

2019

ÖNSÖZ

Kliniğimiz ve üniversitemiz kurucularından, uzmanlık eğitimim sürecinde tanımaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Prof.Dr.Yusuf Çağlar'a,

Mesleki anlamda bizlerle tecrübelerini her zaman paylaşan ve biz asistanların herhangi bir sorunu olduğunda sabırla dinleyip yardımcı olan,yalnızca bir bilim insanı olarak değil bir hekim,bir kadın ve insani değerler olarak da örnek aldığım, asistanı olmaktan ayrıca onur duyduğum anabilimdalı başkanımız Prof. Dr. Nurşen Yüksel'e,

Cerrahi becerinin sabır, disiplin ve çok çalışmakla oluşabileceğini kendi meslek hayatıyla bize gösteren ve tez sürecinde desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Levent Karabaş'a,

Asistanlığım boyunca çalışmalarını , sabrını ve özverisini takdir ve hayranlıkla izlediğim, mesleğinde titizliği hiç elden bırakmayan ve başarının bir tesadüf olmadığı gerçeğini bizlere davranışları ile de kanıtlayan değerli hocam Prof. Dr. Özgül Altıntaş'a,

Klinik tavır ve davranışları ile olduğu kadar bilimsel çalışmalar konusunda yeni fikirlere açık olması ve cesaretlendiren tavrı ile de tüm tez sürecimde olduğu gibi her zaman manevi desteğini yanımda hissettiğim sevgili hocam Prof. Dr. Berna Özkan'a,

Asistanlığım süresince mesleki anlamda desteğini esirgemeyen ve cerrahiye başlarken emekleme dönemlerimde sabırla yanımda olan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Dilara Pirhan'a,

Önce kıdemlim olarak tanıdığım,benzer dönemlerden geçtiğimiz sonra da hocam olarak mesleki anlamda desteğini esirgemeyen Doktor Öğretim Görevlisi Dr.Sevgi Özel Subaşı'na,

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım, Prof.Dr. Murat Kasap, Doç.Dr. Gürler Akpınar'a

Bu günlere gelmemi sağlayan, her zaman herşekilde desteğini esirgemeyen sevgili aileme,

Asistanlık süresince ailelerimizden çok birlikte zaman geçirdiğimiz, acı-tatlı birçok anılarımız olan ve çalışmaktan her zaman keyif aldığım değerli asistan hekim arkadaşlarıma,

Asistanlığım süresince destek olan hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma, Şükranlarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

KISALTMALAR LİSTESİ

TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Amaç

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Retina Anatomisi

2.1.1 Retinanın Katmanları

2.1.2. Retinayı Oluşturan Hücreler ve Fonksiyonları

2.1.3. Retinanın Kanlanması

2.2. RETİNANIN FİZYOLOJİSİ

2.3. RETİNAL EMBRİYOGENEZİS

2.4. VİTREUS

2.5. EPIRETİNAL MEMBRANLAR

2.5.1. Tanım ve Sınıflandırma

2.5.2. Epidemiyoloji

2.5.3. Patogenez

2.5.4. Semptomlar

2.5.5. Klinik Bulgular

2.6. ARKA VİTRE DEKOLMANI

2.7 .HİSTOPATOLOJİ

2.8. MUAYENE YÖNTEMLERİ

2.8.1. Refraksiyon Muayenesi

2.8.2. Fundus Muayenesi

2.8.3. Tanı Konulması

2.8.4 Yardımcı Tetkikler

2.8.4.1. Optik Koherens Tomografi (OKT)

2.8.5. Ayırıcı Tanı

2.8.6. Tedavi

2.9 Proteomiks analizi

2.9.1 Biyobelirteçler

2.9.2 Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji

2.9.3.MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi

2.9.4 2D Jel elektroforez çalışmaları

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Örnek Alınma Biçimi ve Cerrahi Teknik:

3.2. Proteomiks Değerlendirmesi

3.2.1 Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması

3.2.2 Protein Konsantrasyonunun Tayini

3.2.3Protein Örneklerinin Odaklanmaları ve 2D Jel Elektroforezleri

3.2.4 In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18

3.2.5 MALDI TOF-TOF Analizi

3.2.6 Biyoinformatik Analizler

4. BULGULAR

4.1 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

5. TARTIŞMA

6. SONUÇ

7. KAYNAKÇA

RESİM LİSTESİ

1. Renkli fundus görüntüsünde makulanın topografik anatomisinin şematik gösterimi.
2. Optik koharens tomografi görüntüsünde, retinanın histolojik tabakalanması ve fovea ile olan ilişkisi.
3. Retinanın Tabakaları
4. Bruch membranı (kırmızı ok) içten dışa; RPE basal laminası, iç kollagen tabaka, elastin lifler, dış kollagen tabaka, koryokapillaris basal laminası.
5. Retinanın hücresel tabakaları
6. Retinanın topografik haritasında kon ve rodların dağılımı. Rod yoğunluğu optik diskin de dışından geçen geniş bir dairesel alanda bulunurken L ve M konlar foveal pitte yoğunlaşmaktadır.
7. Rod ve Con Morfolojik Görüntüsü. BB, Basal Cisim; C, Connecting Stalk; Ce, Sentirol; IS, İç Segment; M, Mitokondri; NR, Nukleus Bölgesi ; OS, Dış Segment; SR, Siaptik Bölge; SV, Sinaptik Vezikül.
8. Retinanın nöronal organizasyonu; soda perifer retina sağda foveal alan gösterilmektedir.
9. Rod ve konların sinaptik bölgeleri rodların bipolar ve horizontal hücrelerle tek triadı (bağlantı) varken konların birden fazla sinaptik triadı mevcuttur.
10. Foveanın histolojik görünümü.
11. ON-Off Yolları.
12. Retinanın çeşitli hücre gruplarının bulunduğu tabakaları şematize eden bir çizim.C, Kon; R, Rod; BC, Bipolar Hücreler; HC, Horizontal Hücre; AC, Amakrin Hücreler; GC, Ganglion Hücresi; MC, Müller Hücresi (Müller hücreleri retinanın eksternal limitan membranından internal limitan membranına dek uzanmaktadır).
13. Primer görme korteksinin 6 tabakası.
14. Şematik çizimde santral retinal arter dallarının ILM altında seyri ve sinir lifi tabakası ile iç nükleer tabakada bulunan yüzeyel ve derin kapiller ağlar görülmekte (kırmızı oklar). Altta ise RPE altında fenestralı koryokapillaris kapillerleri seçiliyor (beyaz ok).
15. Şematik çizimde, optik vezikülden optik çukurluğa ve çok katlı retinal yapıya geçiş gösterilmektedir.

16. Vitrenin göz içi dokularla ilikisini gösteren şematik çizim. BS: Berger boşluğu, CC: Cloquet kanalı, M: Martegiani bölgesi, WL: Wieger ligamanı, VB: Vitre bazı, AH: Anterior hyaloid.
17. Kollagen demetlerinin organizasyonu ve Na-hyalüronat molekülleriyle ilişkisi.
18. Sağ gözde ERM (A: renkli fundus, B: ERM'ye bağlı damarlarda distorsiyon, C: FFA' da geç fazda artan makula ödemi).
19. Fundus fotoğrafında travmaya sekonder gelişmiş evre 3 ERM, makular pucker.
20. Bir numaralı Amsler grid kartında çizgilerdeki dalgalanmalar hasta tarafından kartın üzerine çizilmiştir.
21. A M-Charts testi, **B** hasta tarafından 0,6°'lik noktalardan oluşan doğru üzerinde metamorfopsinin kaybolduğu belirtilmiştir.
22. ERM (pucker)
23. Posterior prekortikal vitre paketi şematik görünüm; arka vitre likefiye olarak arka kutbun önünde optik boşluk oluşturmaktadır, vitreal korteks ise halen retinal yüzeye yapışıktır.
24. Sağ gözde ERM'nin red free fundus resmi.
25. OKT'nin şematik olarak çalışma prensibi görülmektedir. Referans ayna-ayırıştırıcı mesafesi değiştirilerek farklı derinlikte retinal dokulara ait farklı fazdaki dalgalar referans ışınla karşılaştırılabilir.
26. Normal bir gözde herbir lineer makula taramasında OKT, retina kalınlığını hesaplar. Bunun için çizilen sınırların uygunluğu kontrol edilmelidir.
27. Sağlıklı bir gözde, makula taramasında; aynı gözün Stratus OKT (solda), çok yüksek çözünürlüklü OKT (ortada) ve sOKT (sağda) ile elde edilen görüntüleri görülmektedir.
- 28.** Retina iç yüzeyinde ERM'ye ait hiperreflektif band, retinal kalınlaşma.
29. Soldan sağa; infüzyon setinin ve cerrahi giriş yerlerinin trokarlar yardımıyla transkonjunktival yerleşimi (KOUGH operasyon görüntülerinden alınmıştır.).

ŞEKİL LİSTESİ

1. Kontrol grubuna ait K2 vitreus örneğinin çöktürme sonrası ve öncesi bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü
2. HASTA VE KONTROL ÇÖKERTME SONUÇLARI
3. Kontrol ve hasta havuzu örneklerinin bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü. Her kuyucuğa 10 µg protein yüklenmiştir
4. 2D jel görüntüsü: pH3-10 aralığında protein dağılımını ve sayısını belirlemek amacıyla yapılmış 7cm'lik 2D jel görüntüsü. (M: Unstained Protein Molecular Weigth Marker, ThermoScientific, CatNo26610)
5. 11 cm'lik geniş jellerde ve pH 3-10 aralığında çalışılmış jellerin PDQuest Advance yazılımı ile analizi
6. Her bir grup için elde edilen 2D jel görüntüleri ve regülasyon görülen ve kesilip tanımlanan proteinlerin jel üzerindeki pozisyonları
7. Hasta ve kontrol grubunda protein spotlarının yakın-çekim resimleri
8. Proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
9. Proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
10. Proteinlerin katıldığı hücrel prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
11. Proteinlerin katıldığı sınıflamaya ait prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
12. Hücrel yolak prosesleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
13. . Proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
14. Proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
15. Proteinlerin katıldığı hücrel prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
16. Proteinlerin katıldığı sınıflamaya ait prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

17. Proteinlerin katıldığı hücrel prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu
18. Up regüle proteinlerin STRING analizi.
19. Up regüle proteinlerin moleküler fonksiyon kümelenmeleri.
20. .Up regüle proteinlerin aquesu ve vitreous ile alakalı makalelerde tespit edilen proteinlerle ortak olanlar.
21. Down regüle proteinlerin STRING analizi.
22. Down regüle proteinlerin moleküler fonksiyon kümelenmeleri.
23. Down regüle proteinlerin aquesu ve vitreous ile alakalı makalelerde tespit edilen proteinlerle ortak olanlar.
24. Up ve Down regüle proteinler beraber STRING analizi.
25. Up ve Down regüle proteinler beraber moleküler fonksiyon kümelenmeleri.
26. Up ve Down regüle proteinler beraber aquesu ve vitreous ile alakalı makalelerde tespit edilen proteinlerle ortak olanlar.

TABLO LİSTESİ

- 1) Tablo 1:** Miktarlarında regülasyon görülen ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin gruplara göre hesaplanmış regülasyon oranları. Tabloda verilen yoğunluk değerleri Hasta ve Kontrol sütunları altında listelenmiştir. Kırmızı renkli ok up-regülasyonu, siyah renkli ok ise down-regülasyonu temsil etmektedir.
- 2)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu moleküler fonksiyonlarına göre dağılım tablosu
- 3)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu biyolojik proseslerine göre dağılım tablosu.
- 4)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel proseslerine göre dağılım tablosu.
- 5)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu protein sınıflama proseslerine göre dağılım tablosu.
- 6)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel yolak 'a göre dağılım tablosu
- 7)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu moleküler fonksiyonlarına göre dağılım tablosu
- 8)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu biyolojik proseslerine göre dağılım tablosu.
- 9)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel proseslerine göre dağılım tablosu.
- 10)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu protein sınıflama proseslerine göre dağılım tablosu.
- 11)** Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel proseslerine göre dağılım tablosu.
- 12) TABLO X: MALDI SONUÇLARI**

KISALTMALAR

ABCR : Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Transporter
A. D. : Anabilim Dalı
Ark. : Arkadaşları
AVD : Arka Vitre Dekolmanı
AP-1 : Aktivatör Protein 1
bFGF : Bazik Fibroblast Growt Faktör
COST : Kon Dış Segment Uç Çizgisi
CFT : Santral Foveal Kalınlık
DEİGK : Düzeltilmiş En İyi Görme Keskinliği
ELM : Eksternal Limitan Membran
ERM : Epiretinal Membran
FFA : Fundus Floresein Anjiografisi
fERG : Fokal Elektoretinografi
FK : Fotokoagülasyon
GAG : Glikozaminoglikan
G : Gauge
GABA : Gamaaminobütirik Asit
GİB : Göz İçi Basıncı
HGF : Hepatosit Growt Faktör
HA : Hyalüronik Asit
ILM : Internal Limitan Membran
IS/OS : Fotoreseptör İç ve Dış Segment Birleşme Hattı
ISY : İndosiyanın Yeşili
ISYA : İndosiyanın Yeşili Anjiografisi
İOL : İntroakuler Lens
KMÖ : Kistoid Makula Ödemi
LGN : Lateral Genikulat Nükleus
MMP : Matriks Metallo Proteinaz
M : Metamorfopsi
ml : Mililitre

mm : Milimetre
mmHg : Milimetre Civa
mERG : Multifokal Elektroretinografi
nm : Nanometre
NF kB : Nüleer Faktör Kappa B
PPV : Pars Plana Vitrektomi
Ort. : Ortalama
Preop. : Preoperatif
PDR : Proliferatif Diyabetik Retinopati
PVR : Proliferatif Vitreoretinopati
PROS : Fotoreseptör Dış Segmenti
Postop : Postoperatif
SD-OKT : Spektral Domein Optik Koherens Tomografi OKT : Optik Koherens Tomografi
RPE : Retina Pigment Epiteli
TA : Triamsinolon Asetonid
TM : Tripan Mavisi
TGF beta : Transforming Growth Faktör Beta
TIMP : Doku Metalloproteinaz İnhibitörleri
VEGF : Vasküler Endoteliyal Growth Faktör
VİH : Vitre İçi Hemoraji
µm : Mikrometre
Na⁺-K⁺ATPaz : Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz

ÖZET

İDİYOPATİK EPIRETİNAL MEMBRANI OLAN HASTALARDA VİTREUS ÖRNEKLERİNDEKİ PROTEİN İÇERİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç ve Kapsam: İdiyopatik Epiretinal Membranı olan hastalarda hastalığın olası patogenezi ve yeni tedavi yöntemleri gelişimi konusunda protein içeriğinin proteomik yolla incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları A.D. Retina departmanında Mayıs 2017-Ağustos 2018 tarihleri arasında idiyopatik epiretinal membran tanısıyla pars plana vitrektomi uygulanacak 12 hastanın 12 gözü ve kontrol grubu olarak da herhangi sistemik hastalığı olmayan 12 hastanın 12 gözü çalışmaya dahil edildi.

İki gruptan da steril şartlarda ve kontamisyona dikkat edilerek vitreus örnekleri alınarak proteomiks analizi yapıldı.

Bulgular: ERM ve sağlıklı kontrol grubunun vitreus örneklerinin yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 24 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre çalışma grubunda Alpha-1-antitrypsin, Vitamin D-binding protein, Complement C3, Complement C4-B, Complement C4-A, Retinol-binding protein 4, Beta-crystallin B2, Ig kappa chain C region, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain, Alpha-1-antichymotrypsin, Opticin düzeylerinde azalma, Alpha-1-antitrypsin , Lambda-crystallin homolog , Alpha-2-HS-glycoprotein , Pigment epithelium-derived factor , Transthyretin , Prostaglandin-H2 D-isomerase , Apolipoprotein A-I , Glutathione peroxidase 3 , Beta-crystallin A3 , Zinc-alpha-2-glycoprotein , Apolipoprotein A-IV , Ig gamma-1 chain C region düzeyinde artma görüldü.

Sonuç: Elde edilen veriler, yapılan biyoinformatik analizler ile birleştirildiğinde ERM gelişiminde rol alan inflamatuvar mediyatörler dışında bahsettiğimiz proteinlerin de etkili olabileceği görülmüştür. Bu yapısal proteinlerin seçici regülasyonunun etyopatolojide yeni fikirler verebileceği gibi buna bağlı olarak da tedavi modaliteleri geliştirme konusunda da umut ışığı olabileceği düşünülmektedir.ERM' nın günümüzdeki tedavisi ve ERM tanılı insan vitreus modellerinin proteomiks çalışmalarının literatürdeki sayıları sınırlıdır. Bu sebeple bu çalışmanın literatüre katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: epiretinal membran,proteomiks,vitreus

ABSTRACT

EVALUATION OF PROTEIN CONTENT IN VITREOUS

EXAMPLES IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC EPIRETINAL MEMBRANE

PURPOSE: The aim of this study is to investigate the likely pathogenesis of the disease and new treatment modalities related with protein content in patients with idiopathic Epiretinal Membrane.

METHODS:

In Kocaeli University Faculty of Medicine Ophthalmology of the retina department between May 2017 and August 2018 with the diagnosis of idiopathic epiretinal membrane who underwent pars plana vitrectomy 12 eyes of 12 patients, and 12 eyes of 12 patients without any systemic disease as control group were included in the study.

In both groups, vitreous samples were taken under sterile conditions and proteomics analysis was performed.

RESULTS: By comparative proteome analysis of the vitreous samples of ERM and healthy control group, the presence of regulation in 24 protein spot was determined.

In the ERM group, Alpha-1-antitrypsin, Vitamin D-binding protein, Complement C3, Complement C4-B, Complement C4-A, Retinol-binding protein 4, Beta-crystallin B2, Ig kappa chain C region, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain, Alpha-1-antichymotrypsin, Opticin levels decreased compared to the control group.

In the ERM group, Alpha-1-antitrypsin, Lambda-crystallin homolog, Alpha-2-HS-glycoprotein, Pigment epithelium-derived factor, Transthyretin, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Apolipoprotein A-I, Glutathione peroxidase 3, Beta-crystallin A3, Zinc-alpha-2-glycoprotein, Apolipoprotein A-IV, Ig gamma-1 chain C region levels increased compared to the control group.

CONCLUSION: The data obtained, combined with the bioinformatics analyzes, showed that the proteins we mentioned other than the inflammatory mediators involved in the development of ERM may also be effective. Selective regulation of these structural proteins

may give new ideas in the etiopathology, and it may be hoped that there will be hope for developing treatment modalities. The current treatment of ERM and the proteomics studies of human vitreous models diagnosed with ERM are limited in the literature.

The current treatment of ERM and the proteomics studies of human vitreous models diagnosed with ERM are limited in the literature. Therefore, we believe that this study will contribute to the literature.

KEYWORDS: epiretinal membrane, proteomix, vitreous

1.GİRİŞ

1.1 Giriş ve Amaç

Son dönemde vitreoretinal cerrahi alanında hızla ilerleyen teknolojik gelişmeler ve vitreustan örnek alınımının mümkün hale gelmesi retinal yüzey hastalıklarının tanı ve tedavisinde yol gösterecek olan gelişmeler kaydettirmiştir. Bu gelişmeler beraberinde o güne kadar mümkün olamayan histopatolojik çalışmalara imkân tanımış olup özellikle vitreoretinal yüzey hastalıklarının patofizyolojisi, tedaviye cevabı ve karakteristik özelliklerini anlamaya yardımcı olmuştur.

Retinal yüzey hastalıklarının aydınlatılması, retina ve vitreus hakkında fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilgili, birbirleriyle doğrudan ilintili değerli bilgilerin ortaya çıkması anlamına da gelmektedir. Epiretinal membran oluşumu mekanizma olarak vitreomaküler traksiyon sendromu ve makular delik oluşumuna benzerlikler göstermekte, sıklıkla diabette ve retina dekolmanında görülen proliferatif membranlarla histopatolojik olarak ortak süreçlere sahiptirler. Bu nedenle epiretinal membran patofizyolojisini anlamak, geniş bir çerçevedeki retinal hastalıkların oluşum ve ortaya çıkış mekanizmasını anlamada ve olabilecek yeni tedavi ya da profilaksi yöntemleri geliştirmede yardımcı olmaktadır.

Epiretinal membranlar; makula bölgesine yerleşik, damardan yoksun, fibrosellüler yapıya sahip anormal çoğalmalar olarak tanımlanmaktadır. Maküler pucker, makular buruşukluk, selofan makulopati, epimaküler membran, preretinal maküler fibrozis gibi farklı isimlendirmeleri mevcut olup aynı zamanda bu isimlendirmeler hastalığı evrelendirmede de kullanılmaktadır (1,2,3) Epiretinal membranlar altta yatan nedene göre primer ve sekonder olarak adlandırılmaktadırlar. Epiretinal membranın oluşumunda herhangi bir etyolojik faktör mevcut değilse primer veya idiyopatik epiretinal membran şeklinde tanımlanmaktadır. Genellikle 50 yaş üzeri hastalarda saptanmakta olup prevalansı 60 yaş altındaki bireylerde %2, 70 yaş üzeri bireylerde ise %12 oranında bildirilmektedir. Epiretinal membran yavaş seyirli bir hastalık olup bazen yıllarca aynı evrede kalabilmektedir. Hastalarda görme azalması, makropsi, mikropsi veya metamorfopsi şikayetlerine yol açabilir (4). Yapılan fundus muayenesi ile bu membranlar saptanabilmektedir. Ayrıca fundus floresein anjiyografi, optik koherans tomografi, kırmızıdan yoksun fundus fotoğrafları bu membranları tespit etmede ve retina yüzeyindeki

yapısal bozulmaları ortaya koymada yardımcıdır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki epiretinal membran oluşumu inflamatuvar basamakları içermektedir.(5)

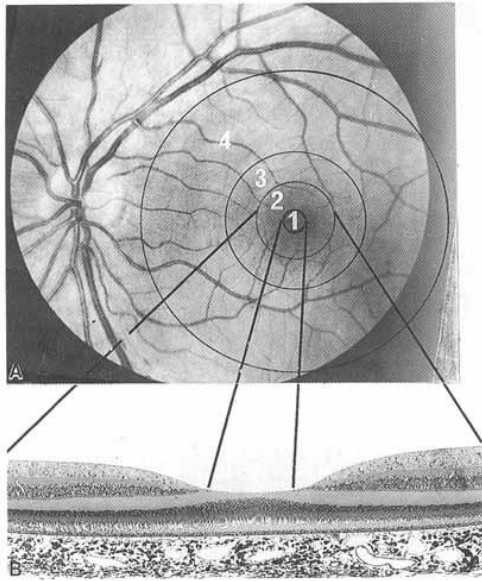
Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır.(6). Çalışmamızda, İdiyopatik epiretinal membran (iERM) tanısı alan hastalardan ve sağlıklı kontrol gruplarının vitreus örneklerinde protein analizi yardımıyla epiretinal membran patofizyolojisini aydınlatmayı ve bulduğumuz bulgularla yeni tedavilere ışık tutabilmeyi amaçlıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 RETİNA ANATOMİSİ [4-11]

Nöral tüpten köken alan retina, merkezi sinir sisteminin bir parçasıdır. Görsel bilginin ilk olarak elde edildiği yerdir. İnsan vücudundaki tüm duysal verinin %80'inin retinal kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Yaklaşık 2500mm² alana sahip olan retinanın arka kutbunda bulunan makula, retinanın görme fonksiyonu için en önemli bölgesidir. Makula, temporal arkatlar arasında 5-6mm çaplı alanda yer alır. Makulanın merkezi 1,5mm'sinde (1 optik disk çapında) fovea bulunur. En yüksek görme keskinliğinin olduğu bölge foveadır (**Resim1**).

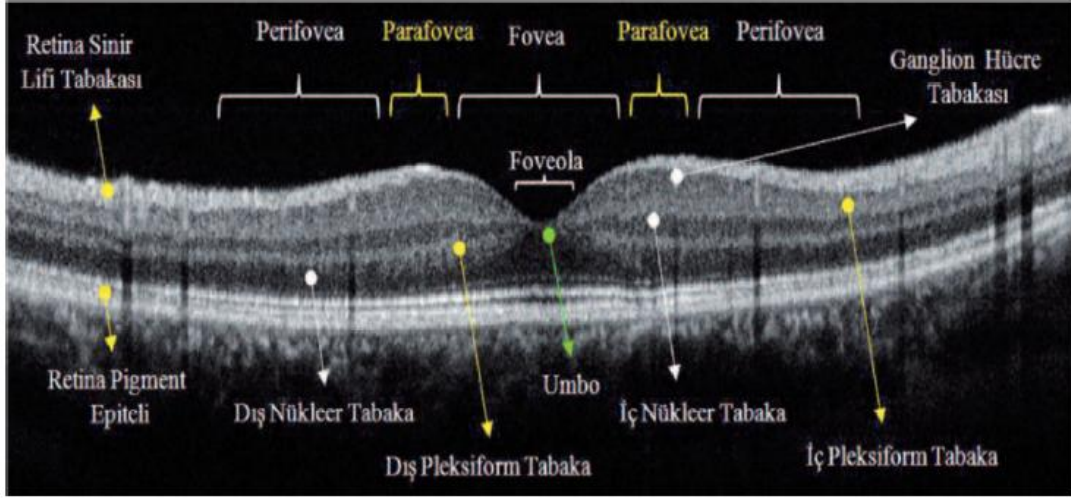


Resim 1: Üstte en içte (1) foveola (0.33 mm), (2) 1.5 mm çapında fovea , (3) 0.5 mm eninde annüler zon olan parafovea, (4) 1.5 mm eninde annüler zon yapısı ile klinik makulanın en periferinde perifovea bulunmaktadır. Altta ise foveolar alanda gangliyon, sinir lifi, iç nükleer ve iç peksiform tabakaların olmadığı seçilmektedir.

Fovea optik diskten yaklaşık 4mm (2,5 disk çapı) mesafede ve 0,8mm daha aşağıda yer alır. Foveanın clivus adlı sınırı genç erişkinlerde ve çocuklarda görülen halkasal ışık reflesinin oluşumunu sağlar.

Foveanın ortasındaki retinal damar içermeyen bölgeye foveal avasküler zon denir.

Foveanın merkezindeki 0,35mm çaplı bölge foveola'dır. Çogu hastada foveola, yaklaşık 500µm çapında olan, foveal avasküler zon içerisinde yer alır. Foveoladaki küçük çukurluğa umbo denir (**Resim2**).



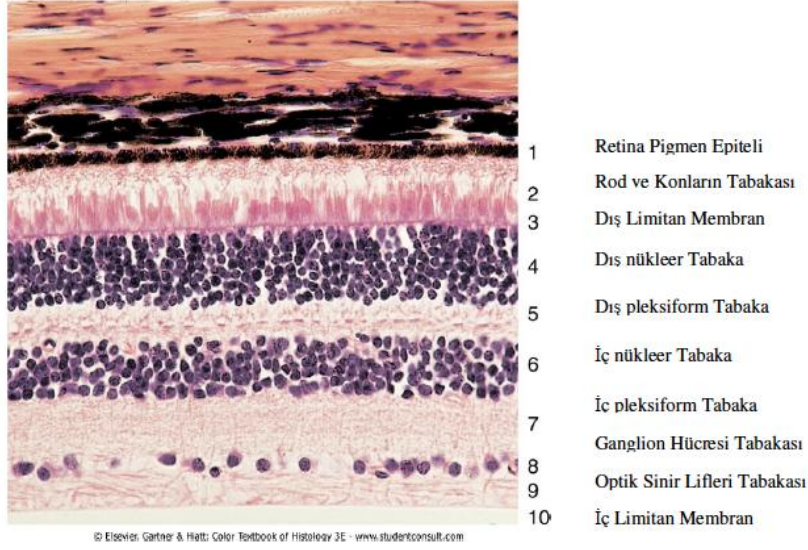
Resim2: Optik koharens tomografi görüntüsünde, retinanın histolojik tabakalanması ve fovea ile olan ilişkisi.

Foveayı çevreleyen 0,5mm çaplı parafoveal bölgede ganglion hücre katı, iç nükleer kat ve dış pleksiform kat en kalındır.

Retina önde ora serratadan başlayarak arkada optik diske doğru uzanır. Papillomaküler demet bölgesi en kalın, fovea ve ora serrata en ince olduğu yerlerdir. İn vivo kosullarda retina şeffaf renkli bir yapıdır. Arka kutup bölgesi yoğun miktarda, sarı renkli karotenoid pigmenti olan, ksantofil içermesi nedeniyle makula lutea olarak anılmaktadır. Koroid damarları içerisindeki kanın, fundusa turuncu-kırmızı rengini verdiği inandırılır. Fundus muayenesinde RPE içerisindeki artmış pigment nedeniyle fovea diğer yapılardan daha koyu renkli görünür.

2.1.1 Retinanın Katmanları:

Retina, vitreden skleraya doğru su katlardan oluşmaktadır (**Resim3**).



Resim3: Retinanın tabakaları

a. İnternal limitan membran:

(ILM) retina ve vitre arasındaki yapısal bağlantıyı temsil eder. Periyodik asit schiff (PAS) pozitif bir membrandır. Düz bir iç (vitreal) membranı ve Müller hücrelerinin plazma membranı ile yakın pozisyonda yerleşen düzensiz retinal yüzeyi vardır. ILM ve müller hücrelerinin yakın ilişkisi ILM'nin bu hücrelerden oluştuğuna işaret eder. ILM' nin kalınlığı ora serrata yakınlarında vitreus bazında 50 nm, ekvator da 300 nm, arka kutupta 900 nm ve foveada yaklaşık 15 nm kadardır [12].

Dikkat çekici olan nokta ILM'nin inceldiği vitre bazı ya da fovea gibi bölgelerde ILM ile vitreal korteks arası sıkı bağlantılar bulunmasıdır. Foos ve ark. elektronmikroskopik incelemelerde ayrıca vitre bazı, ekvator ve foveada ILM ile Müller hücrelerinin sitoplazmaları arasında sıkı bağlantı plakları göstermişlerdir [13].

Klinik olarak vitreomaküler yüzey hastalıklarında bu sıkı bağlantılar sayesinde arka hyaloidin ILM'ye uyguladığı tanjansiyel ya da ön-arka kuvvetlerin retinal değişikliklere yol açtığı düşünülebilir [1,14].

b. Sinir Lifi Katı:

Ganglion hücrelerinin aksonlarından oluşur. Optik disk kenarında en kalın (20-30µm) olan sinir lifi tabakası perifere doğru incelerek devam eder. Gangliyon hücrelerinin aksonları 0,6-2µm kalınlıkta olup, intraretinal seyirleri boyunca myelinsizdirler. Ancak optik disk lamina cribrosasından geçtikten sonra myelin kılıfla sarılırlar. Bu nedenle optik sinir lamina cribrosa'dan sonra çap olarak genişler. Retina geneline bakıldığında optik sinir başına uzanan aksonlar en kısa mesafeyi katedecek şekilde dizilmişken foveanın temporalinden gelen aksonal demetler foveanın etrafını dolaşacak şekilde arkuat fibrilleri oluşturarak optik diske ulaşırlar. Makuladan çıkıp optik diske uzanan liflerin toplamına ise "papillomaküler band" adı verilir.

c. Ganglion Hücre Katı:

Ganglion hücre ve yer değiştirmiş amakrin hücrelerden oluşur.

d. İç pleksiform kat:

Bipolar hücreler amakrin hücreler ve ganglion hücrelerle sinaptik iletişim kurar.

e. İç Nükleer Kat:

Horizontal hücre, bipolar hücre ve amakrin hücrelerin gövdeleri ve Müller hücreleri bulunur.

f. Dış Pleksiform Kat:

Fotoreseptörler, horizontal hücre ve bipolar hücrelerle sinaptik iletişim kurar. Rod ve konların terminal uçları yapı itibariyle birbirlerinden farklı olup, rod sonlanmaları oval yapıları nedeniyle 'sferül', kon sonlanmaları ise geniş ve ayaklı uzanımlar şeklinde olduklarından 'pedikül' olarak adlandırılır.

g. Dış Nükleer Kat:

Fotoreseptörlerin hücre gövdeleri bulunur.

h. Dış Limitan Membran:

Müller hücreler ile fotoreseptörlerin zonüler birleşim yeridir.

ı. Fotoreseptörkatı:

Rod ve konların iç ve dış segmentlerini içerir.

i. Retina Pigment Epiteli (RPE):

İnsan gözünde yaklaşık 4-6 milyon RPE hücresi bulunmaktadır. RPE hücre katı optik sinirde başlar, ora serrataya uzanır, önde silier cismin pigment epiteli olarak devam eder. Hücre yoğunluğu fovea santralinden periferde gidildikçe azalır.

RPE hücrelerinin apikal yüzeyindeki mikrovilluslar fotoreseptör dış segmentleriyle temastadır (bir RPE hücresi yaklaşık 30-45 fotoreseptöre karşılık gelir). RPE tabanı alttaki Bruch membranına sıkıca yapışmıştır. RPE melanin granülleri içerir, bunlar makulada en az periferde en yüksek yoğunluktadır. RPE ile retina arasında subretinal aralık bulunurken optik disk ve ora serrata da sıkı yapışıklık söz konusudur.

• Bruch Membranı:

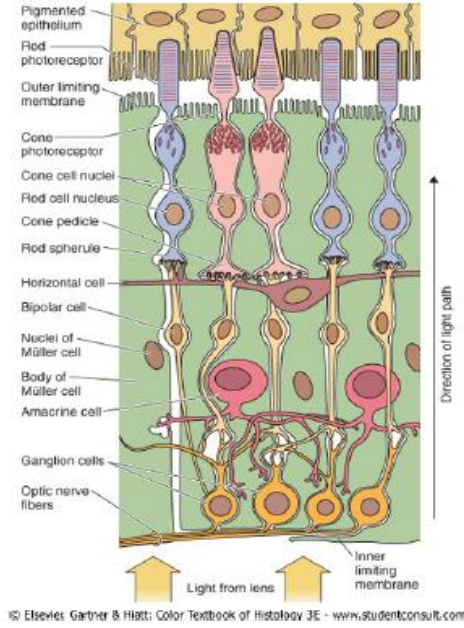
RPE'nin bazal membranı, iç gevşek kollajenöz kat, orta elastik lif katı, dış gevşek kollajenöz kat ile koryokapillaris endotelinin bazal membranından oluşmaktadır (**Resim4**).



Resim4: Bruch membranı (kırmızı ok) içten dışa; RPE basal laminası, iç kollajen tabaka, elastin lifler, dış kollajen tabaka, koryokapillaris basal laminası.

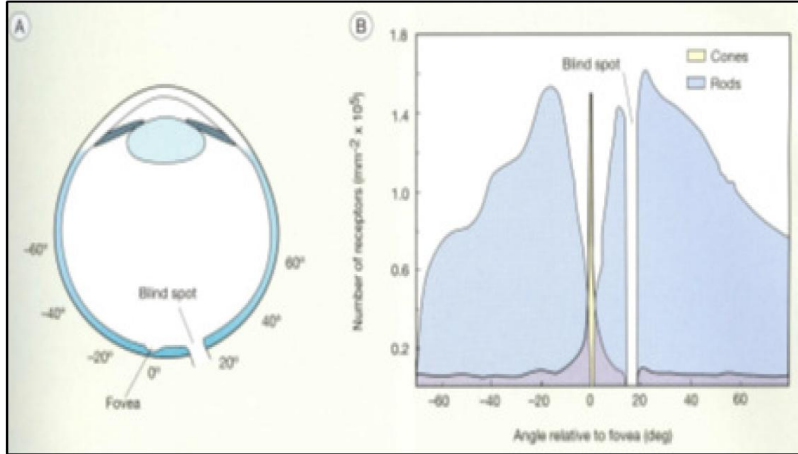
- **Koroid:** Vaskularize ve pigmente bir dokudur, anteriorda ora serratadan posteriorda optik sinire kadar uzanır. Koroid, optik sinire ve RPE katına sıkıca yapışmıştır, ora serratada silier cisme dönüşür.

- 2.1.2 Retinayı Oluşturan Hücreler ve Fonksiyonları [4,15-19]



Resim5: Retinanın hücresel tabakaları

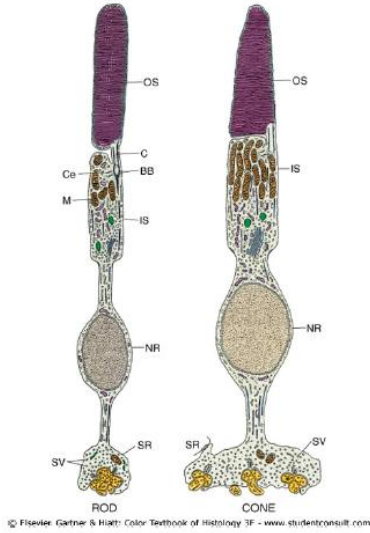
- a. **Rodlar:** Fotreseptördür; dış segment, iç segment, nukleus ve sinaps parçalarından oluşur. Rodlar, karanlık ve alacakaranlık koşullarına özelleşmiştir. Rod yönetimli görmede renk görme yoktur. Rod/kon oranı 20/1'dir. Foveanın 350µm çaplı bölümünde bulunmazlar. Foveanın 20 derece çevresindeki annüler bölgede en yüksek yoğunluğa ulaşırlar.



Resim6: Retinanın topografik haritasında kon ve rodların dağılımı. Rod yoğunluğu optik diskin de dışından geçen geniş bir dairesel alanda bulunurken L ve M konlar foveal pitte yoğunlaşmaktadır.

20-100 rod bir bipolar hücreyle, bipolar hücre de tek ganglion hücre ile temas eder.

Rodun sinaptik bölümü olan sferülü yaklaşık 2µm çapındadır. Sferül, glutamat içeren sinaptik veziküllere sahiptir. Rod iç segmenti 2 parçaya ayrılır; dıştaki ellipsoid kısım fazla miktarda mitokondri, içteki kısım ise bol miktarda kollajen içerir (**Resim7**).



Resim7: Rod ve Con Morfolojik Görüntüsü. BB, Basal Cisim; C, Connecting Stalk; Ce, Sentriol; IS, İç Segment; M, Mitokondri; NR, Nükleus Bölgesi ; OS, Dış Segment; SR, Siaptik Bölge; SV, Sinaptik Vezikül.

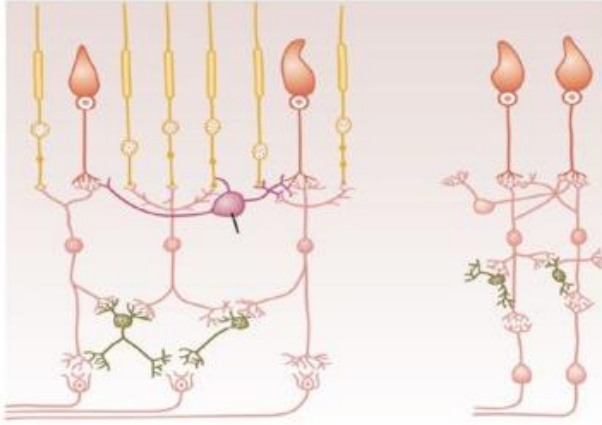
Dış segmentler 2 hafta içinde tamamen yenilenir. Rod dış segmentlerinde yüzlerce disk bulunur, içerdikleri proteinin %90'ını rodopsin oluşturur. Opsinden başka fotoreseptöre özgü spesifik adenosin trifosfat bağlayıcı kaset transporter (ABCR), membran bariyerinden farklı substratların geçişinde görev alır.

Periferin/rds ve Rom1, adezyon molekülleri olup dış segmentteki diskleri birbirlerine ve plasma membranına bağlarlar. Rod dış segmentinde yüksek düzeyde bulunan dokozahekzaenoik asit fotonların abzorbe edilmesini ve görsel uyarılma için uygun mikroçevre oluşturulmasını sağlar.

b. Konlar:

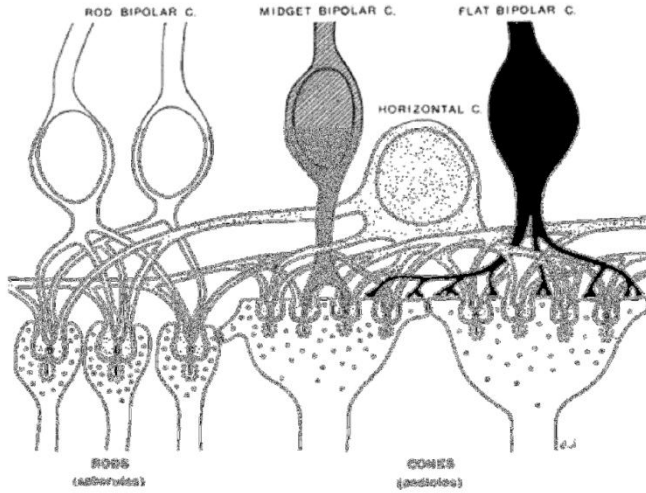
Konlar roddan daha büyüktür, dış segmente doğru daralır. Aydınlıkta yüksek görme keskinliği ve renkli görme sağlar. Foveada kon yoğunluğunun en fazla olması hassasiyeti artırır. Damarsal yapı, rod ve mavi kon foveada bulunmaz.

Arka kutupta herbir kon tek bir bipolar hücre ile bağlanırken bu bipolar hücre de tek bir ganglion hücresi ile sinaps yapar. Bu sayede görmenin ilk 3 nöronu birbirleri ile birebir ilişki kurmuş olur (**Resim8**).



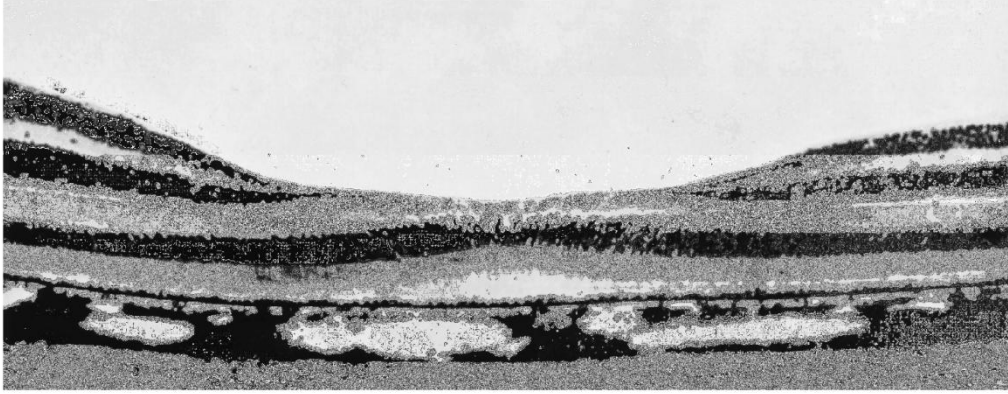
Resim8: Retinanın nöronal organizasyonu; solda perifer retina sağda foveal alan gösterilmektedir.

İnsan retinasında yaklaşık 5 milyon kon bulunmaktadır. 561nm, 530nm ve 430nm dalga boyundaki ışığa hassas konlar sırasıyla kırmızı, yeşil ve mavi kon sınıflarını oluşturur. Konların sinaptik bölümündeki pediküller, diğer rodlarla, konlarla, horizontal ve bipolar hücre süreçleri ile sinaps yapar (**Resim9**).



Resim9: Rod ve Konların sinaptik bölgeleri rodların bipolar ve horizontal hücrelerle tek triadı (bağlantı) varken konların birden fazla sinaptik triadı mevcuttur.

Primat retinasında fovea yakınında kon aksonları radyal olarak saçılır, merkez çevresinde pediküller annüler bir dizilim gösterir (**Resim10**).

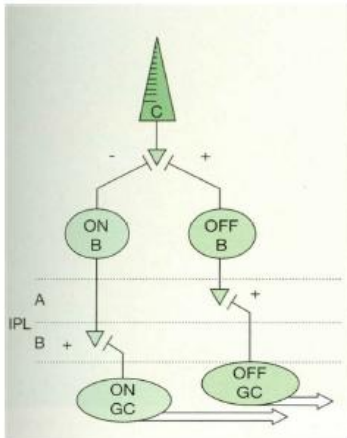


Resim10: Foveanın histolojik görünümü.

Foveada ışık algılamasının artırılması için konular bu bölgede özellikle incelik ve uzar [20]. Fovea çöküntüsü, konuların merkeze göçü esnasında iç nükleer tabakanın ve ganglion hücre tabakasının dışa hareketi sonucunda gelişir [21-23].

c. Bipolar hücreler:

Bipolar hücreler vertikal olarak yerleşirler, dendritleri rod ve konularla, iç pleksiform tabakada da ganglion hücre ve amakrin hücreler ile sinaps yaparlar. Fotoresptörlerden uyarı alırlar, iç retina görsel sinyal iletirler. Glutamat salınması için özelleşmişler. Terminallerinde sinaptik kurdeleler bulundurlar. Rod bipolar hücreler ışık uyarısına ON cevabı verirler, genelde ganglion hücrelerle direkt temas kurmazlar, iletimlerinin %90'dan fazlasını amakrin hücrelere yaparlar. Retina, ON ve OFF kon bipolar hücreler yoluyla ON, OFF kanallara ayrılmıştır (**Resim11**).



Resim11: ON-OFF Yolları.

İç pleksiform tabakada, OFF bipolar hücre, OFF ganglion hücresi ile ON bipolar hücre ON ganglion hücresi ile farklı seviyeler de sinaps yapar. Işık yoğunluğundaki değişikliğe bağlı olarak ON ve OFF bipolar hücreler birbirine zıt sinyaller oluştururlar. Glutamat ON ve OFF bipolar hücrelerde birbirine zıt cevaplar oluşturur. ON midget bipolar hücreler, ON midget ganglion hücrelerle, OFF midget bipolar hücrelerde OFF midget ganglion hücrelerle temas kurar.

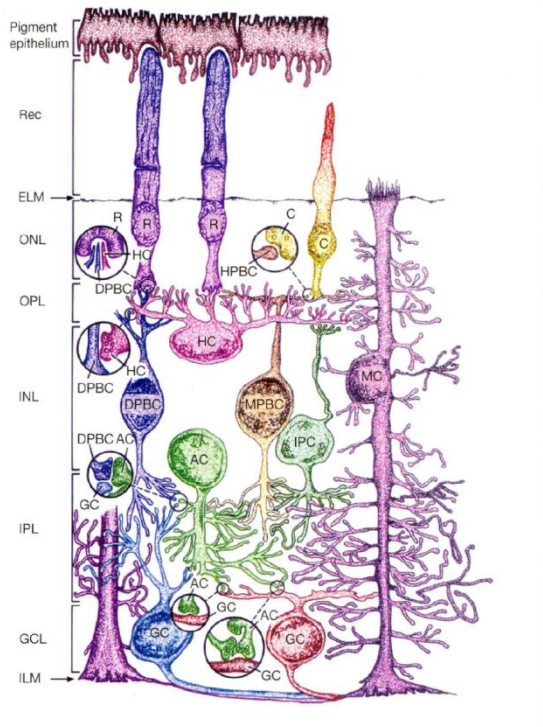
d. Horizontal Hücreler:

Konlara negatif geri bildirim sağlarlar. Horizontal hücreler birçok rod sferülü ve kon pedikülü ile sinaps yapar.

e. Amakrin Hücreler:

Bipolar hücelere geri bildirim verirler. S1, S2, AII amakrin hücresi, dopaminerjik amakrin hücresi ve star burst kolinerjik amakrin hücresi gibi çok farklı çeşitleri vardır. Primer olarak iç nükleer katın iç sırasında yerleşmişlerdir, çoğunlukla inhibitör internöronlardır.

Nörotransmitör olarak amakrin hücreler gamaaminobütirikasid (GABA), glisin, asetil kolin, dopamin ve glutamat kullanırlar. Tüm bipolar hücre terminalleri GABA yönetimli negatif geribildirim alırlar. Ganglion hücrelerin neredeyse yarısı 1-23 amakrin hücre ile eşleşmiştir (**Resim12**).



Resim12: Retinanın çeşitli hücre gruplarının bulunduğu tabakaları şematize eden bir çizim. C, Kon; R, Rod; BC, Bipolar Hücreler; HC, Horizontal Hücre; AC, Amakrin Hücre; GC, Ganglion Hücresi; MC, Müller Hücresi (Müller hücreleri retinanın eksternal limitan membranından internal limitan membranına dek uzanmaktadır).

f. İnterpleksiform Hücreler:

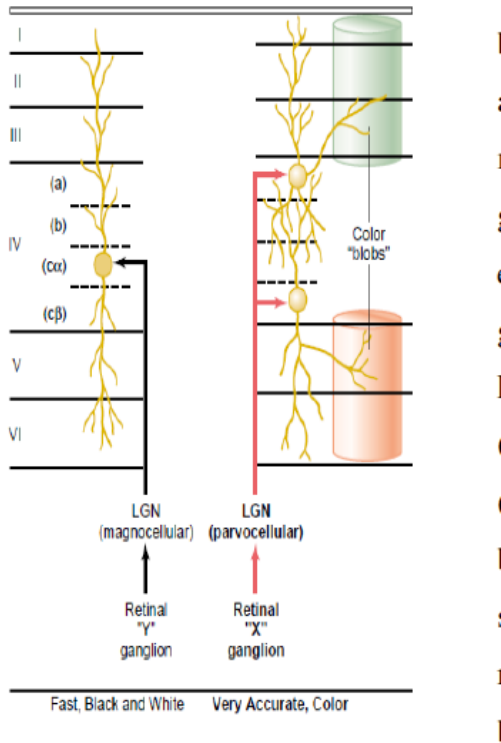
Amakrin hücrelerin özelliklerini paylaşırlar ancak dış retina yönlenirler.

g. Müller Hücreler:

İç limitan ile dış limitan membran arasında vertikal olarak uzanır. Retina katları arasında en sık görülen glial hücrelerdir. Çekirdekleri iç nükleer tabakada yer alır, retina yapısal destek ve besin sağlarlar. Retinanın gelişimi ve metabolizması için önem taşırlar, glutamat ve GABA'nın yıkımında görev alırlar.

h. Ganglion Hücreleri:

Aksonları iç yüzey boyunca paralel olarak optik diske doğru uzanarak sinirli tabakasını oluştururlar. Kurdele sinapslarda bipolar hücrelerden ve daha fazla sayıda amakrin hücreden input alırlar. Ganglion hücreler birçok diğer retinal nöronlardan farklı olarak, konvansiyonel aksiyon potansiyelleri oluştururlar. Glutamat yoluyla yüksek görme merkezleri ile iletişim kurarlar.



Resim13: Primer görme korteksinin 6 tabakası.

Retinadaki herbir nokta için 50 ganglion hücre bulunur, sayıları yaklaşık 1.5 milyon olup, optik sinirdeki akson sayısı kadardır. Ganglion hücreleri fizyolojik ve morfolojik olarak yaklaşık 15-20 çeşide sahiptir. Her bir ganglion hücre tipi farklı bir görsel kanalı temsil etmektedir. Morfolojilerine göre ikiye ayrılır, bu lateral genikülat nukleus (LGN) ile yaptıkları bağlantılarla korelasyon gösterir. P ganglion hücreleri (parvoselüler) (%80) LGN'nin parvo kısmına, M ganglion hücreleri (magnoselüler) (%5-10) LGN'nin magnoselüler kısmına bağlanırlar (Resim13). W-benzeri hücreler, muhtemelen superior kollikulusta sonlanırlar. P hücrelerinin küçük reseptif alan büyüklüğü ve renk kodlama özelliği bulunur.

Midget ganglion hücreler merkezi retinada sayıca baskındır. ON ve OFF olarak 2 tip bulunur. Merkezde 1 kon > 1 midget bipolar hücre > 1 midget ganglion hücre bağlantısı bulunur. Merkezi 10 derece dışında (2mm dışında) midget hücreler birçok midget bipolar hücreden input alır. Midget ganglion hücreler lateral genikülat parvoselüler katlarına projekte olurlar, renk sinyallerini de taşırlar. Retinal ganglion hücreler ON (reseptif alanda ışık ile eksite olan merkezi hücreler) ve OFF (reseptif alanda ışık ile, inhibe olan merkezi hücreler) olarak 2 temel gruba ayrılır.

2.1.3 Retinanın Kanlanması [24]:

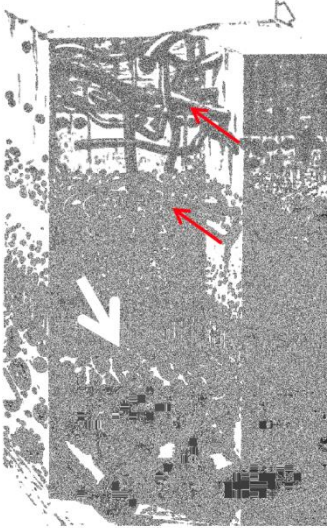
Retina birim ağırlık başına oksijen tüketiminin yüksek olduğu bir dokudur. Optik diskin yakınındaki büyük dallar dışında gerçek arter ve ven içermemektedir. Retina arterleri anatomik olarak uç-arter olup arteriovenöz anastomoz göstermemektedirler.¹⁰

Arterler: Santral retinal arter (SRA); internal karotid arterden ayrılan oftalmik arterin dalıdır. Retinal kan dolaşımı retinal ve üveal (koroidal) olmak üzere iki ayrı kaynaktan gelir. Dış pleksiform ve dış nükleer tabakalar, fotoreseptörler ve pigment epitelinden oluşan retinanın 1/3 dış kısmı koroid dolaşımından, 2/3 iç kısmı ise santral retinal arterden beslenir.

- Oftalmik arterin, SRA'dan sonraki dalları olan kısa ve uzun arka siliyer arterler globa optik sinir etrafından girerler. Posterior koryokapillaris kısa arka siliyer arterlerden, anterior koryokapillaris ise uzun arka siliyer arterlerden ve ön siliyer arterlerden beslenmektedir.

Venler: Ora serratada venler, arterlerin sonlandığı yerin daha periferinden başlarlar. Ekvatordan itibaren ise arterlerle birlikte seyrederek ve papillada toplanarak santral retinal veni oluştururlar. Santral retinal ven ya superior oftalmik ven yolu ile veya direkt olarak kavernoöz sinüse drene olur.

Kapillerler: Retina arteriyolları ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Retina kapillerleri çoklu arteriyoller bağlantıları içermektedir. Böylelikle bir besleyici damarın kapanması ile kapiller yatakta dolaşım durmaz. Koryokapillerlerin duvarlarında geniş pencerelenmeler bulunmasına ve geçirgen olmalarına karşılık, retina kapillerlerinin duvarları geçirgen değildir. Retina kapillerleri yüzeysel ve derin olmak üzere iki ağ şeklinde mevcuttur. Retinada kapillerlerin olmadığı üç bölge mevcuttur: Ora serratadan 1,5 mm gerisine kadar olan bölge, fovea santralinde ortalama 0,5 mm'lik bölge (foveal avasküler zon) ve büyük arterlere ya da daha az oranda venlere komşu bölgeler.



Resim14: Şematik çizimde santral retinal arter dallarının ILM altında seyri ve sinir lifi tabakası ile iç nükleer tabakada bulunan yüzeysel ve derin kapiller ağları gösterilmektedir (kırmızı oklar). Altta ise RPE altında fenestralı koryokapillerleri seçiliyor (beyaz ok).

2.2 RETİNANIN FİZYOLOJİSİ [5]

Retinanın özellikle de arka kutbun görevi, ışık fotonlarını yakalamak ve fototransdüksiyon ile fotonları elektrik sinyaline döndürmektir. Bu süreç fotoreseptörlerin dış segmentinde gerçekleşir. Fototransdüksiyonun temelini oluşturan fotopigmentler, fotoreseptörlerin dış segmentlerindeki zarlarda bulunur. Rodlarda esas fotopigment rodopsin olup 500nm'lik (mavi-yeşil) ışığı absorbe etme özelliğine sahiptir. Kon fotopigmentleri spektrumun mavi, yeşil ve sarı dalga boyuna denk gelen absorpsiyon yeteneğine sahip farklı tiplerden oluşur. Kon fotopigmentleri topluca iodopsin olarak anılır.

Her bir kon, bu üç tipten sadece birini ihtiva eder. Bu üç tipin farklı uyarı bileşimleri renk görmeyi ortaya çıkarır.

Tüm fotoreseptör hücreleri ışık absorpsiyonuna hiperpolarizasyon ile cevap verir. Bipolar ve horizontal hücreler, veri işlenmesinde ikinci sıra nöronlarıdır. Bu hücreler fotoreseptörler ile ilişkisini nörotransmitterler aracılığıyla kurarlar. Karanlığa uyum sağlandığında, fotoreseptörler depolarize olarak nörotransmitter salgırlar. Işık ortamında ise fotoreseptörler hiperpolarize olur ve nörotransmitter salınımı azalır. Merkezi sinir sisteminin diğer bölümlerinde olduğu gibi retinanın nöronal hücrelerinde esas uyarıcı nörotransmitter glutamattır. Bipolar hücrelerden artan glutamat salınımı ile iletilen görsel veri, horizontal hücreler ve amakrin hücreler vasıtasıyla işlenir. Horizontal ve amakrin hücreler uyarının retinada gereksiz yayılımını engeller ve kontrast için gerekli olan sınır ayırımının yapılması sağlar.

Retina içerisindeki 3. ve son nöron olan ganglion hücrelerine iletilen görsel veri, ganglion hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşumuna yol açar. Arka kutupta her bir kon tek bir bipolar hücre ile bağlanırken, bu bipolar hücre yine tek bir ganglion hücresi ile sinaps yapar. Bu sayede görmenin ilk 3 nöronu birbirleri ile birebir ilişki kurmuş olur.

Halbuki makula dışındaki alanda 20-100 adet kon 3-15 arasındaki bipolar hücreye projekte olur ve bu hücrelerden elde edilen görsel veri 1 adet ganglion hücresi ile bağlantı kurar. Bu yapılanma makuladan elde edilen görsel verinin daha kaliteli olmasına yol açmaktadır. Yine optik sinire katılan retina sinir liflerinin en az 1/3'ü makuler bölgeden köken alır ve direkt temporalden optik sinire girer. Bu noktadan sonra oluşan görsel veri, optik sinirden başlayan süreç ile görsel kortekse ulaştırılır.

2.2.1 RPE Hücrelerini Görevleri:

Görme fonksiyonunun devamı için kritik role sahiptir. RPE fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir [25];

a. Nöral Retinanın Fizyolojik Adezyonu:

Adezyonu sağlayan pasif kuvvetler; vitreus varlığı, transretinal sıvı akımları, interfotoreseptör matriksin varlığı ve koroidin ozmotik basıncıdır. Aktif kuvvetler ise ,RPE' nin suyu ve elektrolitleri subretinal aralıktan apikal bölgede bulunan Na^+/K^+ -ATPaz pompası yoluyla aktif olarak pompalaması ve sekonder olarak bikarbonat transport sistemidir.

b. Fotoresptörlerden Dökülmüş Dış Segmentlerin Fagositozu:

Dış segmentin RPE'nin plazma membranına bağlanması ile plazma membranı dış segment fragmanı çevresine invajine olur, fagosom içine alır. Fagozomlar hücre tabanına taşınır, lizozomlarla birleşir ve degrade edilir. Oluşan moleküller RPE hücresinden dışarı diffüze olur veya hücre tarafından tekrar kullanılır.

c. Kan-Retina Bariyeri, Transport ve İyonik Pompa:

Dış kan-retina bariyeri RPE tarafından oluşturulmaktadır. RPE, koryo kapillaris ile dış retina arasındaki sıvı ve molekül alışverişini kontrol etmektedir. RPE'nin bariyer fonksiyonu; RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ve RPE membranındaki proteinlerin polarize dağılımı ile gerçekleştirilir. Na^+/K^+ -ATPaz plazma membranından Na^+ ve K^+ iyonlarının geçişini kontrol eder. Hepatosit büyüme faktörü RPE hücrelerinde bulunan bariyer fonksiyonunu düzenleyen önemli bir faktördür.

d. Görsel Pigment Rejenerasyonu-Retinol Metabolizması:

Na^+/K^+ -ATP az ve sitoskelatal proteinler RPE 'de apikal hücre membranında yerleşirler. Retinolün metabolizması için önemli üç sitozolik retinoid-bağlayan protein RPE 'de yer alır. RPE, A vitamininin görme siklusu için alınması, depolanması ve mobilizasyonunda önemli role sahiptir. Karaciğerden sonra en yüksek A vitamini konsantrasyonuna sahiptir. RPE, 11- cis-retinali oluşturur, fotoresptör opsini sentezler ve 11-cis-retinaldehidi rodopsinin rejenerasyonunda kullanır.

e. Melanin Pigmenti:

Melanin yapan melanosomlar RPE'de bulunur. Melanin granülleri RPE hücresinde rod dış segmentlerine yakın temasta apikal bölgede yerleşir. Melanin granülleri ışık saçılmasını azaltarak, sklera yoluyla ışık absorpsiyonunu en aza indirir.

f. İmmün Fonksiyonu:

RPE pasif bariyer görevi görür, ayrıca TGF-beta gibi immün süpresif sitokinlerin aktif sekresyonunu yapar. Enflamatuar cevap varlığında RPE, enflamatuar medyatörlerin etkilerini inhibe edebilir.

g. Büyüme Faktörleri Ve Sitokinler:

Fizyolojik ve patolojik durumlarda salgılanır.

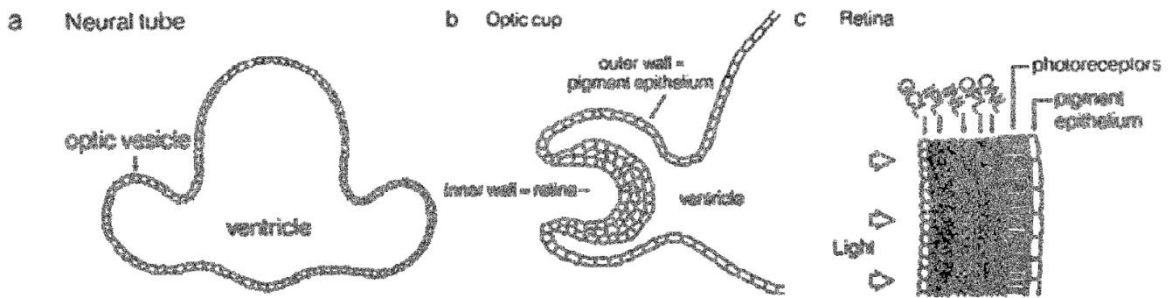
- h. Hasar veya mikro çevredeki belli bazı değişikliklerde RPE hücreleri, göç eder.
- i. Dış segmentleri çevreleyen mukopolisakkarit matriksin (interfotoresptör matriksi) üretimini yapar.
- j. Isı alış-verişi yapar.

Işık subretinal aralıkta K^+ iyon konsantrasyonunu azaltır.RPE hücresi hiperpolarize olur. K^+ iyon konsantrasyonunun Na^+-K^+ATPaz aktivitesinin etkilemesi sebebiyle ışık subretinal aralıktaki iyon kompozisyonunu ve RPE 'nin transport fonksiyonunu etkileyebilir.

2.3 RETİNAL EMBRİYOGENEZİS

İnsan gözünün gelişimi, fetal hayatın 22. gününde nöroektodermal diensefalonun her iki tarafından tomurcuklanan optik primordiumların gelişimiyle başlar. Ardından 3mm'lik gelişim fazında nöral tüpün ventrolateralinde optik veziküller (**Resim15 a**) şekillenir. Fetal hayatın 4. Haftasında optik veziküller invajinasyon yoluyla optik çukurluklara (**Resim15 b**) dönüşürler [26].

Takip eden 5. haftada ise optik çukurlukların inferomedialinde 'embriyonik fissür' denilen bir açıklık meydana gelir ve bu açıklıktan mesenkimal kökenli dokular ve vasküler yapılar optik veziküle giriş yapar (**Resim15 c**).



Resim15: Şematik çizimde, optik vezikülden optik çukurluğa ve çok katlı retinal yapıya geçiş gösterilmektedir.

Optik vezikülün dış katındaki tek katlı hücre sırası RPE'ye, iç katındaki hücreler ise nörosensöriyel retinaya dönüşmektedir. Bu fissür 7. haftada kapanır ve bu kapanmadaki olası anomaliler kolobom oluşumuna neden olur.

Optik çukurlukların iç yüzeyini kaplayan hücreler çok katlı olacak şekilde çoğalarak 6. hafta itibariyle iç ve dış nöroblastik katmanlardan oluşan nöroepiteli oluştururlar. Yine bu dönemde primitif retina diyebileceğimiz bu katmanların en iç yüzeyinde primitif Müller hücreleri oluşmaya başlar ve ILM'yi meydana getirirler. 8.haftadan sonra nöroblastik katmanlar içten dışa doğru olmak üzere differansiye olarak retinal tabakaları oluştururlar.

Optik çukurluğun dış yüzeyindeki tek sıralı hücre tabakası ise özelleşerek retina pigment epiteline dönüşür. Optik çukurluğun iç ve dış tabakaları arasında yer alan boşluk ise subretinal alan olacaktır. Kural olarak retinal differansiyasyon optik diskten periferde olmakla beraber, makula bu konuda istisnai bir şekilde postnatal 4. aya kadar özelleşmeye devam eder.

Gelişimin 4. ayında retinal damar yapısı belirmeye başlar. Retinal hücreler prenatal 8. aya kadar periferdeki özelleşmemiş multipotent öncü hücreler vasıtası ile çoğalmaya ve retinal yüzeyi genişletmeye devam eder, 8. aydan sonra retina daha fazla genişlemese de erişkinlerde ora serrata'da multipotent, öncü hücreler bulunmaktadır.

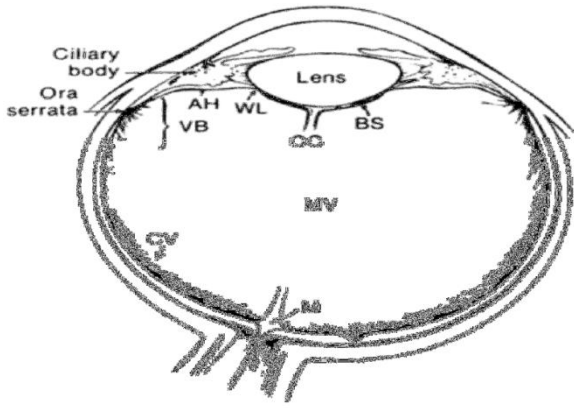
2.4 VİTREUS:

Göz küresinin ortasında ortalama 4ml hacimde ve jelöz kıvamdadır. Vitre önde lens ve silier cisimle, arkada ise retina ile komşudur. Göz küresinin şeklini korumaya ve optik sistemin ışık geçirgenliğini sağlamaya uygun bir yapıdadır. Anatomik ve histolojik olarak medulla (iç) ve korteks (dış) olarak iki bölüme ayrılır. Korteks tabakası (%2'si) içerdiği 'halosit' denen hücrelerle vitreusun metabolik olarak aktif bölümünü oluşturur. Medullar bölge ise kollagen fibriller ve hyalüronik asitten (HA) zengin yapıdadır ve hemen hemen hiç hücre barındırmaz.

Vitre ön yüzeyi ile lens arka yüzeyi arasındaki 9mm genişliğindeki potansiyel boşluğa Berger boşluğu denir. Lensin periferinden kapsülüne hyaloidokapsül yapıdaki Wieger ligamanı ile bağlıdır. Vitre bazında ise vitreal korteks ora serrata'nın 1,5mm önünde ve 3mm kadar arkasında yer alan bölge içerisinde, kollagen lifler retinaya dikey bir açıyla uzanarak ILM ve retinaya sıkı bir şekilde bağlanmıştır. Vitre bazı yaşla beraber arkaya doğru genişlemektedir (Resim16).

Vitre bazının arkasında kalan bölgedeki korteks, arka vitre korteksi olup retinaya paralel uzanan ve sıkı demetler halinde organize olmuş tip II kollagen lifleri içerir. Arka vitreal korteks yüzeyinin ILM'ye ekvator ve foveada bağlantı plakları ile bağlandığı gösterilmiştir [13].

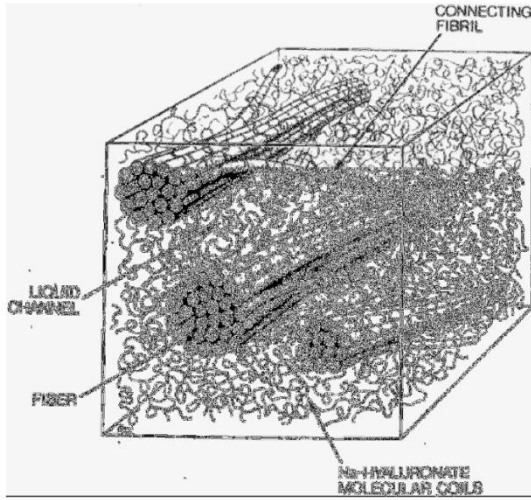
Bunun dışında ILM'nin yüzeyinde varolduğu düşünülen glikoproteinler ile vitreal korteks glikoproteinleri arasında biyokimyasal bir adezyon olduğu da düşünülmektedir. Ana vasküler yapıların üzerinde incelen ILM ile vitreal korteks arasında vitreoretinovasküler bandlar olduğu saptanmıştır [27].



Resim16: Vitrenin göz içi dokularla ilişkisini gösteren şematik çizim. BS: Berger boşluğu, CC: Cloquet kanalı, M: Martegiani bölgesi, WL: Wieger ligamanı, VB: Vitre bazı, AH: Anterior hyaloid.

Halositler, gestasyonun 5. ayında embriyonik fissürden globa giren mezenkimal dokulardan kaynaklanarak vitrealkorteks tabakasında yerleşirler. Halositler fizyolojik şartlarda proliferasyona uğramazlar. Sentez ve fagositoz yapabilirler. Bu hücreler hyalüronik asit (hyalüran) ve heksozaminleri sentezleyerek glikozaminoglikanların (GAG) yapısını oluştururlar. Medullada tip II, V ve IX kollagen demetleri kovalent bağlarla birleşerek kollagen fibrilleri oluştururlar.

GAG ve Na-Hyalüronik asit bu fibriller arasındaki boşluğu doldurarak vitreye özgü bir kıvam verirler (**Resim17**). Vitrenin bu yarı jel yarı sıvı haline “reoloji” denilmektedir.



Resim17: Kollagen demetlerinin organizasyonu ve Na-hyalüronat molekülleriyle ilişkisi.

Yaşla beraber vitrenin likefikasyona (sıvılaşma) uğramasıyla reolojik özellikleri değişmeye başlar. Medullada hyalüronik asit; kollagen fibrilleri organize bir halde tutar. Hyalüronik asit, fotooksidatif stresler sonucu serbestleşen hidroksil radikalları ile yıkıma uğratılır ve yapısı bozulur. Bozulan hyaluronik asit kollagen demetlerinin organizasyonunu sağlayamaz sonuç olarak da vitreal likefikasyon gelişir.

Bu sıvılaşma süreci ile ilgili diğer hipotez: vitrede ekstrasellüler matriksin bir parçası olan matriks metalloproteinaz enzimlerinin (MMP 1,2,3 ve 9) doku metalloproteinaz inhibitörlerinin (tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP 1,2 ve 3), inhibitör etkisinden kurtularak vitrenin jel yapısını sıvılaştırdıklarıdır. Buna sinchizis de denilmektedir.

Likefiye vitreus, globun rotasyonel hareketlerinin ve yerçekiminin etkisi ile jel yapı içerisinde hareketlidir. Bu hareketlilik retina – vitreal korteks bağlantılarına çeşitli yönlerde traksiyonel kuvvetler uygulamaktadır. Bunun sonucunda ise yer yer ayrılan ILM– vitreal korteks açıklıklarından sıvı vitreus sızarak retina vitreus arasındaki potansiyel boşluğa yayılır ve sonuçta tüm vitre gövdesi sıvılaşarak büzüşüp kollabe olabilir (sinerezis).

2.5 EPİRETİNAL MEMBRANLAR

2.5.1 Tanım ve Sınıflandırma:

İlk defa Iwanoff tarafından 1865'te tanımlanan epiretinal membranlar [1,2] ILM'nin iç yüzeyinde ploriferasyonla oluşan avasküler, fibrosellüler yapıdadır ve değişen düzeylerde görme bozukluğuna neden olurlar.

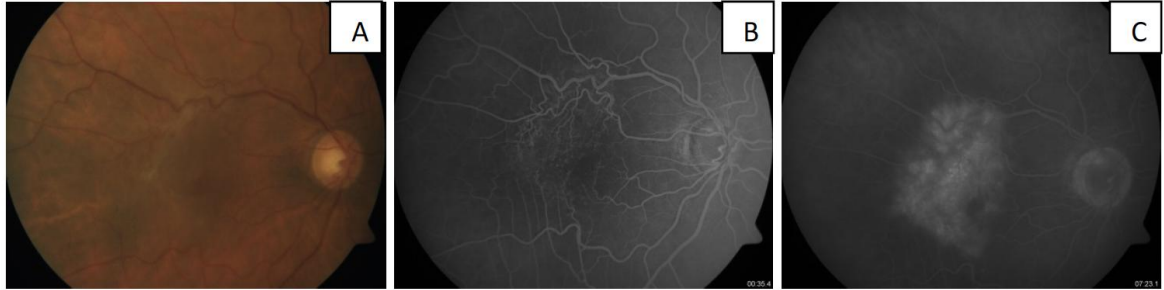
Bunlar, epiretinal astrositik membran, preretinal vitreal membran, preretinal makular fibrozis, selofan makulopati, yüzeyel kırışıklık retinopatisi, makular pucker veya vitreoretinal yüzey anomalileri olarak isimlendirilmektedir [30-35].

Epiretinal membranlar (ERM) fundus görüntüsündeki özelliklere göre Gass [36,30] tarafından şu şekilde sınıflandırılmıştır;

Evre 0: Retinal distorsiyon olmaksızın retinal yüzeyde seçilen parlak, saydam membran; (klinik olarak selofan makulopati ya da premakular gliosis).

Evre 1: Retinal yüzeyde ve ILM'de düzensiz kırışıklıklara yol açan saydam ERM (yüzey kırıştırıcı makulopati).

Evre 2: Altta yatan retinal damarları örten kalın, opak ERM (klinik olarak makular pucker) (**Resim18**).



Resim18: Sağ gözde ERM

(A: renkli fundus, B: ERM'ye bağlı damarlarda distorsiyon, C: FFA'da geç fazda artan makula ödemi).

Epiretinal membranlar oluşum nedenlerine göre primer ve sekonder ERM olarak iki gruba ayrılır;

a. İdiyopatik (Primer) ERM :

Arka vitreus dekolmanı saptanması dışında normal olan gözlerde gelişen ERM'ler idiyopatik olarak adlandırılır [38]. Görülme sıklığı, %68'dir. Erkek ve kadınlarda görülme sıklığı eşit olup, %20-%30 olguda bilateraldir [3,39-40].

b. Sekonder ERM:

Tüm ERM'lerin %32'sidir. Bu grup içindeki membranların retinal damar hastalıkları (vasküler tıkaçıcı hastalıklar, diyabetik retinopati), oküler inflamatuvar hastalıklar, künt veya perforan travmalar (Resim19), geçirilmiş göz ameliyatları (özellikle dekolman cerrahisi), lazer fotokoagülasyon veya kriyoterapi, intraoküler tümörler ve retinitis pigmentosa gibi patolojiler ile ilişkili olduğu bilinmektedir [38,41-42,44-47].



Resim19: Fundus fotoğrafında travmaya sekonder gelişmiş evre 3 ERM, makular pucker.

Sekonder ERM nedenlerinin başında retina dekolman cerrahisi gelmektedir. Klinik olarak tesbit edilen epiretinal membranların üçte ikisinin retina dekolman cerrahisi sonrası oluştuğu saptanmıştır [48,49].

Retinal yırtık ya da retina dekolman cerrahisini takiben % 4-8 oranında ERM gelişimi bildirilmiştir [50]. Önceki çalışmalarda ERM'nin geçirilmiş katarakt cerrahisi ile de ilişkili olduğu [51-54] yeni bir çalışmaya göre ise katarakt cerrahisi yapılan gözlerin %11'inde

ERM geliştiği, cerrahiden kısa bir süre sonra selofan refle saptanan hastaların %13'ünde 3 yıl içerisinde preretinal fibrozise ilerlediği saptanmıştır [51].

2.5.2 Epidemiyoloji:

Geçtiğimiz yıllarda, değişik etnik gruplarda yapılan populasyon temelli çalışmalar ERM için %2,2 ile %18,5 arasında değişen prevalans bilgileri sağlamıştır [52,40,42,43,55-60]. Beyaz ırkla karşılaştırıldığında asyalılarda ERM prevalansının daha düşük olduğu ileri sürülmüştür [55,57]. Örneğin McCarty ve ark.'nın çalışmasında yaş ile standardize edilmiş ERM prevalansı beyazlarla (%5,1-9,1) [40, 55-57,61] kıyaslandığında, Japonlarda (%2,8) [55,58] daha düşük olarak raporlanmıştır.

ERM görülme sıklığı 5 yıllık periyotta 60 yaş altında (%3,7), 60-70 yaş arasında (%6,6) iken ortalama (%5,3) olarak bildirilmiştir [38,42].

Görülme sıklığının yaşla birlikte arttığı bilinmekle birlikte sekonder hastalıklara bağlı olarak daha genç yaşlarda da ortaya çıkabileceği vurgulanmaktadır [38].

2.5.3 Patogenez:

ERM'ler vitreoretinal arayüzünün hastalığı [62] olup RPE, fibroblast, makrofaj, miyofibroblast ve glial hücrelerden oluşan fibroselüler özelliktedirler [1,42,63-66].

Fibroselüler büyümenin; retina üzerinde teğetsel çekim kuvveti oluşturarak retinal mimariyi deformasyona uğrattığına inanılır [62].

ERM'lerin morfolojik özellikleri, ilişkili retinal hastalığa olduğu kadar proliferen olan hücrelerin kaynağına [38,67]; çeşitli büyüme faktörlerine ve sitokinlerin seviyelerindeki farklılıklara da bağlı olabilir [38,42,68]. Yapılan histopatolojik çalışmalar RPE hücresinin idiyopatik ERM'de hakim hücre [38,69,66] olduğu, RPE hücre metaplazisinin fibröz doku oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir [38,70,71].

Fibrosit ve makrofajlar muhtemelen kortikal hiyalosit kaynaklı olup, miyofibroblastlar membranın kontraksiyonundan sorumlu olarak altındaki retina yapısında distorsiyona ve ince kırışıklıklara neden olurlar [38,44,70].

Primer ERM oluşumunda kabul gören diğer mekanizma glial hücre kaynaklı ERM oluşumudur [38].

Glial hücrelerin retina altından türetildiği, hücre göçü, hücre bölünmesi veya hücrel hipertrofi ile ILM'yi katederek ekstraretinal hedefe ulaştıkları düşünülür. [72].

ERM'li olguların hemen hepsine AVD eşlik eder. AVD ile gelişen traksiyonun da benzer bir mekanizmayla ILM defekti ve ERM oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir [73,74,75].

C.Harada ve ark.'nın çalışmasında PDR, PVR'de vitrede ve aköz humörde olduğu kadar ERM'lerde de bFGF, HGF, VEGF, NF-kB, AP-1 gibi çeşitli mediatörlerin ve reseptörlerinin artmış olduğu gösterilmiştir [72,76]. İdiyopatik ERM patogenezinde sayılan mekanizmalara ilaveten, ISOS hattının bozulması sessiz, uzun süreli veya ağır ERM göstergesi olarak düşünülmektedir [77].

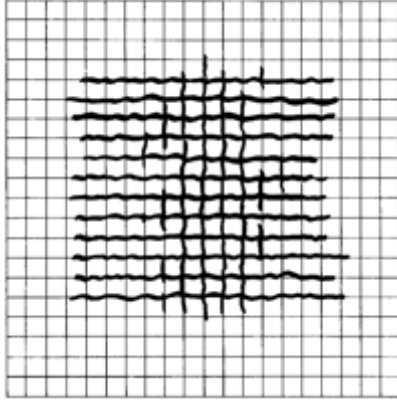
2.5.4 Semptomlar:

Hastaların çoğu asemptomatik olup, görme seviyeleri normale yakındır [3, 78, 79]. ERM'de maküla tutulumu olduğunda görme keskinliğinde azalma ve metamorfopsi gibi ciddi semptomlar görülür. Bu semptomlar, ERM'nin makülada distorsiyon, traksiyon, mikredekolman, ödem oluşturması ve aksoplazmik akımı engellemesi sonucu gelişmektedir [73,79-81]. Daha nadir olarak mikropsi, makropsi, santral fotopsi ve diplopi görülebilir [3].

Azalmış görme keskinliği ve metamorfopsi; maküler distorsiyon, vasküler sızıntı, traksiyonel retina dekolmanı ve ERM gibi pek çok nedenle ilişkili olabilir [82,83-85].

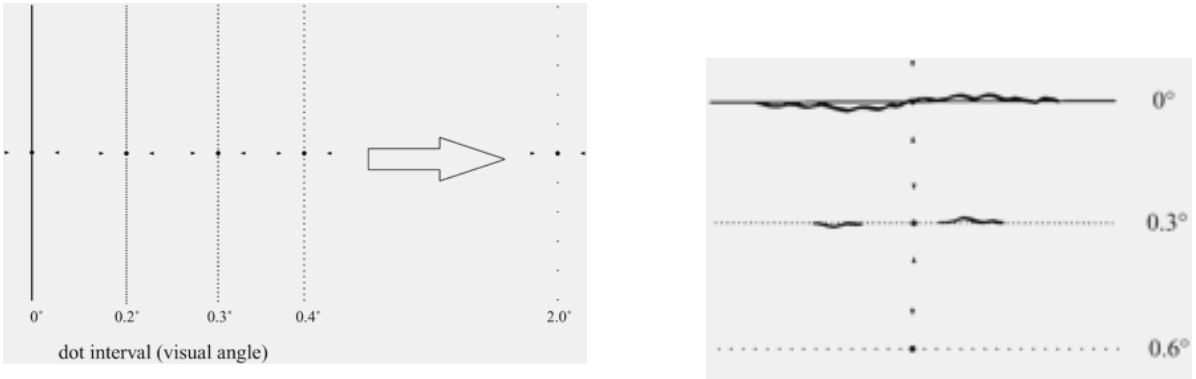
Metamorfopsi genellikle Amsler kartıyla saptanabilir. Amsler M. tarafından 1947'de geliştirilen bir numaralı kartta 10cm²'lik bir alanda 5mm²'lik ve 33cm mesafeden 1 derecelik görme alanlarına karşılık gelen 400 küçük kare bulunmaktadır ve santral 10 derecelik görme alanı değerlendirilmesini sağlar.

Amsler grid testinde, hastanın (refraktif kusuru düzeltilmiş olarak) yakın okuma mesafesinden kartın merkezindeki noktaya bakması istenir. Bu esnada 'grid' içerisinde yer alan düz çizgilerden herhangi bir dalgalanma görüp görmediği sorgulanır. Hastanın tek başına uygulayabileceği basit bir test olan Amsler grid testi, kalitatif özelliktedir. Bu yöntemde veriler subjektiftir. Ciddi katarakt veya korneal opesite gibi durumlar sonucu etkileyebilir [86] (**Resim20**).



Resim20: Bir numaralı Amsler grid kartında çizgilerdeki dalgalanmalar hasta tarafından kartın üzerine çizilmiştir.

Metamorfopsinin kantitatif değerlendirmesinin objektif olarak yapılabilmesi için Matsumoto ve ark. [86] tarafından M-CHARTS (Metamorfopsi Kartları) denen bir sistem geliştirilmiştir. Bu sistemde 0,2-2 derecelik mesafede sabit aralıklarda yerleşen doğrusal dizilimli noktalardan oluşan 19 vertikal çizgi bulunmaktadır. Hastaya gösterilen bu 19 doğru üzerinde metamorfopsi varlığı sorgulanır ve metamorfopsinin ortadan kalktığı doğru parçasında noktaların birbirlerinden kaç derecelik aralıklarla ayrı durdukları belirleyicidir (Resim21).



Resim21: A M-Charts testi, B hasta tarafından 0,6°'lik noktalardan oluşan doğru üzerinde metamorfopsinin kaybolduğu belirtilmiştir.

2.5.5 Klinik Bulgular:

Aseptomatik bir hastada selofan makulopati ince, düzgün yüzeyli, parlak refle görünümünde saptanabilirken; ERM belirginleştikçe iç retina katlarında ince yüzeysel, ışınsal pliler olduğu görülebilir. Kalınlaşan ve opaklaşan (pucker) membranların, damarlarda çekinti, distorsiyon oluşturduğu saptanabilir [3,78,79] (**Resim22**).

Makulada pseudohole görünümüne, santral retinal kalınlaşmaya, ödeme ve hatta lameller makula deliğine yol açabilirler [87].

İdiyopatik ERM özellikle makula distalinde yer aldığında foveal ektopiye neden olabilir [88]. Hastaların fundus muayenesinde optik disk üzerinde ayrılmış peripapiller glial dokunun beyaz bir halka şeklinde görülmesi AVD olduğunun göstergesi olabilir (Weiss halkası) [89].



Resim22: ERM (pucker)

2.6 ARKA VİTRE DEKOLMANI

İki teori AVD'yi takiben ERM'lerin nasıl oluştuğunu açıklamak için birleştirildi. 1.teori: AVD'nin glial hücre proliferasyonuna izin veren ILM ayrışmasına neden olduğudur. 2.teori: İnkomplet vitreoretinal ayrılma, arka vitreal korteksin bir kısmını ILM'ye bağlı olarak bırakır bu da ERM gelişiminde nidus olarak işlev yapar. AVD'ler ve ERM'ler arasındaki ilişki arka hyaloidal membranın retinadan ayrılmasını "gerçek" AVD varsayan anatomik bir modele dayanmaktadır. Fundoskopik muayenede görülen AVD'lerden kaç tanesinin gerçekten ayrılmış hyaloidal membranı yansıttığı bilinmemektedir. Arka vitre retinadan ayrıldığı zaman, ayrılmış hyaloid yüksek enerjili ve oblik aydınlatmalı biyomikroskop ile görülebilir [89].

Bu klinik görüntüyü fizyolojik ilişkisi ile bağdaştırma, çok geniş postmortem araştırmalarla değerlendirilmiştir [89,91,92].

Bu çalışmalarda AVD'si olan hastalar ölene kadar izlenmiştir. Bir çalışmada, klinik muayenede AVD'si olduğu rapor edilen hastaların postmortem değerlendirmelerinde %66'sında ayrılmış hyaloid olduğu bulunmuştur [89,92].

Burada hastaların takip sırasında ölen küçük bir yüzdesi değerlendirilmiştir. Klinik muayenede AVD bulunan gözlerin ERM cerrahisi sırasında hyaloid durumunu değerlendiren bir çalışmada [89], biomikroskopik incelemede AVD gözlenen 66 gözden, 38 tanesinde ameliyat sırasında ayrılmış hyaloid olduğu görülmüştür.

Diğer bir deyişle, preoperatif değerlendirmelerin hyaloidlerden %57'sinin ayrılmış olduğu doğru olarak saptanmıştır. Bu yüzden, klinik AVD izleniminin ayrılmış hyaloid için sensitif (%80,8) bir marker olmasına rağmen, daha az spesifik (%54,8) bir marker olabileceği düşünülmüştür. Preoperatif AVD bulunmaması cerrahi sırasında hyaloidin ayrılmamış olduğunun güçlü bir göstergesidir. Bu çalışmaya göre AVD'yi tanımanın 2 nedenle önemli olduğu düşünülmüştür:

1.AVD retinal yırtığa giden bir kritik bir yolun göstergesi olabilir. 2.AVD varlığı veya yokluğu diğer vitreoretinal hastalıkların gidişatını ve prognozunu değiştirebilir [89,93]. Yine de hyaloid durumu ile görsel sonuçlar arasında hiçbir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç olarak, fundoskopik muayenede izlenen AVD gerçekten posterior hyaloidin ayrışması değilse, AVD'nin klinik bulgularının prognostik değerinin azalacağı söylenebilir [89] (**Resim23**).



Resim23: Posterior prekortikal vitreus paketi şematik görünüm; arka vitreus likefiye olarak arka kutbun önünde optik boşluk oluşturmaktadır, vitreal korteks ise halen retinal yüzeye yapışıktır.

Klinik çalışmalara göre AVD'nin insidansı yaşla birlikte artış gösterir. 50 yaş altında <%10, 60-70 yaş arası %27 ve 70 yaş sonrası %63 oranında görülmektedir [94]. Kadınlarda semptomatik AVD sıklığı %65-68 iken erkeklere %32-35 oranındadır [95]. AVD'nin görülme sıklığı; psödo fak ve afak hastalarda, vitreal inflamasyonlarda ve vasküler hastalıklarda (DM, vaskülitik lezyonlar) artmaktadır.

Akiba ve ark. [96] arka hyaloid-retina ilişkisine dayanarak AVD'yi 4 gruba ayırmışlardır;

- Grup1: AVD bulunmaması
- Grup2: Makulada vitreoretinal adezyon ve traksiyonlar içermeyen parsiyel AVD
- Grup3: Makulada traksiyon yapan parsiyel AVD
- Grup4: Komplet AVD

Vitre dekolmanının vitreomakular hastalıklarla ilişkili olmasının dışında; perivasküler sıkı adezyon bölgelerinden vitreal korteksin ayrılması sonucu %3,7-11,7 oranında vitre içi hemoraji oluşabilir. Yine sıkı yapışıklık olan vitre bazı ve periferik retinada likefiye vitrenin traksiyonu sonucu dev retinal yırtıklar ve regmatojen retina dekolmanı meydana gelebilir.

2.7 HİSTOPATOLOJİ:

İlk kapsamlı histolojik çalışma, Clarkson ve ark. (37) 1977'de yayınlamış olduğu 1612 otopsi ve 388 enükleasyon materyali ile toplam 2000 gözü içeren araştırmadır. Tüm gözler içinde ERM'ye rastlanma oranı % 5.5 iken, toplam sayısı 168 olan membranlar histolojik olarak incelendiğinde, büyük çoğunluğunun glial kökenli hücreler olduğu, fibroblastik ve fibrotik membranların daha yaşlı membranlarda bulunduğu, RPE hücrelerine ise ancak retina dekolmanı ya da retinal yırtık saptanmış olan (RPE tabakasının retinal yüzeye geçiş imkanı bulunduğu) ERM'lerde rastlandığı keşfedilmiştir. Hiscott ve ark.'nın arka arkaya yayınlanan üç immunohistokimyasal çalışmasında (39,40,41) ERM hücrelerinin kökeni, dağılımı ve patogenesisine katılma şekilleri hakkında geniş bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmalara göre ERM'lerin oluşumunda skar formasyonuna benzer özellikler görülmekte, fibronektin, glial kökenli hücreler (Müller veya astrositler), fibroblast benzeri hücreler oluşumunda yer almakta idi. Hiscott incelediği

örneklerde ERM gelişiminde 4.ayın kritik bir dönüm noktası olduğunu düşünmüştür. İlk dört aylık kısa dönemde glial kökenli hücreler öncü hücre grubu olarak retinal yüzeyde proliferere olmakta, ardından 4.ayı takiben fibroblast ve myofibroblast kökenli hücreler glial doku tarafından oluşturulmuş olan yapıya katılmakta, kollagen ve fibronektin sentezi ile ERM’de patolojik semptomlara yol açan tanjansiyel retinal traksiyona ve distorsiyona neden olmaktadır. Bu histolojik bulgular semptomların prognozuna da uyumlu bulunmuştur.

Bugüne kadar yapılan klinik ve histolojik araştırmalar sonucunda ERM oluşumunda ilk aşama İLM’de oluşan mikro çatlaklardır. Fizyolojik koşullarda retinal yüzeyde membran oluşumunu sağlayacak ölçüde hücre göçü mümkün olmadığından, hücrelerin retina yüzeyine ulaşması için İLM’den geçebilmeleri gerekmektedir. Sekonder ERM etiolojisinde yer alan tüm faktörler (fotokoagülasyon, oküler travma vs.) ve idiopatik ERM gelişiminde etioloji kabul edilen arka vitre dekolmanı İLM bütünlüğünü bozmaktadır. Hogg ve ark.’nın (44) yaptıkları bir çalışmada RPE hücreleri, fibroblastik ve glial kökenli hücreler, PDGF (Platelet kökenli büyüme faktörü) ve fibronektine cevaben in vivo şartlarda migrasyon yetenekleri açısından karşılaştırılmış ve glial kökenli hücrelerin en hızlı ve en fazla miktarda göç ettikleri gösterilmiştir.

Özetle, İLM çatlakları retinal yüzeyde gliosis oluşturmaktadır. Oluşan bu gliosisi takiben yine farklı kemotaktik faktörler aracılığı ile fibroblastik hücreler gliosisden oluşan bu hücre köprüsüne 4. ay itibariyle yerleşmektedirler ve yeni kollagen ve fibronektin sentezine başlarlar. Membranlarda kollagen ve fibronektin artarken hücrelerel bileşenler inflamatuvar hücrelerin eklenmesiyle çeşitlenmektedir. Geç dönem ERM’lerde ise hücrelilik oldukça azalır, kollagenin hakim olduğu fibröz bir membran gelişir (41).

Foveal fonksiyonların bozulmasındaki en önemli etmenler ise retinanın tam ya da yarım kat katlantılara veya distorsiyona uğraması (tanjansiyel traksiyon) , veya parsiyel AVD’lerde arka hyaloidle İLM arasında var olan sıkı bağlantılarla makular bölgeye anteroposterior traksiyon uygulanması sonucu gelişen makular ödemdir. Tanjansiyel traksiyonda “hiposelüler jel kontraksiyonu” (22) denilen bir faktör yer almaktadır, öyle ki değişik hücre gruplarının kollagen I veya II içeren jellerde serum bazlı ya da serum dışı büyüme faktörleriyle kollageni kontrakte edebildikleri gösterilmiştir (47).

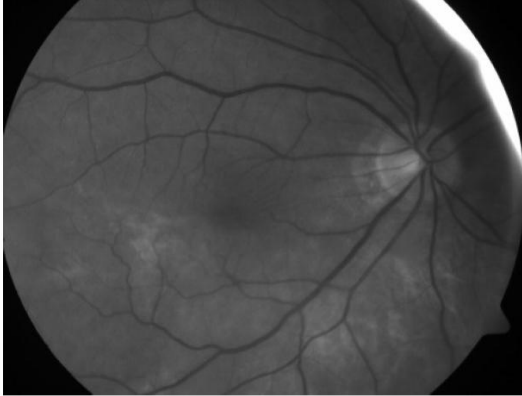
2.8. MUAYENE YÖNTEMLERİ:

2.8.1 Refraksiyon Muayenesi :

Makula hastalıklarının takibinde ve teşhisinde düzeltilmemiş ve en iyi düzeltilmiş görme keskinliğinin saptanması ve refraksiyon muayenesi ilk basamağı oluşturmaktadır. ERM hastalarında görme azalması pozitif skotom ve metamorfopsi ile başlar, sıklıkla takip eden 4-6 ay arasında gittikçe daha çok azalır (hızlı progresyon dönemi) ve ardından uzun süre aynı seviyede kalabilir. Vizyon hastaların ancak % 5'inde 20/200'ün altına inecek kadar kötüleşirken, çoğunluğunda 20/50 ve üstünde olarak kalır (54).

2.8.2 Fundus Muayenesi:

Hastanın pupilleri düzeltilmiş görme keskinliği tespit edildikten sonra midriatik topikal bir ajanla dilate edilir. En sık kullanılan fundoskopik teknik biyomikroskopun yarıkli lambası ve artı değerlikte bir lens yardımı ile hastanın fundusunun ve area centralisinin incelenmesidir (indirek oftalmoskopi). ERM muayenesinde retinal sinir tabakasında ve yüzeydeki lezyonların daha iyi görülmesini sağlayan kırmızıdan yoksun (yeşil) ışıkla bakılması en ince membranların bile görülmesini sağlayacaktır.



Resim24: Sağ gözde ERM'nin Red Free fundus resmi.

Oftalmoskopik olarak; foveal ve perifoveal damarlarda düzleşme, kapillerlerde distorsiyon, retinal striasyon, makular heterotopia, psödohole (yalancı delik) görünümü, parsiyel / komplet AVD, ILM kırışıklıkları veya parlaması, opak ya da pigmente ERM, makular ödem, mikroanevrizmalar, iskemiye sekonder gelişen cotton-wool spotlar, ayrıca sekonder membran etiyojilerine (diabetik retinopati, fotokoagülasyon, geçirilmiş retinit, vaskülit vs.) bağlı bulgular da görülebilir.

2.8.3 Tanı Konulması:

Tanı genellikle oftalmoskopik olarak konur. Fundus floresein anjiyografisi (FFA), ve optik koherens tomografi yardımcı yöntemlerdir [3].

2.8.4 Yardımcı Tetkikler:

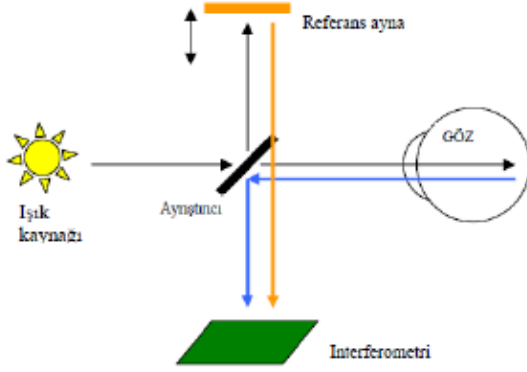
2.8.4.1 Optik Koherens Tomografi (OKT) :

İlk olarak 1991'de kullanılmaya başlanan optik koherans tomografisi (OCT) gözün anatomisini in vivo şartlarda 10 mikron aralıklarla tomografik olarak inceleyebilen en yüksek çözünürlüklü yardımcı tetkik modalitesidir. Kullanıma girdiğinden beri sağladığı klinik kolaylık özellikle makular hastalıklar ve glokom takibinde en sık başvuru alan tetkik olmasına yol açmıştır.

(A)Çalışma Prensipleri

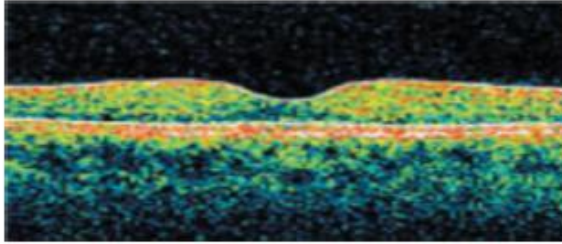
Referans aynanın ışık ayrıştırıcısına uzaklığı değiştirilerek göz içi dokuların farklı derinliklerinden yansıyan ışınlar değerlendirilebilir. Böylece retinanın ILM ve RPE arasında kalan tüm dokularına ait tomogram haritaları iki boyutlu olarak gösterilebilmektedir. Aynı zamanda retinal ve foveal kalınlık 10 nm'lik bir hassasiyetle tanımlanmakta ve tüm bunlar bir bilgisayar yardımıyla renkli veya gri skala yardımı ile haritalanmaktadır.

Optik koherens tomografide görüntü, retina katlarının optik olarak farklı yansıtıcılıkta olması ile elde edilmektedir (Reflektivite). Dokulardan geri yansıyan ışığın yoğunluğuna göre gri veya renkli skala kullanılarak kesit görüntüleri oluşturulmaktadır. Retina sinir lifi tabakasında aksonal uzantıların çok olması, retina pigment epitelinde yüksek melanin pigment seviyesi ve koryokapillardaki yüksek hemoglobin düzeyinden dolayı bu yapıların optik yansıtıcılığı yüksektir. Fotoreseptör tabaka ise orta düzeyde yansıtıcılığa sahiptir.



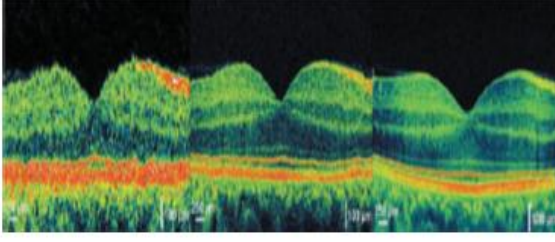
Resim25: OKT'nin şematik olarak çalışma prensibi görülmektedir. Referans ayna-aynıştırıcı mesafesi değiştirilerek farklı derinlikte retinal dokulara ait farklı fazdaki dalgalar referans ışınla karşılaştırılabilir.

OKT yazılımı, retina kalınlığını hesaplar. Her bir A mod taramada rölatif olarak yüksek reflektivitesi olan iki nokta arası mesafeyi hesaplar. İç retina sınırı olarak vitreoretinal ara yüzeyi ve dış retina sınırı olarak da retina pigment epiteli-fotoreseptör katını belirler ve mesafeyi ölçer. (Resim 26)



Resim26: Normal bir gözde her bir lineer makula taramasında OKT, retina kalınlığını hesaplar. Bunun için çizilen sınırların uygunluğu kontrol edilmelidir.

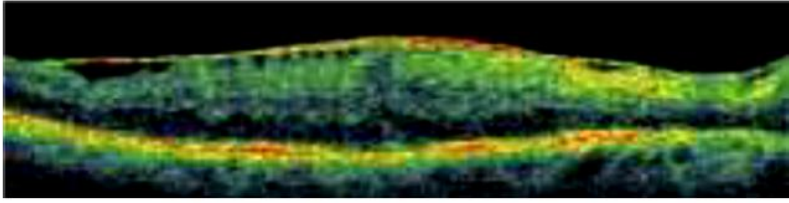
Son gelişmelerle yüksek hızlı ve çok yüksek çözünürlüğe sahip olan spektral OKT cihazı geliştirilmiştir [253-257]. Spektral OKT Fourier domain tespiti ile şimdiki OKT'den 50 kat daha hızlıdır [258]. sOKT'nin gözdeki aksiyel çözünürlüğü 3,4 mikron olup saniyede 24000 A mod tarama yapmaktadır. Birkaç superluminesent diyot laser tek fiber kablo ile sisteme bağlıdır. Bu sistemle görüntü elde etme hızı da artmıştır. Standart OKT'den bir diğer farkı referans aynanın sabit olmasıdır. sOKT, yüksek hızda retinada transvers olarak çok sayıda veri elde ettiğinden fokal patolojilerin atlanması ihtimalini azaltır (Resim27).



Resim27: Sağlıklı bir gözde, makula taramasında; aynı gözün Stratus OKT (solda), çok yüksek çözünürlüklü OKT (ortada) ve sOKT (sağda) ile elde edilen görüntüleri görülmektedir.

(B) ERM'lerde OKT Bulguları:

- ERM retina iç yüzeyinde hiperreflektif bir band olarak seçilebilir (Resim28).



Resim28 : Retina iç yüzeyinde ERM'ye ait hiperreflektif band, retinal kalınlaşma.

- ERM kontraksiyonunun iç retina katlarında oluşturduğu distorsiyon, artmış foveal kalınlık
 - Foveal kontur düzleşmesi
 - Dış pleksiform ve intraretinal katlarda sıvı birikimine ait yansıma azalması ya da kistoid boşluklar (Resim30) [3,98].
 - Makular psödohol (yalancı delik) formasyonu; gerçek tam kat ya da lameler hollerden farklı olarak foveada fotoreseptör tabakası kalınlık ve yapı olarak korunmuştur ve ERM'ye bağlı olarak psödohol kenarlarında vitreal tarafa dikleşen kenarlar mevcuttur.
 - ERM traksiyonuna sekonder gelişebilen lokalize seröz retina dekolmanı
 - Çözünürlüğü daha yüksek spektral OKT ile fotoreseptör iç ve dış segment birleşme hattı (İS/OS) bütünlüğü [3,99,100].

2.8.5 Ayırıcı Tanı :

Preoperatif dönemde görme azalmasının epiretinal membran dışı bir nedenden kaynaklanmadığını; fundus muayenesi, OKT ve FFA'dan yararlanarak göstermek önemlidir.

Ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken patolojiler;

- Makular hol, başlangıç aşamasında veya tam kat olabilmekte, ERM'de oluşabilen psödohol görünümüyle karışabilmektedir. OKT'de fovea merkezinin tam kat fotoreseptör tabakasının korunması ve FFA'da geç dönem floresein sızıntısının olmaması psödoholu gösterir.
- Submakular bölgede koroidal neovaskülarizasyon, santral görmeyi başlı başına azaltan bir klinik antite olup, ERM ile birlikte olması halinde membran soyulması ile vizyon artışı mümkün olamayacağından FFA ve ISYA ile ekarte edilmelidir.
- Katarakt, ERM hastalarında preoperatif nükleer sklerozun derecesinin ve katarakt varlığının tespiti görme keskinliğini azaltan patolojinin tespiti açısından önemlidir.
- Katarakt cerrahisi sonrası makular ödem, makular teleenjiyektaziler
- Retinal vasküler tıkanıklığa (ven kök ya da ven dal tıkanıklığı) sekonder gelişen ERM'lerde iskemi nedeniyle makular fonksiyonlar ileri derecede etkilenmiş ise; ERM'nin soyulması ile görme keskinliğinde artış gerçekleşmeyebilir.

2.8.6 Tedavi:

1978'de Machamer'ın ERM nedeniyle semptomatik görme bozukluğu olan hastalarda PPV uygulaması [3], bu tedavinin günümüze kadar gelişerek standart tedavi yöntemi olmasının önünü açmıştır [107,114].

a. Cerrahi Endikasyonunun Verilmesi:

Göz merkezlerinin çoğunda DEİGK düzeyi yaklaşık 20/30 'un (0,6) altına düştüğünde EMR soyulması için makuler cerrahinin uygulanması savunulmaktadır [115,116].

Metamorfopsisi olan hastalar çok daha iyi görme seviyelerinde bile opere edilebilmektedirler [3]. Fakat şu ana kadar cerrahi için OKT bulguları gibi objektif bir endikasyon rapor edilmemiştir.

b. Spontan Rezolüsyon:

Cerrahi endikasyon öncesinde dikkate alınabilecek bir diğer özellik nadir de olsa tamamlanmamış AVD'lerin retinal yüzeyden ayrılarak beraberinde ERM'nin de ayrışmasına neden olabileceği dolayısıyla erişkinlerde %1 oranında spontan rezolüsyona rastlanabileceği belirtilmektedir [1,117].

c. Cerrahi Tedavi:

Epiretinal membranların cerrahi tedavisi, PPV-arka segment cerrahisini içeren ortak yaklaşımlarla membran soyulmasında kullanılan özel yöntemleri içermektedir. Sırasıyla;

- Hazırlık ve anestezi aşaması
- Sklerotomilerin açılması
- Kor vitrektomi ve arka hyaloidin temizlenmesi
- ERM boyanması ve soyulması
- ILM boyanması ve soyulması
- Periferik retinanın ve arka kutbun iatrojenik yırtık açısından incelenmesi
- Göz içi tamponadı verilmesi (opsiyonel)
- Sklerotomilerin kapatılması, olarak özetlenebilir.

2.9 PROTEOMİKS ANALİZİ

Proteomiks genomun tüm protein komponentlerini (proteom) çalışın bir bilim dalıdır. Proteomiks ve proteom terimleri Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1990'larda türetilmiştir. Bu kelimeler tüm bir organizmadaki tüm genlerin kolleksiyonlarını ifade eden genomiks ve genom kelimelerinin yansımalarıdır. Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışın, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır(118). Hücrede gerçekleşen posttranslasyonel modifikasyonlar normal ve patolojik dokulardaki farklılıkları belirler

ve proteinde görülen post-modifikasyonların tümünün bilgisini protein kodlayan bölgelerdeki genomik bilgi tek başına veremez. Bu nedenlerle, genomik çalışmalar her zaman nihai protein ekspresyonu hakkında doğru bilgiler sağlayamaz iken yapılan proteom çalışmaları, hastalık patolojisini ve fenotipini genomik çalışmalardan farklı yollarla ortaya çıkarabilmektedir.

Hastalıkların erken tanısı, risklerin veya tedavi yanıtlarının izlenebilmesi için biyobelirteçlerin keşfi; klinik sonuçları düzeltebilecek yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için protein hedeflerinin tespit edilebilmesi klinik proteomiksin temel amaçlarındandır.

2.9.1 Biyobelirteçler

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür(119). Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak birtakım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesi bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesiyle mümkün olabilmektedir. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır. Biyobelirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metodlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde biyobelirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir biyobelirteçle ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir(120).

2.9.2 Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji

Örnek hazırlığı proteom analizi için ilk adımdır. Tüm hücre ve doku özütlerinde proteinlerin farklı moleküler kütle, yük, izoelektrik nokta ve çözünürlüğe sahip olmaları örnek hazırlanmasındaki ana problemdir.(121) Ayrıca bu aşamada örnek karmaşıklığının azaltılması da önemlidir. Proteom analizinde ikinci adım analitik protein ayırım teknolojisidir. Analitik protein ayırım teknolojisinde önce kompleks protein karışımlarını belli proteinlere ya da protein alt gruplarına ayrılarak

basitleştirir. Daha sonra örnekler arasında karşılaştırma yapılarak protein düzeylerindeki farklılıklar belirlenir. Proteinlerin ayrımı araştırmacıya analizi için spesifik proteinleri hedeflemesini sağlar. İlki sıvı fazda ayrımın yapıldığı metod ve ikincisi ise proteomikte altın standart olup sıklıkla tercih edilen 2D (iki boyutlu) jel elektroforez metodu olmak üzere iki tip metod mevcuttur(120,121). Bunlardan farklı olarak diğer protein ayırma teknikleri 1D jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi 1. SDS- PAGE (denatüre edici page) ve 2.ND-PAGE(non denatüre edici page), HPLC (yüksek performans likit kromatografisi), kapiler elektroforez, izoelektrik odaklama ve kromatografik yöntemlerdir.(120,121) Ayrıştırılmış örneklerin analizi, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight* (MALDI-ToF), ESI-MS (*electrospray ionization-mass spectrometry*), PSDMALDIMS (*Post Source Decay*) ve SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*) yöntemleri ile yapılır. Kütle spektrumu ve kromatogram verileri alınan örnekler için veri tabanında tarama yapılmakta ve belirli olasılıklarla protein eşleştirmeleri elde edilmektedir. MALDI-TOF ile protein bilgisine ulaşıp proteinin adı konulduktan sonra,ESI-MS için kullanılan Q-TOF ile amino asit dizilimlerine ulaşılarak proteinlerin primer amino asit dizileri aydınlatılabilmektedir. Veri tabanları üzerinden kimliği belirlenmiş olan proteinler değerlendirilerek farklı tedavi dozlarına yanıt, tedavi edilen ve edilmeyen bireylerdeki protein haritaları veya farklı hastalıkları taşıyan vakalar ile kontrol grupları arasında fark doğrudan ve en güvenilir şekilde ortaya koyulmaktadır.

2.9.3 MALDI-TOF KÜTLE SPEKTROMETRİSİ ANALİZİ

Kütle spektrometre aletleri iyonlaştırılmış maddeleri gaz fazında analiz ederler. Bu nedenle bir kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle/yük oranını belirleyebilen bir kütle analiz cihazı ve bir dedektörden oluşur. Proteinlerin ve biyolojik moleküllerin gaz fazına taşınabilmesi ESI (*electrospray ionisation*) veya MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization*) teknikleri ile yapılır. MALDI tekniğinde analizi yapılacak maddeler katı bir kristal matriks ortamından lazerle iyonize edilir. Matriksin olmadığı ortamda biyomolekül parçalanacağı için matriksin kullanılması şarttır. İyonlaştırılmış biyomoleküller elektrik alan içerisinde hızlandırılarak bir tüp içerisine aktarılır. İyonların bu tüp içerisindeki hızları her bir iyonun kütle ve yükü ile doğru orantılıdır. Böylece her bir iyonun tüpten çıkış anı sahip olduğu kütle/yük sinyal oranına bağlı

olarak değişir.

MALDI-TOF metodu kullanılarak proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin karakterizasyonu ve tanımı mümkündür. Bu metod oldukça duyarlı olup moleküler ağırlıkları 400 ile 350,000 Da arasındaki polipeptidlerin tanımlanmasını sağlar. Elde edilen kütle/yük değerlerinin analizi MALDI-TOF analizinden elde edilen kütle/yük değerleri Swiss-Prot veri bankasında Prospector adı verilen ve ücretsiz ulaşılabilen bir programda araştırılabilir. Bu programın amacı araştırılan proteinin kütle/yük değerlerini bugüne kadar bilinen tüm kütle/yük değerleri ile karşılaştırmak, veri tabanındaki değerlerle eşleşip eşleşmediğini araştırmak ve hangi proteine ait olduğunu tespit etmeye çalışmaktır. Protein prospector içerisinde birkaç farklı programı kullanmak mümkündür. (Swiss-Prot veri bankası, <http://prospector.ucsf.edu/>)

Bu bağlamda kullanabileceğimiz ikinci bir program da Peptident adı altında sunulan ve ExPasy veri bankası tarafından ücretsiz olarak kullanıma açılan veri tabanıdır (<http://ca.expasy.org/tools/peptident.html>). Oldukça kolay kullanılabilen bir kullanıcı-ortamına (*interface*) sahip olan bu program elde edilen kütle/yük değerlerini direk olarak veri bankası içerisinde araştırır.

Kısacası proteomiks analizinde kullanılan genel strateji; (1) Ekstraksiyon, solübilizasyon, ön-fraksiyonlama, DNA'nın uzaklaştırılması, yaygın bulunan proteinlerin uzaklaştırılması gibi teknikleri içeren örnek hazırlığı. (2) Protein ve/veya peptitlerin tanımlanması (identifikasyonu) ve elektroforeze dayalı tekniklerin kullanımınıdır.

2.9.4 2D Jel elektroforez çalışmaları

Protein örneklerinin hangi odaklama aralığında çalışılacağını belirleyebilmek için, 7 cm boyutunda pH 3-10 aralığında lineer striplerde bir ön çalışma yapıldı (**Şekil 4**). Yapılan bu ön çalışma neticesinde örneklerin 11 cm'lik geniş jellerde ve pH 3-10 aralığında çalışılmasının uygun olacağı sonucuna varıldı. Bu amaçla metod kısmında anlatıldığı gibi her bir örnekten ikili tekrar olacak şekilde 900 µg protein kullanılarak 2D-jeller üretildi. Üretilen jeller Mura-fast boyası ile boyandı, VersaDoc MP4000 sistemi ile görüntülendi ve görüntüler PDQuest Advance yazılımı ile analiz edildi (**Şekil 5**).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları A.D. retina departmanında Mayıs 2017-Ağustos 2018 tarihleri arasında idiyopatik epiretinal membran tanısıyla pars plana vitrektomi uygulanacak 12 hastanın 12 gözü ve kontrol grubu olarak da herhangi sistemik hastalığı olmayan 12 hastanın 12 gözü çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamıza idiyopatik ERM tanısı ile PPV yapılması planlanan hastalar alındı. Proliferatif diabetik retinopatisi olan hastalar, glokom-üveit tanısı olanlar, sekonder epiretinal membran tanısıyla operasyon planlanan ya da daha önce geçirilmiş cerrahi öyküsü olan edilmiş hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Hastaların fundustaki ERM görünümleri Gass sınıflaması kullanılarak sınıflandırıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların başlangıç görme keskinliği Snellen eşeli ile, göz içi basınçları Goldmann aplanasyon tonometrisi ile değerlendirildi. 6mm/Hg'nin altı hipotoni, 25mm/Hg'nin üstü hipertoni olarak kabul edildi. Biyomikroskopik incelemede fakik hastalarda nükleer skleroz ve katarakt varlığı biyomikroskop ile subjektif olarak derecelendirildi. Fundus muayeneleri biyomikroskop eşliğinde 90D'lik standart lenslerle yapıldı.

ERM'lerin yapısı, retinal yüzeyle ve arka hyaloidle olan ilişkisi hastanemizde kullanılan Spektralis OKT cihazı ile değerlendirildi.

OKT'de epiretinal membran varlığı retinanın önünde, ince, yüksek reflektiviteli band olarak tanındı.

Santral makula kalınlığı bütün hastaların OKT horizontal kesitlerinde, fovea merkezinde vitreomaküler yüzey ve retina pigment epiteli arasındaki mesafenin ölçümü ile saptandı.

Operasyon öncesinde cerrahinin olası riskleri ve faydaları hakkında tüm hastalara ayrıntılı bilgi verildi ve Helsinki deklarasyonuna uygun olarak düzenlenmiş, aydınlatılmış onam formları imzalatıldı.

Cerrahi endikasyon DEİGK düzeyleri Snellene göre 0,6 ve daha az olduğunda, metamorfopsi varlığında, semptomlar progresyon gösterdiğinde tek cerrah tarafından PPV endikasyonu konuldu. 12 gözden 4 'üne kombine FAKO emülsifikasyonu ile katarakt ekstraksiyonu+İOL implantasyonunu takiben PPV yapıldı. 8 gözde yalnızca PPV uygulandı.

Tüm gözlere standart pars plana vitrektomi uygulandı.Cerrahi işlem başlamadan önce proteom analizi için vitreus örneği alındı.Çalışma grubundan alınan vitreus örneklerinde lense ait herhangi bir protein içeriğinin de olabileceği düşünülerek kontrol grubu sağlıklı katarakt cerrahisi geçirecek olan hastalarda arka kapsül açılması olan hastalardan seçildi ve bu hasta grubundan vitreus örneği alınarak lense ait olabilecek proteinlerin dışlanması hedeflendi.

12 hastanın 12 gözü de kontrol grubunu oluşturmaktaydı. Kontrol grubuna herhangi bir sistemik ve retinal hastalığı olmayan sağlıklı grup hastalar alındı. Katarakt cerrahisi sırasında arka kapsülü açılan hastalardan vitreus örneği alındı. Kontrol grubuna dahil edilmeme kriterleri, üveit atağı geçirme bulgusu, glokom, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, retinal arter ya da ven oklüzyonu, hipertansif retinopati, diyabet tanısı ve daha önce vitreoretinal cerrahi geçirmiş olan hastalar kontrol grubuna alınmadı.

3.1 Örnek Alınma Biçimi ve Cerrahi Teknik:

Tüm müdahaleler ameliyathane koşullarında yapıldı. Kontrol gruplarında peribulber anesteziden sonra göz kapakları ve çevresi %10' luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Katarakt cerrahisine başladıktan sonra işlem esnasında komplikasyon sonucunda arka kapsülü açılan hastalardan transkonjuktival 23 gauge sklerotomi açılarak, okütomun aspirasyon ucuna enjektör takılmış bir vaziyette vitreus örneği(yaklaşık 0,5-0,6 mL) alındı. Bu işlemlerin hiç birinde ön kamara koruyucu ve infüzyon kullanılmadı. Ardından rutin cerrahi prosedüre devam edildi

Çalışma gruplarında 4cc(lidokain+bupivakain karışımı) retrobulber anesteziden sonra göz kapakları ve çevresi %10' luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Steril kapak ekartörü yerleştirildikten sonra rutin PPV girişleri olan klasik üç port pars plana vitrektomi (12 gözde) ile aynı cerrah tarafından yapıldı.İnfüzyon ve ön kamara koruyucu kullanılmadan önce okütomun aspirasyon ucuna enjektör takılmış bir vaziyette vitreus örneği(yaklaşık 0,5 mL) alındı ve ardından infüzyon açılıp basınç ayarlaması yapıp hipotoniye izin verilmedi. ERM soyulmasının ardından retinal yüzeyde ikincil bir membran yapısı görülen ve ILM kırışıklığı bulunan olgularda ILM soyulması uygulandı. ILM ve ERM soyulmasında

cerrahi boya olarak tripan mavisi, indosiyenin yeşili, triamsinolon asetonid kullanıldı. Peroperatif, hava, SF6 , C3F8 gazları tamponad olarak tercih edildi, hiçbir vakada silikon yağı kullanılmadı.

Alınmış örnekler steril ependorf tüplerine yerleştirildikten sonra, -80 derecelik sıvı azot tankında dondurulup, -80 derecede buzdolabında bekletildi. Örnekler hep aynı cerrah tarafından alındı. Hiçbir operasyonda komplikasyon gelişmedi.



Resim 29: Soldan sağa; infüzyon setinin ve cerrahi giriş yerlerinin trokarlar yardımıyla transkonjunktival yerleşimi (KOUGH operasyon görüntülerinden alınmıştır.).

3.2 PROTEOMİKS DEĞERLENDİRMESİ

3.2.1 Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması

Vitröz sıvısı ve retina örneklerinden protein özütleri DIGE tamponu (7 M Urea, 2 M Thiourea, 30 mM Tris, and 5 mM Mg(CH₃COO)₂, pH 9) içerisinde hazırlandı. Örneklerin homojenizasyonu sırasında protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitör karışımı eklendi. Homojenize edilen örneklerden proteinleri içeren sıvı kısmı elde edebilmek için örnekler önce +4°C'de 10.000xg'de 10 dk santrifüj edildi, oluşan sıvı üst faz temiz yeni tüpe alınarak örnekler tekrar 4°C'de 20,000xg'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda iyice temizlenen protein içeren supernatant dikkatlice pipet yardımıyla alınarak Lo Binding tüpler içerisine aktarıldı.

3.2.2 Protein Konsantrasyonunun Tayini

Örnekler kullanılmak üzere -80°C 'de saklama öncesi protein konsantrasyonlarının ölçülmesi gerekmektedir. Protein konsantrasyonları hazırlanan standartlar ve gerekli örnek dilüsyonları kullanılarak Bradford metodu ile belirlendi ve tüpler üzerine konsantrasyonlar yazılarak örnekler hızlı dondurma sonrası -80°C 'de saklandı.

3.2.3 Protein Örneklerinin Odaklanmaları ve 2D Jel Elektroferezleri

Protein örneklerine ilk aşamada IPG stripler üzerine geçebilmeleri için striplerle birlikte rehidrasyona tabi tutuldu. İzoelektrik odaklamada öncül denemeler için 7cm'lik IPG stripler (pH 3-10 NL), analizler için ise 17 cm'lik IPG stripleri (pH 5-8 NL).). Bu aşamada 7cm IPG stripler için 100 μg , 17cm IPG stripler için ise 750 μg protein örneği kullanıldı. Gerekli miktardaki protein örneği 2D rehidrasyon tamponu ile karıştırılıp içerisinde stripin pH'sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklendi. Bu aşamadan sonra protein örnekleri fokuslama trayleri içerisine konuldu ve örneklerin üzerlerine uygun IPG stripler dikkatli bir şekilde yerleştirilerek 50 μA /IPG Strip akım uygulanacak şekilde PROTEAN IEF (BioRad) içerisinde aktif rehidrasyona tutuldu (20°C). Aktif rehidrasyon sırasında 1. saatin sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerilerine 2-3 ml mineral yağı ilave edildi ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edildi.

Rehidrasyon işleminden sonra IPG striplerin izoelektrik odaklamasına geçildi. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kağıdı ve su yardımı ile temizlendi, ardından temiz bir fokuslama trayi içerisine konularak üzerlerine yeni mineral yağ eklendi. Trayler daha sonra yine PROTEAN IEF (BioRad) içerisine konularak adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C 'de fokuslandı (7cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 4000V 2 saat Linear, S3: 4000volt, 10000 V-saat, Rapid, toplam 5 saat 14000 V-saat. 11cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 8000V 2.5 saat Linear, S3: 8000volt, 20000 V-saat, Rapid, toplam 5.3 saat ~30000 V-saat. 17cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 10000V 2.5 saat Linear, S3: 10000volt, 40000 V-saat, Rapid, toplam 7 saat ~50000 V-saat.). Fokuslama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde sıralanırlar.

Fokuslama sonrasında stripler tampon I (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk'lık sürelerle yıkandı. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan veya precast olarak alınan poliakrilamid jellere (12% veya değişik konsantrasyonlarda) yerleştirilerek elektroforez (7 cm'lik stripler için Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) kullanılarak ve 17 cm'lik stripler için Dodeca Cell (Bio-Rad) kullanılarak 35mA 30 dk, 48mA 5 saat 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta (2D) ayırma tabii tutuldu [Laemmli vd. 1970]. İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılacak jeller için jel jel farklılığını ortadan kaldırmak amacıyla çoklu örnek çalışmalarında 17'cm'lik stripler için DODECA (BioRad) jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemi kullanıldı.

Elektroforez sonrasında jeller 40% metanol, 10% asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edildi ve ardından laboratuvarımızda üretilen Murafast colloidal Coomassie mavisi boyası içerisinde gece boyu boyandı. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad) ile yapıldıktan sonra jellerin analizleri PDQuest Advanced programı ile yapılarak istatistiki olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad) ile yapıldı.

3.2.4 In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18

Protein spotlarından peptidlerin elde edilebilmesi için proteinlerin jel içerisinde peptidlerine ayrılması ve ardından jelden izole edilmeleri gerekmektedir. Bu işlem için spot örnekleri %50 asetronitril (ACN) ve %50 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde destain edilerek çalkalamalı vorteks üzerinde yıkanır. Yıkama sonunda örnekler 25mM amonyum bikarbonat içerisinde 10% TCEP olacak şekilde 60°C'de 10 dk disülfid bağlarının kırılması sağlanacak reducing edilir. Ardından son konsantrasyonu 100 mM iyodaasetamit (IAA) olan 25mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistin yan zincirlerinden metillenecektir (Alkylation). Bu işlem sonunda %100'lük ACN içerisine alınan spotlar, ACN uzaklaştırıldıktan sonra son konsantrasyonu 10ng/µl olan tripsin ile 30°C'de gece boyu kesime alınır. Örneklerin Zip-Tip'leri uçların önce ACN ve 0,1% triflorik asit ile dengelenmesi ile başlar. Her örnek 25-30 defa pipetlendikten sonra MALDI matriks ile MALDI plate üzerine elüsyonu yapılır.

3.2.5 MALDI TOF-TOF Analizi

Zip-tip sonrası MALDI plate yerleştirilen örneklerin AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analizleri yapıldı. MALDI-TOF-TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içerisinde ayırdırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olur. Cihazdan elde edilen veriler online MASCOT data bankasından Protein Pilot programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlenir.

MALDI kalibrasyonu eksternal veya internal kalibrant kullanılarak yapılacak, her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanılacaktır.

Elde edilen tüm spektralar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksede modifikasyon olarak carbamidomethyl (cysteine), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlenerek MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

3.2.6 Biyoinformatik Analizler

Tanımlanan proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücreyel yolları belirlemek için ise Panther ve String programları kullanıldı. Bu programların her ikisi de internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilen programlar olup <http://www.pantherdb.org/> ve <https://string-db.org/> web adreslerinden ulaşılabilir.

4.BULGULAR

4.1 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

SPSS Versiyon 21 ,Kruskal Wallis testi ,Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Sayısal veriler, % 95'lik güven aralığında bulundu. Tüm istatistiksel analizlerde “p” değerinin < 0,05 olması anlamlı kabul edildi

4.1 .1 Demografik Özellikler:

Çalışmaya 24 hastanın 24 gözü dahil edildi. Kontrol ve hasta grubunun her birinde 12 hastanın 12 gözü vardı.Hastaların 9 ü erkek 3'si kadındı. Yaşları 24-69 arasında değişen hasta grubunda ortalama yaş $56 \pm 5,0$ idi. Gözlerden 7'i sağ, 5'i sol ERM tanısıyla opere edildi .Kontrol grubunda ise hastaların 7 ' si erkek 5 'i kadındı.Kontrol grubunda opere olan gözlerden 9 'u sağ 3'ü sol katarakt tanısı ile opere edildi.Kontrol grubunun yaşları 59-76 arasında değişmekte olup ortalama yaş $67 \pm 4,0$ idi.

4.1.2 Preoperatif Muayene Bulguları:

- Preoperatif düzeltilmiş en iyi görme keskinliği (DEİGK) opere gözlerde ortalama $0,37 \pm 0,230$ idi.
- Gözlerin 5'i psödo fak, 3' ü nükleer skleroz,4 ' ünde nükleokortikal katarakt vardı.
- Olguların ortalama göz içi basınçları (GIB) aplanasyon ile $15,78 \pm 2,11$ mmHg bulundu.
- Hasta grubunda ortalama OKT kalınlığı $430 \mu\text{m} \pm 24 \mu\text{m}$ olarak bulundu.

Protein konsantrasyonunun çok düşük olması nedeniyle ölçüm yapılamadığından yüksek hacimde örneğin çöktürülmesi ve çökeltinin DIGE tamponu içinde tekrar çözülmesi sağlanarak konsantrasyonun artırılması ve örneğin temzilenmesi sağlandı. Çöktürülmüş ve çöktürülmemiş örneklerden bir boyutlu (1D) jel elektroforezi yapılarak örnek kalitesi ve miktarı kontrol edildi (**Şekil1**) Şekilde görüldüğü gibi çöktürme sonrasında protein konsantrasyonunun arttığı gözlemlendi.

**Çöktürülmüş
vitreus sıvısı**

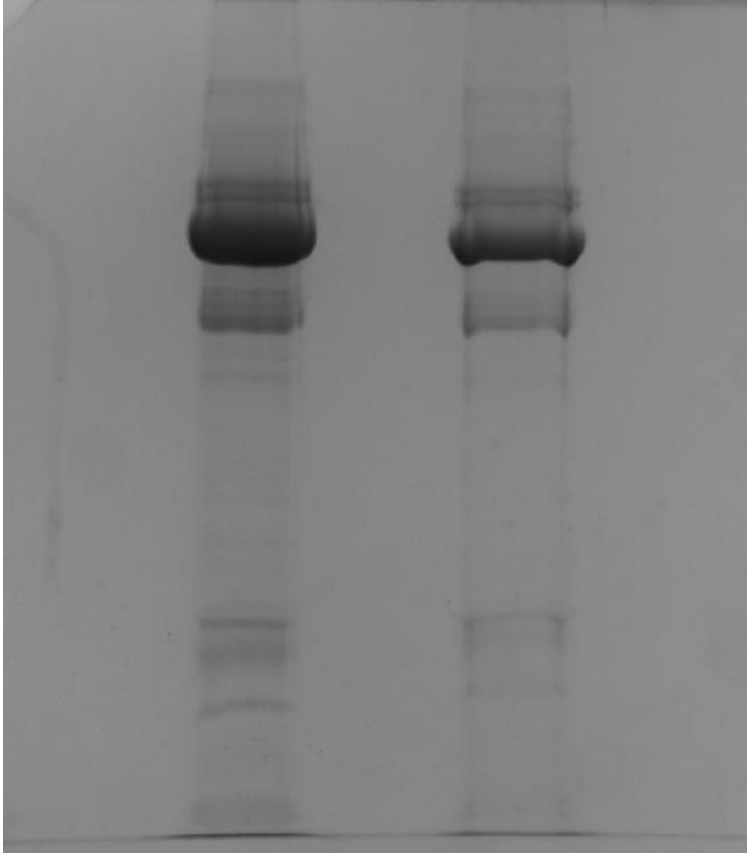
K2

2 µl (18,6 µg/µl)

**Gelen
vitreus sıvısı**

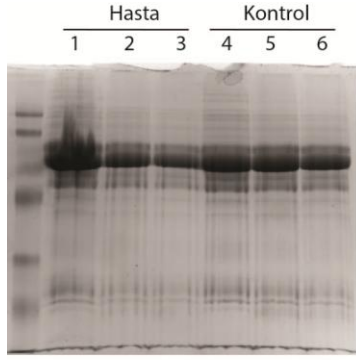
K2

20 µl



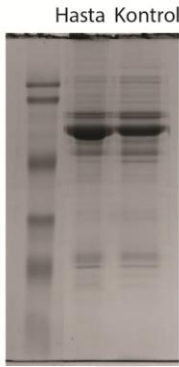
Sonuçlar Şekil 1. Kontrol grubuna ait K2 vitreus örneğinin çöktürme sonrası ve öncesi bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü

Çöktürülmüş örneğin örnek kalitesinin ve protein miktarının daha iyi olması nedeniyle tüm örneklerin bu şekilde hazırlanmasına karar verildi. Yapılan Bradford ölçümleri sonucunda özellikle hasta grubuna ait örneklerin hacimlerinin ve protein konsantrasyonlarının çok düşük olduğu görüldü (Şekil 2).



*Örnekler TCA/Aseton çöktürme ile temizlendi

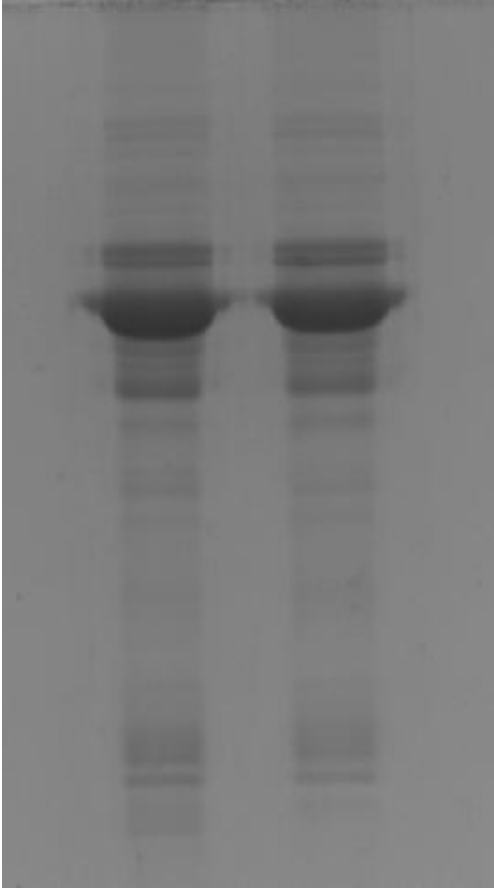
*Örnekler Hasta ve Kontrol olmak üzere iki ayrı havuzda toplandı



Sonuçlar Şekil 2.

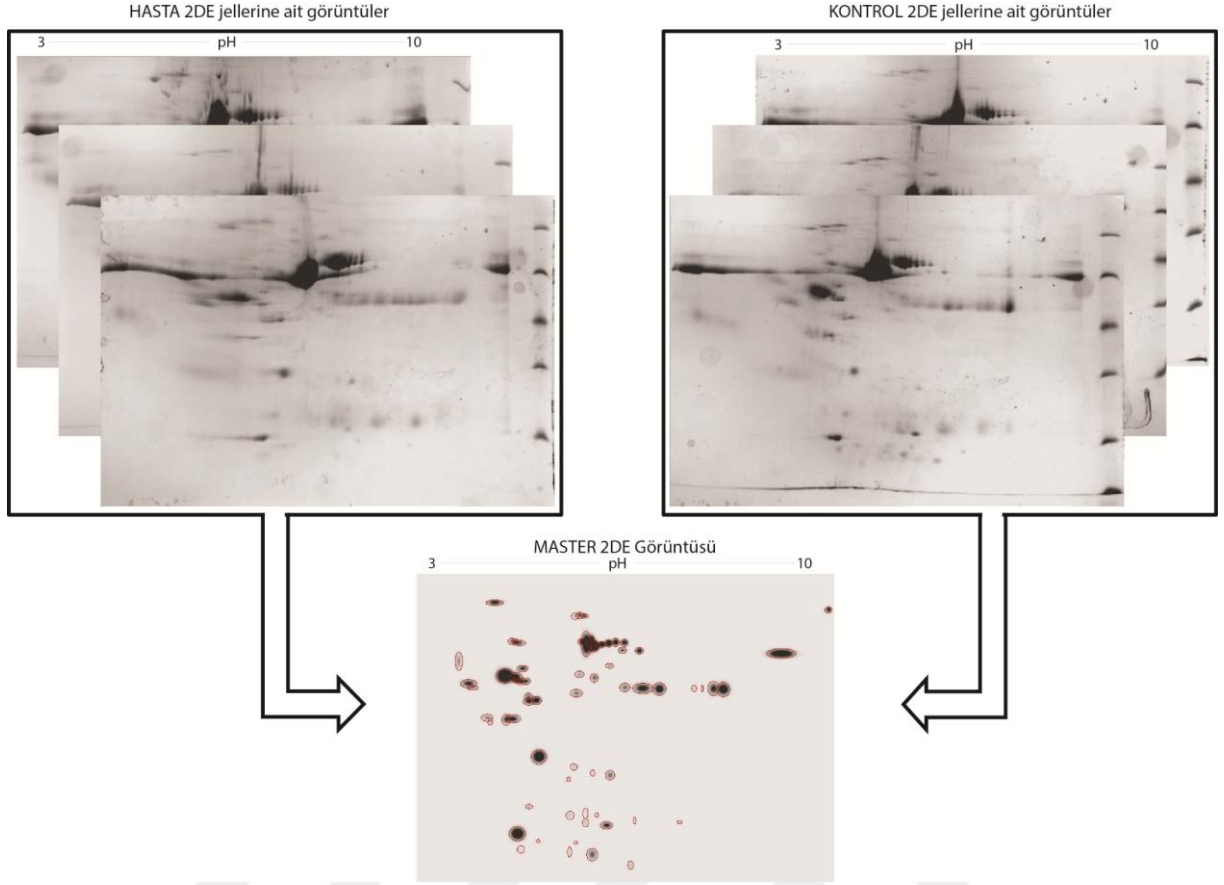
Yapılan 1D-jel elektroforezi çalışmalarında hem hasta hem de kontrol grubunun örnek miktarları ve konsantrasyonlarının çok düşük olması nedeniyle, iki boyutlu (2D) jel elektroforezi çalışmalarında kullanılacak protein havuzlarının örnek konsantrasyonuna göre değil hacime göre oluşturulmasına karar verildi. Örnek havuzları oluşturulurken hacimce en az olan örnek baz alınarak oluşturuldu. Bradford yöntemiyle protein havuzlarının konsantrasyonu ölçüldükten sonra 1D-jel elektroforezi yapılarak ölçümümüz onaylandı (**Şekil 3**). Deney sonucunda oluşturulan hasta ve kontrol grubu protein havuzlarının eşit miktarda protein içerdiği görüldü. Yapılan bu öncül analiz, örneklerin karşılaştırmalı 2D-jel çalışmalarına uygun olduğunu ve elde edilecek bilgilerin güvenilir olacağını gösterdi. Toplamda yaklaşık olarak 3000 µg protein içeren havuzlar çalışmanın sonuna kadar kullanılacak şekilde parçalar ayrıldı ve -80°C'de saklandı.

Kontrol Hasta
Havuz Havuz

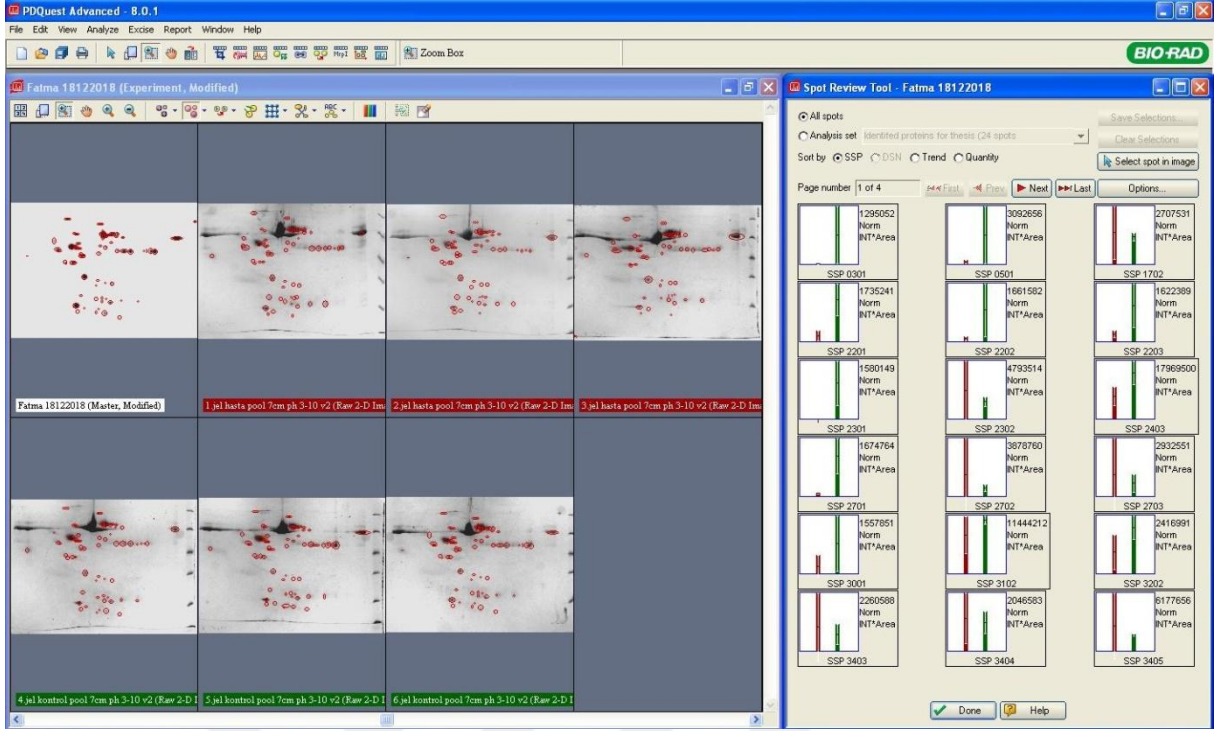


Sonuçlar Şekil 3. Kontrol ve hasta havuzu örneklerinin bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü. Her kuyucuğa 10 µg protein yüklenmiştir

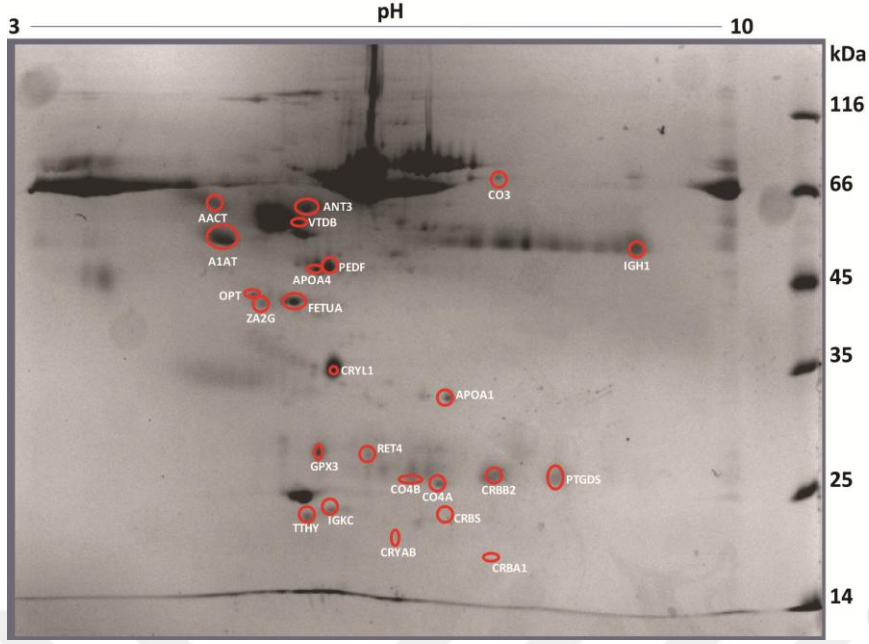
Yapılan analizler jeller üzerinde ortalama 148 adet protein spotunun bulunduğunu gösterdi (Şekil 6). Jeller arası eşleşme oranının %98 olduğu görüldü. Kontrol grubu içinde yapılan analizde varyasyon katsayısının 25.67, ERM grubu içerisinde ise 22.65 olduğu bulundu. Bu rakam jellerin protein profillerinin genel manada birbirine çok benzer olduğuna işaret etmektedir



Sonuçlar Şekil 4. 2D jel görüntüsü: pH3-10 aralığında protein dağılımını ve sayısını belirlemek amacıyla yapılmış 7cm'lik 2D jel görüntüsü. (M: Unstained Protein Molecular Weight Marker, ThermoScientific, CatNo26610)



Şekil 5. 11 cm'lik geniş jellerde ve pH 3-10 aralığında çalışılmış jellerin PDQuest Advance yazılımı ile analizi



Şekil 6. Her bir grup için elde edilen 2D jel görüntüleri ve regülasyon görülen ve kesilip tanımlanan proteinlerin jel üzerindeki pozisyonları

Jellerin görsel analizi örneklerin protein aralığının hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıkta proteinler içerdiğini gösterdi. Bazı protein spotları diğer spotlara göre baskın bir görüntü verdi ve bu spotların daha büyük moleküler ağırlıklı proteinlerden oluştuğu görüldü. Ancak bu protein spotlarının jel üzerindeki dağılımları homojen olmadığı için

bu spotlar arasındaki karşılaştırma sağlıklı sonuçlar vermedi ve bu nedenle bu spotlar tanımlanmadı. Yapılan analizde jel üzerindeki diğer spotların regülasyon oranlarının sağlıklı bir şekilde hesaplanabileceği görüldü ve karşılaştırmalı analizler bu spotlar ile yapıldı. Toplamda 24 protein spotunda en az 2 kat regülasyon olduğu görüldü. Bazı proteinler seçici olarak sadece kontrol grubunda gözlemlendi. Bu spotlar, tanımlanmak amacı ile jellerden otomatik spot cutter cihazı ile kesildi ve jel-içi tripsin ile kesilerek peptidlerine ayrıldı. Ayrılan peptidlerin kütle/yük (m/z) oranları MALDI-TOF/TOF cihazı ile belirlendi (Şekil 7). Belirlenen m/z oranları MASCOT yazılımı aracılığı ile protein tanımlamada kullanıldı. Tanımlanan protein listesi tablo 1’de verilmiştir.

TABLO X: MALDI SONUÇLARI

Spot	SSP	AC no.	Protein Kayıt	Kütle (Da)	Skor	Beklenti	Eşleşme	pI	Dizi örtüşmesi (%)	Protein Tanımı	Gözlenen	Hesaplanan	İyon	Peptit
A6	2302	P0100 9	A1AT_HUM AN	46707	137	4,00E-10	20	5,3 7	40	Alpha-1-antitrypsin	1078.5055	1077.5203	27	K.FLENEDRR.S
A2	4502	P0100 8	ANT3_HUM AN	52569	340	2e-030	41	6,3 2	43	Antithrombin-III	1211.6349	1210.6346	6	R.FRIEDGFSLK.E
											1340.6526	1339.6561	66	K.TSDQIHFFFAK.L
											1674.8522	1673.8373	48	K.LQPLDFKENAEQSR.A
											1874.8826	1873.8653	7	K.ATEDEGSEQKIPEATNR.R
A12	5202	Q9Y2 S2	CRYL1_HUM AN	35396	58	0,036	12	5,8 1	37	Lambda-crystallin homolog				
A4	3405	P0277 4	VTDB_HUM AN	52929	303	1e-026	29	5,4 3	40	Vitamin D-binding protein	1275.6118	1274.5601	71	R.VCSQYAAAYGEK.K + Carbamidomethyl (C)
											1326.7506	1325.7456	8	R.RTHLPEVFLSK.V
											2092.8245	2091.8184	64	K.SLGECCDVEDSTTCFNAK. G + 3 Carbamidomethyl (C)
											2264.9507	2263.9297	17	K.SCESNSPFPVHPGTAECCT K.E + 3 Carbamidomethyl (C)
											2518.0371	2517.0094	29	K.EVVSLTEACCAEGADPDC YDTR.T + 3 Carbamidomethyl (C)
C9	3202	P0276 5	FETUA_HUM AN	39300	95	7e-006	16	5,4 3	19	Alpha-2-HS-glycoprotein	802.3369	801.3480	29	K.QYGFCK.A + Carbamidomethyl (C)
											813.4314	812.4432	29	K.FSVVYAK.C

A8	5203	P3695 5	PEDF_HUMA N	46313	521	1.6e- 048	33	5,9 7	42	Pigment epithelium- derived factor	855.4614	854.4610	10	R.TESIIHR.A
											977.5212	976.5229	63	K.SSFVAPLEK.S
											1157.5018	1156.5070	42	R.YGLSDLCK.I Carbamidomethyl (C) +
											1383.6732	1382.6718	57	K.LQSLFDSPDFSK.I
											1516.6899	1515.6729	35	K.TSLEDGYLDEER.T
											1559.7987	1558.7780	33	K.LAAAVSNFGYDLYR.V
											1644.7882	1643.7679	107	R.KTSLEDGYLDEER.T
A11	8602	P0102 4	CO3_HUMA N	187030	147	4e-011	39	6,0 2	12	Complement C3	1139.5088	1138.5335	29	K.FYYIYNEK.G
											1985.9661	1984.9636	18	K.SGQSEDRQVPGQMTLK .I
A12	3001	P0276 6	TTHY_HUM AN	15877	207	4e-017	11	5,5 2	57	Transthyretin	1394.6080	1393.6150	83	K.AADDTWEPFASGK.T
											1522.7061	1521.7100	74	R.KAADDTWEPFASGK.T
B9	6001	P0C0L 5	CO4B_HUM AN	192673	296	5.1e- 026	38	6,7 3	9	Complement C4-B	969.4869	968.4967	59	R.VEYGFQVK.V
											976.4300	975.4273	29	K.FACYYPR.V Carbamidomethyl (C) +
											1052.4574	1051.4570	29	R.GLQDEDGYR.M
											1086.6097	1085.6233	45	K.ITQVLHFTK.D
											1115.4976	1114.5117	33	R.CSVFYGAPSK.S Carbamidomethyl (C) +
											1909.8595	1908.8743	57	R.LLATLCSAEVCQCAEGK.C

														+ 3 Carbamidomethyl (C)
B10	7103	P0C0L 4	CO4A_HUM AN	192650	296	5.1e- 026	38	6,6 5	9	Complement	969.4869	968.4967	59	R.VEYGFQVK.V
											976.4300	975.4273	29	K.FACYYPV.V Carbamidomethyl (C) +
											1052.4574	1051.4570	29	R.GLQDEDGYR.M
											1086.6097	1085.6233	45	K.ITQVLHFTK.D
											1115.4976	1114.5117	33	R.CSVFYGAPSK.S Carbamidomethyl (C) +
											1909.8595	1908.8743	57	R.LLATLCSAEVCQCAEGK.C + 3 Carbamidomethyl (C)
C7	8102	P4122 2	PTGDS_HUM AN	21015	80	0,00022	19	7,6 6	36	Prostaglandin-H2 D- isomerase				
B5	7102	P0264 7	APOA1_HUM AN	30759	465	6.4e- 043	34	5,5 6	65	Apolipoprotein A-I	1283.5745	1282.5652	19	K.WQEEMELYR.Q
											1301.6411	1300.6411	30	R.THLAPYSDEL.R.Q
											1318.6263	1317.6347	20	K.LSPLGEEMRDR.A Oxidation (M) +
											1380.7007	1379.7085	58	K.VQPYLDDFQKK.W
											1467.7877	1466.7841	6	K.VEPLRAELQEGAR.Q
											1723.9513	1722.9376	46	R.QKVEPLRAELQEGAR.Q
											1815.8594	1814.8435	81	K.DSGRDYVSQFEGSALGK. Q
C2	6102	P0275 3	RET4_HUMA N	22995	100	2,30E- 06	16	5,7 6	46	Retinol-binding protein 4	1106.5879	1105.5880	12	R.VKENFDKAR.F

											1161.5194	1160.5325	(5)	R.FSGTWYAMAK.K
											1177.5178	1176.5274	29	R.FSGTWYAMAK.K + Oxidation (M)
											2693.1497	2692.1136	3	K.GNDDHWIVDTDYDTYAV QYSCR.L + Carbamidomethyl (C)
B11	8101	P4332 0	CRBB2_HUM AN	23365	403	1e-036	35	6,5	64	Beta-crystallin B2	1024.4340	1023.4410	14	R.WDSWTSSR.R
											1285.6027	1284.6146	23	R.IRDMQWHQR.G + Oxidation (M)
											1408.7230	1407.7398	63	K.IILYENPNFTGK.K
											1760.8491	1759.8318	7	R.VQSGTWVGYQYPGYR.G
											2190.0349	2189.0138	44	K.GDYKDSSDFGAPHPQVQS VR.R
C5	5001	P0183 4	IGKC_HUMA N	11602	174	8,10E- 14	12	5,5 8	80	Ig kappa chain C region	869.3373	868.3497	11	K.SFNREGC.- + Carbamidomethyl (C)
											1875.9029	1874.9197	73	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S + Carbamidomethyl (C)
											1945.9893	1945.0197	30	-.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
B12	6001	P2291 4	CRBS_HUM AN	20993	231	1.6e- 019	27	6,4 4	56	Beta-crystallin S	891.3817	890.4069	8	R.WMGLNDR.L
											1156.5638	1155.6037	35	R.AVHLPSPGGQYK.I
											1517.7045	1516.7310	8	K.ITFYEDKNFQGR.R
											2097.7371	2096.7663	16	R.YDCDCDCADFHTYLSR.C + 3 Carbamidomethyl (C)

											2253.8342	2252.8674	16	R.RYDCDCDCADFHTYLSR. C + 3 Carbamidomethyl (C)
C6	6002	P0251 1	CRYAB_HU MAN	20146	298	3.2e- 026	29	6,7 6	73	Alpha-crystallin B chain	1088.4939	1087.5047	17	R.QDEHGFISR.E
											1213.6327	1212.6503	42	K.HFSPEELKVK.V
											1374.6979	1373.6993	8	R.RPFFPFHSPSR.L
											1822.0381	1821.0360	13	R.TIPITREEKPAVTAAPK.K
B6	4101	P2235 2	GPX3_HUMA N	25537	146	5.1e- 011	24	8,2 6	44	Glutathione peroxidase 3	818.4219	817.4374	19	K.FYTFLK.N
											1633.7434	1632.7413	32	K.NSCPPTSELLGTSDR.L + Carbamidomethyl (C)
C1	8001	P0581 3	CRBA1_HUM AN	25134	177	4e-014	29	5,8 1	58	Beta-crystallin A3	1611.8203	1610.8053	17	K.ITIYDQENFQGKR.M
C8	2202	P2531 1	ZA2G_HUM AN	33851	111	1.6e- 007	20	5,5 7	34	Zinc-alpha-2- glycoprotein				
A7	4303	P0672 7	APOA4_HUM AN	45371	255	6,40E- 22	34	5,2 8	47	Apolipoprotein A-IV	1104.5543	1103.5611	29	R.LEPYADQLR.T
C10	0501	P0101 1	AACT_HUM AN	47621	272	1,30E- 23	31	5,3 3	30	Alpha-1- antichymotrypsin	960.4997	959.5036	14	K.ADLSGITGAR.N
											1061.5648	1060.5804	19	R.EIGELYLPK.F
											1094.6095	1093.6244	53	R.NLAVSQVVHK.A
											1108.5392	1107.5461	11	R.WRDSLEFR.E
											1972.9100	1971.8897	26	K.AKWEMPFDPQDTHQSR.F
											1988.8954	1987.8847	(4)	K.AKWEMPFDPQDTHQSR.F + Oxidation (M)

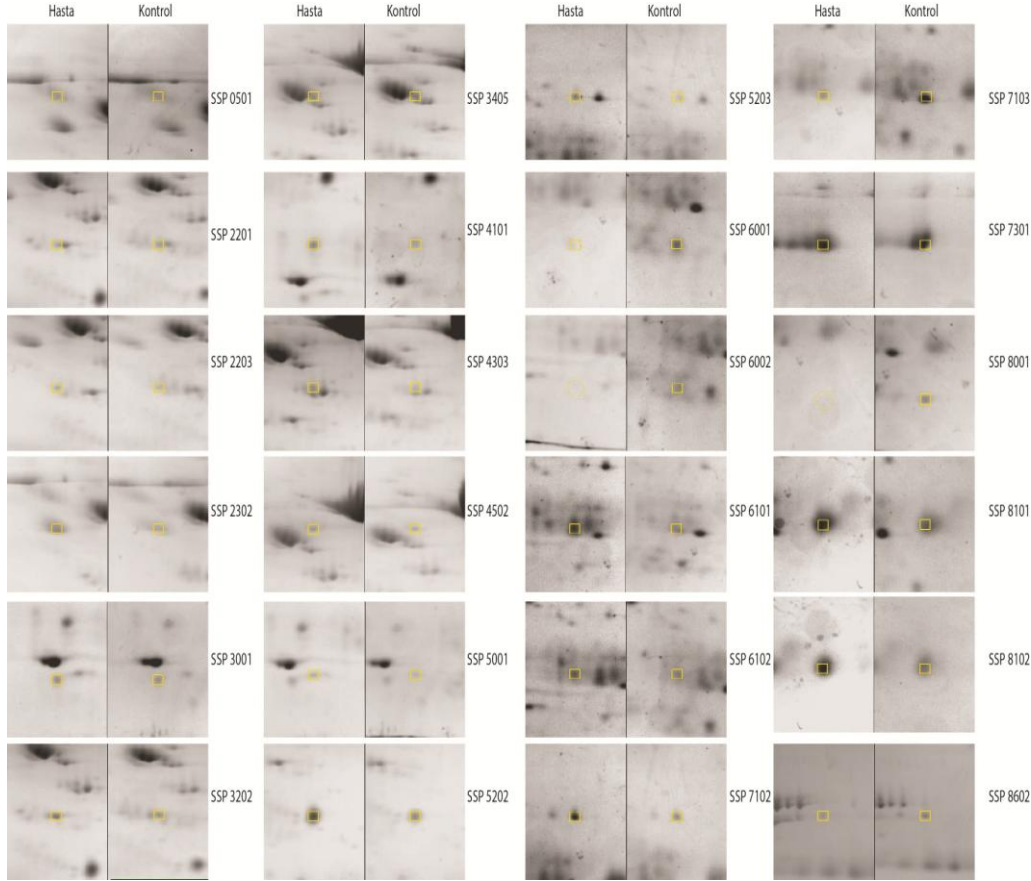
											2019.9648	2018.9585	1	R.LYGSEAFATDFQDSAAAK K.L
C8	2203	Q9UB M4	OPT_HUMA N	37237	61	0.017	16	5,3 9	23	Opticin				
C12	7301	P0185 7	IGHG1_HUM AN	36083	181	1,60E- 14	20	8,4 6	34	Ig gamma-1 chain C region	838.4763	837.4960	35	K.ALPAPIEK.T
											1186.6123	1185.6394	38	K.GPSVFPLAPSSK.S
											1286.6543	1285.6666	17	R.EPQVYTLPPSR.D
											1677.7789	1676.7947	10	K.FNWYVDGVEVHNAK.T

Tanımlanan 24 proteinin gruplar arasında nasıl bir regülasyona uğradığını daha net belirleyebilmek için, spotların yoğunlukları ölçülüp oranlamalar yapılmıştır (Tablo 2). Kontrol grubuna göre ERM grubunda Alpha-1-antitrypsin, Vitamin D-binding protein, Complement C3, Complement C4-B, Complement C4-A, Retinol-binding protein 4, Beta-crystallin B2, Ig kappa chain C region, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain, Alpha-1-antichymotrypsin, Opticin düzeylerinde azalma, Alpha-1-antitrypsin , Lambda-crystallin homolog , Alpha-2-HS-glycoprotein , Pigment epithelium-derived factor , Transthyretin , Prostaglandin-H2 D-isomerase , Apolipoprotein A-I , Glutathione peroxidase 3 , Beta-crystallin A3 , Zinc-alpha-2-glycoprotein , Apolipoprotein A-IV , Ig gamma-1 chain C region düzeyinde artma görüldü.

Elde edilen regülasyon oranlarının görsel olarak da gerçekliğini gösterebilmek için ilgili spotlar, jeller üzerinde bulunarak yakın-çekim resimleri alındı (**Şekil 8**). Yapılan görsel analiz sonucunda spotların yoğunluk ölçümlerinin doğru tayin edildiği ve elde edilen regülasyon oranlarının doğru ifade edildiği kanaatine varıldı.

SSP			Hasta	Kontrol	Hasta/Kontrol Regülasyon Oranı	Hasta grubundaki regülasyon trendi
2302	P01009	Alpha-1-antitrypsin	4793514	2898158	1,653986	↑
4502	P01008	Antithrombin-III	2603867	4608737	0,564985	↓
5202	Q9Y2S2	Lambda-crystallin homolog	11259050	9241240	1,218348	↑
3405	P02774	Vitamin D-binding protein	6177656	8880924	0,69561	↓
3202	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	3110668	2416991	1,287	↑
5203	P36955	Pigment epithelium- derived factor	1388091	725453,5	1,913412	↑
8602	P01024	Complement C3	2104162	4396859	0,47856	↓
3001	P02766	Transthyretin	1791222	1557851	1,149803	↑
6101	P0C0L5	Complement C4-B	37187,5	1998445	0,018608	↓
7103	P0C0L4	Complement C4-A	1923253	3647914	0,52722	↓
8102	P41222	Prostaglandin-H2 D- isomerase	4645085	2290174	2,028268	↑
7102	P02647	Apolipoprotein A-I	3487204	1598953	2,180929	↑
6102	P02753	Retinol-binding protein 4	15999,7	2254467	0,007097	↓
8101	P43320	Beta-crystallin B2	72691	1955063	0,037181	↓
5001	P01834	Ig kappa chain C region	364817,3	1846516	0,197571	↓
6001	P22914	Beta-crystallin S	17287,3	1961738	0,008812	↓
6002	P02511	Alpha-crystallin B chain	2456523	5232456	0,469478	↓
4101	P22352	Glutathione peroxidase 3	1435582	1193905	1,202425	↑
8001	P05813	Beta-crystallin A3	2249631	1092926	2,058355	↑
2202	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	341685,7	151582,3	2,254127	↑
4303	P06727	Apolipoprotein A-IV	5050541	1586950	3,182546	↑
501	P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	250399,8	3092656	0,080966	↓
2203	Q9UBM4	Opticin	328240,8	1622389	0,202319	↓
7301	P01857	Ig gamma-1 chain C region	956957	439126	2,179231	↑

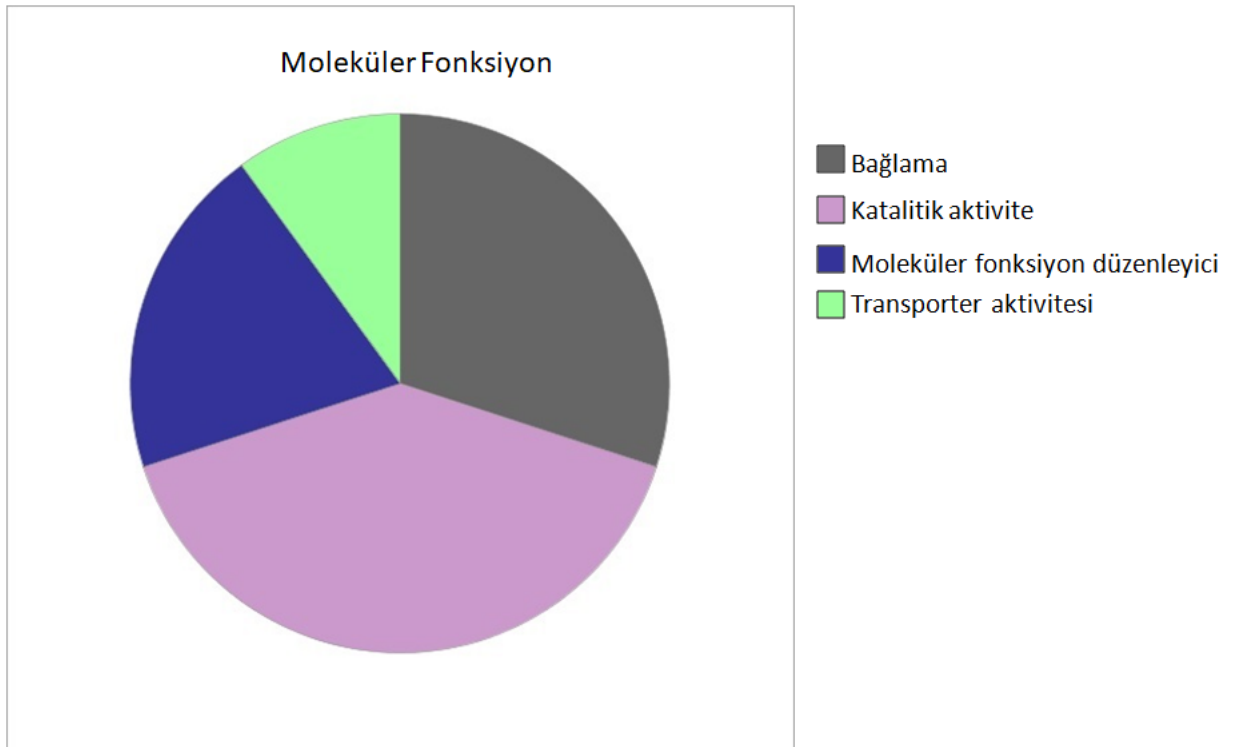
Tablo 1. Miktarlarında regülasyon görülen ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin gruplara göre hesaplanmış regülasyon oranları. Tabloda verilen yoğunluk değerleri Hasta ve Kontrol sütunları altında listelenmiştir. Kırmızı renkli ok up-regülasyonu, siyah renkli ok ise down-regülasyonu temsil etmektedir.



Şekil 8. Hasta ve kontrol grubunda protein spotlarının yakın-çekim resimleri

Yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 24 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edildi. ERM hastalarında kontrol grubuna göre 12 protein spotunun düzeyinde azalma olduğu görüldü. Bu proteinlerin fonksiyonel analizlerini yapabilmek için proteinler ile ilgili bilgiler PANTHER veri bankasında araştırıldı. Tanımlanan proteinlerin çoğunluğunu katalitik ve bağlanma aktivitesi gösteren proteinler olduğu, bir kısmının da transport aktivitesi gösteren proteinler olduğu görüldü (Şekil 10 ve Tablo 7). Aynı proteinler görev aldıkları biyolojik proseslere göre kategorize edildiğinde bu proteinlerin çeşitli biyolojik proseslerde rol oynadığı dikkati çekmektedir. Bu prosesler ağırlıklı olarak biyolojik regülasyon, hücrel komponentlerin organizasyonu ve biyogenezi, hücrel prosesler ve multisellular organizmal prosesler olmak üzere, çeşitli metabolik proseslerde, lokalizasyon ve stimulusa cevap

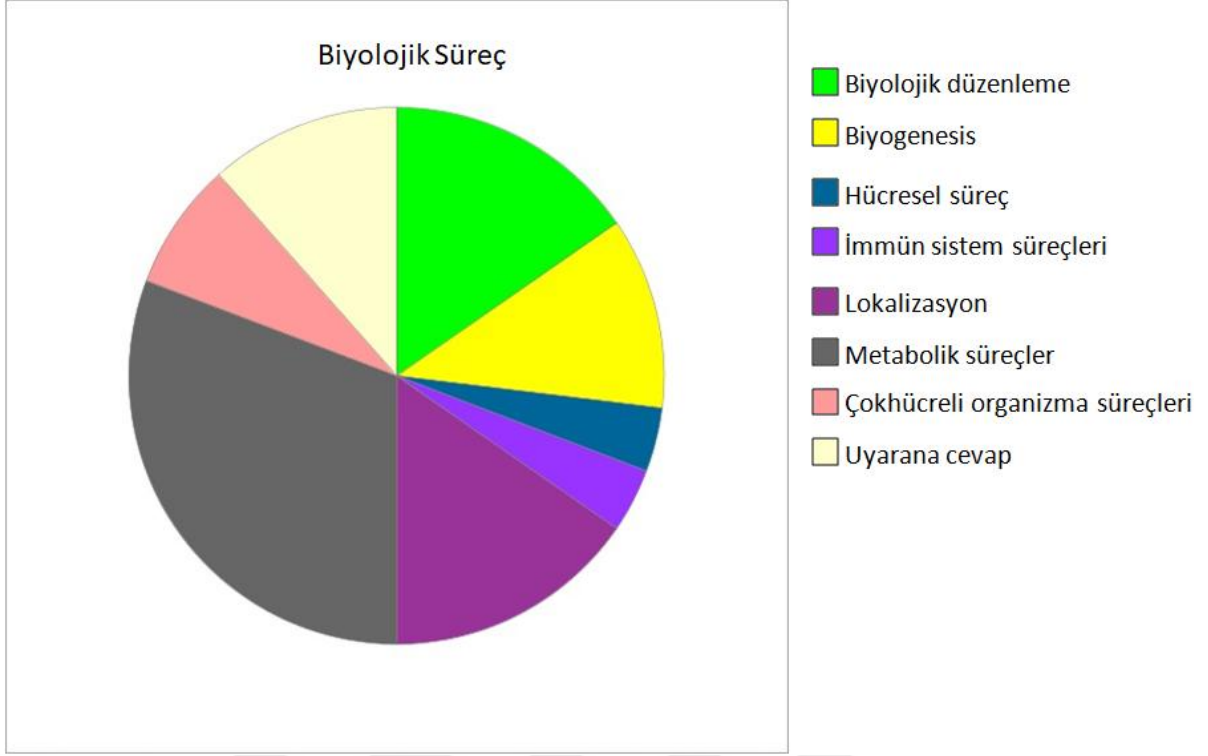
oluşturan proseslerin de olduğu görülmektedir (Şekil 11 ve Tablo 8). Bu hücrel proseslerde rol oynayan proteinler Apolipoprotein A-IV, Alfa-1antitripsin, İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related, Apolipoprotein A I , Alfa 2 HS Glikoprotein, Prostaglandin H2 D-İzomeraz olarak tanımlanmıştır. Bu tip proteinler, birçok metabolik olayda merkezi destek görevi gördüğü için “hub proteinler” olarak adlandırılır. Bu proteinlerin PANTHER analizleri up regüle ve down regüle olmasına göre ayrı ayrı gösterilmiştir.



Şekil 9. Up proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 7. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu moleküler fonksiyonlarına göre dağılım tablosu

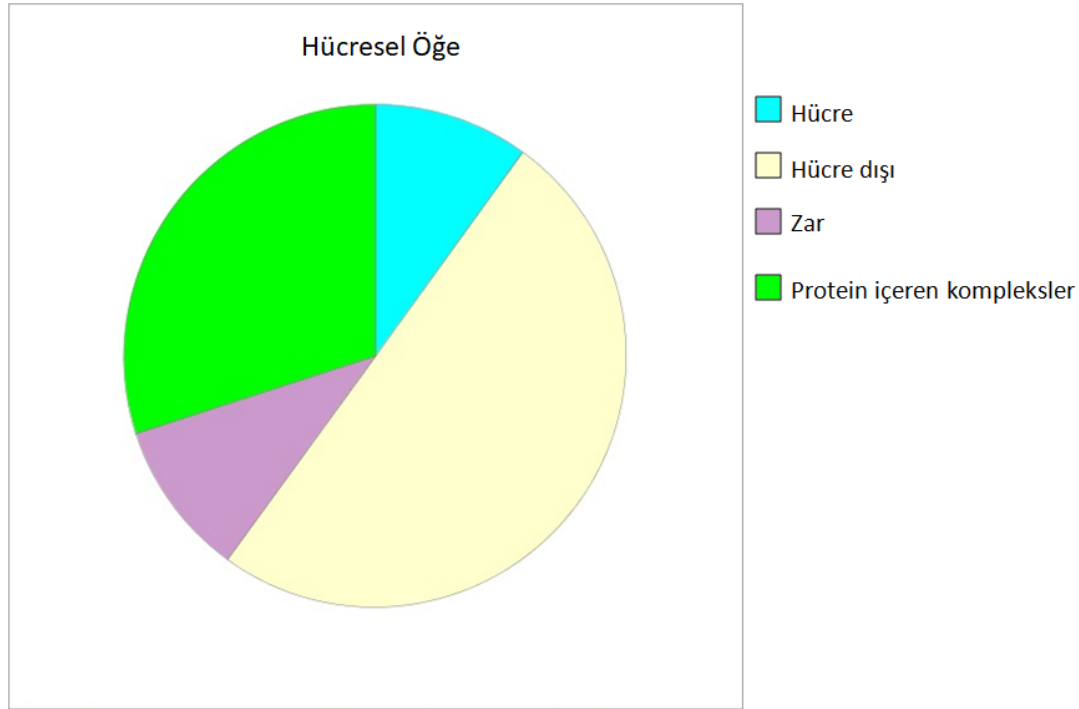
Moleküler Fonksiyon	İlişkili Proteinler
Bağlayıcı	Pigment epithelium-derived factor Apolipoprotein A- IV Alfa-1 antitripsin İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Apolipoprotein A I Glutasyon Peroksidaz 3
Katalitik aktivite	Pigment epithelium-derived factor Apolipoprotein A- IV Lambda kristalin homolog Alfa-1 antitripsin Alfa 2 HS Glikoprotein Prostaglandin H2 D-İzomeraz Apolipoprotein A I Glutasyon Peroksidaz 3
Moleküler fonksiyon regülatörü	Pigment epithelium-derived factor Apolipoprotein A- IV Alfa – 1 antitripsin Apolipoprotein A I
Transporter aktivitesi	Apolipoprotein A- IV Apolipoprotein A I



Şekil 10. Up proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 8. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu biyolojik proseslerine göre dağılım tablosu.

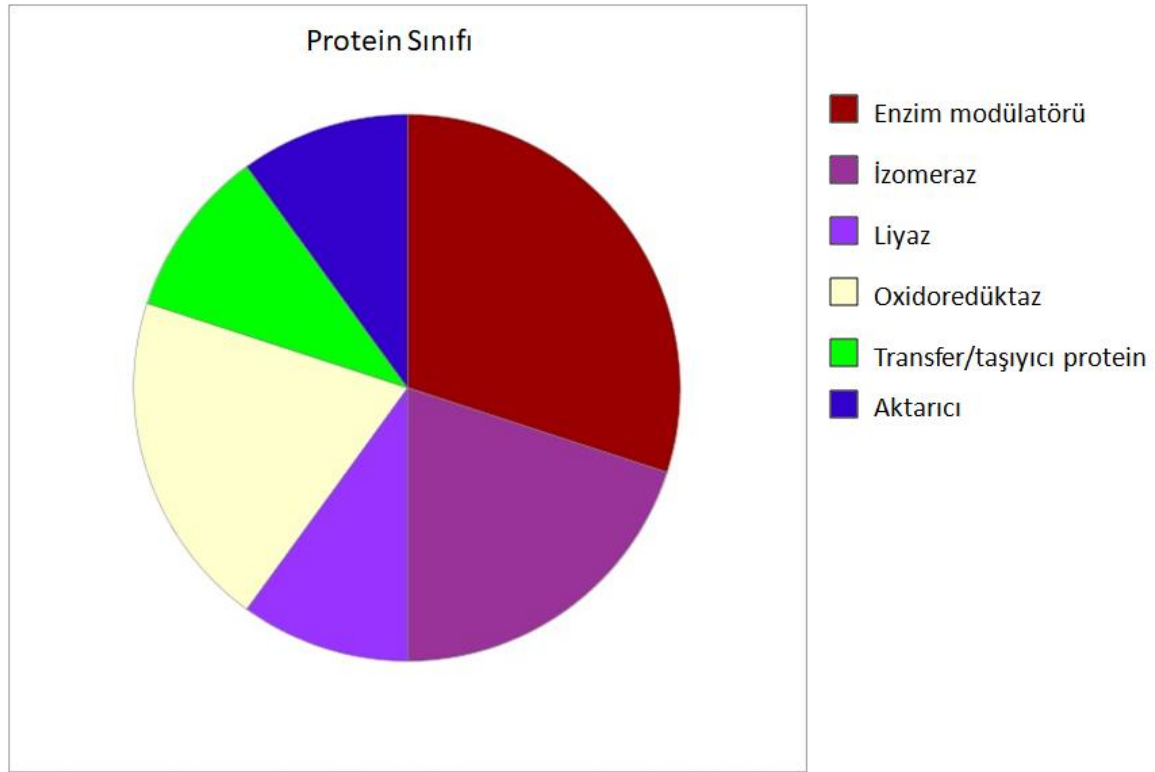
Biyolojik Süreç	İlişkili Protein
Biyolojik düzenleme	Apolipoprotein A- IV Alfa 2 HS Glikoprotein İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Apolipoprotein A I
Biyogenezis	Apolipoprotein A- IV İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Apolipoprotein A I
Hücreyel süreç	İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related
İmmun sistem süreçleri	İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related
Lokalizasyon	Apolipoprotein A- IV İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Prostaglandin H2 D-İzomeraz Apolipoprotein A I
Metabolik süreçler	Pigment epithelium-derived factor Apolipoprotein A- IV Lambda kristalin homolog Alfa-1 antitripsin Alfa 2 HS Glikoprotein İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Prostaglandin H2 D-İzomeraz Apolipoprotein A I
Çok hücreli organizma süreçleri	Apolipoprotein A- IV Apolipoprotein A I
Uyarana cevap	Zinc- Alfa-2- Glikoprotein İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Glutatyon Peroksidaz 3



Şekil 11. Up proteinlerin katıldığı hücresel prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 9. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel proseslerine göre dağılım tablosu.

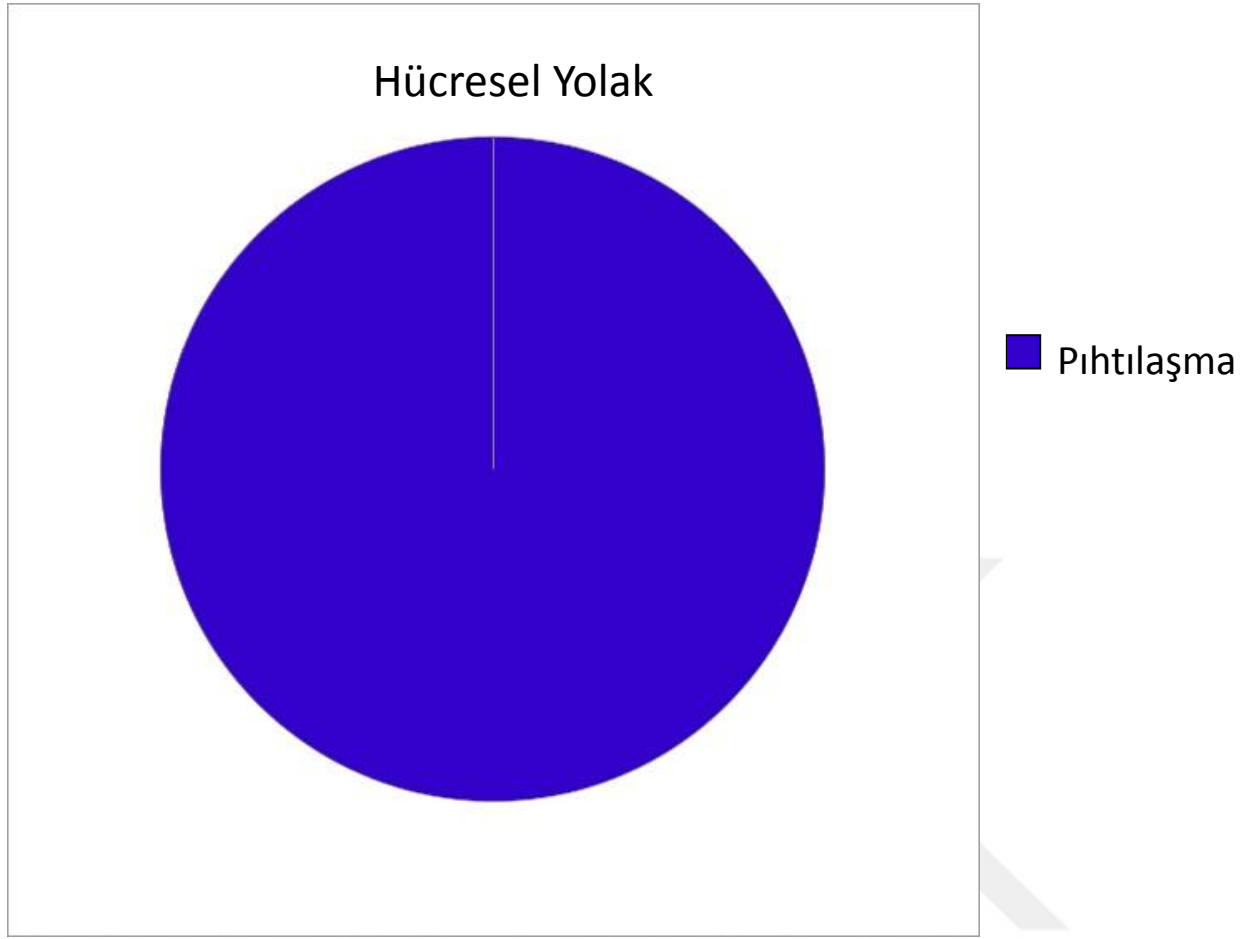
Hücresel Öğe	İlişkili Protein
Hücre	Zinc- Alfa-2- Glikoprotein
Hücre Dışı	Pigment epithelium-derived factor Apolipoprotein A- IV Alfa-1 antitripsin İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related Apolipoprotein A I
Zar	İmmunoglobulin heavy constant gamma 1-related



Şekil 12. Up proteinlerin katıldığı sınıflamaya ait prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 10. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu protein sınıflama proseslerine göre dağılım tablosu.

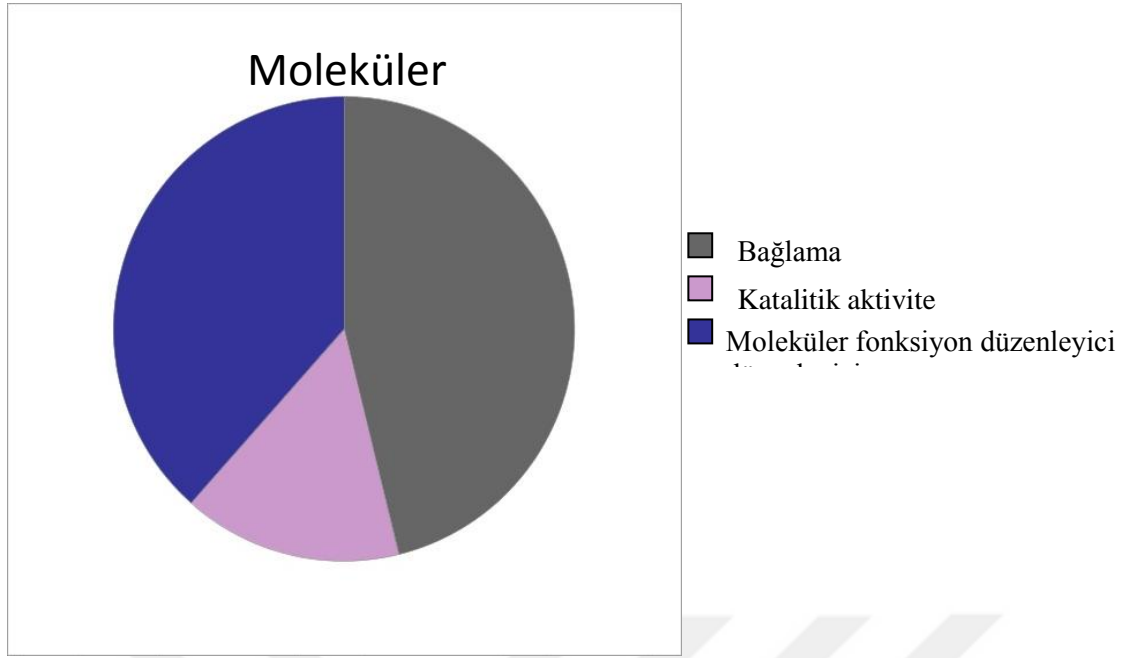
Protein Sınıfı	İlişkili Proteinler
Enzim modülatörü	Pigment epithelium-derived factor Alfa-1 antitripsin Alfa 2 HS Glikoprotein
İzomeraz	Lambda kristalin homolog Prostaglandin H2 D-İzomeraz
Liyaz	Lambda kristalin homolog
Oxidoredüktaz	Lambda kristalin homolog Glutasyon Peroksidaz 3
Transfer/ taşıyıcı protein	Transtiretin
Aktarıcı	Transtiretin



Şekil 13. Up proteinlerin hücresel yolak prosesleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 11. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel yolak'a göre dağılım tablosu

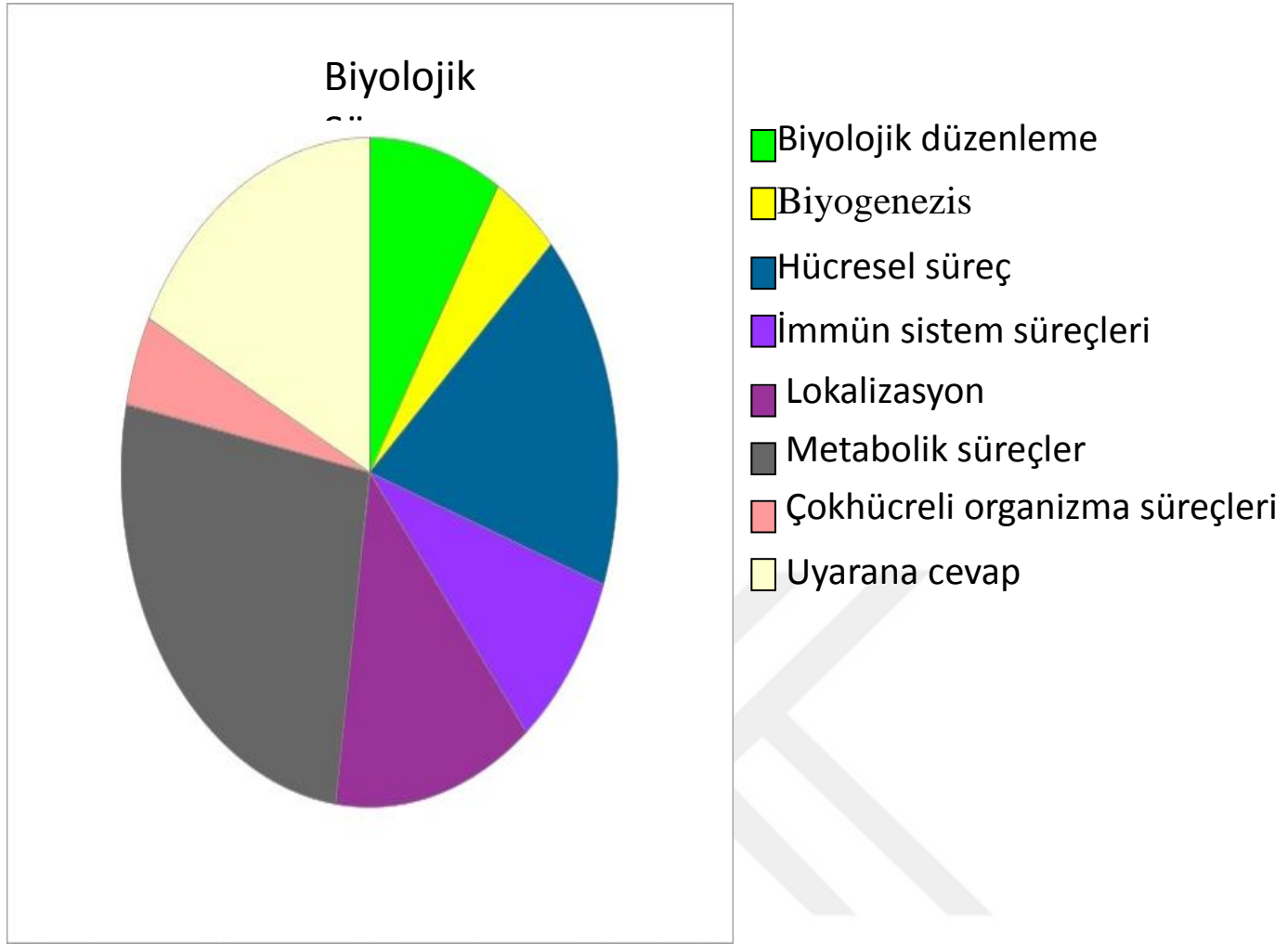
Hücresel Yolak	İlişkili Protein
Pıhtılaşma	Alfa-1 antitripsin



Şekil 14. Down proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 13. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu moleküler fonksiyonlarına göre dağılım tablosu

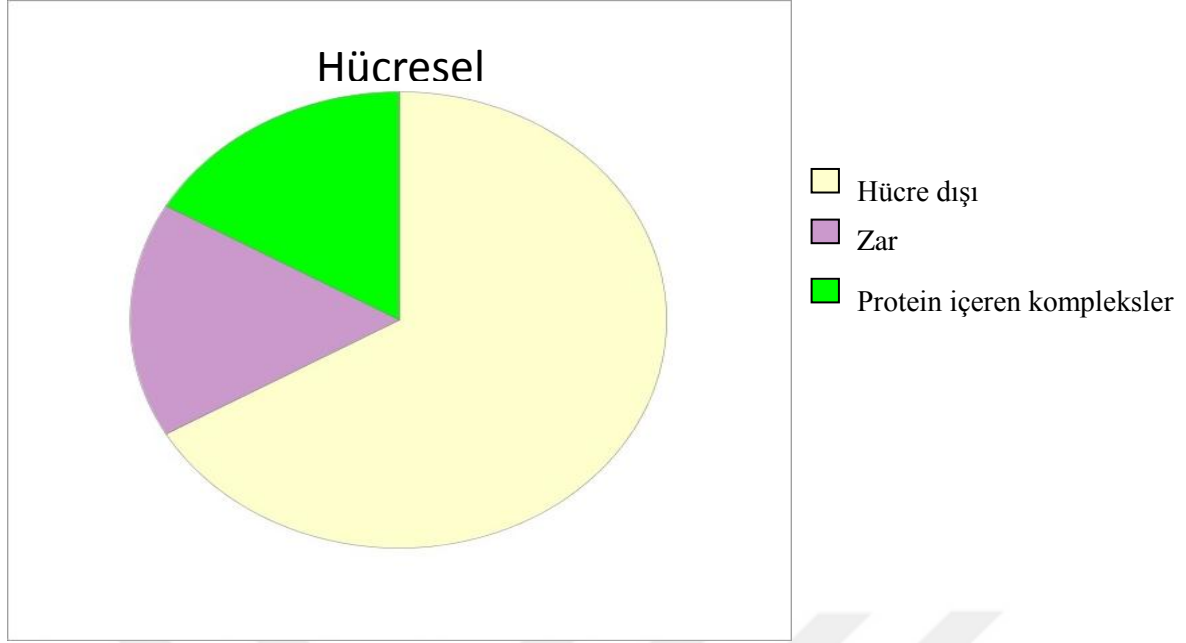
Moleküler Fonksiyon	İlişkili Proteinler
Bağlayıcı	Antitrombin 3 Kompleman C4 A Alfa-1 antikomotripsin İmmunoglobulin kappa constant Kompleman C3
Katalitik aktivite	Antitrombin 3 Alfa-1 antikomotripsin
Moleküler fonksiyon regülatörü	Antitrombin 3 Kompleman C4 A Alfa-1 antikomotripsin Kompleman C3



Şekil 15. Down proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 14. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu biyolojik proseslerine göre dağılım tablosu.

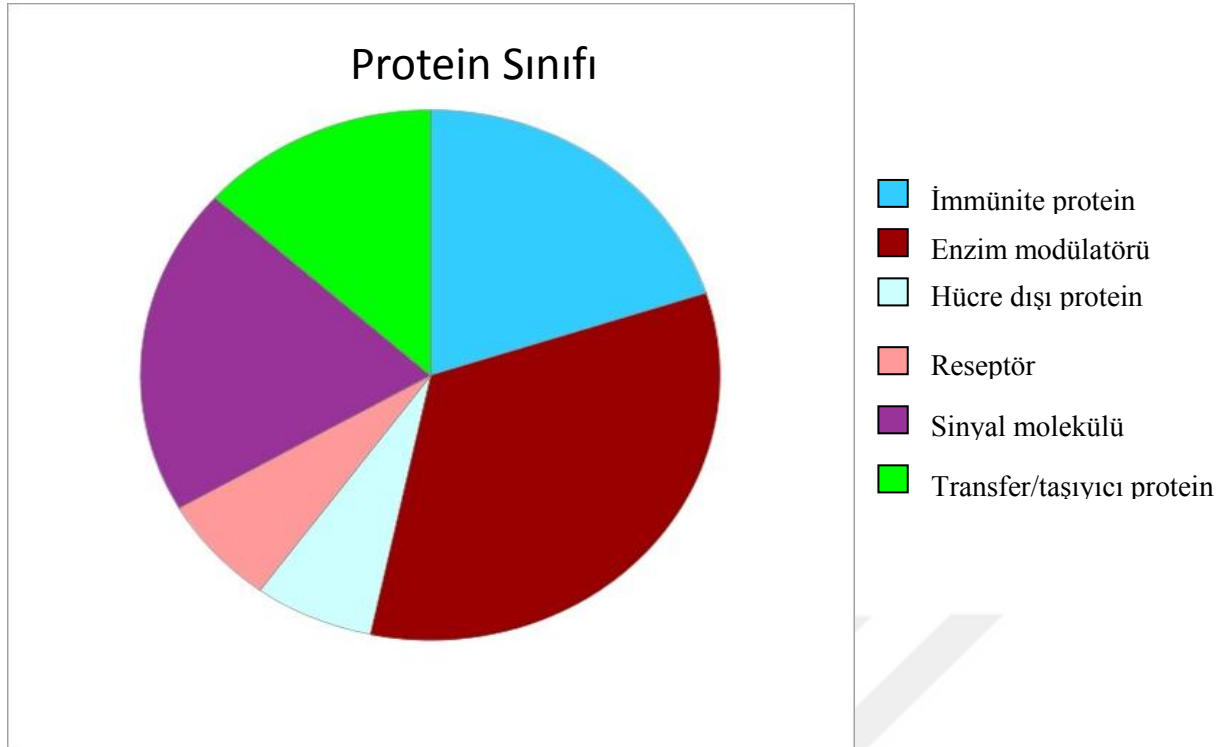
Biyolojik Süreç	İlişkili Protein
Biyolojik düzenleme	Optisin İmmunoglobulin Kappa
Biyogenezis	İmmunoglobulin Kappa
Hücreyel süreç	Kompleman C4 İmmunoglobulin Kappa Kompleman C3
İmmun sistem süreçleri	Alfa kristallin B zincir İmmunoglobulin Kappa
Lokalizasyon	Vitamin D bağlayıcı protein İmmunoglobulin Kappa Retinol bağlayıcı protein
Metabolik süreçler	Antitrombin 3 Kompleman C4 Alfa-1- antikomotripsin İmmunoglobulin Kappa Kompleman C3
Çok hücreli organizma süreçleri	Alfa kristallin B zincir
Uyarana cevap	Kompleman C4 Alfa-1- antikomotripsin Kompleman C3



Şekil 16. Down proteinlerin katıldığı hücresel prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 15. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel proseslerine göre dağılım tablosu.

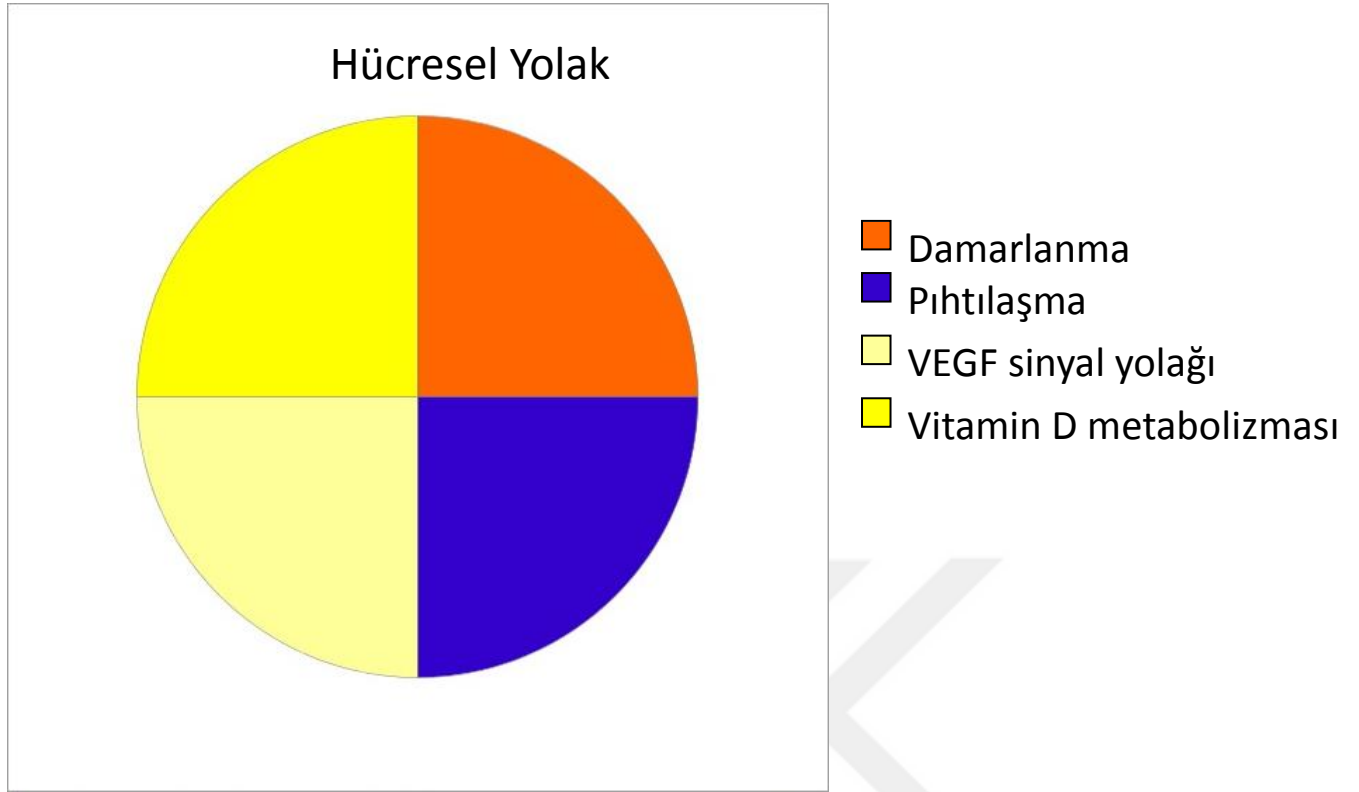
Hücresel Öğe	İlişkili Protein
Hücre Dışı	Antitrombin 3 Alfa 1-antikimotripsin Optisin İmmunoglobulin kappa
Zar	İmmunoglobulin kappa
Protein içeren kompleksler	İmmunoglobulin kappa



Şekil 17. Down proteinlerin katıldığı sınıflamaya ait prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 16. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu protein sınıflama proseslerine göre dağılım tablosu.

Protein Sınıfı	İlişkili Proteinler
İmmünite protein	Kompleman C4 Kompleman C3
Enzim modülatörü	Antitrombin 3 Kompleman C4 Alfa-1-antikimotripsin Kompleman C3
Hücre dışı protein	Optisin
Reseptör	Optisin
Sinyal molekülü	Kompleman C4 Kompleman C3
Transfer/ taşıyıcı protein	D vitamini bağlayıcı protein Retinol bağlayıcı protein

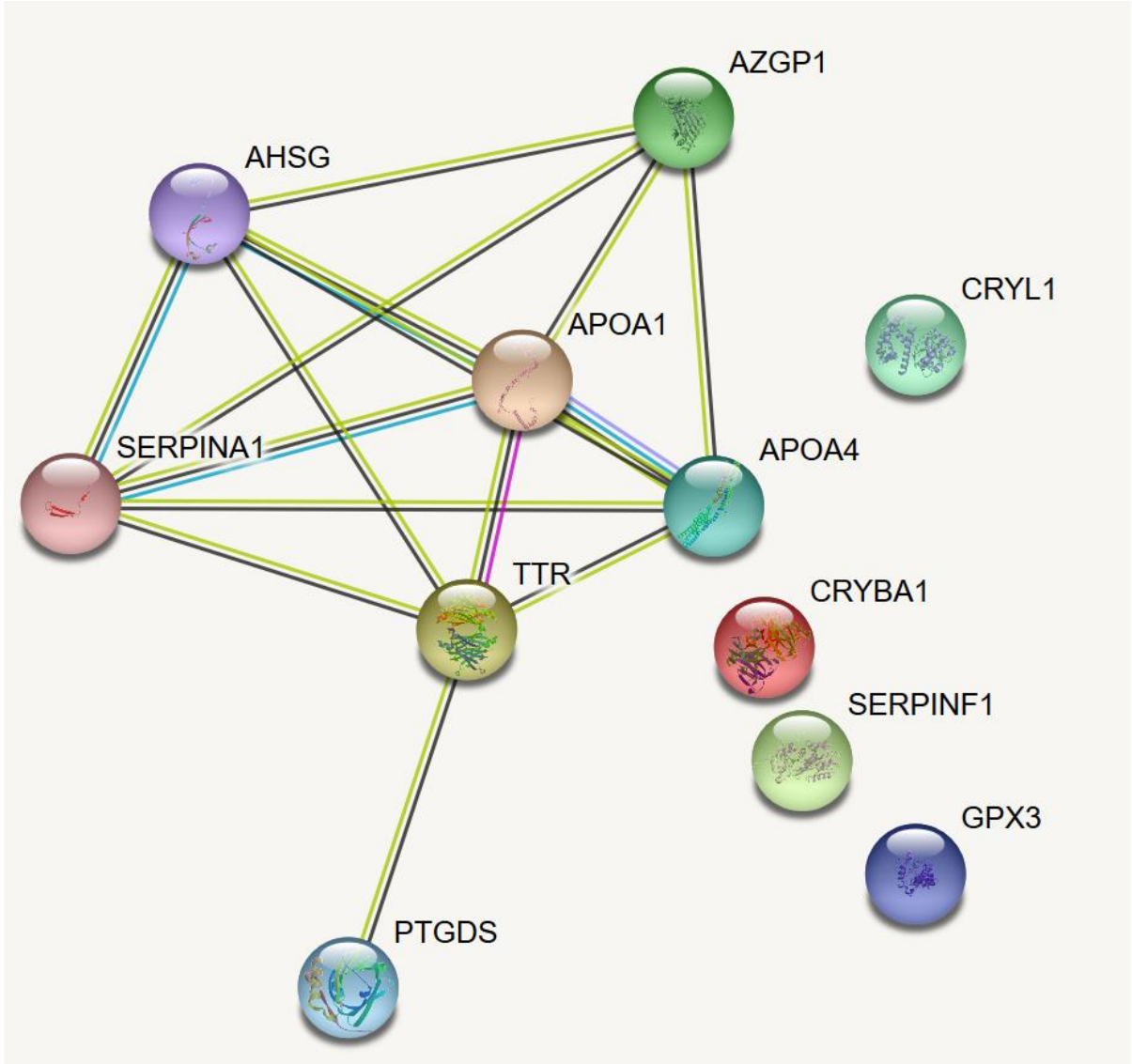


Şekil 18. Down proteinlerin katıldığı hücresel prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 17. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu hücresel proseslerine göre dağılım tablosu.

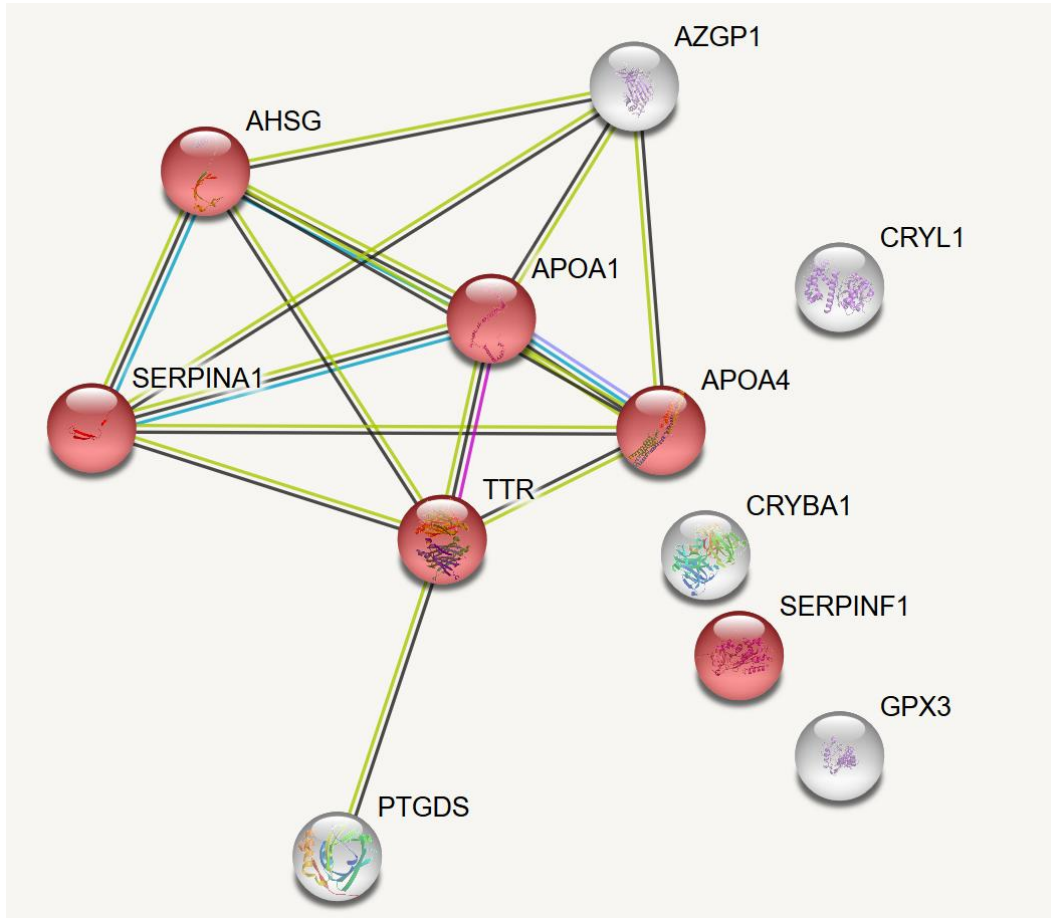
Hücresel yolak	İlişkili Proteinler
Damarlanma	Alfa kristalin B zincir
Pıhtılaşma	Antitrombin 3
VEGF sinyal yolağı	Alfa kristalin B zincir
Vitamin D metabolizması	Vitamin D bağlayıcı protein

PANTHER analizleri tanımlanan proteinlerin interaktomlarını belirlemede net sonuçlar vermediği için elde ettiğimiz verileri STRING analizine de tabi tuttuk. STRING analizinde proteinler arası etkileşim kriterleri sıkı tutulduğunda, tanımlanan tüm proteinlerin birbiri ile etkileştikleri, ancak belirgin bir metabolik yol üzerinden anlam ifade etmediği görüldü. Etkileşim kriterleri sıkı tutulmadığında ise tanımlanan proteinlerin anlamlı yollarla ilişkilerde olduğu görülmüştür.



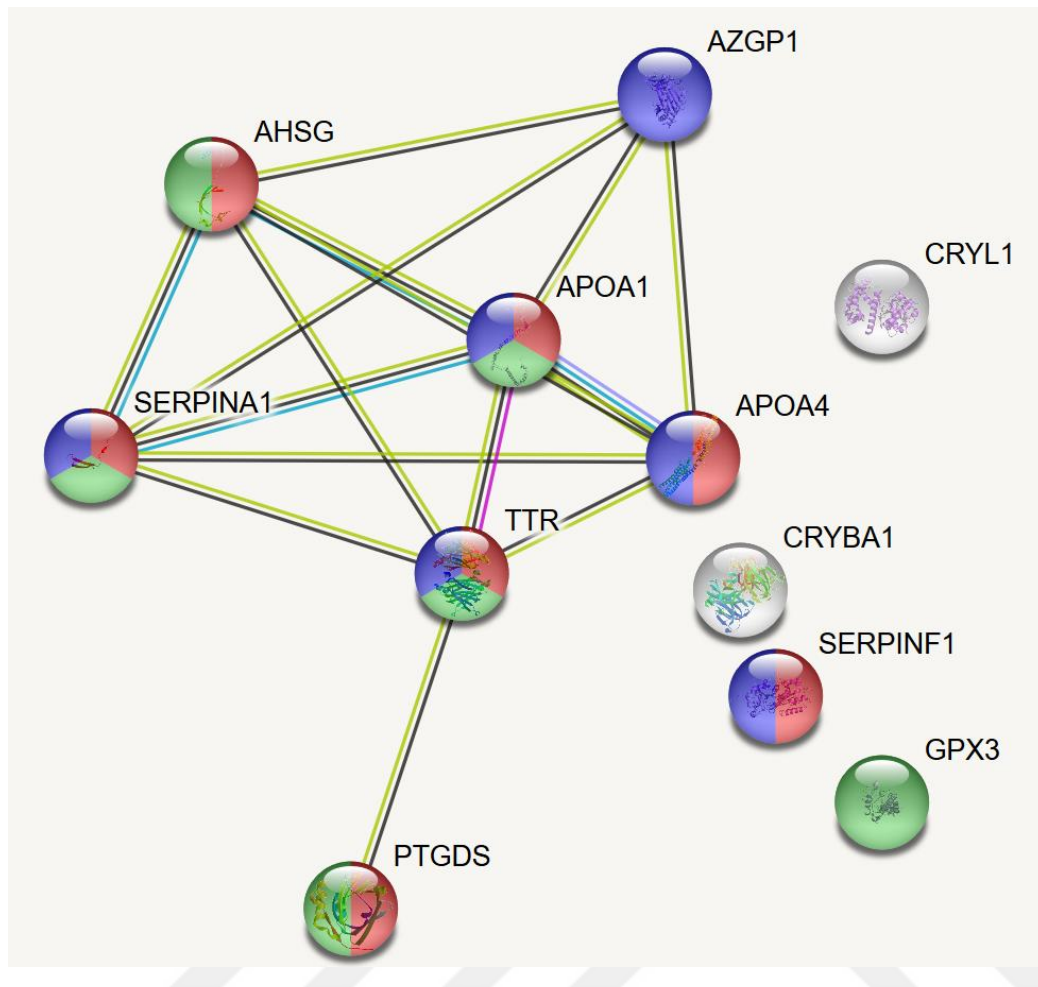
Şekil.19 Up regüle proteinlerin STRING analizi.

Şekil 20. Up regüle proteinlerin moleküler fonksiyon kümelenmeleri.

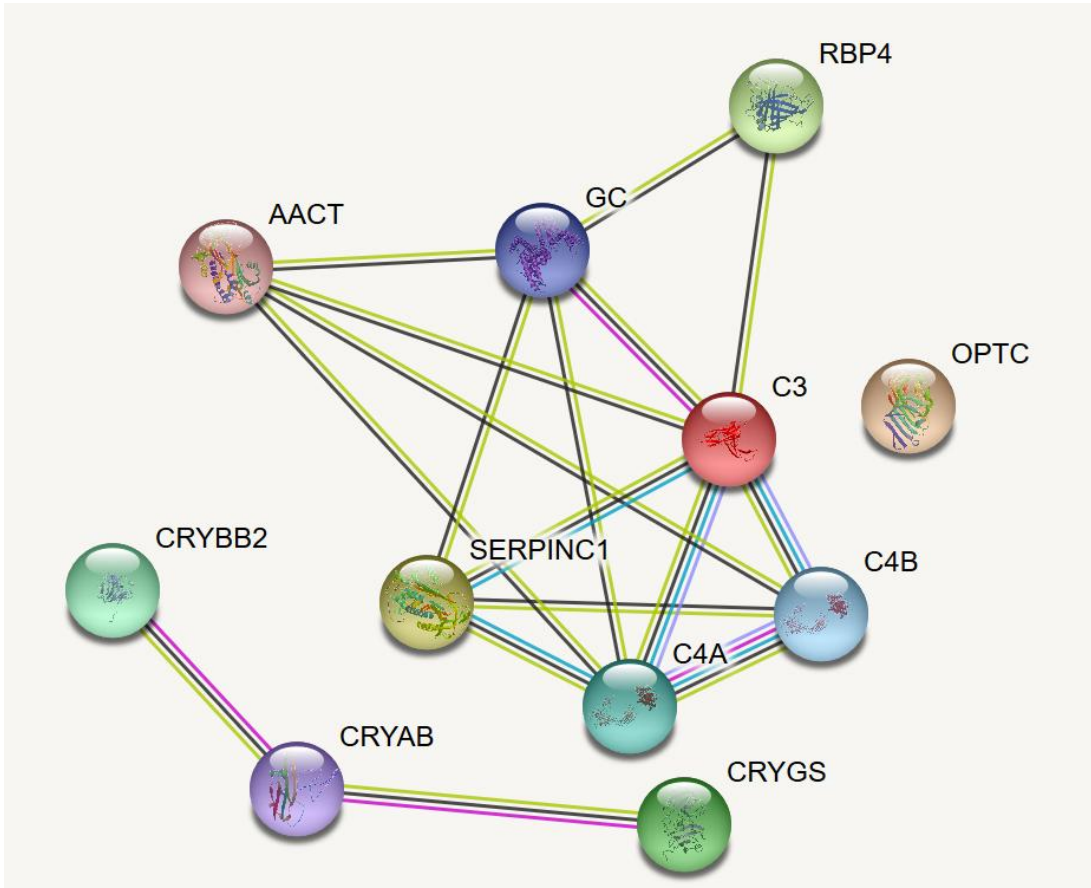


Molecular Function (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0060228	phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activ...	2 of 6	0.00083
GO:0098772	molecular function regulator	6 of 1793	0.0024
GO:0031210	phosphatidylcholine binding	2 of 22	0.0024
GO:0030234	enzyme regulator activity	5 of 1016	0.0024
GO:0017127	cholesterol transporter activity	2 of 17	0.0024

Şekil 21. Up regüle proteinlerin aqueous ve vitreous ile alakalı makalelerde tespit edilen proteinlerle ortak olanlar.

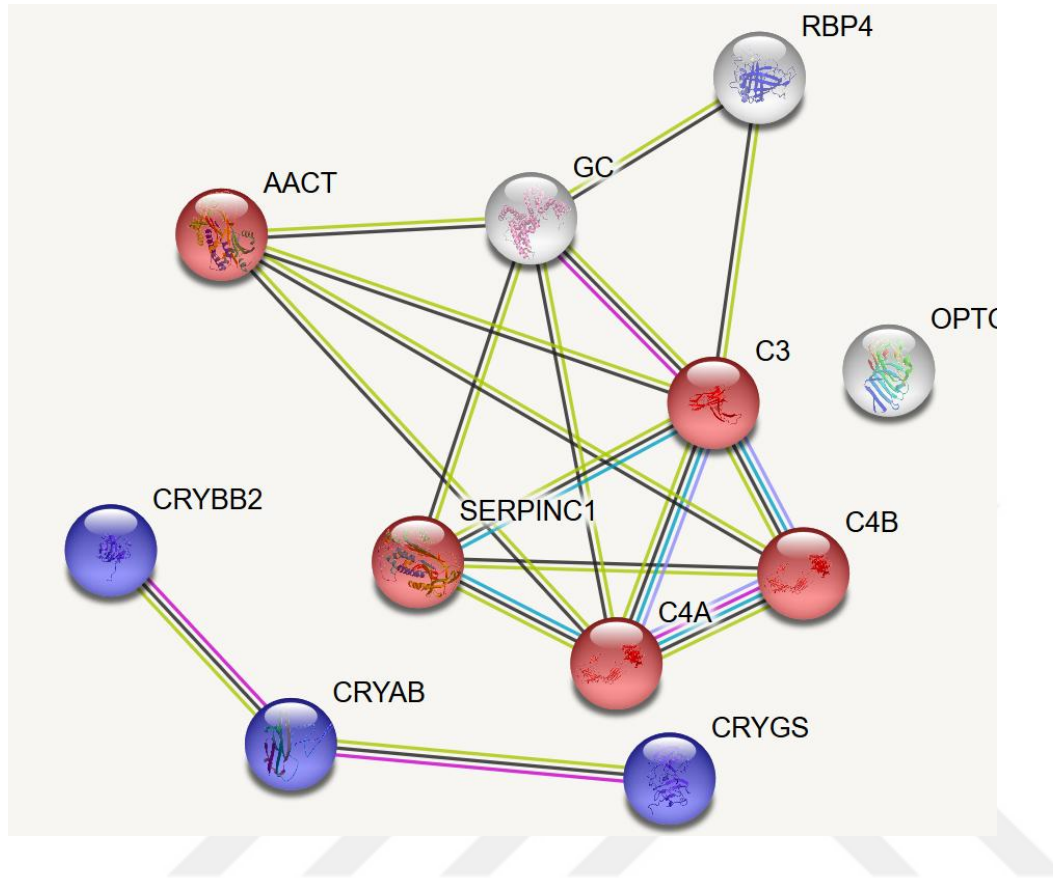


Reference publications				
<i>publication</i>	<i>(year) title</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>	
PMID:19081814	(2008) Proteome Profiling of Vitreoretinal Diseases by Clust...	7 of 21	7.14e-14	●
PMID:28145509	(2017) Serum protein changes in a rat model of chronic pai...	6 of 17	1.19e-11	
PMID:24828575	(2014) Proteomics of vitreous humor of patients with exud...	6 of 18	1.19e-11	●
PMID:28469465	(2017) Characterization of Vitreous and Aqueous Proteome...	6 of 41	6.30e-10	●
PMID:26909022	(2016) Proteomics Research in Schizophrenia.	7 of 112	6.64e-10	●



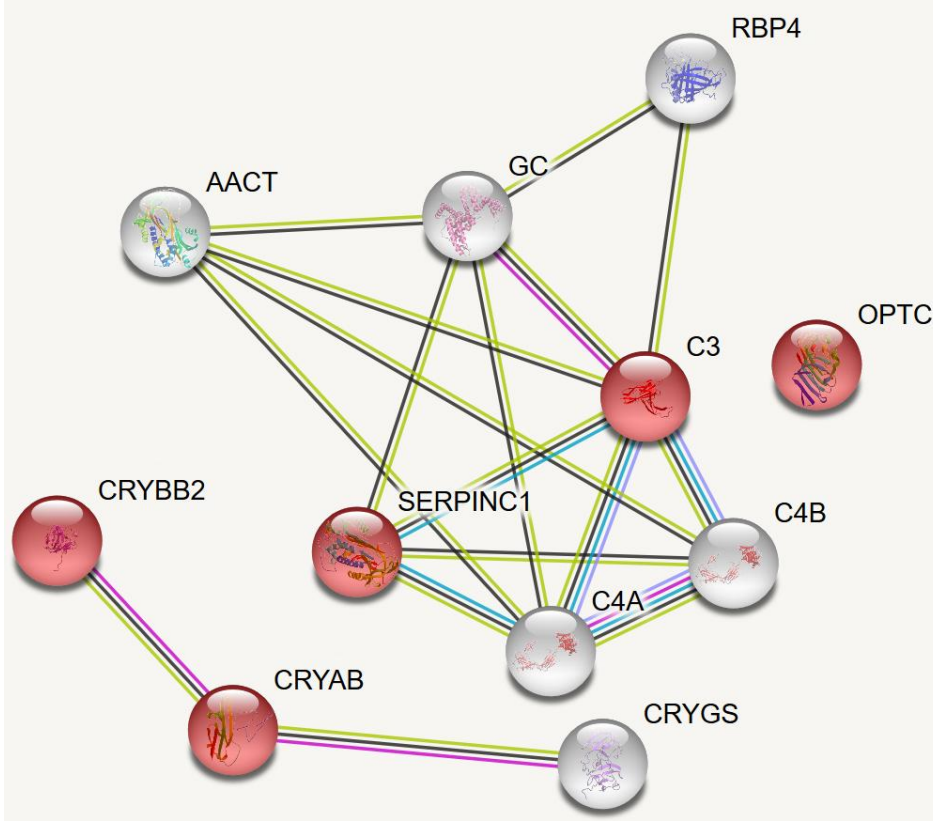
Şekil 22. Down regüle proteinlerin STRING analizi.

Şekil 23. Down regüle proteinlerin moleküler fonksiyon kümelennmeleri.



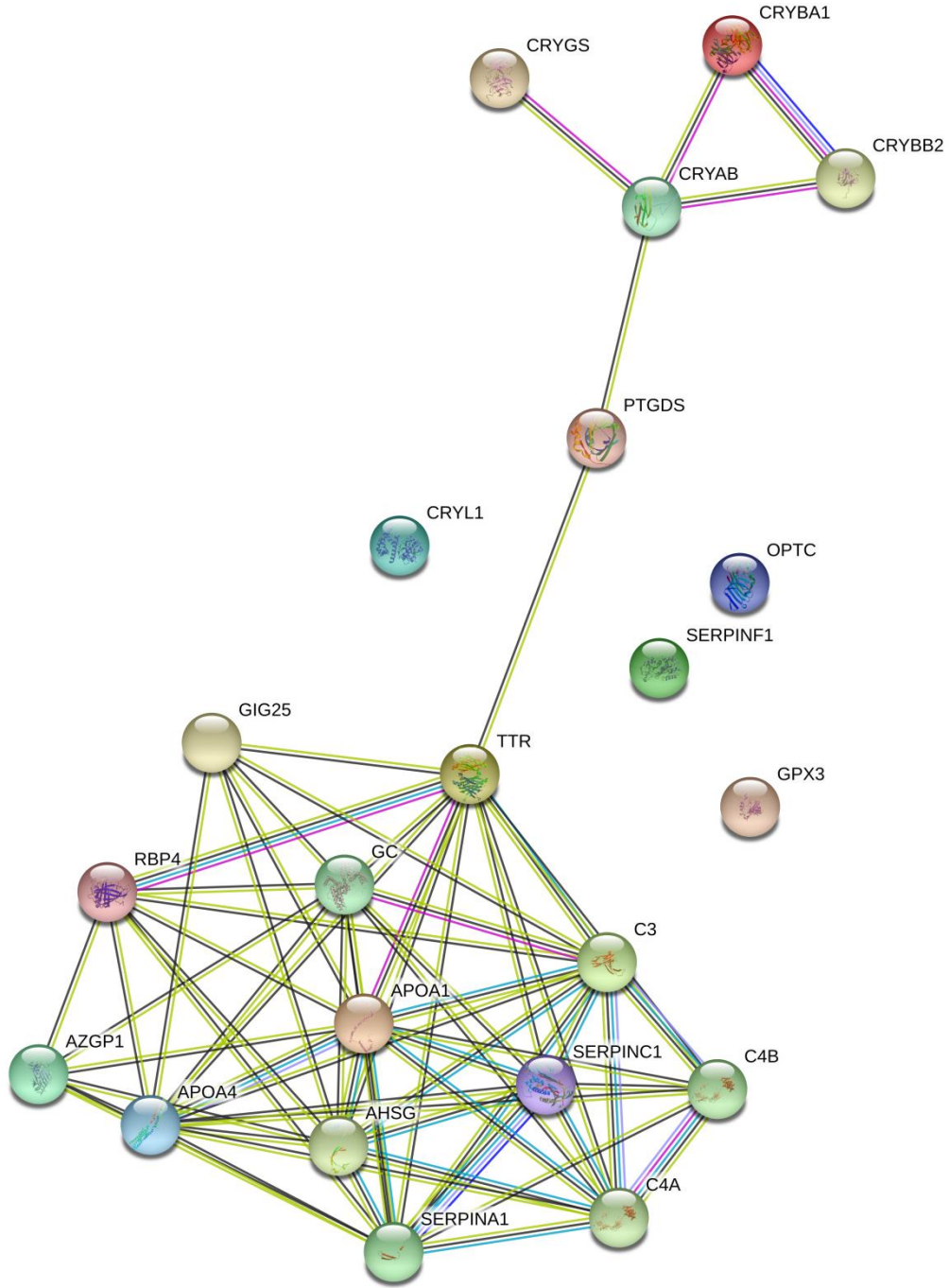
Molecular Function (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0004866	endopeptidase inhibitor activity	5 of 169	1.74e-06
GO:0005212	structural constituent of eye lens	3 of 21	3.98e-06
GO:0001848	complement binding	2 of 20	0.00071
GO:0090482	vitamin transmembrane transporter activity	2 of 24	0.00087
GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	3 of 180	0.0010

Şekil 24. Down regüle proteinlerin aqueous ve vitreous ile alakalı makalelerde tespit edilen proteinlerle ortak olanlar.

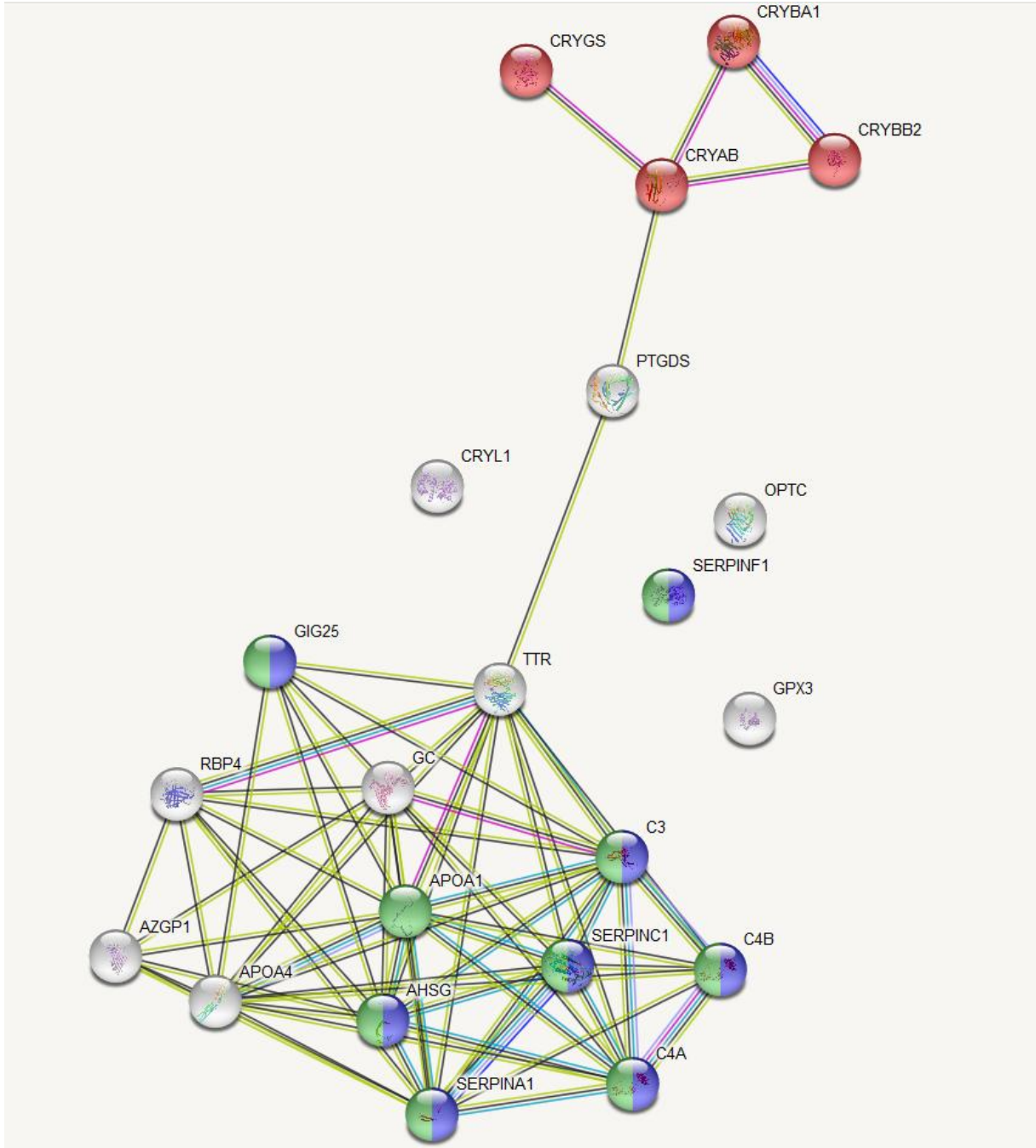


Reference publications				
publication	(year)	title	count in gene set	false discovery rate
PMID:28855568	(2017)	Plasma biomarker proteins for detection of human g...	6 of 41	1.44e-09
PMID:23916703	(2013)	Proteomic analysis in peritoneal dialysis patients wit...	5 of 9	1.44e-09
PMID:21799770	(2011)	Proteomic biomarkers for acute interstitial lung dise...	6 of 39	1.44e-09
PMID:27362861	(2016)	Proteomic Analysis of Vitreous Humor in Retinal Vei...	5 of 17	4.73e-09
PMID:24533825	(2014)	Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial...	6 of 63	5.23e-09

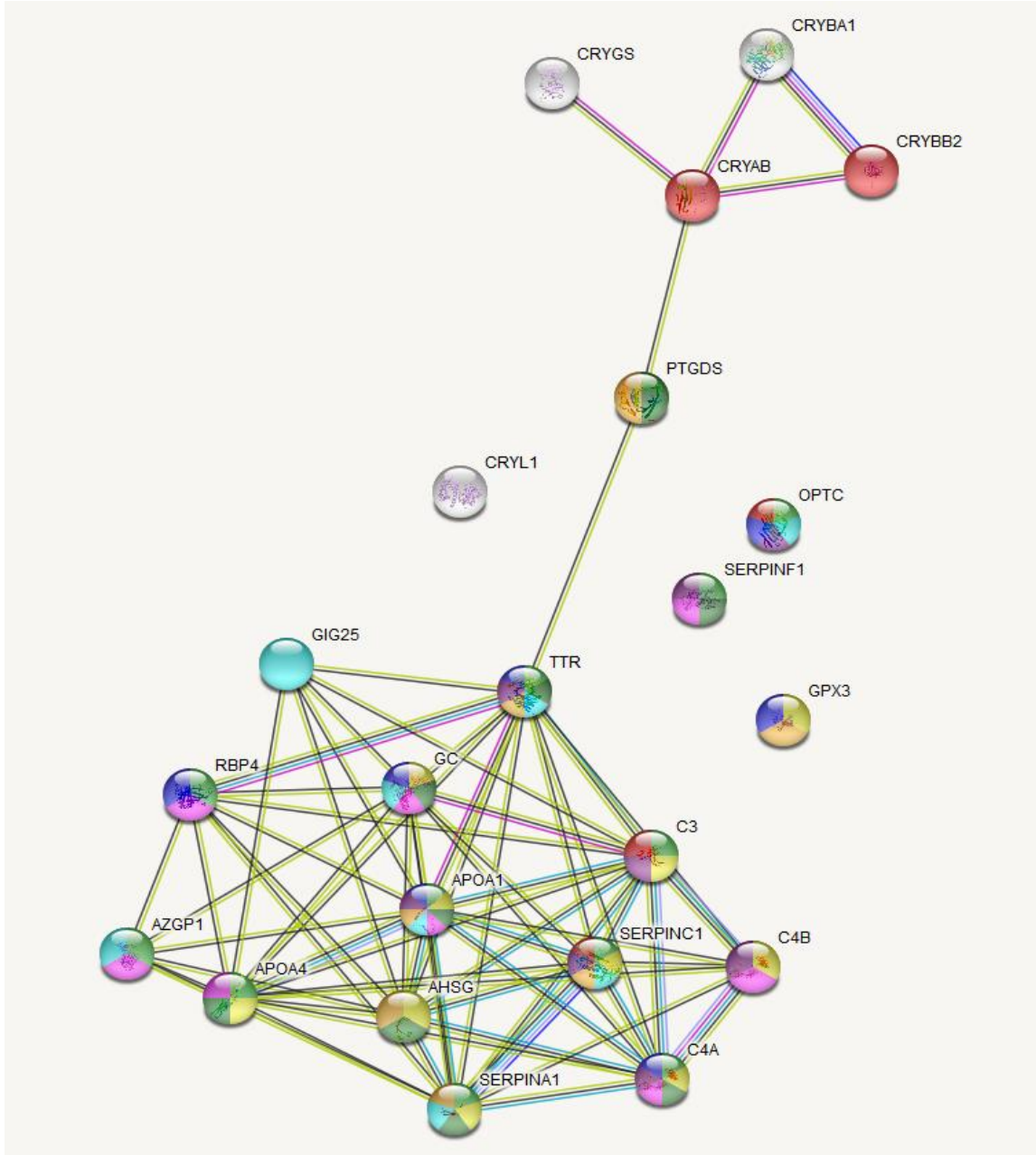
Şekil 25. Up ve Down regüle proteinler beraber STRING analizi.












Şekil 26. Up ve Down regüle proteinler beraber moleküler fonksiyon kümelenmeleri.



Şekil 27. Up ve Down regüle proteinler beraber aquesu ve vitreous ile alakalı makalelerde tespit edilen proteinlerle ortak olanlar.



Reference publications			
<i>publication</i>	<i>(year) title</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
PMID:28469465	(2017) Characterization of Vitreous and Aqueous Proteome...	11 of 41	7.62e-19 
PMID:21091014	(2010) Vitreous proteomics and diabetic retinopathy.	10 of 28	4.89e-18 
PMID:25290619	(2014) Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer us...	10 of 36	2.80e-17
PMID:21799770	(2011) Proteomic biomarkers for acute interstitial lung dise...	10 of 39	4.22e-17
PMID:19081814	(2008) Proteome Profiling of Vitreoretinal Diseases by Clust...	9 of 21	8.94e-17 
PMID:23916703	(2013) Proteomic analysis in peritoneal dialysis patients wit...	8 of 9	1.78e-16
PMID:22973072	(2012) Proteomic analyses of the vitreous humour.	8 of 13	1.28e-15 
PMID:28007936	(2016) Proteomics reveals the effects of sustained weight l...	10 of 63	1.58e-15
PMID:28855568	(2017) Plasma biomarker proteins for detection of human g...	9 of 41	8.60e-15
PMID:21923925	(2011) Proteomic analysis of mare follicular fluid during lat...	9 of 48	2.77e-14
PMID:25187886	(2014) Proteomic profiling of serum from patients with tub...	8 of 24	4.17e-14
PMID:25379033	(2014) Proteomic analysis of human plasma in chronic rhe...	9 of 55	6.59e-14
PMID:20019884	(2009) Proteomic analysis of human aqueous humor using ...	8 of 26	6.59e-14 
PMID:22761838	(2012) Discovery of novel biomarker candidates for liver fib...	8 of 36	5.48e-13
PMID:28750635	(2017) Proteomic analysis of human follicular fluid associa...	8 of 37	6.21e-13
PMID:22355332	(2012) iTRAQ identification of candidate serum biomarkers ...	8 of 37	6.21e-13
PMID:23400684	(2013) Proteomic analysis of synovial fluid from the osteoa...	8 of 38	6.63e-13
PMID:21136595	(2010) Plasma profiles in active systemic juvenile idiopathi...	8 of 39	7.54e-13
PMID:28145509	(2017) Serum protein changes in a rat model of chronic pai...	7 of 17	1.02e-12
PMID:27136540	(2016) Proteome Profile and Quantitative Proteomic Analys...	8 of 41	1.02e-12
PMID:24828575	(2014) Proteomics of vitreous humor of patients with exud...	7 of 18	1.31e-12 
PMID:23844025	(2013) An insight into the changes in human plasma proteo...	7 of 23	5.26e-12
PMID:21297942	(2011) Eimeria species and genetic background influence t...	7 of 24	6.50e-12
PMID:25097467	(2014) Proteomic analysis of human vitreous humor.	8 of 56	7.88e-12 
PMID:28452939	(2017) A Review: Proteomics in Retinal Artery Occlusion, Re...	7 of 94	1.15e-08 
PMID:27362861	(2016) Proteomic Analysis of Vitreous Humor in Retinal Vei...	5 of 17	2.16e-08 

5.TARTIŞMA

Epiretinal membranlar (ERM'ler) retina dekolmanı, göz içi inflamasyon, travma ve retinal vasküler hastalıklar gibi diğer oküler hastalıklarla ilişkili olmadıklarında idiyopatik olarak adlandırılır. İdiyopatik epiretinal membranlar (iERM 'ler) hala patagonezinin çok iyi aydınlatılmadığı güncel sahip olunan bilgiler dahilinde iç limitan membran (ILM) üzerindeki fibrosellüler dokunun büyümesi ile karakterize olarak tanımlanan membranlardır. İnce selofan benzeri görünüm oluşturmakla birlikte kontraktıl membranlar metamorfopsiye ve de görme keskinliğinde azalmaya sebep olmaktadır.

Bugüne kadar, bir dizi genetik, çevresel, proteomik ve hücresele hedef, iERM için hem risk faktörleri hem de potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Bu faktörlerin daha iyi anlaşılması ve iERM için potansiyel biyobelirteç olarak kullanılması, gelecekteki araştırmalara ve klinik uygulamalara rehberlik edebilir(124). Proteom analizi geniş protein ailesinden eş zamanlı değerlendirmeyi sağlar. İnsan vitreusundan alınan örnekler sitokinlerin vitreus boşluğuna akması ve retinaya yakınlığı nedeniyle iERM için en iyi biyobelirteç kaynağı olarak nitelendirilebilir (125.)

Bununla birlikte daha önce yapılmış olan iERM olan hastalardan proteomik çalışmaları sınırlı sayıda hastadan oluşmaktadır. (126) Sağlıklı grup ile yapılan karşılaştırmada yüksek bulunan proteinler ile birlikte düşük olan proteinlerin de anlamlı olabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda, Alpha-1-antitripsin, Lambda-crystallin homolog, Alpha-2-HS-glycoprotein, Pigment epithelium-derived factor, transthyretin, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Apolipoprotein A-I, Glutathione peroxidase 3, Beta-crystallin A3, Zinc-alpha-2-glycoprotein, Apolipoprotein A-IV, Ig gamma-1 chain C region preteinlerinin hasta grubunda up regüle olduğu , Antithrombin-III, Vitamin D-binding protein, Complement C3, Complement C4-B, Complement C4-A, Retinol-binding protein 4, Beta-crystallin B2, Ig kappa chain C region, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain, Alpha-1-antichymotrypsin, opticin pteinleri hasta grubunda down regüle olduğu bulunmuştur. Aşağıda bu proteinler ile ilgili literatür bilgisini ve bu proteinlerin hastalık ile olan ilişkilerini tartıştık.

Alpha-1-antitripsin:(AAT):(AAT), karaciğerde sentezlenen bir glikoproteindir. AAT de Anti-trombin 3, albumin ve tiroid bağlayıcı globulin gibi serin proteaz inhibitör ailesi'nin

(SERPİN) bir üyesidir (127). Esas görevi, aktive olmuş nötrofillerden salınan proteinaz 3, elastin ve katepsin G gibi proteazların yıkıcı etkilerini önlemektir. Bu nedenle, inflamasyon sırasında serum AAT düzeyinin yükselmesinden dolayı, AAT bir akut faz reaktanı olarak da kabul edilmektedir.

GustavoOrtiza ve arkadaşlarının diyabetik fare retinasında yaptıkları çalışmalar göstermiştir ki, diyabetik retinopati de (DR'de) enflamatuar bir süreç tetiklenir. Serin proteazların bir inhibitörü olan AAT 'nin çeşitli hastalıklarda anti-enflamatuar özellik göstermesinden yola çıkılarak DR'nin neden olduğu erken değişiklikleri önlemek için AAT kullanımını değerlendirmeyi amaçlayan bu çalışma , AAT ile tedavi edilen diyabetik farelerde, gangliyon hücre kaybı ve retinal hasarda gecikme olduğunu göstermiştir. Bu hayvanlarda belirgin şekilde azalmış enflamatuar durum gösterilmiştir. AAT, kontrol farelerinininkine benzer sistemik ve retinal TNF- α seviyesini koruyabilmiştir. Böylece AAT ile tedavi edilen farelerin daha az retinal nörodejeneratif değişiklikler gösterdiği, sistemik ve retinal TNF-a seviyelerinin azaldığını gösterilmiştir. Sonuç olarak Alfa-1-antitripsin, erken diyabetik retinopatide nörodejenerasyonu yavaşlatmıştır. Sistemik ve retinal TNF-alfa seviyeleri alfa-1-antitripsin ile düşürülmüştür.(128)

NúriaCabezas-Llobet^a ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları çalışma ile Human alpha 1-antitrypsin (hAAT) 'in oksijen ve glukoz yoksunluğundan (OGD) sonra nöronları ve glial hücreleri koruyabildiğini test etmeyi amaçlamışlardır.Bu amaçla, HAAT'nin fare kortikal nöronal, hipokampal, striatal ve ayrıca glial kültürlerine eklenmesi OGD indüksiyonundan 30 dakika sonra yapılmış ve 24 saat sonra hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Farklı apoptotik belirteçlerin ve çeşitli enflamatuar parametrelerin ekspresyonu, immünoblotlama ve RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak da ,Alfa-1 antitripsin, nöronları ve glia'yı oksijen glukoz yoksunluğuna karşı koruduğu bulunmuştur. AAT'ın koruyucu etkisine, enflamatuar sitokinlerin azalmasının aracılık ettiği bulunmuştur.(129)

Yaptığımız çalışmada Alfa 1 Antitripsin düzeyleri çalışma grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur.Bu bilgi inflamatuvar bir süreç olduğunu düşündüğümüz idiyopatik epiretinal membran patogenezinde değerlidir.

KRİSTALİN:

Kristalinler, omurgalı lensinin baskın yapısal bileşenleridir. Kristalinlerin beyin, kalp, böbrek, akciğerler ve retina gibi diğer dokularda eksprese olduğu bilinmektedir (165).Katarakt,

kristalimsi protein stabilitesinin kaybı ve müteakip kristalinlerin kısmen açılma eğilimi nedeniyle toplanıp, birikmesi ve çökmesi sonucu oluşur. (130)

Erken yaşlarda oluşan kataraktın, kristalin proteinlerinin genellikle kalıtsal mutasyonlarından kaynaklandığı ,yaşa bağlı kataraktın ise postranlasyonel modifikasyonlardan (PTM) kaynaklandığı düşünülmektedir (131). Oksidasyon , hem yaşlı hem de kataraktlı lenslerde, bazı kristalinlerin *in vitro* toplanma eğilimini artıran yaygın bir PTM'dir. Katarakt oluşum mekanizmaları incelendiğinde kristalin proteinlerinin stabilizasyonu sağlayan disülfid bağ yapısının değişmiş olduğu ve proteinlerin kümelenme oluşturduğu gözlenmiştir. (132)

UVA ışığına uzun süre maruziyetin, lens nükleer ışık saçılımı ve lens nükleer kristallerinin toplanmasını arttırdığı gösterilmiştir. Bu bilgiden yola çıkılarak katarakt oluşumuna neden olan faktörlerden biri olarak değerlendirilmiştir.(133)

Lens çekirdeğine olan UVA ışığının zararlı etkilerinin, yaşa bağlı vitreusun sıvılaşması ve posterior vitreus ayrılmasının bir sonucu olarak meydana gelen kısmi oksijen basıncındaki artışla daha hızlı ortaya çıktığı gösterilmiştir.(134).

Lambda-crystallin homolog, Beta-crystallin A3, Beta-crystallin B2, Alpha-crystallin B chain, Beta-crystallin S proteinleri çalışmamızda çalışma ve kontrol grubu arasında düzeyleri farklı çıkan kristalin proteinleridir. Lambda-crystallin homolog, Beta-crystallin A3 proteinleri çalışma grubunda yüksek, Beta-crystallin B2, Alpha-crystallin B chain, Beta-crystallin S proteinleri çalışma grubunda düşük bulunmuştur.

Lambda-crystallin homolog: Çok yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar, ışığın saçılmasını ve katarakt oluşumunu önlemek için aşırı çözünürlük ve termodinamik stabilite gösterirler.(135)

İdiyopatik epiretinal membranı bulunan hasta gruplarında sık rastalanılan posterior vitre dekolmanının vitre içindeki oksijenizasyonu değiştirdiği gösterilmiştir.(136).Bu bilginin ışığında çalışma grubunda Lambda-crystallin homolog proteinin yüksek bulunmuş olması vitredeki değişen oksijenizasyonun Davic C.Babee ve arkadaşlarının yapmış olduğu oksijenin oksidatif hasara yol açarak katarakt oluşumunu hızlandırdığı sonucunu destekler nitelikte olup beklediğimiz sonuçlardır. (137)

Beta-crystallin A3: Işık ,beta kristalin A3 ve A4'ün tirozin fosforilasyonunda belirgin bir artışa neden olur. Protein fosforilasyonları da görsel sinyallemede temel düzenleyici rollere sahiptir. Beta kristalinin fosforilasyonu RPE'de bir anti-apoptotik şaperon işlevi gösterir.(138)

Yapılan çalışmalar neticesinde bugün bu proteinin lens dışında retina da RPE tarafından ve astrositler tarafından düzenleyici olarak kullanıldığını biliyoruz. β A3 / A1-kristalinin RPE hücresinin lizozomlarında önemli bir fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. Lens içindeki proteinin konsantrasyonu, RPE'deki konsantrasyonuna kıyasla son derece yüksektir. Normal RPE hücrelerinin alt hücrel fraksiyonlanması, β A3 / A1-kristalinin bir lizozomal lümenal protein olduğunu ortaya çıkarmıştır. (144).Lizozomal aktivite de rol alıyor olması AMD gibi yaşa bağlı birikimlerle giden hastalık etyolojisinde rol oynadığı kadar inflamatuvar birikim materyalinin uzaklaştırılmadığı epiretinal membran patofizyolojisinde de rol oynayacağını düşündürmektedir.(139)

Bizim çalışmamızda da yüksek bulunması ERM nin inflamatuvar süreci ile ilgili literatür bilgilerini desteklemektedir.

Beta-crystallin B2:Fabian Anders ve ark. erken glokom hastalığında Beta-crystallin düzeylerini inceleyerek retina içindeki varlığını ve net nöro-koruyucu etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, proteomik veriler, β -kristalin B2'nin apoptoz ve gen regülasyonu üzerine ciddi etkisi olan kalsiyuma bağlı hücre sinyal yollarını etkileyebileceğini göstermiştir.(140).

Nöral progenitor hücreler (β B2-crystallin-NPCs) in , in vivo olarak distal optik sinir gövdesi içinde kesilmiş optik sinir aksonlarının rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Rapor edilen veriler, nB2-kristalin üreten "hücrelerin" merkezi sinir sistemi yaralanmaları için yeni terapötik ilaçlar sağlamak için kullanılabilirliğini göstermektedir (180). Böhm ve ark. Retina gangliyon hücresi denegerasyonuna RPE cevabının, terapötik olarak kullanılabilen β -kristalin B2 ler aracılığı ile aracılık ettiğini bu nedenle düşünmektedirler (141).

Bizim çalışma verilerimizde Beta-crystallin B2, i ERM grubunda kontrol grubuna göre 0.037 kat daha düşük seviyede bulunmuştur. Apoptotik sürece etkisi olduğu bilinen bu proteinin çalışma grubunda az bulunmuş olması inflamatuvar materyalin uzaklaştırılmasındaki mekanizma olan apoptotik sürecin eksikliğini açıklayıcı olarak düşünülebilir.

Alpha-crystallin B chain:Çeşitli stres koşullarında çeşitli proteinlerin agregasyonunu önleyerek şaperon benzeri aktiviteye sahiptir(142).Alfa-kristalin oksidatif stres tarafından düzenlenir ve anjiyogenez, apoptoz ve b-amiloid fibril oluşumunu engeller (143).Isı şok protein ailesi üyelerinden biri olan alphaB-kristalin, moleküler şaperonların ve anti-apoptotik biyolojik yolların özelliklerine sahiptir.Retinopati, inflamasyon ve sinir sistemi hastalıkları gibi çok faktörlü hasarlanmaların, alfa-kristalin ile yakın ilişki içerisinde oldukları gösterilmiştir. (144).

Alpha-crystallin B chain 'in ; AMD, diyabetik retinopati, üveit, oküler travma ve iskemi olmak üzere geniş bir retinal hastalık patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir.(145).

Son zamanlarda, Alpha-crystallin B chain'in mitokondri-aracılı apoptozun önemli bir düzenleyicisi ve anti-inflamatuar özelliklere olduğu gösterilmiştir. Alpha-crystallin B chain'in Retina pigmentin Epitelinde(RPE),oksidatif stresin neden olduğu apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. (146).

Alfa-kristalin B Chain knockout farelerinde RPE çalışmaları göstermiştir ki Alfa-kristalin B Chain vasküler endotelial büyüme faktörü ile etkileşim yoluyla (VEGF) retinal ve koroidal anjiyogenezi desteklemektedir.(147).Kronik stresin Alfa-kristalin B Chain seviyesini azaltabildiği ve bu değişikliğin dejeneratif süreçleri teşvik edebildiği gösterilmiştir. (147,148).Kase ve arkadaşları yaptıkları çalışmada anjiyogenezde rol oynayan VEGF-A için bir şaperon olarak Alfa-kristalin B Chain in önemli bir rol oynadığını ve terapötik bir hedef olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuşlardır. Alfa-kristalin B Chain, oküler anjiyogenezin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar(149).

Alfa-Kristalin B Chain i ERM grubunda kontrol grubuna göre down-regüle olduğu görülmüştür. Şaperon benzeri aktiviteye sahip olan ve anjiogenez, apoptoz oluşumunu engellediği gösterilmiş olan Alfa-Kristalin B Chain in iERM grubunda kontrol grubuna göre düşük çıkması apoptotik süreçteki aksama nedeniyle inflamatuvar materyalin uzaklaştırılmadığı görüşünü destekler bir sonuçtur.

Beta-crystallin S: Beta-Crystallin S, bir mol'e karşılık gelen 177 kalıntı uzunluğuna sahiptir. N-terminal serin tarafından bloke edilir. Kristalin ailesinin diğer üyeleri ile sekans karşılaştırması yapıldığında, insan gamma-kristalliniyle (% 53 özdeşlik) beta A3 / A1 kristalin (% 37 özdeşlik) ilişki ortaya konulmuştur.(150)

Bizim çalışmamızda, Beta-crystallin S, çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha az eksprese bulunmuştur.Ancak mevcut bilgilerimiz dahilinde hastalık patogenenezi ile ilişkilendirilmesi yapılamamıştır .

Alpha-2-HS-glycoprotein:Fetuin A olarak da bilinir.Enflamatuar cevabın frekansını, hızını veya kapsamını, kimyasal veya fiziksel ajanların neden olduğu enfeksiyon veya yaralanmaya karşı oluşan ani savunma reaksiyonunu modüle eden süreçte görevli olduğu gösterilmiştir.(151)

Kemirgenlerde, tirozin kinaz reseptörü üzerinden insülinin etkisini inhibe ettiği gösterilmiştir (142). Chunming Zhao ve arkadaşlarının Diyabetik Retinopati (DR) tanısı olan 224 hasta ve 68 sağlıklı kontrol grubundan aldıkları serum ve vitreus örneklerinden yaptıkları inceleme sonucunda serum ve vitreus fetuin-A konsantrasyonlarının yüksekliği ile DR'nin ortaya çıkışı ve hastalığın ilerleme hızının korele olduğu sonucuna varılmıştır. (143).

Çalışmamızda da kontrol grubuna göre hasta grubunda yüksek çıkmış olması, Chunming Zhao ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki sonuçlara benzemekte olup ERM in de inflamatuvar patogeneze sahip olabileceğini düşündürdü.(151)

Pigment epithelium-derived factor : (PEDF)

(PEDF), RPE 'den salgılanan 50 kDa'lık bir proteindir.Gözdeki diğer hücre tiplerinin yanı sıra retinal nöronları ışıktan, oksidatif stres ve glutamat eksitotoksitesinden koruyan bir proteindir. (152)Güçlü bir antianjiyogenik faktör olarak, PEDF'nin, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile indüklenen retinal mikrovasküler endotel hücre çoğalmasını baskılayarak retina neovaskülarizasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.(153)

Çalışmalar, PEDF'nin makrofaj apoptozisini indüklediğini ve IL-10 ekspresyonunu artırarak anti-enflamatuvar özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur (154,155).

Çalışmamızda da PEDF yi yaklaşık 2 kat fazla bulmamız ERM nin inflamatuvar mekanizmaya sahip olduğunu ve literatürde yapılan çalışmalar ile benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir.(156)

Transtiretin(prealbumin):

Transtiretin (Prealbumin) (TTR), retinolü retinol bağlayıcı proteine bağlayan bir proteindir. (149).Transtiretin ,oküler dokudaki retinal pigment epitel hücreleri (iRPE) tarafından üretilir . TTR üreten iRPE'ler aynı ortamda iRPE'leri de baskılar. TTR'nin, iRPE'lerin çoğalmasını ve neovaskülarizasyonu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. (157,158).

Çalışmamızda transtiretin düzeyi hasta grubunda yüksek bulunmuştur.ERM patogenezi ile direkt ilişkilendirilememiştir.

Apolipoprotein a 1 : APOA1, 243 amino asit kalıntısı olan nispeten büyük bir proteindir. Vazoprotektif HDL [159] ve apolipoprotein E'nin (Apo-E) [160] ana protein bileşenidir . Tserentsoodol ve arkadaşları,APOA1 içeren HDL'nin, zararlı oksitlenmiş lipidleri çıkararak retina içinde lipit taşınmasını kolaylaştırdığını öne sürdüler.(161) Son zamanlarda yapılan pek çok çalışmada, lipid düzeyleri ile diyabetik retinopatinin (DR) patogenezindeki rolü arasındaki ilişki araştırılmıştır. Simó ve arkadaşları[162] DR'li hastaların vitreus içeriklerinde daha yüksek düzeyde APOA1 belgelendirmiştir.Aynı yazarlar RPE'de daha yüksek bir APOA1 mRNA seviyesi bulmuşlardır. Bu, RPE'nin gözde APOA1'in ana kaynağı olarak çalıştığını göstermektedir. Bu çalışma, DR ortamının APOA1'in ekspresyonunu stimüle edebileceğini varsaymaktadır, çünkü APOA1 oksidatif reaktifler için etkili bir temizleyicidir [163]. Simó ve arkadaşları ayrıca, retinal APOA1 üretiminin artmasının, DR'ye karşı koruyucu bir telafi edici mekanizma olduğu kabul edilmiştir.(164)

Bu nedenle, düşük retina APOA1 üretimi olan DR hastalarının, retina lipid birikimi ve sert eksüda oluşum oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir.(165) APOA1 ayrıca tanınmış bir negatif akut faz proteindir, bu nedenle anti-inflamatuar etkilere sahiptir. Çalışmalar APOA1'in inflammatuar yanıt sırasında nötrofil aktivasyonunu ve degranülasyonunu inhibe edebildiğini göstermiştir [166].Liao ve arkadaşları [167], APOA1'in aktif nötrofillerin fibronektine yapışmasını önleyebildiğini, nötrofil oksidasyonunu inhibe edebildiğini, nötrofil degranülasyonunu azaltabildiğini in vitro deneylerle göstermiştir.(168)

Biz bu çalışmamızda negatif akut faz reaktanı olan ve anti enflamatuar fonksiyon gösteren apolipoprotein a y1 hasta grubunda yüksek bulduk.Bu sonuçtan yola çıkarak başından beri ERM patogenezinde inflamasyonun rolünün olduğuna inancımız artmış olup beraberinde farklı mekanizmaları da aktifleştirerek aktivasyonu stimüle ettiğini düşünmekteyiz .

Apolipoprotein A4:Apolipoproteinler (apoproteinler),lipoproteinlerin proetin komponenti olan Apo A,Apo B,Apo C,Apo D ve Apo E dir.

Çalışmamızda hasta grubu ile kontrol grubu arasında çok anlamlı fark olmamakla birlikte hasta grubunda yüksek bulundu.Hastalık patogenezi ile direkt ilişkilendirme yapılamadı.

Prostaglandin : İnsanlarda, prostaglandin H2-D izomeraz, prostaglandin H2'nin, bir nöromodülatör ve merkezi sinir sisteminde yağ asidi biyosentezi için bir trofik faktör olarak işlev gören prostaglandin D2'ye dönüşümünü katalize eder. (169)

Çalışmamızda PDR de anlamlı bulunmuş bir protein olan prostaglandinin hasta grubu olan i ERM grubunda yüksek çıkması patogenezi ile direkt ilişkilendirilememiştir.

Glutasyon Peroksidaz (GPX) :

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler de dahil olmak üzere antioksidan savunma arasındaki dengede bir bozulma olarak tanımlanmaktadır[161,162]. Hücre içi sinyal, transkripsiyon aktivasyonu, hücre proliferasyonu, inflamasyon ve apoptoz gibi hücre fonksiyonlarının uygun şekilde düzenlenmesi için belli bir ROS seviyesi çok önemlidir, ancak daha yüksek miktarlarda ROS makromoleküllere zararlıdır (170) glutasyon peroksidaz (GPX), GPX'ler, organik peroksitleri ve hidrojen peroksiti, glutasyonun çift oksidasyonu yoluyla azaltan selenoproteinlerdir [171,172].Bu proteinlerdeki herhangi genetik polimorfizm ya da enzimatik aksama başta katarakt olmak üzere yaşa bağlı gelişen hastalıkların patogeneziinde rol oynamaktadır.Bizim çalışmamızda da hasta grubunda bu protein yüksek bulunmuş olup epiretinal membran oluşumu sırasında olası oksidatif bir mekanizmanın da tetiklenebileceğini gündeme getirmiş olup bu verinin kanıtlanması adına daha çok seri ile çalışmanın uygun olacağı düşünüldü.

Zinc-alpha-2-glycoprotein:Çinko-alfa-2-glikoprotein (ZAG), ana histo-uyumluluk kompleksi sınıf I protein ailesine ait 41-43 kDa glikoproteindir (172,173). ZAG hücre çoğalmasını engeller ve Cdc2 ekspresyonunu azaltır (hücre döngüsündeki hız sınırlayıcı bir adım) [168] ve bu nedenle ERM ilerlemesi için reaktif bir sınırlayıcı faktör olabilir. Açıkçası, ZAG'ın intraoküler üretimine dahil olan mekanizmalar ve epiretinal membranın patogeneziindeki rolü net ortaya konulamamıştır.

Bizim çalışmamızda çalışma grubunda yüksek bulunmuş olup hücre çoğalmasını sınırlayıcı fonksiyon göstermesinden dolayı reaktif sınırlayıcı faktör olarak artmış olabileceği düşünüldü.

Antitrombin-III :Koagülasyon kaskadı aktivasyonu proliferatif vitreoretinopati (PVR) gelişiminde potansiyel bir faktör olarak tanımlanmıştır [174]. PVR'lı hastalarda daha yüksek intravitreal trombin konsantrasyonları bulunmuştur ve intravitreal trombinin proinflamatuvar ve pro-fibrotik mediatörler üretmek için retina pigment epitel hücrelerini uyardığı gösterilmiştir. [175,176].

Retina pigment epitel (RPE) hücreleri, bu fibroproliferatif membranların oluşumuna sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanması, proliferasyon ve hücre dışı matriks üreten miyofibroblastlara ayrıştırılması yoluyla katkıda bulunur (177).

Çalışmamızda antitrombin 3 düzeylerinin hasta grubunda düşük bulduk ve epiretinal membran gibi inflamasyona bağlı olduğu düşünülen proliferatif süreci nasıl etkilediği ortaya konulamamıştır.

Vitamin D-binding protein : D2 vitamini ve D3 vitamini bağırsaklardan emildikten sonra, D vitamini bağlayıcı proteinler vasıtasıyla dolaşıma geçer.Yağda çözündükleri için yağ dokusunda, deri, karaciğer, bağırsak gibi birçok dokunun lipid bileşenlerinde yer aldıkları gösterilmiştir.(178) D vitamininin tüm şekilleri serumda D vitamini bağlayıcı proteine (DVBP) bağlanarak taşınır; sadece %1-3'ü serbest olarak bulunur (179)

D vitamini bağlama proteini (DBP),molekül ağırlığı 52-59 kDa olan bir molekül a2-globülinidir ve başlangıçta Hirschfeld tarafından 1959 'da plazmanın a2- globülin kısmından izole edilmesinin ardından "gruba özgü bileşen "(Gc) olarak adlandırılmıştır.(180)

Yapılan çalışmalarda 13 proteinden, a-2-makroglobulin ,seruloplazmin ,a-fetoprotein , D vitamini bağlayıcı protein , α -1-antitripsin , a-1glikoprotein, hemopeksin , apolipoprotein içeren 9 proteinA-1 ve A-IV, sadece ROP hastalarının vitreus örneklerinde bulunmuştur. (181)

Yaptığımız çalışmamız da bu proteini düşük bulmuş olup etyolojik olarak aydınlatamadık ancak daha ileri ve destekleyici çalışmalar ile ilişkilendirilebileceğini düşündük.

Complement C3, Complement 4-A, Complement C 4-B:

Kompleman bileşenleri neovaskülarizasyona kendi başlarına değil, inflamatuvar hücreler *yoluyla* aracılık eder (175)Bir OIR fare modelinde gösterildiği gibi, tamamlayıcı faktörler C3a ve C5a, makrofajları C3aR ve C5aR'ye bağlayarak aktive eder, böylece anjiyogenez düzenlediği gösterilmiştir(182).

Çalışmamızda kompleman proteinlerinin hasta grubunda düşük oluyor olması anti inflamatuvar mekanizmanın aktif olduğunu destekler bulgu olup beklenen bulgudur.

Retinol bağlayıcı proteinin (RBP4) : Apolipoprotein A1'in (APOA1) ve retinol bağlayıcı proteinin (RBP4), regmatojen retina dekolmanı (RRD) olan hastaların vitröz örneklerinde daha fazla yoğunlaştığı başarılı bir şekilde gösterilmiştir.(183) Bu, kan-retinal bariyer yıkımı veya retina fonksiyon bozukluğunun ciddiyetinin bir yansıması olabilir. Bununla birlikte, RBP4, lipitte çözünen vitaminlerin taşınmasından sorumlu bir nakil proteini olarak rol oynayan, karaciğerde sentezlenmiş bir adipokindir ve RBP4'ün retina fonksiyon bozukluğuna ve dejenerasyonuna katkıda bulunabileceği bildirilmiştir .(184)

Çalışmamızda hasta ve kontrol grup arasında çok fazla fark bulunmamakla birlikte mevcut bilgiler dahilinde hastalık patogenezi ile ilişkilendirme yapılamamıştır.

Immunoglobulin kappa constant: İmmünoglobulin ağır zincirlerinin sabit bölgesi,B lenfositleri tarafından üretilen membrana bağlı veya salgılanmış glikoproteinlerdir. Hümorale immünitenin tanınması aşamasında, membrana bağlı immünoglobulinler, spesifik bir antijenin bağlanması üzerine, B lenfositlerinin immünoglobulinleri salgılayan plazma hücrelerine klonal genişlemesini ve farklılaşmasını tetikleyen reseptörler olarak hizmet eder (185).

Immunoglobulin kappa constant protein, hücre proliferasyonu ve ölümü ve metabolik fonksiyonun kontrolü de dahil olmak üzere, gözün retinası içinde bir iç dengenin korunmasında yer alan bir doku homeostatik prosesi yolağına dahildir.(186).

Immunoglobulin kappa constant bizim çalışmamızda çalışma grubunda daha düşük bulunmuştur. Retina iç dengesinin korunmasında (187) rol alan Immunoglobulin kappa constant seviyesinin ERM hastalarında az olması etyopatolojisinde rol alabileceğini düşündürmektedir.

Optisin: Optisin, vitreus içeriğinde kollajen fibrilleri ile ilişkili bir glikoproteindir. Optisin, pigment olmayan siliyer epitel tarafından posterior vitreusa salgılanır. (199).Opticinin işlevleri hakkında çok az şey bilinmektedir, ancak heparan ve kondroitin sülfat glikozaminoglikanlar ve retina büyüme hormonu ile etkileşime girdiği bildirilmiştir.(200).Optisinin vitreus kollajen fibrilleri ile birlikte organize olduğu gösterilmiştir.(201)Optisin, ayrıca, insan gözünde daha önce gözlemlendiği gibi, ILM ve lens kapsülünde lokalizedir.(202).Ayrıca, nörosensör retinada, özellikle iç katmanlarında, daha önce sıçanlarda gösterilen verileri doğrular şekilde düşük seviyelerde optisin tespit edilmiştir. (188).

Trabeküler ağ örgüsünde de optisin gözlenip, insan gözündeki gözlemleri doğrulamıştır. (189) Erişkinlerde genç gözlere göre daha belirgin bulunmuştur ve yaşa bağlı birikim göstermiştir. Çalışmamızda gruplar arasında anlamlı fark çıkmamıştır.

α_1 -Antikimotripsin:Serin proteinaz inhibitörü (serpin) ailesinin bir üyesidir.(204)Son zamanlarda, α_1 -antichymotrypsin Alzheimer hastalığı ile bağlantılı nörofibriler plakların bir ana bileşen olarak tespit edilmiştir ve *in vitro* çalışmalar, amiloid-fibril oluşumu oranını arttırdığını göstermiştir. (190)

Yaptığımız çalışmada hasta grubunda düşük bulunmuştur hastalık grubu ile tam ilişkisi bilinmemektedir.

Hastalıkların patogenezini anlamada kullanılan proteomik dataları sistem biyolojisi yaklaşımı ile incelemek daima avantajlı olup, görülen değişimlerin organizmayı hangi moleküler düzeyde etkilediğini göstermektedir. Biz de bu amaçla elde ettiğimiz verileri biyoinformatik araçlar kullanarak değerlendirdik. Yaptığımız PANTHER analizinde seviyelerinde değişiklik gördüğümüz proteinlerin daha ziyade bağlama ve katalitik aktivite gösteren proteinler olduğunu ve birçok farklı proseste rol alabileceklerini gördük. Buradan çıkardığımız sonuç, bu proteinlerin multifonksiyonel proteinler olup organizmanın metabolizmasında merkezi rol oynadıkları gerçeğidir Araştırmamızı bir ileri seviyeye çekip STRING yazılımı ile derinleştirdiğimizde hastalık patogenezini aydınlatmada daha yardımcı olacağını düşündük. Aynı analiz metodu ile bulunan proteinlerin ve bu proteinlerin etkileştiği proteinlerin gözün yapısal öğelerinden olduğu veya bu öğelerin oluşumunda etki ettiği gösterildi. Bunlar içerisinde en öne çıkan ve dikkatimizi çeken moleküler olay plazma lipoprotein partikül temizlenme olaylarıdır. Bu nedenle bu hastalığın patolojisinin daha derinlemesine yapılabilmesi için çalışma modalitesi tasarlanması ve endositik yolak ativitesinin derinlemesine araştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

ERM tanısı konulan daha önce cerrahi uygulanmamış ve ek retinal, sistemik hastalığı olmayan hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun yine bu grupta da ek sistemik hastalık olmayan sağlıklı bireylerden alınan vitreus örneklerinin protein içeriği proteomiks yöntemiyle kıyaslanarak ERM etyopatolojisi ve olabilecek yeni tedavi hedefleri araştırılmıştır. ERM ve sağlıklı kontrol grubunun vitreus örneklerinin yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 24 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre ERM grubunda Alpha-1-antitrypsin, Vitamin D-binding protein, Complement C3, Complement C4-B, Complement C4-A, Retinol-binding protein 4, Beta-crystallin B2, Ig kappa chain C region, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain, Alpha-1-antichymotrypsin, Opticin düzeylerinde azalma, Alpha-1-antitrypsin , Lambda-crystallin homolog , Alpha-2-HS-glycoprotein , Pigment epithelium-derived factor , Transthyretin , Prostaglandin-H2 D-isomerase , Apolipoprotein A-I , Glutathione peroxidase 3 , Beta-crystallin A3 , Zinc-alpha-2-glycoprotein , Apolipoprotein A-IV , Ig gamma-1 chain C region düzeyinde artma görüldü.

Elde edilen veriler, yapılan biyoinformatik analizler ile birleştirildiğinde ERM gelişiminde rol alan inflamatuvar mediyatörler dışında bahsettiğimiz proteinlerin de etkili olabileceği görülmüştür. Bu yapısal proteinlerin seçici regülasyonunun etyopatolojide yeni fikirler verebileceği gibi buna bağlı olarak da tedavi modaliteleri geliştirme konusunda da umut ışığı olabileceği düşünülmektedir.

ERM' nın günümüzdeki tedavisi ve ERM tanılı insan vitreus modellerinin proteomiks çalışmalarının literatürdeki sayıları sınırlıdır. Bu çalışma literatüre bu anlamda bir katkı sağlamakla birlikte, bu hastalığın patolojisinin daha ayrıntılı olarak anlaşılabilmesine yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

ÖZGEÇMİŞ

Uzm. Dr. FATMA SÜMER (Göz Hastalıkları Uzmanı)

Adres: Gazanfer Bilge Bulvarı Erenler Cedit Sitesi C3 Blok Kat: 5 Daire : 21
İZMİT/KOCAELİ [E-posta:fatmasumer_@hotmail.com](mailto:fatmasumer@hotmail.com)

ÜYELİKLER

Türk Oftalmoloji Derneği

YABANCI DİLLER

İngilizce: iyi

EĞİTİM

Merkez İlköğretim Okulu GÖLHİSAR 1995-1996

Suna Uzal İlköğretim Okulu BURDUR 1996-2002

Adile Mermerci Anadolu Lisesi 2002-2006 Zeytinburnu/İSTANBUL

Tıp Eğitimi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi , BURSA, 2007-2013

Uzmanlık Eğitimi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Kliniği 09.07.2014-
12.4.2019

Üye Olduğu Dernekler: Türk Oftalmoloji Derneği

İş Deneyimleri :

- Gölhisar Devlet Hastanesi Kasım 2013-Aralık 3013
- Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Asistan Doktor (TEMMUZ 2014- NİSAN 2019).

7. KAYNAKÇA

- 1.) Smiddy WE, Maguire AM, Green WR, Michels RG, de la Cruz Z, Enger C, Jaeger M, Rice TA. Idiopathic epiretinal membranes. Ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Ophthalmology*. 1989 Jun;96(6):811-20; discussion 821
- 2.) Wiznia RA. Natural history of idiopathic preretinal macular fibrosis. *Ann Ophthalmol*. 1982;14:876-8
- 3.) Pearlstone AD. The incidence of idiopathic preretinal macular gliosis. *Ann Ophthalmol*. 1985;17:378-80).
- 4.) Michels RG. A clinical and histopathologic study of epiretinal membranes affecting the macula and removed by vitreous surgery. *Trans Am Ophthal Soc*. 1982;80:580-656).
- 5.) Mandal N, Kofod M, Vorum H, et al. Proteomic analysis of human vitreous associated with idiopathic epiretinal membrane. *Acta Ophthalmologica*. 2013;91(4):e333–e334
- 6.) Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from CIPHERGEN Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans*. Apr 2002;30(2):82-87.
- 7.)Dilek G;Retina Ve Optik Sinirin Anatomisi Ve Fiziyojisi: Turkiye Klinikleri JOphthalmol-Special 6 Topics 2009;2(3)
- 8.) Özgür Y;Makula Anatomisi, Histolojisi Ve Fiziyojisi: Tur Ki Ye Kli Nik Le Ri JOphthalmol-Special Topics 2013;6(1):1-4
- 9.) Massey SC. Functional Anatomy Of The Mammalian Retina. Section 1, Part 4,Vol 1 Hinton DR. Basic Science And Inherited Retinal Disease, In: Ryan SJ. Re Tina 4th Ed, China, Elsevier Mosby; 2006. P.48-82.
- 10.) Thumann G, Hoffman S, Hinton DR. Cell Biology Of The Retinal Pigment Epithelium. Section 1, Part 7, Vol 1 Hinton DR. Basic Science And Inherited Retinal Disease, In: Ryan SJ. Retina 4th Ed, China, Elsevier Mosby; 2006. P.137-52.
- 11.) American Academy Of Ophthalmology, Basic And Clinical Science Course, Section 12, Part1, LEO. Fundamentals And Diagnostic Approaches. Retina And Vitreous;2005. P.7-16
- 12.) American Academy Of Ophthalmology, Basic And Clinical Science Course, Section 5, Chapter 1, LEO, Neuroophthalmologic Anatomy, Neuroophthalmology; 2005. P.5-28.

- 13.) Sharma RK, Ehinger BEJ. Development And Structure Of The Retina. In: Kaufman PL, Alm A. Eds. Adler's Physiology Of The Eye, 10th Ed. St Louis: Mosby; 2003. P.319-47.
- 14.) Oyster C. Retinal III: Regional Variation And Spatial Organization. In: Oyster C. Ed. The Human Eye-Structure And Function, Sunderland:Sinauer Associates; 1999. P.649-700.
- 15.) Green WR: Vitreoretinal Interface. In Ryan SJ (Ed). Retina. Vol III. St Louis: Mosby, 2000:1882–1960
- 16.) Foos RY: Ultrastructural Features Of Posterior Vitreous Detachment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1975;196:103
- 17.) Fine B: Limiting Membranes Of The Sensory Retina And Pigment Epithelium. An Electron Microscopic Study. Arch Ophthalmol 66:847--60, 1961
- 18.) American Academy Of Ophthalmology, Basic And Clinical Science Course, Section 5, Chapter 1, LEO, Neuroophthalmologic Anatomy.
- 19.) Neuroophthalmology; 2005. P.5-28. . American Academy Of Ophthalmology, Basic And Clinical Science Course, Section 2, Fundamentals And Principles Of Ophthalmology; 2005. P.76-83.
- 20.) Chen J, Geller S, Flannery. Structure And Function Of Rod Photoreceptors. Section 1, Part Vol 1 Hinton DR. Basic Science And Inherited Retinal Disease, In: Ryan SJ. Retina 4th Ed, China, Elsevier Mosby; 2006. P.153-70.
- 21.) Miller RF. The Physiology And Morphology Of The Vertebrate Retina Section 1, Part 9, Vol 1 Hinton DR. Basic Science And Inherited Retinal Disease, In: Ryan SJ. Retina 4th Ed, China, Elsevier Mosby; 2006. P.171-205.
- 22.) Principles And Practice Of Ophthalmology. Basic Sciences. Al Bert & Jacobi Ec WB Saunders Company, Philadelphia, 1994.
- 23.) Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human Photoreceptor Topography. J Comp Neurol 1990;292(4):497-523.
- 24.) Hendrickson AE. Morphological Development Of The Primate Retina. In: Simons K, Ed. Early Visual Development, Normal And Abnormal. New York: Oxford University; 1993. P. 287-95
- 25.) Hendrickson AE. Primate Foveal Development: A Microcosm Of Current Questions In Neurobiology. Recent Developments. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35(8):3129-33
- 26.) Provis JM, Diaz CM, Dreher B. Ontogeny Of The Primate Fovea: A Central Issue In Retinal Development. Prog Neurobiol 1998;54(5):549- 80

- 27.) Harris A, Bingaman D, Ciulla TA, Martin B. Retinal And Choroidal Blood Flow In Health And Disease. Section 1, Part 5, Vol 1 Hinton DR. Basic Science And Inherited Retinal Disease, In: Ryan SJ. Retina 4th Ed, China, Elsevier Mosby; 2006. P.83-102.
- 28.) Thum Ann G, Hoffman S, Hinton DR. Cell Biology Of The Retinal Pigment Epithelium Section 1, Part 7, Vol 1 Hinton DR. Basic Science And Inherited Retinal Disease, In: Ryan SJ. Retina 4th Ed, China, Elsevier Mosby; 2006. P.137-52.
- 29.) Julia B, Dahmen G, Zeigler A, et al.: Internal limitan membrane peeling with indocyanine green or trypan blue in macular hole surgery. Arch Ophthalmol. 2007;125:326-332
- 30.) Mutlu F, Leopold IH: Structure Of The Hum An Retinal Vascular System. Archophthalmol 1986;71:93.
- 31.) J.Sebag Ve Kenneth M.P.Yee, Vitreus: From Biochemistry To Clinical Relevance, In Duane's Ophthalmology On CD-ROM 2006, Lippincott, Found. Vol. 1 Chapter 16
- 32.) Banach MJ, Hassan TS, Cox MS, Et Al: Clinical Course And Surgical Treatment Of Macular Epiretinal Membranes In Young Subjects. Ophthalmology 108:23--6, 2001
- 33.) Serap K, Leyla A, Epiretinal Membranlar :Ret-Vit 1994 ; 2:214-9
- 34.) Mcdonald HR, Schatz H: Inrtaduction To Epiretinal Membranes. In Ryansj, Schachatap, Murpy RP, Patz A Eds. Retina The CV. Mosby Co , St Louis 1989 Vol2 ;P 789
- 35.) Michels RG: Macular Pucker. In Ryansj, Glaser BM, Michels RG Eds. Retina The CV. Mosby Co , St Louis 1989 Vol3 ;P 419
- 36.) Kanski JJ: Clinical Ophthalmology. Toppan Printing Co Hong Kong 1989;P:361
- 37.) Basar D, Türker D, Öngör E, Gücükoğlu A, Soyly T ve Ark.: Makula Kırışıklıkları. TOD XII. Ulus. Kong. Bülteni 1980;S78
- 38.) Peksayar G; Vitreoretinal Yüzey Patolojileri; T Oft. Gaz. 1989;19:156
- 39.) Po-Yen L, Kai-Chun C, Wen-Chuan W; Anatomic And Functional Outcome After Surgical Removal Of İdiopathic Macular Epiretinal Membrane: Kaohsiung Journal Of Medical Sciences (2011) 27, 268-275
- 40.) Gass. Stereoscopic Atlas Of Macular Disease. St Louis, MO: Mosby-Year Book; 1987.
- 41.) Çiğdem A, Hülya G, Eylem YAMAN P ; Primer Ve Sekonder Epiretinal Membranların Optik Koherens Tomografi Bulgularının Karşılaştırılması: Ret-Vit 2009;17:263-268

- 42.) Klein R, Klein BE, Wang Q, Moss SE. The Epidemiology Of Epiretinal Membranes. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994;92:403-25
- 43.) Mitchell P, Smith W, Chey T, Wang JJ, Chang A. Prevalence And Associations Of Epiretinal Membranes. The Blue Mountains Eye Study,Australia. *Ophthalmology* 1997;104(6):1033-40
- 44.) Mcdonald HR, Johnson RN, Ai E, Et Al.: Macular Epiretinal Membranes. In *Retina*. Ed. Ryan SJ. 2006;3:2509-2525
- 45.) Fraser-Bell S, Guzowski M, Rochtchina E, Et Al.: Five-Year Cumulative Incidence And Progression Of Epiretinal Membranes: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2003;110:34-40
- 46.) Kawasaki R, Wang JJ, Mitchell P, Et Al, Singapore Malay Eye Study Group. Racial Difference In The Prevalence Of Epiretinal Membrane Between Caucasians And Asians. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1320-4
- 47.) Hasanreisoglu B.: Epiretinal Membranlar. *Ret-Vit*. 2001;9:8-12.
- 48.) Kaynak S.;Vitreomaküler Traksiyon Sendromu Ve Epiretinal Membranlarda OCT: Tanı Ve Takipteki Önemi:*Ret-Vit*. 2009;17: 1-8.
- 49.) Köksal S, Atmaca L.: Epiretinal Membranlar. *Ret-Vit*. 1994;2: 214-219.
- 50.) Pournaras CJ, Donati G, Brazitikos PD, Et Al.: Macular Epiretinal Membranes. *Seminars In Ophthalmology*. 2000;15:100-107.
- 51.) Özlem A, Coşar B, Gamze M, Solmaz Ö, Nilüfer B Epiretinal Membran Ve Makula Deliği Cerrahisinde Tripan Mavisini Kullanımı *Ret - Vit* 2004; 12 : 45-4.
- 52.) Michels RG.: Vitrectomy For Macular Pucker. *Ophthalmology* 1984; 91:1384-1388
- 53.) Lobes LD Jr, Burton TC: The Incidence Of Macular Pucker After Retinal Detachment Surgery. *Am J Ophthalmol* 1978; 85: 72-78
- 54.) CALVIN SZE-UN F, PAUL M, ELENA R, THOMAS H, TANIA DE L,AND JIE JIN W ;Incidence And Progression Of Epiretinal Membranes In Eyes After Cataract Surgery: *Am J Ophthalmol* 2013;156:312-318
- 55.) Kleinr,Kleinbe,Wangq,Mossse.The Epidemiology Of Epiretinal Membranes. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994;92:403-425
- 56.) Appiah AP, Hirose T. Secondary Causes Of Premacular Fibrosis. *Ophthalmology* 1989;96(3):389-392
- 57.) Jahn CE, Minich V, Moldaschel S, Et Al. Epiretinal Membranes After Extracapsular Cataract Surgery. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(5):753-760

- 58.) Ching Hui N, Ning C, Jie Jin W, Amirul F. M. I, Ryo K, Stacy M. M, Mary Frances C, Barbara E. K.K, Ronald K, Tien Yin W, Phd; Prevalence And Risk Factors For Epiretinal Membranes In A Multi-Ethnic United States Population: *Ophthalmology* 2011;118:694-699
- 59.) Fraser-Bell S, Ying-Lai M, Klein R, Varma R, Los Angeles Latino Eye Study Group.
- 60.) Mccarty DJ, Mukesh BN, Chikani V, Et Al. Prevalence And Associations Of Epiretinal Membranes In The Visual Impairment Project. *Am J Ophthalmol* 2005;140:288 –94
- 61.) Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M, Et Al. Prevalence And Risk Factors For Epiretinal Membranes In A Japanese Population: The Hisayama Study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241:642– 6
- 62.) You Q, Xu L, Jonas JB. Prevalence And Associations Of Epiretinal Membranes In Adult Chinese: The Beijing Eye Study. *Eye (Lond)* 2008;22:874 –9.
- 63.) Kawasaki R, Wang JJ, Sate H, Et Al. Prevalence And Associations Of Epiretinal Membranes In An Adult Japanese Population: The Funagata Study. *Eye (Lond)* 2009;23:1045–51.
- 64.) Klein R, Klein BE, Wang Q, Moss SE. The Epidemiology Of Epiretinal Membranes. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994;92:403–25; Discussion 425–30.
- 65.) Nuno L. G, Inigo C, Howard F. F, And Stanley C; Subfoveal Pigment Changes In Patients With Longstanding Epiretinal Membranes: *Am J Ophthalmol* 2009;147:865–868.
- 66.) Kampik A, Green WR, Michels RG, Nase PK: Ultrastructural Features Of Progressive Idiopathic Epiretinal Membrane Removed By Vitreous Surgery. *Am J Ophthalmol* 1980, 90: 797-809.
- 67.) Miller B: Epiretinal Macular Membranes: Pathogenesis And Treatment. *Dev Ophthalmol* 1997, 29:61-3.
- 68.) Trese M, Chandler DB, Machemer R: Macular Pucker. II. Ultrastructure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1983, 221:16-26
- 69.) Smiddy WE, Maguire AM, Green WR, Et Al.: Idiopathic Epiretinal Membranes. Ultrastructural Characteristics And Clinicopathologic Correlation. *Ophthalmolgy* 1989;96: 811-820.
- 70.) Mori K, Gehlbach PL, Sano A, Et Al.: Comparison Of Epiretinal Membranes Of Differing Pathogenesis Using Optical Coherence Tomography. *Retina*. 2004;24:57-62
- 71.) Immonen I, Vaheri A, Tommila P, Et Al.: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1996;234:664-669.

- 72.) Michels RG.: A Clinical And Histopathologic Study Of Epiretinal Membranes Affecting The Macula And Removed By Vitreous Surgery. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1982;80:580-656.
- 73.) Foos RY.: Vitreoretinal Junkture-Simple Epiretinal Membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1974;189:231-250
- 74.) Pournaras CJ, Donati G, Kapetanios AD, Et Al.: Miyofibroblastes Et Membranes Fibrovasculaires Retiniennes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1998;212:356-358.
- 75.) C. Harada Et Al.; The Role Of Cytokines And Trophic Factors In Epiretinal Membranes:Involvement Of Signal Transduction In Glial Cells :*Progress In Retinal And Eye Research* 25 (2006) 149–164.
- 76.) Fatih H, Ateş Y, Erkan Ç, Ahmet F. N; Maküler Epiretinal Membranlarda İç Limitan Membran Soyulması: *Ret - Vit* 2005; 13 : 99-102.
- 77.) Mcdonald HR, Verre WP, Aaberg TM: Surgical Management Of İdiopathic Epiretinal Membranes. *Ophthalmology* 1986;93:978-983.
- 78.) Burke JM, Smith JM: Retinal Proliferation In Response To Vitreous Hemoglobin Or Iron Invest *Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20: 582-592.
- 79.) Hogg, P.A., Grierson, I., Hiscott, P., 2002. Direct Comparison Of The Migration Of Three Cell Types Involved In Epiretinal Membrane Formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2749–2757.
- 80.) Ji Hyun K, Yong Min K, Eun Jee C, Soo Young L, And Hyoung Jun K;Structural And Functional Predictors Of Visual Outcome Of Epiretinal Membrane Surgery:*Am J Ophthalmol* 2012;153:103–110.
- 81.) Mcdonald HR, Johnson RN, Ai E, Jum Per JM,Fu AD. Macular Epiretinal Membranes In Ryans Retina. In: Wilkinson CP, Vol III, Chap.147. 4th Ed. Philadelphia; Elsevier Mosby: 2001. P.2509-25
- 82.) King L, Joshi JS, Wirotsko WJ, Mieler WF. Epiretinal Membranes In Macular Surgery. In: Quiroz Mercado H, Alfaro III VD, Ligget PE, Tano Y, De Juan E. Jr.; Chap.14. Philadelphia; Lippincott Williams: 2000. P.166-78
- 83.) Pessin SR, Olk RJ, Grand MG, Et Al.: Vitrectomy For Premacular Fibroplasia: Prognostic Factors, Long-Term Follow-Up, And Time Course Of Visual Improvement. *Ophthalmology* 1991; 98: 1109-1114.
- 84.) Park DW, Dugel PU, Garda J, Et Al.: Macular Pucker Removal With And Without Internal Limiting Membrane Peeling: Pilot Study. *Ophthalmology* 2003; 110: 62-64

- 85.) Akinari Et Al. Correlation Between Metamorphopsia And Epiretinal Membrane Optical Coherence Tomography Findings: *Ophthalmology* 2009;116:1788–1793
- 86.) Michels RG. Vitreous Surgery For Macular Pucker. *Am J Ophthalmol* 1981;92:628—39
- 87.) Arimura E, Matsumoto C, Okuyama S, Et Al. Retinal Contraction And Metamorphopsia Scores In Eyes With Idiopathic Epiretinal Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2961–6.
- 88.) Niwa T, Terasaki H, Kondo M, Et Al. Function And Morphology Of Macula Before And After Removal Of Idiopathic Epiretinal Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1652–6
- 89.) Chota Matsumoto Et Al. Quantification Of Metamorphopsia In Patients With Epiretinal Membranes, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44: 4012-4016
- 90.) Charles S, Calzada J, Wood B. Epimacular Membranes In Vitreous Microsurgery. 4th Ed. Philadelphia; Lippincott Williams And Wilkins: 2007. P.149-55
- 91.) Kamei M, Hisatomi T, Ishibashi T, Tano Y. Epiretinal Membranes. Chapter 16. In *Retinal Imaging*. Huang D, Peter KK, Careen YL, Elias IT. China. MOSBY Elsevier. 2006, 191-197
- 92.) Courtney L. K P. Kumar R, Rajendra S. A, Phd; Effect Of Preoperative Vitreous Status On Visual Outcomes Following Vitrectomy For Epiretinal Membrane Repair: *Can J Ophthalmol* 2011;46:186–90
- 93.) Grewing R, Mester U: Results Of Surgery For Epiretinal Membranes And Their Recurrences. *Br J Ophthalmol* 80: 323--6, 1996
- 94.) Wilkins JR, Puliafito CA, Hee MR, Et Al. Characterization Of Epiretinal Membranes Using Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 1996;103: 2142-51
- 95.) Snead MP, Snead DR, James S, Et Al. Clinicopathological Changes At The Vitreoretinal Junction: Posterior Vitreous Detachment. *Eye*. 2008;22:1257–62
- 96.) Yamamoto T, Akabane N, Takeuchi S. Vitrectomy For Diabetic Macular Edema: The Role Of Posterior Vitreous Detachment And Epiretinal Membrane. *Am J Ophthalmol*. 2001;132:369–77
- 97.) Ali Osman S, Ferit Hakan Ö, Aylin Y; Vitreus hastalıkları ve vitrektomi cerrahisi: *Temel Göz Hastalıkları* 2. Baskı 2011, 611-625
- 98.) Novak MA, Welch RB: Complications Of Acute Symptomatic Posterior Vitreous Detachment. *Am J Ophthalmol* 1984;97:308

- 99.) Akiba J, Yoshida A, Trempe CL. Prognostic Factors In Idiopathic Preretinal Macular Fibrosis. *Graefesarch Clin Exp Ophthalmol* 1991;229:101-104
- 100.) Miller KM, Albert DR, Asbell PA, Atebara NH, Schechter RJ, Wang MX, Morse C, Optical Coherence Tomography, Telescopes And Optical Instrum Ents, Chapter 9, Clinical Optics, Section 3, Basic And Clinical Science Course, Denny M, Taylor F, Eds, San Francisco, American Academy Of Ophthalmology, 2005-2006, 322-325.
- 101.) Mavrofides EC, Rogers HA, Truong S, Puliofito C, Fujimoto JG. Vitreoretinal Interface Disorders In Optical Coherence Tomography Of Ocular Diseases. In: Schum An JS, Puliofito C, Fujimoto JG. 2nd Ed. Slack Inc, Thorofare 2004. P.57-101.
- 102.) Mitamura Y, Hirano K, Baba Y, Yamamoto S. Correlation Of Visual Recovery With Presence Of Photoreceptor Inner/Outer Segment Junction In Optical Coherence Images After Epiretinal Membrane Surgery. *Br J Ophthalmol* 2009;93:171-5
- 103.) Suh MH, Seo JM, Park KH, Yu HG. Associations Between Macular Findings By Optical Coherence Tomography And Visual Outcomes After Epiretinal Membrane Removal. *Am J Ophthalmol* 2009;147(3):473-480
- 104.) Pascale M, Cecile A, Belkacem H; Optical Coherence Tomography Of Idiopathic Macular Epiretinal Membranes Before And After Surgery: *Am J Ophthalmol* 2000;130:732–739.
- 105.) Schmidt-Erfurth U, Leitgeb RA, Michels S, Et Al. Three-Dimensional Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography Of Macular Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:3393–3402.
- 106.) Inoue M, Morita S, Watanabe Y, Et Al. Inner Segment/Outer Segment Junction Assessed By Spectral-Domain Optical Coherence Tomography In Patients With Idiopathic Epiretinal Membrane. *Am J Ophthalmol* 2010;150:834-839.
- 107.) Ooka E, Mitamura Y, Baba T, Et Al. Foveal Microstructure On Spectral-Domain Optical Coherence Tomographic Images And Visual Function After Macular Hole Surgery. *Am J Ophthalmol* 2011;152:283–90
- 108.) Wakabayashi T, Fujiwara M, Sakaguchi H, Et Al. Foveal Microstructure And Visual Acuity In Surgically Closed Macular Holes: Spectral-Domain Optical Coherence Tomographic Analysis. *Ophthalmology* 2010;117:1815–24.
- 109.) Shimozono M, Oishi A, Hata M, Et Al. The Significance Of Cone Outer Segment Tips As A Prognostic Factor In Epiretinal Membrane Surgery. *Am J Ophthalmol* 2012;153:698 – 704.

- 110.) Akira S, Jiro K, Gerd K, Et Al. Phd; Photoreceptor Outer Segment Length: A Prognostic Factor For Idiopathic Epiretinal Membrane Surgery : Ophthalmology 2013;120:788–794
- 111.) Brar M, Yuson R, Kozak I, Et Al. Correlation Between Morphologic Features On Spectral-Domain Optical Coherence Tomography And Angiographic Leakage Patterns In Macular Edema. Retina. 2010;30: 383–389.
- 112.) E Cobos, L Arias, JM Ruiz-Moreno Et Al.; Preoperative Study Of The Inner Segment/Outer Segment Junction Of Photoreceptors By Spectral-Domain Optical Coherence Tomography As A Prognostic Factor In Patients With Epiretinal Membranes: Clinical Ophthalmology 2013;7 1467–1470
- 113.) MASATAKA S, AKIO O, MASAYUKI H, TAKA AKI M Et Al.; The Significance Of Cone Outer Segment Tips As A Prognostic Factor In Epiretinal Membrane Surgery: Am J Ophthalmol 2012;153:698–704
- 114.) JAE SUK K, JAY C, CANDY K. C Et Al.; Retinal Adherence And Fibrillary Surface Changes Correlate With Surgical Difficulty Of Epiretinal Membrane Removal: Am J Ophthalmol 2012;153:692–697
- 115.) ERI N, FMM IO S, CHIEKO S, KOUKI F, AYANA Y AND ATSUSHIF; Displacement Of The Retina And Its Recovery After Vitrectomy In Idiopathic Epiretinal Membrane: Am J Ophthalmol 2013;155:1014-1020
- 116.) Kofod M, La Cour M. Quantification Of Retinal Tangential Movement In Epiretinal Membranes. Ophthalmology 2012; 119(9):1886–1891.
- 117.) Wong JG, Sachdev N, Beaumont PE, Chang AA. Visual Outcomes Following Vitrectomy And Peeling Of Epiretinal Membrane Clin Experiment Ophthalmol 2005;33:373–8
- 118.) Haritoglou C, Eibl K, Schaum Berger M, Et Al. Functional Outcome After Trypan Blue-Assisted Vitrectomy For Macular Pucker: A Prospective, Randomized, Comparative Trial. Am J Ophthalmol 2004;138:1–5
- 119.) Thompson JT. Epiretinal Membrane Removal In Eyes With Good Visual Acuities. Retina 2005;25:875-882.
- 120.) Meyer CH, Rodrigues EB, Mennel S, Et Al: Spontaneous Separation Of Epiretinal Membrane In Young Subjects: Personal Observations And Review Of The Literature. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 242:977--85, 2004
- 121.) Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from CIPHERGEN Biosystems: a novel

- proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans.* Apr 2002;30(2):82-87.
- 122.) Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer.* Apr 2003;3(4):243-
- 123.) Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* Aug 2006;24(8):971-983.
- 124.) G M-V. *Proteomics principles and Challenges*2004.
- 125.) Moore CA, Khoury MJ, Bradley LA. From genetics to genomics: using gene-based medicine to prevent disease and promote health in children. *Semin Perinatol.* Jun 2005;29(3):135-143.
- 126) Mol Biosyst. 2014 Oct;10(10):2558-66.
doi10.1039/c4mb00240g.Vitreous proteomic analysis idiopathic epiretinal membranes Yu J¹, Feng L, Wu Y, Wang H, Ba J, Zhu W, Xie C.
- 126.) Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.* 1972;26:3-27.
- 127.) Risk Factors and Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration , Prog Retin Eye Res. 2016 Sep; 54: 64–102. Published online 2016 May 6. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.003
- 128.) Stefansson E (2009) Physiology of vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247: 147–163
- 129.) Primhak RA, Tanner MS. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Arch Dis Child* 2001; 85(1): 2-5.
- 130.) Massi G, Chiarelli C. Alpha 1-antitrypsin: molecular structure and the Pi system. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 393: 1-4.
- 131.) Simsek H, Pinar A, Altinbas A, Alp A, Balaban YH, Buyukasik Y ve ark. Cutoff level to detect heterozygous alpha 1 antitrypsin deficiency in Turkish population. *J Clin Lab Anal* 2011; 25(4): 296-299.
- 132.) Hutchison DC. Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med* 1998; 92(3): 367-377.
- 133.) Alpha-1-antitrypsin ameliorates inflammation and neurodegeneration in the diabetic mouse retina *Experimental Eye Research* Volume 174, September 2018, Pages 29-39)

- 134.) Human alpha 1-antitrypsin protects neurons and glial cells against oxygen and glucose deprivation through inhibition of interleukins expression *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* Volume 1862, Issue 9, September 2018, Pages 1852-1861
- 135.) The Molecular Refractive Function of Lens γ -Crystallins Author links open overlay panel Huaying Zhao¹ Patrick H. Brown² M. Teresa Magone¹ Peter Schuck¹
- 136.) H. Bloemendal, W. de Jong, R. Jaenicke, N.H. Lubsen, C. Slingsby, A. Tardieu
137. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 86 (2004), pp. 407-485
- 138.) The Structure and Stability of the Disulfide-Linked γ S-Crystallin Dimer Provide Insight into Oxidation Products Associated with Lens Cataract Formation Author links open overlay panel David C. Thorn[†] Aidan B. Grosas[†] Peter D. Mabbitt¹ Nicholas J. Ray Colin J. Jackson John A. Carver
- 139.) A. Pande, J. Pande, N. Asherie, A. Lomakin, O. Ogun, J.A. King, N.H. Lubsen, D. Walton, G.B Benedek
- 140.) Molecular basis of a progressive juvenile-onset hereditary cataract *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (2000), pp. 1993-1998
- 141.) *J Biol Chem.* 2018 Nov 16; 293(46): 18010–18011. doi: 10.1074/jbc.H118.006240
- 142.) Barron ve diğerleri, 1988 ; Bergauer, 1991 ; Giblin ve diğerleri, 2002 ; Simpanya ve diğerleri, 2008
- 143.) UniProt: the universal protein knowledgebase: The UniProt Consortium.
- 144.) Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J*, 2003; 376: 135–45
- 145.) Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 2000; 164: 87–98)
- 146.) Relation of Serum and Vitreous Concentrations of Fetuin-A with Diabetic Natural Science Fund Project in Shandong Province
- 147.) *Int Ophthalmol.* 2018 Dec;38(6):2445-2450. doi: 10.1007/s10792-017-0750-9. Epub 2017 Oct 25. Elevated serum fetuin-A levels are associated with grades of retinopathy in type 2 diabetic patients. Yilmaz A¹, Yilmaz T², Gunay M³
- 148.) Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. Barnstable CJ, Tombran-Tink J *Prog Retin Eye Res.* 2004 Sep; 23(5):561-77.

- 149.) Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, Katai M, Yan L, Suzuma K, West K, Davarya S, Tong P, Gehlbach P, Pearlman J, Crabb JW, Aiello LP, Campochiaro PA, Zack DJ *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Mar; 43(3):821-9. Inflammatory Mechanisms of Idiopathic Epiretinal Membrane Formation
- 150.) 23-24 Pigment epithelium-derived factor induces interleukin-10 expression in human macrophages by induction of PPAR gamma. Yang SL, Chen SL, Wu JY, Ho TC, Tsao YP *Life Sci.* 2010 Jul 3; 87(1-2):26-35.
- 151.) 40 Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Protects Osteoblastic Cell Line from Glucocorticoid-Induced Apoptosis via PEDF-R Yao S, Zhang Y, Wang X, Zhao F, Sun M, Zheng X, Dong H, Guo K *Int J Mol Sci.* 2016 May 13; 17(5): [PubMed] [Ref list]
- 152.) Helen PL, Rajagopal G, Prasanna CV, Ramakrishnan S. A study of prealbumin in health and diseases by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *Ind J Med Res* 1975;63:273-77.
- 153.) Ramakrishnan S. A brief communication on 'prealbumin' in tuberculosis. *Lung India* 1984;2:265-68.
- 154.) Transthyretin: the servant of many masters. Buxbaum JN, Reixach N *Cell Mol Life Sci.* 2009 Oct; 66(19):3095-101.
- 155.) Apolipoprotein measurements: is more widespread use clinically indicated? Davidson MH *Clin Cardiol.* 2009 Sep; 32(9):482-6.
- 156.) Lipid free apolipoprotein E binds to the class B Type I scavenger receptor I (SR-BI) and enhances cholesteryl ester uptake from lipoproteins. Bultel-Brienne S, Lestavel S, Pilon A, Laffont I, Tailleux A, Fruchart JC, Siest G, Clavey V *J Biol Chem.* 2002 Sep 27; 277(39):36092-9.
- 157.) Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I, Lee JW, Fliesler SJ, Rodriguez IR *Mol Vis.* 2006 Oct 27; 12():1319-33.
- 158.) Elevation of apolipoprotein A-I and apolipoprotein H levels in the vitreous fluid and overexpression in the retina of diabetic patients. Simó R, Higuera M, García-Ramírez M, Canals F, García-Arumí J, Hernández C *Arch Ophthalmol.* 2008 Aug; 126(8):1076-81.
- 159.) High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced epidermal [corrected] growth factor receptor activation and subsequent matrix

- metalloproteinase-2 upregulation. Robbesyn F, Augé N, Vindis C, Cantero AV, Barbaras R, Negre-Salvayre A, Salvayre R *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jun; 25(6):1206-12.
- 160.) Apolipoprotein A1 is overexpressed in the retina of diabetic patients. Simó R, García-Ramírez M, Higuera M, Hernández C *Am J Ophthalmol.* 2009 Feb; 147(2):319-325.e1.
- 161.) Apolipoprotein A-I decreases neutrophil degranulation and superoxide production. Blackburn WD Jr, Dohlman JG, Venkatachalapathi YV, Pillion DJ, Koopman WJ, Segrest JP, Anantharamaiah GMJ *Lipid Res.* 1991 Dec; 32(12):1911-8
- 162.) Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A-I. Liao XL, Lou B, Ma J, Wu MP *Life Sci.* 2005 Jun 3; 77(3):325-35
- 163.) Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy. Kim SJ, Kim S, Park J, Lee HK, Park KS, Yu HG, Kim Y *Curr Eye Res.* 2006 Mar; 31(3):231-40
- 164.) What is oxidative stress? Betteridge DJ *Metabolism.* 2000 Feb; 49(2 Suppl 1):3-8
- 165.) The evaluation of the oxidative stress parameters in nondiabetic and diabetic senile cataract patients. Yildirim Z, Yildirim F, Ucgun NI, Kilic N *Biol Trace Elem Res.* 2009 May; 128(2):135-43
- 166.) Antioxidants: an integrative approach. Lachance PA, Nakat Z, Jeong WS *Nutrition.* 2001 Oct; 17(10):835-8
- 167.) Reactive oxygen species in vascular wall. Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006 Mar; 6(1):1-19. [PubMed] [Ref list]
- 168.) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84
- 169.) Light-Induced Phosphorylation of Crystallins in the Retinal Pigment Epithelium *Int J Biol Macromol.* 2011 January 01; 48(1): 194–201. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.11.009: Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F *Mol Cancer Res.* 2008 Jun; 6(6):892-906
- 170.) Hydrophobic ligand binding by Zn-alpha 2-glycoprotein, a soluble fat-depleting factor related to major histocompatibility complex proteins. Kennedy MW, Heikema AP, Cooper A, Bjorkman PJ, Sanchez LMJ *Biol Chem.* 2001 Sep 14; 276(37):35008-13
- 171.) He N, Brysk H, Tying SK, Ohkubo I, Brysk MM (2001) Zinc-alpha₂-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces *Cdc2* expression. *J Cell Biochem* 81:162–169

- 172.) The role of thrombin in proliferative vitreoretinopathy, *Bastiaans J, van Meurs JC, Mulder VC, Nagtzaam NM, Smits-te Nijenhuis M, Dufour-van den Goorbergh DC, van Hagen PM, Hooijkaas H, Dik WA* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jul 11; 55(7):4659-66
- 173.) Thrombin induces epithelial-mesenchymal transition and collagen production by retinal pigment epithelial cells via autocrine PDGF-receptor signaling. *Bastiaans J, van Meurs JC, van Holten-Neelen C, Nagtzaam NM, van Hagen PM, Chambers RC, Hooijkaas H, Dik WA* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Dec 19; 54(13):8306-14
- 174.) Pastor JC de la Rua ER Martin F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res .* 2002; 21: 127–144
- 175.) Hiscott P Sheridan C Magee RM Grierson I. Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease. *Prog Retin Eye Res .* 1999; 18: 167–190
- 176.) Feist RM Jr King JL Morris R Witherspoon CD Guidry C. Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol .* 2013; 252: 347–357
- 177.) *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jul 1;488(3):483-488. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.067. Epub 2017 May 11. Identification of vitreous proteins in retinopathy of prematurity. Sugioka K¹, Saito A², Kusaka S³, Kuniyoshi K¹, Shimomura Y¹.
- 178.) Synthesis and propagation of complement C3 by microglia/monocytes in the aging retina. *Rutar M, Valter K, Natoli R, Provis JM* *PLoS One.* 2014; 9(4):e93343
- 179.) Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Langer HF, Chung KJ, Orlova VV, Choi EY, Kaul S, Kruhlak MJ, Alatsatianos M, DeAngelis RA, Roche PA, Magotti P, Li X, Economopoulou M, Rafail S, Lambris JD, Chavakis T* *Blood.* 2010 Nov 25; 116(22):4395-403
- 180.) Activation of the Alternative Complement Pathway in Vitreous is Controlled by Genetics in Age-Related Macular Degeneration *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(10):6628-6637. doi:10.1167/iovs.12-9587
- 181.) Wu Z, Ding N, Yu M, Wang K, Luo S, Zou W, Zhou Y, Yan B, Jiang Q. Identification of Potential Biomarkers for Rhegmatogenous Retinal Detachment Associated with Choroidal Detachment by Vitreous iTRAQ-Based Proteomic Profiling. *Int J Mol Sci.* 2016;•••:17
- 182.) Cioffi CL, Dobri N, Freeman EE, Conlon MP, Chen P, Stafford DG, Schwarz DM, Golden KC, Zhu L, Kitchen DB, Barnes KD, Racz B, Qin Q, Michelotti E, Cywin CL, Martin WH, Pearson PG, Johnson G, Petrukhin K. Design, synthesis, and evaluation of nonretinoid

retinol binding protein 4 antagonists for the potential treatment of atrophic age-related macular degeneration and Stargardt disease. *J Med Chem.* 2014;57:7731–57

183.) Cioffi CL, Racz B, Freeman EE, Conlon MP, Chen P, Stafford DG, Schwarz DM, Zhu L, Kitchen DB, Barnes KD, Dobri N, Michelotti E, Cywin CL, Martin WH, Pearson PG, Johnson G, Petrukhin K. Bicyclic [3.3.0]-Octahydrocyclopenta[c]pyrrolo Antagonists of Retinol Binding Protein 4: Potential Treatment of Atrophic Age-Related Macular Degeneration and Stargardt Disease. *J Med Chem.* 2015;58:5863–88.

184.) Park SE, Kim DH, Lee JH, Park JS, Kang ES, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. Retinol-binding protein-4 is associated with endothelial dysfunction in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2009;204:23–5. [PubMed]

185.) Solini A, Stea F, Santini E, Bruno RM, Duranti E, Taddei S, Ghiadoni L. Adipocytokine levels mark endothelial function in normotensive individuals. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:103. [PMC free article][PubMed]

186.) β B2-Crystallin Promotes Axonal Regeneration in the Injured Optic Nerve in Adult Rats *Cell transplant* 2015;24(9):1829-44. Doi 10.3727/096368914X684583 Epub 2014 Oct 8

187.) Effects of crystallin- β -b2 on stressed RPE in vitro and in vivo 2013 Jan;251(1):63-79. doi: 10.1007/s00417-012-2157-7. Epub 2012 Oct 17

188.) The primary structure of the B2 chain of human alpha-crystallin."Kramps J.A., de Man B.M., de Jong W.W.*FEBS Lett.* 74:82-84(1977)

189.) Expression and mechanism of alphaB-crystallin in retina and extraocular tissues and organs. Liu DM, Zhou S, Chen JM, Peng SY, Xia WT, Fa Yi, Zue Za Zi 014 Dec;30(6):470-3.)