



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RETİNA PİGMENT EPİTELİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE
ANTİ-VEGF İLAÇLARIN ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mustafa ŞAHİNER

KAYSERİ-2016



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

RETİNA PİGMENT EPİTELİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE
ANTI-VEGF İLAÇLARIN ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Hazırlayan
Dr. Mustafa ŞAHİNER

Danışman
Prof. Dr. Ayşe ÖNER

Bu tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TTU-2015-5996 proje kodu ile desteklenmiştir.

KAYSERİ-2016

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana desteğini esirgemeyen, cerrahi olarak yetişmemdeki büyük katkılarından, içten ve sevgiyle gösterdiği yakınlıktan dolayı, değerli tez hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe ÖZTÜRK ÖNER'e,

Asistanlık sürem boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, eğitimime ve yetişmeme olan katkılarından dolayı çok kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Ertuğrul MİRZA, Prof. Dr. Hakkı DOĞAN, Prof. Dr. Kuddusi ERKILIÇ, Prof. Dr. Sarper KARAKÜÇÜK, Prof. Dr. Cem EVEREKLİOĞLU, Doç. Dr. Koray GÜMÜŞ, Doç. Dr. Hatice ARDA, Yrd. Doç. Dr. Çağatay KARACA ve Uzm. Dr. Metin ÜNLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması sürecinde hücre kültürü çalışmasının planlanması ve verilerin analizi konusunda özveriyle çalışan Yard. Doç. Dr. Zeynep Burçin Gönen ve Uzm. Biyolog Dilek BAHAR'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Tezimin istatistiksel analizinde desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Reşat AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma; servis, poliklinik ve ameliyathanede beraber çalıştığım tüm hemşire, teknisyen, sekreter ve yardımcı personele destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tanıdığım günden beri ihtiyaç duyduğum her anımda yanımda olan ve bana desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım eşim, hayat arkadaşım Büşra'ya en içten sevgilerimi sunarım.

Dr. Mustafa ŞAHİNER

KAYSERİ – 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
RESİMLER VE ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar ve GRAFİKLER LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Retinanın Anatomi ve Histolojisi	4
2.1.1. Retinanın Katmanları	4
2.1.2. Retinanın Kan Dolaşımı.....	8
2.2.VEGF.....	10
2.2.1. VEGF’in Göz Üzerine Etkileri	11
2.3. Antianjiyojenik Ajanlar	12
2.3.1. Bevacizumab (Avastin).....	13
2.3.2. Ranibizumab	14
2.3.3. Aflibercept-VEGF Trap	15
2.3.4.Pegaptanib Na	16
2.4. Anti-VEGF Ajanların Kullanıldığı Göz Patolojileri	16
2.4.1.Koroidal neovaskülarizasyon.....	16
2.4.2. Diabetik Retinopati	17
2.4.3. Retinal Vasküler Tıkanıklıkları	17
2.4.4. Neovasküler Glokom	17
2.4.5. Prematür Retinopatisi (ROP).....	18
2.5. Anti-VEGF İlaçların Yan Etkileri	18
2.5.1. Kardiyovasküler Sistem.....	18

2.5.2. Pıhtılaşma-Kanama Riski	19
2.5.3. Nefrotoksisite.....	19
2.5.4. İmmün Sistem.....	20
2.5.5. İmmün Yanıt İndüksiyonu	20
2.5.6. Anti-Apopitozis	20
2.5.7. Oküler Yan Etki.....	21
2.5.8. Ön Kamara Reaksiyonu	21
2.5.9. Göz içi basınç yükselmesi:	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1.Hücrelerin Elde Edilmesi	22
3.2. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanışı.....	25
3.3. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları	25
3.4. Hücrelerin Pasajlanması	25
3.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması:	25
3.6. Hücrelerin Karakterizasyonu.....	25
3.7. İlaç Dozlarının Ayarlanması.....	26
3.8. Hücre Proliferasyon Analizi	26
3.9. Apoptozisin Değerlendirilmesi	27
3.10. Canlılığın Değerlendirilmesi	27
3.11. Senesensin Değerlendirilmesi	28
3.12. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Primer Kültür ve Pasajların Mikroskopik Görünümleri.....	29
4.2. Anti-VEGF İlaçların Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi.....	31
4.3. Hücrelerin Cytokeratin 18 ve ZO-1 boyaları ile karakterizasyonu:	32
4.4 Anti-VEGF ilaçların canlılık üzerine etkileri:	34
4.5. Anti-VEGF ilaçların apoptozis üzerine etkileri:	35
4.6 Anti-VEGF ilaçların proliferasyona etkisi:	37
4.7. Anti-VEGF ilaçların senesense etkileri:	38

5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	44
KAYNAKLAR	45
TEZ ONAY SAYFASI.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANCHOR	: Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD
DMEM	: Dulbecco's minimum essential medium
DMÖ	: Diabetik Maküler Ödem
DMSA	: Dimetilsülfoksit
DR	: Diabetik retinopati
ELM	: Eksternal limitan membran
FBS	: Fetal bovine serum
FDA	: Food and drug administration
FDT	: Fotodinamik tedavi
GAG	: Glukozaminoglikanlar
GİB	: Göz içi basıncı
HIF-1	: Hipoksinin indüklediği faktör
ILM	: İnternal limitan membran
IRBP	: İnterfotoresptör retinal bağlayıcı protein
KNV	: Koroidal neovaskülerizasyon
MARINA	: Minimal classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD
MTT	: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NVG	: Neovasküler glokom
OKT	: Optik kohorens tomografi
PBS	: Fosfat tamponlanmış serum

PDRP	: Proliferatif diabetik retinopati
PFA	: Paraformaldehit
PrONTO	: Prospective Optical coherence tomography imaging of patients with Neovascular AMD Treated with intraocular ranibizumab Study
PRP	: Panretinal photokoagulasyon
ROP	: Prematüre retinopatisi
RPE	: Retine pigment epiteli
RVT	: Retinal ven tıkanıklığı
SRVO	: Santral retinal ven oklüzyonu
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR-1	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 1
VEGFR-2	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 2
VISION	: VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization
VIEW	: VEGF Trap-Eye: Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD
YBMD	: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu

RESİMLER VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 3.1. Enüklasyon yöntemi ile elde edilen gözlerin ekstraoküler dokulardan temizlenmesi.	23
Resim 3.2. Limbusun 3 mm posteriorundan dairesel şekilde insizyon yapılarak kornea ve ön segment materyallerinin temizlenmesi.	24
Resim 3.3. Steoromikroskop altında mikropipet yardımıyla nöronal retina ve koroid arasından retina pigment epiteli hücrelerinin elde edilmesi.....	24
Resim 3.4. Apoptoz ve canlılık ölçümlerinin yapıldığı MuseCell Analyser cihazı	28
Resim 4.1. Primer RPE hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü.	29
Resim 4.2. Birinci pasaj sonrası RPE hücre kültürünün mikroskopik görünümü.....	30
Resim 4.3. İkinci pasaj sonrası RPE hücre kültürünün mikroskopik görünümü.....	30
Resim 4.4 Üçüncü pasaj sonrası RPE hücre kültürünün mikroskopik görünümü	31
Resim 4.5. İlaçların hücre morfolojisi üzerine olan etkilerinin mikroskopik görünümü	32
Resim 4.6. Hücrelerin ZO-1 boyası ile karakterizasyonu	32
Resim 4.7. Hücrelerin cytokeratin 18 boyası ile karakterizasyonu	33
Şekil 2.1. Retinanın histolojik kesiti	5

TABLÖLAR ve GRAFİKLER LİSTESİ

Tablo 4.1. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde canlılığa olan etkilerinin istatistiksel analizi.	35
Tablo 4.2. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde apoptozise olan etkilerinin istatistiksel analizi.	36
Tablo 4.3. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde proliferasyona üzerine olan etkilerinin istatistiksel analizi.	37
Tablo 4.4. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde senesense olan etkilerinin istatistiksel analizi.	39
Grafik 4.1. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki canlılığa olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.	34
Grafik 4.2. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki apoptozise olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.	36
Grafik 4.3. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.	37
Grafik 4.4. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki senesense olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.	38

RETİNA PİGMENT EPİTELİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE ANTI-VEGF İLAÇLARIN ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Retina pigment epiteli (RPE) hücre kültürüne Anti-VEGF ilaçların etkisini değerlendirmek.

Gereç ve Yöntem: Yeni Zelanda beyaz tavşanlarından enükleasyon yöntemi ile elde edilen gözlerden izole edilen retina pigment epitel hücrelerinden oluşturulan hücre kültürlerine aflibercept (0,5 mg/ml), bevacizumab (0,3125) ve ranibizumab (0,125 mg/ml) dozlarında uygulandı. 72 saat sonunda kontrol grubunda ve ilaç uygulaması yapılan kültürlerde canlılık, apoptozis, proliferasyon ve senesense olan etkileri değerlendirildi.

Bulgular: Aflibercept uygulanan kültürde hem kontrol grubuna göre hem de bevacizumab ve ranibizumab uygulanan gruba göre apoptoziste azalma ve canlılıkta artış olduğu görülmektedir ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Bevacizumab ve ranibizumab uygulanan grupta ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptoziste artış ve canlılıkta azalma olduğu görülmektedir ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Proliferasyon ve senesens üzerine etkileri değerlendirildiğinde anti-VEGF ilaç uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında herhangi bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç: Anti-VEGF ilaçların proliferasyon ve senesens üzerine herhangi bir etkisi gözlenmedi. Afliberceptin apoptozisi azaltarak muhtemelen buna sekonder canlılığı artırdığı, ranibizumab ve bevacizumabın ise tam tersine apoptozisi artırarak canlılığı azalttığı gözlenmiştir. Literatürde şimdiye kadar anti-VEGF ilaçların senesense olan etkilerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamız bu yönde hem yol gösterici olup hem de yeni çalışmalarla desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Anti-VEGF, Hücre kültürü, Retina pigment epiteli

THE EFFECT OF ANTI-VEGF DRUGS ON RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL CULTURE

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effects of anti-VEGF drugs on retinal pigment epithelium (RPE) cell culture.

Material and Methods: Aflibercept (0.5 mg/ml), bevacizumab (0,3125 mg/ml) and ranibizumab (0.125 mg/ml) were applied to the RPE cell cultures which were isolated from the enucleated eyes of New Zealand white rabbits. The effects on viability, apoptosis, proliferation, and senescence of the cells were evaluated in the control and drug applied cultures at the end of 72 hours.

Results: There was a statistically significant increase in the viability and decrease in the apoptosis of the cells in aflibercept applied culture when compared to the control, bevacizumab and ranibizumab groups ($p < 0.05$). There was a statistically significant increase in apoptosis and decrease in viability in the bevacizumab and ranibizumab-treated groups compared with the control group ($p < 0.05$). There was not a difference between groups when we evaluate the effects on cell proliferation and senescence ($p > 0.05$).

Conclusion: Our study showed that anti-VEGF drugs had no effects on senescence and proliferation of RPE cells. Aflibercept was found to decrease the apoptosis and increase the viability of the cells. In contrast, ranibizumab and bevacizumab was observed to increase the apoptosis and reduce the viability of RPE cells. In the literature, there are no studies evaluating the effects of anti-VEGF drugs on senescence. We believe that our study will guide future studies in this respect.

Keywords: Anti-VEGF, cell culture, retinal pigment epithelial

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oküler anjiyogenetik hastalıkların etyopatogenezinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) önemi anlaşıldıktan sonra antianjiyogenik ilaçlar (anti-VEGF), diyabetik maküla ödemi (DMÖ), eksüdatif yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD) ve retina ven tıkanıklığının (RVT) primer tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu grupta oküler kullanıma uygun olan ilaçlar pegaptanib, bevacizumab ve ranibizumab olarak gösterilmektedir (1). Son zamanlarda özellikle tekrarlayan anti-VEGF ajanlara rağmen sebat eden maküla ödeminde kullanılan aflibercept de bu gruptaki ilaçlardan biridir.

VEGF, diyabetik retinopatideki neovaskülarizasyondan primer sorumlu tutulan proanjiyogenetik bir sitokindir (2). Koriokapiller damar fenestrasyonunu sağlayarak retina pigment epiteline (RPE) ve fotoreseptörlere yeterli kan akımının oluşmasını sağlamaktadır. VEGF vasküler geçirgenliği artırma fonksiyonun yanı sıra mitojenik, kemotaktik, proenflamatuar ve nöroprotektif bir faktör olarak da bilinmektedir. VEGF, embriyolojik gelişimde retinal vaskülarizasyonun tamamlanması ve enflamasyon gibi durumlarda fizyolojik anjiyogenezi sağlar. Diyabetik retinopati, neovasküler yaşa bağlı maküla dejenerasyonu ve kardiyovaskülopati gibi oküler iskemiye neden olan durumlarda patolojik anjiyogenezin gelişmesinde rol oynamaktadır. Neovaskülarizasyon retinal iskemiye cevap olarak salınan VEGF tarafından stimule edilmektedir.

VEGF'in, vitreoretinal hastalıklarda neovaskülarizasyon ve vasküler geçirgenliğin artmasına bağlı makula ödemi gelişiminden sorumlu en önemli anjiyogenik faktör

olduğu gösterilmiştir (3). Son yıllarda makula ödemi azaltmak ve görme düzeyini iyileştirmek için sızıntı ve vasküler geçirgenlik artışı önlemeye yönelik antienflamatuar ve antianjiyogenik tedavi stratejisi kullanılmaktadır. İlk defa 2005 yılında neovasküler ve eksüdatif retina hastalıklarında kullanılan intravitreal anti-VEGF ajan bevacizumabdır (Avastin®, Genentech, Roche, Basle, Switzerland). Bu ajan VEGF'in direkt agonisti olan rekombinant humanize monoklonal bir antikordur (4). Bevacizumabın klinik kullanımı daha sonra tüm dünyada yaygınlaşmıştır (5). Sonradan geliştirilmiş olan diğer bir ajan ise ranibizumabdır (Lucentis®). Monoklonal antikor fragmanı olan ranibizumab, başlangıçta sadece eksüdatif YBMD'de kullanımına onay verilmekte iken, daha sonra DMÖ ve RVT'ye bağlı makula ödemi tedavisi için de onay almıştır. Ranibizumab güçlü bir antienflamatuar ve antianjiyogenik ilaç olması, kan-retina bariyerinin rejenerasyonunu sağlaması ve VEGF üretimini azaltmasından dolayı intravitreal enjeksiyon şeklinde uygulanmaya başlanmıştır.

Son zamanlarda özellikle tekrarlayan anti-VEGF ajanlara rağmen sebat eden makula ödeminde kullanılmaya başlanan bir başka anti-VEGF ajan ise afliberceptdir (EYLEA® 2mg/0.05 ml, Regeneron Pharmaceuticals, New York, USA). Aflibercept VEGF'lere bağlanır ve VEGFR-1-VEGFR-2 etkinleşmesini bloke eder.

Anti-VEGF'lerin intravitreal enjeksiyonu ile VEGF'in inhibisyonu sağlanarak makula ödemi ve neovaskülarizasyon azaltılmakta, bu sayede hastalığın stabilizasyonu sağlanarak mevcut görme yeteneğinin korunması amaçlanmaktadır.

VEGF, vaskülogenezis ve anjiyogenezisde önemli bir görev üstlenmektedir (6). Gözde normal retinal gelişim için gereklidir. Aynı zamanda RPE ve fotoreseptörlere yeterli kan akımının sağlanması koriokapiller damar fenestrasyonunun sağlanmasında kritik rol oynamaktadır (7).

VEGF, endotel hücrelerinin kritik durumlarda yaşamasını sağlar. VEGF in-vitro olarak antiapoptotik proteinleri (Bcl-2, x1Ap, survivin) indükler. İn-vitro çalışmalar VEGF'in fotoreseptör diferansiyasyonunda rol oynadığını ve fotoreseptör sağlığı için gerekli olduğunu düşündürmektedir. İn-vitro modelde VEGF'in postnatal rat fotoreseptörlerini ve rodopsin proteinini %300 artırdığı gösterilmiştir. YBMD patogenezinde fotoreseptör dejenerasyonu, DR'de nöronal iske mi yer aldığına göre VEGF inhibitörleri uzun sürede bu prosesi hızlandırabilir mi sorusu cevaplanmayı beklemektedir. Retinal hücrelerde

regüler hücre siklusünde VEGF'in apoptozisi bozarak nasıl etkiğiği bilinmemektedir. RPE'den oto-parakrin salınımının artması koryokapiler perfüzyonu azaltır. RPE'den mitojenik stimölasyonla bazal sekresyonunun trofik veya protektif etkisi tam olarak bilinmemektedir. VEGF izoformlarının inhibisyonu iskemik retinada apoptotik etkiyi artırabilir mi ve eğer öyle ise bu durum ne kadar süre etkilidir, tek bir inhibisyon veya tekrarlanan dozlarda etkinin ne olduğu henüz bilinmemektedir. Sitoprotektif etkisi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (8-14). Literatürde şimdiye kadar anti-VEGF ajanların retina hücreleri üzerinde, özellikle de RPE hücreleri üzerinde senesansa olan etkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

Bu çalışma intravitreal anti-VEGF'lerin (bevacizumab, ranibizumab ve aflibercept) retina pigment epiteli hücre kültürü üzerindeki proliferasyon, apoptozis, hücre canlılığı ve senesense olan etkilerini hücre kültürü düzeyinde değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

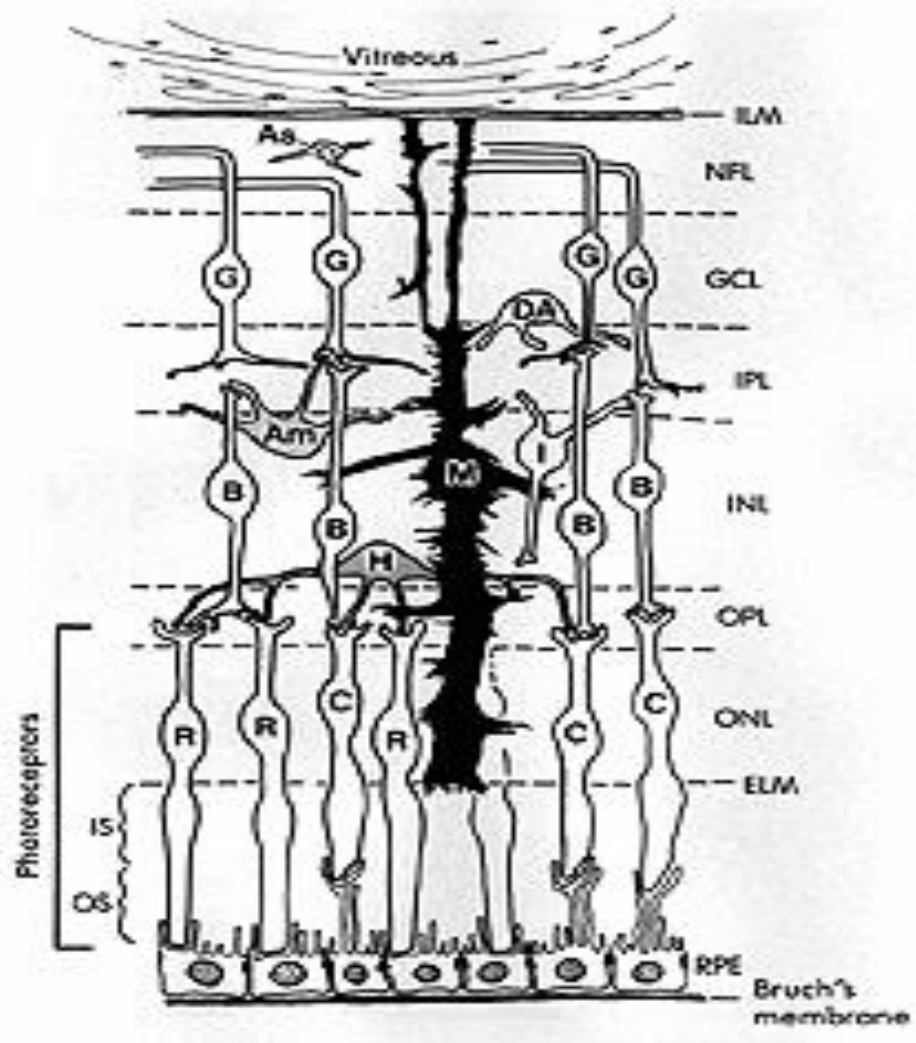
2.1. Retinanın Anatomi ve Histolojisi

2.1.1. Retinanın Katmanları

Gözün en iç tabakasında yer alan fotoreseptör özelliği ile optik enerjiyi algılayan ve beyne optik sinir yoluyla ileten retina, optik sinir başından ora serrataya dek uzanan bir yapıdır. İç tarafta vitreus korteksi ile dış tarafta da Bruch membranı aracılığıyla koryokapillaris tabakasıyla ve koroidle komşudur. Çok katlı nörosensoryel tabakalardan ve tek sıra heksagonal hücrelerden oluşan retina pigment epitel (RPE) tabakasından oluşmuştur. Nörosensoryel tabaka önde ora serrata düzeyinde pigmentsiz silier cisim hücreleriyle, RPE tabakası ise pigmentli silier epiteline geçiş yaparak sonlanmaktadır. Histolojik özelliklere dayanarak retina 10 katmandan oluşmuştur (Şekil2.1).

1. İnternal limitan membran (İLM)
2. Sinir lifi tabakası
3. Ganglion hücre tabakası
4. İç pleksiform tabaka
5. İç nükleer tabaka
6. Dış pleksiform tabaka

7. Dış nükleer tabaka
8. Eksternal limitan membran (ELM)
9. Fotoresptör tabaka (rodlar ve konlar)
10. Retina pigment epitel tabakası



Şekil 2.1. Retinanın histolojik kesiti

Bruch Membranı: Bruch membranı RPE ile koryokapiller dokuyu birbirinden ayırmaktadır. İki tabaka halinde kollajen lifler içeren Bruch membranının bu iki tabakasının arasında elastin lifler mevcuttur. İç ve dış sınırlarını ise RPE'nin ve koryokapillarisin bazal laminaları oluşturur.

Retina Pigment Epiteli: Retina pigment epiteli tek katlı heksagonal hücrelerden oluşur. Retina pigment epitelinde hücreler arası zonula adherens ve zonula okludens denilen sıkı bağlantılar sayesinde dış kan-retina bariyeri oluşur. Retina yüzeyindeki mikrovilluslar sayesinde, fotoreseptör hücrelerin pigment içeren ışığa duyarlı dış segmentlerini sararlar ve atılan dış segment parçalarını fagositoz yoluyla temizlerler (15). RPE'nin görevleri arasında içerdikleri melanin granülleri sayesinde ışık saçılmalarını absorbe etmek, fotoreseptör dış segmentindeki vitamin A metabolizmasına katılmak, interfotoreseptör matriks içeriğini muhafaza etmek, konların dış segmentini saran kılıflarla metabolik alışveriş ve koryokapillaristen gelecek olan maddelerin retinaya aktif transport yoluyla seçici olarak iletilmesi sayılabilir. Retina genelinde ortalama olarak 45 fotoreseptöre 1 RPE hücresi düşmektedir (15). RPE'de bulunan tek pigment melanin değildir. Fotoreseptör tabakanın dış segmentlerinden dökülen lipid bazlı materyallerin tam olarak lizozomal sindirime uğramamış hali olduğu düşünülen lipofuksin granülleri yaşla beraber artmaktadır. En yüksek lipofuksin konsantrasyonu makülada bulunur. Lipofuksin pigmentinin RPE hücresinde artmasının, maküla dejenerasyonunda rol oynadığı da düşünülmektedir (16).

İnterfotoreseptör matriks: İnterfotoreseptör matriks retina ve RPE hücreleri arasında bulunur. İç kısımda Müller hücreleri apikal uzantıları ve fotoreseptörlerin iç segmentleri arasında bulunan intermedyer bağlantılardan (zonula adherens) oluşan eksternal limitan membranla, dış kısımda ise RPE hücrelerinin zonula okludenslerince oluşturulan dış retina kan bariyerince sınırlandırılmaktadır. İnterfotoreseptör matriks yapısı çeşitli protein ve enzimler içermektedir. Bunlardan en önemlisi İnterfotoreseptör Retinoid Bağlayıcı Proteindir (IRBP). IRBP' nin RPE hücresi ile fotoreseptörler arasında vitamin A türevlerinin transportunu sağladığı gösterilmiştir (17) . Matrix içerisinde glukozaminoglikanlardan (GAG) ve glukoproteinlerden oluşan rod ve konların dış segmentlerini saran rod ve konlar için farklı olmak üzere matriks kılıfları olduğu bulunmuştur. Bu kılıfların fotoreseptörleri birbirinden izole ettiği düşünülmektedir.

Fotoreseptör Tabakası: Fotoreseptör hücreleri gözün kırıcı ortamı tarafından yönlendirilen görüntüyü nöral sinyallere çevirerek görme olayını başlatan özelleşmiş hücrelerdir. Retinada koniler ve basiller olmak üzere iki tip fotoreseptör hücresi vardır.

Basiller karanlıkta, koniler aydınlıkta işlev yaparlar. Foveada hiç basil bulunmazken koniler en yüksek konsantrasyona sahiptir. İnsan koni pigmentleri 419 nm (mavi), 531 nm (yeşil), 558 nm (kırmızı) olmak üzere ışık spektrumunun üç bölgesindeki fotonları maksimum olarak absorbe ederler. Koniler ışıktaki renk ayırımı, aydınlıkta görme ve keskin görmeden sorumludur. Koniler horizontal ve bipolar hücrelerle olduğu kadar diğer basiller ve konilerle de sinaps yaparlar. Konilerin toplam sayısı yaklaşık 6,5 milyondur. Basil hücreleri foveoladan 0,5 mm uzaklıkta ortaya çıkarlar. 5-6 mm uzaklık, en yoğun oldukları bölgedir. Konilerin sayısında merkezden periferiye doğru hızlı bir düşüş gözlenir. Basiller konilerden daha dar ve uzun yapıdadırlar. Periferik retinada basillerin çapı 25 mikrondur. Basiller alacakaranlıkta ve karanlıkta görmeden sorumludurlar. Bir basilde ortalama 6.000- 10.000 disk bulunur. Basil iki horizontal hücre dendriti ile bir ya da daha çok bipolar hücre dendriti ile sinaps yapmaya uyumludur. Retinada toplam basil sayısı yaklaşık 120 milyondur. Koni ve basil hücrelerinin dış segmentleri mukopolisakkarid bir örtüyle kaplıdır ve pigment epiteli ile temas halindedir.

Dış Limitans Zarı: Fotoreseptörlerin iç segmentleriyle Müller destek hücrelerinin dış uzantılarının aralarındaki bağdan oluşmuştur. Gerçek bir membran değildir. Koni ve basillerin dış ve iç segmentlerinin arasından geçer. Periferik retinada bu membran ora serrata pigment epiteli ile birleşir.

Dış Nükleer Tabaka: Fotoreseptörlerin çekirdek ve sitoplazmalarının bulunduğu bölgedir.

Dış Pleksiform Tabaka: Birinci nöron fotoreseptörler ile bipolar ve horizontal hücrelerin arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir. Normal retinada kalınlığı 2 mikron olmasına karşılık, fovea çukurluğunun kenarında clivusta 50 mikronu bulur. Foveada konilerin önünü serbest bırakmak için kenarlara çekilerek Henle katını oluştururlar.

İç Nükleer Tabaka: İkinci nöron bipolar hücreleri, bağlantı hücreleri, amakrin ve yatay hücreler ile destek hücreleri Müller hücrelerinin çekirdeklerinin bulunduğu bölgedir.

İç Pleksiform Tabaka: Foveolada bulunmayan iç pleksiform kat ikinci nöron bipolarlar ile üçüncü nöron gangliyonlar ve amakrin hücreleri arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir.

Gangliyon Hücre Tabakası: Üçüncü nöron olan gangliyon hücreleri katıdır. İç pleksiform kat gibi foveolada bulunmaz. Gangliyonlar, bipolarlar gibi iki çeşittirler. Merkezdekiler küçüktür ve dendritleri konilerle sinaps yapan bir bipolar hücreyle sinaps yapar. Periferdekiler daha büyüktürler ve birkaç bipolarla sinaps yaparlar.

Sinir Lifi Tabakası: Korpus genikulatum lateralede sonlanan 1,2 milyon dolayındaki gangliyon hücresi aksonları, sinir lifleri katını oluşturur. Burada ayrıca retina arter ve venleri, astrositler, mikrogliyal hücreler ile oligodendrositler de vardır. Retina beslenmesinde rolü olan astrosit, mikrogliya ve oligodendrositler retinanın arter, ven ve kapillerleri çevresinde kümelenmişlerdir.

İç Limitans Zarı: Retinanın en iç katı olan iç limitans zarı, retinayı vitreustan ayırır. Vitreus ile temas halinde olan iç yüzünün düzgün olmasına karşılık, dış yüzü Müller hücrelerinin uçlarından ötürü pürüzlüdür. Yazarların bir kısmına göre gerçek bir zardır. Diğerlerine göre de Müller hücrelerinin uçları tarafından oluşturulmuştur.

2.1.2. Retinanın Kan Dolaşımı

Gözün arteriyel beslenmesi internal karotid arterin ilk dalı olan oftalmik arter tarafından sağlanır. Oftalmik arterden çıkan retina santral arteri, retinanın iç 2/3'ündeki tabakaları besler. Retinanın dış 1/3'ü ise (retina pigment epiteli, fotoreseptörler) koroidden difüzyonla beslenir. Oftalmik arterin santral retina arterinden sonraki dalları olan kısa ve uzun arka siliyer arterler optik sinir etrafından globa girerler. Posterior koriokapillaris kısa arka siliyer arterlerden, anterior koriokapillaris ise uzun arka siliyer arterlerden ve ön siliyer arterlerden beslenir.

Retinanın venöz drenajı santral retina veniyle sağlanır. Optik sinirden çıkan venöz drenaj direkt olarak kavernoöz sinüse ulaşır. Koroidin venöz drenajı ise vorteks venleri ile üst ve alt oftalmik venler aracılığıyla kavernoöz sinüste sonlanır.

1-Arterler

Retinanın nöroserebral katı santral retinal arterden ve var olduğunda, siliyoretinal arterden beslenir.

a) Santral Retinal Arter:

Oftalmik arterin dalı olan santral retinal arter, papilladan 1 cm uzaklıkta optik sinir içine girer. Papilla merkezinde ilk önce alt ve üst, sonra da temporal ve nazal dallara ayrılarak retinaya yayılır. Retina yüzeyinde sinir lifleri ve iç limitans zarı katında seyreder. Retina santral arteri dallanmaları ikiye ayrılma şeklinde olur. Periferiye doğru arterler, arteriyol ve kapillerlere dönüşürler.

b) Siliyoretinal arter:

Koroidden gelen, papilla çevresindeki Zinn arter çemberinden kaynaklanır. Papilla temporal kenarından çıkarak maküla bölgesini sular. Fluoresein anjiografisinde, retina arterlerinden önce, koroid ile beraber boyanır. Siliyoretinal arter, olguların ancak %6-20'sinde bulunur.

2- Venler

Ora serratada venler, arterlere göre daha perifere kadar giderler. Ekvatordan itibaren arterlerle birlikte seyrederler ve papillada toplanarak santral retinal veni oluştururlar. Arter ve venler sık sık çaprazlaşırlar. Santral retinal ven, oftalmik vene, sonra da kavernöz sinüse dökülür. Venlerin çapı arterlere göre daha geniştir. Normalde arter çapının ven çapına oranı 2/3' tür.

3- Kapillerler

Retina arteriyolları ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Koriyokapillerlerin duvarlarında geniş pencerelemeler bulunmasına ve geçirgen olmalarına karşılık, retina kapillerlerinin duvarları sızdırmazdır. Retina pigment epiteli dış, retina kapillerleri de iç kan retina bariyerini oluştururlar. Kapillerlerin bazal zarının içinde, birbirlerine zonula

okludenslerle sıkıca yapışık endotel hücreleri, duvarlarında da, kasılmalarını sağlayan çizgisiz kas lifleri, perisitler vardır.

Normalde perisit/endotel hücresi oranı 1/1' dir. Retina kapillerleri yüzeyel ve derin olmak üzere iki ağ şeklindedirler.

a) Yüzeyel kapillerler

Retinanın sinir lifleri katındadırlar.

b) Derin kapillerler

İç nükleer ve dış pleksiform katların birleşme yerindedirler. Derin kapillerler, yüzeyel kapillerlerden kaynaklanırlar ve onlara, dikine gelen kapillerlerle bağlıdırlar. Dış pleksiform kat, retina kapillerleriyle beslenen bölge ile koroidden beslenen katlar arasındadır.

4- Lenfatik Damarlar

Retinada lenfatik damar yoktur (18-23).

2.2.VEGF

VEGF 40 kDa ağırlığında endotelial hücre büyümesi, neovaskülarizasyon ve damar geçirgenliğini arttıran potent bir dimerik glikoproteindir. VEGF anjiyogenezin en önemli merkezi mediatörü olarak tanımlanmıştır ve anjiyogenezde anahtar bir rol oynamaktadır. VEGF geni 8 ekzon ve 7 introndan oluşmaktadır (24,25). Gen 14kb'lık kodlama bölgesini kapsamış olup 6. kromozom (6p21.3) üzerinde bulunur (26). VEGF gen ailesi VEGF-A, B, C, D, E, F ve plasental büyüme faktörü olmak üzere toplam 7 alt gruptan oluşmaktadır (27). Anjiyogenezde en güçlü ilişkisi olan VEGF-A, anti-VEGF tedavisinin hedefidir (28). VEGF-A'nın içerdiği aminoasit sayılarına göre adlandırılan VEGF 121, VEGF 145, VEGF 148, VEGF 162, VEGF 165, VEGF 165b, VEGF 183, VEGF 189, VEGF 206 olmak üzere 9 izoformu bulunmaktadır (29,30). İnsan gözünde güçlü patolojik formu VEGF 165'dir (31).

VEGF damar geçirgenliğinde artış sağlayan, anjiojenik, mitojenik, nöroprotektif, kemotaktik bir faktördür. VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR 1 (flt-1), VEGFR 2 (flk-1/KDR) ve VEGFR 3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGFR 1 ve VEGFR 2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGFR 3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (32). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar.

2.2.1. VEGF'in Göz Üzerine Etkileri

Retinada, VEGF'in ana kaynağı RPE, müller hücreleri, ganglion hücreleri ve perisitlerdir (30). Hipoksik ya da iskemik durumlar anjiojenenezisin başlıca aktivatörleridir (33). VEGF-A gen ekspresyonunda ana düzenleyici, hipoksinin indüklediği faktör-1'dir (HIF-1) (34,35). Diğer büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü α ve β , keratinosit büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü), hipofiz hormonları, nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler (İnterlökin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8) ve onkogenik mutasyonlarla da VEGF ekspresyonu düzenlenir (30,33,36).

RPE'den salgılanan VEGF, RPE ve koryoepitel arasında parakrin sinyal oluşturarak endotelial fenestrasyonu sağlar. RPE'den VEGF-A salgısı engellenen farelerde koryoepitel gelişiminde bozukluk gösterilmiştir (37). RPE'nin koryoepitel ile komşu olan taban kısmındaki VEGF salgısı fotoreseptörlerle komşu olan tepe kısmına göre 2-7 kat daha fazladır. Bu farklılık hipoksik durumlarda daha da artar (38). İleri glikasyon son ürünleri, reaktif oksijen ara ürünleri ve hipoksi, RPE'den VEGF salınımını arttıran güçlü uyarıcılardır (33).

VEGF'in normal retinadaki kesin rolü tam olarak anlaşılamamıştır (2). Gözde aşırı VEGF inhibisyonunun VEGF'in bilinmeyen fonksiyonlarını engelleyerek (örn; endotel hücre devamlılığı için fizyolojik düzey) yan etki oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir (39).

Neovasküler oküler hastalıklarda VEGF'in rolünü gösteren çok sayıda çalışma vardır. Proliferatif diyabetik retinopati ve neovasküler glokom gibi neovasküler hastalıklarda hem vitreusta hem de hümör aközde yüksek seviyede VEGF saptanmıştır (40). Hayvan çalışmalarında VEGF'in iris, koroid ve retina neovaskülarizasyonları gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (41,42). Maymunlarda vitreus içine VEGF enjeksiyonu ile retina ve iris neovaskülarizasyonları oluşturulmuştur (43).

İnsanlarda YBMD'nin erken dönemlerinde RPE'de artmış VEGF ekspresyonu gösterilmiş ve koroid neovaskülarizasyonu gelişiminde rol oynadığı ifade edilmiştir (44). Ayrıca YBMD'lu hastalardan cerrahi olarak çıkarılan koroid neovaskülarizasyonu dokularında yüksek oranda VEGF-A ekspresyonu saptanmıştır (45). Koroid neovaskülarizasyonlu hastaların vitreuslarında yüksek konsantrasyonda VEGF saptanmıştır (46). VEGF 121 ve VEGF 165 cerrahi olarak çıkarılan koroid neovaskülarizasyonu dokularında gösterilmiştir (47).

2.3. Antianjiyojenik Ajanlar

Anjiyojenezin en önemli uyarıcı olan VEGF patolojik anjiyojenez ve embriyonik vaskülojenezde rol oynamaktadır. Esas patolojik formu VEGF 165'dir. İlk olarak 1994 yılında proliferatif diyabetik retinopatili insan gözlerinde aköz ve vitreus VEGF seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır (48,49). VEGF kan-retina bariyerinin bozulmasına, damar geçirgenliği arttırarak retina ödeme, endotel hücre proliferasyonuna ve neovaskülarizasyon oluşumuna yol açmaktadır (50-52). Retina pigment hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, müller hücreleri ve astrositler gibi birçok retina hücresi VEGF sentezler. Deneysel çalışmalarda hipoksiye bağlı retinal iskeminin VEGF sentezini arttırdığı bulunmuştur (53,54). Hipoksi varlığında VEGF'in m-RNA sentezi 30 katına çıkar. Hipoksiye bağlı stimülasyon sonucunda ortaya çıkan VEGF artmış damar geçirgenliğine ve neovaskülarizasyona neden olur. Retinal/subretinal neovaskülarizasyon, diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı, iris neovaskülarizasyonu, retina dekolmanı, prematüre retinopatisi, yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan gözlerde aşırı VEGF-A salınımı izlenmiştir (46,50,51).

2.3.1. Bevacizumab (Avastin)

Bevacizumab (Avastin; Genentech, South San Francisco, CA) şubat 2004'de FDA tarafından metastatik kolorektal kanserlerin tedavisi için onaylanan, tam uzunlukta monoklonal antikordur. Son zamanlarda YBMD'de ruhsat dışı (off-label) intravitreal ve intravenöz kullanımı tariflenmiştir (6). Bevacizumab VEGF'ye spesifik olarak bağlanan ve VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize eden rekombinant insan monoklonal antikorudur. Klinik olarak kullanıma giren ilk antianjiyogeniktir. Bevacizumab, fare epitoplarının insanlara uygulanması ile fareden VEGF'ye karşı elde edilmiş ve insan bağışıklık sistemine uygun hale getirilmiştir. Aminoasit diziliminin % 93'ü insan ve % 7'si fare kökenlidir. Üretildiği ajanla aynı biyokimyasal ve farmakolojik özelliklere sahiptir, ancak daha az immün cevaba sebep olur ve daha uzun ömürlüdür.

Bevacizumab, VEGF'nin endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasına engel olarak endotel hücrelerinin proliferasyonuna sebep olan reseptör dimerizasyonunu ve buna bağlı olarak transfosforilasyon yolu ile aktivasyonunu ve hücre içi aktivasyonu engellemektedir. Üzerinde iki adet antijen bağlanma bölgesi (Fab ve Fc) bulunur. Molekül ağırlığı 140 kDa'dur. Bevacizumabın bu büyük molekül ağırlığı nedeni ile antikorun antijen bağlayan kısmının pepsin ayırma yöntemi ile ayrılması sonucu elde edilen monoklonal antikorun antijen bağlayan parçasının çeşitli işlemlerden geçirilmesi ile ranibizumab elde edilmiştir (6,55,56). Bevacizumabın göz dokularındaki dağılımı ve farmakokinetiği ile ilgili çalışmalar Rhesus maymunlarında bevacizumab ve bevacizumabın Fab fragmanı kullanılarak değerlendirilmiştir. Fab fragmanının vitreusta yarı ömrü 3.2 gün, bevacizumabın tamamı kullanıldığında ise yarı ömrü 5.6 gün olarak belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada Fab fragmanının subretinal alana 1 haftada ulaşabildiği ve ortalama 1 hafta kalabildiği gösterilmiştir. Yarılanma ömrünün uzunluğu bevacizumabın daha düşük dozlarda etkili olmasını sağlayabilir. Büyük molekül ağırlığına rağmen antikorun tamamının intravitreal kullanımı sırasında sistemik dolaşımda antikor çok küçük miktarlarda saptanabilirken, sadece Fab kısmı uygulandığında sistemik dolaşıma geçmediği gösterilmiştir. Göz içine verilen antikorun yıkılmaması sebebi ile antikorun biyolojik aktivitesi göz içindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Yapılan başka bir çalışmada tek bir bevacizumab enjeksiyonu ile ortalama 27-38 günlük biyolojik bir etki elde edilebileceği vurgulanmıştır. Tüm bu özellikleri göz önüne alındığında klinik uygulamalarda bevacizumabın 1.25 mg dozunun yeterli

olabileceği düşünölmüş ve bu da birçok klinik çalışma ile desteklenmiştir. Tekrar enjeksiyonun süresinin ise ilacın biyolojik aktivitesi göz önüne alınarak 4-5 hafta olduğu bildirilmiştir (57).

2.3.2. Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis, Novartis Pharma AG, Basel, İsviçre and Genentech, San Francisco, California, ABD) VEGF'e bağlanan, rekombinant teknolojisi ile üretilmiş insanlaştırılmış antikordur (Fab). Pegaptanibten farklı olarak, VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanarak biyolojik aktiviteyi sonlandırır. Minimal klasik ve gizli lezyonlarda Anti-VEGF antikorı Ranibizumab'ın Neovasküler YBMD'de kullanılması isimli çalışma (Minimal classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD) (MARINA) randomize, çift körlü, sham tedavi kontrollü, minimal klasik veya gizli YBMD'ye ikincil KNV'lerde intravitreal ranibizumabın iki değişik dozunun ve sham tedavinin 24 ay boyunca 4 haftada bir uygulanarak denendiğı bir çalışmadır. MARINA çalışmasında, 12 ayın sonunda, ranibizumab tedavisi alan hastaların % 95'inde görme kazancı veya stabilizasyonu olmasına karşın, tedavi almayan grupta bu oranın % 62 olduğu göröldü. Daha önemlisi, sham tedavi grubu ile karşılaştırıldığında, ranibizumab tedavisi alan grubun % 40'ında ≥ 15 harf kazanç vardı (58). YBMD'de Baskın Klasik Koroidal Neovasküler Membranın Anti-VEGF Antikoru ile Tedavisi çalışması (Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD) (ANCHOR) randomize, çift kör ve sham tedavi kontrollüdür. YBMD'ye sekonder gelişen baskın klasik KNV'de ranibizumab enjeksiyonu + sham verteporfin ile fotodinamik tedavi (FDT) ile sham enjeksiyon + verteporfin ile FDT tedavisinin karşılaştırıldığı çalışmadır. Çalışma sonuçlarına göre, 12 ayın sonunda görmede korunma veya artış (15 harften daha az kayıp) oranları, ranibizumab tedavisi alan grupta % 95, FDT yapılmış grupta ise % 64 oranında bulundu. İkinci yılın sonunda 15 harften az kayıp yaşayan hastaların oranı ranibizumab tedavi grubunda % 90, FDT grubunda ise % 65.7'di. 24. ayın sonunda, ortalama görme artışı 11 harfti ve % 41 hastada 3 sıra ve üzeri görme artışı vardı. % 80 hastada ise görme korunmuş veya artmıştı. Ranibizumab, Temmuz 2006'da FDA tarafından onaylandı (59). MARINA ve ANCHOR çalışmaları aylık ranibizumab tedavi sonuçlarını değerlendirdi. PIER çalışması ise YBMD'ye ikincil gelişen subfoveal KNV'lerin 3 ay boyunca aylık ranibizumab tedavisi sonrası, üç ayda bir yapılan

enjeksiyonların etkinliğini ve güvenilirliğini araştırdı. 12 ayın sonunda başlangıç görme keskinliğinden ortalama değişim sham, 0.3 ve 0.5 mg ranibizumab gruplarında sırası ile, -16.3, -1.6 ve -0.2 harfti ($p<0.0001$). MARINA ve ANCHOR çalışma sonuçları gibi, başlangıç görme keskinliklerine göre artış ilk 3 ayda tespit edildi, ancak tedavinin etkinliği 3 aylık enjeksiyonlara geçildiğinde azaldı (58,59). İntraoküler ranibizumab ile tedavi edilen hastalarda OKT görüntülenmesi (Prospective Optical coherence tomography imaging of patients with Neovascular AMD Treated with intraocular ranibizumab Study) (PrONTO) isimli çalışmada ise, Rosenfeld ve arkadaşları 0.5 mg ranibizumabı 3 ay boyunca aylık olarak uygulamıştır. 3 aydan sonra yapılan aylık vizitlerde, eğer görme kaybı 5 harf ve üzeri ise, OKT’de tespit edilen sıvı varsa, OKT’de santral maküla kalınlığında 100 μm ’den fazla bir artış varsa, yeni başlayan klasik KNV varsa, yeni maküler kanama varsa, ranibizumab enjeksiyonu sonrası 1.ayda hala maküla kalınlığında azalma yoksa enjeksiyon tekrarlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 40 hastada, OKT yol göstericiliğindeki tedavi ile görme artışında ortalama 9.3 harf ($p<0.001$) ve OKT’de santral retinal kalınlıkta 178 μm azalma ($p<0.001$) sağlanmıştır. Bahsedilen görme keskinliği ve OKT sonuçlarına 12 ayın sonunda ortalama 5.6 enjeksiyon ile ulaşılmıştır. Sıvıdan arındırılmış maküla elde edildikten sonra enjeksiyon yapılmadan geçirilen süre 4.5 ay olarak tespit edilmiştir (60).

2.3.3. Aflibercept-VEGF Trap

Aflibercept (EYLEA® 2mg/0.05 ml, Regeneron Pharmaceuticals, New York, USA) VEGF’lere bağlanır ve VEGFR-1-VEGFR-2 etkinleşmesini bloke eder. Afliberceptin etkinliğini göstermek için yapılan çalışmalardan biri VIEW (VEGF Trap-Eye: Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD) çalışmasıdır. VIEW çalışması faz 3 randomize çift kör bir çalışma olarak düzenlenmiş ve ranibizumab 0.5mg/ay ve aflibercept aylık ve iki ayda bir dozları (0.5-2mg) karşılaştırılmıştır. Bir yıllık izlem sonrasında görme keskinliğini stabilleşmesinde gruplar arasında fark saptanmamış ancak görme keskinliği artışında afliberceptin 2mg/ay uygulananının; ranibizumaba 0.5 mg/ay ve diğer aflibercept uygulamalarına göre daha etkin olduğu görülmüştür (61).

2.3.4.Pegaptanib Na

Pegaptanib (Macugen; Eyetech Pharmaceuticals; Pfizer Inc, New York, ABD) VEGF165'e yüksek afinitesi ve özgüllüğü olan RNA oligonükleotid ligandır. Diğer anti-VEGF tedavilerden farklı olarak tüm izoformların yerine VEGF165'in ve diğer büyük VEGF moleküllerinin, heparin bağlayıcı kısımlarına bağlanarak, VEGF reseptörlerine bağlanmasını engeller.

İlaç 6 hafta ara ile intravitreal olarak uygulanır. Oküler neovaskülarizasyonda VEGF inhibisyon çalışması (VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization) (VISION), prospektif, randomize, çift körlü ve kontrollü faz 3 çalışmasıdır. Subfoveal KNV'si olan YBMD hastalarına, 48 hafta boyunca 6 haftada 1 pegaptanib ve sham enjeksiyonlar uygulanmıştır. Bir yılın sonunda tedavi alan grupta ≤ 3 sıra kayba % 70 hastada, ≥ 6 sıra kayba % 10 hastada rastlanırken, sham grubunda bu oranlar sırası ile % 55 ve % 22 olarak bulunmuştur. Bir yılın sonunda ≥ 3 sıra görme kazancı, tedavi alan grupta % 6, sham grubunda ise % 2 olarak tespit edilmiştir. İlaç güvenli bulunmuştur, ancak 12 hastada endoftalmi gelişmiştir (1,3 risk/hasta/yıl). 2004 yılında FDA ilacı YBMD tedavisi için uygun bulmuştur. Tedavi altındaki hastalarda görme düşüşü yaşanması ve daha etkili yeni anti-anjiyogenik ilaçların piyasaya sürülmesi ile pegaptanib kullanımı azalmıştır (62).

2.4. Anti-VEGF Ajanların Kullanıldığı Göz Patolojileri

2.4.1.Koroidal neovaskülarizasyon

Koroidal neovaskülarizasyonun etyolojisinde birçok neden vardır. Bunlar;

Yaş tip YBMD

Retinal anjiomatöz proliferasyon

Patolojik myopi

Angioid streak

Erişkin vitelliiform distrofi

Üveit

Toxoplazmozis

Multifokal koroiditis

Koroidal osteoma

İdiyopatik olarak listelenebilir.

2.4.2. Diabetik Retinopati

Uzamış hiperglisemi sonrasında PKC aktivasyonu sonrasında VEGF sentezi hızlanır. Artmış VEGF angiogenezis sonrasında proliferasyon ve maküler ödeme yol açar.(42) Bundan dolayı anti VEGF ajanların PDRP ve DMÖ de kullanılmasının olumlu sonuçlar vereceği düşünülmüştür. PDRP ve DMÖ tedavisinde standart tedavi olarak fotokoagulasyon tedavisi uygulanmaktadır. Ancak dirençli DMÖ ve ileri dönem PDRP de vitrektomi öncesi anti VEGF ajanların kullanımı avantaj sağlayabilmektedir (63,64).

2.4.3. Retinal Vasküler Tıkanıklıkları

Retinal vasküler tıkanıklıklar sonrasında VEGF seviyesi yükselir ve maküler ödeme neden olabilir. Anti-VEGF ajanların retinal vasküler tıkanıklarda kullanımının olumlu sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır (72). Retinal damar tıkanıklığında bevacuzimab ve ranibizumabın etkinliğinin değerlendirildiği Singer ve ark.larının yaptığı çalışmada ranibizumabın kısa dönemde makular kalınlığı daha etkin biçimde azalttığı tespit edilmiştir (66). Eylül 2012 tarihinde Aflibercept SRVO'ya sekonder makula ödeminin tedavisinde FDA onayı almıştır (67).

2.4.4. Neovasküler Glokom

Neovasküler glokom retinal iskemi sonrasında açıda neovaskülarizasyon sonucu açının kapanması ile meydana gelebilmektedir. Bu tablo diabetik retinopati, vasküler tıkanıklıklar, orak hücreli anemi, oküler iskemik sendrom, eski retina dekolmanı gibi retinal iskemiye neden olan patolojiler sonrasında oluşabilmektedir. Neovasküler glokomun standart tedavisinde PRP yapılarak retinal iskemiye azaltmak veya cerrahi

ve/veya medikal tedavi ile göz içi basıncı düzenlemek vardır. Bazı çalışmalarda VEGF düzeyinin aköz humor ve vitreusta arttığı gösterilmiştir.(68) Anti VEGF ajanlarla kombine PRP tedavisi NVG regresyonunu hızlandırabilmektedir (69).

2.4.5. Prematür Retinopatisi (ROP)

ROP periferel retinanın inkomplet vaskülarizasyonu sonrası retinal neovaskülarizasyona neden olabilen yenidoğan hastalığıdır. ROP için risk faktörleri prematürite, düşük doğum ağırlığı ve oksijen tedavisine maruz kalmaktır. Yapılan çalışmalarda yüksek oksijen konsantrasyonunun vasküler formasyonu bozduğu ve hipoksiye neden olarak VEGF seviyesini yükselttiği görülmüştür.(70) ROP tedavisinde özellikle grade 3 ROP tedavisinde fotokoagülasyonla kombine veya tek başına önemli etkiye sahip oldu ve grade 4-5 ROP ta vitrektomi öncesinde önemli yere sahip olduğu gösterilmiştir (71).

2.5. Anti-VEGF İlaçların Yan Etkileri

2.5.1. Kardiyovasküler Sistem

İntraoküler anti-VEGF enjeksiyonu sonrası ani kan basıncı değişiklikleri olabilir. İntravitreal enjeksiyon öncesi ve sonrası 24 saatlik kan basıncı takibi yapıldığında sadece gece görülen tansiyon düşüklüğünde (nokturnal dipping) azalma gözleendiği göze çarpmaktadır (72).

Aterosklerotik kalp hastalığında kompanzasyon mekanizması olarak kollateral damar oluşumunda VEGF rol oynamaktadır. Anti-VEGF ilaçlar tedavi etkinliğinde hücresel düzeyde endotelial disfonksiyona yol açmaktadır. Dolayısı ile miyokart enfarktüsü açısından predispoze hastalarda anti-VEGF ilaçların önemli derecede yan etki oluşturup oluşturmayacağı merak konusudur. Ranibizumab çalışmalarında ölüm oranı kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. İleri yaş olgularda kullanımın kardiyovasküler hastalığı provoke etmediği düşünülmektedir. Bununla birlikte uzun süreli kullanımında nasıl yan etkilere yol açacağı bilinmemektedir (73,74).

2.5.2. Pıhtılaşma-Kanama Riski

İntravenöz avastin kullanımında tromboembolik risk %1.9'dan %4.4'e çıkmaktadır. Faz 1 avastin çalışmalarında venöz tromboz sıklığında artış bildirilmiştir. İn vitro çalışmalarda farklı VEGF inhibitörleri pıhtılaşma parametrelerinde değişikliğe yol açmaktadır. Endotel hücrelerinin rejenerasyon ve turnoveri azaltıldığında subepitelyal matriks açığa çıkar. Böylelikle vonwillebrand faktör (VWF) gibi trombojenik faktörler salınır. Avastin tedavisinde de serum F8 ve VWF düzeyinde artış saptanmıştır. İntraoküler anti-VEGF uygulamalarında (Macugen, Lucentis, Avastin) retinal damarlarda tromboz riski gözlenmemiştir. Sistemik avastin tedavisinde gastrointestinal kanama veya perforasyon olabileceği bildirilmiştir. Vitre hemorajilerinde de intravitreal Avastin enjeksiyonu ile herhangi bir sistemik yan etki gözlenmeden olumlu sonuçların alındığı olgu sunumları bildirilmiştir.

Etki mekanizması ve klinik çalışmalardaki yan etkilerinden yola çıkılarak gebelik ve çocukluk, akut intraoküler enfeksiyon, akut miyokart enfarktüsü, anjina pectoris, hipertansif kriz, böbrek yetmezliği, aktif glomerülonefrit, ve bilinen alerji durumlarında kesin olarak; kontrolsüz hipertansiyon, nörodejeneratif hastalıklar ve respiratuar yetmezlik durumlarında ise relatif olarak Avastin uygulanmaması önerilmektedir (5,75-87).

2.5.3. Nefrotoksisite

Böbrek gelişimi esnasında VEGF inhibisyonu glomerüler endotel bozukluğa yol açar ve bu durum böbrek yetmezliği sonucu ölüme neden olabilir. Erişkinlerde glomerüler filtrasyona etkisi gözlenmemiştir. Klinik çalışmalarda onarım mekanizmaları ve rezerv kapasitesinin bozulduğuna dair bilgiler verilmektedir. Bazı çalışmalara göre VEGF inhibisyonunda klinik proteinüri olabilmektedir. Maymunlarda yapılan sistemik Avastinin güvenlik çalışmalarında önemli değişiklikler bildirilmemiştir. Ancak bazı kanser hastalarında glomerüler değişiklikler gözlenmiştir. Proteinüriye rağmen toksisitenin nadir olduğu düşünülmektedir. Anti-VEGF ilaçların böbrek yetmezliği durumundaki etkileri tam çalışılmamıştır. Klirensin azaldığı durumlarda serum pegaptanib konstrasyonunun yükselebileceği bilinmektedir (88-93).

2.5.4. İmmün Sistem

VEGF kemotaktik ve monositlere migratör etkilidir. Anti-VEGF tedavi ile makrofajların inhibisyonu söz konusu olabilir. Ayrıca, VEGF B-hücre indüksiyonu ve T-lenfositlerine kemotaktik etki gösterir. Bu etkiler VEGF inhibitörü ilaçların romatoid artrit gibi kronik enflamatuar hastalıklarda faydalı olabileceğini gösterebilir. Antijen prezente eden dendritik hücrelerin gelişim ve olgunlaşması VEGF ile bozulduğundan VEGF inhibitörlerinin spesifik immün cevabı artırması söz konusu olabilir. VEGF hematopoezde öncü hücrelerin salınım ve olgunlaşmasında etkilidir. Granülosit ve makrofajların koloni oluşturmada büyüme faktörleri de yer alsa da bu durum esas olarak otokrin regülasyonla ilişkili olduğundan VEGF inhibisyonundan etkilenmesi beklenmemektedir (94-99).

2.5.5. İmmün Yanıt İndüksiyonu

Avastin ile hücresel yıkım veya kompleman aktivasyonu gözlenmemiştir. Avastin VEGF reseptörüne direkt olarak bağlandığından bevacizumab-VEGF kompleksi hücre membranına bağlanamaz ve hücresel Fc-prezentasyonu olmaz. Bu nedenle hücresel immün reaksiyon riskinin olmadığı düşünülür. Avastine karşı yüksek titrede antikor oluşumu olası görünmemektedir. Lucentisin immünolojik potansiyeli fragmentasyonu nedeniyle daha da azdır. Ancak sinomolgus maymununda antikor oluşmuştur ve hastaların da %1-6'sında ranibizumaba karşı antikor saptanmıştır. Klinik önemi bilinmemekle birlikte yüksek seviyede immünoreaktivite saptanan bazı hastalarda iritis ve vitritis gözlenmiştir. (8,9,100).

2.5.6. Anti-Apoptozis

Vasküler endotelial büyüme faktörü endotel hücrelerinin kritik durumlarda yaşamasını sağlar. VEGF in-vitro olarak antiapoptotik proteinleri (Bcl-2, x1Ap, survivin) indükler. İn-vitro çalışmalar VEGF'in fotoreseptör diferansiyasyonunda rol oynadığını ve fotoreseptör sağlığı için gerekli olduğunu düşündürmektedir. İn-vitro modelde VEGF'in postnatal rat fotoreseptörlerini ve rodopsin proteinini %300 artırdığı gösterilmiştir. YBMD patogenezinde fotoreseptör dejenerasyonu, DR'de nöronal iskemiyi yer aldığına göre VEGF inhibitörleri uzun sürede bu prosesi hızlandırabilir mi sorusu cevaplanmayı

beklemektedir. Retinal hücrelerde regüler hücre siklusünde VEGF'in apoptozisi bozarak nasıl etki ettiği bilinmemektedir. RPE'den oto-parakrin salınımının artması koryokapiler perfüzyonu azaltır. RPE'den mitojenik stimülasyonla bazal sekresyonunun trofik veya protektif etkisi tam olarak bilinmemektedir. VEGF izoformlarının inhibisyonu iskemik retinada apoptotik etkiyi artırabilir mi ve eğer öyle ise bu durum ne kadar süre etkilidir, tek bir inhibisyon veya tekrarlanan dozlarda etkinin ne olduğu henüz bilinmemektedir. Sitoprotektif etkisi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (8-14).

2.5.7. Oküler Yan Etki

Lokal tolerans her üç anti-VEGF ajan için de iyidir. Anti-VEGF ajanlar ile normal retinal veya koroidal damarlara hasar gözlenmemiştir. Arteriovenöz transit zamanında gecikme, koroidal perfüzyon anormalliği (hipoperfüzyon) veya arterioller ve kapiller oklüzyon bildirilmemiştir (101).

2.5.8. Ön Kamara Reaksiyonu

Ön kamera reaksiyonu, enjeksiyona veya ilacın hazırlanışına bağlı olabilir. Anti-VEGF ilaç çalışmalarında üveit açısından kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmuştur. Pegaptanib grubunda %14.3 iken kontrol grubunda %5.7 ve ranibizumab grubunda %12.4 iken kontrol grubunda %3.5 bulunmuştur. Bevacizumab sonrası da ön kamera reaksiyonu bildirilmiştir. Laser flare-metre ile enflamatuvar aktivite ölçüldüğünde intravitreal bevacizumab sonrası tındalin azaldığı gösterilmiştir.(77-82,86,100-101)

2.5.9. Göz içi basınç yükselmesi:

Enjeksiyon veya ilaca bağlı GİB yükselmesi nadirdir. İntravitreal Macugen 0.3mg/90µl sonrası ortalama GİB'ın 16 mmHg'den 21 mmHg'ye çıktığı bildirilmiştir. Göz içi basınç yükselmeleri ilk yarım saat ile 2 saat arasında izlenmektedir. Kısa süreli düzelme volüm etkisi olduğunu gösterebilir. Lucentis 0.3 mg/50µl intravitreal enjeksiyon sonrası 2 olguda yüksek GİB bildirilmiştir. Bevacizumab (1.25 mg/50 µl) ile de anlamlı GİB yükselmesi bildirilmemiştir. İntravitreal bevacizumab sonrası 12. haftaya kadar GİB'nin monitörize edildiği bir çalışmada hemen enjeksiyon sonrası 2 hastada yükselme dışında 1,3,6 ve 24. saatlerde; 2,6 ve 12. haftalarda anlamlı GİB yükselmesi kaydedilmemiştir. (102,103)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi (ERÜ) Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'na, tıpta uzmanlık eğitimi bitirme tezi olarak tek merkezli invitro koşullarda hücre kültürleri üzerinde Anti-VEGF ilaçların klinik dozlarda retina pigment epiteli hücre kültürleri üzerine olan etkilerini araştırma amacıyla planlanıp deneysel araştırma projesi olarak hazırlanmıştır. Projemiz, ERÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 14.01.2015 tarih ve 01 sayılı oturumunda amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere uygun bulunarak onaylanmıştır. Ayrıca projemiz gerek bilimsel destek gerekse bütçe desteği açısından değerlendirilmek üzere ERÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne sunulmuştur. Birim'in 08.07.2015 tarih ve 2015/12 sayılı oturumunda incelenmesi sonucunda, TTU-2015-5996 proje kodu ile kabul edilmiştir.

Araştırmada kullanılacak hücre kültürlerini oluşturmak için gerekli olan tavşan RPE hücreleri, ERÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çeşitli nedenlerle sakrifiye edilen tavşan gözlerinden elde edilmiştir.

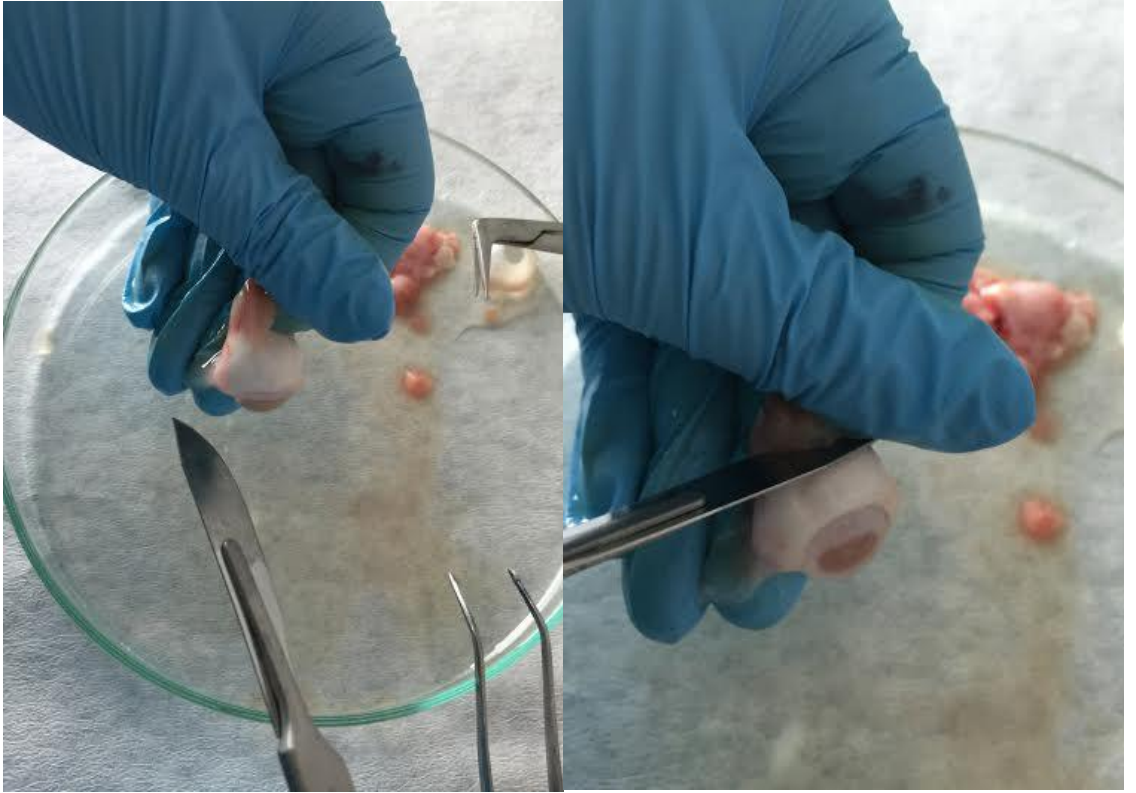
Araştırma için hücre kültürlerinin hazırlanması, hücre sayımları, hücrelerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi, ilaç uygulamaları ve sonuçların tespiti ERÜ Genom ve Kök Hücre Merkezi hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.Hücrelerin Elde Edilmesi

ERÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çeşitli nedenlerle sakrifiye edilen Yeni Zellenda beyaz tavşanlardan enükleasyon yöntemi ile elde edilen

gözler ekstraokuler dokulardan temizlendi (Resim 3.1). Penisilin ve streptomisin ile yıkanan glob, %2 lik penisilin ve streptomisin içeren düşük şekerli Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) solüsyonu içerisinde taşındı. Sonrasında %2 lik dispaz içeren fosfatla tamponlanmış serum (PBS)'da 37 C de 20 dk bekletildi. Sonrasında limbusun 3 mm posteriorundan dairesel şekilde insizyon yapılarak kornea ve ön segment materyalleri temizlendi (Resim 3.2).

Elde edilen kısım 2 saat boyunca 37 C de düşük şekerli DMEM ve %10 luk fetal bovine serum (FBS) solusyonunda bekletildi. Son olarak stereomikroskop altında mikropipet yardımıyla nöronal retina ve koroid arasından retina pigment epiteli hücreleri elde edildi (Resim 3.3). Elde edilen hücreler önceden hazırlanmış kültür besiyerinin içine alındı.



Resim 3.1. Enüklasyon yöntemi ile elde edilen gözlerin ekstraokuler dokulardan temizlenmesi.



Resim 3.2. Limbusun 3 mm posteriorundan dairesel şekilde insizyon yapılarak kornea ve ön segment materyallerinin temizlenmesi.



Resim 3.3. Steoromikroskop altında mikropipet yardımıyla nöronal retina ve koroid arasından retina pigment epiteli hücrelerinin elde edilmesi.

3.2. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanışı

Hücre kültürü çalışmalarının tümü steril laminar akım kabini içinde gerçekleştirildi. Hücre kültürü besiyeri olarak; %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM kullanıldı. Elde edilen hücreler kültür besiyerinin içerisine alındı. 1200 rpm de 5 dk boyunca santrifuj edildi. Tüplerin üzerindeki süpernatant kısımlar atıldıktan sonra tüpün tabanına çökelen hücreler 2 ml taze besiyeri birkaç kez pipetlenerek, 25 cm²'lik hücre kültür kabına 3 ml taze besiyeri ile ekildi.

3.3. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları

Hücreler 37⁰ C de % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Yaklaşık 48 saat sonra hücrenin medyumunu PBS ile yıkanarak değiştirildi.

3.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler %70-80 yoğunluğa geldikten sonra hücre kültür kabındaki medyum aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi PBS ile yıkandıktan sonra kültür kabının içerisine 3 ml Tripsin-EDTA ilave edildi. 4 dk boyunca 37⁰ C de inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı mikroskopik olarak (hücrelerin yuvarlaklaşıp yüzeyde hareket etmeye başladıkları) gözlemlendi. Sonra 1/10 kadar FBS ilave edilerek tripsin inhibe edildi. Konik tabanlı santrifuj tüplerine alınarak 1200 rpm de 5 dk boyunca santrifuj edildi. Daha sonra oluşan pellet 75 cm²'lik flasklara 10 ml besiyeri ile beraber kültüre edildi.

3.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması:

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer lamı üzerine konularak hücreler sayıldı. Daha sonra bu sayı –sulandırma miktarı x 10 000- sayısı ile çarpıldı. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulundu.

3.6. Hücrelerin Karakterizasyonu

Çalışmada kullanmak için izole edilen ve 2. pasaja gelmiş olan hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak içinde steril lamel bulunan 6 kuyucuklu platelere ekildi. Hücreler bu lameller üzerinde %70-80 yoğunluğa ulaştıkları zaman %4'lük paraformaldehit (PFA)

ile 10 dakika boyunca fikse edildi. PFA, PBS ile iyice yıkandıktan sonra %3'lük BSA ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek spesifik olmayan bağlantıların olmasını engellemek için bloklama işlemi yapıldı. Bloklama işlemi bittikten sonra yine PBS ile yıkanan hücreler 1:100 oranında PBS ile dilüe edilen ZO-1 (Santa Cruz, sc-33725) ve Cytokeratin18 (Millipore, MAB3234) ile bir gece oda sıcaklığında inkübe edildi. Bir gece inkübasyon ardından PBS ile yıkanarak fazla antibodilerin uzaklaştırılması sağlandı ve ardından primer antibodilere uygun sekonder antibodilerle 37°C'de karanlıkta 1 saatlik bir inkübasyonun ardından yine PBS ile fazla antibodi uzaklaştırıldı ve üzerinde hücre bulunan lameller DAPI içeren mounting medium ile bir lam üzerine kapatıldı. Mounting mediumun donması bekledikten sonra örnekler floresan mikroskop (Nikon Eclipse Ti) ile görüntülendi.

3.7. İlaç Dozlarının Ayarlanması

Doz ayarlanması yapılırken, her üç anti-VEGF ilaç için; klinikte kullanılan doz (vitreus sıvısında dilüe olmuş miktar göz önüne alınarak), tek doz ilaç uygulaması yapıldı. Bevacizumab için; 0,3125mg/ml (klinik doz) , ranibizumab için; 0,125mg/ml (klinik doz) , aflibercept için ise; 0,5mg/ml (klinik doz) uygulama yapıldı. Her ilaç için 72. saat sonunda hücrelerin proliferasyon, apoptoz, canlılık ve senesens özelliklerine nasıl etki ettiği test edildi.

3.8. Hücre Proliferasyon Analizi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Yöntemi

MTT analizi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapötik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir.

Yapılış Yöntemi;

MTT yönteminin uygulamasından 1 gün önce 96'lık plak içerisine sayımı yapılan 2500 hücre (2500/kuyu) ile 100 µl medyum hazırlandı ve kuyulara ekimi yapıldı. Mikroplak 24 saat 37°C ve %5 CO2 ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları

sağlandı. Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmış oldu. Bu proteinlerin ve büyüme faktörlerinin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir süre gerekmektedir. Ayrıca bu yolla medyum içerisindeki terapötik ajanların hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanmaları da sağlanmış olmaktadır. 24 saatlik inkübasyondan sonra seri dilüsyonlar halinde hazırlanan anti-VEGF ilaçlar seriler halinde gruplara bölünen hücre hattı medyumuna ilave edildi (100 µl olan medyum ve hücre karışımı üzerine 100 µl içerisinde dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonu ayarlanan anti-VEGF ilaç eklendi). 72 saat sonrasında MTT deneyi yapıldı. MTT testi için, hücrelerin kültüre edilmesinden 48 saat sonra kaldırılan hücrelerden bir kısmı MTT proliferasyon testi için ayrıldı ve 96 kuyucuklu platelere her gruptan cm²'ye 3000 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa son hacim 0,5mg/ml olacak şekilde MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] eklendi. Hücreler MTT ile birlikte 4 saat 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Oluşan formazan kristalleri 100'er mikrolitre DMSO (Dimetilsülfoksit) eklenerek 15 dk boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi ve formazan kristalleri çözülüp mor renk oluşunca Promega Glomax MultiDetection System Plate reader ile 560nm de absorbans ölçümü yapıldı. Tüm deney işlemleri ve MTT testi üç kez tekrarlandı.

3.9. Apoptozisin Değerlendirilmesi

Apoptozisi tayin etmek için hücreler yine belirlenen dozlarda belirlenen günlerde Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit MCH100105 kiti ve Millipore Muse® Cell Analyzer cihazı (Resim 3.4) kullanılarak apoptoz ölçümü yapıldı. Üretici firmanın talimatları küt protokolüne uygun olarak test gerçekleştirildi.

3.10. Canlılığın Değerlendirilmesi

Hücrelerdeki canlılığı tayin etmek için hücreler yine belirlenen dozlarda belirlenen günlerde MuseCell Analyser (Merck Millipore) Count& Viability kiti ve Millipore Muse® Cell Analyzer cihazı (Resim 3.4) kullanılarak canlılık ölçümü yapıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda kit protokolüne uygun olarak test gerçekleştirildi.

3.11. Senesensin Değerlendirilmesi

Hücrelerdeki senesens miktarını tayin etmek için hücreler yine belirlenen dozlarda belirlenen günlerde Promega β -Galactosidase Enzim Kiti kullanılarak ve Promega Glomax MultiDetection System Plate reader cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici firmanın talimatları kit protokolüne uygun olarak uygulandı.



Resim 3.4. Apoptoz ve canlılık ölçümlerinin yapıldığı MuseCell Analyser cihazı

3.12. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin kaydı ile tanımlayıcı ve karşılaştırmalı istatistiksel analizler için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 22.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı. Canlılığın, apoptozisin ve senesensin değerlendirilmesi için her kültürden ayrı ayrı üçer ölçüm yapıldı. Proliferasyonun değerlendirilmesi için ise her kültürden dört farklı ölçüm alındı. Verilerin değerlendirilmesinde one way ANOVA testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Primer Kültür ve Pasajların Mikroskopik Görünümleri

Hücrelerin ilk pasajdaki görüntüleri homojen bir yapıda olmayıp iğsi ve yıldızsı bir morfoloji göstermektedir. (Resim4.1)

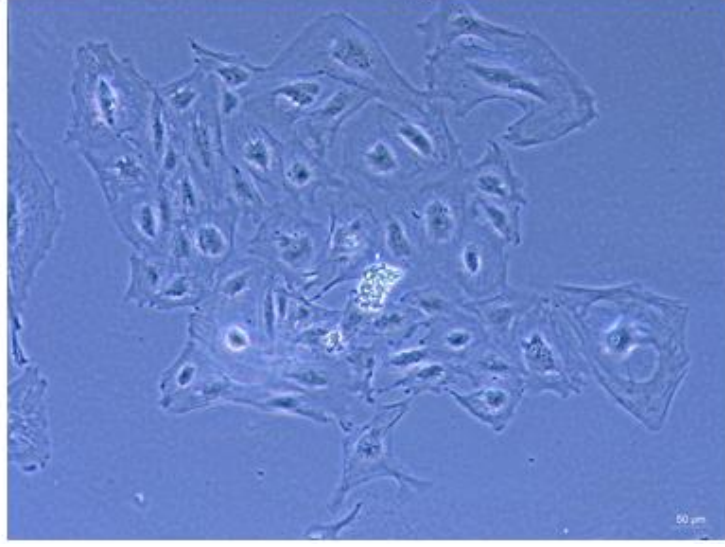
Primer Kültür



Resim 4.1. Primer RPE hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü.

Hücreler birinci pasajlarında iğsi ve yıldızsı yapıdan uzaklaşıp daha kübik bir görüntü almışlardır. (Resim 4.2)

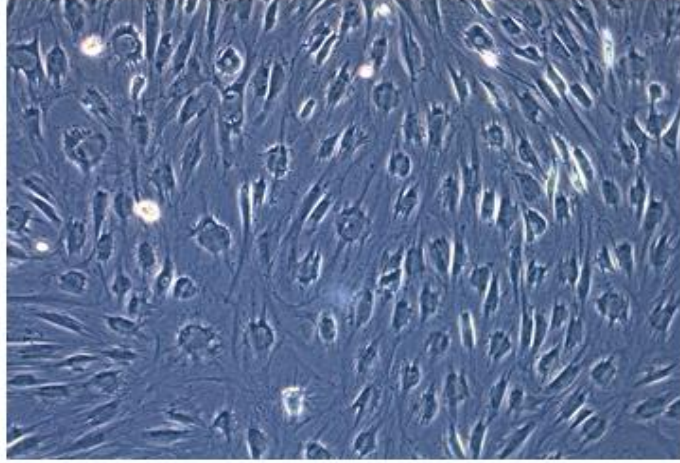
1. Pasaj



Resim 4.2. Birinci pasaj sonrası RPE hücre kültürünün mikroskopik görünümü

Hücreler ikinci pasajla birlikte daha homojen bir görünüm kazanmış hemen hemen kübik görünüme ulaşmış ve içsi yapıda hücrelerin sayısı azalmıştır.

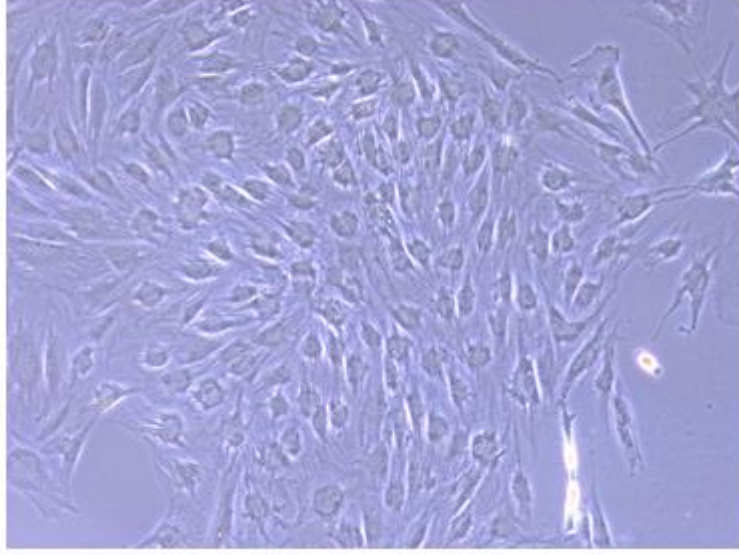
2. Pasaj



Resim 4.3. İkinci pasaj sonrası RPE hücre kültürünün mikroskopik görünümü

Üçüncü pasajdaki hücreler artık tam bir kübik görünümlü morfoloji sergileyip RPE hücre karakterini bu pasaj sayısında homojen olarak göstermeye başlamıştır. (Resim 4.4)

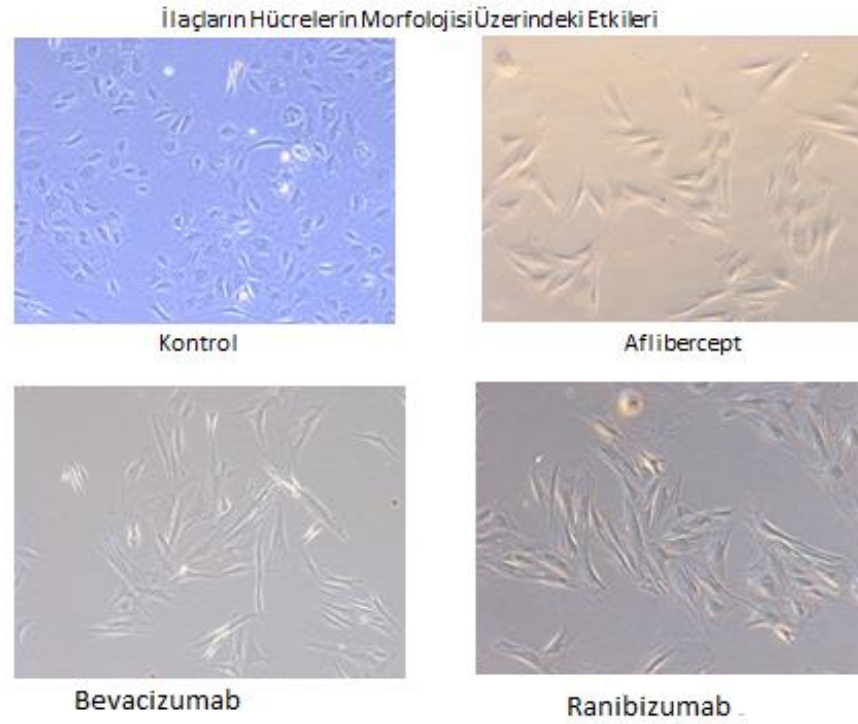
3. Pasaj



Resim 4.4 Üçüncü pasaj sonrası RPE hücre kültürünün mikroskopik görünümü

4.2. Anti-VEGF İlaçların Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

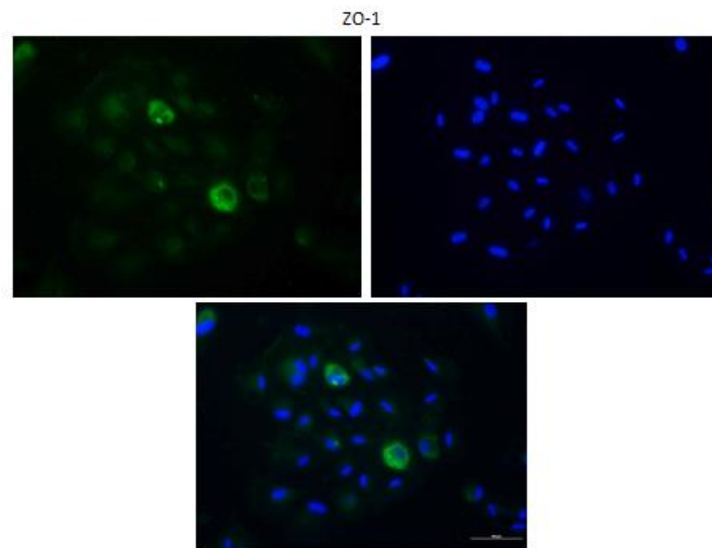
Hücrelerin görüntülerine bakıldığında kontrol grubundaki hücrelerin RPE hücre karakterizasyonu olan kübik şeklini koruduğu; ancak ilaçlı grupların kübik şekilden uzaklaşarak iğsi bir yapı kazandığı gözlenmiştir. Aynı zamanda eşit sayıda kültüre başlanan hücrelerde, kontrol grubuna göre hücre sayısının azaldığı da gözlenmiştir. (Resim 4.5)



Resim 4.5. İlaçların hücre morfolojisi üzerine olan etkilerinin mikroskopik görünümü

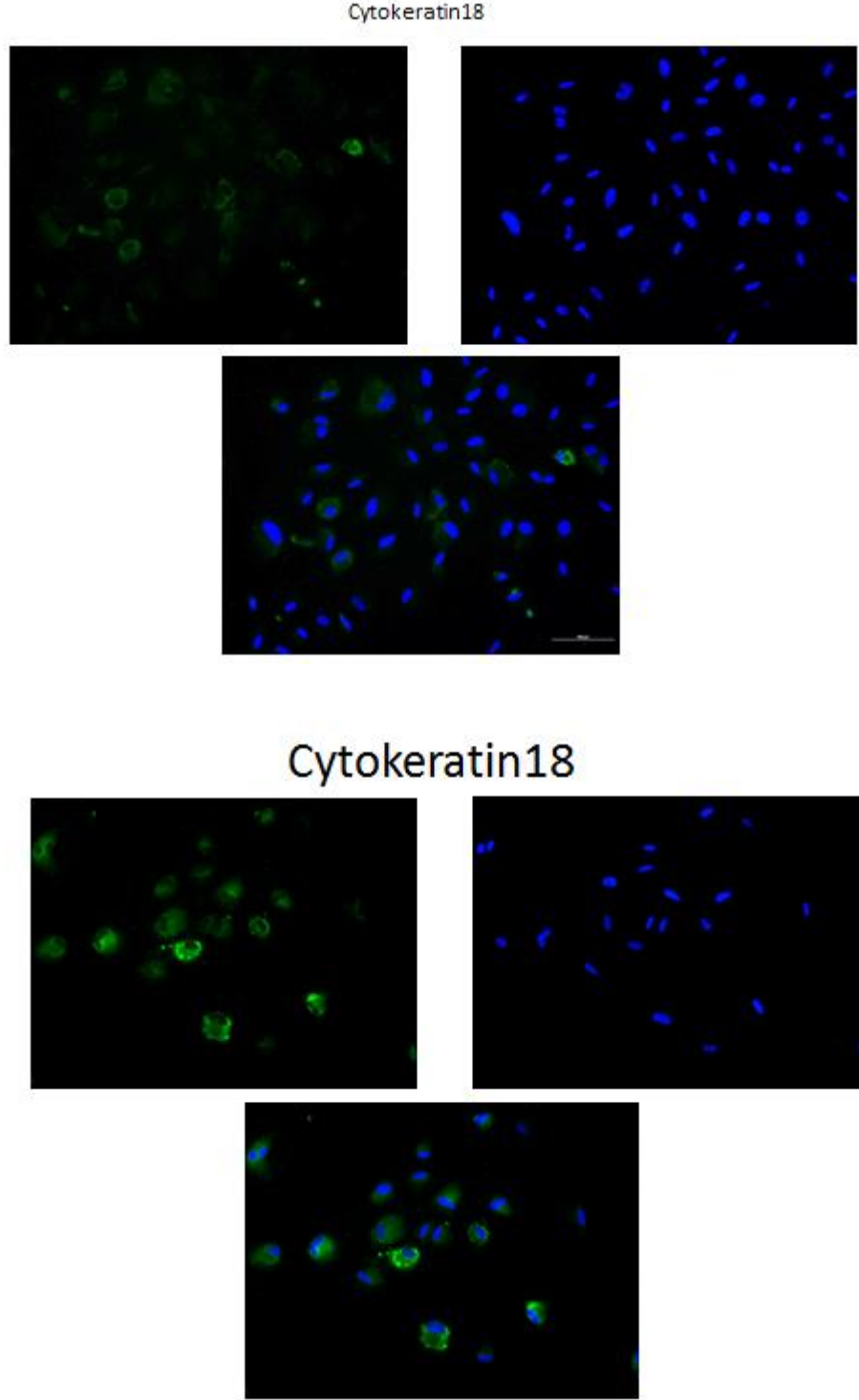
4.3. Hücrelerin Cytokeratin 18 ve ZO-1 boyaları ile karakterizasyonu:

Üçüncü pasaja gelmiş hücrelerin immüsitokimya yöntemiyle Zo-1 antikoruna ve çekirdek boyası olan DAPI ile boyanması. Boyama sonucunun pozitif olması kübik morfolojideki hücrelerin RPE hücresi olduğunu göstermektedir. (Resim 4.6)



Resim 4.6. Hücrelerin ZO-1 boyası ile karakterizasyonu

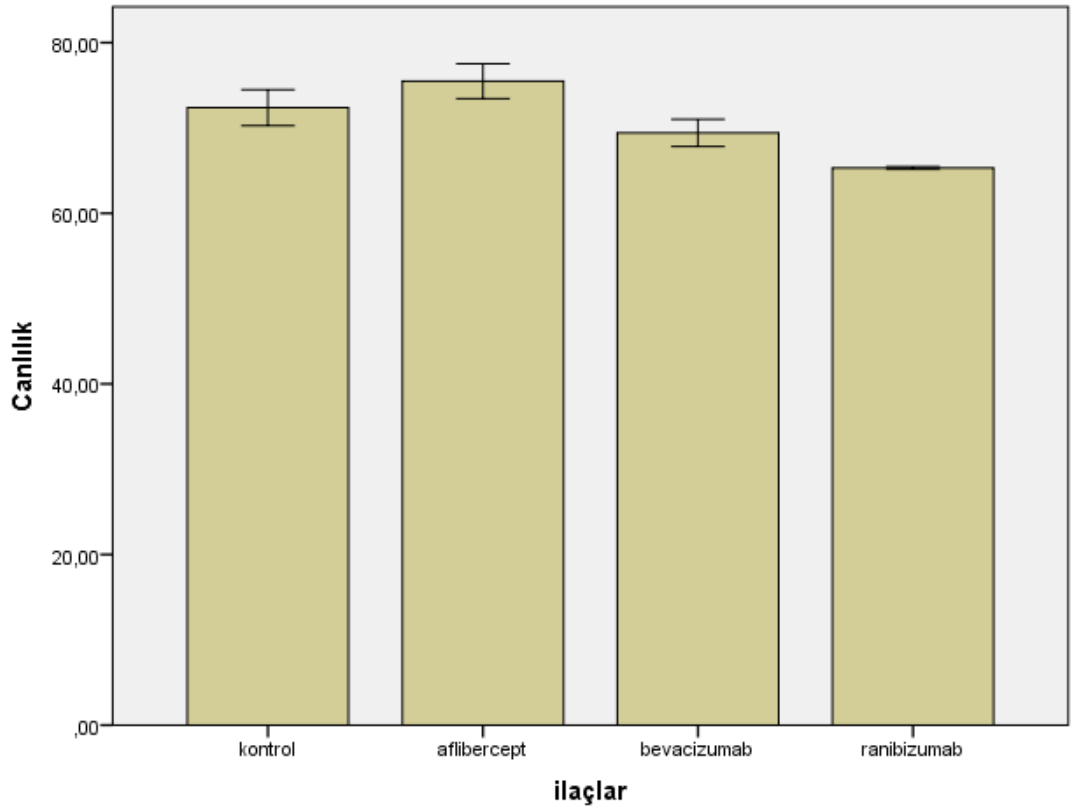
Üçüncü pasaja gelmiş hücrelerin immüsitokimya yöntemiyle Cytokeratin-18 antikoru ve çekirdek boyası olan DAPI ile boyanması. Boyama sonucunun pozitif olması kübik morfolojideki hücrelerin RPE hücresi olduğunu göstermektedir. (Resim 4.7)



Resim 4.7. Hücrelerin cytotkeratin 18 boyası ile karakterizasyonu

4.4 Anti-VEGF ilaçların canlılık üzerine etkileri:

Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültüründe canlılık üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde; ilaç uygulandıktan 72 saat sonra, kontrol grubuna göre aflibercept uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde değerlendirilen bir artış olduğu ($p=0.02$) ,bevacizumab* ve ranibizumab** uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre canlılığın istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir (* $p=0.03$, ** $p=0.00$).(Grafik 4.1) (Tablo 4.1)



Grafik 4.1. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki canlılığa olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.

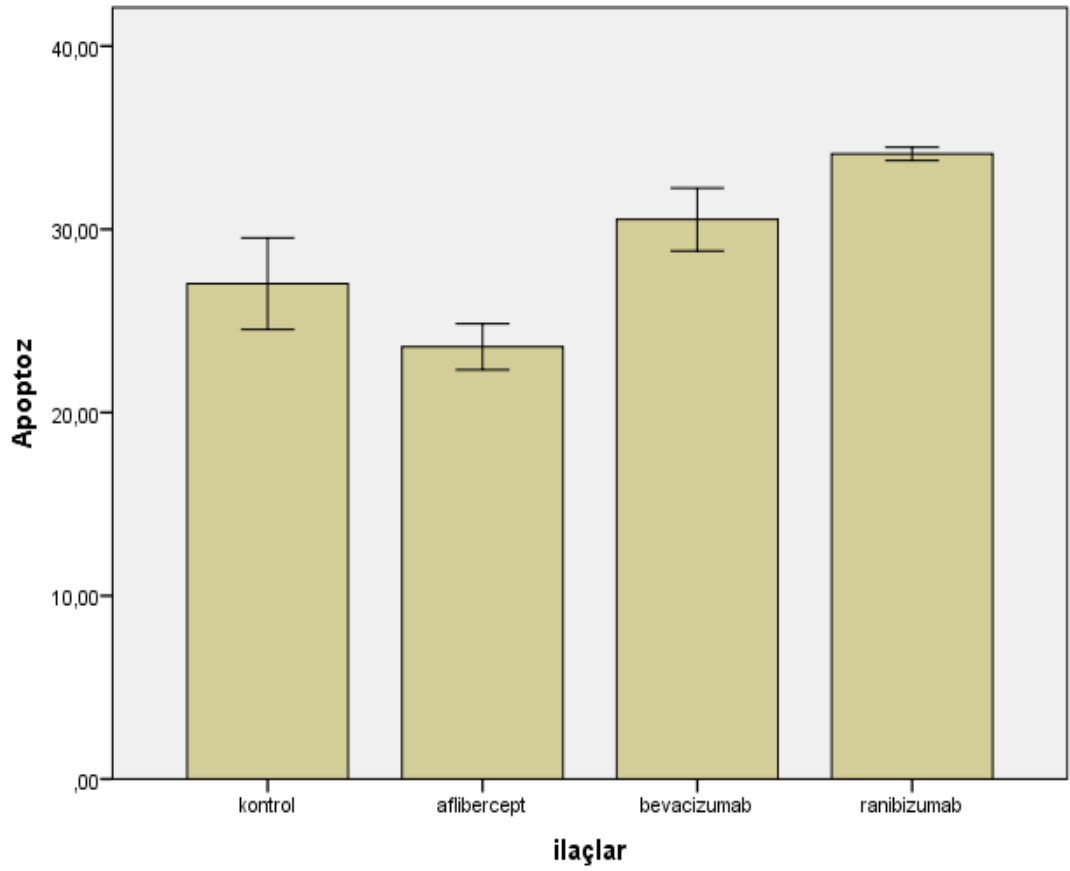
Tablo 4.1. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde canlılığa olan etkilerinin istatistiksel analizi.

	Karşılaştırılan gruplar	Ortalama değer	Standart Sapma	P değeri
Kontrol	Aflibercept	-3,09667*	,54898	,002
	Bevacizumab	2,95667*	,54898	,003
	Ranibizumab	7,07667*	,54898	,000
Aflibercept	Kontrol	3,09667*	,54898	,002
	Bevacizumab	6,05333*	,54898	,000
	Ranibizumab	10,17333*	,54898	,000
Bevacizumab	Kontrol	-2,95667*	,54898	,003
	Aflibercept	-6,05333*	,54898	,000
	Ranibizumab	4,12000*	,54898	,000
Ranibizumab	Kontrol	-7,07667*	,54898	,000
	Aflibercept	-10,17333*	,54898	,000
	Bevacizumab	-4,12000*	,54898	,000

*: Karşılaştırılan gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılığı ifade eder.

4.5. Anti-VEGF ilaçların apoptozis üzerine etkileri:

Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültüründe apoptozis üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde; ilaç uygulandıktan 72 saat sonra, kontrol grubuna göre aflibercept uygulanan grupta apoptoziste istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir azalma olduğu ($p=0.01$) ,bevacizumab* ve ranibizumab** uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre apoptozisin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı görülmektedir (* $p=0.01$, ** $p=0.00$)



Grafik 4.2. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki apoptozise olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.

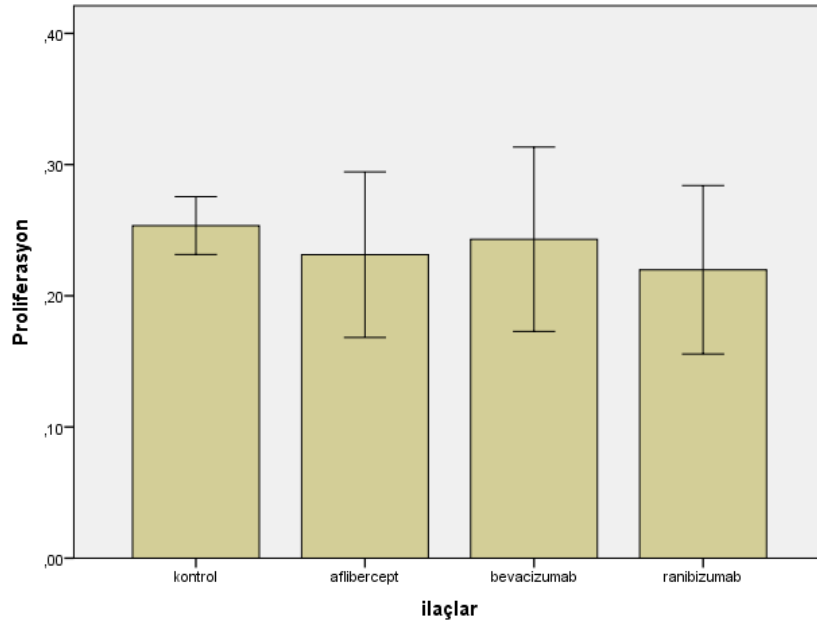
Tablo 4.2. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde apoptozise olan etkilerinin istatistiksel analizi.

	Karşılaştırılan gruplar	Ortalama değer	Standart Sapma	P değeri
kontrol	aflibercept	3,45333*	0,54274	0,001
	bevacizumab	-3,50333*	0,54274	0,001
	ranibizumab	-7,07667*	0,54274	0
aflibercept	kontrol	-3,45333*	0,54274	0,001
	bevacizumab	-6,95667*	0,54274	0
	ranibizumab	-10,53000*	0,54274	0
bevacizumab	kontrol	3,50333*	0,54274	0,001
	aflibercept	6,95667*	0,54274	0
	ranibizumab	-3,57333*	0,54274	0,001
ranibizumab	kontrol	7,07667*	0,54274	0
	aflibercept	10,53000*	0,54274	0
	bevacizumab	3,57333*	0,54274	0,001

*: Karşılaştırılan gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılığı ifade eder.

4.6 Anti-VEGF ilaçların proliferasyona etkisi:

Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültüründe proliferasyon üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde; ilaç uygulandıktan 72 saat sonra yapılan ölçümlerde, ilaç uygulanan gruplarda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyon üzerine anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0.05$)



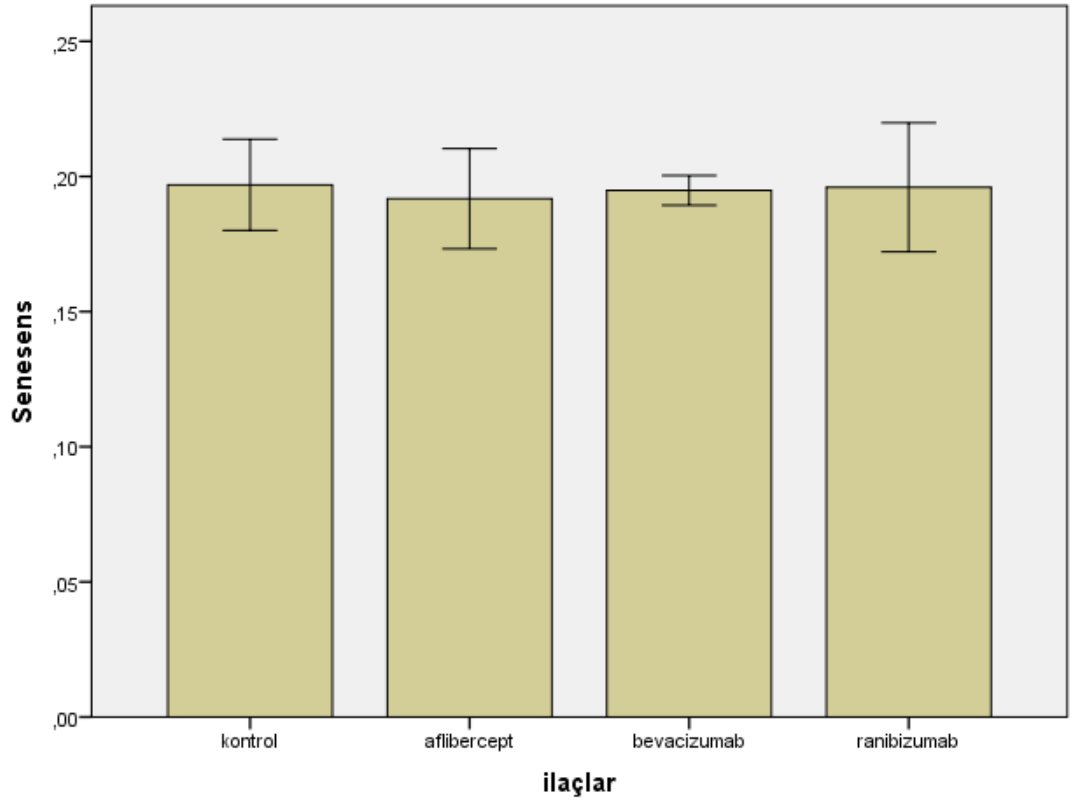
Grafik 4.3. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Tablo 4.3. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde proliferasyona üzerine olan etkilerinin istatistiksel analizi.

	Karşılaştırılan gruplar	Ortalama değer	Standart Sapma	P değeri
kontrol	aflibercept	0,02215	0,02585	0,827
	bevacizumab	0,01039	0,02585	0,977
	ranibizumab	0,03367	0,02585	0,579
aflibercept	kontrol	-0,02215	0,02585	0,827
	bevacizumab	-0,01175	0,02585	0,967
	ranibizumab	0,01152	0,02585	0,969
bevacizumab	kontrol	-0,01039	0,02585	0,977
	aflibercept	0,01175	0,02585	0,967
	ranibizumab	0,02328	0,02585	0,805
ranibizumab	kontrol	-0,03367	0,02585	0,579
	aflibercept	-0,01152	0,02585	0,969
	bevacizumab	-0,02328	0,02585	0,805

4.7. Anti-VEGF ilaçların senesense etkileri:

Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültüründe senesens üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde; ilaç uygulandıktan 72 saat sonra yapılan ölçümlerde, ilaç uygulanan gruplarda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında senesens üzerine anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0.05$)



Grafik 4.4. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerindeki senesense olan etkilerinin 72 saat sonunda birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Tablo 4.4. Anti-VEGF ilaçların RPE hücre kültürü üzerinde senesense olan etkilerinin istatistiksel analizi.

Karşılaştırılan		Ortalama değer	Standart Sapma	P değeri
	Gruplar			
kontrol	aflibercept	,00510	,00576	,813
	bevacizumab	,00205	,00576	,983
	ranibizumab	,00091	,00576	,998
aflibercept	kontrol	-,00510	,00576	,813
	bevacizumab	-,00305	,00576	,950
	ranibizumab	-,00419	,00576	,884
bevacizumab	kontrol	-,00205	,00576	,983
	aflibercept	,00305	,00576	,950
	ranibizumab	-,00114	,00576	,997
ranibizumab	kontrol	-,00091	,00576	,998
	aflibercept	,00419	,00576	,884
	bevacizumab	,00114	,00576	,997

5. TARTIŞMA

Oküler anjiogenetik hastalıklarda VEGF'in önemi anlaşıldıktan sonra VEGF'in transmembran reseptörüne bağlanmasını önleyen anti-VEGF ajanlar, eksüdatif yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, DMÖ ve retinal ven tıkanıklığı gibi korioretinal vasküler bozuklukların tedavisini tamamen değiştirmiştir. Pegaptanib, VEGF 165'i, (uzun bir izoform), ranibizumab ve bevacizumab ise VEGF-A'nın tüm izoformlarını, aflibercept ise VEGF-A, VEGF-B, plasental büyüme faktörü ve VEGF 165 bütün izoformlarına yüksek afinite ile bağlayarak VEGF'in etkilerini önlemektedirler. Bu ajanların yarılanma ömrü 7-10 gün olarak belirtilmekte, intravitreal enjeksiyon sonrası klinik aktif kalma süresi genellikle 4 haftayı aşmaktadır. Bevacizumab ve aflibercept Fc fragmanından dolayı sistemik yarılanma ömrü daha uzundur. Bu ilaçların intravitreal uygulamasından sonra plazma VEGF düzeyinde azalma olduğu bildirilmiştir(104). Mevcut kullanılmakta olan anti-VEGF ilaçlarla ilgili yapılan prelinik hayvan çalışmalarında intravitreal uygulama sonrası oküler dokulara ve sistemik olarak toksik bulgulara rastlanmamıştır.

Luthra ve ark. Bevacizumabın in-vitro toksisitesini araştırdıkları çalışmalarında; bevacizumab 0.125 mg/ml ve 1mg/ml arası 4 ayrı dozda insan RPE hücresi (ARPE19),rat nörosensoriyal retina hücresi (R28) ve insan mikrovasküler endotel hücreleri (HMVECad) üzerinde toksisite oluşturmamıştır(105).

Bevacizumab 0.008 mg/ml ile 2.5 mg/ml arasında 6 farklı dozda ARPE19, rat retinal ganglion hücresi (RGH5) ve domuz koroid endotel hücreleri (KEH) üzerinde 2, 6 ve 24

saat inkübasyon sonrası in vitro toksisite gözlenmemiştir, ancak 2.5mg/ml konsantrasyonda KEH hücre canlılığında hafif azalmaya yol açmıştır. Bevacizumab 0.08mg/ml KEH hücrelerinde orta derece DNA sentezini azaltmıştır. KEH proliferasyon hızı 2.5 mg/ml dozunda %65 azalmıştır. RPE ve RGH hücre proliferasyonunda 0.08 mg/ml konsantrasyona kadar inhibisyon gözlenmemiştir. KEH hücre üzerindeki antiproliferatif etkisi daha uzun inkübasyon süresinde değişmemiştir. İntravitreal bevacizumab etkisine ilk maruz kalacak ve belki de en fazla etkilenmesi beklenen RGC hücrelerinde 10 kat konsantrasyona kadar yan etki gözlenmemiştir. Prolifere olan hücre kültüründe KEH ve RGH hücrelerinde sitotoksosite saptanmaz iken, 2.5 mg/ml konsantrasyonda 48 saat sonra ARPE hücrelerinde %30 azalma gözlenmiştir. Çalışmacılar bevacizumabın 0.8 mg/ml konsantrasyonakadar güvenli olduğunu ancak 0.25-0.30 mg/ml (intravitreal 1.25 mg dozuna denk gelmektedir) konsantrasyonundan fazla kullanılmamasını önermektedirler (106). İn vitro hücre kültüründe üç anti-VEGF ilacın kıyaslamalı sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada bevacizumab, pegaptanib ve ranibizumabın RGH, ARPE19 ve KEH hücreleri üzerine klinikte uygulanan dozlara denk gelen konsantrasyonlarında toksisite saptanmamıştır (107).

Başka bir çalışmada bevacizumab 2.5 mg/ml konsantrasyonda RPE hücrelerinde toksik etki oluştururken daha düşük dozlarda toksisite oluşturmamıştır. İnsan optik sinir başı astrosit, insan trabeküler ağ hücresi ve kornea endotel hücrelerinde ise hiçbir dozda toksisite gözlenmemiştir (108).

Maturi ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada tekrarlayan anti-VEGF enjeksiyonların retinaya toksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Aynı çalışmada YBMD’de uygulanan bevacizumab tedavisinin fotoreseptörlere toksik olmadığı elektrofizyolojik testler ile gösterilmiştir (109). Elektrofizyolojik testler anti-VEGF’lerin fotoreseptörlere toksik etkisinin olmadığını gösterirken Lois ve ark. Anti VEGF tedavi uygulanan YBMD olgularının otofloresans görüntülerini değerlendiren çalışmalarının sonucunda RPE atrofisinin sıklıkla karşılaşıldığını bildirmişlerdir(110).

Inan ve ark. tavşan gözlerinde intravitreal 1.25 mg ve 3.0 mg dozlarında bevacizumab enjeksiyonunun oküler toksisitesinin değerlendirildiği çalışmada klinik, elektrofizyolojik ve ışık mikroskopik değerlendirmelerle göz içi yapılar için toksisite lehinde bulgular saptanmamasına rağmen elektron mikroskopik değerlendirmede her iki

doz grubunda 14 ve 28. günlerde alınan kesitlerde fotoreseptör iç segmentlerinde kristalarda destrüksiyon, mitokondrilerde şişme ve parçalanma gözlenmiştir. Saptanan ultrastrüktürel hasarın apoptozise bağlı olup olmadığını anlamak amacıyla preparatlar immünohistokimyasal olarak caspase-3, caspase-9 ve bax boyama yöntemleri ile boyandığında hem düşük hem de yüksek doz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yoğun apoptotik boyanma izlenmiştir (111).

Afliberceptin toksik ve antiproliferatif etkilerinin ranibizumab ve bevacizumab ile karşılaştırıldığı çalışmada; insan retina pigment epitel hücre kültürü (ARPE19) , rat ganglion hücre kültürü (RGH5), fare fotoreseptör hücre kültürü (661W) üzerine aflibercept (0.125 , 0.5 , 2 mg) , ranibizumab (0.125mg) ve bevacizumab (0.3125 mg) belirtilen dozlarda uygulandıktan sonra 1,24,48 ve 72 saat sonrasında hücre morfolojisi, canlılık, apoptozis ve proliferasyonu değerlendirilmiştir.Çalışmadan çıkan sonuca göre ; aflibercept , hücre morfolojisi , apoptozis , hücre canlılığı ve proliferasyon üzerine herhangi bir hücre kültüründe ve herhangi bir konsantrasyonda değişikliğe neden olmamıştır.Genel olarak aflibercept ; bevacizumab ve ranibizumab ile karşılaştırıldığında mevcut parametreler üzerine artırıcı veya azaltıcı yönde bevacizumab ve ranibizumaba göre daha az etkiye sahiptir.Bu çalışmaya göre aflibercept hücre kültürleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı için klinik uygulamalarda güvenle kullanılabilir sonucu çıkmıştır (112).

Lytvynchuk ve ark. Ranibizumab, bevacizumab, pegaptanib ve afliberceptin fibroblast hücreleri üzerine olan doz bağımlı hücresel etkilerini 5 gün boyunca inceledikleri çalışmada; anti-VEGF ilaçların canlılık, mitotik aktivite, ve proliferasyon üzerine inhibe edici etki gösterirken hücresel heterojenite, apoptozis ve otofajiyi artırdıklarını göstermişlerdir.Bu etkinin doz bağımlı olarak değiştiği görülmektedir.Yine bu çalışmada ranibizumabın hücresel büyüme kinetiği üzerine daha az agresif etki gösterdiği ancak diğer üç anti-VEGF ilacın yüksek anti proliferatif ve apoptotik etki göstererek hücresel büyüme kinetiğini olumsuz etkiledikleri görülmüştür (113).

Yetişkin domuzdan elde edilen (retina-RPE-koroid) birleşik kültürü ile sadece nöronal retinanın izole bir şekilde kültür edildiği besiyerlerine 0.25mg/ml, 0.5mg/ml ve 1.25mg/ml olmak üzere üç farklı dozda bevacizumab uygulamasının yapıldığı çalışmada; her iki kültür ortamında kontrol gruplarına göre herhangi bir toksik etkiye

rastlanmamıştır. Aynı çalışmada bevacizumabın klinik dozun 5 katına kadar tolere edilebileceği vurgulanmıştır (114).

Ranibizumab, pegaptanib ve bevacizumabın anjiojenik süreç üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; insan umbilical ven endotel hücreleri üzerine bu 3 ilacın hücre sitotoksitesi, hücre çoğalması, apoptozis, hücre göçü ve anjiogenesis üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak herhangi bir konsantrasyonda hiçbir sitotoksik etkilerine rastlanmamıştır. Aynı çalışmada hücre çoğalması üzerine bevacizumab ve ranibizumabın klinik dozlarının azaltıcı etkisi gözlenmiştir, buna karşılık pegaptanibin hücre çoğalması üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Buna ek olarak insan umbilical ven endotel hücrelerinde apoptozis etkisinin bevacizumab ve ranibizumab tarafından artırıldığı gözlenmiştir. Çalışmacılar sonuç olarak bu üç ajanın endotel hücreleri üzerinde farklı etkiler gösterdiğini vurgulamışlardır (115).

Bizim çalışmamızda ise afliberceptin RPE hücre kültürüne klinik dozda (0.5mg/ml) uygulandığında 72 saat sonra yapılan değerlendirmede apoptozis üzerine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltıcı etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bevacizumab ve ranibizumabın ise klinik dozlarda sırasıyla 0.3125mg/ml ve 0.125mg/ml uygulandığında apoptozisi kontrol grubuna göre indüklediği gözlenmiştir. Aflibercept uygulanan kültürde apoptozisin azalmasına sekonder olarak hücre canlılığında kontrol grubuna göre artış olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bevacizumab ve ranibizumab uygulanan gruplarda ise canlılıkta kontrol grubuna göre anlamlı azalma izlenmiştir. Bevacizumab ve ranibizumabın bu etkisinin apoptozisi artırmaları sonucu ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Proliferasyon ve senesense üzerine olan etkilerine baktığımızda ; üç anti-VEGF ilacında istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek düzeyde bir değişikliğe neden olmadığı sonucuna ulaşıldı.

6. SONUÇLAR

1. Her üç anti-VEGF ilacın (aflibercept, bevacizumab ve ranibizumab) klinik kullanım dozlarında kültür ortamında, uygulamadan 72 saat sonra, RPE hücre proliferasyonuna olumsuz etkisi yoktur.
2. Her üç anti-VEGF ilacın (aflibercept, bevacizumab ve ranibizumab) klinik kullanım dozlarında kültür ortamında, uygulamadan 72 saat sonra, RPE hücre senesensine olumsuz etkisi yoktur.
3. Aflibercept RPE hücre kültürüne klinik dozda (0.5mg/ml) uygulandığında, 72 saat sonra yapılan değerlendirmede, hücre apoptozisini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmaktadır.
4. Aflibercept uygulanan RPE kültüründe apoptozisin azalmasına sekonder olarak hücre canlılığında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış saptanmıştır.
5. Bevacizumab ve ranibizumabın klinik dozlarda sırasıyla 0.3125mg/ml ve 0.125mg/ml RPE hücre kültürüne uygulandığında apoptozisi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı şekilde arttırmaktadır.
6. Bevacizumab ve ranibizumab uygulanan gruplarda hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı azalma izlenmiştir.
7. Anti-VEGF ilaçlar klinikte uygulanırken normal hücrelere toksik etkilerinin olabileceği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Nuzzi R, Tridico F. Local and sysytemic complications after intravitreal administration of anti-vascular endothelial growth factor agents in the treatment of different ocular diseases: A five-year retrospective study. Semin Ophthalmol. 2013 (Epub ahead of print).
2. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. Prog Retin Eye Res. 2003; 22: 1-29.
3. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. Diabetes Care. 2003; 26:2653- 64.
4. Kim J, Kim D, Kim ES, Kim MJ, Tchah H. Topically administered bevacizumab had longer standing anti-angiogenic effect than subconjunctivally injected bevacizumab in rat corneal neovascularization. Int J Ophthalmol.2013; 6: 588-91.
5. Fung AE, Rosenfeld PJ, Reichel E. The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide. Br J Ophthalmol. 2006; 90: 1344-9.
6. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev 2004;25:581-611.
7. Smith LEH. Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP. The Friedenwald Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;19:5177-5182.
8. O'Neill CA, Christian B, Murphy CJ, et al.: Safety evaluation of intravitreal administration of rhuFab VEGF in cynomolgus monkeys for 3 months. Invest Ophthalmol Vis sci. 2000;41:142.
9. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 1998;273:13313-13316.
10. Tran J, Master Z, Yu JL et al.: A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:4349-4354.

11. Yourey P, Gohari S, Su JL, Alderson RF.: Vascular endothelial cell growth factors promote the in vitro development of rat photoreceptor cells. *J Neurosci.* 2000;20:6781-6788.
12. Greenberg DA, Jin K.: From angiogenesis to neuropathology. *Nature.* 2005;438:954-959.
13. Guerrin M, Moukadi H, Chollet P et al.: Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol.* 1995;164:385- 394.
14. Spaide RF, Armstrong D, Browne R.: Continuing medical education review: choroidal neovascularization in age-related macular degeneration - what is the cause? *Retina.* 2003;23:595-614.
15. Marmor MF. Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium. In Marmor MF, Wolfensberger TJ (eds). *The Retinal Pigment Epithelium.* New York, Oxford University Press. 1998, 3-97.
16. Eldred GE. Lipofuscin and other lysosomal storage deposits in the retinal pigment epithelium. In Marmor MR, Wolfensberger TJ (eds). *The Retinal Pigment Epithelium.* New York, Oxford University Press, 1998, 651-668.
17. Saari JC. Enzymes and proteins of the mammalian visual cycle. *Prog Ret,* 1990 , 363-381.
18. Bengisu Ü. Göz Hastalıkları. Palme Yayıncılık, Ankara, 1989: 161-166.
19. Tasman W, Jaeger EA, Rullo C, Montzka D, Zacierka MD. *Duane's Clinical Ophthalmology.* JB Lippincott Company, 1994: 85-110
20. Albert DM, Jakobiec FA. *Clinical Practice Principles and Practice of Ophthalmology.* W.B. Saunders Company, 1994 :835-945
21. Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology, Second Edition.* Mosby, St.Louis, USA, 2004: 245-565
22. Flynn HW. Basic and Clinical Science Course, Section 12, Retina and Vitreous. American Academy of Ophthalmology, San Francisco, USA, 2003-2004: 35-67
23. Aydın P, Akova YA. Göz Hastalıkları. Güneş Kitabevi, Ankara, 2001: 15-35.

24. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.
25. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
26. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al.: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93:1493-1495.
27. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-794.
28. Bhisitkul RB.: Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1542-1547.
29. Kaiser PK.: Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:660-668.
30. Shams N, Ianchulev T.: Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin N Am*. 2006;19:335-344.
31. Usui T, Ishida S, Yamashiro K. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(2):368-74.
32. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUMB Life* 2001; 52: 61-66.
33. Tong JP, Yao YF.: Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions. *Clin Biochem*. 2006;39:267-276.
34. Arjamaa O, Nikinmaa M.: Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res*. 2006;83: 473-483.
35. Ozaki H, Yu AY, Della N, et al.: Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:182- 189.

36. Lin RC, Rosenfeld PJ.: Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin.* 2007;47:117-137.
37. Marnesos AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, et al.: Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol.* 2005;167:1451-1459.
38. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, et al.: Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol.* 1999;155:421-428.
39. Lu M, Adamis AP.: Molecular biology of choroidal neovascularization. *Ophthalmol Clin N Am.* 2006;19:323-334.
40. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al.: Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1994;118:445-450.
41. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, et al.: Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch ophthalmol.* 1996;114:66-71.
42. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, et al.: Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol.* 2002;120:338-346.
43. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al.: Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology.* 1996;120:338-346.
44. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, et al.: Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:154-162.
45. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, et al.: Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:1929-34.

46. Wells JA, Murthy R, Chibber R, et al.: Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 1996;80:363-366.
47. Rakic JM, Lambert V, Devy L, et al.: Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3186-3193.
48. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-7.
49. Malecaze F, Clemens S, Simorer-Pinotel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor mRNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1476-1482.
50. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2155-2162.
51. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50: 1774-1778.
52. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
53. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994; 145: 574-584.
54. Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1219-1228.
55. Mulcahy MF, Benson AB.: III. Bevacizumab in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5:997-1005.

56. FDA Medwatch. Barron H.: Genentech. Important drug warning [letter]. Available at: http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2005/Avastin_dearhcp.pdf. Accessed October 10, 2005.
57. Krohne TU, Eter N, Holz FG, et al. Intraocular pharmacokinetics of bevacizumab after a single intravitreal injection in humans. *Am J Ophthalmol*. 2008;146:508-12.
58. Rosenfeld PJ, Rich RM, Lalwani GA. Ranibizumab: Phase III clinical trial results. *Ophthalmol Clin North Am*. 2006;19:361-72.
59. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009;116:57-65.
60. Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Fung AE, et al. A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *Am J Ophthalmol*. 2009;148:43-58.
61. Heier JS, Brown DM, Chong V, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012;119(12):2537-48.
62. Singerman LJ, Masonson H, Patel M, et al. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: third-year safety results of the VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation (VISION) trial. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:1606-11.
63. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, Kuppermann B, Kenney M. Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol J*. 2013;7:4-10.
64. Chen E, Park CH. Use of intravitreal bevacizumab as a preoperative adjunct for tractional retinal detachment repair in severe proliferative diabetic retinopathy. *Retina* 2006;26:699-700.
65. Hsu J, Kaiser RS, Sivalingam A, et al. Intravitreal bevacizumab (avastin) in central retinal vein occlusion. *Retina* 2007;27:1013-9.

66. Singer MA, Cohen SR, Groth SL, et al. Comparing bevacizumab and ranibizumab for initial reduction of central macular thickness in patients with retinal vein occlusions. *Clin Ophthalmol* 2013;7:1377-83.
67. Evoy KE, Abel SR. Aflibercept: newly approved for the treatment of macular edema following central retinal vein occlusion. *Ann Pharmacother* 2013;47(6):819-27.
68. Tripathi RC, Li J, Tripathi BJ, et al. Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 1998;105:232-7.
69. Davidorf FH, Mouser JG, Derick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina* 2006;26:354-6
70. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:101-11.
71. Wu WC, Yeh PT, Chen SN et al. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in Taiwan. *Ophthalmology* 2011;118(1):176-83.
72. El Wardani M, Ziemssen F, Peters S.: Tuebingen Bevacizumab Study Group. Intensified Monitoring of Circadian Heart Rate and Blood Pressure Before and After Intravitreal Bevacizumab Injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:5227.
73. Eyetech Study Group.: Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age related macular degeneration. *Retina*. 2002;22:143-152.
74. Ferrara N, Damico L, Shams N, et al.: Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2006;26:859-870.
75. Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S.: Side effects of VEGF inhibition. *Ophthalmologie*. 2006;103:484-492.
76. Macugen (pegaptanib sodium) [package insert]. New York: Eyetech Pharmaceuticals, Inc, and Pfizer Inc. 2004.

77. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS et al.: for the MARINA study group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;355:1419-1431.
78. Brown DM, Kaiser PK, Michels M et al.: for the ANCHOR study group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;355:1432-1444.
79. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, et al.: Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004;351:2805-2816.
80. The Eyetech study group.: Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal Neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2003;110:979- 986.
81. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group; Chakravarthy U, Adamis AP, Cunningham ETJr, Goldbaum M, Guyer DR, Katz B, Patel M. Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2006;113:1508.1-25.
82. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:2335-2342.
83. Ma L, Francia G, Vilorio-Petit A et al.: In vitro procoagulant activity induced in endothelial cells by chemotherapy and antiangiogenic drug combinations: modulation by lower-dose chemotherapy. *Cancer Res.* 2005;65:5365-5373.
84. Kilickap S, Abali H, Celik I.: Bevacizumab, bleeding, thrombosis, and warfarin. *J Clin Oncol.* 2003;21:3542.
85. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD et al.: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2006;113:363-372.
86. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al.: Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology.* 2005;112:1035-1047.

87. Spaide RF, Fisher YL.: Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. 2006;26:275-278.
88. Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K.: Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest*. 1997;99: 2351-2357.
89. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F et al.: VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest*. 1999;104:913-923.
90. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D et al.: Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem*. 2003;278:12605-12608.
91. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE et al.: Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol*. 1999;27:78-86.
92. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M et al.: Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*. 2005;23:3697-3705.
93. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H et al.: Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*. 1990;172:1535-1545.
94. Hattori K, Dias S, Heissig B et al.: Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193:1005-1014.
95. Reinders ME, Sho M, Izawa A et al.: Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest*. 2003;112:1655-1665.
96. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T et al.: Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*. 1998;92:4150-4166.
97. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH et al.: Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol*. 1995;62:203-215.

98. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, et al.: Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*. 2004;7:335-345.
99. Steffensmeier AC, Azar AE, Fuller JJ, et al.: Vitreous injections of pegaptanib sodium triggering allergic reactions. *Am J Ophthalmol*. 2007;143:512-513.
100. Ziemssen F, Warga M, Neuhann IM et al.: Tuebingen Bevacizumab Study Group. Does intravitreal injection of bevacizumab have an effect on the blood-aqueous barrier function? *Br J Ophthalmol*. 2006;90:922.
101. Kiss C, Michels S, Prager F et al.: Evaluation of anterior chamber inflammatory activity in eyes treated with intravitreal bevacizumab. *Retina*. 2006;26:877-881.
102. Hariprasad SM, Shah GK, Blinder KJ.: Short-term intraocular pressure trends following intravitreal pegaptanib (Macugen) injection. *Am J Ophthalmol*. 2006;141:200-201.
103. Kernt M, Neubauer AS, Kampik A.: Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment is safe in terms of intraocular and blood pressure. *Acta Ophthalmol*. 2007;85:119-120.
104. Stewart MW. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pre-clinical characteristics of ophthalmic drugs that bind VEGF. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014; 7: 167-80.
105. Luthra S, Narayanan R, Marques LE et al.: Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina*. 2006;26:512- 518.
106. Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A et al.: Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab (avastin) on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1316-1321.
107. Spitzer MS, Yoeruek E, Sierra A, et al.: Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007, Online baskı.
108. Welge-Lussen U, et al.: Bevacizumab has no toxicity on cultured cell from the anterior and posterior segment of the human eye. *EVER*. 2006;7.

109. Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL. Electrophysiologic finding after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina*. 2006; 26: 270-74.
110. Lois N, McBain V, Abdelkader E, Scott NM, Kumari R. Retinal pigment epithelial atrophy in patients with exudative age-related macular degeneration undergoing antivascular endothelial growth factor therapy. *Retina*. 2013; 33: 13-22.
111. Inan UU, Avci B, Kusbeci T, et al.: Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized rhuMAB vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:1773-1781.
112. Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, et al.: Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol* 2013;97: 917–923.
113. Lytvynchuk L, Sergienko A, Lavrenchuk A, and Petrovski G. Antiproliferative, Apoptotic, and Autophagic Activity of Ranibizumab, Bevacizumab, Pegaptanib, and Aflibercept on Fibroblasts: Implication for Choroidal Neovascularization. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Ophthalmology* Volume 2015, Article ID 934963, 10 pages
114. Kaempfer S, Johnen S, Salz AK et al.: Effects of Bevacizumab (Avastin) on Retinal Cells in Organotypic Culture. *IOVS*, July 2008, Vol. 49, No. 7 3164-3171
115. Carneiro A, Falcaõ M, Pirraco A et al. Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Experimental Eye Research* 88 (2009) 522–527.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

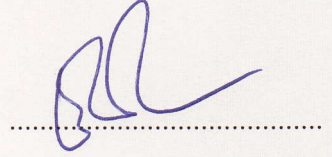
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Mustafa ŞAHİNER'e ait "Retine Pigment Epiteli Hücre Kültürüne Anti-VEGF ilaçların etkisi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

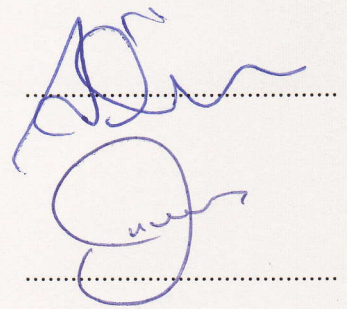
Tarih: 24 / 06 / 2016

İmza

Başkan : Prof. Dr. Kuddusi ERKİLİÇ



Üye : Prof. Dr. Ayşe ÖZTÜRK ÖNER (Danışman)



Üye : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

