

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**İNTRAVİTREAL BEVACİZUMABIN RETİNAL
FOTORESEPTÖR APOPİTOZİSİNİ ARTIRICI ETKİSİNİN
VE
L-KARNİTİNİN KORUYUCULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI**

DR. TALİP ÖREL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**İNTRAVİTREAL BEVACİZUMABIN RETİNAL
FOTORESEPTÖR APOPTOZİSİNİ ARTIRICI ETKİSİNİN
VE
L-KARNİTİNİN KORUYUCULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**HAZIRLAYAN
Dr. TALİP ÖREL**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. SÜLEYMAN KAYNAK**

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 09.KB. SAG.14 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	II
TABLO LİSTESİ	V
RESİM LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
ÖNSÖZ	VIII
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	2
GİRİŞ VE AMAÇ	3
GENEL BİLGİLER	6
MAKULA ANATOMİSİ	6
YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU	8
EPİDEMİYOLOJİ	9
PATOGENEZ	10
YBMD TİPLERİ	10
YBMD TEDAVİSİ	15
ANJİOGENEZ	21
VEGF AİLESİ	22
APOPTOZİS	23
L-KARNİTİN	26
GEREÇ VE YÖNTEM	28
BULGULAR	37
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR	58
KAYNAKLAR	59

SİMGELER ve KISALTMALAR*

YBMD:	Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
AMD:	Age-related Macular Degeneration
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)
H&E:	Hematoksilen-Eozin
RPE:	Retina Pigment Epiteli
mm:	Milimetre
FAZ:	Foveal Avasküler Zon
µm:	Mikrometre
FA:	Floresein Anjiyografi
KNV:	Koroidea Neovaskülarizasyonu
PEDF:	Pigment Epithelium-Derived Factor (Pigment Epitel Kaynaklı Faktör)
MPS:	Macular Photocoagulation Study
PED:	Pigment Epitel Dekolmanı
İSYA:	İndosiyanin Yeşil Anjiyografisi
AREDS:	Age-Related Eye Disease Study
IU:	International Unit
mW:	Miliwatt
FDT:	Fotodinamik Tedavi

** Simgeler ve kısaltmalar metinde geçiş sıralarına göre sıralanmış olup, metinde kullanılış şekline göre İngilizce ve Türkçe açıklamaları yapılmıştır.*

BPD-MA:	Benzoporphyrin Derivative Monoacid (Benzoporfirin Derivatif Monoasit)
LDL:	Low-Density Lipoprotein (Düşük Ağırlıklı Lipoprotein)
nm:	Nanometre
İVTA:	İntravitreal Triamsinolon Asetonid
FDA:	US Food and Drug Administration
VISION:	VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation
MARINA:	Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration
ANCHOR:	The Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration
POHS:	Presumed Ocular Histoplasmosis Syndrome (Tahmini Oküler Histoplazmozis Sendromu)
PIGF:	Placental Growth Factor (Plasental Büyüme Faktörü)
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü)
Ca:	Cancer
ATP:	Adenozin Trifosfat
TNFR:	Tumor Necrosis Factor Receptor (Tümör Nekroz Faktör Reseptörü)
DNA:	Deoksiribonükleik Asid
RNA:	Ribonükleik Asid
Kaspaz:	Cysteine Aspartate Spesifik Proteases
ICE:	Interleukin 1- β Converting Enzyme (İnterlökin 1- β Dönüştürücü Enzim)
ICAM:	Intracellular Adhesion Molecules (İntrasellüler Adhezyon Molekülleri)
KoA:	Koenzim A
PLL:	Poly-L-lysine
TdT:	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz

TUNEL:	The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick and Labelling
DAB:	Diaminobenzidine
PBS:	Phosphate-Buffered Saline (Fosfatla Tamponlanmış Salin)
OsO₄:	Osmiyum Tetroksit
DDSA:	Dodecenyl Succinic Anhidrit
BDMA:	Benzyl Dimethylamine
SD:	Standart Deviasyon
PrONTO:	The Prospective Optical Coherence Tomography Imaging of Patients with Neovascular AMD Treated with intraOcular Ranibizumab
OKT:	Optik Koherans Tomografi
SANA:	Systemic Avastin for Neovascular AMD
VIBERA:	Intravitreal Injection of Bevacizumab and Ranibizumab
ARPE19:	Kültüre Edilmiş İnsan Retina Pigment Epitel Hücreleri
CEC:	Choroideal Endothelial Cells (Koroideal Endotel Hücreleri)
RGC-5:	Retinal Ganglion Cells (Retinal Ganglion Hücresi)
R28:	Rat Nörosensöryel Hücreleri
HMVECad:	Human Microvascular Endothelial Cells, Adult Dermis (İnsan Mikrovasküler Endotel Hücreleri)
ERG:	Elektroretinografi
kD:	kiloDalton

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Beaver Dam Eye Çalışması Sonuçları	9
Tablo 2: Bcl-2 grubu proteinler	25
Tablo 3: Çalışmaya alınan tavşan grupları	28
Tablo 4: Işık mikroskopik doku takip protokolü	29
Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü	30
Tablo 6: TUNEL uygulama prosedürü	32
Tablo 7: İndirekt immünohistokimyasal boyama prosedürü	34
Tablo 8: Çalışma ve kontrol grubu gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri	41
Tablo 9: L-karnitin uygulanan ve uygulanmayan tavşanlarda, intravitreal bevacizumab uygulanan gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri	43

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Retinanın Katmanları	8
Resim 2: Kuru tip YBMD’de OKT ve FA bulguları	12
Resim 3: Yaş tip YBMD’de OKT ve FA bulguları	13
Resim 4: 1a grubundaki gözlerin ışık mikroskopik bulguları	37
Resim 5: 1b grubundaki gözlerin ışık mikroskopik bulguları	38
Resim 6: 1c grubundaki gözlerin ışık mikroskopik bulguları	38
Resim 7: 1a,1b ve 2a,2b grubu gözlerin TUNEL ile boyanma bulguları	40
Resim 8: 1c ve 2c grubu gözlerin TUNEL ile boyanma bulguları	41
Resim 9: 1c ve 2c grubundaki gözlerin kaspaz-3 antikoru ile boyanma bulguları	44
Resim 10: 1a ve 1b grubunun elektron mikroskopik bulguları	46
Resim 11: 1c ve 2c gruplarının elektron mikroskopik bulguları	46

SEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** İntravitreal bevacizumab uygulanan gözler ve kontrol grubu gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri 42
- Şekil 2:** İntraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanlarda, intravitreal bevacizumab uygulanan gözler ve kontrol grubu gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri 42
- Şekil 3:** İntraperitoneal L-karnitin uygulanan ve uygulanmayan tavşanların çalışma gözlerinin TUNEL boyanma yüzdeleri 43

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sürecinde değerli önerilerini ve bilimsel katkılarını esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Süleyman Kaynak'a, mikroskopik ve immünohistokimyasal incelemeleri yapan ve tezimizdeki mikroskopik görüntüleri sağlayan Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Candan Özoğul ve Dr. Serap Cilaker Mıçlı'ya ve çalışmanın istatistiksel analizini gerçekleştiren Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Türkan Günay'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Asistanlık eğitimim boyunca oftalmoloji bilimini bana öğreten, deontolojik ve ahlaki değerlerini bana aktaran; Prof. Dr. Güray Çingil, Prof. Dr. Mehmet Ergin, Prof. Dr. Osman Saatçi, Prof. Dr. İsmet Durak, Prof. Dr. Üzeyir Günenç, Prof. Dr. Meltem Söylev Bajin, Prof. Dr. Tülin Berk, Doç. Dr. Hakan Öner, Doç. Dr. Zeynep Özbek Söylemezoğlu, Doç. Dr. Nilüfer Koçak, Doç. Dr. Aylin Yaman ve Uzm. Dr. Gül Arıkan Özden'e sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım. Ayrıca bu güzel günleri birlikte geçirdiğim asistan arkadaşlarıma ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan eşim ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

DR. TALİP ÖREL

Kasım 2009

İZMİR

ÖZET

Amaç: İntravitreal bevacizumabın, retinal fotoreseptörler üzerindeki apoptotik etkisinin tavşanlar üzerinde araştırılması ve olası apoptotik etkinin L-karnitin ile önlenip önlenemeyeceğinin gösterilmesi.

Yöntem: Çalışmaya 2–3 kg ağırlığında toplam 30 erkek tavşan (Yeni Zelanda albino tavşan) dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tavşanların tümünün sağ gözlerine ya 2 mg (0,08 ml) ya 4 mg (0,16 ml) ya da 6 mg (0,24 ml) intravitreal bevacizumab (Altuzan, Roche®) uygulandı. Tavşanların sol gözlerine ise sağ gözleri ile aynı hacimde intravitreal salin solüsyonu uygulanarak kontrol grubu oluşturuldu. 30 tavşanın 15 tanesine ilaveten intraperitoneal 500 mg/kg L-karnitin uygulandı. İki hafta boyunca tavşanlar DEÜTF Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'nda günlük olarak takip edildi. İkinci haftanın sonunda tavşanlar kurban edildi ve gözler enükle edildi. Enükle edilen gözler; ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal çalışma için saklandı.

Bulgular: Takip süresince kornea ve lensde değişiklik gözlenmedi, herhangi bir retinal komplikasyon gelişmedi. Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama ile yapılan incelemede, çalışma ve kontrol gözlerinde retinal toksisiteye rastlanmadı. Elektron mikroskopisi, immünohistokimyasal yöntem ve TUNEL tekniği ile yapılan incelemelerde bütün intravitreal bevacizumab uygulanan gruplarda; ultrastrüktürel hasar, DNA fragmentasyonu ve kaspaz-3 ile boyanma gözlemlendi. 2 mg ve 4 mg intravitreal bevacizumab uygulanan gruplarda ultrastrüktürel hasar ılımlı düzeyde iken, 6 mg intravitreal bevacizumab uygulanan grupta ultrastrüktürel hasar şiddetliydi. 2 mg ve 4 mg intravitreal bevacizumaba ilaveten intraperitoneal L-karnitin uygulanan grupta hücresel hasar saptanmadı. 6 mg intravitreal bevacizumab uygulanan grup ile ilaveten intraperitoneal L-karnitin uygulanan grup arasında hücresel hasar açısından anlamlı farklılık yoktu.

Sonuçlar: İntravitreal bevacizumab, bütün doz gruplarında retinal fotoreseptör hücreleri üzerinde apoptozise neden olmaktadır. İntraperitoneal uygulanan L-karnitin, 2 mg ve 4 mg intravitreal bevacizumab dozlarında bu hasarı önleyebilirken, 6 mg intravitreal bevacizumab dozlarında bu hasarı önleyememektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, İntravitreal bevacizumab, L-karnitin, VEGF inhibisyonu, Yaşa bağlı makula dejenerasyonu

SUMMARY

Purpose: To evaluate the apoptotic effect of intravitreal bevacizumab on retinal photoreceptor cells in rabbits and to demonstrate if L-carnitine prevents this probable apoptotic effect.

Methods: Thirty male rabbits (New Zealand, albino) weighing 2 to 3 kg each were used in this study. All rabbits' right eyes underwent intravitreal bevacizumab of either 2 mg (0,08 ml), 4 mg (0,16 ml) or 6 mg (0,24 ml). 15 rabbits underwent intraperitoneal 500 mg/kg L-carnitine additionally. All rabbits' left eyes, which had the same amount of intravitreal saline solution with their right eyes, were tested as control. Rabbits' eyes were observed daily for two weeks. After two weeks, rabbits were sacrificed and globs were enucleated. Enucleated eyes were preserved for light microscopic, electron microscopic and immunohistochemical investigation.

Results: During the follow-up period, cornea and the lens remained unchanged, no retinal complications were detected. In both enjection and control eyes there was no significant retinal toxicity in histological sections which were performed by hematoxylin and eosin (H&E) staining. Ultrastructural damage, DNA fragmentation and caspase-3 immunostaining in all intravitreal bevacizumab groups were observed with electron microscopy, immunohistochemical method and TUNEL method. The ultrastructural damages in 2 and 4 mg intravitreal bevacizumab groups were mild but serious in 6 mg intravitreal bevacizumab group. No cellular damage was detected in 2 and 4 mg intravitreal bevacizumab groups which underwent intraperitoneal L-carnitine additionally. There was no significant difference in cellular damage in both 6 mg intravitreal bevacizumab groups with or without additional intraperitoneal L-carnitine.

Conclusion: Intravitreal bevacizumab causes apoptotic effects on retinal photoreceptor cells with all doses of intravitreal bevacizumab. Intraperitoneal L-carnitine could prevent this damage in 2 and 4 mg intravitreal bevacizumab groups despite this results there was no inhibiting effect of L-carnitine on apoptotic damage in 6 mg intravitreal bevacizumab group.

Key words: Age-related macular degeneration, apoptosis, Intravitreal bevacizumab, L-carnitine, VEGF inhibition

GİRİŞ VE AMAC

Sağlık standartlarının gelişmesi ve beklenen yaşam süresinin artması ile özellikle gelişmiş toplumlarda yaşlı nüfus ve beraberindeki sağlık sorunları gün geçtikçe artmaktadır. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (YBMD) da yaşlı nüfusta görülen başlıca sağlık problemlerinden birini teşkil etmektedir. YBMD, gelişmiş ülkelerde 65 yaş üzeri toplumda merkezi görme kaybı ve körlüğün en sık sebebinin oluşturmaktadır. Dünya’da 161 milyon görme azlığı olan hastanın % 8.7’si YBMD’ a bağlı olarak az görmektedir (1). Gelişim mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olan hastalık, multifaktöryel etiyojolojiye sahiptir. Artan yaş ile birlikte; metabolik, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile koryokapillaris, Bruch membranı, retina pigment epiteli (RPE) ve fotoreseptör dejenerasyonu meydana gelmektedir. Bruch membranının yapısında meydana gelen değişiklikler ve anormal birikintiler sonucunda makrofajların, dev hücrelerin, kompleman ve immün komplekslerin eşlik ettiği kronik bir enflamasyon ortaya çıkar. Enflamasyonun tetiklediği hipoksi ve iskemiye bağlı olarak anjiyojenezisi aktive ve inhibe eden faktörler arasındaki dengenin bozulması, koroidea neovaskülarizasyonu (KNV) ile sonuçlanır. Bu süreç sonunda görme kaybı; eş zamanlı sıvı birikimi, kanama, lipid eksudasyonu ve fibrozis ile birlikte giden koryoretinal atrofi veya KNV sonucu gerçekleşen fotoreseptör hasarına bağlı olarak gelişmektedir.

YBMD temel olarak 2 tipe ayrılır: non-neovasküler (kuru, atrofik) tip ve neovasküler (yaş, eksudatif) tip. YBMD’li hastaların %90’ında non-neovasküler tip mevcutken, %10’unda neovasküler tip mevcuttur. YBMD’ye bağlı legal körlüklerin %90’ı neovasküler tipe bağlı olarak gelişirken, sadece %10’u non-neovasküler tipe bağlı olarak gelişir. YBMD sıklığı, artan yaş ile birlikte artmaktadır. Framingham Göz Çalışması; YBMD sıklığını 52–64 yaşlarında %2, 65–74 yaşlarında %11 ve 75 yaş üzerinde % 28 olarak tespit etmiştir (1). Beaver Dam Eye Çalışması ise YBMD sıklığını, 65–74 yaşlarında %19, 74 yaş üzeri toplumda ise %37 olarak tespit etmiştir (2).

Yaş tip YBMD tedavisinde çeşitli tedavi modaliteleri mevcuttur. Bunlar arasında; lazer fotokoagülasyon, radyoterapi, fotodinamik tedavi, transpupiller termoterapi, intravitreal enjeksiyonlar ve maküler cerrahi yöntemleri bulunmaktadır. Neovasküler YBMD patogenezinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF’in) anahtar rol

oynadığının gösterilmesi (3) ve neovasküler membranlarda VEGF ekspresyonunun arttığının gösterilmesi ile tedavi stratejileri VEGF inhibisyonu yönüne kaymıştır. Anti-VEGF ilaçlar arasında en erken olarak kullanıma sokulanı, bevacizumabdır (Altuzan, Roche®). Bu ilaç öncelikle Amerika Birleşik Devletlerinde kolorektal kanserlerin tedavisinde immünosüpressif ilaçlarla birlikte kullanılmış olup, sonraki dönemde oftalmolojide amaç ötesi (off-label) olarak kullanılmaya başlamıştır (4). Esas olarak bevacizumab, VEGF'in bütün izoformlarını inhibe eden bir özelliğe sahiptir. Molekül yapısının büyüklüğü, sağlıklı retinadan geçişine müsait olmayacak derecede büyüktür ve vitreus içindeki yarı ömrü de bu nedenle diğer moleküllere göre daha uzun olarak yaklaşık üç hafta kadardır.

Ranibizumab (Lucentis®, Genentech Inc) ve VEGF₁₆₅'i inhibe eden pegaptanib (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals) bevacizumabtan sonra kullanıma giren ve esas olarak intravitreal kullanım amaçlı olarak üretilmiş diğer iki anti-VEGF molekülleridir. Ranibizumab ve pegaptanib, YBMD tedavisinde intravitreal kullanım için FDA (US Food and Drug Administration) onayı almışken bevacizumab, göz hastalıkları için kullanım ruhsatı olmayan, sadece metastatik kolon kanserleri için FDA (US Food and Drug Administration) onayı almış bir ilaçtır. Bevacizumab, intravitreal kullanım için üretilmemiş olsa da ucuz olması nedeniyle bir dönem yaygın olarak intravitreal tedavide kullanılmıştır. Ülkemizde bevacizumabın intravitreal kullanımına Sağlık Bakanlığı tarafından, amaç ötesi (off-label) ilaç kullanımı adı altında, çeşitli şartlara bağlanarak Haziran 2007'den beri izin verilmektedir. Bu nedenle, ülkemizde de bevacizumab kullanımı bir dönem oldukça yaygınlaşmıştır. Bu uygulamaların sonuçlarına ilişkin oftalmoloji literatüründe bir çok yayın olmakla birlikte, bunlar daha çok olgu serilerinden ibaret ve retrospektif ağırlıklı çalışmalardır.

Özellikle amaç ötesi kullanılmakta olan bevacizumab, gerek kullanım alanı, gerek uygulama tekniği ve gerekse doz ve yanetki/toksisite çalışmaları açısından pek çok tartışmanın konusu olmuştur. Bizim bu çalışmamız da bu alandaki bilgileri artırmak amacı ile düzenlenmiş bir çalışmadır.

Yapılan klinik çalışmalar intravitreal bevacuzimab uygulamasının görme düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığını göstermiştir (4). Genel kabul görmüş standart bir uygulama protokolü yoktur. Her klinik kendi protokolünü uygulamaktadır. Intravitreal

uygulama dozu 1.25 mg–2.5 mg aralığındadır. Oküler kullanımda 1 haftadan daha uzun bir süre sistemik dolaşımında kalır. Oküler komplikasyonlar arasında; korneal abrazyon, kemozis, lens yaralanması, oküler inflamasyon, retina pigment epitel ayrılması, akut görme kaybı yer almaktadır. Sistemik komplikasyonlar ise; beyin infarktı, sistolik kan basıncında yükselme, yüz derisinde kızarıklık, kaşıntıyla birlikte yaygın döküntü, menstrüel düzensizlik olarak belirtilmiştir. Ancak bunlar oldukça nadir görülen komplikasyonlardır (5).

VEGF'in öncelikli hedef hücresi vasküler endotel hücresi olsa da çalışmalar, retina pigment epiteli hücreleri (RPE) üzerinde de mitojenik etkileri olduğunu göstermiştir (6). Yapılan son çalışmalarda VEGF'in sadece endotel hücreleri için değil aynı zamanda nöronal hücreler için de yaşam açısından son derece önemli bir ajan olduğu ve nöroprotektif etkisinin de var olduğu gösterilmiştir (7). Endotel ve nöron hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli olan VEGF'in bütün izoformlarının inhibisyonu, neovaskülarizasyonun önlenmesi gibi faydalı etkiler sağlasa da retinal hücrelerde apoptozise yol açarak istenmeyen etkilere de neden oluyor olabilir. İnan ve arkadaşlarının (8) 2007 yılında yayınladıkları makalede, intravitreal bevacizumab uygulanması ile fotoreseptörlerde apoptozisin varlığını immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik çalışma ile göstermeleri, bevacizumab ile anti-VEGF tedavisinin güvenilirliğini sorgulamamız gerektiği sonucunu doğurmuştur.

Bu kadar yaygın kullanılan bir ilacın ultrastrüktürel yan etkileri hakkında yeterli bilgi ve yayın olmayışı, bizi bu konuda aydınlatıcı araştırma yapmaya sevk etmiştir. Yaptığımız bu çalışma ile intravitreal uygulanan bevacizumabın retinal fotoreseptörler üzerinde apoptozise yol açıp açmadığını, açıyorsa oluşan apoptozisin intraperitoneal uygulanan L-karnitin ile önlenip önlenemeyeceğini göstermeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1. MAKULA ANATOMİSİ

Makula, arka kutupta bulunan yaklaşık 5 mm çapında oval bir alandır. Optik diskin 3 mm temporalinde ve 0,8 mm inferiorunda yer alır. Histolojik olarak ksantofil pigmenti taşıyan ve birden çok ganglion hücre tabakasının mevcut olduğu retina bölgesidir. Makula, kendi içerisinde klinik önemine göre; fovea, foveola, umbo, foveal avasküler zon (FAZ), parafovea ve perifovea gibi bölümlere ayrılır (9,10).

Fovea: Makula merkezindeki iç retinal satıhta yer alan bir çöküntüdür. Çapı ortalama bir optik disk çapı kadardır (1.5mm). Oftalmoskopide, retinanın artmış kalınlığından ve parafoveal bölgedeki internal limitan membrandan doğan, oval biçimde bir ışık röflesi ile teşhis edilir (9).

Foveola: Foveanın merkezi zeminini oluşturur ve 0.35 mm çapa sahiptir. Bu bölge retinanın en ince kısmı olup, ganglion hücresi ihtiva etmez, sadece rodler ve konlardan oluşmuştur (10).

Umbo: Umbo, foveanın merkezindeki çukurluğu ifade eder. Retinanın en keskin görmeye sahip bölümüdür. Foveanın ve umbonun baskın fotoreseptörleri konilerdir. Konilerin en yüksek konsantrasyonu umboda 150–200 µm çapında bir alanda görülür (10).

Foveal Avasküler Zon: Foveanın içinde santral 450–600 µm çapında bir alandır. Santral retinal arterden kaynaklanan vasküler yapıların bulunmadığı alandır. Kanlanması koryokapillarisden sağlanır. Net sınırları ancak floresein anjiyografi (FA) ile belirlenebilir (9).

Parafovea: Fovea kenarını çevreleyen, 0.5 mm kalınlığındaki bir kemerdir. Merkezden bu mesafeden itibaren, retina tabakalarının 4–6 kat ganglion hücresi ve 7–11 tabaka bipolar hücreleri içeren düzenli mimari özelliği kazandığı gözlenir (10).

Perifovea: Perifovea, parafoveyı 1.5 mm genişliğinde bir kemer olarak sarar. Bölge, pek çok ganglion hücresi tabakası ve 6 sıra bipolar hücre tabakası içermesiyle karakterize edilir (10).

Retina Pigment Epiteli: Hegzagonal hücrelerden oluşan tek katlı bir tabakadır. Bu hücrelerin apikal bölgelerinde yer alan villus şeklindeki uzantılar, fotoreseptörlerin dış segmentlerinin etrafını çevirmiş durumda bulunurlar. Her bir RPE hücresine düşen fotoreseptör sayısı sabittir ve her bir RPE hücresine ortalama 45 fotoreseptör düşer. RPE fotoreseptör fonksiyonunun korunması için hayati öneme sahiptir. Foveada yer alan retina pigment epiteli hücreleri, daha uzun ve daha ince olup fundusun diğer tarafında

bulunanlara nazaran daha büyük melanozomlar içerirler. RPE hücrelerinde yaşla birlikte lipofuksin maddesi birikmeye başlar. Lipofuksinin RPE'ye alınıp sindirilen, fotoreseptör dış segment kaynaklı lipidler olduğu sanılmaktadır (10). RPE Fonksiyonları aşağıdaki gibidir:

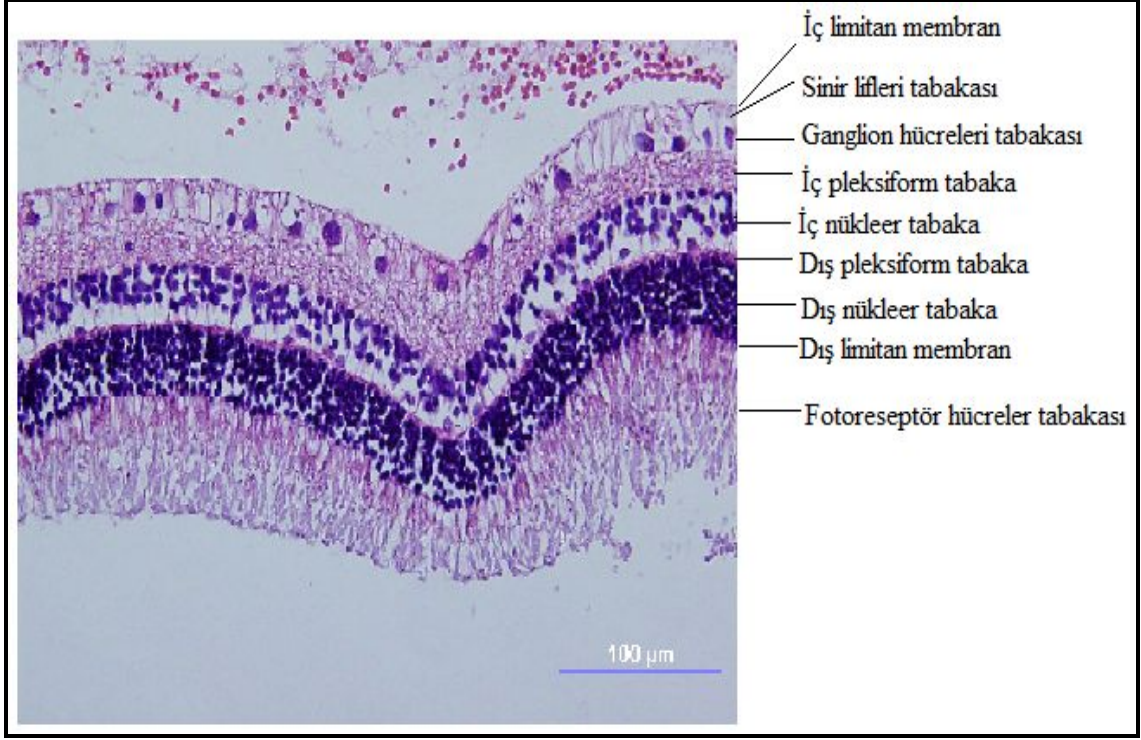
- Hücresel mimariyi sağlamak ve Dış Kan Retina Bariyeri oluşturmak.
- Dağılmış ışığı absorbe etmek.
- Komşu yapıları kontrol etmek için büyüme faktörleri ve anjiojenik faktörleri salgılamak.
- Görsel pigment sentezi ve yenilenmesinin sağlanması
- Fotoreseptör yenilenmesi ve fagositozunun sağlanması
- Fotoreseptörler arası matriks üretimi ve retinal adhezyonun sağlanması
- Elektriksel homeostazın sağlanması
- Yaralanma ve cerrahi sonrası rejenerasyonun sağlanması

Bruch Membranı: Retina pigment epitelini koryokapillarisden ayırır. Elektron mikroskopisi ile beş katman olduğu gözlenir: 1- Retina pigment epitelinin bazal laminası, 2- İç kollajen tabaka, 3- Elastik liflerin kalın bandı, 4- Dış kollajen tabaka, 5- Koryokapillarisin dış tabakasının bazal laminası (9).

Retina Katmanları:

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

Retinanın katmanları Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim1: Retinanın Katmanları (*Tavşan Retinası*)

2. YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU

YBMD, gelişmiş ülkelerde 65 yaş üzeri toplumda merkezi görme kaybı ve körlüğün en sık sebebidir (1). Gelişim mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olan hastalık multifaktöryel etiyojolojiye sahiptir. Artan yaş ile birlikte; metabolik, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile koryokapillaris, Bruch membranı, retina pigment epiteli ve fotoreseptör dejenerasyonu meydana gelmektedir. Bu süreç sonunda görme kaybı; eş zamanlı sıvı birikimi, kanama, lipid eksudasyonu ve fibrozis ile birlikte giden, atrofi veya koroidea neovaskülarizasyonu sonucu gelişen fotoreseptör hasarına bağlıdır (2). YBMD temel olarak 2 tipe ayrılır: non-neovasküler (kuru, atrofik) tip ve neovasküler (yaş, eksudatif) tip. YBMD'nin yaygınlığı gelişmiş ülkelerde, beklenen yaşam süresinin uzamasına bağlı olarak artmakta ve buna bağlı olarak ciddi medikal, sosyal ve ekonomik sorun teşkil etmektedir. Dünya'da 161 milyon görme azlığı olan hastanın % 8.7'si YBMD'a bağlı olarak az görmektedir (1).

2.1. EPİDEMİYOLOJİ

YBMD'li hastaların %90'ında non-neovasküler tip mevcutken, %10'nunda neovasküler tip mevcuttur. YBMD'ye bağlı legal körlüklerin %90'ı neovasküler tipe bağlı olarak gelişirken, sadece %10'u non-neovasküler tipe bağlı olarak gelişir. YBMD sıklığı, artan yaş ile birlikte artmaktadır. Framingham Göz Çalışması; YBMD sıklığını 52-64 yaşlarında %2, 65-74 yaşlarında %11 ve 75 yaş üzerinde %28 olarak tespit etmiştir (1). Beaver Dam Eye Çalışması ise YBMD sıklığını 65-74 yaşlarında %19, 74 yaş üzeri toplumda ise %37 olarak tespit etmiştir (2) (Tablo 1).

Yaş	YBMD Prevelansı		YBMD 10 Yıllık insidansı	
	Erken YBMD	Geç YBMD	Erken YBMD	Geç YBMD
43 -54	8,4	0,1	4,7	0,1
55 -64	13,8	0,6	10,6	1,0
65 -74	18,0	1,4	21,7	4,4
74+	29,7	7,1	28,7	9,5
Toplam	15,6	1,6	10,9	2,1

Tablo 1: Beaver Dam Eye Çalışması Sonuçları

- Framingham Göz Çalışması, beyaz ırk kadınlarda erkeklere oranla orta-ağır YBMD sıklığının biraz daha fazla olduğunu göstermiştir (1).
- YBMD'nin yol açtığı bilateral körlük insidansının beyazlarda, siyahlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (2). Bu farklılığın sebebi, siyah ırkta fazla bulunan melanin pigmentinin anti-oksidan etkisine bağlanmaktadır .
- Nükleer sklerozu olan hastalarda YBMD sıklığı artmış olarak bulunmuş ancak benzer ilişki kortikal katarakt ve arka subkapsüler katarakt ile gösterilememiştir. Ayrıca katarakt cerrahisi YBMD'da progresyona yol açmaktadır. Bu durumun kristalin lensin kısa dalga boylu UV ışınlarını bloke edici etkisinin katarakt

cerrahisi ile ortadan kalkması ve postoperatif dönemdeki inflamasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (11).

- Drusen tipi, sayısı, büyüklüğü, lokalizasyonu, eşlik eden RPE değişikliği ve floresein boyanma paterni (boya sızıntısı), riski belirleyen faktörlerdir. Konfluent ve yumuşak drusenli hastalar özellikle koroideal neovaskülarizasyon (KNV) gelişimi ve jeografik atrofi açısından artmış risk altındadırlar (12).
- Sigara kullanımı ile YBMD riskini arttıran önlenebilir bir faktördür. Günde 25 adet ve üzerinde sigara içenlerde, hiç sigara içmeyenlere göre YBMD gelişimi için rölatif riskin 2.4 olduğu gösterilmiştir (13).
- Obezitenin ve fazla miktarda doymuş yağ asidi ve kolesterol tüketiminin, aterosklerotik sürecin hızlanmasına ve Bruch membranının yapısının bozulmasına yol açarak YBMD riskini arttırabileceği düşünülmektedir (14).

2.2. PATOGENEZ

İlerleyen yaş ile birlikte, RPE hücrelerinde lipofuksin adlı metabolizma ürünü artık maddeler birikmeye başlar. Lipofuksin granülleri, 40 yaşında RPE sitoplazmasının %8'ini, 80 yaşında ise %19'unu işgal etmektedir (15). RPE'nin fagositoz yeteneğinin azalması ile fotoresöptör kaynaklı yıkım ürünleri, RPE'nin hücre membranı ile bazal membranı arasında birikmeye başlar (16). Bruch membranının yapısında meydana gelen değişiklikler ve anormal birikintiler sonucunda makrofajların, dev hücrelerin, kompleman ve immün komplekslerin eşlik ettiği kronik bir enflamasyon ortaya çıkar. Enflamasyonun tetiklediği hipoksi ve iskemiye bağlı olarak anjiojenezisi aktive ve inhibe eden faktörler arasındaki dengenin bozulması, KNV ile sonuçlanır. KNV'de anjiojenezisi inhibe eden en önemli faktör pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF) iken, anjiojenezisi başlatan en önemli faktör VEGF'dir (17).

2.3. YBMD TİPLERİ

YBMD; neovasküler (eksudatif, yaş) tip ve non-neovasküler (atrofik, kuru) tip olmak üzere 2 tiptir. Yumuşak drusen varlığı ve RPE değişiklikleri *erken evre YBMD* olarak adlandırılırken, coğrafik atrofi ve neovasküler tip, *geç evre YBMD* olarak adlandırılır.

2.3.1. Non-Neovasküler YBMD (Atrofik, Kuru Tip)

YBMD'li vakaların %90'ı atrofik tiptir. YBMD'ye bağlı körlüklerin %10'u bu tip ile ilişkilidir. Atrofik tip YBMD'de görülen temel lezyonlar; drusen, RPE değişikliği, RPE'nin coğrafik atrofisi ve fokal hiperpigmentasyonudur. En önemli histopatolojik bulgu drusendir. Drusen genellikle arka kutuba yerleşir ve fundus muayenesinde yüzeyden hafifçe kabarık görünümündedir. Drusen-YBMD ilişkisi şu şekildedir:

I- Drusen yok ya da 63 µm'dan küçük, az sayıda drusen: *YBMD yok* olarak sınıflandırılmıştır.

II- 20'den az sayıda 63- 124 µm arası drusen varlığı veya pigment değişiklikleri, *erken evre YBMD* olarak sınıflandırılmıştır.

III- 20'den fazla 63 -124 µm arası drusen varlığı veya en az bir tane 125 µm'dan büyük drusen varlığı veya makula merkezini tutmayan coğrafik atrofi varlığı, *orta evre YBMD* olarak sınıflandırılmıştır.

IV- Coğrafik atrofi varlığı ise *ileri evre YBMD* olarak sınıflandırılmıştır (18).

Drusen boyutuna göre; *küçük drusen*: 63 µm'dan küçük, *orta drusen*: 63 -124 µm, *büyük drusen*: 124 µm'dan büyük olarak sınıflanır. Klinik görünümüne göre ise; *sert drusen*, *yumuşak drusen*, *gerileyen kalsifik drusen* ve *retiküler drusen* olarak sınıflanır.

Sert Drusen: Bruch membranının iç yüzeyinde hyalin materyal birikimlerinden oluşur. Çapı 63 µm'dan küçük, sınırları belirgin, sarı-gri renkte görülür (19).

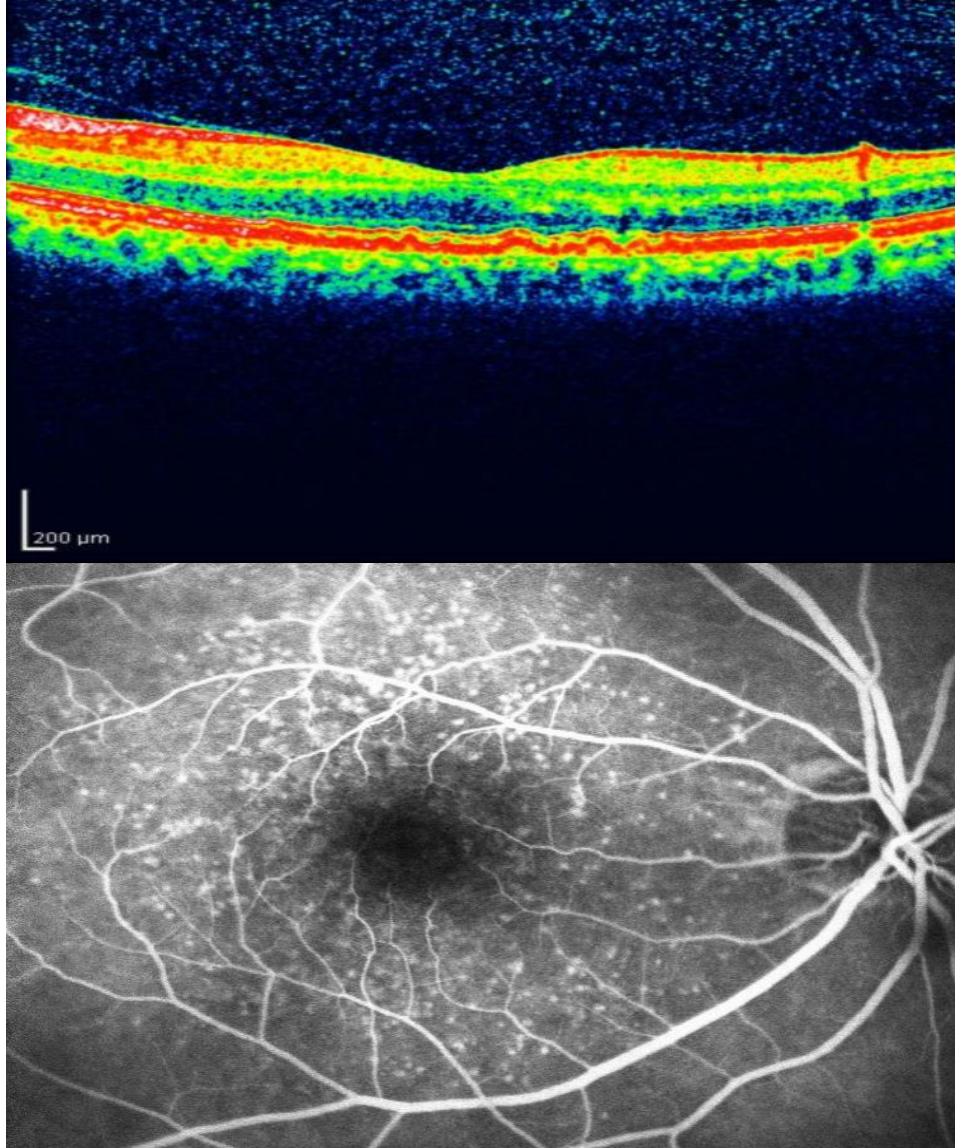
Yumuşak Drusen: Çapı 63 µm'den büyük, sarı renkli, sınırları belirsiz amorf yapıda bazal lineer birikimlerdir. Genellikle birleşme ve kümelenme eğilimindedirler (*konfluent drusen*). Konfluent ve büyük yumuşak drusende coğrafik atrofi ve KNV gelişme riski fazladır (20).

Gerileyen ve Kalsifik Drusen: Drusenin gerilemesi ile ortaya çıkan keskin sınırlı, beyaz, kalsifiye, pigment birikimleri ile seyreden ve bunu zamanla RPE incilmesi veya atrofinin takip ettiği lezyonlardır (20).

Retiküler Psödodrusen: Çoğunlukla düşük koroideal perfüzyon sonucu ortaya çıkan 125–250 µm çapında, sınırları belirsiz, sarımtırak, yuvarlak lezyonlardır. KNV gelişme riski yüksektir (21).

Coğrafik atrofi, en az 175 µm çapında bir sahada koroidea damarlarının görünmesine yola açan, keskin sınırlı yuvarlak veya oval, hipopigmentasyon-depigmentasyon ya da retina pigment epitelinin tam kaybı ile karakterize alan olarak tanımlanmıştır. YBMD'nin %12-21'inde coğrafik atrofiye bağlı ciddi görme kaybı gelişmektedir. Coğrafik atrofi bilateral olmaya meyillidir ve 5–10 yıl içerisinde körlüğe yol

açmaktadır. Bilateral olması durumunda koroidea neovaskularizasyonu gelişme riski 2 yılda %2, 4 yılda %11 olarak bulunmuştur (22). Resim 2’de kuru tip YBMD’de OKT ve FA bulguları gösterilmiştir.

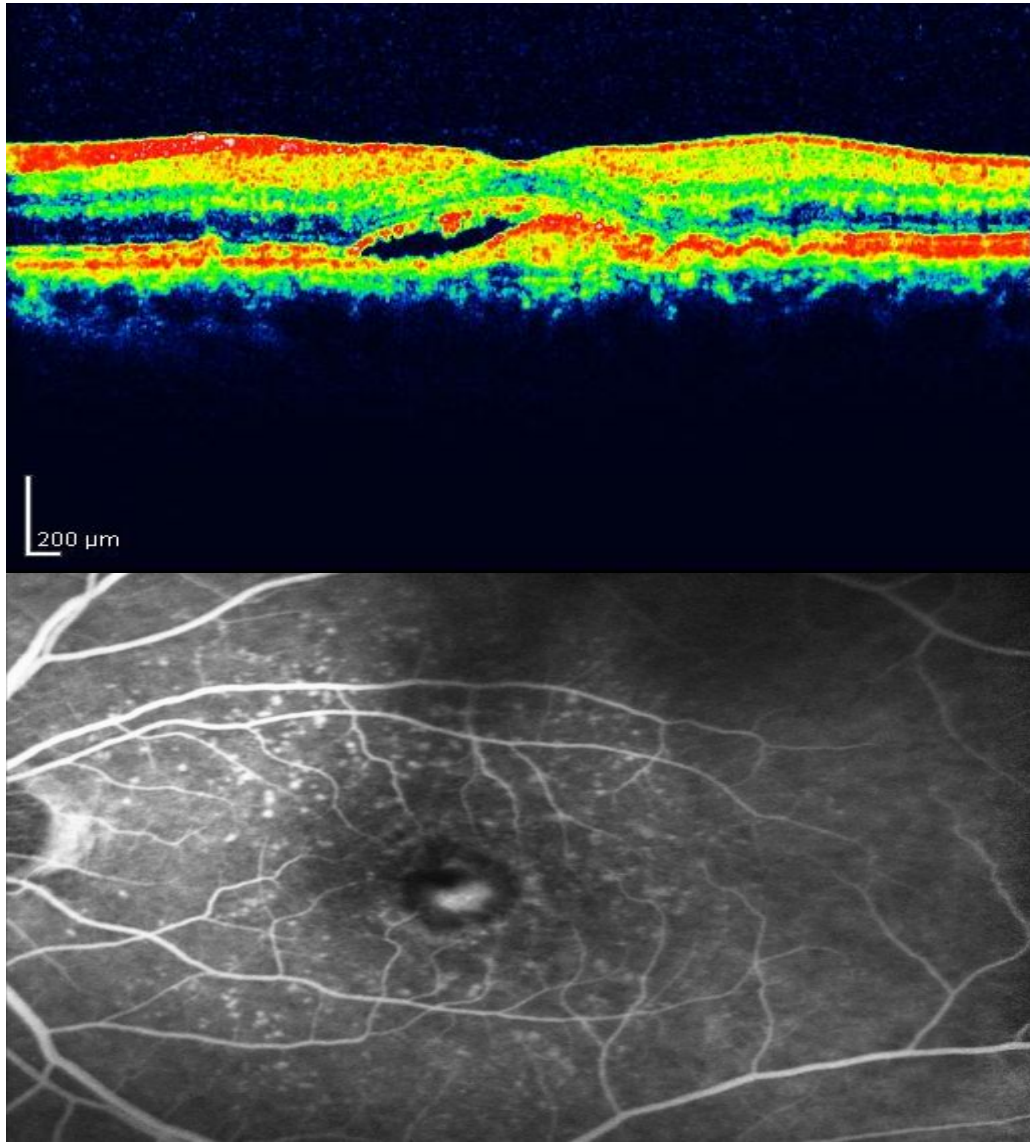


Resim 2: Kuru tip YBMD’de OKT ve FA bulguları (*DEÜ Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD Retina Birimi fotoğraf arşivinden alınmıştır*)

2.3.2. Neovasküler Tip YBMD (Eksudatif, Yaş Tip)

Koroideal neovaskularizasyon (KNV), subretinal alanda kan damarlarının büyümesi sonucu sıvı, kan ve lipit sızıntısıyla ortaya çıkan patolojik bir süreçtir. KNV sıklıkla koryokapillaris kaynaklıdır ve Bruch membranındaki bir yırtıktan RPE altı alana

veya nörosensöryel retina altına doğru yayılım gösterir. RPE'nin elevasyonuna neden olabilen fibrotik proliferasyon ile birlikte (23). KNV temel olarak koryokapillaris-Bruch membranı-RPE-dış retina birleşiminin zarar gördüğü her durumda oluşabilir (24). KNV özel bir uyarıya karşı gelişen nonspesifik ve stereotipik bir yara iyileşmesidir. Yapılan histopatolojik çalışmalarda, KNV'de RPE ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin varlığı gösterilmiştir. KNV'nin aşamaları; başlangıç evresi, inflamatuvar evre ve inflamasyonda gerileme ile beraber hücresel elemanlarda azalmayla karakterize skatrizasyon evresidir (25).



Resim 3: Yaş tip YBMD'de OKT ve FA bulguları (*DEÜ Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD Retina Birimi fotoğraf arşivinden alınmıştır*)

Koroideal Neovaskularizasyonlar, floresein anjiografi (FA) görünümüne göre Maküler Fotokoagülasyon Çalışma Grubu (MPS) tarafından klasik ve okült olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır.

A- Klasik KNV: Anjiogramın erken fazlarında sınırları belirgin, komşu dokulardan kolaylıkla ayırt edilebilen, parlak hiperfloresans veren ve floresein sızması sonucu geç dönemde göllenme gösteren KNV paternidir.

Klasik KNV, foveal avasküler zon (FAZ) merkezine olan uzaklığına göre üç tipe ayrılır (26).

1- Subfoveal KNV: FAZ merkezinde olan lezyonlar

2- Jukstafoveal KNV: FAZ merkezinden 1–199 µm uzaklıkta olan lezyonlar

3- Ekstrafoveal KNV: FAZ merkezine 200 µm'den uzak olan lezyonlar

Klasik KNV içerdiği klasik komponentin miktarına göre de *baskın klasik tip* ve *minimal klasik tip* lezyon olarak tanımlanır.

a- Baskın Klasik KNV: Klasik KNV alanının, tüm lezyon alanının %50 veya daha fazlasını içermesidir.

b- Minimal Klasik KNV: Klasik KNV alanının, tüm lezyon alanının %50'sinden daha azını içermesidir.

B- Okült KNV: FA bulgularına dayanarak Maküler Fotokoagülasyon Çalışma Grubu (MPS), Okült KNV'yi iki farklı gruba ayırmışlardır. Bunlar; *fibrovasküler pigment epitel dekolmanı* ve *kaynağı belirsiz geç sızıntıdır* (27).

1- Fibrovasküler Pigment Epitel Dekolmanı: FFA'da floresein injeksiyonundan 30–60sn sonra sınırları belirgin olmayan, minimal hiperfloresans veren, granüler tarzda boya tutan lezyonlardır. Boya tutulumu hiçbir zaman Klasik KNV'de olduğu gibi keskin sınırlı olmaz (27).

YBMD'deki pigment epitel dekolmanı (PED); RPE altındaki materyalin özelliklerine göre hemorajik PED, seröz PED, drusenoid PED ve fibrovasküler PED şeklinde sınıflandırılır (28).

a- Hemorajik PED: RPE altında kan bulunması nedeniyle FA'nın bütün evrelerinde hipofloresans mevcuttur.

b- Seröz PED: Hem atrofik hem de eksüdatif tip YBMD' de gelişebilir. Erken fazdan itibaren giderek artan, sınırları keskin parlak bir hiperfloresans oluştururlar.

c- Drusenoid PED: Çok sayıda yumuşak drusenin birleşmesinden oluştuğu için girintili çıkıntılı kenarlara sahiptir. FA'da tüm anjiogram boyunca değişmeyen hafif floresans verir.

2- Kaynağı Belirsiz Geç Sızıntı: FA'nın erken fazlarında kaynağı belirlenemeyen zayıf hiperfloresans, geç fazında ise RPE düzeyinde sınırları belirsiz lekeli hiperfloresans şeklinde gözlenir.

Okült KNV, FA'da keskin sınırlara sahip olmasa da indosiyanın yeşil anjiografisi (İSYA)'de keskin sınırlara sahip olarak gözlenebilir. Bazı durumlarda keskin sınırlı damar ağı görülemez ve İSYA'nın geç evrelerinde optik diskten küçük *sıcak nokta (hot spot)* ya da optik diskten daha büyük *plak tarzı boyanma* olarak gözlenir (29).

Yaş tip YBMD aktif dönemi geçirdikten sonra diskiform skar ile sonlanır. Diskiform skarın fibrotik kısmı geç fazda boyanırken, aktif kısmı sızıntıya neden olur. Hiçbir floresein sızıntısı yoksa *saf diskiform skar* olarak, aktif koroidea neovaskülarizasyonu ile birlikte lezyonun dörtte birinden az kısmını kaplayan skar dokusu varsa *neovasküler skar* olarak adlandırılır.

2.4. YBMD TEDAVİSİ

2.4.1 Non-Neovasküler YBMD Tedavisi:

Yaşa Bağlı Göz Hastalıkları Çalışma Grubu (AREDS); YBMD'da yüksek doz antioksidan vitaminlerin (400 IU vitamin E, 500 mg vitamin C ve 15 mg beta karoten) ve minerallerin (80 mg çinko oksit ve 2 mg bakır oksit) alımını önermektedir. Son çalışmalarda lutein, ksantin ve zeaksantin de YBMD profilaksisinde etkin olduğu gösterilmiştir. Antioksidan tedavi ile 5 yıllık takipte tek taraflı orta derecede veya ileri YBMD'de progresyonu %25, orta derecede görme kaybı (3 sıra veya daha fazla) riskini %19 azalttığını bildirmektedir. YBMD olmayanlarda veya erken YBMD'deki faydalı oldukları gösterilememiştir (30). Kuru tip YBMD tedavisinde antioksidan vitamin ve mineraller dışında önerebilecek tedavi protokolü bulunmamaktadır.

2.4.2 Neovasküler YBMD Tedavisi:

Yaş tip YBMD tedavisinde çeşitli tedavi modaliteleri mevcuttur. Bunlar arasında; lazer fotokoagülasyon, radyoterapi, fotodinamik tedavi, transpupiller termoterapi, intravitreal enjeksiyonlar ve maküler cerrahi bulunmaktadır.

A- Lazer Fotokoagülasyon: Ekstrafoveal ve jukstafoveal lezyonlarda birçok klinik çalışma ile etkinliği gösterilmiş bir tedavi şeklidir. Fotoreseptör ve retina pigment

epitelinde geri dönüşsüz hasara yol açarak merkezi görme kaybına yol açabileceğinden subfoveal lezyonlarda kullanılmaz. Maküler Fotokoagülasyon Çalışma Grubu (MPS)'nin verilerine göre, tedavisiz bırakılan hastalarda ağır görme kaybı (≥ 6 sıra görme kaybı) ektrafoveal lezyonu olan olgularda %64, jukstafoveal lezyonu olan olgularda %58 iken, lazer fotokoagülasyon uygulanan hastalarda bu oranlar sırası ile %46 ve %49 olarak daha az bulunmuştur. Günümüzde lazer fotokoagülasyon tedavisi ektrafoveal lezyonlar ile sınırlıdır ve birçok jukstafoveal lezyonda bile kullanılmamaktadır (31,32).

B- Radyoterapi: YBMD tedavisinde kullanılan radyoterapi yöntemleri teleterapi ve brakiterapidir. YBMD hastalarına teleterapi uygulanan ve 7-11 ay boyunca takipleri yapılan bir çalışmada, radyoterapi alan grupta % 61.3 oranında KNV stabilizasyonu ve regresyonu sağlanırken, görme keskinliği % 80.6 oranında sabit kalmıştır. Aynı çalışmada tedavisiz bırakılan grupta bütün hastalarda KNV'de progresyon saptanmış ve hastaların % 55'inde görme azalması saptanmıştır. Seçilmiş vakalarda radyoterapi, KNV tedavisinde etkili bir tedavi gibi görünse de, potansiyel tehlikeleri ve tedavi protokollerinin ve takip kriterlerinin tam olarak oturmamış olması nedeniyle KNV tedavisinde güncelliğini kaybetmiştir (33).

C- Transpupiller Termoterapi: Diod lazer kullanılarak retina pigment epiteli ve koriokapillaris ısısı, vücut ısısının 10 derece üzerine çıkarılır ve geri dönüşsüz hasar oluşturulur. 810 nm dalga boyunda diod lazer, 800 mW enerji altında, 3 mm spot çapında, 60 saniye boyunca lezyon üzerine uygulanarak hasar oluşması sağlanır. Hasar mekanizmasında; serbest radikal salınımı, neovasküler damarların trombozu, apoptozis ve anjiogenezisin hipertermik inhibisyonu rol oynamaktadır. Okült lezyonlarda iyi sonuçlar elde ettiği bildirilmiş olsa da yüksek komplikasyon riski nedeniyle güncelliğini kaybetmiştir (34).

D- Makula Translokasyonu: Makula translokasyonunda ana gaye maküler fotoreseptörleri, defektif RPE alanından sağlam RPE alanına taşımaktır. Cerrahi sonrası; retina dekolmanı, makula deliği, epiretinal membran gibi komplikasyonlar görülebilmektedir. Major bir cerrahi olması, cerrahi sonrası nükslerin sık olması ve daha pratik ve efektif yöntemlerin geliştirilmesi ile bu yöntem ancak çok ağır hemorajik dekolmanı olan seçilmiş olgularda uygulanmaktadır (35).

E- Submaküler Cerrahi: Maküler translokasyon yapmadan KNV'nin cerrahi olarak çıkarılmasıdır. Oküler histoplazmozise bağlı KNV ve idiopatik KNV olgularında uygulanmaktadır. YBMD'de kullanımı çok kısıtlıdır. Yüksek nüks ve komplikasyon oranına sahiptir. Submaküler Cerrahi Çalışması'nda submaküler cerrahinin termal lazere üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (36).

F- Fotodinamik Tedavi: Fotodinamik tedavi (FDT) toksik olmayan ışığa duyarlı bir maddenin ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürmesi ve bu kimyasal enerjinin hedef dokuya nakledilmesi sonucunda dokuda oluşan değişikliklerin tedavi edici amaçlı kullanılmasıdır. Günümüzde FDT'de ışığa duyarlı ajan olarak benzoporfirin derivatif monoasit (BPD-MA, verteporfirin) kullanılmaktadır. Verteporfirin (Visudyne®) lipofilik yapıya sahip bir moleküldür. Tümör hücreleri ve hızlı bölünen aktif hücreler tarafından hızlı bir şekilde hücre içine alınır. İn vivo çalışmalar artmış hücre aktivitesinden dolayı verteporfirin neovasküler endotel hücreleri tarafından hızlı ve selektif bir şekilde alındığını göstermiştir. Kan dolaşımında verteporfirin düşük ağırlıklı lipoproteinlere (LDL) bağlanarak bir kompleks oluşturur. LDL-verteporfirin kompleksi hücre yüzeyindeki LDL reseptörleri aracılığıyla ya da endositoz yoluyla hücre içine alınır. Hızlı proliferasyona uğrayan endotel hücrelerinde, LDL reseptör üretiminde artış olduğu bilinmektedir. Bu sayede verteporfirin, özellikle hızlı proliferasyon gösteren endotel hücrelerinde birikime uğrar. Verteporfirin birkaç zirvesi olan uzun absorpsiyon dalga boyuna sahiptir. Melanin, kan ve fibrotik dokulara penetre olabilen 689 nm dalga boyunda ışığı (kırmızı ışık) etkili bir şekilde absorbe eder. Aslında verteporfirin en kuvvetli absorpsiyon zirvesi 400 nm dalga boyu (mavi ışık) civarındadır; ancak bu dalga boyunda oksihemoglobin de absorpsiyon zirvesine sahip olduğu için bu dalga boyu klinik amaçlı kullanılamaz. Verteporfirin kullanılarak yapılan fotodinamik tedavi için en uygun ışık kaynağı 689 nm dalga boyu yayabilen non-termal diod lazerdir.

Fotodinamik tedavinin dokularda neden olduğu tahrip edici etki oldukça karmaşık olmakla beraber, temelde üç mekanizma varlığı tanımlanmıştır. Bunlar hücresel mekanizmalar, damarsal mekanizmalar ve immünolojik mekanizmalardır. Asıl etki mekanizması damarsal mekanizmadır. Damar tıkanmasına giden yoldaki ilk basamak endotel hasarıdır. Oksijen radikalleri ve hücre membranı ile reaksiyona girebilen diğer aktif ürünler endotelde tahribata neden olur. Bir senaryoya göre endotel tahribatı hücre iskeletinde değişimlere, bu da endotel hücrelerinde büzüşmeye ve sonuçta hücrelerin birbirinden uzaklaşarak aralarındaki boşlukların açılmasına neden olur. Oluşan boşluklarda

açığa çıkan bazal membran trombosit aktivasyonu ve agregasyonunu hızlandırır. Trombosit aktivasyonu kan akımında staza ve damar sisteminin kapanmasına neden olur (37). Bu nedenle PDT ‘den, aynı zamanda vazooklüsiv tedavi olarak da bahsedilir. Nadir olarak Verteporfin ile FDT’nin sistemik ve oküler yan etkileri bildirilmiş olup, bu etkiler genellikle geçici niteliktedir. TAP çalışmasında; bel ağrısı %2.5, alerjik reaksiyon %2, enjeksiyon yeri reaksiyonu %15.9, fotosensitivite %3.5, geçici görme şikayetleri %22, ani görme azalması (en az 4 sıra) %0,7 geliştiği bildirilmektedir. Nadir olgularda subretinal veya vitre içi kanama, RPE yırtığı, uzamış koroidal hipoperfüzyon da bildirilmiştir (38).

G- İntravitreal Enjeksiyonlar:

1- Anekortav Asetat: Anekortav asetat anjiostatik bir steroid olup, *kortizen* olarak sınıflandırılan derive bir ilaçtır. Steroidlerin ana yapı iskeleti olan kortizol üzerinde yapılan değişikliklerle üretilen, glikokortikoid aktiviteden arındırılmış ve anjiostatik etkinliği ön plana çıkarılmış moleküller “*anjiostatik kortizenler*” olarak isimlendirilir. Anekortav asetat anjiogenezin matris metalloproteinaz indüksiyonu, ekstraselüler matris yeniden şekillenmesi ve endotel hücre migrasyonu basamaklarını inhibe etmektedir. Uygulama 15 mg dozunda, 6 aylık aralıklarla ve özel olarak hazırlanmış subtenon kanül ile posterior jukstaskleral subtenon enjeksiyon şeklinde yapılır. Anekortav asetat çalışma grubunun on iki aylık sonuçlarında, altı ay ara ile posterior jukstaskleral uygulanan 15 mg anekortav asetatin plaseboya göre görme keskinliğinin korunmasında daha etkili olduğu gösterilmiştir (39).

2- Triamsinolon Asetat: Anti-inflamatuar özellikleri bulunan kortikosteroidlerin VEGF geninin ekspresyonunu inhibe ettikleri gösterilmiştir. Kortikosteroidlerin ayrıca pro-inflamatuar mediatörler tarafından gerçekleştirilen VEGF indüksiyonunu doza ve süreye bağımlı bir şekilde azalttıkları da gösterilmiştir (40). Yaş tip YBMD hastalarında özellikle FDT ile kombine kullanımında faydaları gösterilmiştir. YBMD ile ilişkili olan ve FDT tarafından indüklenen inflamatuvar reaksiyonu ve anjiogenezini inhibe etmektedir. İntravitreal triamsinolon asetonid (İVTA) uygulaması sonrası görülebilen komplikasyonlar; katarakt oluşumu, göz içi basınç yüksekliği, endoftalmi ve regmatojen retina dekolmanıdır (41).

3- Pegaptanib Sodyum: Selektif olarak insan gözündeki en önemli patolojik VEGF izoformu olan VEGF₁₆₅’e bağlanabilme özelliğine sahip RNA aptameri olan pegaptanib sodyum, FDA tarafından onaylanan ilk anti-VEGF ajandır. Antikor olmamasına rağmen antikor gibi davranır. Farmakokinetiği altı haftada bir vitre içi

uygulanmasını gerektirir. VEGFA'nın heparin bağlama alanına bağlanarak VEGF₁₆₅ ve daha büyük izomerlerin VEGF reseptörüne bağlanmasını engeller (42). Pegaptanib sodyum ile yapılmış 1208 neovasküler YBMD hastasının dahil edildiği Faz 2/3 çalışması olan VISION (VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation) Çalışması'nın sonuçları 2004 yılında açıklanmıştır. Tüm anjiyografik lezyon tiplerinin dahil edildiği çalışmada, 54 haftanın sonunda 1 yıl boyunca 6 haftada bir pegaptanib tedavisi alan grupta plaseboya göre ciddi görme kaybı (30 harf veya daha fazla) riskinin anlamlı olarak az olduğu (%10-%22) saptanmıştır. Bu sonuçlara göre 0.3 mg pegaptanib sodyum neovasküler YBMD tedavisinde tüm anjiyografik alt tipler için FDA'den kullanım onayı almıştır. VEGF₁₆₅'i selektif olarak etkilemesiyle güvenli oluşu teorik bir üstünlük oluştururken, hızlı sıvı azalması sağlayamaması ve sadece sınırlı olguda görme artışı olması zayıf yönleridir (43).

4- Ranibizumab: Bevacizumabın molekül büyüklüğünün fazla olması nedeniyle VEGF'e karşı monoklonal antikorun antijen bağlayan kısmının pepsin ayırma yöntemiyle ayrılması sonucu elde edilen monoklonal antikor parçasının etkinliğinin bevacizumabdan daha üstün olacağı düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak, insan VEGF'ine karşı fareden elde edilen monoklonal antikorun antijen bağlayan parçasının (Fab fragmanı) çeşitli işlemlerden geçirilmesi ile ranibizumab elde edilmiştir (44). Ranibizumab, 2006 yılında tüm yaş tip YBMD olguları için FDA onayı almıştır. Ranibizumab da bevacizumab gibi bütün VEGF izoformlarını inhibe eder (45).

Faz 1-2 klinik çalışmalarında, ranibizumabın güvenilir ve aktif olduğunun gösterilmesi üzerine neovasküler YBMD tedavisinde kullanımını ile ilgili iki büyük faz 3 çalışması yapılmış olup bunlar MARINA ve ANCHOR Çalışmaları'dır.

Çok merkezli, 2 yıllık, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışma olan MARINA (Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration) Çalışması'nda, minimal klasik veya okült lezyonları olan hastalar, 24 aylık 0.3 mg veya 0.5 mg intravitreal ranibizumab enjeksiyonu veya plasebo tedavisi almak üzere gruplara ayrılmıştır. 24 ay boyunca ayda bir enjeksiyon şeklinde uygulanan intravitreal ranibizumab tedavisinin, sadece ciddi görme kaybını önlemekle kalmayıp, görme keskinliğinde kazanç sağladığı da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre ranibizumab tedavisi, pegaptanib tedavisine göre görme kazancı sağlama konusunda daha üstün görünmektedir (46).

Baskın klasik lezyonların tedavisinde kullanım için FDA onayı almış FDT ile aynı tip lezyonlarda ranibizumabın etkinliğinin karşılaştırılması amacıyla ANCHOR (The Anti-

VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularisation in Age-Related Macular Degeneration) Çalışması yapılmıştır. Bu çalışma da çok merkezli, çift kör bir çalışma olup, 1 yıllık sonuçlarında intravitreal ranibizumab enjeksiyonunun hem görme keskinliğinde artış hem de lezyon boyutları ve sızıntısında azalma açısından FDT'ye üstün olduğu gösterilmiştir. İntravitreal ranibizumab enjeksiyonu yan etki açısından güvenli bulunmakla birlikte, intraoküler enflamasyon bazı hastalarda gözlenebilmektedir. 0.5 mg dozda daha belirgin olmak üzere, her iki dozda da iridosiklit, vitritis ve üveit gibi yan etkiler % 10–15 oranında ortaya çıkmaktadır (47).

5- Bevacizumab: Fare epitoplalarının insana uyarlanması ile elde edilmiş VEGFA'nın bütün izoformlarını bloke eden monoklonal antikordur. Göz hastalıkları için kullanım ruhsatı olmayan, metastatik kolon kanserleri için FDA onayı almış bir ilaçtır. Bevacizumab büyük moleküler yapıya sahip olduğu için subretinal neovaskülarizasyonların tedavisinde iç limitan membranı ve iç pleksiform tabakayı aşamayacağı, bu nedenle retinaya penetre olamayacağı ve retina altındaki KNV'yi tedavi edemeyeceği düşünülerek bevacizumabdan daha küçük molekül ağırlığına sahip ranibizumab türetilmiştir (48). Bu daha küçük antikor fragmanının retinanın tüm tabakalarından penetre olması ve terapötik potansiyelinin daha fazla olması gibi avantajları olmasına rağmen, bevacizumab oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde intravitreal uygulama ile klinik yerini almıştır ve daha düşük maliyete sahiptir (49). Yapılan klinik çalışmalar intravitreal bevacuzimab uygulamasının görme düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığını göstermiştir (4). Vertoporfirin gibi genel kabul görmüş standart bir uygulama protokolü yoktur. Her klinik kendi protokolünü uygulamaktadır. Genelde yapılan uygulama, tek başına ya da kombine tedavilerde ilk doz uygulayıp aylık kontrollerde OKT ve muayene bulgularına göre KNV aktivitesi devam ediyor ise intravitreal tedaviyi sürdürmek şeklindedir. İntravitreal uygulama dozu 1.25- 2.5 mg aralığındadır. Oküler kullanımda bir haftadan daha uzun bir süre sistemik dolaşımında kalır. Oküler komplikasyonlar arasında; korneal abrazyon, kemozis, lens yaralanması, oküler inflamasyon, retina pigment epitel yırtığı ve akut görme kaybı yer almaktadır. Sistemik komplikasyonları ise beyin infarktı, sistolik kan basıncında yükselme, yüz derisinde kızarıklık, kaşıntıyla birlikte yaygın döküntü ve menstruel düzensizlik olarak belirtilmiştir. Ancak bunlar oldukça nadir görülen komplikasyonlardır. Göz içi basıncı yüksekliği ise bildirilmemiştir (5).

Bevacizumab ve ranibizumab, Genentech firması tarafından üretilmektedir. Ancak sadece ranibizumab intravitreal kullanım amacıyla üretilmiş olup, bevacizumabın

intravitreal uygulaması ile ilgili firma destekli bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden bevacizumab ile ilgili elde edilen verilerin büyük çoğunluğu retrospektif çalışmalardan kaynaklanmaktadır. Ülkemizde bevacizumabın intravitreal kullanımına, Sağlık Bakanlığı tarafından endikasyon dışı ilaç kullanımı adı altında, çeşitli şartlara bağlanarak Haziran 2007'den beri izin verilmektedir.

2.5. ANJİOGENEZ

Kan damarlarının oluşum süreci, vaskülojen ve anjiogen olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Vaskülojen daha önce avasküler olan dokunun ilk kez damarlanması süreci iken, anjiogen mevcut damarlardan yeni damarların oluşması sürecidir (50). Primordial damarsal sistemin gelişimi vaskülojenesis olarak tanımlanır ve endotelial progenitor hücrelerin (anjioblastlar), embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde, ilkel damarsal ağı oluşturmak üzere farklılaşmasını kapsar.

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi anlamına gelen anjiogen, vücutta fizyolojik sürecin bir parçası olabildiği gibi, patolojik süreçlerin bir parçası olarak da gerçekleşebilir. Embriyogen, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde görülen anjiogen fizyolojiktir. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve bazı göz hastalıklarında anjiogen patolojik olarak ortaya çıkmaktadır (51). Retinal dolaşımdan köken alan neovaskülarizasyon genellikle diabetik retinopati, retina ven oklüzyonu, prematür retinopatisi ve orak hücre retinopatisinde görülür. Koroideal dolaşımdan kaynaklanan neovaskülarizasyon ise YBMD, tahmini oküler histoplazmozis (POHS), dejeneratif miyopi ve travmaya bağlı oluşur (52).

Anjiogen oldukça karmaşık bir mekanizmadır ve ekstrasellüler matriks içindeki ve etrafındaki hücrelerde bulunan pek çok büyüme faktörlerini, sitokinleri ve reseptörleri gerektirir. Anjiogen süreci içinde yer alan en temel hücre damar endotel hücresidir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluştururlar ve her ikisi de ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturan genetik bilgileri içerirler.

Anjiogenin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Henüz tüm anjiogenik etkileşimlerin niteliği netliğe kavuşmamıştır. En büyük olasılık anjiogenik uyarıcılar ve anjiogenin inhibitörleri arasındaki dengenin, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlıyor

olmasıdır. Anjiogenik uyarıların artışı ve anjiogenez inhibitörlerinin azalması anjiogenezi başlatmaktadır (51).

2.6. VEGF AİLESİ

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperailisinin üyesi olan VEGF ailesi, endotel hücreleri için önemli etkilere sahiptir. Vücutta hem fizyolojik olaylarda, hem de tümör büyümesi ve yayılması ve retinal neovasküler patolojileri de içeren birçok hastalığın etiolojisinde rol oynar. Molar cinsinden, vasküler geçirgenlikte histaminden 50.000 kat daha güçlü olduğu saptanmıştır. Vasküler geçirgenlik faktörü, ilk kez klonlandığı ve eksprese edildiği 1989 yılına kadar kısmi olarak tanımlanabilmiş ve bu tarihte güçlü bir in vitro endotel hücre büyüme stimülatörü ve in vivo neovaskülarizasyon stimülatörü olduğu gösterilmiştir (53). VEGF aracılığı ile plazma proteinleri, fibrinojen ve pıhtılaşma faktörleri ekstravaze olmakta, ödem sıvısı ve interstisyel basınç artmakta, normalde anti-anjiogenik olan stroma, proanjiogenik stromaya dönüşmektedir. Endotel hücrelerde gen ekspresyonunu yeniden programlamakta, onları apoptozise karşı koruyarak endotel hücre yaşlanmasını durdurmaktadır. VEGF retinada; ganglion hücreleri, müller hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, perisitler ve glial hücrelerden sentezlenir. Koroideal damarların gelişimi için RPE'den üretilen VEGF gereklidir. VEGF ailesi: VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placental growth factor; PlGF) adı verilen altı üyeden meydana gelmektedir (54).

VEGF-A: Altıncı kromozom'da (6p21.3) kodlanmıştır. Aynı zamanda Human-VEGF olarak da bilinir. VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörleri üzerinden anjiogenik etki gösterir. VEGFR-1 üzerinden pozitif ve negatif anjiogenik etki gösterir. VEGFR-2 üzerinden mitojenik, anjiyogenik ve vasküler geçirgenlik artışı gibi etkilerini gösterir. VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olarak isimlendirilmişlerdir ve isimlerindeki sayılar aminoasit sayılarını göstermektedir. İzofomlar arasında majör bir fark heparine olan affiniteleridir. VEGF₁₂₁ hariç hepsi heparine bağlanmaktadır. VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ ve VEGF₁₆₅ salgılandığında kolayca difüze olur ve erimiş formları sıvılarda saptanabilir. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ ise salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve varlıkları testlerde kolayca saptanamaz. VEGF₁₈₉'un da heparine affinitesi yüksektir. VEGF₁₆₅ majör izoformdur ve endotel hücrelerine güçlü mitojen ve kemotaktiktir (55).

VEGF-B: VEGF-B geni 11. kromozomda q13 bandında yerleşmiştir. VEGF-B'nin alternatif parçalanma yoluyla B-167 ve B-186 olmak üzere iki polipeptid formu oluşmuştur. Hipoksi, VEGF B seviyesini düzenlememektedir. VEGFR-1'e bağlanır ve monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanamaz. Bu nedenle VEGF-B yetersiz endotel hücre mitojeni olarak kabul edilmektedir. Çizgili kaslarda, kalp kasında ve yağ dokusunda fazla bulunduğundan dolayı fonksiyonu yüksek hücrel enerji metabolizması ile ilişkili olabilir (56).

VEGF-C: VEGF-A ile %16 oranında benzeyen 388 aminoasitten oluşmuştur. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelyal hücrelerde mitojenik etki yapar. Yara iyileşmesinde rol alır (57).

VEGF-D: 334 aminoasitten oluşan ve VEGF-A ile % 31 oranında aynı aminoasitler içeren bir proteindir. Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar (54). En fazla embriyogenez döneminde akciğer ve deride bulunur. VEGF-D; melanoma, pankreas Ca, meme Ca, özefagus Ca ve akciğer kanserinde tümör anjiogenezis ve lenfanjiogenezisinde etkili bulunmuştur (58).

VEGF-E: VEGF-A ile aminoasit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir. İnsanda bulunmaz (57).

Plasenta Büyüme Faktörü (Placenta Growth Factor; PIGF): VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni aminoasitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 aminoasit içeren son şekli oluşur. VEGF-B gibi VEGFR- 1'e bağlanarak etki gösterir (57).

2.7. APOPİTOZİS

Yunanca “dökülen yaprak” anlamına gelen apoptozis, patolojide *programlı hücre ölümünü* ifade etmektedir. Morfolojik olarak birbirinden farklı iki tip hücre ölümü şekli olduğunu, ilk kez Avustralya'lı patolojist John Kerr bildirmiştir. Sonrasında yapılan elektron mikroskopi çalışmalarında Kerr, bu fenomeni “*büzüşme nekrozu*” olarak tanımladı. 1972'de Andrew Wyllie ve Alistair R. Currie, bu aktif süreci nekrozdan ayırt etmek için “apoptozis” terimini kullandılar (59). Birçok özelliği nekrotik hücre ölümünün diğer tipleri ile benzerdir. Bazı hücreler uyarının şiddeti ve süresine, ölüm olayının hızına, etkilenen hücrenin adenosin trifosfat (ATP) tüketim hızına bağlı olarak, apoptozis veya

nekroz gösterir. Gelişim sırasında, dokulardaki normal hücre popülasyonunun devamında denge sağlayıcı mekanizma olarak, immün sistem reaksiyonlarında korunma mekanizması olarak, hücreler kalıcı olarak zedelendiğinde ve yaşlılıkta apoptozis görülür. Embriyogenez sırasında hücrelerin programlı yıkımı, hormon bağımlı involüsyon, tümörler ve akut inflamatuvar yanıtta polimorf nüveli lökositlerin ölümü gibi çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olay apoptozisi tetikler.

Apoptozis hücre içinden ve dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyretmekte ve hücrenin fagositozu ile sona ermektedir. Bu aşamalar;

A- Apoptozun başlatılması

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için hücre içi veya dışından gelen bir sinyal ile genetik mekanizmanın uyarılması gereklidir.

1- Hücre dışından kaynaklanan sinyaller:

a- Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği: Hücreler komşu hücrelerden ve ekstraselüler matriksten gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise gitmektedirler.

b- Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu: Bazı sitokinlerin hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak oluşturdukları sinyaller apoptozisi başlatabilir. Apoptoziste rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesidir. Bu reseptör ailesinin birçok üyesi olup bir kısmı apoptozis oluştururken bir kısmı ise apoptozisten korumaktadır. TNFR içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir.

c- Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler: Hipoksi, ısı, anti-neoplastik ilaçlar ve radyasyon DNA hasarı oluşturarak apoptozisi başlatmaktadır.

2- Hücre içinden kaynaklanan sinyaller: DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozukluklarıdır (60,61)

B- Hücre içi proteazların aktivasyonu

Hücre içinden ve dışından gelen sinyaller hücre içindeki kaspaz (cysteine aspartate spesifik proteases) adı verilen proteazları aktive etmektedir. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla kaspazları aktive etmektedir. Sinyaller mitokondri dışı zarında geçirgenliği artırır. Mitokondri dışı zarının geçirgenliği bazı proteinler ile sağlanmaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. bcl-2

grubu proteinlerin bir kısmı pro-apoptotik etkili iken diğer kısmı ise anti-apoptotik etkilidir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar (Tablo 2).

<u>Antiapoptotik</u>	<u>Proapoptotik</u>
<ul style="list-style-type: none">• Bcl-2• Bcl-X1• Bcl-v• Mcl-1	<ul style="list-style-type: none">• Bax• Bad• Bak• Bcl-Xs• Bim• Bid

Tablo 2: Bcl-2 grubu proteinler

C- Kaspaz Ailesi ve Apoptozisdeki Roller

Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir enzim grubudur ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlıdır. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır (62–64). Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Kaspaz 2,8,9,10 *başlatıcı kaspazlar* olarak bilinirken, Kaspaz 3,6,7 *efektör kaspazlar* olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1-β dönüştürücü enzimdir (ICE) ve pro-kaspaz 1 olarak bilinir (65).

Kaspazlar, DNA endonükleazı bağlayan proteini yıkarak DNA kırıkları oluşumuna neden olur. Aktini yıkan proteini aktifleştirerek hücre şekil bozukluğu oluştururlar. Membran iç yüzünde bulunan fosfotidilserini dış yüzeyine yer değiştirir, intrasellüler adhezyon molekülleri (ICAM) ve trombospondin gibi adhezyon moleküllerini açığa çıkarırlar (60,61).

Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunuyorsa da bazı üyeleri, örneğin kaspaz 12, golgi aparatında, kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondride bulunabilir (66). En önemli başlatıcı kaspazlar, tip I apoptozis (mitokondri aracılı, intrinsik) için kaspaz 8, tip II

apoptozis (ekstrinsik) için kaspaz 9, tip III apoptozis (endoplazmik retikulum aracılı) için kaspaz 12'dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir (67).

Apoptozisde hücreler morfolojik olarak yüzey yapılarını ve diğer hücrelerle temas yüzeylerini kaybeder. Hücreler sıvı kaybederek küçülür ve büzülür. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirlerine yakınlaştığı görülür. Membranlar bütünlüklerini korurlar ve organeller genel olarak sağlamdır. En önemli değişiklik çekirdekte gözlenir. Kromatin, çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşır (kromatin kondensasyonu), çekirdek büzülür ve bazen membranla sarılı olan birkaç parçaya ayrılabilir. Hücre, zarla çevrili küçük parçalara bölünerek apoptotik cisimcikler oluşturur. Apoptotik cisimcikler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagositoz edilerek temizlenir (60,61).

2.8. L-KARNİTİN

Karnitin (3-hidroksi 4-N-trimetilamino butirat), yağ asit metabolizmasındaki β - oksidasyonda, yağ asitlerinin mitokondri membranından geçişini sağlayan bir maddedir. Karnitin esas olarak karaciğerde, daha az olarak da böbrek ve beyinde sentezlenir. Karnitinin antioksidan etkisinin de bulunduğu düşünülmektedir. Karnitin, aynı zamanda peroksizomal yağ asidi oksidasyonunun son ürünlerinin ve dallı zincirli amino asitlerden oluşan α -ketoasitlerin taşınmasında da görev yapar (68).

L- karnitin ve onun kısa zincirli esterleri olan; L-asetil karnitin ve L-propionil karnitin bazı önemli hücre içi fonksiyonlara ve birçok farmakolojik etkiye sahiptirler:

- Uzun zincirli yağ asitlerinin, β -oksidasyon yeri olan mitokondriyal matriks içine taşınmalarını sağlarlar. Mitokondri iç membranı, uzun zincirli yağ asitlerine karşı geçirgen değildir ve bu membranı ancak karnitinle birleşerek geçebilmektedirler (69).
- Mitokondri hücre membranlarının stabilizasyonunu sağlamakla birlikte, peroksizomal seviyede lipit peroksidasyonunda rol oynamaktadırlar (70).
- Karnitin, karnitin asetiltransferaz enzimi ile Koenzim A (KoA)'dan, karnitine asetil birimlerinin geri dönüşümlü transferini katalizleyerek, serbest KoA miktarını artırır. Serbest KoA miktarının artması ise, α -ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesini arttırmak suretiyle Krebs siklusunu hızlandırarak mitokondri içindeki KoA/asetil KoA oranının korunmasını sağlar (71).

- Karnitin, açıl gruplarını temizlemek suretiyle detoksifiye edici bir ajan olarak rol oynar. Bu yönüyle hücrenin osmotik dengesinin devamını sağlar. Mitokondri içinde birikmeleri durumunda birçok enzimin inhibisyonuna neden olan ve yıkıcı etkileri olan açıl gruplarının mitokondri dışına taşınmalarını sağlar (72).

Ayrıca L-karnitin, membran oluşumu ve bütünlüğü için gerekli fosfolipidlerin sentezini arttırarak ve fosfolipidlerin reaçilasyonuna aracılık ederek, membran onarımında önemli rol oynamaktadır. Bu etkilerin tam mekanizması henüz bilinmemektedir, fakat L-karnitinin membran üzerine direkt etki gösterebileceği düşünülmektedir. Karnitin, β -oksidasyon için lipidleri sitozolden mitokondri içine taşıyarak, lipid düzeylerini düşürmek suretiyle lipoperoksit üretimini azaltmaktadır (73). Serbest radikal hasarına karşı membranı stabilize ederek hücre hasarını önleyebilir ve ayrıca mitokondriyal hasarı engelleyebilir. Böylece serbest radikal kaçışını azaltarak, enerji üretimini arttırabilir (74,75).

GEREC VE YÖNTEMLER

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından, Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nın katkılarıyla, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'nun 16.01.2009 tarihli izni ile Mayıs 2009 tarihinde gerçekleştirildi. Çalışmaya toplam 30 erkek tavşanın (Yeni Zelanda albino tavşan, 2-3 kg ağırlığında) 60 gözü dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tavşanlar 2 eşit gruba ve her grup da 3 eşit alt gruba ayrıldı. Grup 1; her biri 2 mg(0,08 ml) , 4 mg (0,16 ml) ve 6 mg (0,24 ml) intravitreal bevacizumab (Altuzan, Roche®) uygulanacak olan 3 eşit alt gruba (Grup 1a, 1b, 1c) ayrıldı. Grup 2 ise aynı alt gruplama prensibi ile gruplandı (Grup 2a, 2b, 2c), ancak intravitreal bevacizumab uygulamasına ilaveten intraperitoneal 500 mg/kg L-karnitin de uygulandı. Her tavşanın sağ gözü bevacizumab uygulanan çalışma gözü (Ç), sol gözü ise aynı hacimde salin solüsyonu uygulanan kontrol grubu göz (K) olarak belirlendi (Örnek: Ç1a, K1a)(Tablo 3).

<u>Grup 1</u> (İntravitreal Bevacizumab)		<u>Grup 2</u> (İntravitreal Bevacizumab + İntraperitoneal 500 mg/kg L- karnitin)	
Grup 1a	2 mg (0,08 ml)	Grup 2a	2 mg (0,08 ml)
Grup 1b	4 mg (0,16 ml)	Grup 2b	4 mg (0,16 ml)
Grup 1c	6 mg (0,24 ml)	Grup 2c	6 mg (0,24 ml)

Tablo 3: Çalışmaya alınan tavşan grupları

Hayvan laboratuvarı ameliyathanesinde, cerrahi aletlerin sterilizasyonu sağlandıktan sonra, tavşanlar 1 ml intramüsküler ketamin hidroklorid (35 mg/kg)(Ketalar®, Pfizer) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg)(Rompun®, Bayer) karışımı ile uyutuldu. % 0.5'lik tropikamid (Tropamid®, Bilim) ve % 2.5'lik fenilefrin hidroklorür (Mydfirin®, Alcon) damla ile pupiller dilatasyon sağlandıktan sonra, % 0,5'lik proparakain hidroklorür (Alcaine®, Alcon) damla ile topikal anesteziyi ve % 5'lik povidon iodin uygulanmasını takiben intravitreal bevacizumab enjeksiyonu uygulandı. Enjeksiyonlar üst temporalden, cerrahi limbusun 2 mm gerisinden 27-gauge iğne ile yapıldı. L-karnitin (Carnitene®, Santa Farma) ise tavşanlara aynı seansta intraperitoneal olarak uygulandı. Postoperatif dönemde

ofloksasin % 0.3 (Exocin®, Allergan,) antibiyotik damla uygulaması alt konjunktival forniks içine günde 3 kez olacak şekilde 7 gün boyunca uygulandı ve tavşanlar 2 hafta süre ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda bakım altında izlendi. Bu dönem boyunca 1.gün, 3. gün, 1. ve 2. haftada ön segment yapıları ışık kaynağı ile kontrol edildi. Birinci hafta ve ikinci haftada indirekt oftalmoskopi ile fundus muayenesi yapıldı. İkinci haftanın sonunda tavşanlara intrakardiyak 100mg/kg tiopental (Pentotal®, Abbott) uygulanıp, sakrifiye edildikten sonra gözler enükle edilerek histolojik inceleme yapıldı.

1-Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, %10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra, 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp birer saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı (Tablo 4).

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 -48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dk
	% 80 etil alkol	20 dk
	% 95 etil alkol	20 dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dk
	Ksilol	30 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Tablo 4: Işık mikroskopik doku takip protokolü

2-Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 5).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akarsu	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akarsu	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akarsu	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

3-TUNEL Yöntemi

Bu teknik için Apoptag Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit (S7101, Chemicon, USA, Canada) kullanıldı. Poly-L-lysine (PLL; Sigma) ile kaplanmış lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile dehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika 20 µg/ml proteinaz K ile enkübe edildikten sonra, distile su ile 5x2 dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (Merck, 1.08597.1000 Darmstadt, Germany) uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dakika fosfat ile tamponlanmış salin (PBS) (Fluka, 79383, Switzerland) ile yıkama yapıldı. 10 dakika Equilibraton buffer solusyonu uygulandıktan sonra TdT (Terminal deoksinükleotidil transferaz) enzimi ile 37°C de 1 saat enkübe edildi. Stop/wash buffer solusyonu 10 dk uygulandıktan sonra PBS ile yıkama yapıldı ve 30 dakika oda ısısında anti-digoxigenin conjugate solusyonu uygulandı. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla peroxidase substrat DAB [(diaminobenzidine) buffer + DAB substrat] ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Harris hematoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler, %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dk 2 değişim ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 6).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon, Yıkama	PBS	3x10 dk
	Proteinaz K	15 dk
Yıkama	Distile su	5X2 dk
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3X5 dk
	Equilibraton buffer	
	TDT Enzim solusyonu	1 saat, 4°de, karanlıkta
Yıkama	Stop wash buffer	10 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
	Anti-digoxigenin conjugate solusyonu	30 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Boyama	DAB	10 dk
Yıkama	Distile su	10 dk
Ard alan boyaması	Mayer's hematoksilen	5 dk
Yıkama	PBS	3x10 dk
	% 80 alkol	1 dk
	% 95 alkol	1 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol (2 değişim)	30 dk
Kapama	Entellan	

Tablo 6: TUNEL uygulama prosedürü

4-İndirekt İmmünohistokimyasal Yöntem

Kaspaz-3 immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla tavşan spesifik anti-kaspaz-3 antikoları (RB-1197-R7, Thermo Scientific, Fremont, CA) kullanıldı. İmmünohistokimyasal inceleme için 60°C'lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin (00 -3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan kaspaz-3 antikoru ile bir saat +4°C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85 -9043) ile 30 dk enkübe edildi. PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 7).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	37°C 15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Caspase-3, VEFG	2 saat, 4de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 7: İndirekt immünohistokimyasal boyama prosedürü

5-Elektron Mikroskopik Doku Takip Prosedürü

Alınan doku örnekleri 1mm³ lük parçalara ayrıldı. %2.5'lik fosfat tamponlu gluteraldehitte 48 saat tespit edildi. Fosfat tamponları ile yıkandı. 1 saat boyunca bire bir oranında tampon solüsyonu ve OsO₄ (osmiyum tetroksit) ile ikinci kez tespit edildi ve boyandı. Fosfat tamponları ile yıkandı. Propilen oksitten geçirilerek şeffaflaştırıldı. Dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitten geçirilerek şeffaflaştırıldı. Araldit + DDSA (dodecenyl succinic anhidrit) ön gömme materyaline gömülerek bir gece bekletildi. Daha sonra Araldit [E006 Araldite CY212 RESIN (TAAB)] + DDSA [D025 DDSA EM (Dodecenyl Succinic Anhydride), (TAAB)] + BDMA [B008 Accelerator BDMA (benzyl dimethylamine, TAAB)] karışımı olan gömme materyaline gömüldü. Ultramikrotom ile alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopik olarak incelendi ve işaretlendi. İşaretlenen yerlerden alınan ince kesitler uranylacetate-lead citrate boyaları ile boyanarak Carl Zeiss Libra 120 Elektron mikroskopunda incelenerek resimlendirildi.

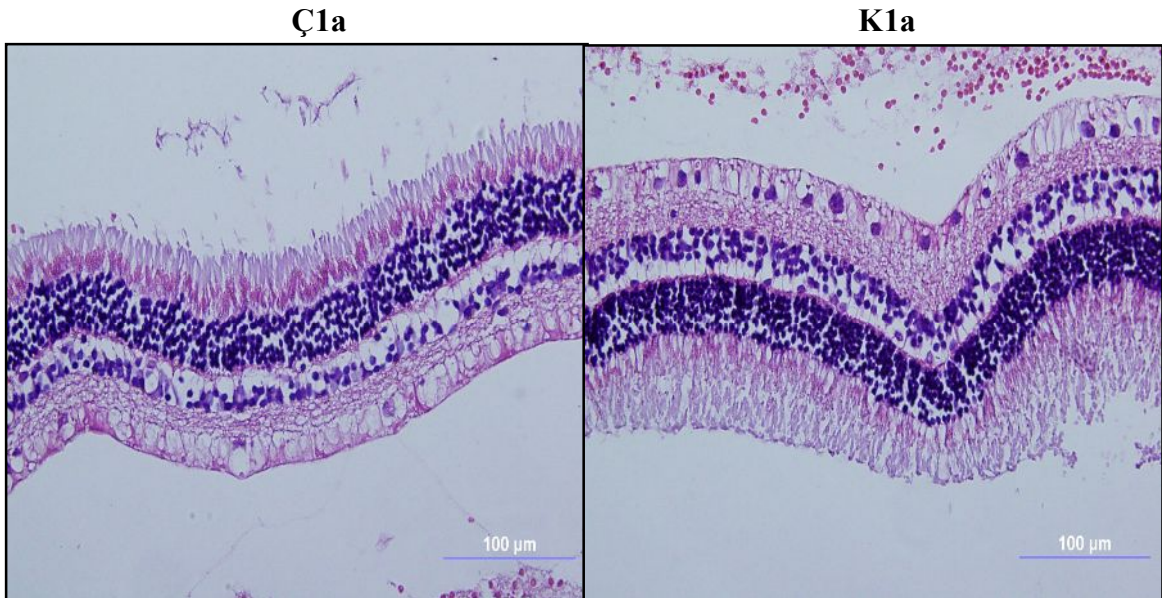
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler, Halk Sağlığı AD'nın katkıları ile SPSS 15.0 istatistik programında değerlendirildi. İstatistiksel analiz için tavşanların bütün çalışma ve kontrol grubu gözlerinin TUNEL boyanma yüzdeleri kullanıldı. Olguların verileri için tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama yüzde değerleri ve standart sapma kullanıldı. Parametrik koşullar karşılanamadığından gruplar arasındaki fark parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Verilerin karşılaştırılması için tablo ve grafikte gösterim yapıldı.

BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda bakım altında izlenen tavşanların hiç birinde, izlem süresince çalışmadan çıkarılmayı gerektirecek sistemik patoloji gelişmedi. İki haftalık çalışma süresince ölen tavşan olmadı. Takip süresi boyunca tavşanların hiçbirinde; korneal ödem, ön kamarada fibrin reaksiyon, hipopiyon, lens kesafeti, vitreus içi hemoraji, retina dekolmanı ve endoftalmi gelişmedi. Tavşanlardan 5'inde konjunktival hiperemi, 3'ünde ise subkonjunktival hemoraji geliştiği gözlemlendi. Histolojik preparatlar hazırlanırken makroskopik bakıda anormal bulguya rastlanmadı.

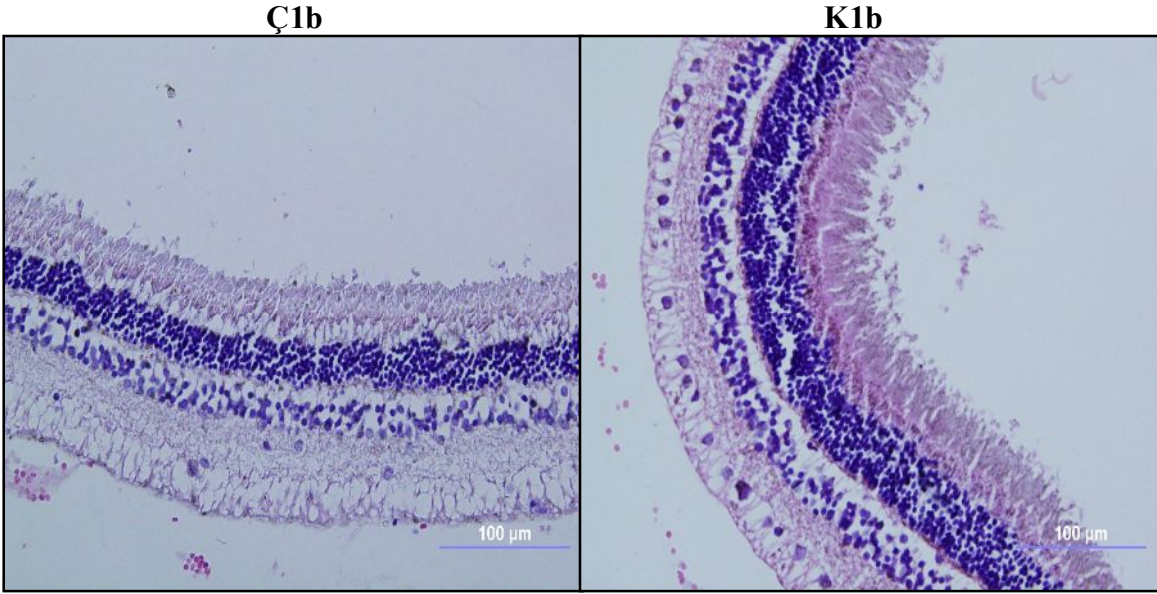
Tavşan gözlerinin Hemotoksilen-Eozin ile boyanması sonrası yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; gerek intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların gerekse intravitreal bevacizumab ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma ve kontrol gözlerinde, morfolojik açıdan farklılık tespit edilmedi. İncelenen bütün gözler (60 göz), ışık mikroskopik olarak normal görünümdeydi ve toksisteye dair hiçbir bulgu yoktu. 2 mg/0.08 ml, 4 mg/0.16 ml ve 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan (sırasıyla grup 1a, 1b, 1c) tavşanlardan birer tanesinin çalışma ve kontrol gözlerinin ışık mikroskopik görüntüleri Resim 2, Resim 3 ve Resim 4'de gözlenmektedir.



Ç: *Çalışma gözü*

K: *Kontrol gözü*

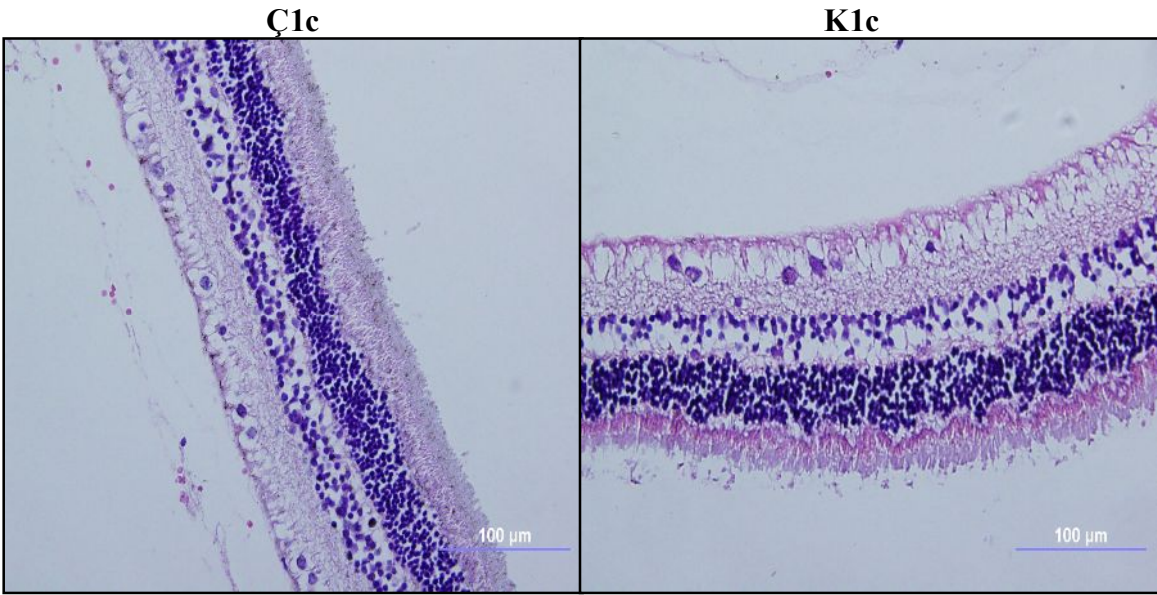
Resim 4: 1a grubundaki gözlerin ışık mikroskopik bulguları



Ç: Çalışma gözü

K: Kontrol gözü

Resim 5: 1b grubundaki gözlerin ışık mikroskopik bulguları



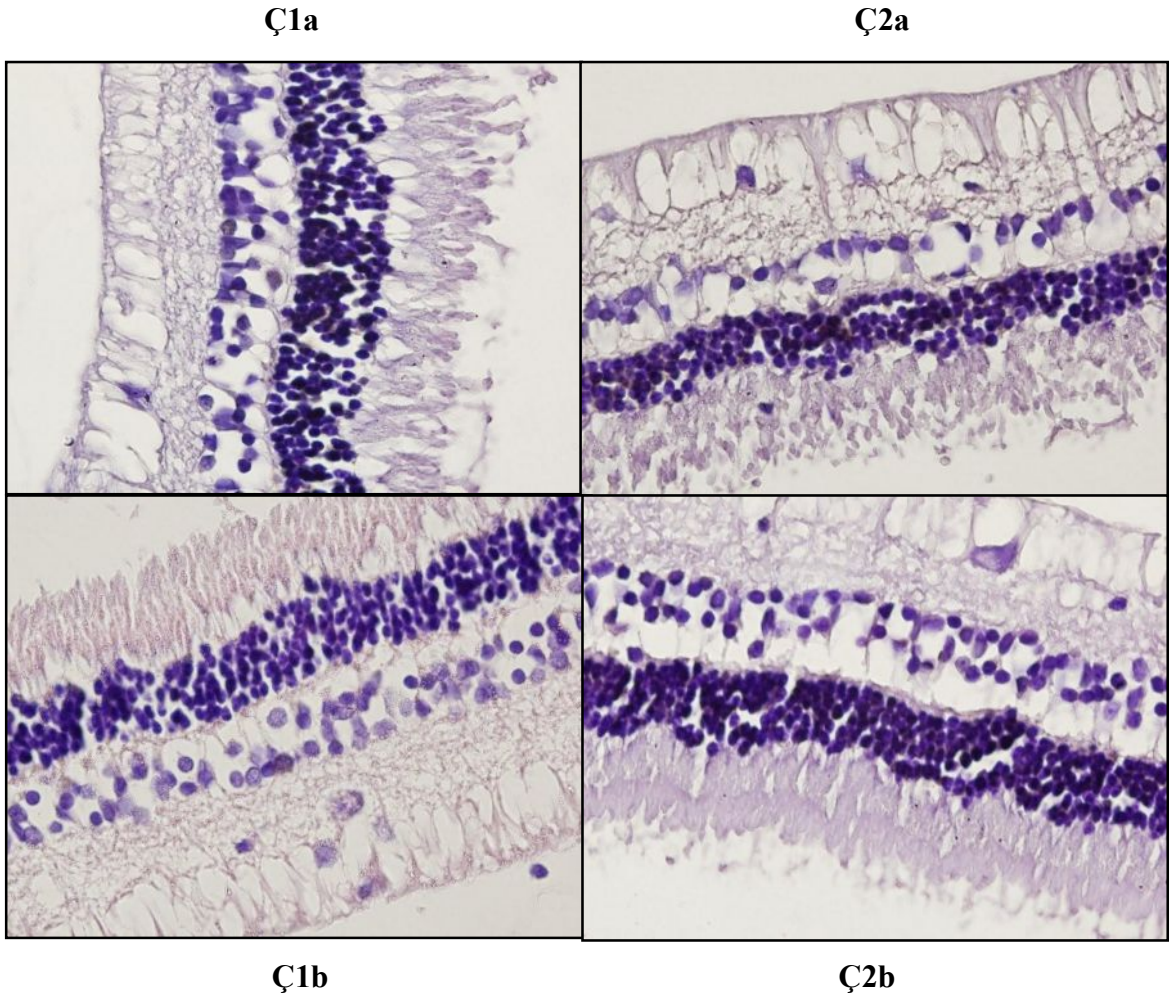
Ç: Çalışma gözü

K: Kontrol gözü

Resim 6: 1c grubundaki gözlerin ışık mikroskopik bulguları

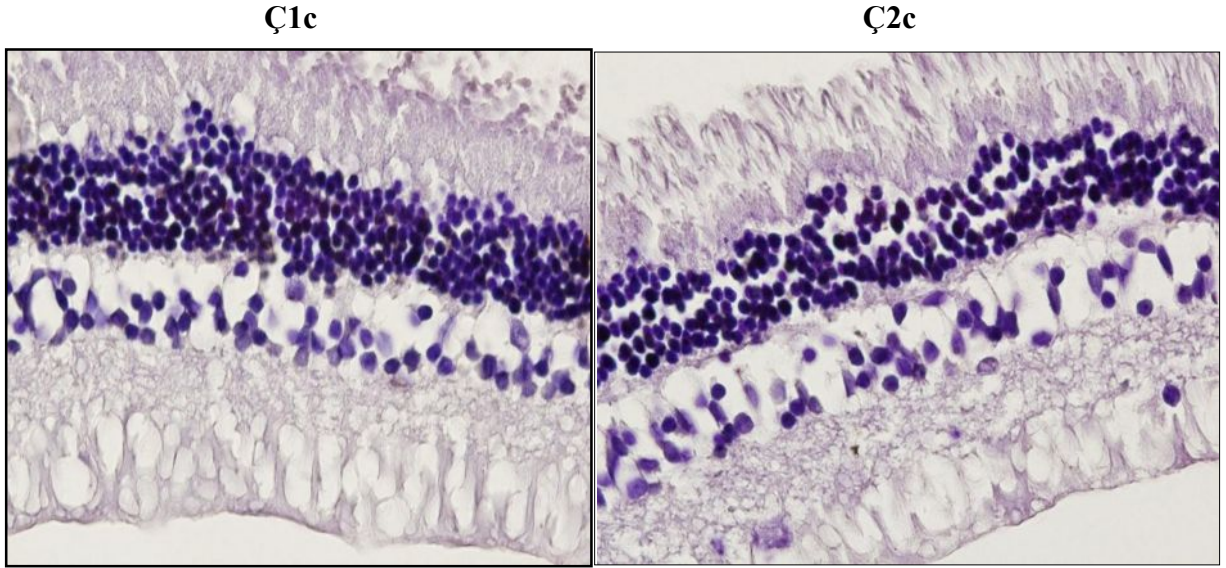
Tavşan gözlerinin, apoptotik süreçteki DNA fragmentasyonunu gösteren TUNEL boyama tekniği ile yapılan incelemelerinde; bütün kontrol grubu gözlerde (sol gözler) TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı beklendiği gibi az sayıdaydı (% 22.0 ± 2.1). Bütün grupların çalışma ve kontrol gözlerinin TUNEL boyanma yüzdeleri Tablo 8, Şekil 1 ve Şekil 2’de gösterilmiştir.

Sağ gözlerine 2mg/0.08 ml (1a) ve 4 mg/0.16 ml (1b) intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların çalışma gözleri ile sağ gözlerine 2 mg/0.08 ml ve 4 mg/0.16 ml intravitreal bevacizumab ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma gözleri (sırasıyla 2a, 2b) TUNEL tekniği ile incelendi. 1a ve 1b grubunda TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı, hücre hasarını gösterecek şekilde fazla (sırasıyla 40.6 ± 2.8 , 48.8 ± 4.8) saptanırken, 2a ve 2b grubunda pozitif boyanan hücre sayısı daha az (sırasıyla 22.0 ± 2.0 , 21.8 ± 1.8) olarak saptandı. İntraperitoneal L-karnitin uygulanan ve uygulanmayan tavşanların çalışma gözlerinin TUNEL boyanma yüzdeleri arasında anlamlı fark saptandı (**p=0.000**). Bu gruplara ait TUNEL boyanma paternleri Resim 5’ de, TUNEL boyanma yüzdeleri ise Tablo 9 ve Şekil 3’de görülmektedir.



Resim 7: 1a,1b ve 2a,2b grubu gözlerin TUNEL ile boyanma bulguları

Sağ gözlerine 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan tavşan gözleri (1c) ile sağ gözlerine 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulaması ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma gözleri (2c) karşılaştırıldı. 1c grubunda fazla sayıda TUNEL pozitif boyanan hücre (59.4 ± 6.9) saptanırken, 2c grubunda da fazla sayıda (54.6 ± 5.1) TUNEL pozitif boyanan hücre saptanmıştır. 2c grubunda TUNEL boyanma yüzdesi, 2a ve 2b grubundaki kadar (sırasıyla 22.0 ± 2.0 , 21.8 ± 1.8) düşük saptanmasa da 1c grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p=0.021$). Bu gruplara ait TUNEL boyanma paternleri Resim 6'da görülmektedir. İntraperitoneal L-karnitin uygulanan ve uygulanmayan tavşanların çalışma gözlerinin TUNEL boyanma yüzdeleri Şekil 3'de görülmektedir.

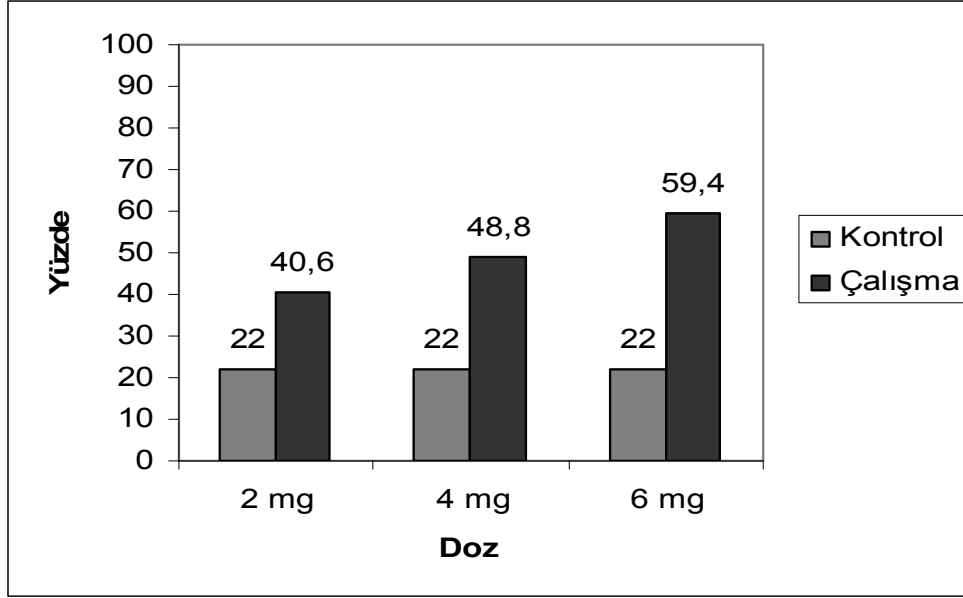


Resim 8: 1c ve 2c grubu gözlerin TUNEL ile boyanma bulguları

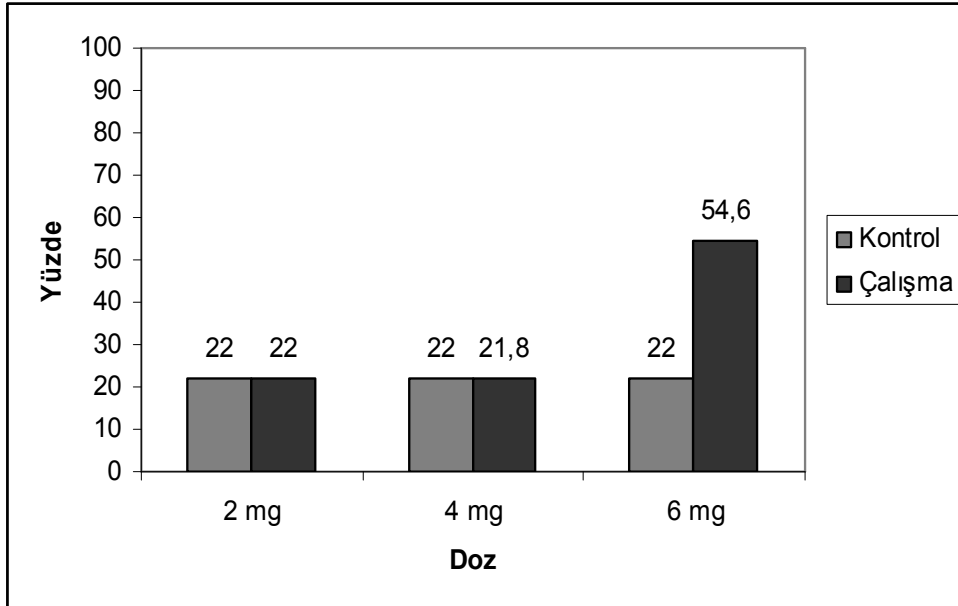
Gruplar	TUNEL*	
	Ortalama \pm SD (%)	P**
1a Kontrol	22.0 \pm 2.1	0.000
1a Çalışma	40.6 \pm 2.8	
1b Kontrol	22.0 \pm 2.1	0.000
1b Çalışma	48.8 \pm 4.8	
1c Kontrol	22.0 \pm 2.1	0.000
1c Çalışma	59.4 \pm 6.9	
2a Kontrol	22.0 \pm 2.1	0.775
2a Çalışma	22.0 \pm 2.0	
2b Kontrol	22.0 \pm 2.1	0.838
2b Çalışma	21.8 \pm 1.8	
2c Kontrol	22.0 \pm 2.1	0.000
2c Çalışma	54.6 \pm 5.1	

*Mann Whitney U testi. ** $p < 0.05$ anlamlı

Tablo 8: Çalışma ve kontrol grubu gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri



Şekil 1: İntravitreal bevacizumab uygulanan gözler ve kontrol grubu gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri

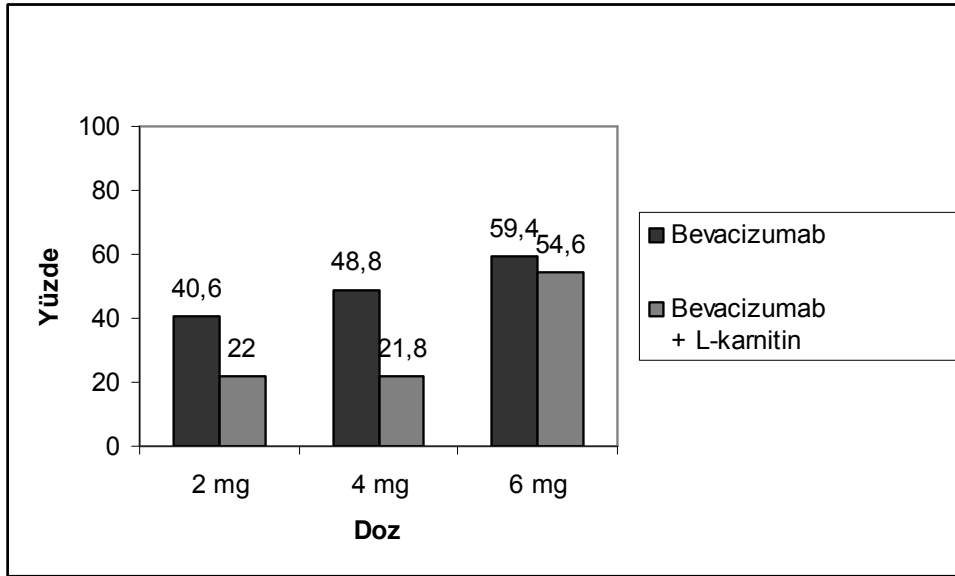


Şekil 2: İntraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanlarda, intravitreal bevacizumab uygulanan gözler ve kontrol grubu gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri

Gruplar	TUNEL*	
	Ortalama \pm SD (%)	P**
1a	40.6 \pm 2.8	0.000
2a	22.0 \pm 2.0	
1b	48.8 \pm 4.8	0.000
2b	21.8 \pm 1.8	
1c	59.4 \pm 6.9	0.021
2c	54.6 \pm 5.1	

*Mann Whitney U testi. ** $p < 0.05$ anlamlı

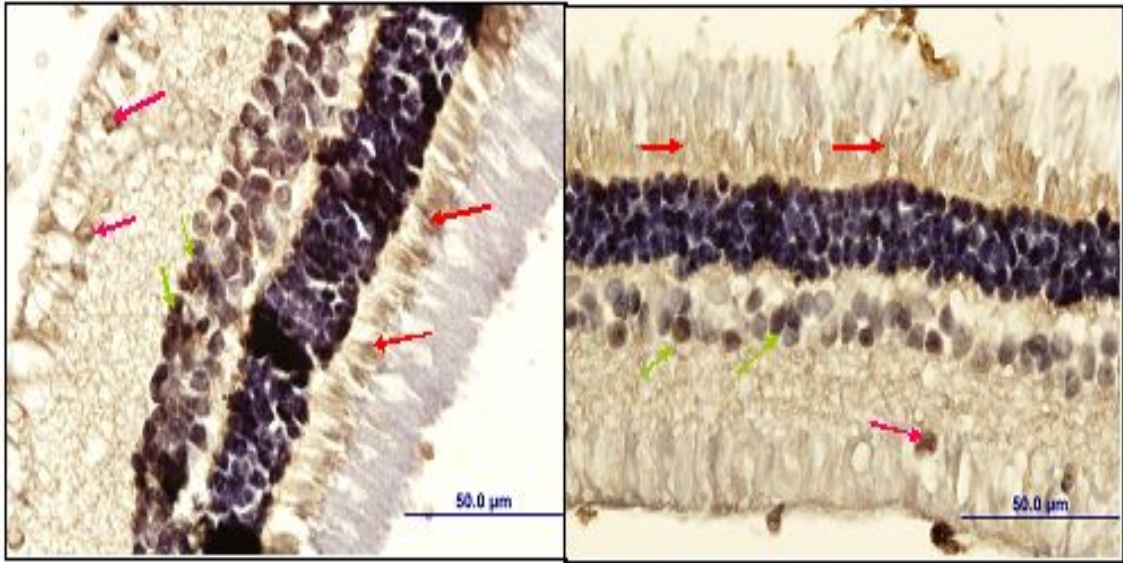
Tablo 9: L-karnitin uygulanan ve uygulanmayan tavşanlarda, intravitreal bevacizumab uygulanan gözlerin TUNEL boyanma yüzdeleri



Şekil 3: İntraperitoneal L-karnitin uygulanan ve uygulanmayan tavşanların çalışma gözlerinin TUNEL boyanma yüzdeleri

Yapılan immünohistokimyasal çalışmada, sağ gözlerine 2mg/0.08 ml (1a) ve 4 mg/0.16 ml (1b) intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde kaspaz-3 tutulumu kontrol gözlerle göre daha fazlaydı. İntravitreal bevacizumab ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde (2a,2b) ise kaspaz-3 tutulumu kontrol grubu gözler ile benzerdi.

6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların çalışma gözleri (1c) ile 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma gözleri (2c) karşılaştırıldığında; 1c grubunda fotoreseptör hücrelerde, bipolar hücrelerde ve ganglion hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen kuvvetli kaspaz-3 tutulumu, 2c grubunda da gözlenmekteydi. Ancak 2c grubunda özellikle bipolar hücrelerde tutulumun 1c grubuna göre daha zayıf olduğu dikkati çekti. Diğer hücrelerde kaspaz-3 tutulumu 1c grubu ile aynıydı. Ancak 2c grubunda bipolar nöronlardaki tutulum diğer bevacizumab doz grupları (2mg/0.08 ml ve 4 mg/0.16 ml) ile karşılaştırıldığında oldukça belirgin kaspaz-3 reaksiyonu göstermekteydi (Resim 7).



1c

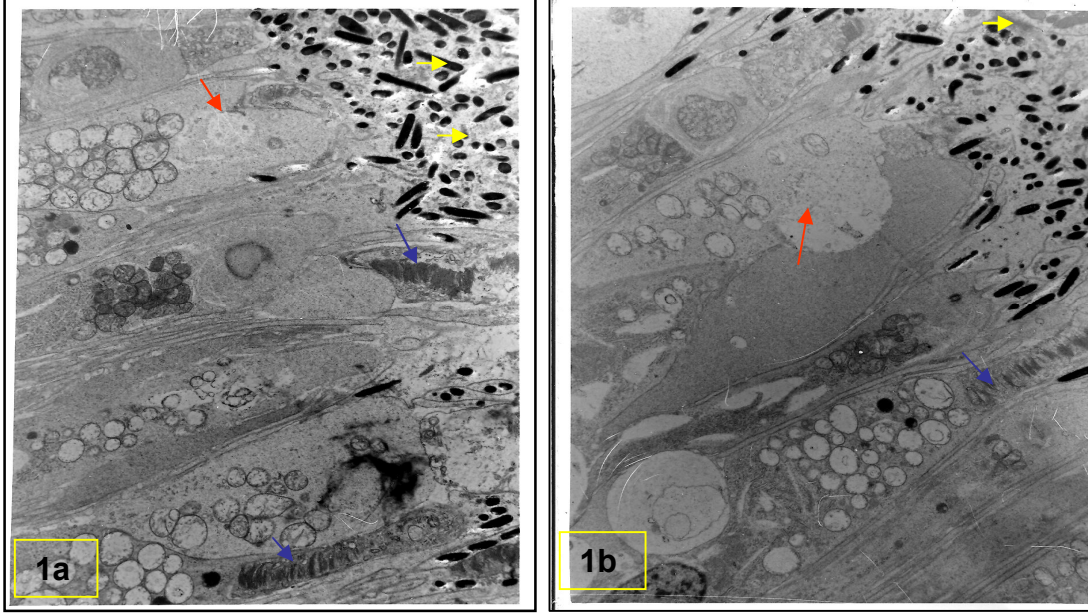
2c

Resim 9: 1c ve 2c grubundaki gözlerin kaspaz-3 antikoruna boyanma bulguları

1c grubunda, fotoreseptör hücrelerin iç segmentlerinde (kırmızı oklar), bipolar hücreler (yeşil oklar) ve ganglion hücrelerinin sitoplazmalarında (pembe oklar) kuvvetli kaspaz-3 tutulumu gözlenmektedir. 2c grubunda ise bipolar hücrelerde zayıf kaspaz-3 tutulumu gözlenirken, diğer hücrelerde kaspaz-3 tutulumu 1c grubu ile benzer gözlenmektedir.

Tavşan gözlerinin elektron mikroskopik ultrastrüktürel bulgularında, tüm kontrol grubu doku örneklerinde; pigment epitel, fotoreseptör hücreler, bipolar nöronlar, amakrin hücreler, Müller hücreleri ve ganglion hücreleri normal görünümdeydi. Ancak 1a (2mg/0.08 ml) ve 1b (4 mg/0.16 ml) grubunun çalışma gözlerinde; pigment epitelinde görünüm normalken, fotoreseptör hücrelerin dış segmentlerinde lameller formun düzensizleştiği, iç segmentte irili ufaklı vakuollerin oluştuğu dikkati çekti. Bu gruplarda pigment hücrelerindeki granüllerde merkezi elektron pale görünüm dikkati çekti. Ayrıca bu hücrelerde az sayıda apoptotik çekirdeklere rastlandı. Bu iki grupta, bipolar nöronlar ve ganglion hücrelerinde ultrastrüktürel düzeyde sadece sitoplazmik dejeneratif vakuoller gözlendi. Diğer organeller normal görünümdeydi. Bevacizumaba ilaveten intraperitoneal L-karnitin uygulanan 2a ve 2b grubunda ise bu bulgular gözlenmedi. Örneklerden alınan kesitler kontrol grubu bulgularına benzerdi.

1c (6 mg/0.24 ml) grubunda ise pigment epitel hücrelerinde granüllerde sayıca azalma ve şekil bozukluğu, mikrovullus yapısında dejenerasyon ve fotoreseptör hücrelerin lamellerinde paralel görünümünün tamamen bozulduğu, bu bölgelerde zar yapısının yer yer kesintiye uğradığı dikkati çekti. Fotoreseptör hücreler arasında kontrol grubuna göre daha çok sayıda apoptotik çekirdeğe sahip hücre gözlendi. Ancak hücrelerde mitokondriyal dejenerasyon gözlenmedi. Bipolar nöronlarda dejeneratif vakuollar gözlenirken, ganglion hücrelerinde hücresel boyutta küçülme ve kısmi sitoplazmik kayıp dikkati çekti. Bu bulgular, bevacizumaba ilaveten intraperitoneal L-karnitin uygulanan 2c grubunda hemen hemen benzerdi. L-karnitin bu grupta retina dokusunu korumadığı belirgin olarak gözlendi. Elektron mikroskopik bulgular Resim 8 ve Resim 9'da gösterilmiştir.

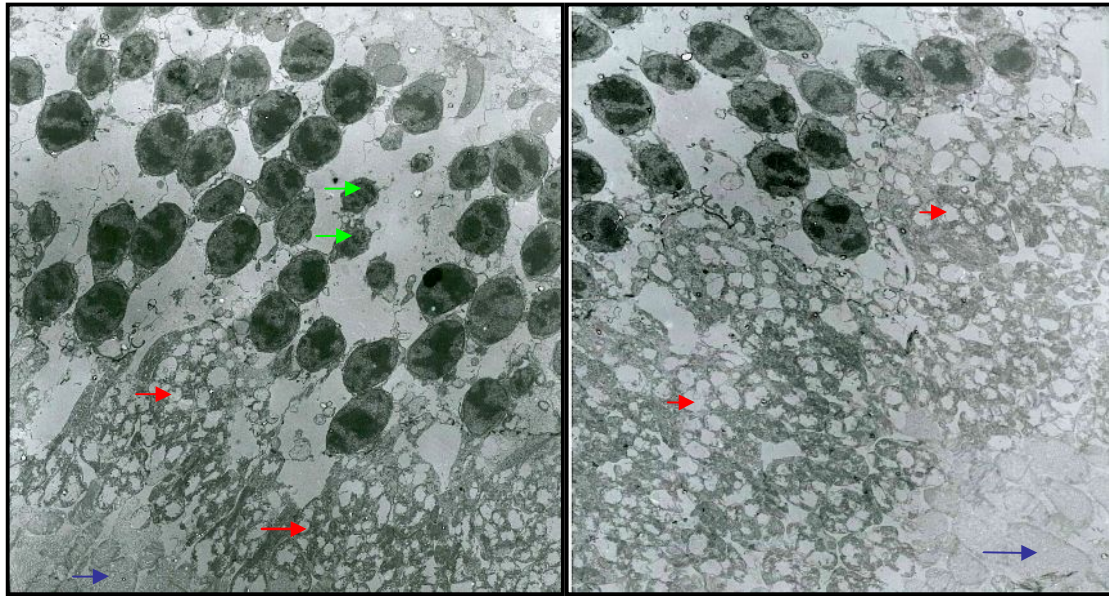


Resim 10: 1a ve 1b grubunun elektron mikroskobik bulguları

Fotoreseptör hücrelerin dış segmentlerinde düzensiz lameller yapı (mavi oklar), sitoplazmada dejeneratif vakuoller (kırmızı oklar) ve pigment epitel hücrelerinde pigment granüllerinde merkezi elektron pale görünüm (sarı oklar) gözlenmekte

1c

2c



Resim 11: 1c ve 2c gruplarının elektron mikroskobik bulguları

Fotoreseptör hücrelerin iç segmentleri (kırmızı oklar) ve dış segmentlerinde (mavi oklar) zar yapısının yer yer kesintiye uğradığı gözlenmekte ve apoptotik fotoreseptör hücre çekirdekleri (yeşil oklar) gözlenmekte.

TARTIŞMA

Sağlık standartlarının gelişmesi ve beklenen yaşam süresinin artması ile birlikte, özellikle gelişmiş toplumlarda yaşlı nüfus ve beraberindeki sağlık sorunları gün geçtikçe artmaktadır. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (YBMD) da yaşlı nüfusta görülen başlıca sağlık problemlerinden birini teşkil etmektedir. YBMD, gelişmiş ülkelerde 65 yaş üzeri toplumda merkezi görme kaybı ve az görmenin en sık sebebinin oluşturmaktadır (1). YBMD sıklığı, artan yaş ile birlikte artmaktadır. Framingham Göz Çalışması; YBMD sıklığını 52–64 yaşlarında %2, 65–74 yaşlarında % 11 ve 75 yaş üzerinde % 28 olarak tespit etmiştir (1). Beaver Dam Eye Çalışması ise YBMD sıklığını 65–74 yaşlarında %19, 74 yaş üzeri toplumda ise %37 olarak tespit etmiştir (2).

Yaş tip YBMD tedavisinde çeşitli tedavi modaliteleri mevcuttur. Bunlar arasında; lazer fotokoagülasyon, radyoterapi, fotodinamik tedavi, transpupiller termoterapi, intravitreal enjeksiyonlar ve maküler cerrahi bulunmaktadır. Neovasküler YBMD patogenezinde VEGF'in anahtar rol oynadığının gösterilmesi (3) ve neovasküler membranlarda VEGF ekspresyonunun arttığının gösterilmesi (76) ile tedavi stratejileri VEGF inhibisyonu yönüne kaymıştır. Anti-VEGF ilaçlar öncelikle kolorektal kanserlerin tedavisinde adjuvan tedavi olarak kullanılmış olup (77), sonraki dönemde oftalmolojide kullanılmaya başlamıştır (78,79).

Oftalmolojide kullanım için FDA onayı alan ilk anti-VEGF ajan pegaptanibdir sodyumdur. Pegaptanib sodyum, VEGF₁₆₅'i selektif olarak hedef alan RNA aptameri bir ajandır. Gragoudas ve arkadaşları(43), 2004 yılında yayınladıkları makalelerinde pegaptanib sodyumun orta ve ağır görme kaybını önlediğini, ancak uzun vadede görme kaybının devam ettiğini belirtmişlerdir. Sonuçları 2004 yılında yayınlanan ve pegaptanibin Faz 2/3 çalışması olan VISION Çalışması'nda; bir yıl boyunca 6 haftada bir pegaptanib tedavisi alan grupta, 54 haftalık takip sonunda tüm anjiyografik lezyon tiplerinde, plaseboya göre ciddi görme kaybı (30 harf veya daha fazla) riskinin anlamlı olarak az olduğu (%10-%22) saptanmıştır. VEGF₁₆₅'i selektif olarak etkilemesiyle güvenli oluşu pegaptanib için teorik bir üstünlük oluştururken, hızlı sıvı azalması sağlayamaması ve sadece sınırlı olguda görme artışı sağlaması zayıf yönleridir (43).

Rakic ve arkadaşları (80), koroidal neovasküler membranlarda sadece VEGF₁₆₅'in değil aynı zamanda VEGF₁₂₁'inde bulunduğunu göstermişlerdir. Sadece VEGF₁₆₅'i bloke eden pegaptanib sodyumun tedavide neden sınırlı etkiye sahip olduğunu açıklamaya çalışmışlardır. Keyt ve arkadaşları (81) ise, VEGF₁₆₅'in proteazlar tarafından biyolojik olarak aktif fragmanı olan VEGF₁₁₀'a parçalandığını, pegaptanib sodyumun VEGF₁₁₀'a karşı etki göstermediğini ve bu yüzden pegaptanib sodyumun sınırlı etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Ranibizumab, yaş tip YBMD tedavisinde intravitreal olarak kullanılmak üzere özel olarak dizayn edilmiş olup, bevacizumabın Fab fragmanıdır. Ranibizumab (48 kd), bevacizumaba (148 kd) göre daha küçük molekül büyüklüğüne sahiptir. Bevacizumabın moleküler yapısı itibariyle büyük olması ve subretinal alana iyi geçemeyeceği varsayılarak geliştirilmiştir. Ranibizumab 2006 yılında tüm yaş tip YBMD olguları için FDA onayı almıştır. Ranibizumab da bevacizumab gibi bütün VEGF izoformlarını inhibe eder (45).

Heiger ve arkadaşları (82), 2006 yılında ranibizumab ile ilgili yayınladıkları çalışmada; bütün hastalarda görsel stabilizasyonun sağlandığını, hastaların %40'ında ise en azından 3 sıralık görsel iyileşme olduğunu bildirmişlerdir. Ranibizumab ile yapılan MARINA Çalışması'nda, minimal klasik veya okült lezyonları olan hastalara 24 ay boyunca aylık 0.3mg veya 0.5mg olmak üzere iki ayrı dozda intravitreal ranibizumab enjeksiyonu uygulanmış ve çalışma sonunda intravitreal ranibizumab tedavisinin sadece ciddi görme kaybını önlemekle kalmayıp, görme keskinliğinde artış sağladığı da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre ranibizumab tedavisi, pegaptanib tedavisine göre görme kazancı sağlama konusunda daha üstün gözükmetedir denilmiştir (46). PrONTO (The Prospective Optical Coherence Tomography Imaging of Patients with Neovascular AMD Treated with intraOcular Ranibizumab) Çalışma Grubu, sıkı optik koherans tomografi (OKT) takibi yapılan hastalarda, değişik doz rejimleri kullanılarak daha az sıklıkla uygulanan ranibizumab ile de başarılı görsel sonuçlar alınabileceğini bildirmiştir (83). Baskın klasik lezyonların tedavisinde kullanım için FDA onayı almış FDT ile aynı tip lezyonlarda ranibizumabın etkinliğinin karşılaştırmak amacıyla yapılan ANCHOR Çalışması da çok merkezli, çift kör bir çalışma olup, 1 yıllık sonuçlarında intravitreal ranibizumab enjeksiyonunun hem görme keskinliğinde artış hem de lezyon boyutları ve sızıntısında azalma açısından FDT'ye üstün olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların sonucunda intravitreal ranibizumab enjeksiyonu yan etki açısından güvenli bulunmuş, ancak 0.5 mg

dozda daha belirgin olmak üzere, her iki dozda da iridosiklit ve vitritis gibi yan etkiler % 10–15 oranında görülebilmektedir denilmiştir (47).

Bevacizumab, ranibizumab gibi VEGF-A'nın tüm izoformlarına etkili olup, farklı olarak antikor fragmanı değil antikorun tamamını içeren bir yapıya sahiptir. Asıl olarak kolorektal kanserlerin tedavisinde adjuvan olarak kullanım için FDA onayı alan ilaç, YBMD tedavisinde amaç ötesi (off-label) olarak kullanılmaktadır. Michels ve arkadaşları (78) ile Moshfeghi ve arkadaşları (84), ilk kez yaş tip YBMD tedavisinde sistemik olarak bevacizumabı (SANA-Systemic Avastin for Neovascular AMD) kullanmışlardır. Hastaların kısa dönem takiplerinde görme keskinliğinde artma ve santral retina kalınlığında azalma saptanmıştır. Yapılan bazı yayınlarda, VEGF inhibitörlerinin sistemik olarak kullanılmasının tromboembolik olaylarda artış, hipertansiyon, epistaksis, hemoptizi, cerrahi sonrası gecikmiş yara iyileşmesi ve üreme fonksiyonlarında bozukluk gibi potansiyel yan etkilere neden olabileceği belirtilmiştir. VEGF inhibisyonu sonucu gelişen koriokapillaris atrofisi nedeni ile sağlam olan gözde de görme kaybı gelişebileceği bildirilmiştir (84).

Rosenfeld ve arkadaşları (79), 2005 yılında KNV tedavisi için ilk kez intravitreal bevacizumab kullanımına dair olgu sunumlarını yaptılar. O günden bu yana YBMD'ye bağlı KNV tedavisinde intravitreal bevacizumabın etkinliğini ve güvenilirliğini araştıran birçok kısa süreli retrospektif veya prospektif çalışma yapıldı. VEGF'in intravitreal kullanımı, sistemik kullanımda gözlenen yan etkileri önlediği gibi koroidal neovasküler membranların antikorlar ile direkt hedef alınmasını da sağlar. İntravitreal kullanım ayrıca kullanılan ilaç dozunu da dramatik olarak düşürür (1.25–2.5 mg intravitreal, 5 mg/kg sistemik). Bevacizumab, daha uzun yarılanma ömrüne sahip olmasına rağmen, ranibizumaba göre VEGF'e daha az affinite ile bağlanır ve daha büyük moleküler yapıya sahip olduğu için ranibizumaba göre subretinal alanda daha az konsantre olur (85). Hayvan çalışmaları bevacizumabın subretinal aralığa geçemeyecek kadar büyük olduğunu gösterse de (86), Rosenfeld ve arkadaşları (79), bevacizumabın KNV tedavisinde etkin olduğunu göstermişlerdir. O halde bevacizumab, hasarlı retinayı rahatlıkla geçebiliyor denilebilir ya da VEGF'i vitreusda, retina yüzeyinde veya retina içinde inhibe etmesi, etkinliği için yeterli olabiliyor denilebilir. Ayrıca hayvan gözlerinin insan gözünü bire bir yansıtmıyor olabileceği ve hayvan gözlerinde subretinal alana geçemeyen bevacizumabın, insan

gözünde subretinal boşluğa geçebiliyor olabileceği öne sürülmüştür (85). Bevacizumab, ranibizumaba göre daha az immünojeniktir (87).

Gamulescu ve arkadaşları (88), intravitreal bevacizumab ve ranibizumabın etkinliğini karşılaştırmak amacı ile yaptıkları olgu kontrollü retrospektif çalışmada, 6 aylık takip sonucunda iki grup arasında görme keskinliği ve santral retinal kalınlık açısından fark olmadığını belirtmişlerdir. Yapılan diğer kısa süreli klinik çalışmalarda da, YBMD tedavisinde kullanılan bevacizumabın gerek sistemik kullanımında (78,84) gerekse intravitreal kullanımında (4,89,90), retinal kalınlıkta azalma ve görme keskinliğinde artmaya yol açtığı gösterilmiştir.

Bu kadar yaygın kullanılan intravitreal bevacizumabın, retinal toksisitesi üzerine yapılan çalışmalara, her geçen gün bir yenisi eklenmektedir. Yapılan ilk yayınlar, ışık mikroskopik çalışmalar ile sınırlıdır. Manzano ve arkadaşları (91), 2006 yılında yayınladıkları çalışmalarında; 12 tavşana 500µg/0.1 ml, 1.0 mg/0.1 ml, 2.5 mg/0.1 ml ve 5.0 mg/0.2 ml olmak üzere 4 ayrı dozda intravitreal bevacizumab enjeksiyonu uygulamışlar. İki hafta sonra tavşanları enükle edip, ışık mikroskopik inceleme ile değerlendirdiklerinde, hiçbir gözde toksisiteye dair bir bulgu saptamamışlardır. Sadece 5 mg doz uygulanan bir gözde vitreusda inflamasyon tespit etmişlerdir. Uzun takip süresi olmadığı için, uzun dönemde oluşabilecek yan etki profili hakkında yorum yapılamayacağını belirtmişler ve ışık mikroskopik düzeyde hasarın gösterilememiş olmasının, elektron mikroskopik düzeyde hasarın olmadığı anlamına gelemeyeceğini belirtmişlerdir.

Bakri ve arkadaşları (92), 2006 yılında bevacizumabın toksisitesi üzerine yaptıkları çalışmada, iki gruba ayırdıkları tavşanlara; 1.25 mg/0.05 ml ve 2.5 mg/0.1 ml olmak üzere farklı dozlarda intravitreal bevacizumab uygulamışlar. Tavşanların gözlerini enjeksiyondan 1 ay sonra enükle edip ışık mikroskobu ile incelediklerinde, her iki grupta da herhangi bir toksisite bulgusuna rastlamamışlardır. Çalışmanın sonunda 1 ay gibi kısa bir sürede ve tek bir uygulama ile bevacizumab toksisitesinin net olarak değerlendirilemeyeceğini, tekrarlanan enjeksiyonlar ile uzun dönem takiplerin yapıldığı çalışmalara ihtiyacın olduğunu belirtmişlerdir.

Cheng ve arkadaşları (93), 2009'da yayınladıkları makalelerinde; rat gözlerine (50–100 µl vitreus hacmine sahip) tek doz ya da 4 hafta boyunca haftada bir 125 µg/5 µl intravitreal bevacizumab uygulamışlardır [Bu ilaç konsantrasyonu (125 µg/5 µl), ortalama 5 ml vitreus hacmine sahip insanlara uygulanan standart 1–2.5 mg bevacizumab dozuna göre, retinal hücreler düzeyinde 2–10 kat fazla **lokal** konsantrasyona sahip]. Birinci ay ve 6. ayın sonunda gözleri enükle etmişler ve yaptıkları ışık mikroskopik incelemede, retinal ganglion hücre sayısında kontrol gözlerle göre herhangi bir farklılık olmadığını saptamışlardır. Tek doz uygulanan bevacizumab ya da haftalık tekrarlanan 4 doz bevacizumabın retinal ganglion hücreleri açısından güvenli olduğunu belirtmişlerdir.

Luthra ve arkadaşları (94), 2006 yılında yayınladıkları makalelerinde, 4 ml insan vitreusu için uygulanan 1.25 mg/0.05 ml bevacizumabın, hücre düzeyinde 0.25 mg/ml lokal konsantrasyona ulaşacağını belirtmişlerdir. Bu düşünceden yola çıkarak insan RPE hücreleri (ARPE–19), rat nörosensöryel hücreleri (R28) ve insan vasküler endotelial hücreleri (HMVECad) üzerine in vitro bevacizumab (0.125 mg/ml, **0.25 mg/ml**, 0.50 mg/ml ve 1 mg/ml dozlarında) uygulamışlar ve viabilite üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda bevacizumab uygulanan hücreler ile kontrol grubu hücreler arasında ışık mikroskopik bulgular açısından fark bulamamışlardır.

İnan ve arkadaşları (8), intravitreal bevacizumab uyguladıkları tavşanlarda, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle toksisiteyi gösterdikleri halde, ışık mikroskopisi ile toksisiteye rastlamamışlardır. Aynı çalışmanın devamı niteliğindeki başka bir çalışmada Avcı ve arkadaşları (7), yine intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanlarda immünohistokimyasal yöntemler ve TUNEL yöntemi ile toksisiteyi (apoptozis) gösterdikleri halde, ışık mikroskopisinde herhangi bir morfolojik değişiklik saptayamamışlardır.

Bizim çalışmamızın da bir basamağını ışık mikroskopik çalışma oluşturmaktaydı. Çalışmaya dahil ettiğimiz tavşanların gerek çalışma gözlerinde gerekse kontrol gözlerinde; Manzano ve arkadaşları (91), Bakri ve arkadaşları (92), Cheng ve arkadaşları (93), İnan ve arkadaşları (8) ve Avcı ve arkadaşlarının (7) sonuçları ile uyumlu olarak ışık mikroskopik yöntemle toksisite bulgularına rastlamadık. Işık mikroskopik incelemede toksisite bulgularına rastlamamış olmamız, bu tekniğin erken toksisite bulgularını gösterecek kadar duyarlı bir yöntem olmamasına bağlıdır. Apoptozis gibi süreçlerin değerlendirilmesinde, ışık mikroskopisinden daha gelişmiş tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle,

ışık mikroskopisi ile bevacizumabın retinal toksisitesinin yok olduğunu söylemek pek anlam ifade etmeyecektir. Çünkü elektron mikroskopik yöntemler (8), immünohistokimyasal yöntemler (7,8) ve TUNEL yöntemi (7) gibi gelişmiş yöntemlerle, intravitreal bevacizumab toksisitesinin gösterildiği çalışmalarda dahi ışık mikroskopisi ile toksisite bulgusuna rastlanamamıştır.

Işık mikroskopisinin ultrastrüktürel yapıyı incelemede yetersiz oluşu, bevacizumabın retinal toksisitesinin araştırılmasında, elektron mikroskopisinin kullanılması gerekliliğini doğurmuştur. İnan ve arkadaşları (8), 2007 yılında yayınladıkları makalelerinde, bevacizumab toksisitesini elektron mikroskopisi ile göstermeye çalışmışlardır. Çalışmaya dahil ettikleri 24 tavşana; 1.25 mg/0.05 ml ve 3 mg/0.12 ml olmak üzere iki ayrı dozda intravitreal bevacizumab uygulamışlar ve tavşanların sağ gözlerini bevacizumab uygulanan çalışma gözleri, sol gözlerini ise eşit dozda salin uygulanan kontrol gözleri olarak belirlemişlerdir. Tavşanları 14. gün ve 28. gün olmak üzere iki farklı zamanda enükle etmişlerdir. Işık mikroskopik değerlendirmede her iki doz grubunda da toksisite bulgusuna rastlanmazken, elektron mikroskopik değerlendirmede her iki doz grubunda da iç fotoreseptör segmentinde mitokondrial hasar tespit edilmiştir.

Kendi yaptığımız çalışmanın ultrastrüktürel (elektron mikroskopik) bulgularında, tüm kontrol grubu gözlerde; pigment epiteli, fotoreseptör hücreler, bipolar hücreler, amakrin hücreler, Müller hücreleri ve ganglion hücreleri normal görünümdeydi. Ancak 2 mg/ 0.08 ml ve 4 mg/ 0.16 ml bevacizumab uyguladığımız tavşanların çalışma gözlerinde pigment epitelinde görünüm normalken, fotoreseptör hücrelerin dış segmentlerinde lameller formun düzensizleştiği, iç segmentte irili ufaklı vakuollerin oluştuğu dikkati çekti. Bu gruplarda pigment hücrelerindeki granüllerde merkezi elektron pale görünüm dikkati çekti. Ayrıca bu hücrelerde az sayıda apoptotik çekirdeklere rastlandı. Bu iki gruptaki bipolar hücreler ve ganglion hücrelerinde ultrastrüktürel düzeyde sadece sitoplazmik dejeneratif vakuoller gözlemlendi. Diğer organeller normal görünümdeydi. 2 mg/ 0.08 ml ve 4 mg/ 0.16 ml bevacizumab ile birlikte 500 mg/kg intraperitoneal L-karnitin uyguladığımız tavşanların çalışma gözlerinde ise bu bulgular gözlenmedi. Bu örneklerden alınan kesitler kontrol grubu bulgularına benzerdi. 6 mg/ 0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde ise; pigment epiteli hücrelerinin granüllerinde sayıca azalma ve şekil bozukluğu, mikrovillus yapısında dejenerasyon, fotoreseptör hücrelerin lamellerinin paralel görünümünde tamamen bozulma ve bu bölgelerde zar yapısının yer yer

kesintiye uğradığı dikkati çekti. Fotoresptör hücreler arasında, kontrol grubuna göre daha çok sayıda apoptotik çekirdeğe sahip hücre gözlemlendi. Ancak hücrelerde mitokondriyal dejenerasyon gözlenmedi. Bipolar hücrelerde dejeneratif vakuoller gözlenirken, ganglion hücrelerinde hücre boyutunda küçülme ve kısmi sitoplazmik kayıp dikkati çekti. Bu bulgular 6 mg/ 0.24 ml intravitreal bevacizumab ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde de hemen hemen benzerdi. Elektron mikroskopik bulgular ışığında; 2 mg/ 0.08 ml ve 4 mg/ 0.16 ml intravitreal bevacizumab uygulamasının, ultrastrüktürel düzeyde hafif hücre hasara neden olduğunu ve oluşan bu hasarın uygulanan intraperitoneal L-karnitin ile önlenemediğini gözlemledik. Ancak aynı durum 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulaması için geçerli değildi. 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan tavşan gözlerinde ultrastrüktürel düzeyde ağır hasar tespit ettik ve bu hasarın intraperitoneal uygulanan L-karnitin ile önlenemediğini gözlemledik.

Kaspazlar, DNA endonükleazı bağlayan proteini yıkarak DNA kırıkları oluşumuna ve aktini yıkan proteini aktifleştirerek hücre şekil bozukluğuna neden olurlar (60,61). Kaspaz-3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir (67). Kaspazlara karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak, sitoplazmik kaspaz ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, apoptozisin tespitinde sık kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. TUNEL yöntemi ise apoptozis tayininde kullanılan bir diğer yöntemdir. Apoptozisin karakteristiği olan DNA fragmatasyonunun, TUNEL yöntemi ile gösterilmeye başlanması, toksisite çalışmalarında bu tekniğin kullanılmasını sağlamıştır. İmmünohistokimyasal yöntemlerden farklı olarak apoptozisin kantitatif değerlendirilmesine de imkan tanıyan bir tekniktir.

İnan ve arkadaşları (8), 24 tavşan üzerinde yaptıkları çalışmada; 1.25 mg/0.05 ml ve 3 mg/0.12 ml intravitreal bevacizumab uygulamasını takiben bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile yaptıkları immünohistokimyasal boyamada, ilaç uygulanan gözlerde yoğun apoptotik protein ekspresyonuna rastlarken, kontrol gözlerde bu ekspresyonu minimal düzeyde bulmuşlardır.

Avcı ve arkadaşları (7), İnan ve arkadaşlarının (8) yaptığı çalışmanın devamı niteliğindeki çalışmalarında, intravitreal bevacizumab ve pegaptanib sodyumun apoptotik etkisini, immünohistokimyasal yöntem (kaspaz-3, kaspaz-9) ve TUNEL yöntemi ile

göstermeye çalışmışlardır. Bevacizumab uygulanan tavşanları; 0.25 mg/10 µl, 0.625 mg /25 µl, 1.25 mg/50 µl ve 2.5 mg/100 µl tek doz intravitreal bevacizumab enjeksiyonu uygulanıp 14. günde enükle edilen tavşanlar, 0.625 mg/25 µl tek doz intravitreal bevacizumab uygulanıp 3. ayda enükle edilen ve her ay 0.625 mg/25 µl intravitreal bevacizumab uygulanıp 3. ayda enükle edilen tavşanlar olarak sınıflamışlar. Kontrol grubu tavşanlar ise 0.05 ml salin solüsyonu enjekte edilen tavşanlar ve sham prosedürü uygulanan tavşanlar olarak alt gruplara ayrılmıştır. Çalışma sonunda yapılan immünohistokimyasal çalışma ile kontrol grubu gözlerde; iç limitan membran, dış limitan membran ve iç pleksiform tabakada kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile boyanma gözlenmiştir. İntravitreal bevacizumab uygulanan çalışma grubu gözlerde de aynı bölgelerde immünohistokimyasal boyanma saptanmış olup, ayrıca dış pleksiform tabaka ve fotoreseptörler katında da boyanma gözlenmiştir. Bütün grupların ganglion hücre tabakasında, iç nükleer tabakada ve retina pigment epitel hücrelerinde TUNEL ile pozitif boyanma tespit etmişlerdir. Dış nükleer tabakada TUNEL ile pozitif boyanmayı, sadece intravitreal ilaç uygulanan çalışma gruplarında gözlemlemişlerdir. TUNEL boyanma yüzdelerini; 0.25 mg dozda % 32, 0.625 mg dozda % 43, 3 kez 0.625 mg dozda % 49.8, 1.25 mg dozda % 55.3, 2.5 mg dozda % 64.5, salin uygulanan grupta % 32.3 ve sham grubunda % 21 olarak tespit etmişlerdir. Farklı intravitreal bevacizumab dozlarının uygulandığı bütün gruplar arasında, apoptotik aktivite açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmış olup, artan doz ile apoptotik etkinin arttığı sonucuna varmışlardır. Bevacizumabın standart dozları ile 2 kat fazla dozları karşılaştırıldığında, apoptozis açısından istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak bevacizumabın standart dozları ile 4 kat fazla dozları karşılaştırıldığında, 4 katı dozlarda daha belirgin apoptozis oluştuğu saptanmıştır. Aynı bevacizumab dozunun (0.625 mg/25 µl) tek doz uygulandığı ya da 3 kez tekrarlandığı gruplar arasında da apoptotik aktivite açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmış olup (**p=0.02**), tekrarlayan uygulama ile apoptotik etkinin arttığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca tavşan gözünde 0.25 mg/10 µl bevacizumab enjeksiyonunun salin enjeksiyonu ile aynı oranda TUNEL boyanma yüzdesine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Kontrol gözlerde de apoptozisin görülmesi, apoptozisin fizyolojik sürecin bir parçası olmasına bağlanmıştır. Ancak fizyolojik sürecin bir parçası olarak işleyen apoptozisde dış etkenlerin etkisi ile artma olabileceği ve apoptotik sürecin patolojik bir boyut kazanabileceği bildirilmiştir.

İmmünohistokimyasal yöntem olarak kaspaz-3 antikorunu kullandığımız çalışmamızda; sağ gözlerine 2 mg/0.08 ml (1a) ve 4 mg/0.16 ml (1b) intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde kaspaz-3 tutulumu kontrol gözlere göre daha fazlaydı. İntravitreal bevacizumab ile birlikte intraperitoneal L-karnitin uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde (2a,2b) ise kaspaz-3 tutulumu kontrol grubu gözler ile benzerdi. Ancak 6 mg/ 0.24 (1c) ml intravitreal bevacizumab uyguladığımız tavşanların çalışma gözlerinde; fotoreseptör hücrelerin iç segmentlerinde, bipolar hücreler ve ganglion hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli kaspaz-3 tutulumu olduğu gözlemlendi. 6 mg/ 0.24 ml bevacizumab uygulanan gözlerde gözlediğimiz kuvvetli kaspaz-3 tutulumunu, 6 mg/ 0.24 ml bevacizumaba ilaveten intraperitoneal L-karnitin uyguladığımız gözlerde (2c) de gözlemledik. Ancak intraperitoneal L-karnitin uygulanan gruptaki bipolar hücrelerde kaspaz-3 tutulumunu, L-karnitin uygulanmayan gruba göre daha zayıf olarak gözlemledik. L-karnitin uygulanan gruptaki bipolar hücrelerde kaspaz-3 tutulumu azalmış olsa da kontrol grubu ve düşük doz bevacizumab (2mg/0.08 ml ve 4 mg/0.16 ml) uygulanan gruba göre kaspaz-3 tutulumu daha belirgindi. Bu bulgulardan yola çıkarak, 2mg ve 4mg intravitreal bevacizumab dozunun, tavşan gözlerinde immünohistokimyasal olarak saptanabilir bir hücresel hasara yol açtığını ve bu hasarın L-karnitin ile önlenebildiği sonucuna vardık. Ancak aynı durum 6 mg/ 0.24 ml bevacizumab uygulaması için geçerli değildi. 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan tavşan gözlerinde, yoğun kaspaz-3 tutulumu ile karakterize ciddi hücresel hasar bulguları vardı ve bu bulgular intraperitoneal uygulanan L-karnitin ile önlenememekteydi.

Tavşanların gözleri üzerinde yaptığımız TUNEL boyama tekniğinde, bütün kontrol grubu gözlerde TUNEL pozitif hücre sayısı beklendiği gibi az sayıdaydı (% 22.0 ± 2.1). 2 mg/0.08 ml ve 4 mg/0.16 ml intravitreal bevacizumab uygulanan tavşanların çalışma gözlerinde TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı fazla iken (sırasıyla 40.6 ± 2.8, 48.8 ± 4.8), ilaveten intraperitoneal L-karnitin uygulanan grupta TUNEL boyanan hücre sayısı daha azdı (sırasıyla 22.0 ± 2.0, 21.8±1.8) (**p=0.000**). 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan grupta ise durum farklıydı. Bu grupta hem 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab uygulanan hem de bevacizumaba ilaveten intraperitoneal L-karnitin uygulanan gözlerde, TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı fazla miktardaydı (sırasıyla 59.4 ± 6.9 ve 54.6±5.1) (**p=0.021**). İntraperitoneal L-karnitin 2 mg ve 4 mg bevacizumab uygulanan gözlerde TUNEL boyanma yüzdesini belirgin olarak azaltmış olsa da 6 mg bevacizumab uygulanan gözlerde TUNEL boyanma yüzdesini aşikar derecede

azaltmamıştır. Ancak 6 mg uygulanan gözlerde de istatistiksel olarak anlamlı TUNEL boyanma azalması gözlenmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak 2 mg/0.08 ml ve 4 mg/0.16 ml bevacizumab dozunun, TUNEL ile saptanabilen hücrel hasara yol açtığını ve bu hasarın L-karnitin ile önlenemediğini gördük. Ancak 6 mg/0.24 ml intravitreal bevacizumab dozunda görülen hasarın, L-karnitin ile aşıkare derecede önlenemediğini saptadık.

Retina çok sayıda tabakadan oluşan ve hücrelerin düzensiz dizilim gösterdiği ve birbirini gölgelediği bir yapı olması nedeniyle belli bir hücre grubunu hedef alan işaretleme yapılmıyorsa, stereolojik uygulamaların sağlıklı yapılabileceği bir doku değildir. Normal şartlarda her dokuda TUNEL pozitif boyanan ya da kaspaz-3 pozitif boyanan hücreler bulunmaktadır. Önemli olan bu hücrelerin sayısındaki artışın varlığına dikkat çekmektir. Aynı durum retinanın katmalarında bulunan farklı karakter ve görevdeki hücreler için de geçerlidir. Bu nedenle TUNEL pozitif boyanan fotoreseptör hücreleri, bipolar hücreleri ve ganglion hücrelerini tek tek ayırt etmek ve saymak mümkün olmadığı için bu çalışmada kontrol ve çalışma gözlerinde tüm pozitif hücreler sayılarak istatistiksel olarak değerlendirmeleri yapılmıştır. Bilindiği gibi TUNEL boyama tekniği, DNA fragmantasyonu olan hücreleri belirginleştiren bir yöntemdir ve işaretleme çekirdeklerde algılanır, hücrelerin TUNEL pozitif boyanması mutlaka apoptoza gidecekleri anlamına gelmez. Ancak büyük bir bölümünün apoptotik yola girdiklerini gösterir. Kaspaz-3 ise normal şartlarda hücrelerde var olan ancak apoptotik süreçte aktive kaspaz formuna dönüşen bir proteindir ve apoptozun aktif elemanıdır. Kaspaz-3 işaretleme sitoplazmada algılanır. TUNEL için yapılan işaretli çekirdek sayma işlemi kaspaz-3 için yapılmamıştır. Çünkü retinada ne kadar ince kesit alınırsa alınsın hücrelerin birbirini gölgelemesi nedeni ile sitoplazmik boyanmış hücreleri birbirinden ayırt edebilmek teknik olarak mümkün değildir. Ancak çalışmamızda kaspaz-3 işaretlemesinin yapılması, apoptoza gideceği kesin olan hücrelerde tutulumun varlığını ve derecesini göstererek, TUNEL bulgularını konfirme etmiştir.

Gerek kendi yaptığımız çalışma gerekse İnan ve arkadaşları (8) ile Avcı ve arkadaşlarının (7) yaptığı çalışmadan da anlaşıldığı gibi intravitreal uygulanan bevacizumab, apoptozis aracılı hücrel toksisiteye yol açmakta ve bevacizumabın bu toksik etkisi, artan ilaç dozu ile artış göstermektedir. Kendi çalışmamızda kullandığımız ve literatürde bu amaçla kullanımını tespit edemediğimiz intraperitoneal L-karnitin, 2 mg ve 4

mg dozlarında uygulanan intravitreal bevacizumabın apoptozis aracılı toksik hücre hasarını önlerken, 6 mg dozda uygulanan intravitreal bevacizumabın toksisitesini önleyememektedir. Avcı ve arkadaşlarının (7) 0.25 mg/10 µl intravitreal bevacizumab dozlarında görülen TUNEL boyanma yüzdesini (%32), 0.05 ml salin solüsyonu uygulanan gözlerde gözlenen TUNEL boyanma yüzdesi (% 32.3) ile benzer bulması, toksik olmayan intravitreal bevacizumab dozu hakkında bize fikir vermektedir. Tavşan vitreus hacminin (2–2.5 ml), insan vitreus hacminin (4–5 ml) yaklaşık olarak yarısına tekabül ettiği göz önüne alınırsa, çalışmamızda kullandığımız dozların insan gözündeki karşılığı 4 mg, 8 mg ve 12 mg olacaktır. Buradan yola çıkarak, L-karnitin insan gözlerinde 8 mg ve daha az dozlarda uygulanan bevacizumaba bağlı apoptotik etkiyi önleyebileceğini söyleyebiliriz. Çalışma süremizin 14 gün ile sınırlı olması, tekrarlayan doz uygulamalarımızın bulunmaması ve uyguladığımız doz çeşitlerinin sınırlı olması, bu konu üzerinde farklı kurgulamalar ile yeni çalışmaların yapılması gerektiği sonucunu doğurmaktadır.

SONUCLAR

1. Çalışmaya toplam 30 erkek tavşanın (Yeni Zelanda albino tavşan, 2-3kg ağırlığında) 60 gözü dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tavşanlar 2 eşit gruba ve her grup da 3 eşit alt gruba ayrıldı. Grup 1; her biri 2 mg(0,08 ml) , 4 mg (0,16 ml) ve 6 mg (0,24 ml) intravitreal bevacizumab (Altuzan, Roche®) uygulanacak olan 3 eşit alt gruba (Grup 1a, 1b, 1c) ayrıldı. Grup 2 ise aynı alt gruplama prensibi ile gruplandı (Grup 2a, 2b, 2c), ancak intravitreal bevacizumab uygulamasına ilaveten intraperitoneal 500 mg/kg L-karnitin de uygulandı. Her tavşanın sağ gözü bevacizumab uygulanan çalışma gözü, sol gözü ise aynı hacimde salin solüsyonu uygulanan kontrol grubu göz olarak belirlendi.
2. İntavitreal bevacizumab uygulanan tavşan gözlerinde, ışık mikroskopik olarak morfolojik değişikliğe rastlamadık.
3. İntavitreal bevacizumab uygulanan tavşan gözlerinin elektron mikroskopisi ile yapılan ultrastrüktürel incelemelerinde; 2 mg ve 4 mg dozlarında ılımlı düzeyde, 6 mg dozlarında ise ağır düzeyde hücresel hasara ve apoptotik hücrelere rastladık.
4. İntavitreal bevacizumab uygulanan tavşan gözlerinin kaspaz-3 ile yapılan immünohistokimyasal incelemesinde; 6 mg dozda daha belirgin olmak üzere bütün doz gruplarında, apoptotik sürece gidişin göstergesi olan kaspaz-3 tutulumunda artış saptadık.
5. Tavşan gözlerinin, apoptotik süreçteki DNA fragmantasyonunu gösteren TUNEL boyama tekniği ile yapılan incelemelerinde; intravitreal bevacizumab uygulanan gözlerde TUNEL pozitif boyanan hücre sayısının daha fazla olduğunu ve artan doz ile birlikte pozitif boyanan hücre sayısının arttığını saptadık.
6. İntavitreal bevacizumaba bağlı apoptotik hücresel hasarın 2 mg ve 4 mg doz gruplarında intraperitoneal uygulanan L-karnitin ile önlenemediğini ancak 6 mg doz grubunda L-karnitin ile önlenemediğini saptadık.
7. Bu çalışmada bulduğumuz sonuçların başka çalışmalar ile desteklenmesine ihtiyaç vardır. Daha uzun süreli takiplerin yapıldığı çalışmalar ile uzun dönemde apoptozis cevabı değerlendirilmelidir. Daha düşük doz uygulamalarında apoptozisin varlığı araştırılmalıdır. Tekrarlayan uygulamalar sonucu verilen kümülatif dozun apoptozis ve hücresel hasara etkisi araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, et al. Framingham Eye Study monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults. *Surv Ophthalmol*. 1980; 24: 335–610.
2. Mukesh BN, Dimitrov PN, Leikin S, et al. Five-year incidence of age-related maculopathy: The Visual Impairment Project. *Ophthalmology* 2004; 111: 1176–1182.
3. Adamis AP, Aiello LP & D'Amato RA. Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis* 1999; 3: 9–14.
4. Costa RA, Jorge R, Calucci D, et al. Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): Results of a phase I dose escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4569–4578.
5. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005; 25: 111–118.
6. Gora-Kupillas K, Josko J. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol* 2005; 43: 31–39.
7. Avcı B, Avcı R, İnan ÜU, Kaderli B. Comparative evaluation of apoptotic activity in photoreceptor cells after intravitreal injection of bevacizumab and pegaptanib sodium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jul; 50(7): 3438–46.
8. İnan ÜU, Avcı B, Kusbeci T, et al. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48: 1773–1781.
9. Kanski JJ. Acquired macular disorders. In: Kanski JJ (ed). *Clinical Ophthalmology: A Systemic Approach*, fifth edition. Philadelphia; Butterworth-Heinemann, 2003, 389–434.
10. Schubert HD. Structure and function of the neural retina. In: Yanoff M, Duker JS (eds): *Ophthalmology*, second edition. Spain; Mosby, 2004, 771–775.
11. Klein R, Klein B, Wang Q, et al. Is age-related maculopathy associated with cataracts? *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 191–196.
12. Abdelselam A, Priore LD, Zarbin MA. Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol* 1999; 44: 1–29.

13. Klein R, Klein BE, Linton KL, et al. The relation of age-related maculopathy to smoking. The Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 190–200.
14. Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD, et al. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1191–1199.
15. Claver CC, Wolfs RC, Assink JJ, et al. Genetic risk of age-related maculopathy: population based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 1646–1651.
16. Van de Schaft TL, Brujin WC, Mooy CM, et al. Is basal laminar drusen unique for age-related macular degeneration? *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 420–425.
17. Kulkarni AD, Kuppermann BD. Wet age-related macular degeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 1994–2009.
18. Bressler NM, Bressler SB, Seddon JM, et al. Drusen characteristics in patients with exudative versus nonexudative age-related macular degeneration. *Retina* 1988; 8: 108–114.
19. Boldt HC, Bressler SB, Fine SL, et al. Age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 1990; 1: 247–257.
20. Bressler NM, Maguire MG, Bressler SB, et al. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration: the Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 442–447.
21. Arnold JJ, Sarks SH, Killingsworth MC, et al. Reticular pseudodrusen: A risk factor in age-related maculopathy. *Retina* 1995; 15: 183–191.
22. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth M. Evolution of geographic atrophy of the retina pigment epithelium. *Eye* 1988; 2: 552–577.
23. Berkow JW. Subretinal neovascularization in senile macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1984; 97: 143–147.
24. Flynn HW, Bressler SB, Brown GC, et al. Age-related macular degeneration in Retina-Vitreus. *AAO Journal*; 2003; 49–76.
25. Grossniklaus HE, Green WR. Choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 496–503.
26. Schmidt-Erfurth U, Miller J, Sickenberg M, et al. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization: Clinical and angiographic examples. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236: 365–374.

27. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 1995; 39: 367–374.
28. Occult choroidal neovascularization. Influence on visual outcome in patients with age-related macular degeneration. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 400–412.
29. Regillo CD, Benson WE, Maguire JJ, et al. Indocyanine green angiography and occult choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 1994; 101: 280–288.
30. Flood V, Smith W, Wang J.J. Dietary antioxidant intake and incidence of early age-related maculopathy. *Ophthalmology* 2002; 109: 2272–2278.
31. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1986; 104: 694–701.
32. Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-years results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 500–509.
33. Subaşı M, Akmansu M, Or M. Treatment of age-related subfoveal neovascular membranes by teletherapy: results of a non-randomized study. *Radiat Med*. 1999; 17: 169–73.
34. Reichel E, Berrocal AM, Ip M, et al. Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1999; 106: 1908–1914.
35. Eckardt C, Eckardt U, Conrad HG. Macular translocation with and without counter-rotation of the globe in patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1999; 105: 25–29.
36. Thomas AA, Kaplan HJ. Surgical removal of subfoveal neovascularization in the presumed ocular histoplasmosis syndrome. *Am J Ophthalmol* 1991; 111: 1–7.
37. Karaçorlu M, Karaçorlu SA, Özdemir H. Fotodinamik tedavinin etki mekanizması. *Koroid Neovaskülarizasyonları ve Fotodinamik Tedavi*. 1. baskı. İstanbul: İstanbul Retina Enstitüsü; 2006: 35–39.
38. Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-

- related macular degeneration with verteporfin: Two-year results of 2 randomized clinical trials –TAP Report No.2. *Arch Ophthalmol* 2001;119:198–207.
39. D'Amico DJ, Goldberg MF, Hudson H, et al. Anecortave Acetate Clinical Study Group. Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology* 2003; 110: 2372–2383.
 40. Nauck M, Roth M, Tamm M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1997; 16: 398–406.
 41. Gillies MC, Simpson JM, Luo W, et al. A randomized clinic trial of a single dose of intravitreal triamcinolone acetonide for neovascular age-related macular degeneration: One year results. *Arch Ophthalmol* 2003; 121; 667–673.
 42. Rosina C, Bottoni F, Staurenghi G. Clinical experience with pegaptanib sodium. *Clin Ophthalmol*. 2008 Sep; 2: 485–488.
 43. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, et al. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351: 2805–2816
 44. Eskens F. Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer* 2004; 90: 1–7.
 45. Lloyd R, Harris J, Wadhwa S, Chambers W. Food and Drug Administration approval process for ophthalmic drugs in the US. *Curr Opin Ophthalmol*. 2008; 19: 190–194.
 46. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355: 1419–1431.
 47. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355: 1432–1444.
 48. 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.
 49. Velpandian T, Sharma C, Garg SP, et al. Safety and cost-effectiveness of single dose dispensing of bevacizumab for various retinal pathologies in developing countries. *Indian J Ophthalmol* 2007; 55: 488–490.

50. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389–395.
51. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932–936.
52. D'Amore PA. Mechanism of retinal and choroidal neovascularisation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 3974–3979.
53. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, et al. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1198–1206.
54. Toivanen PI, Nieminen T, Viitanen L, et al. Novel vascular endothelial growth factor D variants with increased biological activity. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5; 284: 16037–48.
55. Yazır Y, Gonca S, Filiz S, et al. Endotel hücreleri için önemli bir protein ailesi; vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), Ailenin üyeleri, yapısı ve sentezi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 26: 181–184.
56. Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 103–108.
57. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 561–569.
58. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2441–2449.
59. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257.
60. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9: 143–148.
61. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000; 74: 1–20.
62. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312–1316.
63. Slee EA, Adrain C and Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 1067–1074.
64. Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383–424.

65. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641–652.
66. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171–172.
67. Arama E, Agapite J and Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003; 4: 687–697.
68. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganism and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18: 39–61.
69. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatazoa. *HumReprod Update* 1996; 2: 87–102.
70. Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 2006; 78: 803–811.
71. Önal A, Astarçioğlu H, Örmən M, Atila K, Sarıoğlu S. Sıçandaki renal iskemi reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Dergisi* 2004; 10: 160–167.
72. Mansour HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res* 2006; 54: 165–171.
73. Sundaram K, Panneerselvam KS. Oxidative stress and DNA single strand breaks in skeletal muscle of aged rats: role of carnitine and lipoic acid. *Biogerontology* 2006; 7: 111–118.
74. Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol* 2000; 83: 119–124.
75. Augustyniak A, Skrzydlewska E. L-Carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress. *Alcohol*. 2009 May; 43: 217–23.
76. 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: 1929–1934.
77. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182–1186.
78. Schlingemann RO, Witmer AN. Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Prog Brain Res*. 2009; 175:2 53–67.

79. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 331–335.
80. 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.
81. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al. The carboxylterminal domain (111–165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996; 271: 7788–7795.
82. Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR et al. Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology* 2006; 113: 633–642.
83. 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 Jul; 148: 43–58.
84. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty four-week results of an uncontrolled open label clinical study. *Ophthalmology* 2006; 113: 2002–2011.
85. Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, et al. Intravitreal bevacizumab for the Management of Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 1–9.
86. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 536–544.
87. Rosenfeld P, Schwartz D, Blumenkranz M, et al. Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2005; 112: 1048 – 1053.
88. Gamulescu MA, Radeck V, Lustinger B, Fink B, Helbig H. Bevacizumab versus ranibizumab in the treatment of exudative age-related macular degeneration, *Int Ophthalmol*. 2009 Jul 26. [Epub ahead of print]

89. Bashshur ZF, Schakal A, Hamam RN, et al. Intravitreal bevacizumab vs verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 1357–1361.
90. Rich RM, Rosenfeld PJ, Puliafito CA et al. Short-term safety and efficacy of intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006; 26: 495–511.
91. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, et al. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab(Avastin). *Retina* 2006; 26: 257–261.
92. Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, et al. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol.* 2006; 142: 162–164.
93. Cheng CK, Peng PH, Tien LT, et al. Bevacizumab is not toxic to retinal ganglion cells after repeated intravitreal injection. *Retina* 2009; 29: 306–312.
94. 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.