

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

**DENEYSEL PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ MODELİNDE  
İNTRAVİTREAL AFLİBERCEPT ENJEKSİYONUNUN  
İNFLAMASYON, PROLİFERASYON VE PROGRESYON  
MEKANİZMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN  
PROTEOMİK YOLLA İNCELENMESİ**

**Dr.İşıl TAŞ**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı  
Uzmanlık Tezi**

**2017**

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

**DENEYSEL PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ MODELİNDE  
İNTRAVİTREAL AFLİBERCEPT ENJEKSİYONUNUN  
İNFLAMASYON, PROLİFERASYON VE PROGRESYON  
MEKANİZMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN  
PROTEOMİK YOLLA İNCELENMESİ**

**Dr.İşıl TAŞ**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı  
Uzmanlık Tezi**

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

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

**Etik Kurul Onayı: KOU HADYЕК 2/4-2017**

**2017**

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b>	<b>v</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>13</b>
1.1 Giriş ve Amaç	13
1.2 Genel Bilgiler	14
1.2.1 Retina Anatomisi ve Histolojisi	14
1.2.2 Retina Kan Dolaşımı	18
1.2.3 Vitreus Anatomisi	19
1.2.4. Vitreus Fizyopatolojisi	20
1.2.5 Proliferatif Vitreoretinopati (PVR)	21
1.2.5.1 PVR’de Etiyopatogenez	21
1.2.5.2 PVR’de Hücresel Elemanlar ve Büyüme Faktörleri	24
1.2.5.3 PVR’nin Sınıflandırması	29
1.2.5.4 PVR’nin İnsidans ve Risk Faktörleri	32
1.2.5.5 PVR’de Tedavi	33
1.2.5.5.1 PVR’de Cerrahi Tedavi	33
1.2.5.5.2 PVR’de Farmakolojik Tedavi	33
1.2.6 Aflibercept	35
1.2.7 Deneysel PVR Modelleri ve Dispaz	37

1.2.7.1 İn Vitro Deneysel PVR Modelleri	37
1.2.7.2 İn Vivo Deneysel PVR Modelleri	38
1.2.7.1.3 Dispaz	39
<b>2.GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
2.1 Proteomiks Analizi	40
2.1.1 Biyobelirteçler	40
2.1.2 Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji	41
2.2 MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi	42
2.3 Karşılaştırmalı Proteomiks Çalışmalarının Amacı	43
2.4 Deneyin Uygulanışı	43
2.5 Proteomiks Değerlendirmesi	44
2.5.1 Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması	44
2.5.2 Protein Konsantrasyonunun Tayini	45
2.5.3 Protein Örneklerinin Odaklanmaları ve 2D Jel Elektroferezler	45
2.5.4 In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18	46
2.5.5 MALDI TOF-TOF Analizi	47
2.5.6 Biyoinformatik Analizler	47
<b>3. BULGULAR</b>	<b>48</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>75</b>
<b>5. SONUÇ</b>	<b>89</b>
<b>6. ÖZETLER</b>	<b>90</b>
<b>7. KAYNAKÇA</b>	<b>93</b>

## ÖNSÖZ

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

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof.Dr. Nurşen Yüksel 'e uzmanlık eğitimime sağladığı katkıdan, gösterdiği sevgi ve ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Tez konumun seçiminde, proje aşamasında ve yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen; hasta yaklaşımı, cerrahi deneyimi, disiplini, yaptığı işe duyduğu tutkuyla beni kendine hayran bırakan, her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum, uzmanlık eğitim sürecimde benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Prof.Dr. Levent Karabaş'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde, disiplini ve hekimlik kimliğini her zaman örnek aldığım sevgili hocam Prof.Dr. Özgül Altıntaş'a çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi sürecimde cerrahi ve klinik deneyimiyle bana her zaman destek olan kıymetli hocam Doç.Dr. Berna Özkan'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde desteğini hep hissettiren, ihtiyaç duyduğumda yardımını esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç.Dr. Dilara Pirhan'a teşekkür ederim.

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım, Prof.Dr. Murat Kasap, Doç.Dr. Gürler Akpınar ve Yrd.Doç.Dr Aylin Kanlı'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde beraber çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim. Eğitimim süresince uyum içinde çalıştığım klinik hemşirelerine, sekreterlerine ve personeline de teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde şüphesiz en büyük emeğe sahip olan başta sevgili annem ve babam olmak üzere her zaman bana inanan, anlayışlı, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Asistanlık sürecimin en yakın şahidi, her zaman yanımda olan, en büyük destekçim yol arkadaşım Ali Kemal Uslubaş'a teşekkür ederim.

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AAD</b>	: Akut aksonal dejenerasyon
<b>ACN</b>	: Asetonitril
<b>Ag-3340</b>	: Prinomastat
<b>AMD</b>	: Yaşa bağı makuler dejenerasyon
<b>APLAID</b>	: <i>Autoinflammation and PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation</i>
<b>CHP</b>	: Cis- hidroksiprolin
<b>Cis RA</b>	: Cis-retinoik asit
<b>CK-6A</b>	: Keratin, type II cytoskeletal 6A
<b>CRMP2</b>	: <i>Collapsin response mediator protein-2</i>
<b>CTGF</b>	: Bağ dokusu büyüme faktörü
<b>DETAB</b>	: Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi
<b>DMAH</b>	: Düşük molekül ağırlıklı heparin
<b>DME</b>	: Diyabetik makula ödemi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DRP</b>	: Diyabetik retinopati
<b>DRP-2</b>	: Dihydropyrimidinase-related protein 2
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>EG</b>	: Epiretinal glioz
<b>EGF</b>	: Epidermal growth factor
<b>ELİSA</b>	: Enzyme Linked-İmmuno- Sorbent Assay

<b>EMT</b>	: Epitelyal mezenkimal transisyon
<b>Eno1</b>	: Alpha-enolase
<b>ERG</b>	: Elektoretinografi
<b>ERK</b>	: Ekstraselüler sinyal regüle protein kinaz
<b>ESI-MS</b>	: <i>Electrospray ionization-mass spectrometry</i>
<b>ETS</b>	: Elektron transport sistemi
<b>FDA</b>	: Ameirkan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FGF</b>	: Fibroblast growth factor
<b>FU</b>	: Fluorourasil
<b>FUR</b>	: Fluouridine
<b>Gbeta5</b>	: Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
<b>GEP</b>	: Gastroenteropankreatik
<b>GFAP</b>	: Glial fibrillary acidic protein
<b>GH</b>	: Growth Hormon
<b>GİS</b>	: Gastrointestinal sistem
<b>Gnao1</b>	: Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
<b>GS</b>	: Glutamine synthetase
<b>HA</b>	: Hyaluronik asit
<b>HGF</b>	: Hepatosit büyüme faktörü
<b>hnRNP F</b>	: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
<b>HPLC</b>	: Yüksek performans likit kromatografisi
<b>HSV- tk</b>	: Herpes virüs timidin kinaz
<b>IAA</b>	: İyodaasetamit
<b>IDH3A</b>	: Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial

<b>Ig</b>	: İmmunoglobulin
<b>IGF</b>	: İnsulin-like growth faktör
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon gama
<b>KAR</b>	: Kanser ilişkili retinopati
<b>KRB</b>	: Kan retina bariyeri
<b>LDH-B</b>	: L-lactate dehydrogenase B chain
<b>LFK</b>	: Lazer fotokoagülasyon
<b>MALDI-ToF</b>	: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight</i>
<b>MAPK</b>	: Mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaza
<b>MCP-1</b>	: Monosit kemotaktik protein-1
<b>Mit-C</b>	: Mitomisin-C
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinaz
<b>MPP</b>	: Masif periretinal proliferasyon
<b>MPR</b>	: Masif preretinal retraksiyon
<b>MVR</b>	: Masif vitreus retraksiyonu
<b>ND-PAGE</b>	: Non denatüre edici page
<b>NSE</b>	: Gamma-enolase
<b>PDGF</b>	: <i>Platelet derived growth factor</i>
<b>PDGFR</b>	: <i>Platelet derived growth factor</i> reseptörü
<b>PDHE1-B</b>	: Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
<b>PEBP-1</b>	: Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
<b>PIGF</b>	: Plasental büyüme faktörü



<b>PLCG2</b>	: 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
<b>PSD</b>	: <i>Post Source Decay</i>
<b>PVR</b>	: Proliferatif vitreoretinopati
<b>RA</b>	: Retinoik asit
<b>RD</b>	: Retina dekolmanı
<b>RPE</b>	: Retina pigment epiteli
<b>RS1</b>	: Retinoschisin
<b>RVO</b>	: Retinal ven tıkanıklığı
<b>SÇG</b>	: Silikon Çalışma Grubu
<b>SDS- PAGE</b>	: Denatüre edici page
<b>SELDI-TOF</b>	: <i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionization</i>
<b>SMA</b>	: Düz kas aktinin
<b>SRA</b>	: Santral retinal arter
<b>SST</b>	: Spesifik hücre reseptörleri
<b>TA</b>	: Triamsinelon asetonid
<b>TGF-β</b>	: Transforming growth factor beta
<b>TGF-α</b>	: Transforming growth factor alfa
<b>TNF-α</b>	: Tümör nekrotizan faktör alfa
<b>TSH</b>	: Tiroid stimulan hormon
<b>UCH-L1</b>	: Ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz izoenzimi L1
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
<b>α- SMA</b>	: α-düz kas aktininin

## TABLÖLAR LİSTESİ

**Tablo 1.** Retina Cemiyeti Terminolojisi Komitesi'ne göre PVR sınıflandırması

**Tablo 2.** Silikon Çalışma Grubu'na göre PVR sınıflandırması

**Tablo 3.** PVR kontraksiyon tipi sınıflandırması

**Tablo 4.** Kontrol, Dispaz+Salin ve Dispaz+Aflibercept gruplarından elde edilen protein özütlelerinin Bradford ölçüm sonuçları

**Tablo 5.** MALDI-TOF/TOF analizi sonrasında tanımlanan protein spotlarına ait veriler

**Tablo 6.** Miktarlarında regülasyon görülen ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin gruplara göre hesaplanmış regülasyon oranları

**Tablo 7.** Biyolojik proses analizi sonucunda elde edilen verilerin ilgili proteinler ile ilişkilendirilmesi

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1.** Retinanın histolojik kesiti

**Şekil 2.** Göz anatomisi

**Şekil 3.** Vitreustaki kollajen fibrillerin dağılımı

**Şekil 4.** Proliferatif vitreoetinopati döngüsü

**Şekil 5.** Afliberceptin yapısı

**Şekil 6.** VEGF ve anti-VEGF etki mekanizması

**Şekil 7.** Kontrol, Dispaz+Salin ve Dispaz+Aflibercept gruplarına ait örneklerin 1D SDS-PAGE jel görüntüleri.

**Şekil 8.** Western blot analizi

**Şekil 9.** 2D jel görüntüsü.

**Şekil 10.** 17 cm'lik geniş jellerde ve pH5-8 aralığında çalışılmış jellerin PDQuest Advance yazılımı ile analizi

**Şekil 11.** Her bir grup için elde edilen 2D jel görüntüleri ve regülasyon görülen ve kesilip tanımlanan proteinlerin jel üzerindeki pozisyonları.

**Şekil 12.** MALDI-TOF/TOF spektrum görüntüsü

**Şekil 13.** SSP 0301, SSP 1404, SSP 1406, SSP 1508, SSP 1511, SSP 1513 ve SSP 1517 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

**Şekil 14.** SSP 1519, SSP 2202, SSP 2403, SSP 2606, SSP 2607, SSP 3503 ve SSP 3504 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

**Şekil 15.** SSP 3605, SSP 4402, SSP 4606, SSP 4611, SSP 5402, SSP 5608, SSP 7505 ve SSP 7506 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

**Şekil 16.** Proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

**Şekil 17.** Proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

**Şekil 18.** Biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

**Şekil 19.** BioGrid analizi sonucu Guanine nucleotide-binding protein için oluşturulan interaktom verisi

**Şekil 20.** BioGrid analizi sonucu 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase için oluşturulan interaktom verisi

**Şekil 21.** MinePath analizi ile VEGF yolağının gösterilmesi

**Şekil 22.** STRING Analiz sonucu



# 1.GİRİŞ

## 1.1 Giriş ve Amaç

Proliferatif vitreoretinopati (PVR), retinanın her iki yüzünde ve vitreus içerisinde neoplastik olmayan hücresel proliferasyon ile kontrakte membranların oluşmasıyla karakterize, görme kaybıyla sonuçlanabilen anormal bir yara iyileşmesi, bir skarlaşma sürecidir.<sup>1-3</sup> PVR özel bir durum değildir. En sık oküler travma sonrasında olmak üzere retina dekolmanı (RD), vitreoretinal cerrahi müdahale gibi intraoküler bozukluklara ikincil gelişebilen bir doku cevabıdır.<sup>3,4</sup>

Retina dekolmanında %5-10, travma sonrası %25 görülebilen PVR, RD cerrahisinde en sık görülen başarısızlık nedenidir.<sup>2,4,5</sup> Dekole retinanın her iki yüzünde ve vitreusta kontraktıl hücresel membranların oluşumu yeni retinal yırtıkların oluşumuna, onarılmış yırtıkların yeniden açılması ve retinada distorsiyona neden olur.<sup>3</sup> RD cerrahisinin başarısı PVR yokluğuna veya kontrolüne bağlıdır.<sup>6</sup>

Birçok farmakolojik ajanın PVR'ı engelleyici ve tedavi edici etkisi üzerinde çalışılmış, ancak gerek yeterince etkili olmaması gerekse toksisitesi nedeniyle PVR'ın rutin kullanıma giren farmakolojik profilaksisi ve tedavisi henüz bulunamamıştır. Günümüzde PVR'ın asıl tedavisi cerrahidir. PVR cerrahisinde pars plana vitrektominin yanı sıra intravitreal tampon maddelerin ve ileri cerrahi tekniklerin kullanılmasına rağmen %60-80 oranında anatomik başarı bildirilirken, fonksiyonel başarı oranı %30-40'larda kalmaktadır.<sup>5</sup> Görsel sonuçlar da hayal kırıklığı yaratmaktadır. Bundan dolayı son yıllarda PVR ile ilgili çeşitli deneysel hayvan model çalışmalarında artış görülmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sayesinde, büyüme faktörlerinin PVR patogeneziindeki önemi bilinmektedir. Vasküler endotel hücre büyüme faktörlerinden (VEGF) VEGF-A'nın, PVR patogeneziinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir.<sup>7,8</sup> Aflibercept, diyabetik kistoid maküler ödem, retinal damar tıkanıkları ve yaşa bağlı makula dejenerasyonunda güncel ve rutin tedavide intravitreal olarak kullanılan, retinaya toksik olmayan vasküler büyüme faktörü ve plasental büyüme faktörü (PIGF) inhibitörüdür. Çalışmamızda son yıllarda kullanımı yaygınlaşan dispaz ile oluşturulan deneysel PVR modelinin biyokimyasal mekanizması ve bu modele uygulanan intravitreal afliberceptin PVR'ın inflamasyon, proliferasyon ve progresyon mekanizmaları üzerine etkisinin proteomiks analizi ile araştırılması

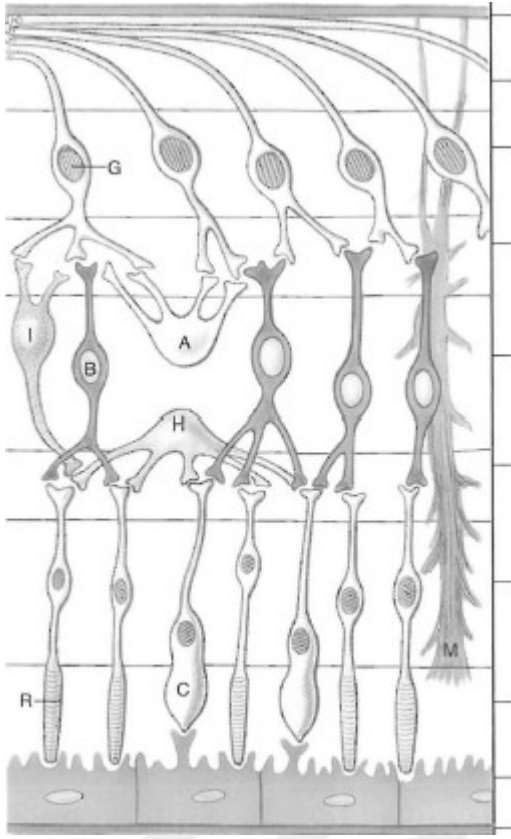
amaçlanmıştır.

## **1.2 Genel Bilgiler**

### **1.2.1 Retina Anatomisi ve Histolojisi**

Retina nöroektoderm kökenli, ışık sinyallerinin sinirsel iletiye dönüştürüldüğü, ince, şeffaf yapıda bir dokudur. Kalınlığı 100 ile 300 mikron arasında değişen retina içten (vitreus tarafından), dışa doğru (koroid tarafına) şu tabakalardan oluşur (Şekil 1):

- 1) İç limitan membran (Müller Hücreleri terminal uzantıları ve bazal membran)
- 2) Sinir lifi tabakası (ganglion hücre aksonları)
- 3) Ganglion hücre tabakası (ganglion hücre çekirdekleri)
- 4) İç pleksiform tabaka (bipolar, amakrin, ganglion hücreleri sinaptik bağlantıları)
- 5) İç nükleer tabaka (bipolar, horizontal, amakrin ve Müller hücre çekirdekleri)
- 6) Dış pleksiform tabaka (Fotoreseptör, bipolar, horizontal hücrelerin sinaptik bağlantıları, Henle lif tabakası)
- 7) Dış nükleer tabaka (fotoreseptör çekirdekleri, kon nükleusları dış grupta, rod nükleusları daha çok iç grupta)
- 8) Dış limitan membran
- 9) Fotoreseptör tabakası



İç limitan membran
Sinir lifi tabakası
Ganglion hücre tabakası
İç pleksiform tabaka
İç nükleer tabaka
Dış pleksiform tabaka
Dış nükleer tabaka
Dış limitan membran
Retina pigment epiteli
Bruch membranı

**Şekil 1.** Retinanın histolojik kesiti: R: Rod fotoreseptör, C: Kon fotoreseptör, B: Bipolar hücre, H: Horizontal hücre, A: Amakrin hücre, G: Ganglion hücre, M: Müller hücre

### Duyusal retina;

**Fotoreseptörler:** Koni ve basil (rod) olarak adlandırılan, retina pigment epiteli (RPE) ile dış limitan membran arasında yer alan iki tip fotoreseptör bulunmaktadır. Her bir fotoreseptörün iç ve dış olmak üzere iki segmenti vardır.<sup>9</sup> Basiller alaca karanlıkta ve gece görmeden (skotopik görme) sorumlu olup, foveada hiç bulunmaz ve periferde doğru sayıları hızla artar, uç periferde hafifçe azalır.<sup>10</sup> Koniler ise parlak ışıkta görme (fotopik görme), renkli görme ve keskin görmeden sorumludurlar. En çok foveada bulunurlar.

**Bipolar Hücreler:** Radyal yerleşimli olan bu hücrelerin, dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basiller ile sinaps yapar, aksonları ise iç pleksiform tabakada gangliyon ve amakrin hücrelerle sinaps yapar.<sup>10</sup> Görevleri fotoreseptörlerden gelen sinyali gangliyon

hücrelere aktarmaktır.

**Gangliyon hücreler:** Retinanın iç kısmında bulunurlar. Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir, dendritleri bipolar hücreler aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar.<sup>10</sup> Optik sinir gangliyon hücre aksonlarının birleşmesiyle oluşur.<sup>11</sup>

**Horizontal hücreler:** Horizontal hücreler basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınlarında yer alan multipolar hücrelerdir. Fotoreseptörleri inhibe eden antagonistik internöronlardır.<sup>11</sup>

**Amakrin Hücreler:** Çoğunlukla inhibitör internöronlardır. Bol sitoplazmalı, parçalı nükleuslu ve çok sayıda dendritleri olan aksonsuz hücrelerdir.

**Müller Hücreleri:** Retinanın glial hücre yapısını oluşturan en önemli hücrelerdir. Retinada mikroglia ve makroglia (Müller hücreleri, astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücreleri) olmak üzere iki tip nöronal olmayan hücre grubu bulunur. Mikroglial hücreler yardımcı immün hücreler, makroglialar ise retinal nöronların fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerdir.<sup>11</sup> Retinanın destek yapısını oluşturan Müller hücreleri, dış limitan membrandan iç limitan membrana kadar uzanmaktadır. PVR patogeneğinde Müller hücrelerinden köken alan retinadaki glial hücreler, çoğalarak iç ve dış limitan membranların içinden geçebilirler. Böylece epiretinal ve subretinal membranları oluşturabilirler.<sup>12</sup>

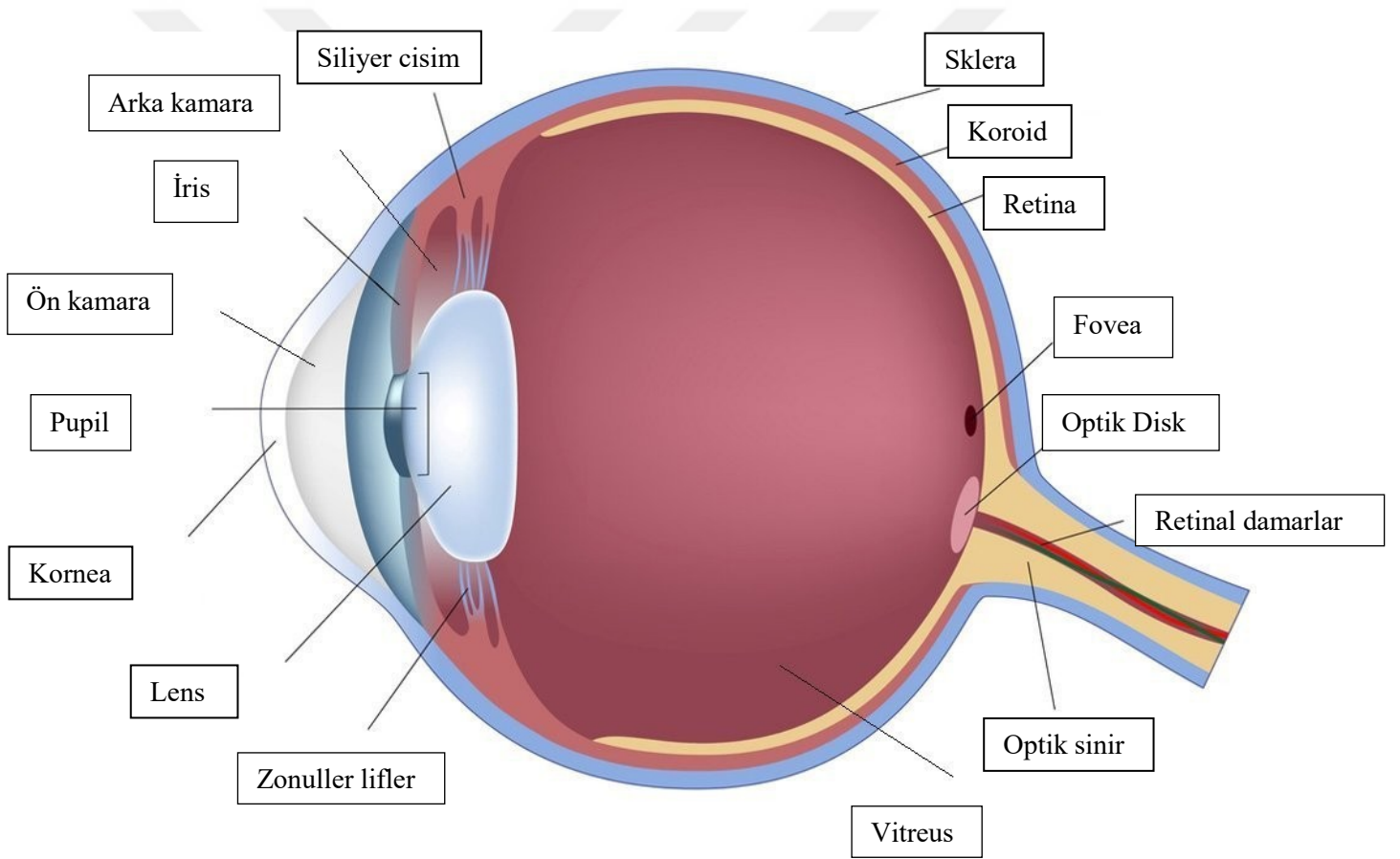
### **Retina pigment epiteli;**

Nöral retina ve koroid arasında uzanan tek sıralı, pigmente, hegzagonal bir hücre tabakası olup, ön tarafta siliyer epitelin pigmentli katı olarak devam eder. Erişkin insan gözünde yaklaşık 3,5 milyon RPE bulunmaktadır. RPE yoğunluğu foveal alanda en fazla olup, periferde doğru azalır.<sup>11</sup> Hücrelerin tepe kısımları hem zonula okludens hem de zonula adherenslerle birbirlerine sıkıca bağlıdır ve dış kan-retina bariyerinin oluşumuna katkıda bulunur.<sup>12</sup> RPE'nin görevleri; fotoreseptör dış segment fagositozu, A vitamini metabolizmasını düzenlemek, rodopsin sentezini düzenlemek, vizuel pigment yenilenmesi, sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanması, oksidatif strese korunma, avasküler dış retinanın sağlanması, immünitenin sağlanması, dış kan retina bariyerinin (KRB) oluşturulması ve devamlılığının sağlanması, subretinal alandaki sıvı ve besin



kontrolünü ve retinal yapışıklığın sağlanmasıdır.<sup>10</sup> PVR patogeneğinde RPE hücreleri kritik role sahiptir. Çeşitli nedenlerle kan retina bariyeri bozulduğunda vitreus boşluğuna geçen RPE hücreleri patolojik olarak çoğalarak kontraktıl membran yapıları oluştururlar. Bunun sonucunda da traksiyonel (fibrotik) retina dekolmanı gelişmesine neden olurlar.<sup>3,12</sup>

İçten vitreusla dıştan koroid ile komşu olan retina olarak iki bölümde incelenebilir (Şekil 2). Bunlar retina vorteks venlerinin skleraya girdikleri yerlerin arka kenarından geçtiği düşünülen kesit ile ayrılan santral (posterior) ve periferik (anterior) retinadır.



Şekil 2. Göz anatomisi

## 1.2.2 Retina Kan Dolaşımı

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.<sup>10</sup>

**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.<sup>10</sup>

**Venler:** Ora serratada venler, arterlerin sonlandığı yerin daha periferinden başlarlar. Ekvatordan itibaren ise arterlerle birlikte seyrederler ve papillada toplanarak santral retinal veni oluştururlar. Santral retinal ven ya superior oftalmik ven yolu ile veya direkt olarak kavernoöz sinüse drene olur.<sup>10,11</sup>

**Kapillerler:** Retina arteriyolları ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Retina kapillerleri çoklu arteriyoler bağlantılar içermektedir. Böylelikle bir besleyici damarın kapanması ile kapiller yatakta dolaşım durmaz. Koryokapillerlerin duvarlarında geniş pencerelemeler 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.<sup>10,11</sup>

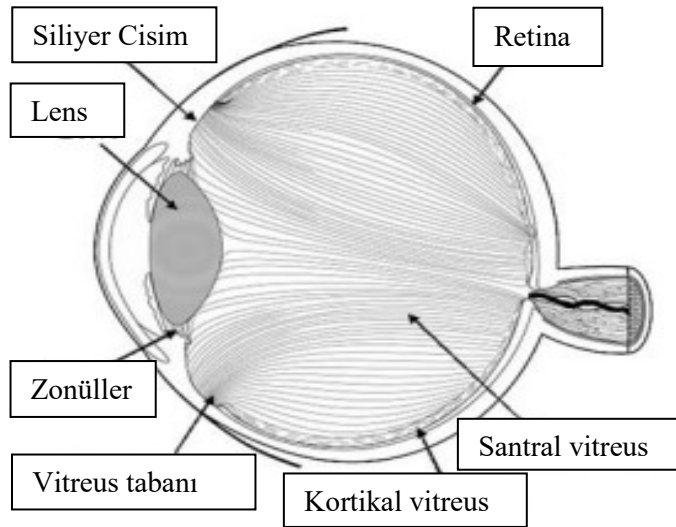
### Kan-Retina Bariyeri (KRB)

Dış KRB, komşu RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri olan zonula okludens ve zonula adherensler aracılığı ile oluşturulmaktadır. İç KRB ise non-fenestre retinal vasküler endotel hücreleri ve bunların arasındaki sıkı bağlantılar tarafından

oluşturulmaktadır.

### 1.2.3 Vitreus Anatomisi

Vitreus; lens, arka kamara, silier cisim ve retina arasında yerleşen, göz küresi hacminin yaklaşık %80'ini oluşturan, gözün en büyük içyapısal elemanıdır. Vitreus, vitreus tabanı, kortikal vitreus ve kor vitreus gibi farklı bölümlerden meydana gelir. Erişkinde ortalama 4 mm<sup>3</sup> olup, ağırlığı ise yaklaşık 4 gr'dır.<sup>10</sup> Vitreus yapısal olarak sıvı içeriği fazla hyaluronik asit matrikste asılı kollejen fibril ağından ibarettir ve %99'u su olmasına rağmen viskozitesi suyunun yaklaşık iki katı kadardır. Geriye kalan %1 'lik kısım ise düşük molekül ağırlıklı yağlar ve inorganik tuzlardan, çözülebilen ve çözülemeyen proteinlerden ve hyaluronik asitten oluşur.<sup>11</sup> Vitreusta bulunan serbest amino asitler serumdaki miktarının beşte biri kadardır. Vitreusta hücreler olarak en sık hyalosit olarak bilinen mononükleer fagositler olmakla beraber daha az sayıda fibroblast ve glial hücreler sayılabilir. Vitreusun en önemli protein içeriğini kollajen oluşturur (Şekil 3).



**Şekil 3:** Vitreustaki kollajen fibrilerin dağılımı

Vitreustaki kollajen, fibroblastlar tarafından üretilen tip-II kollajendir. Polisakkarit bileşiminde bir glikozaminoglikan olan, hyalositlerce sentezlenen hyaluronik asit en

yoğun kortikal vitreusta en az kor vitreusun ön kısmında bulunur. Tüm yaşam süresince ön kortikal vitreustan arka kamaraya geçer. Hyaluronik asit vitreusun stabilizasyonunun, saydamlığını ve viskoelastik yapısını güçlendirir. Genç vitreus %80 jel iken, yaş ile beraber likefiye olmaya başlar ve 70-80 yaşlarında vitreusun yarısı likefiye olur.<sup>10,11</sup> Vitreus ile retinanın komşuluklarını kalıcı kılan bağlantılar vitre tabanı ve optik sinir başında güçlüdür. Bu bağlantılar daha zayıf olmak üzere, lensin gerisindeki hyaloid fossa periferinde, pars plana silier epiteli yüzeyinde, retina damarları ve makula düzleminde de gözlenmektedir.<sup>13</sup>

Vitreus tabanı ora serratanın 1,5-2,0 mm önünde, nazalde 3mm, temporalde ise 1,8 mm arkasına ve birkaç mm vitreus içine doğru yükselen üç boyutlu bir yapıdır.

Kortikal vitreus, vitreusun periferde retinaya komşu 100-300 mikron kalınlıktaki dış kısmıdır. Vitreus tabanı önündeki fibrillerin öne ve içe doğru yönelmesi ile ön kortikal vitreus, arkasından içe ve arkaya doğru yönelmesi ile arka kortikal vitreus oluşmaktadır.<sup>12,13</sup> Müller hücrelerinin bazal membranı olan iç limitan membran ile kortikal vitreustaki fibriller sayesinde retina-vitreus bağlantıları sağlanmaktadır<sup>13</sup>.

Kor vitreus kortikal vitreusun çevrelediği, merkezdeki bölümdür. Daha az yoğun bir yapı olup daha az kollejen fibril içerir.<sup>13</sup>

#### **1.2.4. Vitreus Fiziopatolojisi**

**Vitreusun optik özellikleri:** Vitreusun kırıcılık katsayısı aköz hümöre benzer ve 1,3349'dur.

**Vitreusun mekanik özellikleri:** Ani göz hareketlerinde vitreus diğer dokulara mekanik destek görevi yapmaktadır.

**Vitreusun immünolojik özellikleri:** Hyaluronik asit-kollajen çatının vitritiste antijen deposu gibi davranarak kronik ve\veya tekrarlayan enflamasyonlara neden olduğu bilinmektedir.

**Vitreustaki yabancı hücreler ve membranlar:** PVR da retina kan-retina ve aköz bariyer yıkımı ile vitreusa salınan fibrin ve mitojenler membran gelişimini sağlayarak anormal yara iyileşmesi ile traksiyonel membranlar oluşturarak sonlanabilmektedir.<sup>2,4,13</sup>

## 1.2.5 Proliferatif Vitreoretinopati (PVR)

### 1.2.5.1. PVR'de Etiyopatogenez

Proliferatif vitreoretinopati, retinanın her iki yüzünde ve vitreus içinde neoplastik olmayan hücrel proliferasyonu ile kontrakte membranların oluşması ile karakterize, görme kaybıyla sonuçlanabilen anormal bir yara iyileşmesi, bir skarlaşma sürecidir.<sup>1,2,4</sup> PVR patogenezinde intraokuler enflamasyonu arttıran veya RPE'nin vitreusa dökülmesine neden olabilen her faktör PVR gelişimini uyarabilmektedir.<sup>3,7,8</sup>

Yapılan birçok araştırmada PVR ile yara iyileşme sürecinin benzerliğinin altı çizilmiştir.<sup>14,15</sup> Bu süreç enflamasyon, proliferasyon ve skar oluşumu şeklinde üç safhada tamamlanır.<sup>16-18</sup> PVR' da da öngörülebilir bir zamanlama olduğu gösterilmiştir. Retinal hastalığın başlangıcıyla, primer PVR gelişimi arasında geçen medyan sürenin iki ay olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde sekonder cerrahiler ve nüks PVR gelişimi arasındaki medyan süre de iki aydır.<sup>19</sup>

### Enflamasyon Evresi

Enflamatuar faz ilk 24 saatte meydana gelen lokalize bir reaksiyondur. Retinal yırtık veya travma sonucu normalde Bruch membranında yer alan RPE hücrelerinin vitreus boşluğuna dökülmesiyle tetiklenir.<sup>20</sup> KRB bozularak retinal yırtıkların oluşturduğu açıklıktan vitreus içine ve retina yüzeyine RPE hücrelerinin, inflamatuvar kan hücrelerinin ve proinflamatuvar serum elemanlarının geçmesine neden olur. Serum, RPE hücreleri için kemotaktik ajanlar taşır. Serumdan geçen trombositler *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF-B) ve *epidermal growth factor* (EGF) başta olmak üzere büyüme faktörleri salgılar. PDGF, RPE hücreleri ve glial hücreler için kemoraktan ve mitojendir. TGF-B fibroblastların kollajen ve fibronektin sentezini uyarır. RPE hücreleri miyofibroblast benzeri kontraktıl özellik kazanmakta; glial hücreler, fibroblast ve makrofajları da ortama çekerek PVR gelişimini hızlandırmaktadır. Serum kaynaklı fibronektin bu evrede geçici ekstrasellüler matriks (ECM) oluşumunu ve RPE hücreleri için kemotaktan özellik sağlar. Kandan geçen monositler makrofajlara dönüşerek başta *fibroblast growth factor* (FGF) başta olmak üzere çeşitli sitokinler salgılayarak RPE hücrelerinin metaplastik değişimle miyofibroblast ve makrofaj benzeri özellik kazanmasına neden olurlar.<sup>2,4</sup>

## **Proliferasyon Evresi**

Zedelenmeden sonraki 2-14 gün arasında proliferasyon safhası gelişir. Bu dönemde yara yerine fibroblast göçü olur ve hücreler proliferere olurlar. Ekstrasellüler matriks sentezi başlar.<sup>2,4</sup>

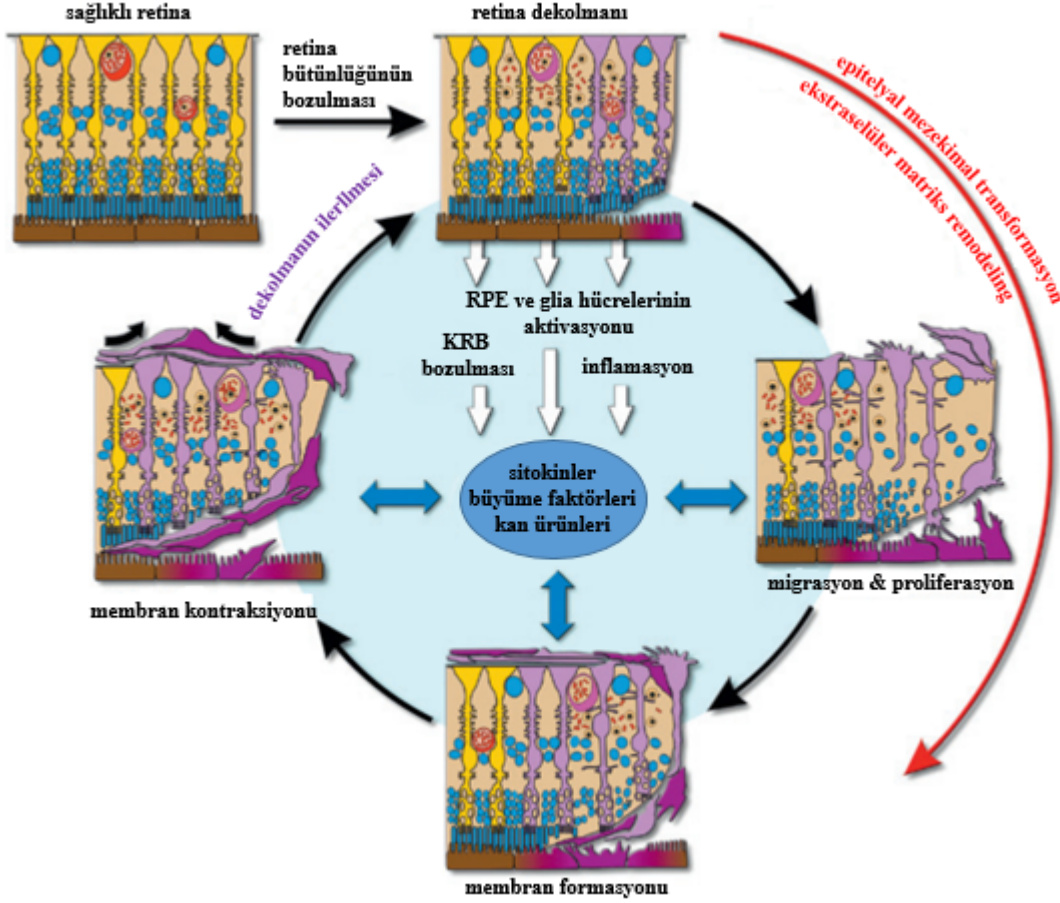
RPE ve intraretinal glial hücreler normalde aktif olarak çoğalmazlar. İskemik, termal veya mekanik hasarlara cevap olarak hızlı bir şekilde çoğalmaya ve opak, kontraktıl membranlar oluşturmaya başlarlar. Yara iyileşmesi ve fibrozis gelişimi RPE hücreleri tarafından üretilen TGF- $\beta$  tarafından arttırılmaktadır. Bu sürece ek olarak RPE hücreleri ortamdaki fibrin ve sitokinlerin (TGF-1 ve TGF-2) etkisi ile morfolojik ve davranışsal değişikliğe uğramakta,  $\alpha$ -düz kas aktininin ( $\alpha$ - SMA) sentezlemekte, miyofibroblast benzeri mezenşimal konfigürasyon ve kontraktıl özellik kazanmaktadırlar.<sup>5,21,22</sup>

Temel olarak makrofajlardan salgılanan FGF fibroblast proliferasyonunu uyarır ve fibroblastlar da geçici ekstrasellüler matriks yerine kalıcı matriksi oluşturan hücresel fibronektin ve kollajeni sentezlerler. PVR membranlarının immünohistokimyasal analizi bu dokularda interstisyel kollajenler olan Tip I ve II kollajen ve değişken miktarlarda da Tip III (vitreusa özgü) kollajen varlığını göstermiştir.<sup>5,21,23</sup> Kandan geçen monositler de makrofajlara dönüşürler ve başta FGF olmak üzere bir takım sitokinler salgırlar ve miyofibroblastların proliferasyonunu stimüle ederler.<sup>2,4</sup>

## **Kontraksiyon Evresi (Skar Oluşumu)**

PVR membranlarının içeriğinde hücreler, büyüme faktörleri ve sitokinler, kollajen ve ekstrasellüler matriks bulunmaktadır.<sup>2,4</sup> PVR membranları ilk oluştukları zaman sahip oldukları hücresel yapıyı zamanla kaybederek bu hücrelerden salgılanan matriks proteinlerince daha zengin bir yapı kazanırlar. PVR gelişiminde hem subretinal hem epiretinal membranlar hem de intraretinal fibrozis olduğu bilinmektedir. Bu membranların esas olarak glial hücreler ve fibroblastlar/myofibroblastlar olmak üzere iki hücre tipi içerdiği gösterilmiştir. Glial hücreler, periretinal membranların non-kontraktıl komponentlerinin oluşumundan sorumludur. Retinal hasarı takiben oluşan basit epiretinal membranlar astrositlerden oluşur ve kontraktıl özellik taşımazlar, ancak retina dekolmanının gelişmesi ve uzun süre devam etmesi diğer hücre tiplerinin ve matriks komponentlerinin de membran yapısına katılması ve kompleks epiretinal membranların

oluşması ile sonuçlanır. RPE hücreleri, Müller hücreleri ve fibroblastlar bu membranların kontraksiyonu için gereklidir ve bu kontraksiyonu sağlayan Tip I kollajeni sentezlerler.<sup>24,25</sup> Bu kontraksiyonların klinik görünümüne yansımaları retinal kırışıklık, vasküler tortuoze, yırtık kenarlarında rulo görünümü, starfold şeklinde retinal katlantılar, tam kat retinal katlantılar, huni biçiminde retina dekolmanı şeklindedir. Kon ve ark.<sup>26</sup> matriks metalloproteinazların (MMP) hücre aracılı kollajen kontraksiyonunda ve dolayısı ile PVR patogenezinde görev aldıklarını göstermişlerdir.<sup>26</sup>



**Şekil 4:** PVR döngüsü. Tetiklediği, retinal ve ekstraretinal kaynaklı hücrelerin dağılması, göçü ve proliferasyonunu takiben epiretinal membran formasyonu oluşur. Retinal bütünlüğün bozulmasına, kan-retina bariyerinin (KRB) bozulması ve inflamatuvar doku cevabı eşlik eder. Bu süreç, kan hücrelerinin, büyüme faktörlerinin ve çözünebilir inflamatuvar faktörlerin (serum, fibrin, metaloproteinazlar), vitreus ve retinaya göç etmelerine sebep olur. Bu faktörlerin Epitelial-mezekimal geçiş (EMT) ve ekstraselüler matriksin yeniden yapılanması sürecinde fibroproliferatif membrandaki hücrelerin miyofibroblastik transdiferasyonu, retina dekolmanı ile sonuçlanan membran kontraksiyonuna neden olur. (Çizim, J. Grosche, Leipzig.)<sup>2</sup>

### **1.2.5.2. PVR'de Hücresel Elemanlar ve Büyüme Faktörleri**

Büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çözümler faktörlerin PVR patogeneğinde merkezi rol oynadığı; kemotaksis, proliferasyon, migrasyon ve hücre dışı matris yeniden modelleme gibi önemli hücresel yanıtları indüklediği fikrini destekleyen çok sayıda kanıt vardır.<sup>27</sup> Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan proteinlerdir. Karşlarına gelen hücre yüzey reseptörleri tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri, deoksiribonükleik asit (DNA) sentez fazını uyararak hücresel çoğalmayı ve farklılaşmayı aktive eder.<sup>28</sup> Sitokinler spesifik olarak hücresel iletişimde yaygın olarak kullanılan sinyalleme proteinlerini belirtir. Genellikle büyüme faktörü aktivitesi gösterirler ve hormonlar gibi otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterebilirler. İnterlökinler, spesifik olarak lökositlere yönlendirilen sitokinlerdir.<sup>2</sup> PVR patofizyolojisinde de birçok büyüme faktörü ve hücre rol oynamaktadır. Bunların başlıcaları aşağıda anlatılmıştır.

#### **Retina pigment epiteli**

RPE hücreleri fizyolojik koşullarda mitotik olarak sessiz ancak retinal hasar durumunda çoğalabilen hücrelerdir. RPE hücreleri RD sonrasında KRB'deki yıkımın da etkisiyle serum elemanlarına maruz kalırlar.<sup>29</sup> Bruch membranından ayrılıp epitel morfolojilerini de kaybederek vitreus içerisine göç ederler. Polaritelerini ve epitelyal özelliklerini kaybeden bu RPE hücrelerinin göç yeteneğinde artış, apoptoziste direnç ve matris üretimine sebep olan mezenkimal bir değişim görülür. PVR'de RPE hücreleri fibroblast benzeri hücreler haline gelir. SMA, *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), vimentin vb. ürünleri ekspres ederler ve epiretinal zarların yapısına katılırlar<sup>30</sup>.

#### **Kan ürünleri (Trombin, Fibronektin, Plazmin)**

KRB'nin bozulması, PVR patogeneğinde karakteristik ve önemli bir olaydır. Retinaya ve vitreusa giren serum, mitojenik sinyallerin hem Müller hücrelerine hem de RPE hücrelerine iletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Serum bileşeni olan trombin, retinal glial hücreleri ve RPE hücrelerinin proliferasyonunu uyarır.<sup>2</sup> Trombin seviyeleri, PVR'li hastaların vitreusunda belirgin olarak daha yüksektir. Proinflamatuvar ve profibrotik yolların aktivasyonunda rol alır.<sup>31</sup> Trombinin, epitelyal mezenkimal transisyonun (EMT) önemli bir belirleyicisi olan aktin stres lif oluşumunun ve PDGF



reseptör sinyalizasyonunun otokrin aktivasyonu yoluyla RPE hücrelerinin migrasyonunu düzenlediği bilinmektedir. RPE'nin koagülasyon kaskadıyla indüklenen EMT, PVR'de fibrotik retina membranlarının oluşumuna katkıda bulunabilir.<sup>32</sup>

Fibronektin, glial hücrelerin migrasyonunu uyarır ve ECM remodelingde önemli bir rol oynar. Deneysel PVR hayvanlarının ve retinal cerrahi hastalarının vitreusunda serum kaynaklı plazmin saptanmıştır. Plazmin, PVR gelişiminde rol alan başlıca PDGF izoformu olan aktif PDGF-C'nin üretilmesinden sorumludur.<sup>33</sup>

### **Glial hücreler**

Glial hücreler ve özellikle Müller hücreleri, retinal fizyolojide merkezi bir rol oynamaktadır. Nöronal aktiviteyi, KRB'nin bütünlüğünü, iyonik ve ozmotik homeostazi muhafaza ederler. Müller hücreleri, her türlü retinal yaralanma ve hastalıkta aktif hücrelerdir.<sup>34</sup> Birçok retinal hastalık, hücresele hipertrofi, vimentin ve GFAP'ın upregülasyonu ile karakterize reaktif gliozis ile ilişkilidir. PVR, reaktif gliozisin, uzun süreli hücre proliferasyonunun önemli bir örneğidir.<sup>35</sup> Reaktif gliozis, deneysel RD modelinde ayrılmadan birkaç dakika sonra gözlenir ve ayrılmayla beraber devam eder.<sup>36</sup> PVR sırasında, Müller hücreleri proliferere olur ve göç ederek membran yapısına katılırlar.

PVR'li hastaların, Müller hücrelerindeki potasyum kanallarındaki hasarı sonucu ortaya çıkan glutamat toksisitesi, PVR'de görülen nöronal dejenerasyona katkıda bulunabilir.<sup>35,37</sup> Reaktif gliozis, retina yatıştırıldıktan sonra görme iyileşmesinde sınırlayıcı bir faktördür.<sup>38</sup> Sağlıklı retinada, Müller hücreleri nöronal büyüme ve nöronal plastisiteyi kolaylaştırmak için gerekli yumuşak destek hücrelerdir. Hipertrofik ve çoğalan glial hücrelerin oluştuğu reaktif glioziste, rijit Müller hücreleri, rejeneratif akson büyümesi için mekanik bir engel olabilmektedir.<sup>38-40</sup>

### **Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)**

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) 36-46kDa ağırlığında, homodimerik glikoprotein yapıda, hücresele proliferasyondan ve vasküler geçirgenlikten sorumlu bir mediyatördür.<sup>41,42</sup>

Vasküler endotelial büyüme faktörün, VEGF-A' dan D'ye ve plasental büyüme faktörü (PlGF) olmak üzere altı üyesi vardır. İnsanlarda, VEGF-A en yaygın izoformudur

ve anjiyogenez için en önemlisidir. VEGF'in üç reseptör (VEGFR) alt tipi tanımlanmıştır. VEGF, en yüksek afinite ile VEGFR-1'e bağlanırken; VEGFR-2 anjiogenezde en önemli rolü oynamaktadır.<sup>27</sup>

Retinadaki birçok hücre tipi VEGF üretir. Buna RPE, vasküler endotel hücreleri, perisitler, retinal nöronlar, Müller hücreleri ve astrositler dahildir.<sup>43</sup> VEGF, iskemik retinal bozukluklara ikincil hipoksi yanıtında RPE ve retinal hücreler tarafından salgılanır. VEGF'in upregülasyonu anjiyogenez, artmış vasküler geçirgenlik ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile sonuçlanır.

Deneyisel PVR modellerinde ve PVR'lı hastalarda gösterilen PDGF reseptör alfa üzerinde üç sınıf büyüme faktörü [vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A), trombosit kökenli büyüme faktörleri (PDGF'ler) ve non-PDGF'ler (PDGF ailesinin dışındaki büyüme faktörleri, IGF-1,FGF vb.) etkilidir.<sup>7,8</sup> PDGF -C ve PDGF-D, PDGF ailesinden çok VEGF ailesine benzemektedir.<sup>44,45</sup>

PVR'lı hastaların vitreuslarındaki VEGF konsantrasyonları, RD ve makuler deliği olan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.<sup>46</sup>

### **Platelet Derived Growth Faktör (PDGF)**

PDGF'nin PVR gelişiminde kritik bir rol oynadığı görülmektedir. Vitreal PDGF, dokuz PVR hastasından sekizinde tespit edilebilir ancak nadiren diğer vitreoretinal hastalıkları olan hastalarda da saptanabilir. PVR membranlarında hem PDGF hem de PDGF reseptörü (PDGFR) bulunur.<sup>47</sup> RPE ve retinal glial hücreler de PDGF üretir ve reseptörlerine sahiptirler.<sup>47</sup> PDGF, RPE ve glial hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipi için güçlü bir kemoatraktan ve mitojen olup hücrel kontraksiyonda da rol alan bir mediatördür.<sup>48</sup> PDGF fibroblastların TGF- $\beta$ 'ya olan çoğalma cevabını artırır.<sup>49</sup>

### **Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

*Transforming growth factor  $\beta$*  ailesi TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'den oluşan yaklaşık 25 kilodalton ağırlığında ve birçok doku tarafından üretilen polipeptidlerdir. Müller hücreleri retinadaki TGF- $\beta$ 'nın bir kaynağıdır.<sup>50</sup> TGF- $\beta$ 'nın, proliferatif diyabetik retinopati ve PVR de dahil olmak üzere farklı fibroz hastalıklarda doku kontraksiyonunda etkili olduğu görülmüştür.<sup>51,52</sup> Normal vitreusta inaktif olan TGF- $\beta$  PVR hastalarının vitreusunda

yüksek seviyelerde bulunmaktadır.<sup>53</sup> TGF- $\beta$ , PVR daki subretinal bantlarda da bulunmaktadır.<sup>54</sup> TGF- $\beta$ , RPE hücrelerinin miyofibroblast dönüşümü, ekstraselüler matriks aktivasyonu ve üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur. TGF- $\beta$ 'nin enflamasyon odağına fibroblast, monosit ve makrofajları çekme özelliği de vardır. Bunların dışında interlökin 1 (IL-1), interlökin 6 (IL-6), tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler de epitel göçünde indirekt olarak etkili olabilmektedir.<sup>2,55,56</sup>

### **Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1)**

PVR'li hastaların vitreus örneklerinin önemli bir bölümünde MCP-1 saptanmış olup, özellikle MCP-1, PVR'nin başlangıç aşamasında bir role sahiptir. Deneysel RD'da, MCP-1'in ekspresyonu bir saat içinde artmaktadır.<sup>57,58</sup> MCP-1, RPE hücrelerinin migrasyonunu uyarır. Bu etki deksametazon tarafından engellenmiştir.<sup>59</sup>

### **Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)**

HGF (scatter faktörü), retinal hücrelerin yayılımında, kemotaksisinde ve EMT'de rol oynayan bir sitokindir.<sup>60,61</sup> PVR'de, vitreusta ve epiretinal membranlarda artmış HGF ekspresyon seviyesi gösterilmiştir.<sup>62,63</sup>

### **Epidermal Growth Faktör (EGF)**

EGF epitel hücreleri için potent mitojen bir polipeptittir.<sup>64</sup> EGF, konsantrasyona bağlı bir şekilde EGF-EGFR-MAPK sinyal yoluyla PVR daki RPE hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu aktive eder.<sup>65</sup> EGF, ayrıca RPE hücrelerini aktive eden integrin- $\alpha$ 5 ekspresyonunu da uyarabilir.<sup>66</sup> Ek olarak EGF, RPE hücrelerinde EMT'yi indükleyebilir.<sup>67</sup>

EGF'nin reseptörüne bağlanması fibronektin, hyaluronik asit gibi ekstraselüler matriks (ECM) moleküllerinin salgılanmasına ve kontakt inhibisyonunun olmadığı hücrelerin çoğalmasına neden olur, hücre iskeletindeki aktinin yeniden düzenlenmesini de sağlar.<sup>64</sup>

Ayrıca PVR'li hastaların cerrahi olarak çıkarılan epiretinal membranlarında da varlığı gösterilmiştir.<sup>68</sup>

### **Fibroblast Growth Factor (FGF)**

Birçok dokuda proliferasyon, farklılaşma, migrasyon, ECM depolanması ve anjiogenez gibi olayları düzenleyen protein grubudur. PVR vitreusunda *basic fibroblast growth factor*

(bFGF) düzeyleri yükselmekte ve fibroproliferatif membranlar bFGF'yi içermektedir.<sup>69,70</sup> PVR-D hastalarında vitreus bFGF ekspresyon seviyeleri; PVR-C, vitreus hemorajisi ve kontrol grubundakilerden belirgin şekilde daha yüksektir.<sup>71</sup> PVR patogenezinde diğer büyüme faktörleri ile birlikte bFGF önemli rol oynamaktadır.<sup>72,73</sup>

### ***Insulin Like Growth Factor (IGF)***

IGF-1 70 amino asitten yapılmış, 7649 dalton ağırlığında polipeptid zincirdir. *Growth hormone* (GH) aracılığıyla IGF-1'in karaciğer ve perifer dokulardan salınımı gerçekleşir. Ayrıca doku hasarına cevap olarak lokal salınımı da mevcuttur. Lokal salınımı direkt olarak veya EGF, FGF, PDGF gibi diğer büyüme faktörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir.<sup>34,74</sup> IGF sisteminin vitreusta var olduğu bilinmektedir.<sup>4</sup>

IGF-1'in farelerde yapılan bir çalışmada, özellikle prematüre retinopatisinin proliferatif fazında etkili olduğu gösterilmesinin yanında IGF-1 in diğer proliferatif vitreoretinal hastalıklarda, PDGF ile birlikte, Müller hücrelerinin ve RPE'nin kontraksiyonu stimüle edici etkisini uyardığı bilinmektedir.<sup>4,75,76</sup>

### **Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF)**

Hem in vivo hem de in vitro çalışmalar, CTGF'nin PVR patogenezinde önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır.<sup>77</sup> CTGF, PVR'li hastalardan fibroproliferatif membranlarda ve vitreus örneklerinde tespit edilmiştir.<sup>63,78</sup>

### **Sitokin aracılı inflamasyon elemanları (interlökinler ve TNF- $\alpha$ )**

Sitokin aracılı inflamasyon yollarının PVR gelişiminde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. PVR 'daki inflamatuvar hücreler, RPE hücreleri ve retinal glial hücreler; vitreusdaki interlökinler (IL -6, IL-1 $\beta$ ), *tumor necrosis factor-alfa* (TNF- $\alpha$ ) ve interferon gama (INF- $\gamma$ ) kaynaklarıdır.<sup>37</sup> Bu sitokinler migrasyon, proliferasyon ve ECM üretimi dahil olmak üzere önemli hücresel yolları uyarabilir<sup>2</sup>.

### **Kollajen ve Ekstrasellüler Matris**

Cilt yara iyileşmesine benzer şekilde, PVR gelişiminde de RPE ve ekstrasellüler matris arasındaki etkileşimler önemlidir.<sup>79</sup>

Kollajen ve ekstrasellüler matris, PVR membranları için bir yapı iskelesi görevi görmektedirler. Kollajenin kaynağı esas olarak RPE'dir. Fibroblast ve glial hücrelerin de kollajen üretiminde rolleri olduğu tespit edilmiştir. Epiretinal membranlarda en sık olarak kollajen tip 1 ve 3 tespit edilirken, tip 2, 4 ve 5'e de rastlanmıştır. PVR membranlarında

yüksek düzeyde fibronektin olduğu tespit edilmiştir. Fibronektin bir ekstrasellüler matriks proteindir. Fibronektin, RPE için kemoatraktandır, RPE hücrelerine geçici bir matriks sağlar, RPE hücrelerinin fibroblastik bir fenotipe dönüşmelerini uyarır, hücrelerin göç etmesi için bir çatı olarak görev alır. PVR'nin başlangıcında kandan köken alırken, daha ileri evrelerde RPE tarafından sentezlenir.<sup>79</sup>

PVR membranlarında tespit edilen diğer ECM proteinleri ise vitronektin, laminin, trombospondin-1, tenaskin ve osteonektindir.<sup>21</sup> Bu proteinlerin özelliği PVR membranlarında tespit edilmelerine rağmen normal retina dokusunda da bulunmamalarıdır. PVR patogenezindeki rolleri halen tam olarak bilinmemekle birlikte ECM oluşumuna katkıları gösterilmiştir.<sup>3</sup> ECM bir başka komponenti olan matriks metalloproteinazların özellikle MMP-1 ve 2'nin düzeylerinin epiretinal ve subretinal PVR membranlarında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serin proteazlar tespit edilmiş diğer bir sitokin grubudur.<sup>16</sup>

### **1.2.5.3. PVR'nin Sınıflandırması**

İlk kez 1934'de Gonin bu durumu retina yüzeyinin membranlar tarafından işgal edilmesi olarak tanımlamış ve preretinal organizasyon kavramını gündeme getirmiştir.<sup>80</sup> Machemer ve Laqua<sup>81</sup> maymunlarda yırtıklı retina dekolmanını inceledikleri çalışmada, retina dekolmanı olan gözlerde RPE ve glial hücre proliferasyonunu, bu proliferasyonun vitreusta, iç ve dış retinal yüzeyde membranlar oluşturduğunu, retinal katlantıların meydana geldiğini göstermişlerdir. Esas patolojinin vitreusta olduğunu düşünerek bu durumu masif vitreus retraksiyonu (MVR) veya masif preretinal retraksiyon (MPR) olarak isimlendirmişlerdir.<sup>81</sup> Sonraki süreçte preretinal membran oluşumu göz önünde tutularak bu isimlendirme masif preretinal proliferasyon (MPP) olarak değiştirilmiştir.<sup>29</sup> Günümüzde de yaygın olarak kullanılan proliferatif vitreoretinopati (PVR) tanımı ve sınıflaması ilk olarak 1983 yılında Retina Cemiyeti tarafından oluşturulmuştur.<sup>82,83</sup>

Retina cemiyeti PVR görünümünü klinik bulgulara ve coğrafi dağılıma göre dört grupta sınıflamıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi'ne göre PVR sınıflandırması(1983)

<b>PVR EVRESİ</b>	<b>BULGULAR</b>
<b>EVRE A</b>	Vitreus bulanıklığı, vitreusta pigment kümelenmeleri
<b>EVRE B</b>	İç retina yüzeyinde kırışıklık ve sertleşme yırtık kenarında kıvrılma, retina damarlarında kıvrım artışı
<b>EVRE C</b>	Tam kalınlıkta sabit retinal katlantılar C1: bir kadranda C2: iki kadranda C3: üç kadranda
<b>EVRE D</b>	Dört kadranda sabit retinal katlantı D1: geniş huni D2: dar huni (20 Dpt. lensle indirekt oftalmoskopide tünelin ön ucu görülebilir.) D3: kapalı huni (optik sinir başı görülemez.)

Ancak bu yeni sınıflandırmanın anteroposterior proliferasyonu ve dolayısıyla PVR'deki anterior traksiyonun içermeyen, ön PVR hakkında bilgi vermeyen ve hücrel proliferatif aktivite derecesi hakkında hiçbir şey söylemeyen statik bir sınıflandırma olması nedeniyle 1989 ve 1991 yılında Silikon Çalışma Grubu (SÇG) tarafından hazırlanan daha kapsamlı bir sınıflandırma gündeme gelmiştir (Tablo 2 ve 3). SÇG grubunun sınıflandırılmasında PVR'nin yeri, yaygınlığı ve şiddeti daha ayrıntılı ele alınmıştır. SÇG sınıflandırmasında PVR anterior ve posterior formlara ayrılmış ve her form üç tipe bölünmüştür. Anterior PVR'nin prognozu ve tedavisi posterior PVR'den farklı olması nedeniyle PVR nin anterior formunun tanımı SÇG'nun en önemli katkısıdır.<sup>4</sup>

**Tablo 2.** Silikon Çalışma Grubu'na göre PVR evrelendirmesi (1989)

<b>EVRE</b>	<b>KLİNİK BULGULAR</b>
<b>A</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vitreus bulanıklığı,</li><li>• Vitreusta pigment kümeleri(clump)</li></ul>
<b>B</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• İç retina yüzeyde kırıxıklık</li><li>• Retinal yırtık kenarında kıvrılma</li><li>• Retinada kalınlaşma(stiffness)</li><li>• Damarlarda kıvrımlanma artışı</li><li>• Vitreus hareketlerinde azalma</li></ul>
<b>CP<sub>1-12</sub>*</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ekvatorun gerisinde yerleşmiş</li><li>• Fokal, diffüz ya da sirkümfensiyal tam kat katlantılar</li><li>• Subretinal bantlar</li></ul>
<b>CA<sub>1-12</sub>*</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ekvatorun önünde yerleşmiş</li><li>• Fokal, diffüz ya da sirkümfensiyal tam kat katlantılar</li><li>• Subretinal bantlar</li><li>• Kondanse vitre bantları</li></ul>

\*: saat kadranı

**Tablo 3.** PVR kontraksiyon tipi sınıflandırması (1991)

<b>TİP</b>	<b>YERLEŞİM</b>	<b>BULGULAR</b>
<b>FOKAL</b>	POSTERİÖR	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vitreus tabanında yıldız şeklinde katlanma</li></ul>
<b>DİFFÜZ</b>	POSTERİÖR	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vitreus tabanının posteriorunda birbiriyle devamlılık gösteren starfold yapıları</li><li>• Optik diskin görülemeyebilir</li></ul>
<b>SUBRETİNAL</b>	POSTERİÖR / ANTERİÖR	<ul style="list-style-type: none"><li>• Subretinal proliferasyon</li><li>• Optik disk etrafında retinanın peçete halkası şeklinde kabarması (napkin ring)</li></ul>
<b>SİRKUMFERENSİYAL</b>	ANTERİÖR	<ul style="list-style-type: none"><li>• Posterior vitreus tabanı boyunca kontraksiyonla beraber retinanın santrale çekilmesi</li><li>• Periferel retinada gerginlik</li><li>• Posterior retinada düzensiz radial katlanmalar</li></ul>
<b>ANTERİÖR</b>	ANTERİÖR	<ul style="list-style-type: none"><li>• Proliferatif doku nedeniyle vitreusun öne çekilmesi</li><li>• Huni görünümünde hareketsiz retina</li><li>• Siliyer prosesler gerilmiş ya da membranla örtülmüş olabilir</li><li>• İris retraksiyonu olabilir</li></ul>

#### **1.2.5.4. PVR'nin İnsidans ve Risk Faktörleri**

Proliferatif vitreoretinopati gelişimi için ön görülen risk faktörlerini iki grupta toplamak mümkündür.

**Kontrol edilemeyen faktörler:** Travma, dev yırtık, multipl yırtıklar, afaki, psö dofaki, retina dekolmanı kaynaklı preoperatif vitre içi hemoraji, koroid dekolmanı, subretinal kanama, multiple göz cerrahisi öyküsü, üveit, dekolmanın yaygınlığı ve preoperatif PVR varlığı sistemik bozukluklarla ilişkili olan retina dekolmanı (Marfan



sendromu, Stickler sendromu, Familial eksudatif vitreoretinopati).<sup>1,4,16,29</sup>

**Kontrol edilebilen faktörler:** Yırtıklı retina dekolmanı cerrahisi, cerrahi sırasında aşırı krioterapi, diatermi ve fotokoagulasyon yapılması, retinanın inkanserasyonu, intraoperatif ve postoperatif vitreus hemorajisi, makula translokasyon cerrahisi, retinal protez implantasyonu, okuler tümörlerin endorezeksiyonu, subretinal sıvı drenajı sırasında vitreus kaybı, tekrarlayan cerrahiler, postoperative uzamış inflamasyon, göz içine hava veya sülfür heksaflorür gazı verilmesi.<sup>1,4,16,29</sup>

#### **1.2.5.5.PVR'de Tedavi**

##### **1.2.5.5.1.PVR'de Cerrahi Tedavi**

PVR de primer tedavi cerrahidir. Cerrahideki asıl amaç retinal yırtıklarını kapatmak, traksiyonları rahatlatmak ve retinayı yatıştırmaktır. Hafif ve orta dereceli vakalar genellikle konvansiyonel cerrahi ile tedavi edilir ancak daha ileri vakalar skleral çökertme, vitrektomi, membran soyma, perflorokarbon sıvıları, retinotomi, retinektomi ve silikon yağı / gaz ile intravitreal tamponad kullanımı gibi tekniklerle zor ameliyatlara gerektirir.<sup>1,4</sup>

##### **1.2.5.5.2. PVR'de Farmakolojik Tedavi**

###### **Antiinflamatuvar ilaçlar**

PVR, KRB bozulmasıyla başlayan inflamatuvar süreç ile başlar. Test edilen ilk ajanlardan biri kortikosteroidlerdir. Fibroblastların büyümesi, sitokin ekspresyonu üzerine kortikosteroidlerin inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir.<sup>84,85</sup> Chandler ve ark yaptığı tavşan modellerinde intravitreal triamsinolonun PVR oranını %90'dan % 56'ya düşürdüğü bildirilmiştir.<sup>86</sup>

Pars plana vitrektomi cerrahisi sonunda intravitreal kortikosteroid kullanılarak intraoküler komplikasyonlarını ve etkinliğini inceleyen kontrollü bir çalışmada kortikosteroid verilen grupta intraoküler inflamasyonun daha az olarak gözlendiği ve PVR tedavisinde potansiyel ek bir ilaç olabileceği belirtilmiştir.<sup>87</sup> Hayvan deneylerinde steroidlerle yakalanan başarıya rağmen, insan çalışmalarında aynı başarı yakalanamamıştır.

## **Antiproliferatif Ajanlar**

KRB bozulması ve enflamasyonun evresinden sonra proliferatif evre ortaya çıkmaktadır. Hücre proliferasyonunu inhibe eden antineoplastik ajanlar PVR tedavisi için kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Bunlar, 5-fluorourasil (5-FU), daunorubisin, metotreksat, taksol, kolşisin, retinoik asit, ribozimler, vinkristin, cisplatin, adriamisin, mitomisin, daktomisin, taksol, tiotepa vb. bileşikler içerir.<sup>88</sup>

## **Ekstrasellüler Matriks Üretim ve Kontraksiyonunu Önleyen Ajanlar**

Proliferasyon sonrası ECM ve kontraksiyon meydana gelir. ECM, kollajen, trombin, fibronektin, MMP ve tübüllere etki eden ajanlar araştırılmaktadır. Bunlar, prokollojen inhibitörü Cis-hidroksiprolin (CHP), kolşisin, D-penisilamin, argotroban, düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH), prinomastat (Ag-3340) ve benzeri bileşiklerdir.<sup>23,88-90</sup>

## **Gen Tedavisi**

İnsan RPE hücreleri herpes simpleks virüs-timidin kinaz (HSV-tk) geni ile transdüksiyona uğratılmış ve sonrasında gansiklovir tedavisi uygulanmıştır. Gansiklovir HSV-tk geni taşıyan hücreleri doz ve zamana bağlı olarak öldürmüştür.<sup>91</sup>

Ikuno ve Kazlauskas<sup>73</sup>, PVR patogenezinde rol alan PDGF reseptörünün (PDGFR) alpha PDGFR olduğu gösterilmiş ve dominant negative PDGFR geninin retroviral yolla verilmesinin kollajen jel kontraksiyonunu ve retina dekolmanını azalttığını göstermişlerdir.<sup>73</sup>

## **PVR Medikal Tedavisinde Denenmiş Diğer Ajanlar**

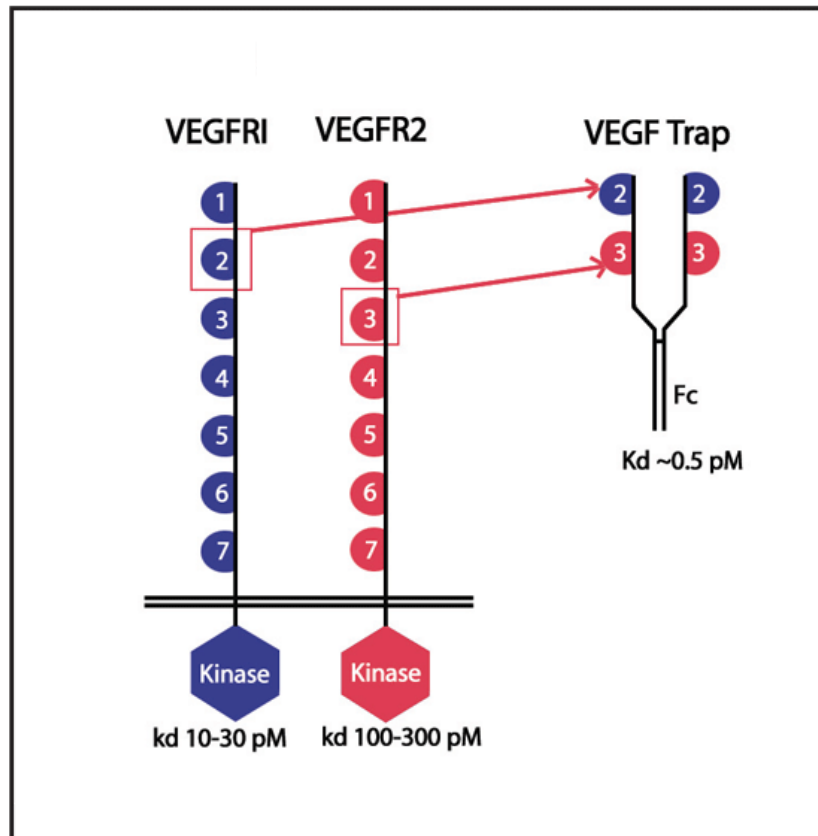
Antiproliferatif etkileri bilinen bu ilaçlar dışında bir antihipertansif olan minoksidil, kalsiyum kanal blokörleri olan verapamil ve diltiazem, kolesterol sentez inhibitörü olan lovastatin, antiparazitik suramin, siklooksijenaz inhibitörleri olan asetilsalisilik asit, indometasin ve meklofenamat, antidepresan olan hiperisin, antioksidan olan ginkgo biloba ve vitamin E, tirozin kinaz inhibitörleri olan genistein ve herbimisin A<sub>2</sub>anjiogenez mediatörü leptin, ribozim türevi Vit100, talidomid, somatostatin analogları (oktreotid ve somatulin), TGF- $\beta_1$  inhibitörü tranilast ve radyoterapinin de PVR üzerine inhibe edici etkileri gözlenmiştir.<sup>92-106</sup>

### 1.2.6.AFLİBERCEPT

2002’de Holash ve arkadaşları tarafından, kanser tedavisi için VEGF-Trap gelişimi ve in vivo çalışmasını bildiren ilk makale yayınlanmıştır. VEGF-Trap, VEGFR-1 in ilk üç immunoglobulin (Ig) bölgeleri ve immunoglobulin G1 ‘in Fc parçalarının birleştirilmesiyle oluşturulmuştur(Şekil 5). Bu başlangıç molekülüne dayanarak üç ilave VEGF-Trap (aflibercept, ziv-aflibercept ve conbercept) geliştirilmiştir.<sup>41</sup>

Aflibercept, VEGF reseptör 1 ve 2 nin antijen bağlayan kısımlarıyla Immunoglobulin G’nin (IgG), Fc parçalarının birleştirilmesiyle oluşturulmuş çözünebilir bir humanize füzyon proteinidir. Kimyasal formülü

$C_{4318}H_{6788}N_{1164}O_{1304}S_{32}$ ’dir.



Tamamiyle insan amino asit yapısında olması sayesinde immünolojik potansiyeli minimize edilmiştir. Bu füzyon proteinin reseptör kısmı bütün VEGF-A

izoformlarının yanında VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü 1 ve 2'ye bağlanabilme özelliğine sahiptir. Böylece VEGF-Trap VEGF-A'nın tüm izoformlarını bloke etmekte kalmayıp, proanjiojenik özelliğe sahip diğer VEGF ailesi üzerinden de etkisini göstermektedir (Şekil 6).<sup>107,108</sup> Aflibercept, bevacizumab veya ranibizumaba kıyasla VEGF-A için daha fazla bağlanma afinitesi gösterebilir.<sup>109,110</sup> Son on yıl içinde, VEGF'yi bloke etmek için intravitreal farmakoterapi kullanımı yaygınlaşmış ve neovasküler yaşa bağlı makuler dejenerasyonu (AMD), diyabetik makula ödemi (DME) ve retinal ven tıkanıklığına (RVO) bağlı makuler ödeme olan hastalarda görsel sonuçlara önemli ölçüde fayda sağlanmıştır.<sup>111-113</sup> Bu retinal hastalıklar, artmış intraoküler VEGF düzeyleri ve makuler ödem gelişimi ile karakterize olup, merkezi ve keskin görme işlev bozukluğu ile sonuçlanır. VEGF aynı zamanda bu koşullarda neovaskülarizasyon gelişimine aracılık eder ve ciddi irreversible görme kaybına yol açabilir. Bu bozuklukları olan hastaların vitreus boşluğuna bir anti-VEGF ajanı verilmesi intraoküler VEGF'yi düşürür, yeni damar oluşumunu ve vasküler kaçışı azaltır.<sup>109,111</sup> Pennock ve ark<sup>7</sup> pigmente tavşanlara intravitreal RPE ve fibroblast uygulayarak oluşturdukları deneysel PVR modelinde afliberceptin etkisini incelemişlerdir. Aflibercept uygulanan grupta retina katlarının yapısının korunduğu ve ERG'de sonuçların anlamlı olarak bozulmadığı görülmüştür.<sup>7</sup>

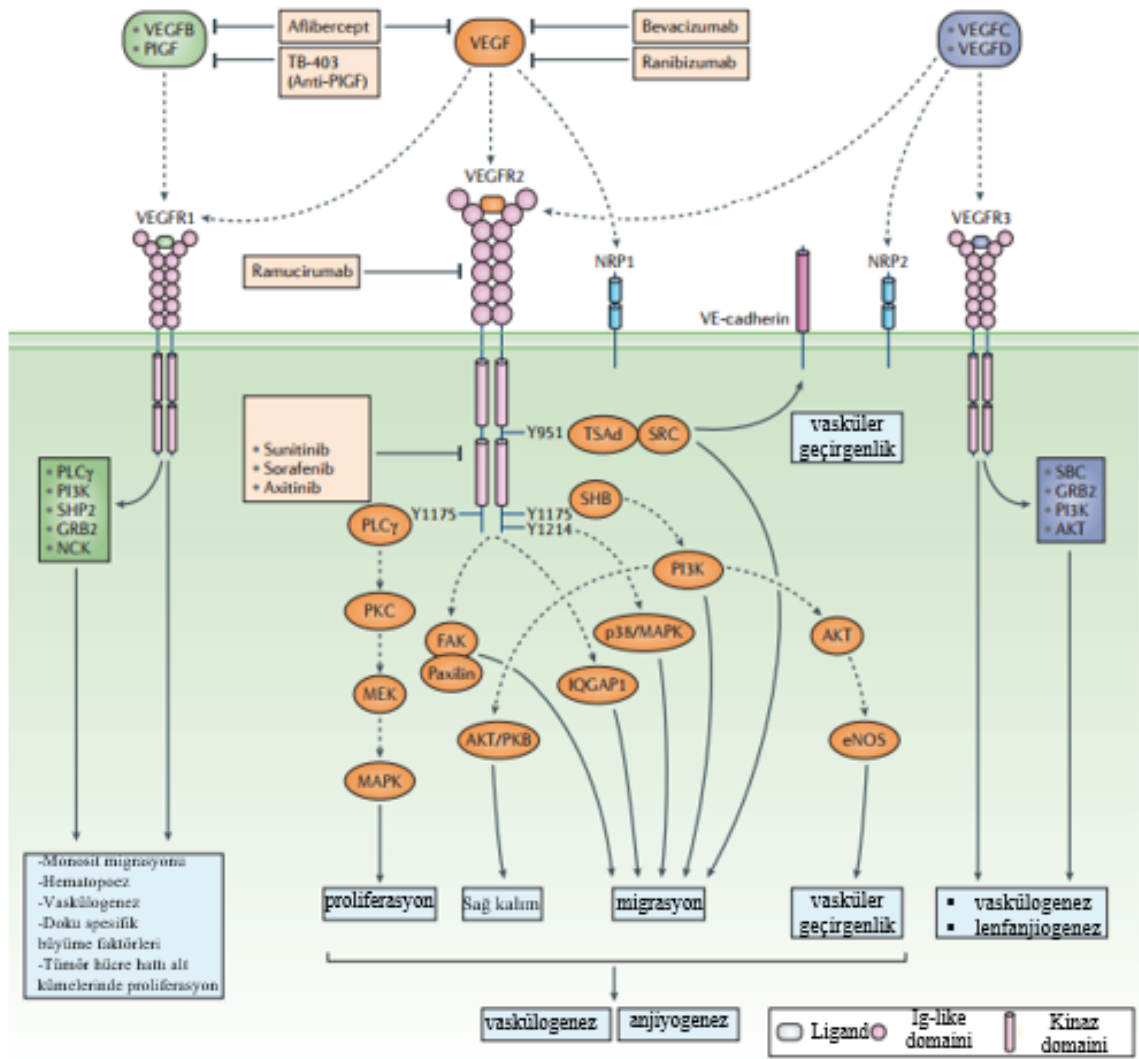
Aflibercept, Ameirkan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Kasım 2011'de yaşa bağlı makula dejenerasyonu, Ekim 2014'te retinal ven okluzyonuna bağlı makuler ödem ve Mart 2015'te diyabetik makuler ödem tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır.<sup>41</sup>

### **Afliberceptin Yan Etkileri**

İntravitreal olarak uygulanan afliberceptin yan etkileri genel olarak göz üzerine olmaktadır. Konjonktival hemoraji, göz çevresinde ağrı, katarakt, vitreus dekolmanı, intraoküler basınçta yükselme bunların başlıcalarıdır. Daha nadir olmakla beraber retina dekolmanı, retinada yırtık, endoftalmi olguları da bildirilmiştir.<sup>114,115</sup>

### **Afliberceptin kontraendike olduğu durumlar**

Okuler ya da periokuler en feksiyonu olan ve aktif intraoküler inflamasyonu olan hastalarda kontraendikedir.<sup>114</sup>



Şekil 6: VEGF ve anti-VEGF lerin etki mekanizması

## 1.2.7 Deneysel PVR Modelleri ve Dispaz

### 1.2.7.1 İn Vitro Deneysel PVR Modelleri

RPE hücreleri insanlardan, primatlardan, tavşanlardan, ineklerden, domuzlardan, kobaylardan, ratlardan ve farelerden izole edilerek hücre çoğalması, apoptoz, göç, ekstraselüler matriklere bağlanma ve matriks kasılması dahil olmak üzere PVR ile ilgili in vitro etkileri incelemek için rutin olarak kullanılmaktadır. İn vitro modelde ise hücre proliferasyonu için enükle edilmiş hayvan gözlerinin vitreus örnekleri kullanılmaktadır.<sup>116</sup>

RPE hücre kültüründen farklı olarak iki tip in vitro model daha bulunmaktadır. Bunlardan birincisi hayvan tenon kapsülü fibroblastlarından veya insan RPE hücrelerinden elde edilen hücre kültürünün organ kültürlerinde yaşatılan retinal eksplantlara ekilmesi ile oluşturulan PVR modelidir. İkinci model ise fareden elde edilen, organ kültüründe yaşatılan retinal eksplantların, glial hücreler üzerine proliferatif etkisi olan ve retinal kontraksiyona sebep olan büyüme faktörlerine (PDGF) maruz bırakılarak oluşturulan PVR modelidir.<sup>116</sup>

### 1.2.7.2 İn Vivo Deneysel PVR Modelleri

Yirmibeşe yakın deneysel in vivo PVR modeli bulunmaktadır. Bu deneysel modelleri üç grupta toplayarak özetlemek mümkündür.<sup>116</sup>

1) Kültüre edilmiş hücrelerin intravitreal enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel in vivo PVR modellerinde otolog fibroblast hücreleri (sağlam olan diğer gözden alınır), homolog fibroblast hücreler (deri biyopsisinden kültüre edilir), endotel hücreleri, kondrositler, embriyonel hücreler, otolog RPE hücreleri, homolog RPE hücreleri, insan RPE hücreleri, makrofajlar, konjonktival fibroblastlar ve plateletten zengin plazma kullanılmaktadır.

2) Diğer modellerle de kombine edilebilen cerrahi müdahale gerektiren deneysel in vivo PVR modelleri:

- Lens ekstraksiyonu ve vitrektomi ile anterior PVR oluşturulan model
- Retina dekolmanı ve RPE soyulması ile PVR oluşturulan model
- Pars plana boyuca insizyon uygulanıp otolog kan enjeksiyonu ile travmatik PVR oluşturulan model
- Retinal kriopeksi, lensektomi, vitrektomi gibi cerrahi müdahalelere ek olarak intravitreal kültüre edilmiş RPE enjeksiyonu ile kombine edilen PVR modelleri
  - Retinal hole oluşturduktan sonra IL-1 enjeksiyonunun kombine edildiği model şeklinde özetlenebilir.

3) Diğer modeller:

- Transgenik PDGF (PDGF ile uyarılmış fotoreseptör hücreleri)
- Adenovirüslerle enfekte edilmiş RPE hücreleri

- Adenoviruslerin
- Concanavalin
- Dispazın intravitreal enjeksiyonu ile oluşturulan model sayılabilir.<sup>116</sup>

### 1.2.7.3 Dispaz

İlk olarak Frenzel ve ark.<sup>117</sup> deneysel çalışmalarında PVR indüksiyonu için farelere intravitreal dispaz uygulamışlardır.<sup>117</sup> Dispaz Bacillus polymyxa'nın kültür filtratlarından izole edilen, fibronektini, kollajen IV'ü ve daha küçük ölçüde olmak üzere kolajenin I'ini parçalayan proteolitik bir enzimdir (nötral proteaz). Deneysel çalışmalarda hücre toplama ve doku ayrıştırılmasında kullanılır.<sup>118</sup> Deneysel PVR modelinde, bazal membran yapısında bulunan ve bazal membran RPE hücrelerinin devamlılığında önemli bir yer tutan kollajen ve fibronektin dispaz ile yıkılmaktadır. Devamlılığı bozulan RPE hücreleri vitreus boşluğuna dökülmekte; böylece vitreusta kontraktıl membranlar oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda PVR geliştirmede etkin dozun 0.05- 0.07 U olduğu ve gelişim süresinin de ortalama 8- 10 hafta olduğu gösterilmiştir.<sup>117</sup> Tikhonovich M. ve ark.<sup>119</sup> ratlarda yaptığı çalışmada ise 0.03U doz ile 6 hafta sonunda PVR oluşumu gösterilmiştir.<sup>119</sup>

Kolay uygulanan ve ucuz maliyetli bu deneysel PVR modelinin dezavantajı Kralinger ve ark.<sup>120</sup> çalışmalarında da gösterildiği gibi katarakt ve lens subluksasyonu oluşması nedeniyle deney süresince fundus görüntülemesine izin vermemesidir. Ancak diğer deneysel PVR modellerinde de katarakt gelişimi söz konusu olduğundan, bu durumun sadece dispazın neden olduğu toksik reaksiyonla değil aynı zamanda PVR'nin patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.<sup>120</sup>

## **2.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1 Proteomiks Analizi**

Proteomiks genomun tüm protein komplementlerini (proteom) çalışan 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 çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır.<sup>121</sup> 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.

#### **2.1.1 Biyobelirteçler**

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür.<sup>122</sup> Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım 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.<sup>123</sup>

### 2.1.2 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.<sup>124</sup> Ayrıca bu aşamada örnek karmaşıklığının azaltılması da önemlidir. Proteom analizinde ikinci adım analitik protein ayırma teknolojisidir. Analitik protein ayırma teknolojisinde önce kompleks protein karışımlarını belli proteinlere ya da protein alt gruplarına ayırarak basitleştirir. Daha sonra örnekler arasında karşılaştırma yapılarak protein düzeylerindeki farklılıklar belirlenir. Proteinlerin ayırma araştırıcısına analizi için spesifik proteinleri hedeflemesini sağlar. İlki sıvı fazda ayırma yapıldığı metod ve ikincisi ise proteomikte altın standart olup sıklıkla tercih edilen 2D (iki boyutlu) jel elektroforez metodu olmak üzere iki tip metod mevcuttur.<sup>124,125</sup> 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 fokuslama ve kromatografik yöntemlerdir.<sup>124,125</sup> Ayırılmış 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.

## 2.2.MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi

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 prospektör 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.

### 2.3 Karşılaştırmalı Proteomiks Çalışmalarının Amacı

Klinik proteomiks çalışmalarında temel amaç, farklı hastalıklara ait özgün biyobelirteçlerin ortaya konması ve bunun tanı testi olarak kullanılmasıdır. Biyokimyasal mekanizmaların karmaşıklığı nedeni ile birçok hastalıkta tek bir biyolojik belirteç ile sonuca ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hastalık progresyonu sırasında ortaya çıkan moleküllerin çalışılmasında, çoklu belirteç panellerinin veya proteomiks panellerinin çalışılması giderek önem kazanmaktadır.<sup>126,127</sup>

Normal biyolojik süreçlerin ve hastalıkların altında yatan mekanizmaların tanımlanması, vücut sıvılarında, hücrelerde veya doku biyopsilerinde diyagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanması, hastalık progresyonunun izlenmesi ve subklasifikasyonu, yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi, vücut sıvı örneklerinin veya doku biyopsilerinin orijinlerinin belirlenmesi, sıvı, hücre veya dokularda protein fenotiplerinin ve post-translasyonel modların belirlenmesi, immünoglobulin klonlarının araştırılması genetik otoimmün, enfeksiyonel veya neoplastik hastalıklar olarak tanımlanabilir.

### 2.4 Deneğin Uygulanışı

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nın katkıları ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları ortalama 350 gram olan 35 adet erkek Long Evans cinsi pigmente ratın tek gözü kullanıldı. Çalışma süresince denekler Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde (DETAB) uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu.

Toz halinde 25 IU dispaz içeren flakon ise (Gibco, Tokyo, Japonya) 0.03IU/µl dispaz olacak şekilde salin solüsyonu yardımıyla hazırlandı. 40mg/ml dozundaki Aflibercept (Eylea, Bayer, Türkiye) intravitreal enjeksiyon için çözeltiden 2 µl hazırlandı. İlaçların hazırlanması esnasında sterilizasyon kurallarına uyuldu. Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 90 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 10 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin gözlerine %0,5'lik proparakain hidroklorid damla (Alcaine, Alcon, Türkiye) damlatıldı.

Endoftalmi profilaksisi için deney süresince yapılan tüm intravitreal uygulamalar öncesinde deneklerin hepsinde glob etrafı %10 povidon iodin ile temizlendikten sonra konjonktiva yüzeyine %5'lik povidon iodin uygulaması yapıp en az üç dakika beklendi ve konjonktiva yüzeyi salin solüsyonu yardımıyla yıkandı. Enjeksiyon sonrası enfeksiyonu önlemek amacıyla topikal antibiyotik olarak ofloksasin damla damlatıldı.

Denekler her grupta on iki rat olacak şekilde, kontrol, dispaz+salin ve dispaz+aflibercept olacak şekilde randomize olarak 3 gruba ayrıldı;

Dispaz+aflibercept grubundaki ratların sağ gözüne limbusun 0,5 mm gerisinden 30 G iğneli enjektör ile girildi ve 2 µl vitreus aspire edildi (vitreus tab). 0.03U/ µl dozunda 2µl dispaz ve 40 mg/ml dozunda 2 µl abflibercept verildi. Dispaz solüsyonunun PVR geliştirmesi için gerekli süre olan 6 hafta boyunca beklenildi.

Dispaz+salin grubundaki ratların sağ gözüne limbusun 0,5 mm gerisinden 30 G enjektör ile girilerek aynı metodla 2µl vitreus tab işlemi uygulandı. 0.03U/ µl dozunda 2µl dispaz ve 2 µl steril salin enjekte edildi. Dispaz solüsyonunun PVR geliştirmesi için gerekli olan 6 hafta süresince beklenildi.

Kontrol grubundaki ratların gözlerine enjeksiyon uygulanmadı.

Takiplerde 2. Haftada katarakt geliştiği görüldü. Altıncı haftanın bitiminde proteomik değerlendirme için evisserasyon işlemi uygulandı.

Ratlardan alınan vitreus ve retina örnekleri incelenmek üzere Tıbbi Biyoloji bölümüne verildi.

## **2.5 Proteomiks Değerlendirmesi**

### **2.5.1 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(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 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.

### **2.5.2 Protein Konsantrasyonunun Tayini**

Örnekler kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ '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  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **2.5.3 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  $\mu\text{g}$ , 17cm IPG stripler için ise 750  $\mu\text{g}$  protein örneği kullanıldı. Gerekli miktardaki protein örneği 2D rehidrasyon tamponu ile karıştırılıp içerisine 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 $\mu\text{A}$ /IPG Strip akım uygulanacak şekilde PROTEAN IEF (BioRad) içerisinde aktif rehidrasyona tutuldu ( $20^{\circ}\text{C}$ ). 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  $20^{\circ}\text{C}$ 'de fokuslandı (7cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 4000V 2 saat Lineer, 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 Lineer, 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 Lineer, 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 istatistikî olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad) ile yapıldı.

#### **2.5.4 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 asetonitril (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 disülfit bağlarının kırılması sağlanacak reducing edilir. Ardından son konsantrasyonu 100 mM iyodaasetamid (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 içerisinde 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.

### **2.5.5 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 ayırıldıktan 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  $\pm 50$  ppm, fragment kütle toleransı  $\pm 0.25$  Da olarak belirlenerek MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

### **2.5.6 Biyoinformatik Analizler**

Tanımlanan proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücreyel yollarını 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. Tanımlanan proteinlerin etkileşim yollarını ve etkileştiği proteinleri belirleyebilmek için ise yine internet üzerinden ücretsiz ulaşılabilen BioGrid analizi gerçekteşirildi (<https://thebiogrid.org/>). Tez içerisinde kullanılan tüm şekiller Adobe Illustrator CS6 programını ile yapıldı ve en az 300 dpi çözünürlükte oluşturuldu.

### 3.BULGULAR

DEKART-Proteomik Araştırma Laboratuvarına 6.Hafta sonunda G1 (Kontrol), G2 (Dispaz+Salin)ve G3 (Dispaz+Aflibercept) uygun şartlar altında getirilen vitreus sıvısı ve retina örneklerinden protein özütleri metod kısmında anlatıldığı gibi hazırlandı. Hazırlanan örneklerden Bradford metodu kullanılarak protein konsantrasyonları ölçüldü. Örneklerdeki protein konsantrasyonu ortalama  $73,8 \pm 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  civarında idi ve örneklerin 2D çalışmalarına yetecek miktarda protein ihtiva ettiği görüldü (Tablo 4). Bradford ile yapılan spektrofotometrik ölçümlerin doğruluğunu test etmek amacı ile, yapılan ölçümler baz alınarak SDS-PAGE protein jelleri hazırlandı. Her bir örnekten eşit miktarda olacak şekilde (20  $\mu\text{g}$ ) yüklemeler yapıldı ve jeller coomassie mavisi ile boyanarak analize tabi tutuldu. Yapılan analiz neticesinde protein ölçümlerinin doğru yapıldığı ve her bir kuyucuğa eşit miktarda protein yüklendiği görüldü (Şekil 7). Ayrıca protein bantlarının keskin olması ve net bir şekilde jel üzerinde görüntü vermesi, örneklerin doğrudan 2D analize tabi tutulabileceğini gösterdi. Ancak bazı düşük moleküler ağırlıklı protein bantlarının örneklerden bazılarında diğerlerine göre daha fazla miktarda bulunduğu görüldü. Bu nedenle normalizasyon yapabilmek için tüm örneklerde görülen bir protein bandı baz alınarak karşılaştırma yapıldı. Yapılan bu öncül analiz, örneklerin karşılaştırmalı 2D-jel çalışmalarına uygun olduğunu ve elde edilecek bilgilerin güvenilir olacağını gösterdi.

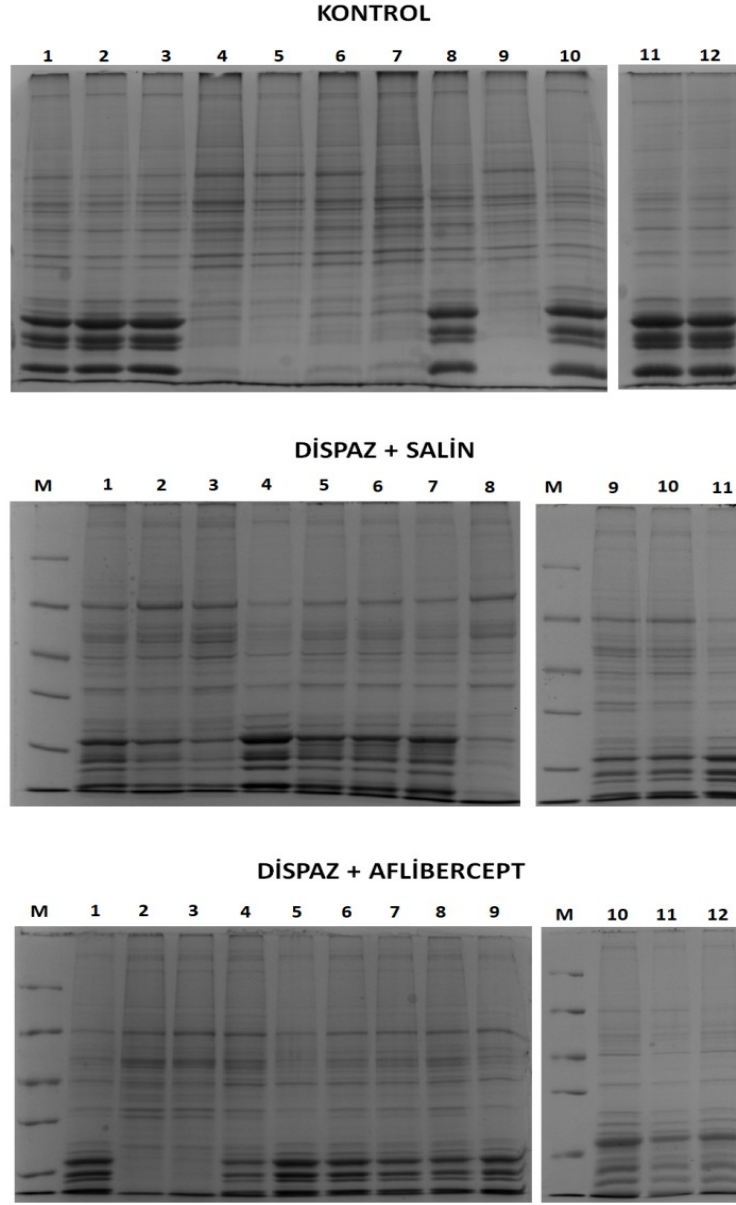
Her bir gruptan protein havuzları oluşturulması için 1.grubun (n=12) her bir örneğinden 285  $\mu\text{g}$ , 2.grubun (n=11) her bir örneğinden 363  $\mu\text{g}$  ve 3.grubun (n=12) her bir örneğinden 333  $\mu\text{g}$  protein alındı ve üç farklı protein havuzu oluşturuldu. Toplamda 4000  $\mu\text{g}$  protein içeren havuzlar çalışmanın sonuna kadar kullanılacak şekilde parçalara ayrıldı ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Oluşturulan havuzların eşit miktarda protein içerdiğini gösterebilmek için her bir havuz örneğinden 20  $\mu\text{g}$  protein alınarak western blot analizine tabi tutuldu. Bu amaçla her örnekte eşit miktarda bulunması gerekli olan bir protein olan beta-aktin miktarları ölçüldü (Şekil 8). Yapılan analizde, havuz örneklerinin doğru oluşturulduğu ve eşit miktarda protein içerdiği görüldü.

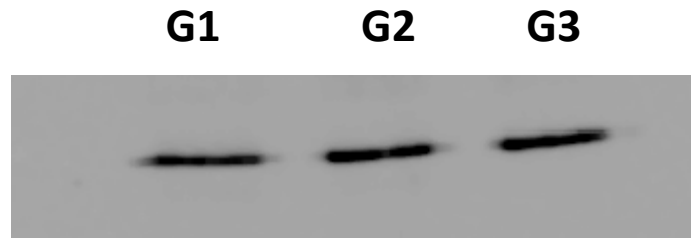


**Tablo 4.** Kontrol, Dispaz+Salin ve Dispaz+Aflibercept gruplarından elde edilen protein özütlerinin Bradford ölçüm sonuçları

<b>KONTROL</b>		<b>DİSPAZ + SALİN</b>		<b>DİSPAZ+AFLİBERCEPT</b>	
<b>K1 R</b>	63,47 µg/µl	<b>G2-1 R</b>	57,74 µg/µl	<b>G3-1 R</b>	117,2 µg/µl
<b>K2 R</b>	107,95 µg/µl	<b>G2-2 R</b>	32,63 µg/µl	<b>G3-2 R</b>	49,85 µg/µl
<b>K3 R</b>	57,44 µg/µl	<b>G2-3 R</b>	34,41 µg/µl	<b>G3-3 R</b>	36,84 µg/µl
<b>K4 R</b>	28,28 µg/µl	<b>G2-4 R</b>	81,26 µg/µl	<b>G3-4 R</b>	59,07 µg/µl
<b>K5 R</b>	35,08 µg/µl	<b>G2-5 R</b>	76,22 µg/µl	<b>G3-5 R</b>	97,08 µg/µl
<b>K6 R</b>	27,01 µg/µl	<b>G2-6 R</b>	83,55 µg/µl	<b>G3-6 R</b>	97,55 µg/µl
<b>K7 R</b>	22,14 µg/µl	<b>G2-7 R</b>	123,18 µg/µl	<b>G3-7 R</b>	59,94 µg/µl
<b>K8 R</b>	59,44 µg/µl	<b>G2-8 R</b>	72,76 µg/µl	<b>G3-8 R</b>	81,03 µg/µl
<b>K9 R</b>	38,99 µg/µl	<b>G2-9 R</b>	64,24 µg/µl	<b>G3-9 R</b>	86,15 µg/µl
<b>K10 R</b>	69,42 µg/µl	<b>G2-10 R</b>	82,61 µg/µl	<b>G3-10 R</b>	100,72 µg/µl
<b>K11 R</b>	71,90 µg/µl	<b>G2-11 R</b>	169,22 µg/µl	<b>G3-11 R</b>	192,02 µg/µl
<b>K12 R</b>	64,69 µg/µl			<b>G3-12 R</b>	179,22 µg/µl



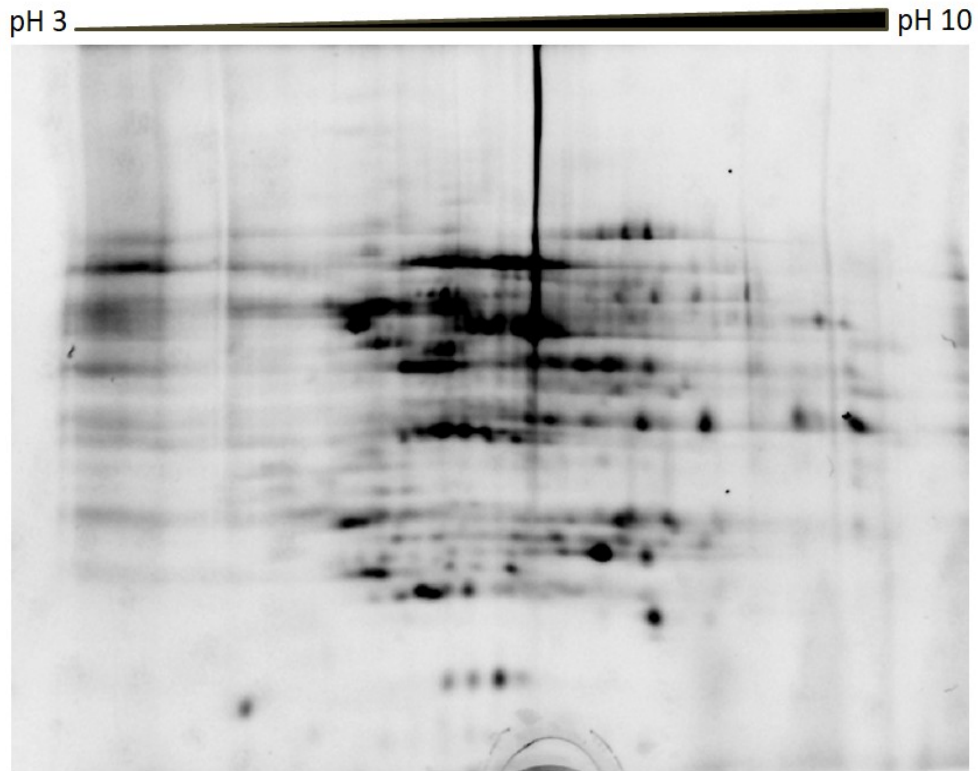
**Şekil7.** Kontrol, Dispaz+Salin ve Dispaz+Aflibercept gruplarına ait örneklerin 1D SDS-PAGE jel görüntüleri. Her bir kuyuya 20 µg protein örneği yüklenmiştir. M.Unstained protein marker



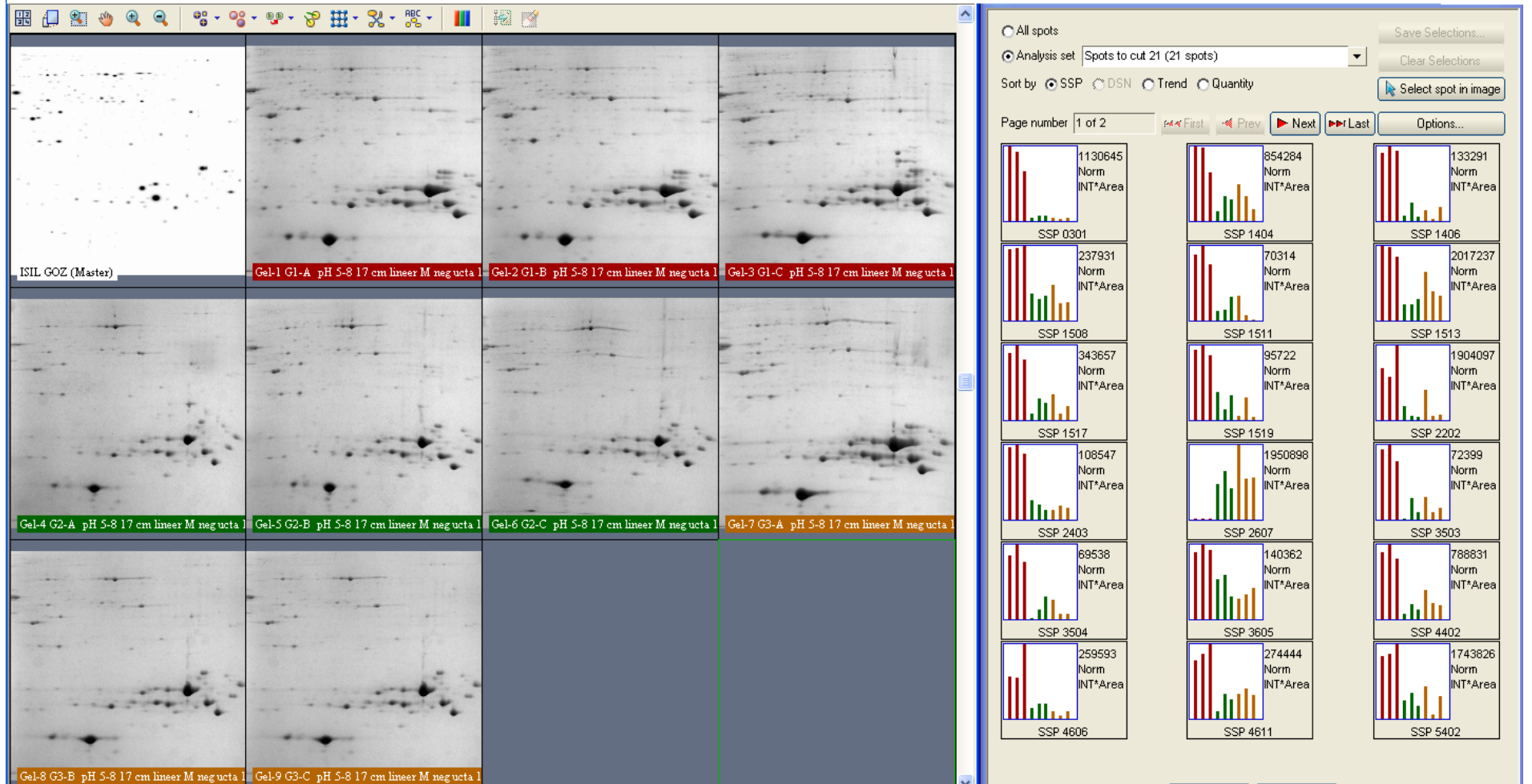
**Şekil 8.** Western blot analizi Hücre içi dokudan bağımsız eşit miktarda sentezlenen aktin proteinini görüntülemek amacıyla yapılan Western blot analizi.(G1, Kontrol; G2, Dispaz+Salin; G3, Dispaz+Aflibercept)

## 2D Jel elektroforez çalışmaları

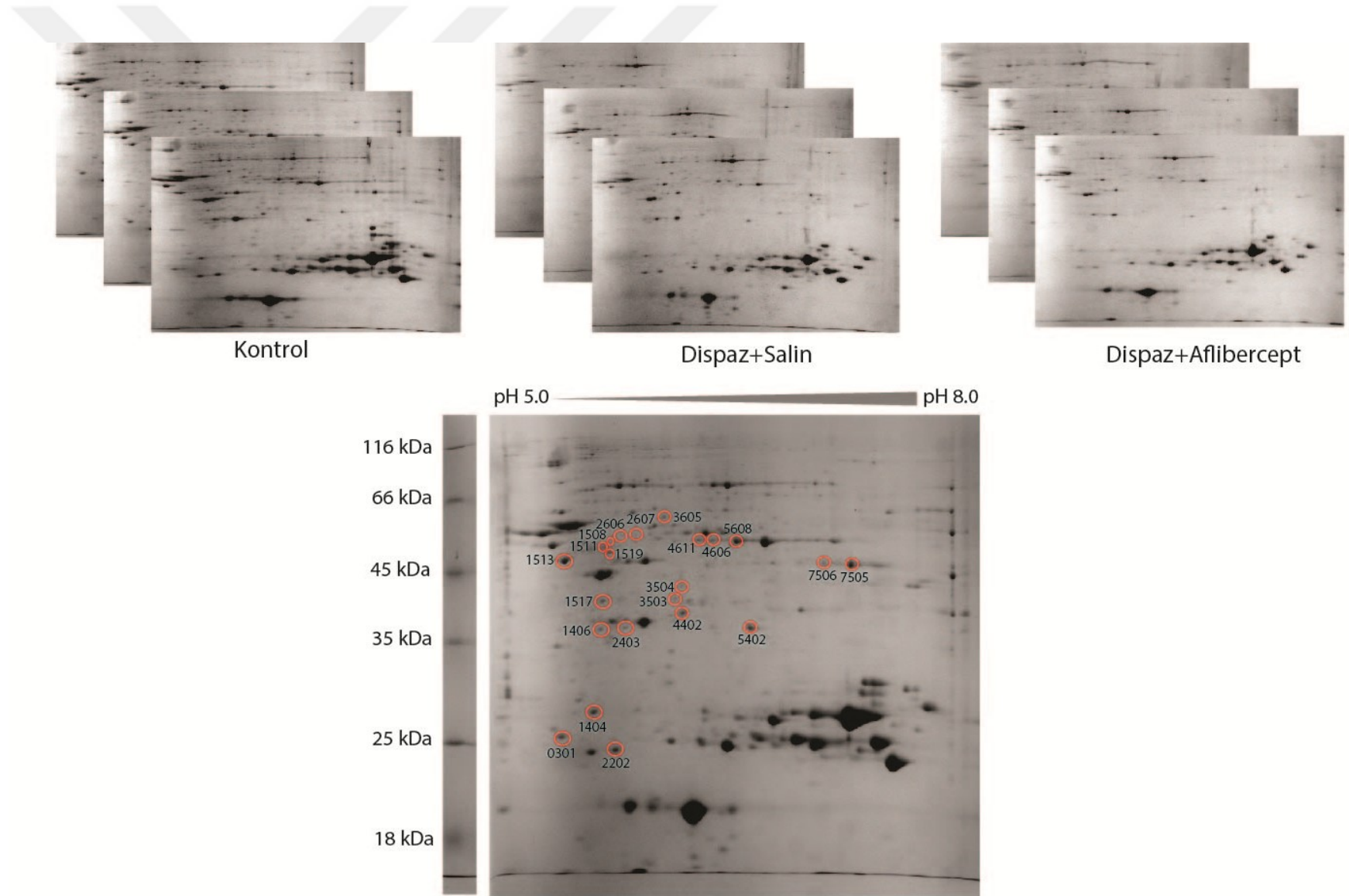
Protein örneklerinin hangi odaklama aralığında çalışılacağını belirleyebilmek için, 7 cm boyutunda pH 3-10 aralığında nonlineer striplerde bir ön çalışma yapıldı (Şekil 9). Yapılan bu ön çalışma neticesinde örneklerin 17 cm'lik geniş jellerde ve pH5-8 aralığında çalışılması gerektiği sonucuna varıldı. Bu amaçla metod kısmında anlatıldığı gibi her bir örnekten üçlü tekrar olacak şekilde 750 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 10). Yapılan analizler jeller üzerinde ortalama 350 adet protein spotunun bulunduğunu gösterdi (Şekil 11). Jeller arası en düşük eşleşme oranının %90 ve en yüksek eşleşme oranının ise %99 olduğu görüldü. Tüm gruplar arasında yapılan analizde varyasyon co-efficiency'nin 75,42 olduğu bulundu. Bu rakam jellerin protein profillerinin genel manada birbirine çok benzer olduğuna işaret etmektedir.



**Şekil 9.** 2D jel görüntüsü: pH3-10 aralığında protein dağılımını ve sayısını belirlemek amacıyla yapılmış 7cm'lik 2D jel görüntüsü.

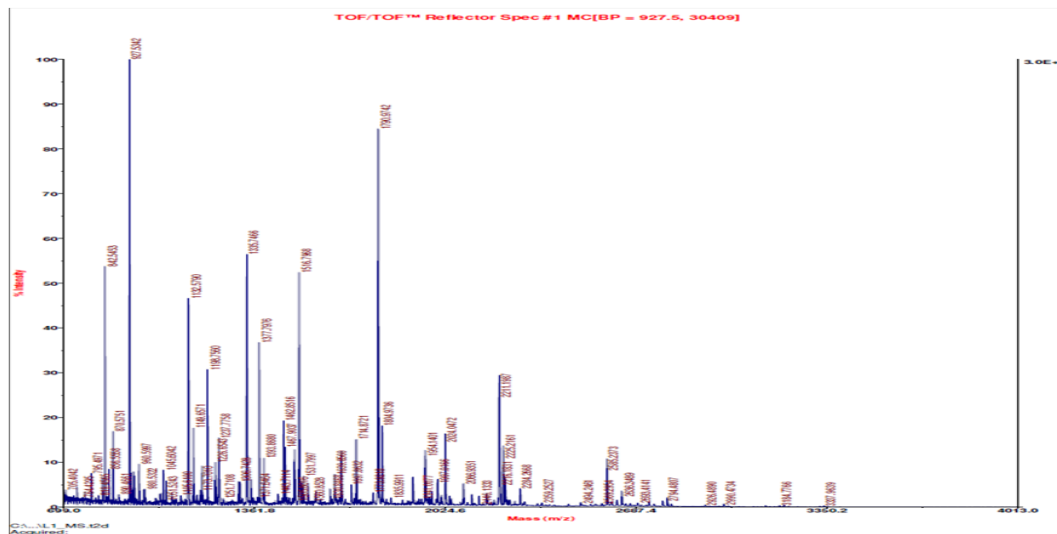


Şekil 10. 17 cm'lik geniş jellerde ve pH5-8 aralığında çalışılmış jellerin PDQuest Advance yazılımı ile analizi



**Şekil 11.** 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 düşük 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 22 protein spotunda kontrole göre en az 2kat regülasyon olduğu görüldü. 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 12). Belirlenen m/z oranları MASCOT yazılımı aracılığı ile protein tanımlamada kullanıldı. Tanımlanan protein listesi tablo 5’te verilmiştir. Tablodaki protein skorları incelendiğinde SSP 0301 ve SSP 1406 numaralı spotlar hariç tüm spotların yüksek güvenilirlikle tanımlandığı görüldü. Bir proteinin istatistiksel olarak doğru tanımlanabilmesi için protein skorunun 100’ün üzerinde olması gerekmektedir. Ancak protein skoru düşük olan protein tanımlamalarında eğer bir iyon skoru elde edilmişse bu tanımlamanın da büyük ihtimalle doğru olduğunu gösterir. Çünkü iyon skoru olan peptidler kütle spektrometresinde dizilenmiş ve amino asit içerikleri belirlenmiş demektir. Tablo 5’te verilen düşük skorlu iki protein için de dizi bilgisi elde edilmiş ve bu proteinlerin doğru tanımlandığı gösterilmiştir.



Şekil 12. MALDI-TOF/TOF spektrum görüntüsü

**Tablo 5.** MADLDI-TOF/TOF analizi sonrasında tanımlanan protein spotlarına ait veriler

SSP No	Acc. No.	Best Prot. Acc.	Best Prot. Mass	Best Prot. Score	Expect	Matches	Calc. pI	Seq. Cov. (%)	Best Prot. Description	Ion Score observed	Me (calc)	Ions	Peptide
0301	Q4FZU2	<u>K2C6A</u> <u>RAT</u>	59213	54	0.033	10	8.06	13	Keratin, type II cytoskeletal 6A	1179.6091	1178.5931	35	K.YEELQITAGR.H
1404	Q00981	<u>UCHL1</u> <u>RAT</u>	24822	311	6.00E-28	23	5.14	54	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	886.4842 895.4575 1379.6517 1678.8245 1983.8980 2548.1382	885.4821 894.4633 1378.6477 1677.8210 1982.8864 2547.1230	48 47 12 51 30 9	K.LGVAGQWR.F R.FSAVALCK.A R.EFTEREQGEVR.F K.QFLSETEKLSPEDR.A K.NEAIQAAHDSVAQEGQCR.V K.CFEKNEAIQAAHDSVAQEGQCR.V
1406	P24135	<u>PLCG2</u> <u>RAT</u>	147641	27	16	19	6.4	12	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	970.4264	969.4226	4	R.SDELTFCR.G
1508	Q68FY0	<u>QCR1_R</u> <u>AT</u>	52815	395	2.4e-036	28	5.57	37	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	809.4440 974.5189 1083.5319 1189.5873 2068.025 2726.2466	808.4443 973.5233 1082.5244 1188.5809 2067.0055 2725.2119	37 37 56 24 41 56	R.SLLTYGR.R R.EHTAYLIK.A R.TDLTDYLSR.H R.IEEVDAQMVR.E R.NALISHLDGTTTPCEDIGR.S K.YFYDQCPAVAGYGPIQLSDYNR.I
1511	Q6AYH5	<u>DCTN2_RA</u> <u>I</u>	44121	298	1.20E-26	25	5.14	47	Dynactin subunit 2	809.3800 975.5268 1031.5763	808.3715 974.5185 1030.5659	17 56 6	K.GLDFSDR.I K.YADLPGIAR.N R.LTELEATVR.C

										1625.8964	1624.8784	37	K.VNALDLAVLDQVEAR.L
										1706.8469	1705.8271	50	R.ENLATVEGNFASIDAR.M
1513	P07323	<u>ENOG_RAT</u>	47111	530	7.5e-050	35	5.03	50	Gamma-enolase	824.3994	823.4010	41	K.YNQLMR.I
										848.4103	847.4089	41	R.FAGHNFR.N
										1174.5559	1173.5513	69	R.IEEELGEEAR.F
										1303.6957	1302.6932	66	K.AGAAEKDLPLYR.H
										1604.7396	1603.7374	3	K.MVIGMDVAASEFYR.D
										1617.7970	1616.8192	55	K.VNQIGSVTEAIQACK.L
										1804.9510	1803.9366	56	R.AAVPSGASTGIYEALER.D
										1855.9060	1854.8934	48	R.CITGDQLGALYQDFVR.N
1517	P59215	<u>GNAO_RAT</u>	40043	165	2.4e-013	14	5.34	47	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	891.4629	890.4610	48	R.LFDVGGQR.S
										1044.4936	1043.4924	53	K.YYLDLDR.I
										1310.6279	1309.6262	68	R.SREYQLNDSAK.Y
										1380.7030	1379.7085	32	K.TTGIVETHFTFK.N
										1445.6824	1444.6834	54	K.IIHEDGFSGEDVK.Q
										1583.7351	1582.7297	42	R.AMDTLGVEYGDKER.K
										1689.8494	1688.8369	41	R.IGAADYQPTEQDILR.T
1519	Q794E4	<u>HNRPF_RA</u> T	45701	165	6.4e-013	14	5.31	21	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	1092.5758	1091.5724	53	R.VHIEIGPDGR.V
										1630.7285	1629.7132	67	K.HSGPNSADSANDGFVR.L
2202	P31044	<u>PEBP1_RA</u> T	20078	265	2.40E-23	16	5.48	40	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	912.4885	911.4865	43	K.FKVESFR.K
										1351.6574	1350.6667	62	R.VDYGGVTVDLGGK.V
										1560.8232	1559.8195	17	K.LYTLVLTDPDAPSR.K
										1963.9402	1962.9535	48	K.GNDISSGTVLSEYVGSPPK.D
										2643.3005	2642.2936	30	K.GNDISSGTVLSEYVGSPPKDTGLHR.Y
2403	P49432	<u>ODPB_RAT</u>	38957	323	3.8e-029	27	6.2	40	Pyruvate dehydrogenase	1231.5977	1230.5881	55	K.VVSPWNSERAK.G



									E1 component subunit beta, mitochondrial	1248.6312 1264.6217 1331.6775 1747.9094 1763.8916 1905.8679	1247.6220 1263.6169 1330.6551 1746.8763 1762.8712 1904.8421	49 35 47 50 21 28	R.VTGADVMPYAK.I R.VTGADVMPYAK.I K.EGIECEVINLR.T R.IMEGPAFNFLDAPAVR.V R.IMEGPAFNFLDAPAVR.V R.EAINQGMDEELERDEK.V
2606	P47819	GFAP_RAT	49927	193	3.8e-016	37	5.35	51	Glial fibrillary acidic protein	1060.4738 1130.4993 1177.6041 1224.5671 1309.6539	1059.4846 1129.5074 1176.6139 1223.5782 1308.6674	1 1 21 3 4	K.HEANDYRR.Q R.SYASSETMVR.G K.LADVYQAE LR.E R.ESASYQEALAR.L R.SKFADLTDVASR.N
2607	P47819	GFAP_RAT	49927	433	3.8e-040	39	5.35	61	Glial fibrillary acidic protein	1060.4755 1177.6074 1224.5681 1309.6567 1387.7419	1059.4846 1176.6139 1223.5782 1308.6674 1386.7579	40 40 39 24 11	K.HEANDYRR.Q K.LADVYQAE LR.E R.ESASYQEALAR.L R.SKFADLTDVASR.N R.LRLDQLTTNSAR.L
3503	Q99NA5	IDH3A_RA T	39588	342	4.7e-031	27	6.47	34	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, Mitochondrial	1028.5051 1216.5919 1316.5159 1391.7344 1472.6074	1027.5087 1215.5924 1315.5173 1390.7456 1471.6184	43 62 49 66 29	K.APIQWEER.N R.IAEFAFEYAR.N K.CSDFTEEICR.R K.TPYTDVNIVTIR.E K.CSDFTEEICRR.V
3504	P62882	GBB5_RAT	38707	151	6e-012	12	5.67	35	Guanine nucleotide- binding protein subunit beta-5	908.4914 1015.5458 1140.5927	907.4916 1014.5458 1139.6015	31 60 62	K.VFNLYPR.K K.SAAEVIAQAR.K R.KPFPDFVYK.R

										1294.6923 1310.6775 1620.7749 1682.8693 1822.9128	1293.6864 1309.6813 1619.7865 1681.8635 1821.9295	28 (9) 57 34 41	R.MVIPGGIDVHTR.F R.MVIPGGIDVHTR.F R.GLYDGPVCEVSTPK.T K.IVLEDGTLHVTEGSGR.Y R.SITIANQTNCPYVTK.V
3605	P47942	DPYL2_RAT	62239	437	1.5e-040	26	5.95	40	Dihydropyrimidinase-related protein 2	908.4914 1140.5927 1294.6923 1310.6775 1620.7749 1682.8693	907.4916 1139.6015 1293.6864 1309.6813 1619.7865 1681.8635	31 62 28 (9) 57 34	K.VFNLYPR.K R.KFPDFVYK.R R.MVIPGGIDVHTR.F R.MVIPGGIDVHTR.F R.GLYDGPVCEVSTPK.T K.IVLEDGTLHVTEGSGR.Y
4402	P42123	LDHB_RAT	36589	494	3e-046	29	5.7	42	L-lactate dehydrogenase B chain	913.5847 957.6072 1176.5868 1186.6494 1248.6100 1314.7448	912.5757 956.6059 1175.5822 1185.6353 1247.5928 1313.7303	51 18 56 96 61 46	K.IVVVTAGVR.Q K.FIIPQIVK.Y K.SADTLWDIQK.D K.LKDDEVAQLR.K R.VIGSGCNLDSAR.F K.LKDDEVAQLRK.S
4606	P04764	ENOA_RAT	47098	498	1.2e-046	34	6.16	52	Alpha-enolase	806.4460 932.5311 1143.6090 1406.7042 1439.7291 1784.8566 1804.9520	805.4446 931.5239 1142.6084 1405.7089 1438.7344 1783.8377 1803.9366	36 35 51 70 51 87 66	K.YNQILR.I R.SFRNPLAK.- R.IGAEVYHNLK.N R.GNPTVEVDLYTAK.G R.YITPDQLADLYK.S R.AGKYDLDFKSPDDASR.Y R.AAVPSGASTGIYEALR.D

4611	P04764	ENOA_RAT	47098	230	2.00E-19	23	6.16	55	Alpha-enolase	806.4420	805.4446	24	K.YNQILR.I	
										932.5267	931.5239	33	R.SFRNPLAK.-	
										1143.6043	1142.6084	45	R.IGAEVYHNLK.N	
										1406.7019	1405.7089	67	R.GNPTVEVDLYTAK.G	
										1439.7253	1438.7344	48	R.YITPDQLADLYK.S	
										1784.8516	1783.8377	67	R.AGKYDLDFKSPDDASR.Y	
5402	O88989	MDHC_RA T	36460	406	1.90E-37	25	6.16	47	Malate dehydrogenase, Cytoplasmic	811.4369	810.4348	39	K.AISDHIR.D	
										1026.4700 1	1025.4600	43	K.ENFSCLTR.L	
										178.6221 13	1177.6091	54	K.GEFITTVQQR.G	
										93.7256 170	1392.7038	61	K.FVEGLPINDFSR.E	
										6.8746 1757	1705.8457	37	K.SAPSIPKENFSCLTR.L	
										.9168 2280.	1756.9142	36	K.VIVVGNPANTNCLTASK.S	
										1377	2279.1083	47	K.NVIIWGNHSTQYPDVNHAK.V	
5608	P04764	ENOA_R AT	47098	626	1.9e-059	34	6.16	51	Alpha-enolase	806.4628	805.4446	26	K.YNQILR.I	
										1143.6242 1	1142.6084	64	R.IGAEVYHNLK.N	
										439.7444 15	1438.7344	63	R.YITPDQLADLYK.S	
										28.7162 163	1527.6841	74	K.YDLDFKSPDDASR.Y	
										3.8235	1632.8141	64	K.VNQIGSVTESLQACK.L	
										1784.8790 1	1783.8377	79	R.AGKYDLDFKSPDDASR.Y	
					626		1.9e-059	34	6.16	51	804.9856	803.9366	75	R.AAVPSGASTGIYEALR.D

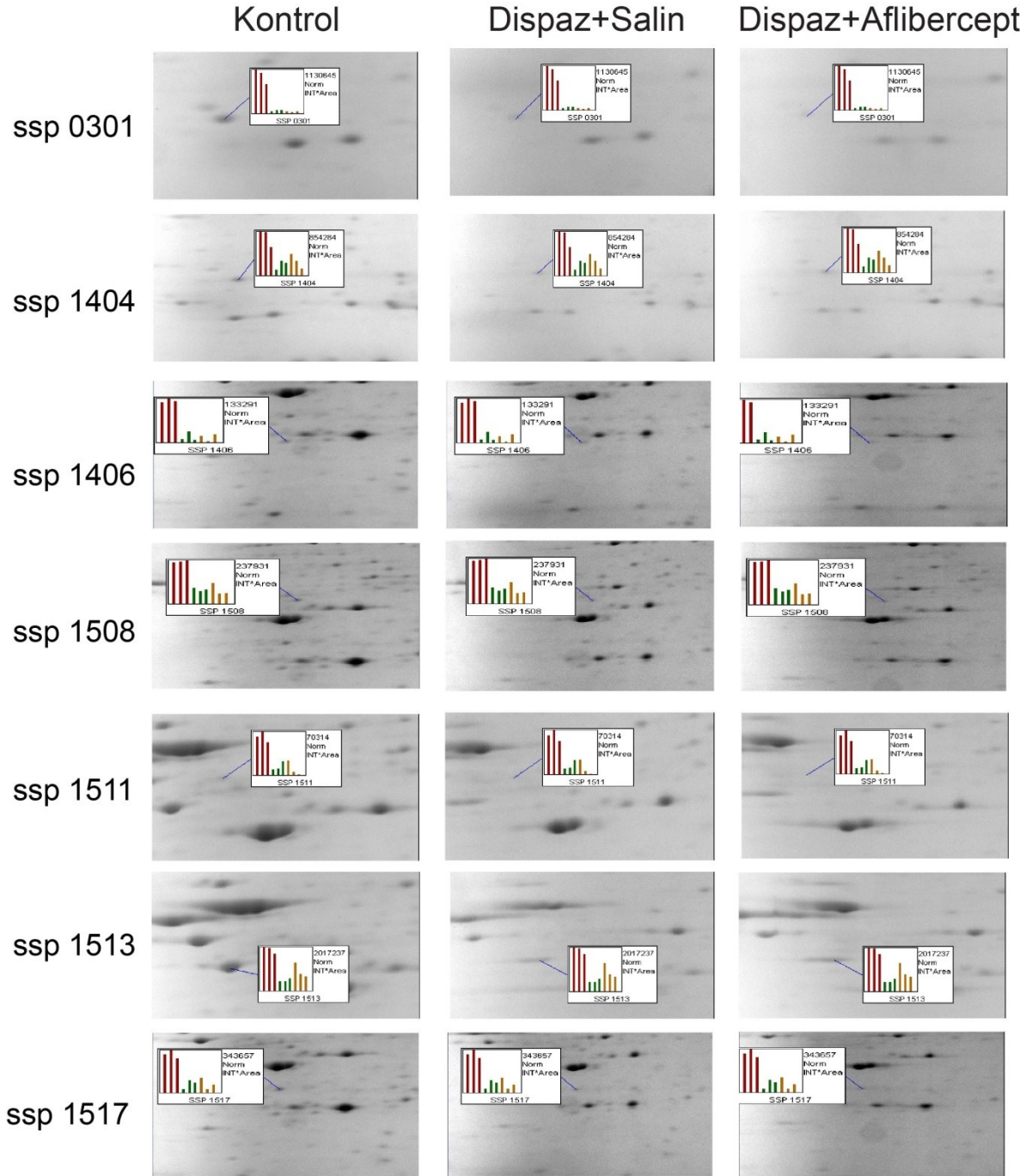
7505	P09606	GLNA_RAT	42240	478	1.2e-044	32	6.64	46	Glutamine synthetase	853.4354	852.4355	39	R.HQYHIR.A
										914.4322	913.4294	49	K.KGYFEDR.R
										928.5082	927.5137	54	R.KPAETNLR.H
										1002.4979	1001.4930	64	R.DIVEAHYR.A
										1084.5298 1	1083.5284	(35	R.MGDHLWVAR.F
										100.5189 19	1099.5233	)	R.MGDHLWVAR.F
										18.9503 192	1917.9367	48	R.RPSANCDPYAVTEAIVR.T
										8.8607 2150	1927.8622	18	R.TCLLNETGDEPFQYKN.-
										.0393	2149.0188	30	R.LTGFHETSNINDFSAGVANR.S
												27	
7506	P09606	GLNA_RAT	42240	364	3e-033	35	6.64	47	Glutamine synthetase	853.4374	852.4355	11	R.HQYHIR.A
										899.5386	898.5348	2	R.SASIRIPR.I
										914.4330	913.4294	9	K.KGYFEDR.R
										928.5124	927.5137	19	R.KPAETNLR.H
										1002.5012	1001.4930	51	R.DIVEAHYR.A
										1918.9497	1917.9367	14	R.RPSANCDPYAVTEAIVR.T
										1928.8673	1927.8622	36	R.TCLLNETGDEPFQYKN.-
										2150.0393	2149.0188	28	R.LTGFHETSNINDFSAGVANR.S

Tanımlanan 22 proteinin gruplar arasında nasıl bir regülasyona uğradığını daha net belirleyebilmek için, spotların yoğunlukları ölçülüp oranlamalar yapılmıştır (Tablo 6). GFAP haricinde tanımlanan diğer tüm proteinlerin G1 grubuna göre G2 ve G3 gruplarında down-regüle olduğu görüldü. G2 ve G3 gruplarını karşılaştırdığımızda ise 2-kat regülasyon kriterine göre *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F* (hnRNP F) ve Alpha-enolase'ın dispaz+salin grubunda up-regüle olduğu, GFAP ve *L-lactate dehydrogenase B chain* (LDH-B) proteinlerinin ise down-regüle olduğu görüldü. Diğer proteinlerdeki regülasyon oranları 2-kat regülasyon kriterinin altında kaldığı için değerlendirmeye alınmadı. Jeller üzerinde kesilen bazı spotlar tanımlandığında bu spotların aynı proteinlere ait olduğu görülmüştür. Alfa enolazı üç farklı spotun, GFAP'ı iki farklı spotun ve glutamin sentetazı ise iki farklı spotun temsil ettiği görülmüştür. Bu bir deneysel sorun olmayıp proteinler üzerindeki posttranslasyonel değişimlerin proteinin odaklama noktasını değiştirmesinde kaynaklanmaktadır. Hatta aynı proteine ait iki farklı spottan biri up-regüle iken diğeri down-regüle olabilmektedir. Bu proteinlerden hangisinin posttranslasyonel değişime uğradığı ileri analizler sonucunda belirlenebilecektir.

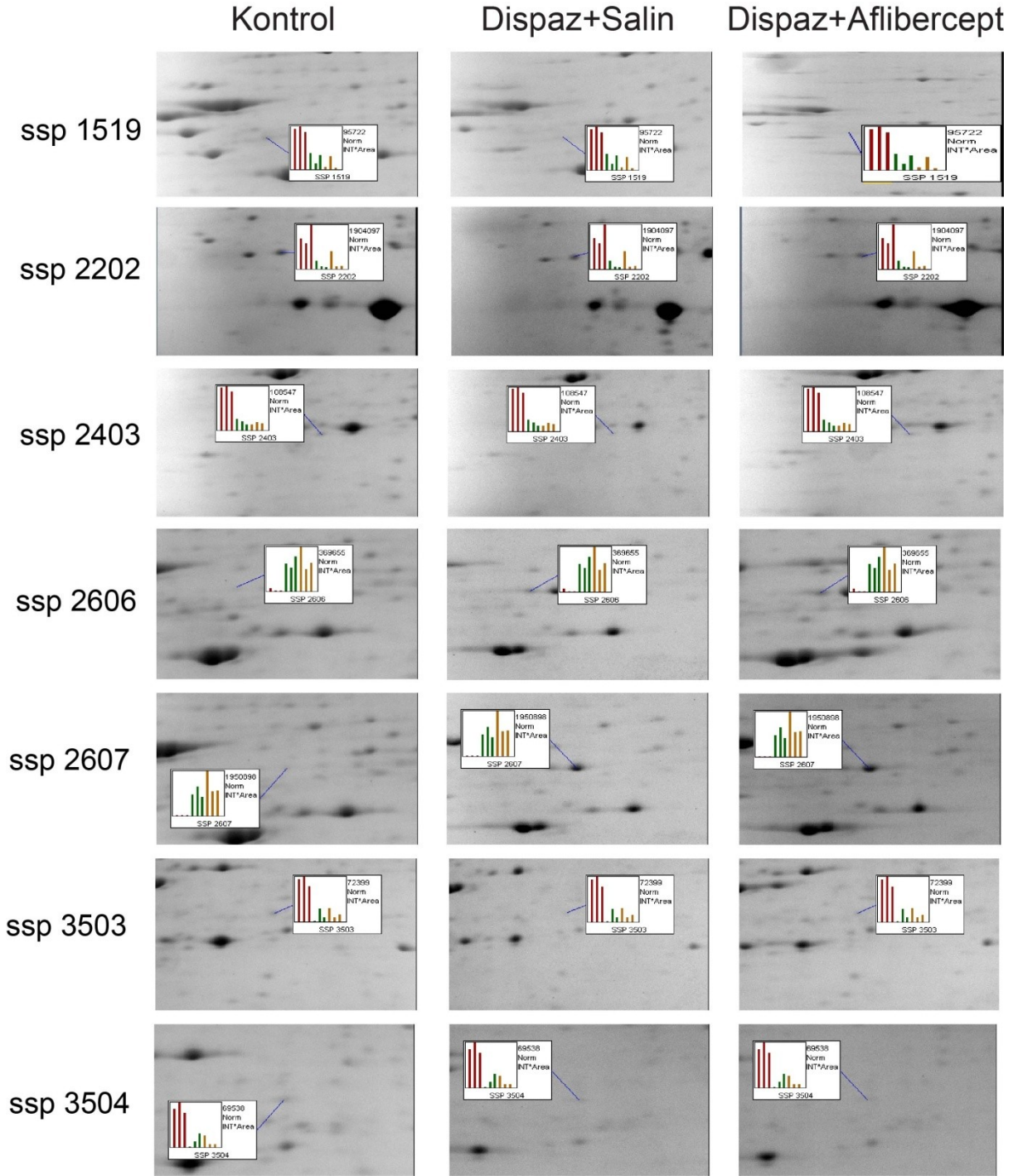
Elde edilen regülasyon oranlarının görsel olarak da gerçekliğini gösterebilmek için ilgili spotlar, jeller üzerinde bulunarak yakın-çekim resimleri alındı (Şekil 13,14 ve 15). Yapılan görsel analiz sonucunda spotların yoğunluk ölçümlerinin doğru tayin edildiği ve elde edilen regülasyon oranlarının doğru ifade edildiği kanaatine varıldı.

**Tablo 6.** Miktarlarında regülasyon görülen ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin gruplara göre hesaplanmış regülasyon oranları. Tabloda verilen yoğunluk değerleri G1, G2 ve G3 sütunları altında listelenmiştir. Yeşil renk down-regülasyonu, kırmızı renk ise up-regülasyonu temsil etmektedir. (G1, Kontrol; G2, Dispaz+Salin; G3, Dispaz+Aflibercept).

SSP Number	Best Protein Description	G1	G2	G3	G2'nin G1'e göre regülasyon oranı	G3'nin G1'e göre regülasyon oranı	G2'nin G3'e göre regülasyon oranı
SSP 0301	Keratin, type II cytoskeletal 6A	979590.9	62022.8	37871.9	15.8	25.87	1.64
SSP 1404	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	752740.9	212275.6	277747.8	3.55	2.71	0.75
SSP 1406	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	127235	16404.2	15319.3	7.76	8.306	1.07
SSP 1508	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	233356	77565.7	76333.8	3.01	3.057	1.02
SSP 1511	Dynactin subunit 2	61999.6	13648.4	9210	4.54	6.732	1.48
SSP 1513	Gamma-enolase	1920626	485374.2	919214.9	3.96	2.089	0.53
SSP 1517	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	312788.7	69047.2	70487.1	4.53	4.438	0.98
SSP 1519	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	90303.6	26733.5	12139.8	3.38	7.439	2.2
SSP 2202	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	1440745	170955.9	325495.6	8.43	4.426	0.53
SSP 2403	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	103567	21159.2	16569.8	4.89	6.25	1.28
SSP 2606	Glial fibrillary acidic protein	10180	240460.3	262074.3	23.6	25.74	0.92
SSP 2607	Glial fibrillary acidic protein	19326.5	1008269	1381877	52.2	71.5	0.73
SSP 3503	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	65771.9	9140.4	13522.2	7.2	4.864	0.68
SSP 3504	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5	60999.4	9841.6	9073.1	6.2	6.723	1.08
SSP 3605	Dihydropyrimidinase-related protein 2	132616.8	67050.7	47374.1	1.98	2.799	1.42
SSP 4402	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	715395.7	102176	204822.1	7	3.493	0.5
SSP 4606	Alpha-enolase	183402	46176.5	18842.7	3.97	9.733	2.45
SSP 4611	Alpha-enolase	244338.1	62385.3	95139	3.92	2.568	0.66
SSP 5402	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1579575	444462.2	448781.9	3.55	3.52	0.99
SSP 5608	Alpha-enolase	1629418	600720.8	620511.6	2.71	2.626	0.97
SSP 7505	Glutamine synthetase	2639099	539455.2	942358.1	4.89	2.801	0.57
SSP 7506	Glutamine synthetase	163429.3	16800.1	22447.6	9.73	7.28	0.75

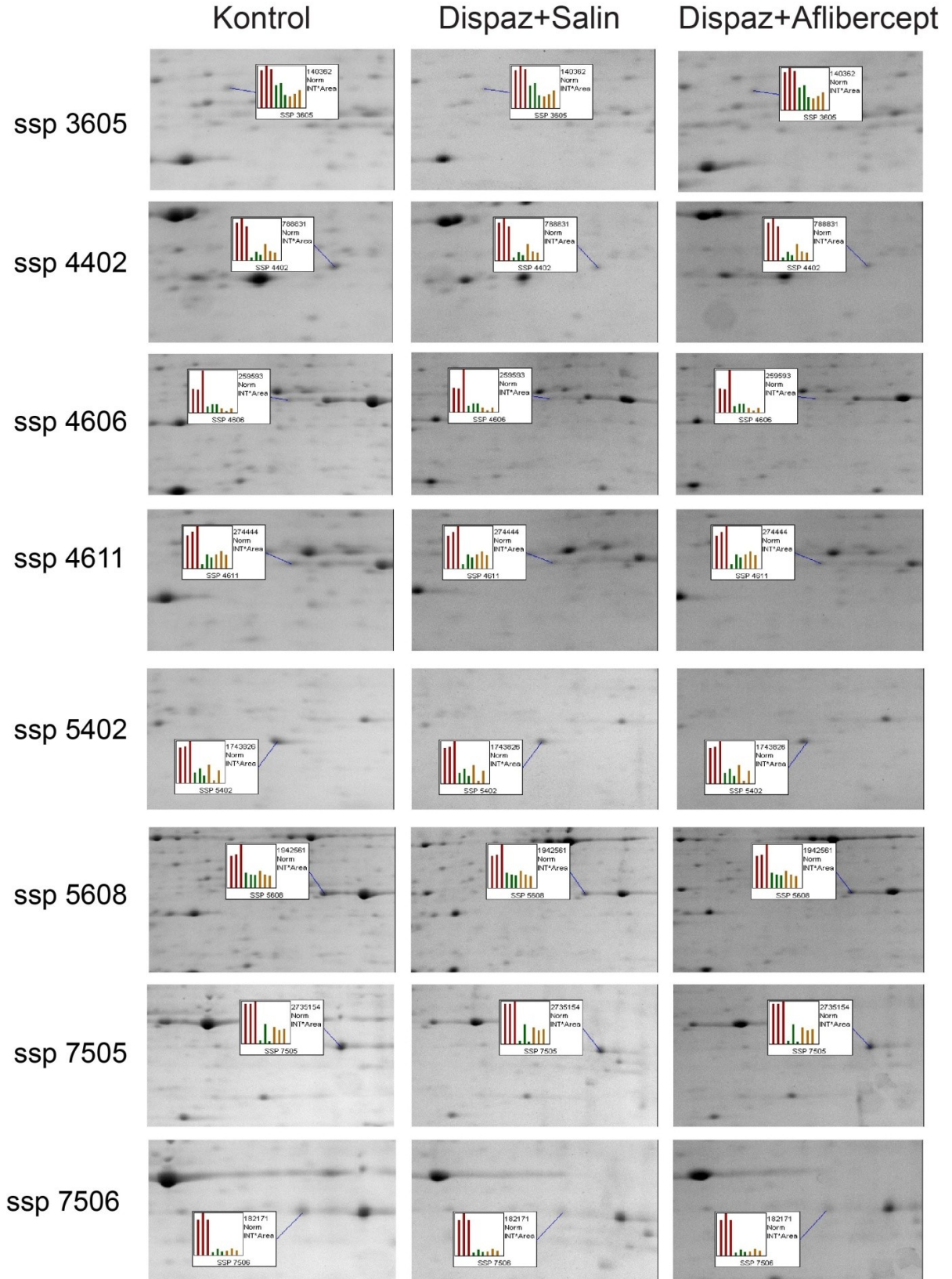


Şekil 13. SSP 0301, SSP 1404, SSP 1406, SSP 1508, SSP 1511, SSP 1513 ve SSP 1517 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri



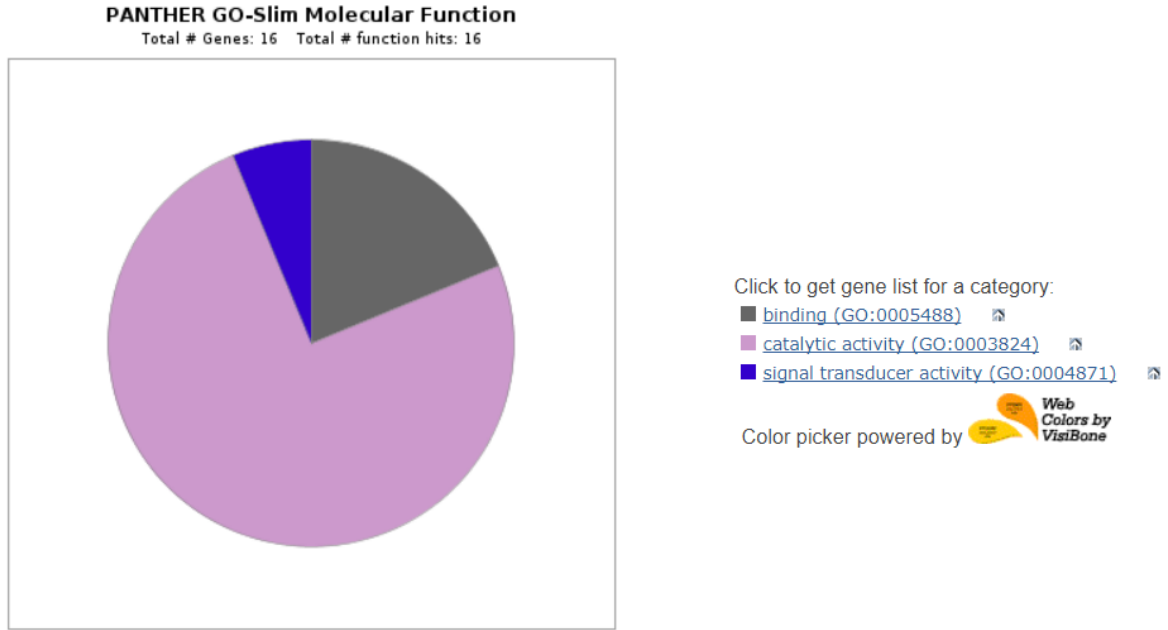
**Şekil 14.** SSP 1519, SSP 2202, SSP 2403, SSP 2606, SSP 2607, SSP 3503 ve SSP 3504 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri



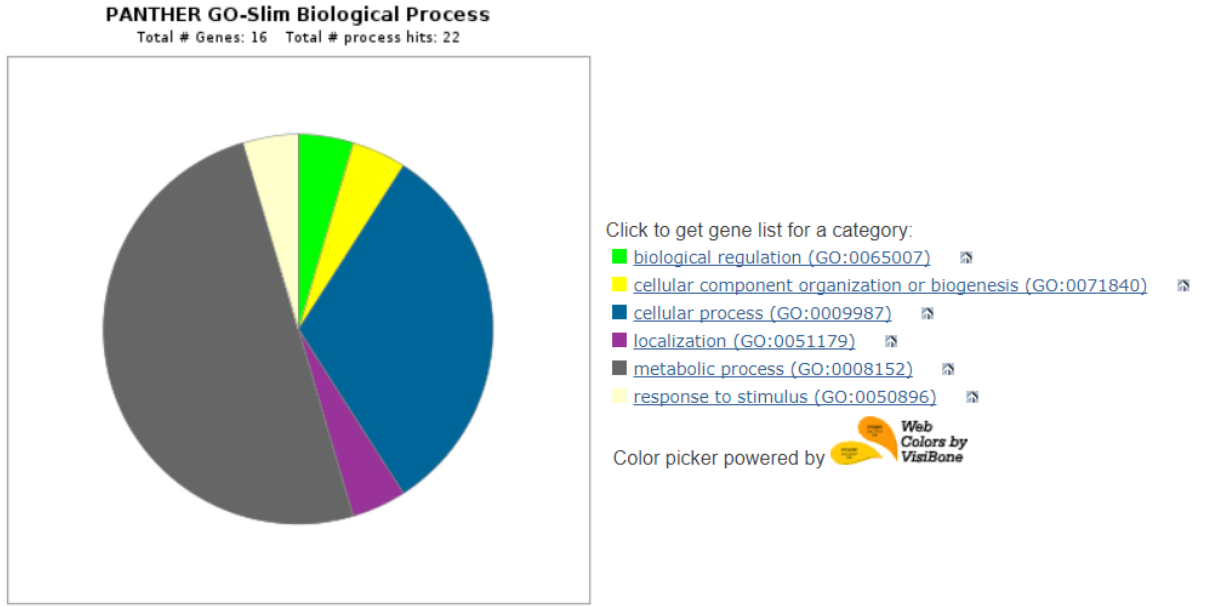


Şekil 15. SSP 3605, SSP 4402, SSP 4606, SSP 4611, SSP 5402, SSP 5608, SSP 7505 ve SSP 7506 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

Yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 22 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edildi. Dispoz ile oluşturulan model hayvanlarda kontrol grubuna göre 20 protein spotunun düzeyinde azalma olduğu görüldü. Bu proteinlerin fonksiyonel analizlerini yapabilmek için proteinler ile ilgili bilgiler PANTHER veri bankasından araştırıldı. Tanımlanan proteinlerin çoğunluğunu katalitik aktivite gösteren proteinler oluştururken bir kısmını da birbiri ile ilişkisi olduğu bilinen sinyal iletim aktivitesi gösteren proteinler ile sinyal iletim mekanizmalarını uyaran proteinlerin oluşturduğu belirlendi (Şekil 16). Aynı proteinler görev aldıkları biyolojik proseslere göre kategorize edildiğinde iki temel proses ağırlıklı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu proseslerden ilki metabolizma ile ilişkili prosesler olup hem katabolik hem de anabolik reaksiyonları içermektedir. İkinci proses ise hücrel prosesleri içermekte ve birbirleri ile etkileşen ve sinyal yollarını tetikleyen proteinleri ihtiva etmektedir (Şekil 17).



**Şekil 16.** Proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

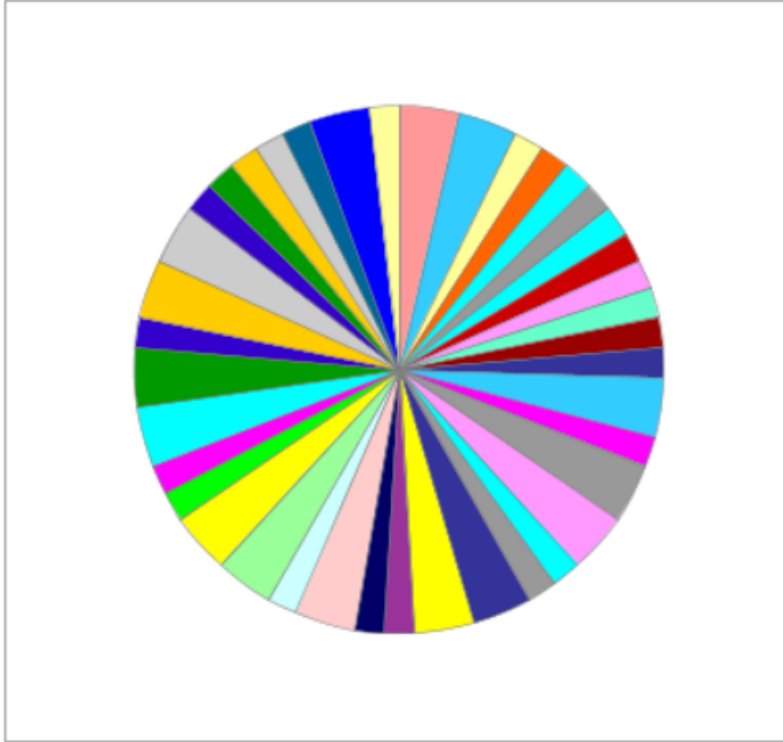


**Şekil 17.** Proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Proteinlerin hangi metabolik yollarda görev aldıklarını görebilmek için yaptığımız analizde karşımıza çıkan liste bizi iki protein üzerinde durmaya zorlamıştır. Bu proteinlerden ilki *guanine nucleotide-binding protein*, ikincisi ise *1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase protein* (PLCD1)'dir (Şekil 18 ve Tablo 7). Yapılan BioGrid analizinde her iki proteinin de hücrede merkezi bir yer tuttuğu birden fazla metabolik yolağı etkilediği ve özellikle sinyal iletim mekanizmaları ile ilişkili olduğu görülmüştür. *guanine nucleotide-binding protein* için 116 etkileşim, 77 etkileştiği protein bulunmuştur. PLCD1 için 24 etkileşim, 17 etkileştiği protein bulunmuştur. BioGrid tarafından oluşturulan metabolik network analizinde her iki protein için de karmaşık bir interaktom paterni üretilmiş olup, bu paternlerden hangisinin oluşturulan hastalık modeli ile ilişkili olduğu ve hangisinin verilen tedaviye yanıtta kullanıldığı bilinmemektedir (Şekil 19 ve Şekil 20). Ancak yapılacak ileri analizlerle (Nano-HPLC LC-MS/MS) bu durum açıklığa kavuşturulabilir. Ayrıca yapılan çalışmalar bu proteinin doğrudan VEGF yolağının bir parçası olduğunu gösterir niteliktedir (Şekil 21).

## PANTHER Pathway

Total # Genes: 16 Total # pathway hits: 55



Click to get gene list for a category:

- [5HT1 type receptor mediated signaling pathway \(P04373\)](#)
- [5HT2 type receptor mediated signaling pathway \(P04374\)](#)
- [5HT4 type receptor mediated signaling pathway \(P04376\)](#)
- [Angiogenesis \(P00005\)](#)
- [Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin \(P05911\)](#)
- [Axon guidance mediated by netrin \(P00009\)](#)
- [Axon guidance mediated by semaphorins \(P00007\)](#)
- [B cell activation \(P00010\)](#)
- [Beta1 adrenergic receptor signaling pathway \(P04377\)](#)
- [Beta2 adrenergic receptor signaling pathway \(P04378\)](#)
- [Beta3 adrenergic receptor signaling pathway \(P04379\)](#)
- [Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway \(P04380\)](#)
- [EGF receptor signaling pathway \(P00018\)](#)
- [Endogenous cannabinoid signaling \(P05730\)](#)
- [Enkephalin release \(P05913\)](#)
- [FGF signaling pathway \(P00021\)](#)
- [GABA-B receptor II signaling \(P05731\)](#)
- [Glutamine glutamate conversion \(P02745\)](#)
- [Glycolysis \(P00024\)](#)
- [Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway \(P06664\)](#)
- [Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq, alpha and Go, alpha mediated pathway \(P00027\)](#)

\*\*Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Pathway

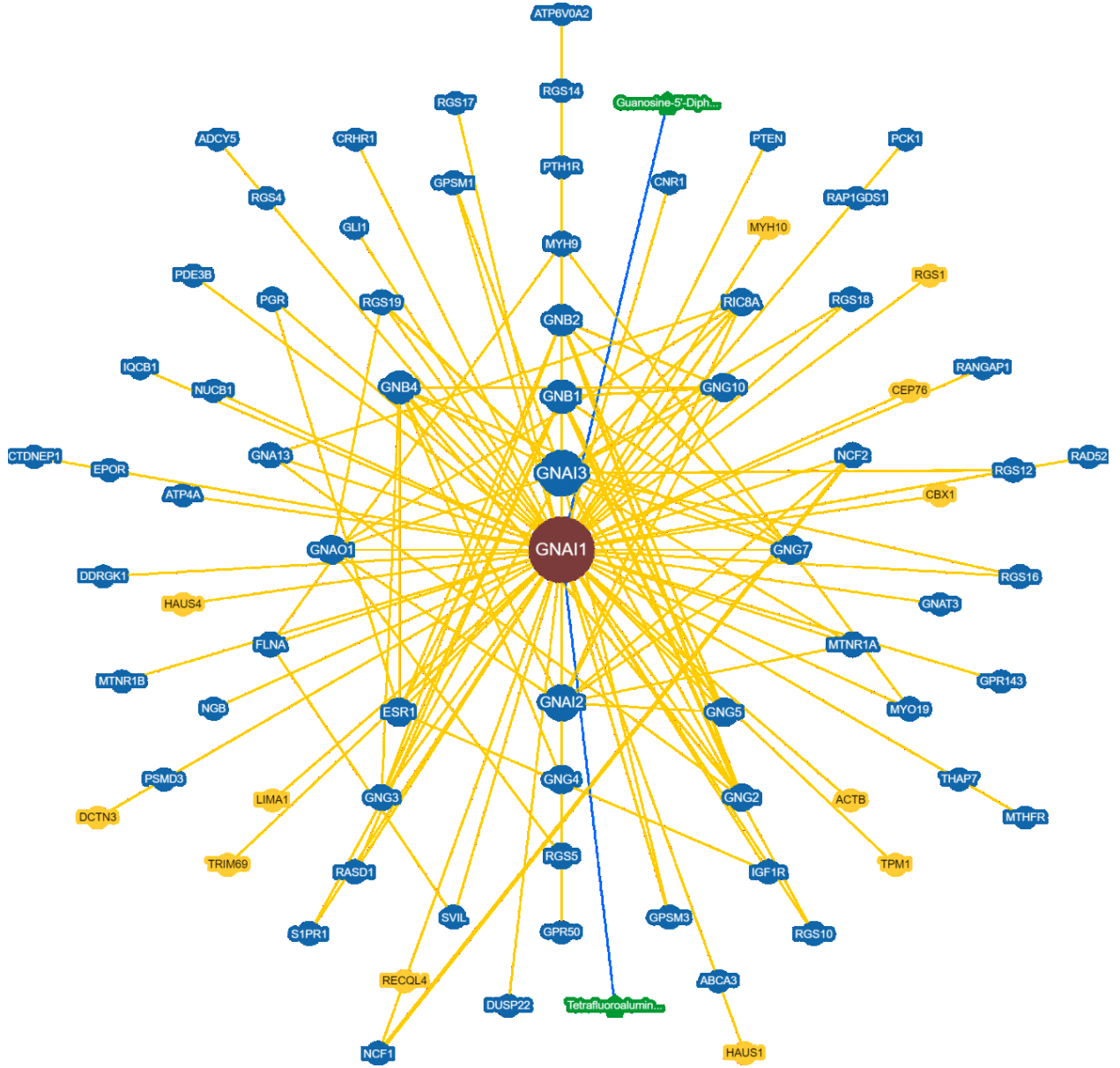
Şekil 18. Biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

**Tablo 7.** Biyolojik proses analizi sonucunda elde edilen verilerin ilgili proteinler ile ilişkilendirilmesi

■	<a href="#">5HT1 type receptor mediated signaling pathway (P04373)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">5HT2 type receptor mediated signaling pathway (P04374)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">5HT4 type receptor mediated signaling pathway (P04376)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Angiogenesis (P00005)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
■	<a href="#">Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin (P05911)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Axon guidance mediated by netrin (P00009)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
■	<a href="#">Axon guidance mediated by semaphorins (P00007)</a>	Dihydropyrimidinase-related protein 2
■	<a href="#">B cell activation (P00010)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
■	<a href="#">Beta1 adrenergic receptor signaling pathway (P04377)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Beta2 adrenergic receptor signaling pathway (P04378)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Beta3 adrenergic receptor signaling pathway (P04379)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway (P04380)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">EGF receptor signaling pathway (P00018)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
■	<a href="#">Endogenous cannabinoid signaling (P05730)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
■	<a href="#">Enkephalin release (P05913)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">FGF signaling pathway (P00021)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2

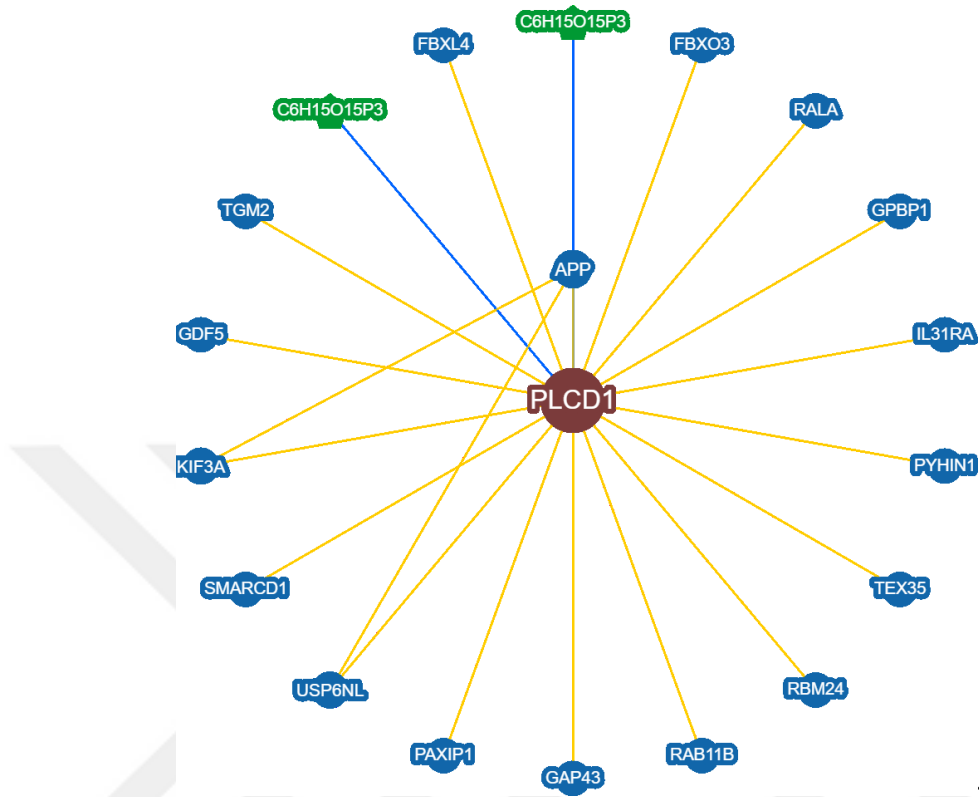
		Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
■	<a href="#">GABA-B receptor II signaling (P05731)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
■	<a href="#">Glutamine glutamate conversion (P02745)</a>	Glutamine synthetase
■	<a href="#">Glycolysis (P00024)</a>	Gamma-enolase Alpha-enolase
■	<a href="#">Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway (P00027)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
■	<a href="#">Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction (P00028)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
■	<a href="#">Histamine H1 receptor mediated signaling pathway (P04385)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Histamine H2 receptor mediated signaling pathway (P04386)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
■	<a href="#">Metabotropic glutamate receptor group II pathway (P00040)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Metabotropic glutamate receptor group III pathway (P00039)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway (P00042)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway (P00043)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5

■	<a href="#">Opioid prodynorphin pathway (P05916)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Opioid proenkephalin pathway (P05915)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Opioid proopiomelanocortin pathway (P05917)</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Oxytocin receptor mediated signaling pathway (P04391)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">PDGF signaling pathway (P00047)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
■	<a href="#">PI3 kinase pathway (P00048)</a>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">Parkinson disease (P00049)</a>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
■	<a href="#">Pyrimidine Metabolism (P02771)</a>	Dihydropyrimidinase-related protein 2
■	<a href="#">TCA cycle (P00051)</a>	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
■	<a href="#">Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway (P04394)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
■	<a href="#">VEGF signaling pathway (P00056)</a>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2

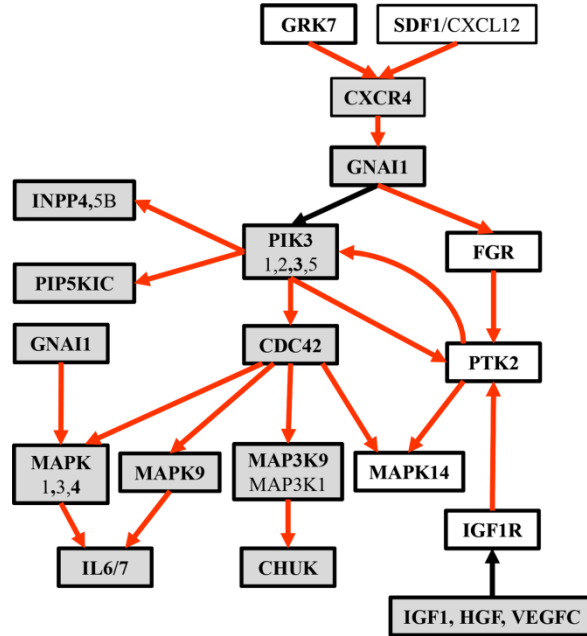


Şekil 19. BioGrid analizi sonucu Guanine nucleotide-binding protein için oluşturulan interaktom verisi



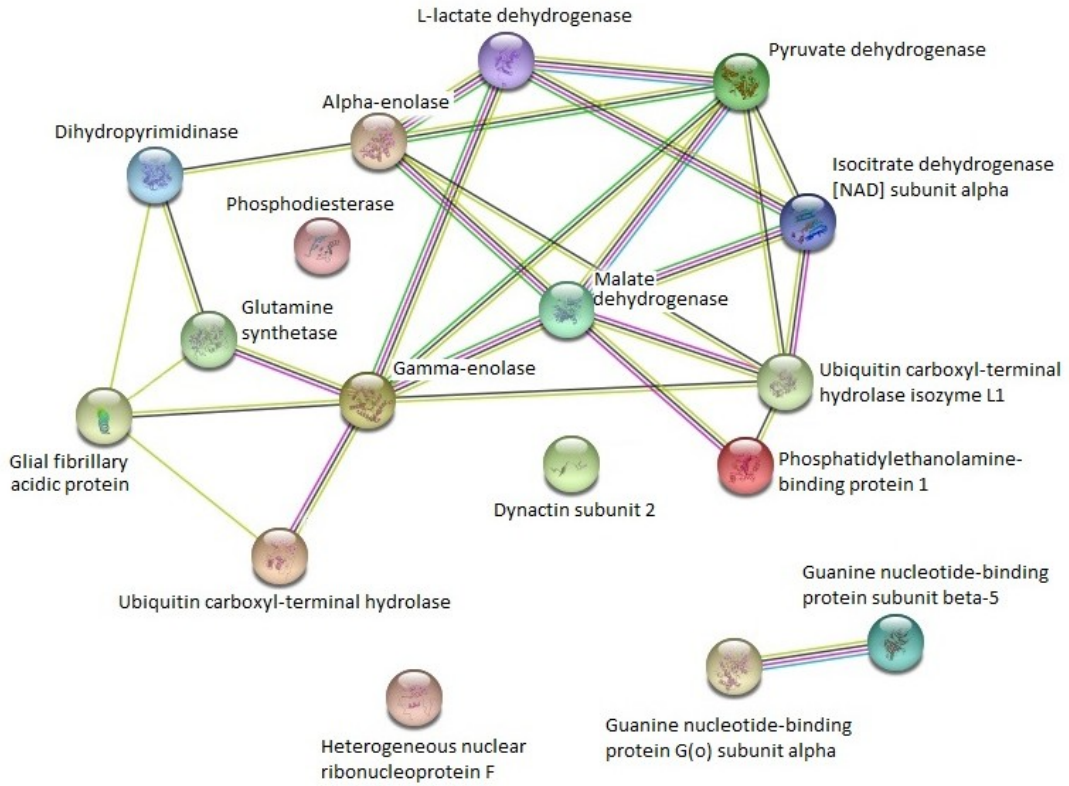


Şekil 20. BioGrid analizi sonucu PLCD1 için oluşturulan interaktom verisi



Şekil 21. MinePath analizi ile VEGF yolağının gösterilmesi

PANTHER analizi tanımlanan proteinlerin birbirleri ile olan bağlantılarını literatürdeki deneysel bilgileri çekerek oluşturamamaktadır. Bu nedenle elde ettiğimiz dataları STRING analizine de tabi tuttuk. Tanımladığımız proteinler arasında nerdeyse tamamının birbirleri ile ilişkili olduğu ve ilintili yollarda görev aldıkları görüldü (Şekil 22).



Şekil 22. STRING Analiz sonucu.

#### 4. TARTIŞMA

PVR vitreoretinal cerrahideki tüm gelişmelere rağmen başta dekolman cerrahisi olmak üzere vitreoretinal cerrahideki en büyük başarısızlık nedenlerinden biridir. Ameliyatsonrası anatomik başarı elde edilse bile aynı oranda fonksiyonel başarının elde edilememesi PVR daki tedavi arayışlarını profilaktik tedavi yöntemi üzerinde yoğunlaştırmaktadır. PVR ile ilgili yapılmış çalışmaların büyük bir çoğunluğu in vitro hücre kültürü veya in vivo hayvan deneyleri şeklinde olup klinik çalışmaların sayısı azdır.

Hayvanlarda deneysel PVR modeli oluşturmak için ilki Ophir ve Blumenkarz<sup>128</sup> tarafından tanımlanmış kültüre edilmiş dermal fibroblastların vitreus içine enjeksiyonunu içeren, diğeri Iverson<sup>129</sup> tarafından tanımlanan deneklere lensektomi ve kor vitrektomi yapıp endodiatemi uygulanan deneysel PVR modeli olmak üzere iki temel protokol mevcuttur. Birçok araştırmacı bu iki temel modeli modifiye ederek farklı deneysel PVR modelleri oluşturmuştur. Örneğin De Souza ve ark.<sup>103</sup> Blumenkranz'ın modelini vitrektomize gözlerde uygulamıştır. Hui ve ark.<sup>130</sup> ise PVR modeli oluşturmak için fibroblast yerine aktive edilmiş homolog makrofajları göz içine injekte etmiştir. Stern ve ark.<sup>131</sup> lensektomi ve vitrektomiden iki hafta sonra eğer traksiyonel retina dekolmanı gelişmemişse hücre kültüründe çoğaltılmış RPE hücresini göz içine enjekte ederek traksiyonel retina dekolmanı oluşturmuştur. Van Bocksmeeveark.<sup>132</sup> ön kamara parasentezinden sonra vitreus içine kültüre edilmiş homolog koroidal fibroblast injekte ederken, Cleary ve Ryan<sup>133</sup> pars planadan bir mikrovitreoretinal (MVR) bıçakla girip, lens ve periferik retinayı koruyarak vitreusun prolabe olmasını sağlamışlar ve penetran göz travması oluşturarak travmatik PVR modeli geliştirmişlerdir. Yara yerini aralıklı olarak sütüre ettikten sonra göz içine otolog serum enjekte etmişlerdir. Chandler ve ark.<sup>86</sup> ise intraoküler basınç en az 20 mmHg olacak şekilde perfloropropan gazını göz içine vererek vitreusun tamamen ayrışmasını sağlayıp kültüre fibroblast hücre enjeksiyonu ile PVR oluşturmuştur. Nakagawa ve ark.<sup>134</sup> bu modeli modifiye ederek gaz kompresyonundan sonra tavşan konjonktival fibroblastları ve trombosit zengin plazmayı intravitreal olarak uygulamışlardır.

Tüm bu deneysel PVR modellerinin ortak noktası fibroblastların hücre kültürlerinde

çoğaltılarak RPE hücrelerinin vitreus boşluğuna döküldüğünde yaptığı etkiyi elde etmektir. Ancak bu modellerin en büyük dezavantajı yüksek teknolojide laboratuvar şartları gerektiren maliyeti yüksek yöntemler olmalarıdır.

İlk olarak Frenzel ve ark.<sup>117</sup> 1998 yılında PVR modeli için tavşan gözlerine intravitreal olarak dispaz uygulamışlardır. Dispaz; bacillus polymyxa'dan elde edilen, deneysel çalışmalarda hücre toplama ve doku ayrıştırılmasında kullanılan proteolitik bir enzimdir (nötral proteaz). Retinadaki bazal membranın yapısında bulunan tip dört kollajen ve fibronektini selektif olarak yıkmaktadır.<sup>135</sup> Devamlılığı bozulan RPE hücreleri vitreus boşluğuna dökülmekte; böylece vitreusta kontraktıl membranlar ve RD oluşturarak PVR benzeri tabloya yol açmaktadır. Bu yöntem minimal travmatize edici olması, hücre kültürü gerektirmemesi, uygulamasının kolay ve maliyetinin ucuz olması nedeniyle daha avantajlıdır.

Ancak PVR modelinin dezavantajı Kralinger ve ark.'nın<sup>120</sup> çalışmalarında da gösterildiği gibi katarakt ve lens subluksasyonu oluşması nedeniyle deney süresince fundus görüntülemesine izin vermemesidir. Ancak diğer deneysel PVR modellerinde de katarakt gelişimi söz konusu olduğundan, bu durumun sadece dispazın neden olduğu toksik reaksiyonla değil aynı zamanda PVR'nin patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda da dispaz uygulamasından yaklaşık iki hafta sonra tüm deneklerde katarakt oluşumu gözlemlenmiştir. Dispaz ile oluşturulan deneysel PVR model çalışmalarının çoğunda örnekler patolojik kesitler, immunohistokimyasal çalışmalarla değerlendirilmiştir. Ancak çok fazla proteomiks çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda kontrol grubu, intravitreal dispaz uygulama enjeksiyonuna eş zamanlı olarak intravitreal salin uygulanan grup ve intravitreal dispaz uygulama enjeksiyonuna eş zamanlı olarak intravitreal aflibercept uygulanan grup olmak üzere üç gruba ayrılan ratların 6. hafta sonunda alınan retina ve vitreus örnekleriyle proteomik analiz yapılmıştır. Analiz sonucu çeşitli protein seviyelerinde değişiklikler olmuştur.

Analiz sonucunda her bir sonucu ayrı ayrı değerlendirdik;

***Keratin, type II cytoskeletal 6A (CK-6A)*** tüm memeli epitelyal hücrelerinde bulunan

intrasisitoplazmik sitoskeletonun Tip II ara filamentlerini oluşturmakta, retina homeostasisinde rol oynamaktadır.<sup>136</sup> RPE hücreleri hegzokonal yapıda, normal şartlarda mitojenik aktivite göstermeyen, retinal hasar durumunda ya da hücre kültürlerinde proliferasyon gösteren hücrelerdir. PVR'de başlangıç basamağında RPE hücrelerinin farklılaşması meydana gelebilir. Özellikle, mitotik olarak inaktif, altıgen bir şekilden, epitelyal özelliklerini kaybettiği göç eden yassı bir morfolojiye dönebilir. İkinci adımda, RPE hücreleri diğer hücrelerle birlikte subretinal boşluktan vitreus boşluğuna göç eder ve yoğun şekilde çoğalırlar. Prolifere olan RPE hücreleri miyofibroblastlara veya mezenkimal benzeri hücrelere transdifferasyon gösterebilir ve epiretinal zarları oluşturabilir.<sup>21</sup> Son olarak, membranlar retinaya kontraksiyon uygulayıp retinanın ayrılmasına neden olabilir.<sup>137-139</sup> Akira Ando ve ark<sup>140</sup> yaptığı çalışmada in vitro olarak PDGF uygulanan RPE hücrelerinin hegzokonal yapıdan epiteyal özelliklerini kaybederek yassı bir morfolojiye dönüştüklerini, bu dönüşüm esnasında RPE hücrelerindeki sitokeratin ekspresyonunun azaldığını, buna eş zamanlı SMA'nın da arttığını, PDGF'nin myoid differansiyonu arttırdığını göstermişlerdir. İnterlökin 1a, IGF-1 ve FGF nin bu sürece PDGF kadar etkisi olmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada PDGF'nin RPE ile kollajen kasılmasını indüklediği de görülmüştür.<sup>140</sup>

Ayrıca Yu J ve ark<sup>141</sup> PVR vitreus örneklerinde hücre iskeleti proteinlerinin azaldığını göstermişlerdir.<sup>141</sup>

Çalışmamızda kontrol grubuna göre dispaz verilen gruplarda keratin seviyesinde azalma görülmüş olup aflibercept uygun grupta anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Keratin yapısal bir hücre iskeleti proteini olup, miktarında meydana gelen değişimler hücre iskeletinde meydana gelen re-organizasyonlara işaret etmektedir. Özellikle keratin miktarındaki düşüşler hücre iskeletindeki değişimin habercisi olabilir. Örneğin yukarıda bahsetmiş olduğumuz gözlemlerde olduğu gibi deneylerimizde gözlemlediğimiz keratin miktarındaki azalışı, dispaz tarafından oluşturulan PVR sonucu RPE'deki değişimin yansımaları olarak değerlendirmek mümkündür.

***Ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz izoenzimi L1 (UCH-L1)***, retinada horizontal, bipolar, amakrin, gangliyon hücrelerinde ve gangliyon hücrelerin oluşturduğu sinir tabakasında lokalize bir enzimdir. Kemirgenlerde, koni veya çubuk fotoreseptörlerinde hiçbir UCH-L1 immünreaktivitesi bulunmamakla birlikte, bu protein tüm diğer memelilerde konilerin tüm uzunluğu boyunca mevcut olduğu görülmüştür.<sup>142</sup> Dispaz uygulanan gruplarda UCHL-1 seviyesinde anlamlı bir düşüş tespit edilmişken, afliberceptin bu düşüşü belirgin olarak değiştirdiği görülmemiştir. Çalışmamızda dispaz ile oluşturulan dekolman ve kontraksiyon ile fotoreseptör tabakadaki hasarın bir göstergesi olduğu düşünülmüştür. UCHL-1 enziminin fizyolojik işlevine bakıldığında bu enzimin protein yıkımında görev alan E3-ubikitin ligazların aksine ubikitine olmuş proteinleri, deubikitine ettiği görülmektedir. Özellikle monoubikitine olmuş proteinlerin deubikitinasyonundan sorumlu bir proteindir. Monoubikitinasyon bir post translasyonel değişim olup hücre içerisinde uygulandığı proteinler üzerinde derin fonksiyonel etkiler yapabilir. Örneğin monoubikitine olmuş bir proteinin hücre içi lokalizasyonu değişebilmekte ve sitoplazmadan hücre çekirdeğine transfer edilebilmektedir. Hücre içerisinde monoubikitine olduğu bilinen çok sayıda protein vardır. Deneylerimizde UCHL-1 miktarında bir azalma olduğunu gördük. Bu gözlem bize monoubikitine olan proteinlerin hücre içerisindeki miktarındaki artışa ve kalış sürelerindeki uzamaya işaret etmektedir. UCHL-1 klinik açıdan önem arz eden bir protein olup özellikle nörodejeneratif hastalıklar olan ilişkisi gösterilmiştir. Bu protein üzerinde görülen bazı mutasyonların körlükle seyreden nörodejeneratif bir hastalık olan spastik paraplejiye neden olduğu gösterilmiştir.<sup>143</sup> Bu mutasyonlar enzim aktivitesinin azalmasına ve dolayısı ile monoubikitine protein miktarında artışa neden olmaktadır. Deneylerimizde gözlemlediğimiz olduğumuz UCHL-1 miktarındaki azalışın bu duruma benzer bir fizyolojik etkisinin olduğunu; dispazın, özellikle fotoreseptör tabaka olmak üzere, retinadaki hasarını yansıttığını düşünmekteyiz. UCHL-1'in ayrıca Parkinson hastalığı ile olan ilişkisi de gösterilmiştir. Bu protein üzerindeki mutasyonların *alfa-synuclein* adı verilen sinaptik proteinin orta beyinde birikime neden olduğu ve Lewy cisimciklerinin oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. Bu bilgidan yola çıkarak deneylerimizde gözlemlediğimiz UCHL-1 seviyesindeki düşüşü hastalık modelimizle ilişkilendirmemiz kolay

olmamaktadır. Ancak yaptığımız literatür araştırmasında UCHL-1'in ayrıca ikincil bir aktivite olarak ubiquitin ligaz aktivitesi de gösterdiği görülmüş ve bu düşük seviyedeki ligaz aktivitesindeki bozulmanın hastalık oluşumunda etkili olabileceği ileri sürülmüştür.<sup>144</sup> Gözlemediğimiz değişimin UCHL-1'in ligaz aktivitesi ile ilişkili olma yönünü de göz ardı edilmemelidir.

***1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 (PLCG2)***, memelilerde, 13 PLC izoenzimi tanımlanmış ve amino asit sekanslarına dayalı olarak PLCG2'nin de aralarında bulunduğu - $\beta$ , - $\gamma$ , -8, - $\epsilon$ , - $\zeta$  ve - $\eta$  olmak üzere altı gruba ayrılmıştır. Bu izozimler, ikinci haberci DAG ve IP3 aracılı yollarla birlikte, esasen protein kinaz aracılı fosforilasyon ve hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyelerindeki yükselme yoluyla çeşitli hücresel işlevlerde ve transmembran sinyalizasyonunda önemli rol oynar.<sup>145</sup> Dikkatimizi çeken bir diğer nokta *1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase*'in VEGF ve EGF sinyal yolları ile ilişkili bir protein olduğudur. Bu proteinin seviyesi kontrole göre hem dispaz+salin grubunda hem de dispaz+aflibercept grubunda 7-8 kat düşüş göstermiştir. Elde edilen bu sonuç, dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Ancak yapılan çalışmalar bu proteinin doğrudan VEGF yolağının bir parçası olduğunu gösterir niteliktedir (Şekil 15). Eksikliğinde B lenfositlerin, trombositlerin ve dendritik hücrelerin etkilendiği, aktive edici mutasyonunda soğuk ürtiker, immün yetmezlik ve otoimmün hastalıkların meydana geldiği görülmüştür.<sup>146-148</sup> Bu hastalıklardan en iyi bilineni *autoinflammation and PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation (APLAID)*'dir. Özellikle 707. pozisyonundaki serin amino asidinin tirozine değişimi EGF sinyal yolağını aşırı aktif hale getirmekte ve hücre içi kalsiyum miktarını patolojik seviyede değiştirmektedir. Hastalığın görülen semptomları arasında cilt hasarı, eklemlerde meydana gelen bozukların yanı sıra gözde meydana gelen hasarda sayılmaktadır.<sup>148</sup> Dispaz uygulanan örneklerdeki bu enzim seviyesindeki değişiklik PVR'deki inflamasyon ve EGF sinyal yolağındaki artışa işaret etmektedir.

***Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Complex III subunit 1)***, mitokondri iç zarında bulunan aerobik solunumda görevli bir proteindir. Renu A. Kowluru ve ark.<sup>149</sup> diyabetik retinopati (DRP) gelişiminde mitokondriyal disfonksiyonun önemli bir rol oynadığının ve son yıllardaki kanıtların diyabetik retinopati ile düşük dereceli kronik inflamatuvar hastalık arasında pek çok benzerlik olduğunun düşünülmesinden yola çıkarak; proinflamatuvar mediator IL-1 $\beta$  ve mitokondriyal disfonksiyon arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Diyabetik farelerde IL-1 $\beta$ 'nin, mitokondriyal disfonksiyon ve mtDNA hasarına uğrayarak retinadaki sitokrom b seviyelerini düşürdüğünü göstermişlerdir.<sup>149</sup> Ayrıca diyabetik retinopatisi olan hastaların periferik kanında da sitokrom b seviyelerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>150</sup>

Yaptığımız deneylerde dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dispaz verilen örneklerde sitokrom b-c1 seviyesinde düşüş gözlemledik. Varsayımımız bu düşüşün bize elektron transport sistemi (ETS) döngüsünü besleyen TCA döngüsünde bir aksaklık olduğunu ve döngünün ETS'yi gerektiği gibi besleyemediğini göstermektedir. Ayrıca deneylerimizde gözlemlediğimiz ve aşağıda bahsettiğimiz LDH seviyesinde meydana gelen düşüşün de bu metabolik değişimi destekler nitelikte olduğuna işaret etmektedir. TCA döngüsü ve laktat üretimi arasında anahtar noktayı tutan asetil-KoA'nın her iki yolağı beslememesi durumunda anabolik reaksiyonlara yönelerek serbest yağ asitlerinin ve sterollerin sentezinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Bu sentez yolağında özellikle araşidonik asit inflamasyonla ilişkili bir molekül olup prostaglandin sentezinde başlangıç noktasında bulunmaktadır. Deneylerimizde gözlemlediğimiz asetil-KoA'nın serbest yağ asidi sentezine yönelişi, indirekt olarak artan inflamasyon ile ilişkili olabilir. Bu kompleksteki düşüş retinal hasar, mitokondriyal hasar, hipoksik koşullar ve inflamasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

***Gama enolaz (Nöron spesifik enolaz, NSE)***, homodimer yapıda glikolizden sorumlu olan bu izoenzim, olgun nöronlarda ve nöronal kökenli hücrelerde bulunanan matur nöron sitoplazmik markerıdır.<sup>136</sup> Yapılan çalışmalarda insan retina nöronlarındaki varlığı gösterilmiştir.<sup>151</sup>



Ducournau Y ve ark.<sup>152</sup> yaptıkları çalışmada RD ve PVR'ı olan ganglion hücresinde, dış nükleer ve iç nükleer tabakalardaki mimarinin kaybolduğu retina örneklerinde NSE şiddetli bir şekilde azaldığı; gangliyon hücresinde ve nükleer tabakalarda orta derecede nöronal bir kaybın olduğu retinal mimarinin nispeten korunduğu örneklerde NSE ekspresyonu nispeten muhafaza edildiği, kontrol grubunda ise NSE güçlü bir şekilde pozitif olduğu görülmüştür.<sup>152</sup> Hao Wang ve ark.<sup>153</sup> yaptığı DRP hastalarının vitreus proteom analizlerinde, gamma enolaz seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş görülmüştür.<sup>153</sup> Ayrıca yapılan başka bir çalışmada diyabeti olan hastalarda retinopatinin eşlik ettiği grupta serumdaki NSE seviyelerinin daha düşük olduğu görülmüştür.<sup>154</sup>

Dunker S ve ark.<sup>155</sup> yaptığı çalışmada ise retina dekolmanı olan hastaların subretinal sıvı, aköz ve kandaki NSE seviyelerinde artış görülmüştür. Ratlarda santral sinir sistemindeki hasara bağlı NSE artışından yola çıkarak RD'nin iskemik hasara sebep olarak retinadan NSE salınım artışına bağlı olduğu hipotezini sunmuşlardır.<sup>155</sup>

Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. NSE'deki anlamlı düşüşün PVR oluşumuna bağlı yoğun retinal hasarı işaret ettiğini düşünmekteyiz.

***Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha (Gnao1)***, asıl olarak hücre membranında lokalize olan Gnao1, dendrit yapısında da görülmüştür. Horizontal hücrelerin rodlarla olan sinaptik etkileşiminde etkili olduğu ve sağlıklı nöron yayılımında rol oynadığını düşündürmektedir.<sup>156</sup> Mutasyonunda epileptik ensefalopati görülmektedir.<sup>157</sup> Guanin nükleotid bağlayan proteinler pek çok transmembran sinyalinde transducer veya modülatör olarak görev yapmaktadırlar. Bu ailenin bir üyesi olan G(o)'ın ise fonksiyonu tam olarak ortaya konulamamıştır. Yaptığımız çalışmaya benzer bir araştırmada Markus ve ark.<sup>158</sup> yapmış oldukları dispaz temelli PVR fare modelinde guanine nükleotid bağlayan proteinin beta alt ünitesine rastlamışlardır. Bu proteininde miktarında bizim gözlediğimiz gibi düşüş tespit etmişlerdir. Ancak fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bu proteinin miktarındaki düşüşü herhangi bir metabolik yolak ile ilişkilendirememişlerdir. Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu

protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir.

***Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F)*** hücre proliferasyonunun görevli bir nucleus proteinidir.<sup>159</sup> hnRNP F, heterojen ribonükleoprotein kompleksinin bir ünitesi olup RNA'yı bağlayabilir. Bu proteinin çoklu fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir. Özellikle gen ekspresyonu sürecinde öncül mRNA'ların işlenmesi, çekirdek dışına taşınması, RNA splicing, mRNA stabilitesi ve translasyonda görev almaktadır. Stress altında hnRNP F hücrenin kaderi hakkında karar verebilme yeteneğine sahip protein olup, özellikle transkripsiyonel regülasyonda yaptığı etki ile birçok metabolik yolağın yönlendirilmesinde rol almaktadır.<sup>160,161</sup> Bu tip çok fonksiyonlu proteinlerdeki değişimleri yorumlamanın zor olduğu gerçeğini hatırla tutarak hnRNP F'in düşüşündeki gözlemin bir sebep mi yoksa bir sonuç mu olduğunu söylemek çok güçtür. Markus ve ark.<sup>158</sup> çalışmalarında hnRNP benzer biçimde düşüş göstermiştir, ancak bu düşüşün nedeni ile ilgili makalede herhangi bir yorum yapılmamıştır. Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir.

***Phosphatidylethanolamine- binding protein 1 (PEBP-1)***, hücre membranında, sitoplazmada bulunan bir proteaz inhibitörüdür. Sinir sisteminde nöronda, akson terminalinde sinaptik vezikülde varlığı gösterilmiştir.<sup>136</sup>

Hao Wang ve ark.<sup>153</sup> yaptığı DRP hastalarının proteom analizlerinde PEBP-1 seviyelerinde anlamlı bir düşüş görülmüştür. Ekstraselüler sinyal regüle protein kinaz (ERK) yolağının bileşenleri olan Raf-1 ve mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaza (MAPK) bağlandığı gösterilmiştir ERK yolağı aracılığıyla yapılan aberran sinyali, telomeraz indüksiyonu, büyüme faktöründen bağımsız proliferasyon ve proanjiyojenik faktörlerin upregülasyonu ile anjiyogenez gibi mekanizmalar yoluyla hücre immortalizasyonunu teşvik edebilir. Bu nedenle, proliferatif DRP hastalarında saptanan düşük PEBP seviyeleri belki de neovaskülarizasyon ve hücre döngüsü ilerlemesi ile ilişkili olduğunu düşünmüşlerdir.<sup>153</sup> Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi

üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Deneyimizdeki dispaz verilen grupta enzim seviyesindeki düşüşün hücre döngüsü ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

***Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial, (PDH, PDHB, PDHE1-B)*** kompleksinde yer alan PDHB immünreaktivitesi RPE, fotoreseptör (iç segment) ve gangliyon hücrelerinde belirgin olarak tespit edilmiştir.<sup>162</sup> PDH'ın metabolik görevi NADH üretimini sağlayarak pürvattan asetil-KoA sentezi gerçekleştirmektir. Sentezlenen asetil-KoA sonrasında TCA döngüsüne girerek ETS'yi beslemek amaçlı indirgenmiş elektron kaynağı üretir.

Bu kompleksteki mutasyonların, primer laktik asidoza sebep olarak merkezi sinir sisteminde dejeneratif değişikliklere yol açtığı görülmüştür.<sup>163,164</sup>

PDHB mutant zebrafishlerde, enerji yetersizliğine bağlı retinal dejenerasyona sonucu hareket görme azalması ve ardından ışık hissi kaybı ile karakterize edilen retina spesifik fenotipi gösterilmiştir.<sup>165</sup>

PDH miktarındaki azalma üç şekilde yorumlanabilir; bunlardan ilki hücrelerin asetil-KoA'ya ihtiyaç duymaması veya sentezlenen asetil-KoA'yı TCA döngüsüne sokamamasıdır. Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bizim yorumumuz yukarıda da bahsettiğimiz gibi (LDH bölümünde) asetil-KoA'nın TCA'ya girmemesi ve yeterli miktarda lipid sentezi yapılamadığından dolayı asetil-KoA'ya ihtiyaç duyulmamasıdır. İkinci ihtimal ise pürivatin glikoneogenez yolağı ile fosfoinol pürüvata geri çevrilmesinden dolayı asetil-KoA'ya dönüşecek yeterince pürüvat molekülünün ortada bulunmamasıdır. Bu ihtimal aslında TCA döngüsünün verimli çalışmaması dolayısıyla ile artakalan okzola asetatında ortamdaki uzaklaştırılarak kullanılmasına yol açabilir. Glukoneogenezin son ürünü olan glukozun metabolizma için değerli bir substrat olduğu düşünülecek olursa bu karmaşık regülasyon şekli daha açıklanabilir. Son olarak da mitokondrial ve retina hasara bağlı olarak seviyelerinde azalma olduğu düşünülebilir.

***Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5 (Gbeta5, Gβ5,GNB5)***'in RGS (G protein sinyal regulator) protein kararlılığını ve membran bağlanmasını farklı şekilde kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle kompleks nöronal G protein sinyal yollarının kontrolünde rol oynar. Asıl olarak hücre membranında olmasına karşın iç ve dış fotoreseptör segmentinde aydınlık ve karalık adaptasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir.<sup>166</sup> Ou J ve ark.<sup>167</sup> yaptığı deneysel X'e bağlı retinoskizis modelinde *retinoschisin* (RS1) eksikliği olan farelerde Gβ5 proteinin postsinaptik bipolar hücrelerde azaldığı görülmüştür.<sup>167</sup>

LRIT3 gen defekti konjenital gece körlüğüne sebep olmaktadır. Neullé M ve ark.<sup>168</sup> farelerde yaptığı bir çalışmada LRIT3 gen defekti olan farelerde kon on-bipolar hücrelerde Gβ5 immunfloresansının olmadığı görülmüştür.<sup>168</sup> Çalışmamızda dispaz verilen gruplardaki seviyesindeki Ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir.

***Glial fibrillary acidic protein (GFAP)***: Sınıf III ara filament olan GFAP, astrositler ve aktifleştirilmiş Müller hücreleri için bir protein biyomarkırıdır.<sup>169</sup> Müller hücreleri, nöral retinadaki glial hücrelerdir. Retinal nöronların homeostasis ve metabolizmasına katılırlar ve tüm retinaya nüfuz ederler.<sup>35,170</sup> Astrositler sadece retinal sinir lifi katmanı ve özellikle de optik sinir başı içinde bulunur. Normal koşullar altında, GFAP Müller hücrelerinde eksprese edilmez. Müller hücrelerinin normal çalışması için GFAP gerekmemekte, sadece gliozisi için gerekmektedir. Artmış GFAP ekspresyonu da dahil olmak üzere Müller hücrelerinin aktivasyonu, insan retina hasarına önemli bir yanıt özelliğidir.<sup>171</sup> Bu yanıt Müller hücrelerinde morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikleri içerir. Bu süreçte Müller hücreleri nörorejenerasyona katkıda bulunabileceği gibi doku onarımında engel oluşturarak nörodejenerasyona da neden olabilir.<sup>35</sup> Müller hücreleri, retina dekolman sonrasında skar oluşumuna ve sonuç olarak kötü görsel fonksiyona sebep olabilir.

Müller hücrelerinde GFAP'ın upregülasyonu, retinal hastalık ve yaralanmaya karşı non-spesifik en duyarlı, belirgin bir yanıttır.<sup>172</sup> Müller hücrelerinin parçalanması hücresel proteolizi tetikler. GFAP polimerinin proteolitik parçalanması ile GFAP çözünür parçaları hücre dışına çıkmaktadır.<sup>169,173</sup> Bu işlem kalsiyum bağımlı ve kalpain aracılı

olmaktadır.<sup>169</sup>

Bu nedenle, GFAP retina hasarı, Müller hücresi aktivasyonu, proteaz aktivasyonu ve nihayet retinadaki sekonder dejeneratif süreçler için dolaylı bir belirteç olarak kullanılabilir.<sup>170,172</sup> Özellikle, RD ve proliferatif vitreoretinopatideki retinal Müller hücrelerinde artmış GFAP ekspresyonu için deneysel ve klinik bulgular vardır.<sup>38,174-180</sup> Dahası, intraretinal glial yanıt epiretinal glioz (EG) oluşumunda merkezi olarak rol oynamaktadır.<sup>172</sup>

İlk Anselm Gerhard Maria Jünemann ve ark.<sup>171</sup>, RD ve EG'li hastaların vitreuslarında artmış GFAP düzeyleri bulmuşlardır.<sup>171</sup>

Dejeneratif vitröz süreçleri potansiyel olarak vitreoretinal arayüzde patolojiye neden olur.<sup>181,182</sup> Müller hücrelerinin RD'da hipertrofi ve hiperplaziye uğrayarak subretinal boşluğa ve vitreusa yayıldığı, GFAP üretimi ile ilişkili olduğu görülmüştür.<sup>82,174,183-185</sup>

Müller hücrelerinin bu spesifik olmayan cevapları, retinal ayrılmanın 1. gününde başlar.<sup>178,186-188</sup> Müller hücrelerinde, erken ve uzun dönem RD'de yüksek GFAP ekspresyonu bulunmuştur. Müller hücrelerindeki artmış GFAP içeren ara filamentler 30 ve 60 günlük müstakil retinalarda protein jelleri, immüno blot analizi ve elektron mikroskopik immüno sitokimyasal olarak tespit edilerek varlığı gösterilmiştir.<sup>174,189</sup> Dahası, doku otoradyografi çalışmaları, RNA lekelenme analizi ve in situ hibridizasyon ile GFAP mRNA'sında beş kat artışa paralel olarak, Müller hücrelerinde RD'den 2-3 gün sonra RNA sentezinde bir artışa işaret etmektedir.<sup>184,190,191</sup> Müller hücrelerinin epiretinal, intraretinal ve subretinal reaktif gliozise sebep olması, dekolmanın yatıştırılmasına rağmen, sonrasında görme iyileşmesinde klinik olarak önemli bir sınırlayıcı faktördür.<sup>38,39,192</sup> Müller hücre gliozunu azaltmaya yönelik girişimlerin, sonraki retinal dejenerasyonu inhibe ettiği ve dekolmanın yatıştırılmasından sonra nörorejenerasyonu desteklediği öne sürülmüştür.<sup>38,39</sup>

Anselm Gerhard Maria Jünemann ve ark.<sup>171</sup> çalışmasında, aksiyel uzunlukları yüksek miyop gözlerde yüksek GFAP düzeyleri gösterilmiştir. Çalışmadaki rakamların az olmasına rağmen miyopik gözlerde, daha sık ve şiddetli retinal dejenerasyon, daha sık RD görülmesi ve vitreoretinal cerrahiden çıkan sonuçlarının daha kötü olması nedeniyle GFAP yüksekliği ve vitreoretinal dejenerasyon arasındaki bağlantının literature ile uyumlu olduğunu

düşünmüşlerdir.<sup>193,194</sup> GFAP retinal glial aktivasyon için bir biyobelirteç görevi görebilir.<sup>171</sup>

PVR'lı gözlerden alınan membranlarda yapılan immünohistokimyasal analizlerde GFAP varlığı görülmüştür<sup>195</sup>. Tavşanlarda yapılan deneysel PVR modelinde GFAP'ta anlamlı artış olduğu görülmüştür.<sup>196</sup> Feist, R.M ve ark.<sup>197</sup> PVR da immünohistokimyasal olarak GFAP pozitif hücrelerde GFAP'a ek olarak SMA'nında eksprese olduğunu göstermişlerdir.<sup>197</sup>

Szczesniak A.M. ve ark.<sup>198</sup> farelerde dispaz ile yaptığı deneysel PVR modelinde de immünohistokimyasal analizde dokularda GFAP artışı görülmüştür.<sup>198</sup> Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dispaz uygulayarak PVR oluşturduğumuz örnek gruplarında GFAP'ın belirgin yükselişi PVR sürecindeki Müller hücrelerinin proliferasyonu, hipertofisini oluşturduğu gliozisin şiddetini ve retinal hasarı kanıtlamaktadır.

***Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial(IDH3A)*** mitokondride yer alan katalitik bir enzimdir.<sup>136</sup> Dispaz uygulanan örneklerdeki düşük seviyesi mitokondri hasarı ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

***Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Collapsin response mediator protein 2, CRMP-2, DRP-2)*** hücre iskeletinin yapısında nöron gövde, dendrit ve aksonunda da bulunabilen nöronal gelişim ve polaritede, aksonal gelişiminde ve hücre göçünde rol oynayan bir proteindir.<sup>136</sup>

Yu Wang ve ark.<sup>199</sup> çalışmasında iskemi / hipoksi (İH) hasarı ile oluşturdukları deneysel oküler iskemik sendrom modelinde retinanın incelendiği ve collapsin yanıt mediatör protein-2'nin (CRMP2) azaldığı gösterilmiştir.<sup>199</sup>

Jian-Nan Zhang ve ark.<sup>200</sup> in vivo ve in vitro yaptıkları akut aksonal dejenerasyon (AAD) çalışmasında erken dönemde calpain artışının CRMP2 seviyesinde düşüklüğe ve aksonal parçalanmaya sebep olduğu görülmüştür. Calpainin inhibitörü calpeptin ile hem CRMP2 seviyesinin düşmemesi hem de bozulmamış CRMP2'nin aşırı ekspresyonu AAD'ye karşı koruyucudur. Üstelik in vitro veriler CRMP2'nin aksonal mitokondri taşınmasını sürdürerek koruyucu işlevini yerine getirdiğini göstermektedir.

Calpain inhibitörü olan calpeptin ile tedavide aksonların proksimalinde 6 saat boyunca tamamen stabilizasyon gözlürken, etkinin distal tarafta daha az olduğu görülmüştür.<sup>200</sup>

Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dispaz verilen örneklerde bu protein seviyesindeki düşüş retina hasarının bir kanıtı olabileceği düşünülmüştür.

***L-lactate dehydrogenase B chain (LDH-B)*** sitoplazmada bulunan, piruvat laktat dönüşümünde yer alan katalitik ve glikolitik bir enzimdir. LDH B'nin hem Bernadett Márkus ve ark.<sup>158</sup> yaptığı deneysel PVR modelinde hem de bizim çalışmamızda seviyesinde azalma olduğu görülmüştür.<sup>158</sup> Deneyimiz dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Enzimdeki düşüş ile laktata dönüşte azalma hücre hasarından ya da mitokondrial hasara bağlı tüketim fazlalığına bağlı olabilir.

***Alpha-enolaz (Eno1)***, fotoreseptör hücrelerin dış segmentinde ve Müller hücreleri dahil olmak üzere retina boyunca mevcut olan glikolitik bir enzimdir. Buna ek olarak,  $\alpha$ -enolaz endotel hücreleri, hematopoetik hücreler (monosit, T hücreleri ve B hücreleri) ve nöronal hücreler yüzeyinde tespit edilmiştir.<sup>201-203</sup> Anti-enolaz antikoru, enolazın katalitik aktivitesini önemli ölçüde azalttı; bunun da, glikolitik ATP'nin tükenmesine ve hücre içi kalsiyumun bir artışına neden olarak hücre apoptozuna yol açtığı görülmüştür.<sup>203</sup> İleri görme kaybıyla sonuçlanabilen kanser ilişkili retinopati (KAR) ve otoimmün retinopatide alpha enolaza karşı oluşan anti-enolaz antikoru görülmüştür. KAR hastalarında anti-enolaz antikoru, retina hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indükleyebildiğini ve insanlarda retinal dejenerasyon için potansiyel bir mekanizma sağladığını göstermiştir.<sup>204,205</sup> Kumagai A ve ark.<sup>206</sup> insan kadavra vitreus örneklerinde yaptıkları proteom analiziyle Eno1 bulunduğunu göstermişlerdir. Eno1 RPE de yüksek konsantrasyonda bulunur. Zheng F ve ark.<sup>207</sup> RPE hücreleri ve koroid patolojik hipoksi veya iskemiye maruz kaldığında, RPE hücrelerinde Eno1'in ekspresyonunun arttığı göstermişlerdir. Deneyimizde dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dispaz verilen örneklerde Eno1'deki düşüşün PVR'deki inflamasyon, doku hasarı ve apoptozisin bir kanıtı olabileceği düşünülmüştür.

***Malaet dehydrogenase(MDH)***, ratlarda en çok iç fotoreseptör tabakada olmak üzere çeşitli retina katlarında görülen sitoplazmik, katalitik bir enzimdir.<sup>208</sup>

Sindhu Saraswathy ve ark.<sup>209</sup> deneysel üveit modelinde mitokondri proteomiks çalışmasında malaet dehidrogenaz enzim seviyesinde kontrol grubuna göre düşüş görülmüştür. İnflamatuvar bir durum olan üveitte bu değişimin mitokondri fonksiyonun değişimine ve doku hasarının erken bir kanıtı olduğu düşünülmüştür.<sup>209</sup> Çalışmamızda dispazın bu proteinin seviyesini etkilediği ancak aflibercept tedavisinin bu protein seviyesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dispaz verilen gruplarda bu enzimin düşmesi retina doku hasarı ve inflamasyon ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

***Glutamine synthetase (GS)***, hem Aretz S ve ark.<sup>210</sup> tarafından insan vitreus proteom analizinde hem de Harada T ve ark.<sup>211</sup> tarafından Müller hücrelerinde spesifik olarak varlığı gösterilerilen katalitik bir enzimdir.<sup>210,211</sup> Önceki çalışmalar retinanın dekole olmasıyla beraber, GFAP protein ve vimentinin artışı, buna karşın glutamin sentetaz, karbonik anhidraz C ve hücrel retinaldehit bağlayıcı düştüğünü ortaya koymuştur.<sup>187</sup>

Müller hücrelerinin, glutamatı ekstraselüler boşluktan süpürdüğü düşünülmektedir. Zehirli bir molekül olan glutamat, glutamin sentetaz enzimi tarafından hemen glutamine dönüştürülür. Glutamin sentetazdaki bir azalma, Müller hücrelerindeki bu fonksiyonu bozabilir ve retinal nöronları glutamatın etkilerine duyarlı bırakabilir. Glutamin sentetaz düzeylerindeki benzer düşüşler santral sinir sistemi hasarından sonra sıçan beyin astrositlerinde; kalıtsal retinal dejenerasyonlu farelerde distrofik retinada gözlemlenmiştir ve glial hücrelerin hasara karşı karakteristik bir yanıtını temsil edebilmektedir.<sup>187</sup> Bernadett Márkus ve ark.<sup>158</sup> farelerdeki deneysel PVR modelinde kontrol grubuna göre seviyesinde azalma olduğu görülmüştür.<sup>158</sup>

ERM'de GS pozitif ve negatif olan olgulardan bahsedilmiştir. Pozitif olanların Müller hücrelerinden kaynaklandığı negatif olanların ise ERM'nin küçük bir kısmının, muhtemelen fibrositler, retinal pigment epitel hücreleri veya miyofibrositler olduğu, GS immünreaktivitesi olmayan glial olmayan hücrelerden oluştuğu açıktır.<sup>212</sup> Çalışmamızda dispaz verilen gruplarda bu enzim seviyesindeki düşüş meydana gelen PVR modelinde hem Müller hasarını hem de glutamatın yıkılmamasına sekonder retinal hasarı arttırdığını düşündürmektedir.



## 5. SONUÇ

Kontrol, Dispaz+salin ve Dispaz+aflibercept olarak üç grup yaratılarak, ratlarda dispaz ile oluşturulan deneysel PVR modelinde dipazın etkisi ve afliberceptin etkinliği araştırılmıştır. Rat retina ve vitreus örneklerinin yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 22 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edilmiştir. Dispaz ile oluşturulan model hayvanlarda kontrol grubuna göre keratin, *type II cytoskeletal*, UCHL-1, PLCG2, *Cytochrome b-c1 complex subunit 1*, *dynactin subunit 2*, *Gamma-enolase*, Gnao1, hnRNP F, *phosphatidylethanolamine-binding protein 1*, *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta*, *isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial*, *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5*, *Dihydropyrimidinase-related protein 2*, *L-lactate dehydrogenase B chain*, *Malate dehydrogenase, cytoplasmic*, *Alpha-enolase*, *Glutamine synthetase* düzeylerinde azalma; GFAP düzeyinde de artış olduğu görülmüştür.

Elde edilen veriler, yapılan biyoinformatik analizler ile birleştirildiğinde dispaz ile oluşturulan hastalık modelinde (PVR) özellikle sinyal yolaklarının bozulduğu ve sinyal iletimi ilişkili proteinlerin seviyelerinde değişiklikler olduğu görülmüştür. Uygulanan aflibercept tedavisinin bu durumu tam olarak düzeltmediği ve protein seviyelerinde belirgin bir normale dönüşe sebep olmadığı kanaatine varılmıştır. Ancak etki mekanizması bilinen afliberceptin doz miktarı değiştirilerek ileri çalışmalar yapılabilir.

PVR ın günümüzdeki tedavisi ve dispaz ile oluşturulan PVR modellerinin proteomiks çalışmalarının literatürdeki sayıları kısıtlıdır. Hatta ratlarda ilk defa yapılan bu preteomiks analizinde, dispaz ile oluşturduğumuz PVR gruplarında ki UCH-L1, PLCG2, *Cytochrome b-c1 complex subunit 1*, *mitochondrial*, *PEBP-1*, *PDHE1-B*, *Gbeta5*, *IDH3*, *Malate dehydrogenase, cytoplasmic*, *CRMP2* varlıkları ve değişiklikleri daha önceki PVR çalışmalarında gösterilmemiştir. Bu yapısal proteinlerin seçici regülasyonunun, retinada oluşan glial yaraların oluşum mekanizmasına ışık tutacağı ve gelecekte geliştirilecek tedavilere yardımcı olacağı ön görülebilir.

## 6.ÖZETLER

### DENEYSEL PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ MODELİNDE İNTRAVİTREAL AFLİBERCEPT ENJEKSİYONUNUN İNFLAMASYON, PROLİFERASYON VE PROGRESYON MEKANİZMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN PROTEOMİK YOLLA İNCELENMESİ

**Amaç ve Kapsam:** Dispaz ile oluşturulan deneysel proliferatif vitreoretinopati modelinde intravitreal aflibercept enjeksiyonunun inflamasyon, proliferasyon ve progresyon mekanizmaları üzerine olan etkilerinin proteomik yolla incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** 35 adet Long Evans pigmente erkek rat; kontrol grubu, dispaz+salin ve dispaz+aflibercept olmak üzere üç gruba ayrıldı. İlk gün dispaz+salin grubuna 2µl dispaz ve 2µl salin, dispaz+aflibercept grubuna 2µl dispaz ve 2µl aflibercept uygulandı. Altı haftalık takip sonrasında evisserasyon işlemi gerçekleştirilerek retina ve vitreus örnekleri proteomiks analizi yapılması amacıyla proteomiks laboratuvarına verildi.

**Bulgular:** Proteomiks analizi sonucunda hem dispaz+salin hem de dispaz+aflibercept grubunda CK-6A, UCH-L1, PLCG2, Complex III subunit 1, NSE, Gnao1, hnRNPF, PEBP-1, Gβ5, PDHB, IDH3A, CRMP-2, LDH-B, Eno1, MDH, GS seviyelerinde belirgin düşüş, GFAP seviyesinde ise belirgin bir artış görülmüştür.

**Sonuç:** Proteomiks analizi sonucunda dispaz ile oluşturulan PVR modelinde, özellikle sinyal yollarının bozulduğu ve sinyal iletimi ilişkili proteinlerin seviyelerinde değişiklikler olduğu görülmüştür. Uygulanan aflibercept tedavisinin, protein seviyelerinde belirgin bir normale dönüşe sebep olmadığına dayanarak bu durumu tamamen düzeltmediği kanaatine varılmıştır. Ancak etki mekanizması bilinen afliberceptin doz miktarı değiştirilerek ileri çalışmalar yapılabilir. PVR'ın günümüzdeki tedavisi ve dispaz ile oluşturulan PVR modellerinin proteomiks analiz çalışmalarının literatürdeki sayıları kısıtlıdır. Hatta ratlarda ilk defa yapılan bu proteom analizinde, dispaz ile oluşturduğumuz PVR gruplarında ki UCH-L1,

PLCG2, Complex III subunit 1, PEBP-1, PDHB, G $\beta$ 5, IDH3A, MDH, CRMP2 varlıkları ve değişiklikleri daha önceki PVR çalışmalarında gösterilmemiştir. Bu yapısal proteinlerin seçici regülasyonunun, retinada oluşan glial yaraların oluşum mekanizmasına ışık tutacağı ve gelecekte geliştirilecek tedavilere yardımcı olacağı ön görülebilir.

Anahtar kelimeler: Proliferatif vitreoretinopati, aflibercept, dispaz, proteomiks



**MONITORING INFLAMMATORY, PROLIFERATIVE AND PROGRESSION  
EFFECTS OF INTRAVITREAL AFLIBERCEPT INJECTION  
AT THE PROTEOM LEVEL  
IN A RAT PROLIFERATIVE VITREORETINOPATHY MODEL**

**Purpose and Scope:** The aim of this study is monitoring inflammatory, proliferative and progression effects of intravitreal aflibercept injection in a dispase induced rat proliferative vitreoretinopathy model by proteomic analysis.

**Material and Methods:** A total of 35 male Long Evans pigmented rats were divided into three groups as control, dispase + saline and dispase + aflibercept. Dispase + saline group received 2 $\mu$ l dispase and 2 $\mu$ l salin, dispase + aflibercept group received 2 $\mu$ l dispase and 2 $\mu$ l aflibercept as treatment in the first day of experiment. At the end of the 6th week all survived rat's retina and vitreous specimens collected by evisceration and given to the proteomics analysis laboratory.

**Findings:** Proteomics analysis revealed that both dispase + saline and dispase + aflibercept group have significantly increased levels of CK-6A, UCH-L1, PLCG2, Complex III subunit 1, NSE, Gnao1, hnRNPF, PEBP-1, G $\beta$ 5, PDHB, IDH3A, CRMP-2, LDH-B, Eno1, MDH, GS and significantly decreased levels of GFAP.

**Conclusion:** Results of proteomic analysis showed impairment of signal pathways and changed levels of signal transmission proteins in dispase induced proliferative vitreoretinopathy rat model. Depending on insignificant improvement of protein levels in intravitreal dispase + aflibercept group, complete cure by aflibercept treatment is thought to be questionable. However, further work can be done by changing the therapeutic dose of aflibercept previously known to be effective in PVR. There is limited literature on proteomic analysis up-to-date treatment of PVR and dispase induced PVR models. This is known to be the first study on proteomic analysis of dispase induced proliferative vitreoretinopathy rat model, furthermore there is no available study indicating the

presence and changes of UCH-L1, PLCG2, Complex III subunit 1, PEBP-1, PDHB, G $\beta$ 5, IDH3A, MDH levels in proliferative vitreoretinopathy. The selective regulation of these structural proteins can enlighten the mechanism of glial wound formation in retina and guide future treatment modalities.

**Key words:** Proliferative vitreoretinopathy, aflibercept, dispass, proteomic



## 7. KAYNAKÇA

1. Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Survey of ophthalmology*. Jul-Aug 1998;43(1):3-18.
2. Wiedemann P, Yandiev Y, Hui Y-N. *Ryan's Retina*. 3rd ed: Elsevier; 2018.
3. Durukan AH. Why Proliferative Vitreoretinopathy Occurs. *Retina Vitreus*. 2013;21(3):155-159.
4. Constable IJ, Nagpal M. *Ryan's Retina*. 3rd ed: Elsevier; 2018.
5. Charteris DG, Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK. Proliferative vitreoretinopathy-developments in adjunctive treatment and retinal pathology. *Eye*. Jul 2002;16(4):369-374.
6. Garweg JG, Tappeiner C, Halberstadt M. Pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment. *Survey of ophthalmology*. Jul-Aug 2013;58(4):321-329.
7. Pennock S, Haddock LJ, Elliott D, Mukai S, Kazlauskas A. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? *Progress in retinal and eye research*. May 2014;40:16-34.
8. Pennock S, Kim D, Mukai S, et al. Ranibizumab is a potential prophylaxis for proliferative vitreoretinopathy, a nonangiogenic blinding disease. *The American journal of pathology*. May 2013;182(5):1659-1670.
9. Snell RS, Lemp MA. *Clinical Anatomy of the Eye*. 2nd ed: Blackwell Science Ltd.; 2013.
10. Tripathi R, Wond M. *Basic and Clinical Science Course Section 2: Fundamentals and Principles of Ophthalmology* 2014.
11. Özdemir H, Arf S, Karaçorlu M. Maküla Hastalıklarında Optik Koherens Tomografi. 2015:3-21.
12. Aydın P, Akova Y. *Temel Göz Hastalıkları*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001.
13. Le Goff MM, Bishop PN. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye*. Oct 2008;22(10):1214-1222.
14. Kirchhof B, Sorgente N. Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Modulation of retinal pigment epithelial cell functions by vitreous and macrophages. *Dev Ophthalmol*. 1989;16:1-53.
15. Weller M, Wiedemann P, Heimann K. Proliferative vitreoretinopathy--is it anything more than wound healing at the wrong place? *Int Ophthalmol*. Mar 1990;14(2):105-117.
16. Pastor JC, de la Rua ER, Martin F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Progress in retinal and eye research*. Jan 2002;21(1):127-144.
17. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. Sep 2 1999;341(10):738-746.
18. Wilkins RB, Kulwin DR, Wendell L. Hughes Lecture. Wound healing. *Ophthalmology*. Apr 1979;86(4):507-510.
19. Mietz H, Heimann K. Onset and recurrence of proliferative vitreoretinopathy in various vitreoretinal disease. *Br J Ophthalmol*. Oct 1995;79(10):874-877.
20. Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Progress in retinal and eye research*. Jan 1998;17(1):77-98.
21. Machemer R, Laqua H. Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol*. Jul 1975;80(1):1-23.
22. Ryan SJ. The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in its management. *Am J Ophthalmol*. Jul 15 1985;100(1):188-193.
23. E. B, G G. Proliferatif Vitreoretinopati Tedavisinde Yeni Deneysel Ajanlar. *Retina Vitreus*. 2004;12:9.
24. Hardwick C, Morris R, Witherspoon D, et al. Pathologic human vitreous promotes contraction by fibroblasts. Implications for proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol*. Dec

1995;113(12):1545-1553.

25. Mamballikalathil I, Mann C, Guidry C. Tractional force generation by porcine Muller cells: paracrine stimulation by retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Feb 2000;41(2):529-536.
26. Kon CH, Occleston NL, Charteris D, Daniels J, Aylward GW, Khaw PT. A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul 1998;39(8):1524-1529.
27. Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Survey of ophthalmology.* Mar-Apr 1992;36(5):373-384.
28. Jones SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene.* Nov 20 2000;19(49):5558-5567.
29. Campochiaro PA. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol.* Feb 1997;115(2):237-241.
30. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, Di Lauro S, Gonzalez-Buendia L, Delgado-Tirado S. Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Progress in retinal and eye research.* Mar 2016;51:125-155.
31. Bastiaans J, van Meurs JC, Mulder VC, et al. The role of thrombin in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul 11 2014;55(7):4659-4666.
32. Bastiaans J, van Meurs JC, van Holten-Neelen C, et al. Thrombin induces epithelial-mesenchymal transition and collagen production by retinal pigment epithelial cells via autocrine PDGF-receptor signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Dec 19 2013;54(13):8306-8314.
33. Lei H, Hovland P, Velez G, et al. A potential role for PDGF-C in experimental and clinical proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* May 2007;48(5):2335-2342.
34. Wang X, Fan J, Zhang M, Sun Z, Xu G. Gene expression changes under cyclic mechanical stretching in rat retinal glial (Muller) cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e63467.
35. Bringmann A, Wiedemann P. Involvement of Muller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Jul 2009;247(7):865-883.
36. Geller SF, Lewis GP, Fisher SK. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* May 2001;42(6):1363-1369.
37. Bringmann A, Francke M, Pannicke T, et al. Human Muller glial cells: altered potassium channel activity in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Dec 1999;40(13):3316-3323.
38. Fisher SK, Lewis GP. Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Res.* Apr 2003;43(8):887-897.
39. Francke M, Faude F, Pannicke T, et al. Glial cell-mediated spread of retinal degeneration during detachment: a hypothesis based upon studies in rabbits. *Vision Res.* Aug 2005;45(17):2256-2267.
40. Lu YB, Franze K, Seifert G, et al. Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 21 2006;103(47):17759-17764.
41. de Oliveira Dias JR, de Andrade GC, Novais EA, Farah ME, Rodrigues EB. Fusion proteins for treatment of retinal diseases: aflibercept, ziv-aflibercept, and conbercept. *Int J Retina Vitreous.* 2016;2:3.
42. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* Feb 1997;18(1):4-25.
43. Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet.* Dec 2009;88(4):495-515.
44. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* Aug 2004;15(4):197-204.

45. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS J.* Nov 2005;272(22):5723-5741.
46. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* Jun 2002;133(6):851-852.
47. Cui JZ, Chiu A, Maberley D, Ma P, Samad A, Matsubara JA. Stage specificity of novel growth factor expression during development of proliferative vitreoretinopathy. *Eye.* Feb 2007;21(2):200-208.
48. Chan CM, Chang HH, Wang VC, Huang CL, Hung CF. Inhibitory effects of resveratrol on PDGF-BB-induced retinal pigment epithelial cell migration via PDGFRbeta, PI3K/Akt and MAPK pathways. *PLoS One.* 2013;8(2):e56819.
49. Huang JS, Wang YH, Ling TY, Chuang SS, Johnson FE, Huang SS. Synthetic TGF-beta antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. *FASEB J.* Aug 2002;16(10):1269-1270.
50. Anderson DH, Guerin CJ, Hageman GS, Pfeffer BA, Flanders KC. Distribution of transforming growth factor-beta isoforms in the mammalian retina. *J Neurosci Res.* Sep 1 1995;42(1):63-79.
51. Hoerster R, Muether PS, Vierkotten S, Hermann MM, Kirchhof B, Fauser S. Upregulation of TGF-ss1 in experimental proliferative vitreoretinopathy is accompanied by epithelial to mesenchymal transition. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Jan 2014;252(1):11-16.
52. Saika S, Yamanaka O, Okada Y, et al. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci (Schol Ed).* Jun 1 2009;1:376-390.
53. Kita T, Hata Y, Kano K, et al. Transforming growth factor-beta2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases: possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes.* Jan 2007;56(1):231-238.
54. Winkler J, Hoerauf H. TGF-ss and RPE-derived cells in taut subretinal strands from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Eur J Ophthalmol.* Jul-Aug 2011;21(4):422-426.
55. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res.* Sep 1997;65(3):391-396.
56. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in retinal and eye research.* Jan 2000;19(1):113-129.
57. Abu el-Asrar AM, Van Damme J, Put W, et al. Monocyte chemotactic protein-1 in proliferative vitreoretinal disorders. *Am J Ophthalmol.* May 1997;123(5):599-606.
58. Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis.* Aug 7 2006;12:867-878.
59. Han QH, Hui YN, Du HJ, Zhang WJ, Ma JX, Wang SY. Migration of retinal pigment epithelial cells in vitro modulated by monocyte chemotactic protein-1: enhancement and inhibition. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Jul 2001;239(7):531-538.
60. Briggs MC, Grierson I, Hiscott P, Hunt JA. Active scatter factor (HGF/SF) in proliferative vitreoretinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Sep 2000;41(10):3085-3094.
61. Lashkari K, Rahimi N, Kazlauskas A. Hepatocyte growth factor receptor in human RPE cells: implications in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jan 1999;40(1):149-156.
62. Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Progress in retinal and eye research.* Nov 2000;19(6):779-802.
63. Hinton DR, He S, Jin ML, Barron E, Ryan SJ. Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. *Eye.* Jul 2002;16(4):422-428.
64. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth



factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* Mar 10 2003;284(1):31-53.

65. Yan F, Hui YN, Li YJ, Guo CM, Meng H. Epidermal growth factor receptor in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmologica.* 2007;221(4):244-250.

66. Chen Z, Chen CZ, Gong WR, Li JP, Xing YQ. Integrin- $\alpha$ 5 mediates epidermal growth factor-induced retinal pigment epithelial cell proliferation and migration. *Pathobiology.* 2010;77(2):88-95.

67. Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C, Kane R. The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Sep 2007;48(9):4291-4299.

68. Baudouin C, Fredj-Reygrobelle D, Brignole F, Negre F, Lapalus P, Gastaud P. Growth factors in vitreous and subretinal fluid cells from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res.* 1993;25(1):52-59.

69. Asaria RH, Kon CH, Bunce C, et al. Silicone oil concentrates fibrogenic growth factors in the retro-oil fluid. *Br J Ophthalmol.* Nov 2004;88(11):1439-1442.

70. Hueber A, Wiedemann P, Esser P, Heimann K. Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR). *Int Ophthalmol.* 1996;20(6):345-350.

71. Liang X, Li C, Gao R, et al. Quantitative study of basic fibroblast growth factor in vitreous with proliferative vitreoretinopathy. *Yan Ke Xue Bao.* Mar 2000;16(1):7-10.

72. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem.* Nov 22 1996;271(47):29822-29829.

73. Ikuno Y, Kazlauskas A. An in vivo gene therapy approach for experimental proliferative vitreoretinopathy using the truncated platelet-derived growth factor alpha receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul 2002;43(7):2406-2411.

74. Clemmons DR. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov.* Oct 2007;6(10):821-833.

75. Guidry C. Tractional force generation by porcine Muller cells. Development and differential stimulation by growth factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Feb 1997;38(2):456-468.

76. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med.* Dec 1999;5(12):1390-1395.

77. Abu El-Asrar AM, Imtiaz Nawaz M, Kangave D, Siddiquei MM, Geboes K. Osteopontin and other regulators of angiogenesis and fibrogenesis in the vitreous from patients with proliferative vitreoretinal disorders. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:493043.

78. Kita T, Hata Y, Miura M, Kawahara S, Nakao S, Ishibashi T. Functional characteristics of connective tissue growth factor on vitreoretinal cells. *Diabetes.* May 2007;56(5):1421-1428.

79. Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, et al. Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology.* Jun 1989;96(6):801-810.

80. Wolfensberger TJ. Jules Gonin. Pioneer of retinal detachment surgery. *Indian J Ophthalmol.* Dec 2003;51(4):303-308.

81. Machemer R, Sugita G, Tano Y. Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1979;77:171-180.

82. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology.* Feb 1983;90(2):121-125.

83. Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, Irvine AR, Lean JS, Michels RM. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* Aug 15 1991;112(2):159-165.

84. Ruhmann AG, Berliner DL. Effect of Steroids on Growth of Mouse Fibroblasts in Vitro.

*Endocrinology*. May 1965;76:916-927.

**85.** Guo CM, Wang YS, Hu D, et al. Modulation of migration and Ca<sup>2+</sup> signaling in retinal pigment epithelium cells by recombinant human CTGF. *Curr Eye Res*. Oct 2009;34(10):852-862.

**86.** Chandler DB, Rozakis G, de Juan E, Jr., Machemer R. The effect of triamcinolone acetonide on a refined experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*. Jun 15 1985;99(6):686-690.

**87.** Jonas JB, Hayler JK, Panda-Jonas S. Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol*. Sep 2000;84(9):1064-1067.

**88.** Sadaka A, Giuliari GP. Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1325-1333.

**89.** Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Cheng L, et al. The effect of prinomastat (AG3340), a potent inhibitor of matrix metalloproteinases, on a subacute model of proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res*. Jun 2000;20(6):447-453.

**90.** Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Keefe K, et al. The effect of prinomastat (AG3340), a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, on posttraumatic proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res*. Jan-Feb 2001;33(1):20-23.

**91.** Schubert CA, Kimura H, Spee C, et al. Retrovirus-mediated transfer of the suicide gene into retinal pigment epithelial cells in vitro. *Curr Eye Res*. Jul 1997;16(7):656-662.

**92.** Baudouin C, Ettaiche M, Imbert F, Droy-Lefaix MT, Gastaud P, Lapalus P. Inhibition of preretinal proliferation by free radical scavengers in an experimental model of tractional retinal detachment. *Exp Eye Res*. Dec 1994;59(6):697-706.

**93.** Baudouin C, Imbert F, Ettaiche M, Gastaud P. Evaluation of antiproliferative effects of the somatostatin analogue somatuline in a rabbit model of traction retinal detachment. *Fundam Clin Pharmacol*. 1995;9(4):357-365.

**94.** Capeans C, Pineiro A, Pardo M, et al. Role of inhibitors of isoprenylation in proliferation, phenotype and apoptosis of human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Mar 2001;239(3):188-198.

**95.** Handa JT, Murad S, Jaffe GJ. Inhibition of cultured human RPE cell proliferation and lysyl hydroxylase activity by hydroxy derivatives of minoxidil. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Feb 1994;35(2):463-469.

**96.** Hoffman S, Gopalakrishna R, Gundimeda U, et al. Verapamil inhibits proliferation, migration and protein kinase C activity in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. Jul 1998;67(1):45-52.

**97.** Kahler CM, Kieselbach GF, Reinisch N, Troger J, Gottinger W, Wiedermann CJ. Fibroblast growth-promoting activity in proliferative vitreoretinopathy: antagonism by acetylsalicylic acid. *Eur J Pharmacol*. Sep 12 1994;262(3):261-269.

**98.** Spraul CW, Kaven CK, Kampmeier JK, Lang GK, Lang GE. Effect of thalidomide, octreotide, and prednisolone on the migration and proliferation of RPE cells in vitro. *Curr Eye Res*. Dec 1999;19(6):483-490.

**99.** Imai K, Loewenstein A, Koroma B, Grebe R, de Juan E, Jr. Herbinmycin A in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy: toxicity and efficacy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. May 2000;238(5):440-447.

**100.** Larrosa JM, Veloso AA, Jr., Leong FL, Refojo MF. Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR. *Curr Eye Res*. Oct 1997;16(10):1030-1035.

**101.** Tahara YR, Sakamoto TR, Oshima YR, et al. The antidepressant hypericin inhibits progression of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res*. Oct 1999;19(4):323-329.

**102.** Yoon HS, Rho SH, Jeong JH, Yoon S, Yoo KS, Yoo YH. Genistein produces reduction in growth and induces apoptosis of rat RPE-J cells. *Curr Eye Res*. Mar 2000;20(3):215-224.

- 103.** de Souza OF, Sakamoto T, Kimura H, et al. Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits by suramin. *Ophthalmologica*. 1995;209(4):212-216.
- 104.** Ito S, Sakamoto T, Tahara Y, et al. The effect of tranilast on experimental proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Aug 1999;237(8):691-696.
- 105.** Lei H, Velez G, Cui J, et al. N-acetylcysteine suppresses retinal detachment in an experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *The American journal of pathology*. Jul 2010;177(1):132-140.
- 106.** Machado RA, Casella AM, Malaguido MR, Oguido AP. [Experimental study of vitreoretinal proliferation inhibition by the use of hypericin]. *Arq Bras Oftalmol*. Sep-Oct 2009;72(5):650-654.
- 107.** Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 20 2002;99(17):11393-11398.
- 108.** Rudge JS, Holash J, Hylton D, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 20 2007;104(47):18363-18370.
- 109.** Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. Jun 2012;15(2):171-185.
- 110.** Stewart MW, Rosenfeld PJ. Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *Br J Ophthalmol*. May 2008;92(5):667-668.
- 111.** Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. Oct 5 2006;355(14):1419-1431.
- 112.** Ogura Y, Roider J, Korobelnik JF, et al. Intravitreal aflibercept for macular edema secondary to central retinal vein occlusion: 18-month results of the phase 3 GALILEO study. *Am J Ophthalmol*. Nov 2014;158(5):1032-1038.
- 113.** Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U, et al. Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. Nov 2014;121(11):2247-2254.
- 114.** EYLEA (aflibercept) injection: US prescribing information. 2012; <http://www.regeneron.com/Eylea/eylea-fpi.pdf>.
- 115.** Frampton JE. Aflibercept for intravitreal injection: in neovascular age-related macular degeneration. *Drugs Aging*. Oct 2012;29(10):839-846.
- 116.** Agrawal RN, He S, Spee C, Cui JZ, Ryan SJ, Hinton DR. In vivo models of proliferative vitreoretinopathy. *Nat Protoc*. 2007;2(1):67-77.
- 117.** Frenzel EM, Neely KA, Walsh AW, Cameron JD, Gregerson DS. A new model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Oct 1998;39(11):2157-2164.
- 118.** Matsumura T, Yamanaka T, Hashizume S, Irie Y, Nitta K. Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease. *Jpn J Exp Med*. Oct 1975;45(5):377-382.
- 119.** Tikhonovich MV, Erdiakov AK, Gavrilova SA. Nonsteroid anti-inflammatory therapy suppresses the development of proliferative vitreoretinopathy more effectively than a steroid one. *Int Ophthalmol*. Jun 21 2017.
- 120.** Kralinger MT, Kieselbach GF, Voigt M, et al. Experimental model for proliferative vitreoretinopathy by intravitreal dispase: limited by zonulolysis and cataract. *Ophthalmologica*. 2006;220(4):211-216.
- 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):243-252.
- 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. Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol*. 1972;26:3-27.
127. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*. Mar 2001;19(3):242-247.
128. Ophir A, Blumenkranz MS, Claflin AJ. Experimental intraocular proliferation and neovascularization. *Am J Ophthalmol*. Oct 1982;94(4):450-457.
129. D I, W D, M H. Pars plana lensectomy, vitrectomy and transvitreal diathermy in the rabbit eye: a model of PVR *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:856-857.
130. Hui YN, Liang HC, Cai YS, Kirchhof B, Heimann K. Corticosteroids and daunomycin in the prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy induced by macrophages. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Feb 1993;31(2):109-114.
131. Stern WH, Lewis GP, Erickson PA, et al. Fluorouracil therapy for proliferative vitreoretinopathy after vitrectomy. *Am J Ophthalmol*. Jul 1983;96(1):33-42.
132. van Bockxmeer FM, Martin CE, Thompson DE, Constable IJ. Taxol for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1985;26(8):1140-1147.
133. Cleary PE, Ryan SJ. Experimental posterior penetrating eye injury in the rabbit. I. Method of production and natural history. *Br J Ophthalmol*. May 1979;63(5):306-311.
134. Nakagawa M, Refojo MF, Marin JF, Doi M, Tolentino FI. Retinoic acid in silicone and silicone-fluorosilicone copolymer oils in a rabbit model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov 1995;36(12):2388-2395.
135. Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispace, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol*. Aug 1989;93(2):287-290.
136. UniProt: the universal protein knowledgebase: The UniProt Consortium.
137. Walshe R, Esser P, Wiedemann P, Heimann K. Proliferative retinal diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction. *Br J Ophthalmol*. Sep 1992;76(9):550-552.
138. Machemer R. Proliferative vitreoretinopathy (PVR): a personal account of its pathogenesis and treatment. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec 1988;29(12):1771-1783.
139. Hiscott PS, Grierson I, McLeod D. Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol*. Oct 1984;68(10):708-715.
140. Ando A, Ueda M, Uyama M, Masu Y, Ito S. Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor. *Br J Ophthalmol*. Nov 2000;84(11):1306-1311.
141. Yu J, Peng R, Chen H, Cui C, Ba J. Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec 13 2012;53(13):8146-8153.
142. Esteve-Rudd J, Campello L, Herrero MT, Cuenca N, Martin-Nieto J. Expression in the mammalian retina of parkin and UCH-L1, two components of the ubiquitin-proteasome system. *Brain Res*. Sep 17 2010;1352:70-82.
143. Bilguvar K, Tyagi NK, Ozkara C, et al. Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 26 2013;110(9):3489-3494.
144. Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT, Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. Oct 18 2002;111(2):209-218.
145. Gresset A, Sondak J, Harden TK. The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell*

*Biochem.* 2012;58:61-94.

**146.** Cremasco V, Benasciutti E, Cella M, Kisseleva M, Croke M, Faccio R. Phospholipase C gamma 2 is critical for development of a murine model of inflammatory arthritis by affecting actin dynamics in dendritic cells. *PLoS One.* Jan 27 2010;5(1):e8909.

**147.** Everett KL, Bunney TD, Yoon Y, et al. Characterization of phospholipase C gamma enzymes with gain-of-function mutations. *J Biol Chem.* Aug 21 2009;284(34):23083-23093.

**148.** Ombrello MJ, Remmers EF, Sun G, et al. Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions. *N Engl J Med.* Jan 26 2012;366(4):330-338.

**149.** Kowluru RA, Mohammad G, Santos JM, Tewari S, Zhong Q. Interleukin-1beta and mitochondria damage, and the development of diabetic retinopathy. *J Ocul Biol Dis Infor.* Jun 2011;4(1-2):3-9.

**150.** Mishra M, Lillvis J, Seyoum B, Kowluru RA. Peripheral Blood Mitochondrial DNA Damage as a Potential Noninvasive Biomarker of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Aug 1 2016;57(10):4035-4044.

**151.** Chevez P, Font RL. Practical applications of some antibodies labelling the human retina. *Histol Histopathol.* Jul 1993;8(3):437-442.

**152.** Ducournau Y, Boscher C, Adelman RA, et al. Proliferation of the ciliary epithelium with retinal neuronal and photoreceptor cell differentiation in human eyes with retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Mar 2012;250(3):409-423.

**153.** Wang H, Feng L, Hu JW, Xie CL, Wang F. Characterisation of the vitreous proteome in proliferative diabetic retinopathy. *Proteome Sci.* Mar 5 2012;10(1):15.

**154.** Sandhu HS, Butt AN, Powrie J, Swaminathan R. Measurement of circulating neuron-specific enolase mRNA in diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* Aug 2008;1137:258-263.

**155.** Dunker S, Sadun AA, Sebag J. Neuron specific enolase in retinal detachment. *Curr Eye Res.* Nov 2001;23(5):382-385.

**156.** Andreopoulos S, Li PP, Warsh JJ. Developmental expression of G alpha o and G alpha s isoforms in PC12 cells: relationship to neurite outgrowth. *Brain Res Dev Brain Res.* Aug 28 1995;88(1):30-36.

**157.** Nakamura K, Kodera H, Akita T, et al. De Novo mutations in GNAO1, encoding a Galphao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet.* Sep 5 2013;93(3):496-505.

**158.** Markus B, Pato Z, Sarang Z, et al. The proteomic profile of a mouse model of proliferative vitreoretinopathy. *FEBS Open Bio.* Aug 2017;7(8):1166-1177.

**159.** Goh ET, Pardo OE, Michael N, et al. Involvement of heterogeneous ribonucleoprotein F in the regulation of cell proliferation via the mammalian target of rapamycin/S6 kinase 2 pathway. *J Biol Chem.* May 28 2010;285(22):17065-17076.

**160.** Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation. *Nat Rev Genet.* May 2014;15(5):293-306.

**161.** Smemo S, Tena JJ, Kim KH, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature.* Mar 20 2014;507(7492):371-375.

**162.** Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit. *J Biol Chem.* Apr 10 2015;290(15):9690-9700.

**163.** Brown GK, Otero LJ, LeGris M, Brown RM. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet.* Nov 1994;31(11):875-879.

**164.** Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, et al. Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) alpha subunit gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum Mutat.* 2000;15(3):209-219.

**165.** Maurer CM, Schonthaler HB, Mueller KP, Neuhaus SC. Distinct retinal deficits in a zebrafish

- pyruvate dehydrogenase-deficient mutant. *J Neurosci*. Sep 8 2010;30(36):11962-11972.
166. Tian M, Zallocchi M, Wang W, et al. Light-induced translocation of RGS9-1 and Gbeta5L in mouse rod photoreceptors. *PLoS One*. 2013;8(3):e58832.
167. Ou J, Vijayarathy C, Ziccardi L, et al. Synaptic pathology and therapeutic repair in adult retinoschisis mouse by AAV-RS1 transfer. *J Clin Invest*. Jul 1 2015;125(7):2891-2903.
168. Neuille M, Morgans CW, Cao Y, et al. LRIT3 is essential to localize TRPM1 to the dendritic tips of depolarizing bipolar cells and may play a role in cone synapse formation. *Eur J Neurosci*. Aug 2015;42(3):1966-1975.
169. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Res*. Mar 10 2015;1600:17-31.
170. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*. Jul 2006;25(4):397-424.
171. Junemann AG, Rejdak R, Huchzermeyer C, et al. Elevated vitreous body glial fibrillary acidic protein in retinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Dec 2015;253(12):2181-2186.
172. Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol*. 2003;230:263-290.
173. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*. Jul 1994;4(3):229-237.
174. Erickson PA, Fisher SK, Guerin CJ, Anderson DH, Kaska DD. Glial fibrillary acidic protein increases in Muller cells after retinal detachment. *Exp Eye Res*. Jan 1987;44(1):37-48.
175. Okada M, Matsumura M, Yamakawa R, Shirakawa H, Yoshimura N, Ogino N. [Immunoelectron microscopic study on glial fibrillary acidic protein (GFAP)-containing cells in preretinal proliferative tissue]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. Jun 1987;91(6):657-664.
176. Okada M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y. Muller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1990;228(5):467-474.
177. Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1990;31(8):1474-1482.
178. Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov 1995;36(12):2404-2416.
179. Geller SF, Lewis GP, Anderson DH, Fisher SK. Use of the MIB-1 antibody for detecting proliferating cells in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 1995;36(3):737-744.
180. Nork TM, Wallow IH, Sramek SJ, Stevens TS, De Venecia G. Immunocytochemical study of an eye with proliferative vitreoretinopathy and retinal tacks. *Retina*. 1990;10(1):78-85.
181. Byer NE. Natural history of posterior vitreous detachment with early management as the premier line of defense against retinal detachment. *Ophthalmology*. Sep 1994;101(9):1503-1513; discussion 1513-1504.
182. Los LI, van der Worp RJ, van Luyn MJ, Hooymans JM. Age-related liquefaction of the human vitreous body: LM and TEM evaluation of the role of proteoglycans and collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul 2003;44(7):2828-2833.
183. Charteris DG, Downie J, Aylward GW, Sethi C, Luthert P. Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jan 2007;245(1):93-100.
184. Erickson PA, Feinstein SC, Lewis GP, Fisher SK. Glial fibrillary acidic protein and its mRNA: ultrastructural detection and determination of changes after CNS injury. *J Struct Biol*. Mar-Apr 1992;108(2):148-161.
185. Erickson PA, Fisher SK, Anderson DH, Stern WH, Borgula GA. Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul 1983;24(7):927-942.

186. Fisher SK, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH. Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. May 1991;32(6):1739-1748.
187. Lewis GP, Guerin CJ, Anderson DH, Matsumoto B, Fisher SK. Rapid changes in the expression of glial cell proteins caused by experimental retinal detachment. *Am J Ophthalmol*. Sep 15 1994;118(3):368-376.
188. Lewis GP, Sethi CS, Carter KM, Charteris DG, Fisher SK. Microglial cell activation following retinal detachment: a comparison between species. *Mol Vis*. Jul 13 2005;11:491-500.
189. Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res*. Jul 1989;49(1):93-111.
190. Erickson PA, Fisher SK. Tritiated uridine labeling of the retina: variations among retinal quadrants, and between right and left eyes. *Exp Eye Res*. Aug 1990;51(2):145-152.
191. Erickson PA, Guerin CJ, Fisher SK. Tritiated uridine labeling of the retina: changes after retinal detachment. *Exp Eye Res*. Aug 1990;51(2):153-158.
192. Anderson DH, Guerin CJ, Erickson PA, Stern WH, Fisher SK. Morphological recovery in the reattached retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Feb 1986;27(2):168-183.
193. Mityr D, Charteris DG, Fleck BW, Campbell H, Singh J. The epidemiology of rhegmatogenous retinal detachment: geographical variation and clinical associations. *Br J Ophthalmol*. Jun 2010;94(6):678-684.
194. Ross WH, Stockl FA. Visual recovery after retinal detachment. *Curr Opin Ophthalmol*. Jun 2000;11(3):191-194.
195. Amarnani D, Machuca-Parra AI, Wong LL, et al. Effect of Methotrexate on an In Vitro Patient-Derived Model of Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1 2017;58(10):3940-3949.
196. Kuo HK, Chen YH, Wu PC, Kuo YH. The Effects of Ozurdex(R) (Dexamethasone Intravitreal Implant) on Experimental Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmologica*. 2015;233(3-4):198-203.
197. Feist RM, Jr., King JL, Morris R, Witherspoon CD, Guidry C. Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Feb 2014;52(2):347-357.
198. Szczesniak AM, Porter RF, Toguri JT, et al. Cannabinoid 2 receptor is a novel anti-inflammatory target in experimental proliferative vitreoretinopathy. *Neuropharmacology*. Feb 2017;113(Pt B):627-638.
199. Wang Y, Wang XL, Xie GL, Li HY, Wang YL. Collapsin Response Mediator Protein-2-induced Retinal Ischemic Injury in a Novel Mice Model of Ocular Ischemia Syndrome. *Chin Med J (Engl)*. Jun 5 2017;130(11):1342-1351.
200. Zhang JN, Michel U, Lenz C, et al. Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration. *Sci Rep*. Nov 15 2016;6:37050.
201. Smith WC, Bolch S, Dugger DR, et al. Interaction of arrestin with enolase1 in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 2011;52(3):1832-1840.
202. Ren G, Adamus G. Cellular targets of anti-alpha-enolase autoantibodies of patients with autoimmune retinopathy. *J Autoimmun*. Sep 2004;23(2):161-167.
203. Magrys A, Anekonda T, Ren G, Adamus G. The role of anti-alpha-enolase autoantibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. *J Clin Immunol*. Mar 2007;27(2):181-192.
204. Adamus G. Impact of Autoantibodies against Glycolytic Enzymes on Pathogenicity of Autoimmune Retinopathy and Other Autoimmune Disorders. *Front Immunol*. 2017;8:505.
205. Adamus G, Amundson D, Seigel GM, Machnicki M. Anti-enolase-alpha autoantibodies in cancer-associated retinopathy: epitope mapping and cytotoxicity on retinal cells. *J Autoimmun*. Dec 1998;11(6):671-677.
206. Kumagai A, Nakayashiki N, Aoki Y. Analysis of age-related carbonylation of human vitreous humor proteins as a tool for forensic diagnosis. *Leg Med (Tokyo)*. Jul 2007;9(4):175-180.

**207.** Zheng F, Jang WC, Fung FK, Lo AC, Wong IY. Up-Regulation of ENO1 by HIF-1alpha in Retinal Pigment Epithelial Cells after Hypoxic Challenge Is Not Involved in the Regulation of VEGF Secretion. *PLoS One*. 2016;11(2):e0147961.

**208.** Ross CD, Godfrey DA. Distributions of aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase activities in rat retinal layers. *J Histochem Cytochem*. Jul 1985;33(7):624-630.

**209.** Saraswathy S, Rao NA. Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec 2009;50(12):5559-5566.

**210.** Aretz S, Krohne TU, Kammerer K, et al. In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome. *Proteome Sci*. May 20 2013;11(1):22.

**211.** Harada T, Harada C, Kohsaka S, et al. Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci*. Nov 1 2002;22(21):9228-9236.

**212.** Kase S, Saito W, Yokoi M, et al. Expression of glutamine synthetase and cell proliferation in human idiopathic epiretinal membrane. *Br J Ophthalmol*. Jan 2006;90(1):96-98.