

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM) insülin eksikliği, yokluğu veya dokular tarafından kullanılmaması sonucu ortaya çıkan ve hiperglisemi ile seyreden sistemik bir hastalıktır. Dünyada DM insidansı %1.5-2.5 oranında bildirilmektedir. Mikrovasküler komplikasyonlar diyabetteki mortalite ve morbiditenin esas nedenini oluşturmaktadır. Kronik hipergliseminin, vasküler endotelyal hasarla sonuçlanan bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere yol açtığı düşünülmektedir (1).

Diyabetik retinopati (DR), DM'de en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur. Tüm diyabet popülasyonunun %25'inde herhangi bir evrede DR bulunmaktadır, bunun %5'inde PDR (proliferatif diyabetik retinopati) görülmektedir. DR gelişmiş ülkelerde 40-65 yaş arası en sık körlük sebebidir. DM'ye bağlı retinopatinin ortaya çıkmasında en önemli faktör hastalığın süresidir. Herhangi bir düzeyde retinopati; 5 yıldan kısa süreli diyabetiklerde %5, 5-9 yıl arasındakilerde %30, 10-14 yıl arasındakilerde %45 ve 15 yıldan uzun süreli hastalarda %62 olarak bildirilmiştir (2).

DM'de hiperglisemi sonucu polyol yolu, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu, glikolizasyon son ürünleri (AGE) oluşumu, oksidatif stres mekanizmaları ile endotel hasarı oluşur. Endotel disfonksiyonunda vazokonstrüktör mediyatörlerin salınımında artış olur, hücre adezyon moleküllerinin salınımı artar (3). Lökositlerin endotele yapışması erken evre DR'de kritik olaydır ve hücre adezyon molekülleri buna arabuluculuk eder. Sonuçta DR'de kronik düşük seviyeli bir inflamasyon söz konusudur (4). Yapılan deneysel bir çalışmada retinada inflamasyon alanlarındaki damar endotelinde intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), E-Selektin, trombosit-endotel hücre adezyon molekülü (PECAM), damar hücre adezyon molekülü (VCAM), P-Selektin gibi adezyon moleküllerinin arttığı immunhistokimyasal olarak saptanmıştır (5).

Endotelin-1'in diyabette retinal değişikliklere arabuluculuk ettiği ve etkisinin diyabetin süresine göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir (6). Yine diyabetik ratlarda kontrollere göre retinada Endotelin-1'in anlamlı artışı likid kromotografi ile radyoimmünassay olarak gösterilmiştir (7).

Diyabetin retinal mikrovasküler komplikasyonlarında temel rol oynayan faktör anjiojenik ve damar geçirgenlik faktörü olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) adlı moleküldür. PDR'li hastaların aköz humor ve vitreuslarında yükselmiş VEGF düzeyleri saptanmıştır (8).

İlk olarak Machemer (9) deneysel olarak intravitreal triamsinolon asetonidin (İVTA) intraoküler proliferasyon üzerine faydalı etkisini göstermiştir. Triamsinolon asetonid (TA)'in deneysel olarak retinal damarlar ve kan-retina bariyerini stabilize ettiği, kapiller geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir. TA'nın subtenon uygulanmasının yetersiz penetrasyon nedeniyle kan-retina bariyerine karşı etkisiz olduğu gösterildiği için intravitreal enjeksiyon tercih edilmektedir (10, 11).

İVTA'nın proliferatif vitreoretinopati, retinal neovaskülarizasyon, eksüdatif yaşa bağlı maküler dejenerasyon, santral retinal ven ve ven dal oklüzyonuna bağlı maküler ödem, postoperatif kistoid maküler ödem, diyabetik makula ödemi (DMÖ), sempatik oftalmi, oküler histoplazmosis sendromu, üveitler, PDR, idyopatik jukstafoveal telenjiektazi tedavisinde kullanıldığını bildiren yayınlar mevcuttur (12-19).

TA'nın DR'nin erken dönemindeki damar sızıntısını ve VEGF, ICAM-1, TNF- α (tümör nekroz faktör alfa) gibi inflamatuvar belirteçleri azalttığı saptanmıştır (20). Ayrıca TA'nın retinal vasküler endotelde adezyon moleküllerinin salınımını azaltıp lökosit-endotel ilişkisini inhibe ederek DR seyrinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (21).

DR'li hastalarda İVTA ile vitreusta VEGF düzeylerinde anlamlı azalma saptanmıştır. Olgularda makula ödeminde gerileme, görme keskinliklerinde artış izlenmiştir (22).

Bu çalışmada streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratlarda intravitreal triamsinolon asetonid'in anjiyogenezis ve doku tutulumu belirteçleri olan VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

1. RETİNA ANATOMİSİ

Retina, sklera ve koroidden sonra, göz küresinin en içteki üçüncü gömleğidir. Ora serratada 0,1 mm, ekvatorunda 0,2 mm, optik sinir yakınında 0,5 mm kalınlığı olan ince saydam bir dokudur. Retina, pigmentli pigment epiteliyle, saydam bir zar olan sensoriyel retinadan oluşmuştur. Arkada sinir lifi tabakası hariç bütün retina tabakaları optik sinir başında sonlanır. Periferde sensoriyel retina ora serrataya uzanır ve pars plana pigmentsiz siliyer epitel ile devam eder. Retina komşu pigment epiteli ve altındaki skleranın şeklini alsa bile pigment epiteline sadece iki bölgede, optik disk ve ora serratada sıkı yapışıklık gösterir. Diğer bölgelerde yapışıklık zayıftır. Pigment epiteliyle sensoriyel retina arasında anatomik bağ yoktur. Birbirlerine sadece yaslanmışlardır. Retina dekolmanı, santral seröz koryoretinopati gibi hastalıklarda sensoriyel retina pigment epitelinden ayrılır (23-28).

1. 1. Retinanın histolojik anatomisi:

Mikroskopik olarak retinanın on katı vardır.

1. Retina pigment epiteli

Retina pigment epiteli, tek sıralı, 4-6 milyon hücreden oluşmuştur. Bu hücreler koroidin Bruch zarına yapışık, küboid yapıda melanin pigmenti içeren hücrelerdir. Bu hücreler arasında zonula okludens denen sıkı bağlantılar vardır. Bu özelliğiyle ışığın koroide geçmesini engellerler. Bu bağlantılar suyun ve iyonların serbest geçişini engellediğinden sıvının subretinal alana pompalanması için metabolik enerji kullanılır. Hücreler arasındaki bağlantıların çok sıkı olması, retina damarlarıyla birlikte, pigment epitelinin ikinci kan-retina bariyerini oluşturmasına yol açar. Pigment epiteli fotoreseptörlerin fonksiyonunu idame ettirmesindeki yaşamsal dokudur. Retina pigment epiteli hücreleri arasında, retinanın farklı bölgelerinde şekil ve boyut farklılıkları görülmektedir. Maküla bölgesindeki hücreler daha küçük çapta iken (10-14 mikron), periferde hücreler düz ve daha geniş çaptadır (60 mikron). Pigment epiteli hücreleri foveada, periferdekilere göre daha yüksek, dar ve pigmentlidirler. Bu nedenle fluorescein anjiyografisinde fovea, koroid fluoresansının maskelenmesine bağlı olarak daha karanlık görülür. Fotoreseptör hücrelerinin yoğunluğu retinanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermekle birlikte, ortalama her bir retina pigment epiteli hücresine karşılık 45 adet fotoreseptör hücresi bulunur.

2. Fotoreseptör tabakası

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

3. Dış limitans zarı

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

4. Dış nükleer tabaka

Fotoreseptörlerin çekirdek ve sitoplazmalarının bulunduğu bölgedir.

5. Dış pleksiform tabaka

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

6. İç nükleer tabaka

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

7. İç pleksiform tabaka

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

8. Gangliyon hücreleri katı

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

9. Sinir lifleri tabakası

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

10. İç limitans zarı

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

1. 2. Retinanın Topografik Anatomisi:

Retina topografik olarak iki bölümde incelenir: Santral retina (maküla) ve periferik retina.

1. Maküla

Santral retina ya da maküla bölgesi, histolojik olarak gangliyon hücre tabakasında en az iki nükleus tabakası içeren bölge şeklinde tanımlanır. Topografik olarak maküla 4 kısımdan oluşur.

a) Fovea

Fovea, santral retinanın iç, yani vitreusa bakan yüzünde hafif bir çöküklük veya ekskavasyondur. Fovea, optik sinir başı merkezinin 4,0 mm temporalinde ve 0,8 mm aşağısında yaklaşık 1,5 mm çaplı alandır. Foveanın derinliği kişiden kişiye değişmekle birlikte, ortalama 0,25 mm'dir. Foveada ikinci ve üçüncü nöronların kenara doğru itilmesine

bağlı olarak 22 derecelik bir çukurluk oluşur. Foveada sinir lifleri, ganglion hücreleri ve iç pleksiform tabakaları yoktur. Foveanın santral 0,57 mm çaplı bölgesi fotoreseptör olarak sadece konileri içerir.

b) Foveola

Foveola 350 mikron çaplı ve 150 mikron kalınlığında, yalnız konilerin yer aldığı fovea çukurluğudur. Avasküler foveola kapillerlerin oluşturduğu bir halka ile çevrelenir. Bu damarlar iç nükleer tabaka düzeyindedir ve 250-600 mikron genişliğindeki avasküler zonu oluştururlar. Foveola merkezinde çapı yaklaşık 150- 200 mikron olan ve en keskin görmeyi sağlayan umbo yer alır. Fovealoda birinci ve ikinci nöronlar kenara itildiğinden dış pleksiform tabakadaki lifler, iç nükleer tabakayı oluşturan hücrelerin uzantıları ile sinaps yapmadan önce iç limitans membrana paralel seyrederekler.

c) Parafovea

Parafovea foveayı çevreleyen, 0,5 mm genişliğindeki bölgedir. İç retina tabakasında, özellikle iç nükleer ve ganglion hücre tabakasında belirgin hücre artışı ile karakterizedir. Retinanın bu bölgesinde tabakalar regülerdir. 4-6 tabaka ganglion hücresi, 7-11 tabaka bipolar hücre içerir. Hücreler bu bölgenin periferinde sayı bakımından azalma gösterir. Her 100 mikronda yaklaşık 100 koni, komşu koniler arasındaki boşlukta ise bir tek basil bulunur.

d) Perifovea

Perifovea 1,5 mm genişliğindedir ve dış sınırı fovea merkezinden 2,75 mm uzaktadır. Çok sayıda ganglion hücre tabakası ve 6 bipolar hücre tabakası içerir. Burada her 100 mikronda ortalama 12 koni ve komşu koniler arasında iki rod hücresi bulunur.

2. Periferik retina

Periferik retina yakın perifer ve uzak perifer olarak iki bölge halinde incelenmektedir.

a) Ekvator

Yakın perifer 1,5 mm genişliğinde perifovea ile ora serrata arasında ekvator olarak adlandırılan, yaklaşık 3 mm genişlikteki bölgedir. Vorteks venleri ekvatorunda, saat 1, 5, 7 ve 11 kadrantları hizasında konumlanmıştır. Üst nazal ve temporal vorteks venleri 7-8 mm, alt vorteks venleri 5-6 mm'lik mesafeden başlarlar. Gözün çevresi ekvatorunda ortalama 72 mm, ora serratada 60 mm'dir.

b) Ora serrata

Uzak perifer, ekvator ile pars plana arasında, ora serrata olarak adlandırılan bölgedir. Ora serrata nöral retinanın sonlandığı, silyer cisim ile retinanın birleştiği yerdir. Ora serratada fotoreseptör yoktur. Burada retina pigment epiteli silyer cisim epiteline, Bruch's membranı pigment epiteli bazal membranına, müller hücreleri pigmentsiz epitele, iç limitans membran ise pigmentsiz epitelin bazal membranına dönüşür. Genişliği temporalde 2 mm, nazalde 1 mm'dir. Limbustan ora serrataya uzaklığı temporalde 7 mm, nazalde 6 mm'dir. Ora serrata bölgesinde sensoriyel retina, pigment epiteli ile birleşir ve retina altı sıvının pars planaya geçişi engellenir. Retina ora serratada 20-30 adet parmaklı uzantılar vererek testere dişi görünümü oluşturur.

c) Pars plana

Uzak periferin ikinci kısmı pars plana bölgesi olup, uç perifer bölgesi olarak da tanımlanmaktadır. Pars plana, retinanın ora serratası ile silyer cismin pars pilikatası arasında bulunur. Silyer cisim pars pilikata ve pars plana olarak iki kısımdan oluşur. Pars pilikata siliyaris, iris kökünden arkaya doğru uzanan yaklaşık 2,5 mm kalınlığındaki bölgedir. Silyer cismin oblik ve dairesel uzanan kasları ve 70-80 adet silyer uzantıları bulunur. Pars plana siliyaris, globun temporal ve nazal yarılarında farklı genişliklerde çepeçevre uzanan, silyer cismin ikinci kısmıdır. Nazalde yaklaşık 3 mm, temporalde ise yaklaşık 4,5 mm genişliktedir.

1. 3. Retinanın Kan Dolaşımı

Gözün arteriyel beslenmesi internal karotid arterin ilk dalı olan oftalmik arter tarafından sağlanır. Oftalmik arterden çıkan retina santral arteri, retinanın iç 2/3'ündeki tabakaları besler. Retinanın dış 1/3'ü ise (retina pigment epiteli, fotoreseptörler) koroidden difüzyonla beslenir. Oftalmik arterin santral retina arterinden sonraki dalları olan kısa ve uzun arka silyer arterler optik sinir etrafından globa girerler. Posterior koriokapillaris kısa arka silyer arterlerden, anterior koriokapillaris ise uzun arka silyer arterlerden ve ön silyer arterlerden beslenir. Retinanın venöz drenajı santral retina veniyle sağlanır. Optik sinirden çıkan venöz drenaj direkt olarak kavernöz sinüse ulaşır. Koroidin venöz drenajı ise vorteks venleri ile üst ve alt oftalmik venler aracılığıyla kavernöz sinüste sonlanır.

1. Arterler

Retina nöroserebral katı retina santral arterinden ve var olduğunda, silyoretiniyen arterden beslenir.

a) Retina santral arteri

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

b) Siliyoretiniyen arter

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

2. Venler

Ora serratada venler, arterlere göre daha perifere kadar giderler. Ekvatordan itibaren arterlerle birlikte seyrederler ve papillada toplanarak retina santral venini oluştururlar. Arter ve venler sık sık çaprazlaşırlar. Çaprazlaşma bölgelerinde aynı kılıf içinde olduklarından arteriyosklerozda arter veni ezer (Gunn belirtisi). Retina santral veni, oftalmik vene, sonra da kavernoöz sinüse dökülür. Venlerin çapı arterlere göre daha geniştir. Normalde arter çapının ven çapına oranı 2/3'tür.

3. Kapillerler

Retina arteriyolları ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Koriyokapillerlerin duvarlarında geniş pencerelemeler bulunmasına ve geçirgen olmalarına karşılık, retina kapillerlerinin duvarları sızdırmazdır. Retina pigment epiteli dış, retina kapillerleri de iç kan-retina bariyerini oluştururlar. Kapillerlerin bazal zarının içinde, birbirlerine zonula occludenslerle sıkıca yapışık endotel hücreleri, duvarlarında da, kasılmalarını sağlayan çizgisiz kas lifleri, perisitler vardır. Normalde perisit/endotel hücresi oranı 1/1'dir. Retina kapillerleri yüzeysel ve derin olmak üzere, iki ağ şekindedirler.

a) Yüzeysel kapillerler

Retinanın sinir lifleri katındadırlar.

b) Derin kapillerler

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

4. Lenfatik damarlar

Retinada lenfatik damar yoktur.

2. KAN-RETİNA BARIYERİ

Kan-retina bariyeri retina damarları ve RPE'den oluşur. Bariyer fonksiyonu, tüm suda çözünen moleküllerin hücreler arası geçişini kısıtlayarak bu moleküllerin retinaya girişini engelleyen sıkı bağlantılara bağlıdır. Elektron mikroskobu, retina kapiller endotel hücreleri ve RPE hücrelerinin apikolateralini çevreleyen zonula okludensi gösterir.

a) Dış Kan-Retina Bariyeri: Komşu RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinden (zonula occludens ve zonula adherens) oluşmaktadır.

b) İç Kan-Retina Bariyeri: Retina kapillerlerinin hücresel elemanları endotelial hücreler ve perisitler tarafından oluşturulur. Endotelial hücreler arasındaki sıkı bağlantılar iç kan-retina bariyerini oluştururlar. Perisitler kapillerlerin etrafını sararlar ve damar duvarının desteğini sağlayan hücrelerdir. Normal sağlıklı damarlarda her bir endotelial hücreye bir adet perisit hücre karşılık gelmektedir.

3. DİYABETİK RETİNOPATİ

DM insülin hormonunun yokluğu, yetersizliği veya dokular tarafından kullanılamaması sonucu oluşan pek çok sistemi tutan bir hastalıktır. DM kronik hiperglisemi ile seyrederek ve başta göz, böbrek ve periferik sinirler olmak üzere tüm mikro ve makrovasküler sistemleri etkiler. Dünyada DM insidansı %1,5-2,5 oranında bildirilmektedir (1). DM'nin iki tipi vardır. İnsüline bağlı DM (tip 1), insüline bağlı olmayan (tip 2). Tip 1 gençlerde akut olarak gelişirken tip 2 erişkinlerde sinsi seyrlidir. İnsülinin 1922 yılında bulunması ve diğer antidiyabetik ilaçların kullanılmaya başlanması ile DM hastalarının yaşam süreleri artmıştır. Bunun sonucu olarak DM'nin ana komplikasyonlarından olan DR görülme sıklığında belirgin artış olmuştur. Tip 1 hastalarda Tip 2'ye göre şiddetli DR gelişme riski daha yüksektir. Ancak diyabetik hastaların %90-95'i Tip 2 hastalar olduğu için şiddetli retinopati gelişen olguların büyük bölümü bu tip hastalardan kaynaklanır (29).

3. 1. DİYABETİK RETİNOPATİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Diyabetik retinopati, DM'de en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur. Tüm diyabet popülasyonunun %25'inde herhangi bir evrede DR bulunmaktadır, bunun %5'inde proliferatif DR görülmektedir. DR gelişmiş ülkelerde 40-65 yaş arası en sık körlük sebebidir ve bir yılda gerçekleşen yeni körlük vakalarının %12'sinden sorumludur (2).

Framingham grubunun 52-85 yaş popülasyonunda yaptığı çalışmada, DR prevalansı, 52-64, 65-74 ve 75-85 yaş arası gruplarda sırasıyla %2.1, %2.9 ve %7.0 olarak bulunmuş, tüm gruplar gözönüne alındığında da %3.1 olarak tespit edilmiştir (30). Kahn ve Bradley'in benzer çalışmasında, 55-64, 65-74 ve 75 yaş ve üzeri gruplarda, DR prevalansı sırasıyla %1.9, %2.8 ve %3 olarak bildirilmiştir (31).

Wisconsin grubunun yaptığı epidemiyolojik çalışmada hastalar 30 yaş altı ve üstü diyabetikler olarak iki grupta incelenmiştir. Otuz yaş altındaki diyabetiklerde, hastalık süresi 5 yıldan az olanlarda retinopati %17, 15 yıl üstünde ise %98 bulunmuştur. Otuz yaş üstünde DM tanısı konulan grupta insülin kullanmayanlarda, 5 yıldan az diyabetik olanlarda retinopati %17-29, 15 yıl üstünde ise %50-63 olarak saptanmıştır. İnsüline bağımlı grupta 5 yıl altında retinopati oranı %40 iken, 15 yıl üstünde %85 'tir (32, 33).

Puberteden önce DM tanısı alan hastalarda DR puberte çağında hızlanır. En hızlı retinopati gelişimi bu grupta görülür. Tip 1 diyabetik hastalarda hastalığın başlama yaşı ilerledikçe DR gelişim hızı da düşmektedir. Tip 2 diyabetiklerde tanı sırasında DR bulunma olasılığı, tip 1'e göre daha yüksektir ancak zaman içinde retinopati gelişme oranı daha düşüktür. Yetmiş yaş üstü diyabetiklerde ise retinopati görülme olasılığı oldukça azdır (2).

3. 2. DİYABETİK RETİNOPATİ RİSK FAKTÖRLERİ

Diyabetin süresi:

DM'ye bağlı retinopatinin ortaya çıkmasında en önemli faktör hastalığın süresidir. Herhangi bir düzeyde retinopati; 5 yıldan kısa süreli diyabetiklerde %5, 5-9 yıl arasındakilerde %30, 10-14 yıl arasındakilerde %45 ve 15 yıldan uzun süreli hastalarda %62 olarak bildirilmiştir (2).

DM tanısı konulduktan 20 yıl sonra tip 1 hastaların hemen tamamında, tip 2 hastaların % 60'ında herhangi bir evrede DR görülür (32).

Metabolik kontrol:

Diyabetik retinopati gelişimini önlemesede, ortaya çıkışını geciktirebilmektedir. Ancak her türlü önlemle kan glukoz seviyeleri normal seviyelerde tutulan bazı hastalarda DR ilerleyişi gözlenebilir.

Yapılan çalışmalarda, iyi metabolik kontrol ile ilerleme hızında azalma saptanmıştır. Tip 1 hastalarda iyi kan şekeri regülasyonu ile DRP gelişme hızında %76, varolan retinopatinin ilerleme hızında % 54 azalma saptanmış (34). Tip 2 hastalarda DR'nin ilerleme hızında % 21 azalma saptanmış (35).

Gebelik:

Gebeliğe retinopatisiz başlayan kadınlarda, nonproliferatif DR gelişimi riski yaklaşık % 10 dur. Gebelik başlangıcında nonproliferatif DR'si olanlar da ilerleme gösterme eğilindedir. Doğumdan sonra bir miktar gerileme olur. Önceden tedavi edilmiş PDR gebelikte çoğunlukla kötüleşmez (36).

Hipertansiyon:

Sistemik hipertansiyon bağımsız bir risk faktörüdür ve DR'nin ilerleyişi ile ilişkili bulunmuştur (37).

Ağır renal hastalık:

Diyabetik retinopatinin ilerlemesini hızlandırabilmektedir. Mikroalbuminürisi olan hastalar dahi, retinopati gelişimi için risk altındadır (37).

Hiperlipidemi:

DR seyirinde olumsuz etkileri mevcuttur, özellikle sürecin bir parçası olan sert eksudaların gelişimini hızlandırmaktadır (38).

Oküler faktörler:

Glokomlu gözlerde ve miyopik gözlerde DR gelişme olasılığının daha az olduğu gösterilmiştir (39).

Diğer olumsuz faktörler arasında şişmanlık, sigara ve anemi sayılabilir.

3. 3. DİYABETİK RETİNOPATİ PATOGENEZİ

DR, retinadaki prekapiller arteriyoller, kapillerler ve venülleri ekileyen bir mikroanjiyopatidir. Hastalık ilerledikçe daha büyük damarlarda da tutulum olabilir. Retinopati tablosunda hem mikrovasküler tıkanıklığa hem de mikrovasküler sızıntıya ait bulgular gözlenir (40).

DR'ye ilişkin patolojik değişimlerin ortaya çıkmasında rol oynayan başlıca patolojik biyokimyasal mekanizmalar nonenzimatik glikolizasyon, artmış oksidatif stres, polyol yolu, PKC aktivasyonu ve artmış nitrik oksit seviyesidir (41, 42).

a) Nonenzimatik glikolizasyon: Uzun süreli hiperglisemide glukoz, proteinlere nonenzimatik olarak bağlanır ve yıkıma dayanıklı birtakım ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur. Bunun en iyi örneği glikolize hemoglobin (HbA1c)'dir. HbA1c'nin oksijene afinitesi fazladır dokuya oksijeni kolaylıkla bırakmaz. Sonuçta retinal hipoksi oluşur. Nonenzimatik glikolizasyon hipergliseminin yüksekliğine ve devam süresine bağlı olarak gelişen yavaş bir reaksiyondur. Ara ürün olarak AGE ürünleri ortaya çıkar. Bu ürünler birikim oluşturarak bazal membranda kalınlaşmaya yol açarlar (43).

b) Oksidatif stres: Bu teoriye göre oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller, proteinlerin çapraz bağlarını etkiler ve damar duvarını oluşturan proteoglikanların yapısında değişme olur. Sonuçta bazal membranda kalınlaşma ve endotel hücre fonksiyonları bozulur ve hücrede tahribat oluşur. Serbest radikaller direkt olarak vasküler endotele toksik olabilir (43).

c) Sorbitol yolu: Diyabetik retinopati gelişiminde rol oynayan enzimatik mekanizmalardan biri sorbitol yolu (polyol yolu)'dur. Glukoz, aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole dönüşür. Normal kan şekeri değerlerinde bu yol çok az aktivite gösterir veya hiçbir aktivite göstermez. Kan glukoz değerlerinin yükseldiği dönemlerde aldoz redüktaz enzimi glukoz için heksokinaz enzimi ile yarışır. Bu enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sorbitol hücre dışına kolay bir şekilde difüze olamaz ve intrasellüler konsantrasyonu artar. İntrasellüler sorbitol birikimi hücre içi elektrolit imbalansı, Na-K ATPaz bozukluğuna yol açar. Bu proçesleri bazal membran kalınlaşması doğal olarak hücre ölümü izler. Bu durum diyabetik retinopatinin gelişiminde rol oynar. Bu reaksiyonların lens epitel hücrelerinde görülmesi de diyabetik katarakt ile sonuçlanır. DM'de retinal perisitler ve Schwann hücrelerinde aldoz redüktazın yüksek konsantrasyonlarda olduğunun gösterilmesi DR ve nöropati gelişiminde aldoz redüktaza bağlı hasarın sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (43).

d) Protein kinaz-C aktivasyonu: Serin-threonin kinaz grubundan olan PKC, adenozin trifosfazdan trifosfat grubunun transferini kataliz ederek hücre içi sinyalizasyonda önemli rol oynar. Kontrol edilemeyen diyabetlilerde, kronik hiperglisemi sellüler diaçilgliserolün artışına neden olur. Bu durum PKC isoformlarını aktive eder. PKC- β I ve β II

isoformları retina ve beyinde bulunur. PKC- β isoformlarının erken hiperglisemiye bağılı mikrovasküler hasarda önemli rol oynadığı, ayrıca VEGF'e bağılı neovaskularizasyonun ve vasküler permeabilite artışının PKC aracılığı ile olduğu düşünölmektedir. PKC aktivasyonunun damarlardaki etkileri şöyle sıralanabilir; endotelial hücre aktivasyonu ve proliferasyonu, permeabilite artışı, lökosit adezyonu, düz kas hücrelerinin kontraksiyonu ve büyümesi, Tümör büyüme faktörü- β , VEGF ve endotelin sentezi, bazal membran/ hücre dışı matriks protein sentezinde artışı ve anjiyogenez (43).

DR'de mikrovasküler tıkanıklıkta rol oynayan faktörler, kapiller endotelial bazal membran kalınlaşması, kapiller endotel ve perisit hücre hasarı ile endotelial proliferasyon, azalmış oksijen transportu ve trombosit yapışkanlığı ve kümelenmesinde artıştır.

Hiperglisemiye maruz kalan endotel hücreleri normalden daha fazla bazal membran materyali salgılamaktadırlar (44). Bazal membran kalınlaşması ile perisit ve endotel hücrelerinin birbirine direk teması önlenir. Perisit ve endotel hücrelerinin direk temasının endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyen önemli bir faktör olduğu görölmüşür (45). Böylece bazal membran kalınlaşmasının endotelial hücre proliferasyonunu yani yeni damar oluşumunu kolaylaştırdığı söylenebilir.

Perisit hücreleri kapillerleri çevreler ve damar duvarının yapısal bütönlüğünü sağlamakla birlikte kasılma özelliğine de sahip olduklarından kapillerlerin çaplarının kontrolünde rol oynarlar. Kronik hiperglisemi durumunda perisit harabiyeti sonucu bu fonksiyonlar bozulur. Damar duvarının bütönlüğünün bozulması ve kapiller dilatasyon mikroanevrizmaların oluşmasında önemli faktörlerdir (46).

Azalmış oksijen transportu sonucu gelişen hipoksi kapiller endotelial hasar yaratan diğer bir faktördür. Kan şekeri regüle olmayan diyabetik hastalarda glikolize hemoglobin miktarı artmakta ve eritrosit 2-3-difosfogliserik asit seviyesi azalmaktadır (47). Bu iki faktör hemoglobinin oksijene bağlanma isteğini arttırmaktadır. Ayrıca eritrositlerin mikrovizkosite özelliğinin artması, deforme olabılme özelliklerinin azalması hipoksiyi destekleyen diğer faktörlerdir (40). Hiperglisemi sonucu Faktör-8 ve trombosit aktivitesinde artış ve fibrinoliz aktivatörlerinde azalma tromboza yatkınlığı arttırır. Aynı zamanda diyabete trombosit fonksiyonlarında anormallikler eşlik eder. Bu olaylar vasküler oklüzyonda rol oynar (27).

DR'de erken dönemde lökositlerin endotele adezyonu (lökostazis) ile birlikte endotel hasarı, kan-retina bariyerinin yıkılması meydana gelir. Hücre adezyon moleküllerinin

arabuluculuk ettiği lökositazis erken evre DR'de kritik olaydır. Yapılan çalışmalarda DR'de retinada VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin, PECAM, TNF- α gibi inflamatuvar belirteçlerin arttığı saptanmıştır. Dolayısıyla DR patogenezinde inflamasyon önemli rol oynamaktadır ve kronik düşük seviyeli bir inflamasyon söz konusudur (4).

Endotel disfonksiyonunda vazokonstriktör mediyatörlerin salımında artış olur, hücre adezyon moleküllerinin (ICAM-1, E-Selektin, PECAM) salınımı artar. ICAM-1 artışı inflamasyona, endotelin-1 artışı vazokonstrüksiyona, büyüme faktörleri artışı anjiyogenezise neden olur. Endotelin-1, güçlü vazokonstrüktif peptittir. DM'da kan akımını azaltarak retinopati gelişimine katkıda bulunur (3).

Hücre adezyon moleküllerinin artışı ile inflamatuvar hücreler damar endoteline tutunur, buradan toplanması ile dokuya geçer, inflamatuvar süreç başlar. DR'de hücre adezyon moleküllerinin artışı kronik inflamasyonun göstergesidir.

Diyabete bağlı retinal inflamasyona renin-anjiyotensin sisteminin de katkıda bulunduğu söylenmektedir. Yapılan bir çalışmada renin reseptör blokajı ile diyabete bağlı VEGF ve ICAM-1 artışının azaldığı saptanmıştır (48). DM ve iskemi nedeniyle biriken fazla miktardaki glutamat, nöronlar için toksiktir ve nöronal ölüme neden olur (49). Diyabetik retinalarda apoptozis ile ilişkili bir protein olan bax'ın artmış düzeyleri gösterilmiştir (50). Hızlanmış hücre ölümleri, ganglion ve iç pleksiform tabakada hücre kaybıyla ve retinada incelmeyle sonuçlanır.

Mikrovasküler tıkanma sonucu retinal hipoksi ve iskemi oluşur. Yeterli beslenemeyen retinanın hipoksiye cevabı iki türlü olabilir. Birincisi beslenemeyen bölgeleri kanlandırabilmek amacıyla normalde mevcut olmayan arteriol-venül arası şant damarları (kollateraller, intraretinal mikrovasküler anomaliler (İRMA)) gelişir. İkincisi hipoksik retinadan açığa çıktığı düşünülen vazoproliferatif faktörlerle yeni damar oluşumu yani neovaskülarizasyonun başlamasıdır. Neovaskülarizasyonun başlaması ile proliferatif evreye geçilmiş olur. Hayvan modellerinde VEGF salınımının neovaskülarizasyon gelişimiyle korele olduğu gösterilmiştir (51). Alınan vitreus örneklerinde PDR'li gözlerde, nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)'li gözlere oranla VEGF konsantrasyonunun daha yüksek olduğu da bildirilmiştir (52).

Neovaskülarizasyon önce endotel proliferasyonu ile başlar ve daha sonra fibröz doku proliferasyonu bu sürece eşlik eder. Yeni damarlar genellikle retinal venlerden gelişirler ve optik diskte iç limitan membran bulunmadığından önce buradan başlama eğilimindedirler.

Diskte neovaskularizasyon gelişmesi için retinanın %25'inden fazlasında perfüzyon olmaması gerekir. Venlerden gelişen yeni damarlar önce iç limitan membran içinde ilerler. Bu damarlar bağ doku çatısı olan ortamlarda daha kolay büyüdüklerinden arka vitreus yüzeyinde yayılma eğilimi gösterirler. Fibroblastlardan gelişen mezenşim dokusu yeni damarları bir zarf gibi çevreler. Oluşan bu fibroproliferatif doku sonrasında kasılmaya başlar. Kasılma arka vitreus yüzüne yapışık neovasküler dokuyu vitreus içine doğru çeker ve çekinti sonucu frajil olan bu damarlardan kanamalar meydana gelebilir (53).

Fibrovasküler dokunun kasılması ile vitreoretinal çekintiler oluşur ve buna bağlı olarak traksiyonel ve/veya yırtıklı retina dekolmanı meydana gelebilir. Hastalığın daha ileri dönemlerinde kalıcı vitreus içi kanamalar, vitreusta opak membran oluşumu, retinada yaygın fibrozis ve neovasküler glokom gelişebilir.

Sonuç olarak diyabetik hastalarda iç kan-retina bariyeri bozulmakta ve artan vasküler geçirgenlik sonucu kan içeriği retinaya yönelerek retinal ödem, sert eksuda, yüzeysel ve/veya intraretinal hemoraji şeklinde bulgular oluşturmaktadır, yine meydana gelen kapiller tıkanma sonucu hipoksi ve iskemi gelişmekte ve bunun sonucu olarakta proliferatif dönemde görülen neovaskularizasyon, vitreus içi ve/veya preretinal hemoraji, fibrovasküler traksiyonel bantlar ve bunların getirdiği retina dekolmanları görülmektedir.

4. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

Yeni damar yapımı (anjiyogenezis, neovaskularizasyon) vücutta fizyolojik olarak doku tamiri, yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiyogenezis ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit vb.), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda mevcuttur (54).

Anjiyogeneziste ilk olarak anjiyogenezise neden olan bir uyarının oluşması (hipoksi, iskemi), daha sonra bu etkenden dolayı anjiyojenik bir faktörün salınması ve ilgili faktör ya da faktörlerin de bazal membranı parçalaması (matriks metalloproteinaz enzimi aracılığıyla) sözkonusudur. Bunu sırasıyla endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, toplanması, proliferasyonu ve tüp oluşumu takip eder ve sonuçta yeni kan damarları oluşur (55).

Anjiyogenezisi stimüle eden birçok hormon ve büyüme faktörleri mevcuttur. Bunlar içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF'dir. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak ta bilinir. Endotel hücreleri üzerinde güçlü mitojenik etkisi olan VEGF gerek in

vivo gerekse in vitro olarak hipoksik ya da iskemik koşullardaki hücrelerden salınarak anjiyogenezisi stimüle edebilmektedir (56).

VEGF 46 kDa homodimerik, heparin-bağlayan glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF-A, B, C, D, E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206 ve VEGF-145 gibi izoformları bulunmaktadır. VEGF-A VEGF olarak adlandırılır en çok çalışılmış olandır. VEGF-165 en bol bulunanıdır (57).

VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak tirozin kinaz yapılı, endotel hücreleri üzerindeki vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (flk-1/KDR) ile lenf damarları üzerindeki VEGFR-3 (flt-4) adlı üç reseptörü ile gerçekleştirir (58). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras/GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, toplanma ve diferansiyasyonunu sağlar (59). Anjiyogenezisin VEGF bağımlı bir mediyatörü olan nitrik oksit, VEGF'in nitrik oksit sentaz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşarak endotel hücre toplanmasında rol alır (60). VEGF'in endotel hücrelerinde VCAM-1 ve ICAM-1'in salınımını artırıcı etkisi vardır.

VEGF gözde pigment epitel hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, glial hücreler, müller hücreleri ve ganglion hücreleri tarafından oluşturulur. Hipoksik şartlarda VEGF'in mRNA'sı artar ve endotel hücrelerinde bir dizi enzimatik olay oluşur. Diaçilgliserol ve endotel hücre çoğalması ve vasküler permabiliteden primer sorumlu enzim olan PKC- β artar (56). Başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, interlökin (IL)-1, IL-6, IL-10, IL-13, fibroblast büyüme faktörü-4, trombosit kökenli büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, TNF- α ve nitrik oksit gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (61). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan "hypoxia-inducible transcription factor-1" de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (62). Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiyojenik faktör olma özelliği yanında; VEGF'e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve hücreler arası bağlantı oluşumuna olanak sağlayarak vasküler geçirgenliği artırır (63).

4. 1. DİYABETİK RETİNOPATİ VE VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

VEGF normal retinadan az miktarda salınmaktadır ve fonksiyonel bir rolü vardır. VEGF-A'nın retinadaki patolojik durumlarda salınımı artar. Artmış VEGF-A NPDR'de endotel hücre göçü, endotel proliferasyonunu tetikleyerek bir geçirgenlik faktörü olarak etki eder. İskemik retinalarda hipoksinin uyardığı VEGFR-1'in sayı ve duyarlılığının artışı, VEGF-A'nın etkisini arttırır. Anjiogenezis sırasında endotel hücrelerinin hücre dışı matriksden toplanması ve invazyonu, integrin ailesine mensup olan hücre adhezyon moleküllerinin şefliğinde olmaktadır.

Glukoz tarafından aktive edilen endotelial PKC- β , VEGF-A'nın proliferatif ve geçirgenlik ile ilgili etkilerinden sorumlu olan sinyalleme kaskadının ana parçasıdır. İnsanlardaki NPDR'de ve deneysel hayvan modellerinde VEGF salınımının artmış olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla endotel hücreleri için bir yaşam faktörü olarak etki ettiği bilinen VEGF-A prelinik DR'nin başlangıcında retinal damar yatağı bütünlüğünü sürdürecektir bir mekanizma olarak artıyor olabilir (64).

Diyabetik retinopati sonucu oluşan iskemik alanlarda VEGF-A'nın lokal olarak artış gösterdiği bulunmuştur. Maymun gözlerinde tekrarlanan VEGF-A enjeksiyonlarının yaygın kapiller iskemiye yol açtığı izlenmiştir (65).

VEGF-A PDR gelişiminde diğer büyüme faktörleriyle, örneğin trombosit kökenli büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve plasental büyüme faktörü ile sinerjik bir etkileşim gösterebilmektedir. PDR'li hastaların aköz humor ve vitreuslarında yükselmiş VEGF-A düzeyleri saptanmıştır. Neonatal farelerde VEGF-A'nın iskemi ile uyarılmış neovaskularizasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir. PDR'de oluşan neovaskularizasyon, muhtemelen bu faktörün iskemik retinadan kaynaklanan yüksek düzeylerine bağlı olarak meydana gelmektedir (66).

PDR'de kalınlaşmış ve sert bazal membranı olan retinal bir kapillerde, lokal VEGF-A üretimi ile endotel hücre hiperplazisi indüklenir ve progresif lüminal daralma ve kapiller beslenme bozukluğu oluşur. Bu durum iskemiye ve VEGF-A salınımını daha da arttırır ve sonuçta DR'de kısır bir döngü oluşur.

DR'de VEGF ve reseptörleri artar. PDR ve DMÖ'de vitreus ve aközde VEGF'in arttığı ve bunun retinopatinin evresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak sistemik VEGF düzeyi ile retinopati arasında zayıf ilişkili bulunmuştur (67).

DMÖ'lü olgularda VEGF ile uyarılmış kan-retina bariyerinin bozulmasının altında yatan mekanizmalar kompleks gibi görünmektedir. VEGF lökosit-aracılı endotel hasarı (68), pencere formasyonu, sıkı bağlantıların çözülmesi (69), hücreler arası kitlesel akım gibi çeşitli mekanizmalarla sızıntılı damarlar oluşturabilmektedir. Bu mekanizmalar tek başlarına yada birlikte etki ederek kan-retina bariyerinin bozulmasına neden olabilirler.

İnsan DR'sinde VEGFR-2 düzeyi sızıntı yapan retinal damarların varlığı ile korelasyon gösterir. Bu da, VEGFR-2'nin vasküler salınımının sadece yerleşmiş DR alanlarında meydana geldiğini düşündürmektedir. Endotelial VEGFR-2 salınımı lokal hipoksi ile direkt olarak uyarabilmektedir. İn vitro VEGFR-2 gen salınımı, kardiovasküler homeostazide kritik bir faktör olan ama aynı zamanda DR gelişiminde ve ilerlemesinde de rol oynayan angiotensin-II ile direkt bir şekilde arttırılmaktadır. DR'de ileri dönemlerde, VEGFR-2'nin arttığı iskemik alanlarda yüksek miktarlardaki VEGF-A üretimi DR'nin iyi bilinen bulgularına yol açmaktadır.

Diyabetik retinopati modelinde, VEGF inhibisyonu ile kan-retina bariyerinin bozulması hem engellenebilmiş hem de tersine çevrilebilmiştir (70).

5. ENDOTELİN-1

Endotelin, endotel hücrelerinden salınan bir peptiddir. Endotelinin 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 isoformu vardır. 1 ve 3 oküler yapılarda bulunur. Endotelin mRNA prekürsörleri retinada çeşitli hücre tiplerinde, en çokta astrositlerde saptanmıştır. Endotelin-1 güçlü vazokonstiktör peptiddir, damar düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olur. 21 aminoasitten oluşur. Endotelinin A ve B olmak üzere iki tip reseptörü vardır. Endotelin-A reseptörü damar düz kas hücrelerinde ve iç retina tabakalarında ve ganglion hücrelerinde bulunurken, Endotelin-B endotel hücrelerinde, glialarda ve retinada dış pleksiform tabakada ve astrositlerde bulunur. Endotelin-1'in A reseptörüne afinitesi yüksektir (71).

5. 1. DİYABETİK RETİNOPATİ VE ENDOTELİN-1

Yapılan çalışmalarda Endotelin-1'in diyabette arttığı gösterilmiştir (72-77).

DM erken evrelerinde endotelin artışının retinal kan akımını azaltarak retinopati gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (3).

DM'da kısa süre sonra hiperglisemi sonucu PKC aktivasyonu, AGE ürünleri ve oksidanlar oluşur. Bunun sonucunda da Endotelin-1 ve VEGF salınımı artar. Endotelin-1 vazokonstrüksiyona ve dolayısıyla hipoksiye neden olur. VEGF permeabilite artışına neden olur. Yokota ve ark. yaptıkları çalışmada diyabetik ratlarda retinada PKC'nin aktive olduğunu ve trombosit kökenli büyüme faktörünü arttırdığını, bunun da Endotelin-1 ve VEGF artışına neden olduğunu göstermiştir (74).

Yapılan deneysel çalışmalarda diyabette endotelin reseptör antagonistlerinin kullanılması ile retinada ICAM-1 ve VEGF'in azaldığı, retinal kan akımının arttığı gösterilmiştir (78, 79). Dolayısıyla diyabette endotelinin retinada ICAM-1 ve VEGF artışına ve kan akımını azaltarak retinopati gelişimine katkıda bulunduğu söylenebilir.

6. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Hücre adezyon molekülleri, hemen hemen tüm hücrelerin yüzeyinde salınan glikoprotein moleküllerinden oluşan bir gruptur. Hücrelerin, sıklıkla da lökositlerin, birbirlerine, endotel hücrelerine veya hücre dışı matrikse bağlanmalarını sağlayan yüzey proteinleridirler.

Yaralanma ve enfeksiyona yanıtta oluşan özel sinyaller bazı adezyon moleküllerinin salınımını ve aktivasyonunu kontrol etmektedir.

Hücre adezyon moleküllerinin, reseptörlerine ve ligandlarına bağlanmaları ile oluşan yanıt ve etkileşim sayesinde doku/organ gelişimi ve hücre proliferasyonu, embriyogenezis, immün ve inflamatuvar hücrelerin inflamasyon bölgesine toplanması, immün yanıtın başlatılması ve yayılması, hücre dışı matriksten hücreye bilgi akışı, yara iyileşmesi ve kanser metastazında rol oynarlar (80).

Yapısal benzerliklerine dayanılarak hücre adezyon molekülleri farklı aileler halinde gruplandırılır:

a) İmmünglobülin Benzeri Süper Aile

Hücre dışı kısımda bir veya daha fazla sayıda immünglobülin tekrarları içerdikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Hücre-hücre adezyonundan sorumludurlar. Özellikle endotel hücre-lökosit adezyonunda ve antijen sunumunda hücre ile lökosit bağlanmasında rol oynarlar. IL-1 ve interferona cevap olarak salınımı artar (80).

ICAM- 1 (intraseküller adezyon molekülü/ CD54):

Endotel hücreleri, epitel hücreleri, lenfosit ve makrofajlardan salınır. Lökosit-lökosit ve lökosit- endotel hücre adezyonunda yer alır. Spesifik olarak lökositlerin yüzeyinde bulunan integrinlere bağlanır. Nötrofillerin hasarlı dokuya göçü sırasında aktive lökosit yüzeyindeki β -2 integrin ile birleşerek aktive endotelle lökosit arasında sıkı bağlantı kurulmasını sağlar. Uyarı sonucu, ICAM-1'in hücre yüzeyinde belirmesi, 2-4 saatte başlar ve 12-16 saat süreyle plato çizer. Ortamda sitokin varlığında ise, 24-72 saat kadar devam eder.

PECAM- 1 (trombosit- endotel hücre adezyonmolekülü-1/ CD31/Endo-cam):

Endotel hücrelerinin birbirleri ile ilişkili olan yüzlerinde bulunur. Ayrıca trombositler ve birçok lökositte az miktarda salınırlar. Lökosit ve endotel hücre yüzeyindeki PECAM-1'ler arasındaki bağlanma ile endotel hücreleri arasından nötrofil toplanması gerçekleşir. 130 kD ağırlığındadır.

Bu ailenin diğer üyeleri; ICAM-2, ICAM-3, VCAM, NCAM'dır.

b) Selektinler

Selektinler, inflamasyon bölgesinde lökositlerin damar endoteline yapışma ve geçiş öncesinde yavaşlayıp, yuvarlanma hareketi yapmalarında görevli moleküllerdir. Lökosit-lökosit ve lökosit-endotel hücre ilişkisinde yer alırlar. Selektinler temel olarak inflamatuvar olaylar sırasında endotel hücrelerine lökositlerin ve trombositlerin tutulumunda yer alırlar ve lökosit integrinleri olarak bilinen β -2 integrinlerin aktivasyonunu sağlarlar (80).

E- Selektin (ELAM/CD62 E):

Aktive endotel hücrelerinden salınır. E-selektin yapımı tümör nekrozis faktör, interlökin-1 ve lipopolisakkarit ile indüklenir. Stimülasyondan yaklaşık 2 saat sonra de novo protein sentezi ile E-selektin salınımı görülür. İnflamasyonda gözlenen lökositlerin endotele adezyonu ve yuvarlanmasında primer rolü E-selektin oynar. Bu nedenle lökosit yüzeyindeki L-selektin en önemli ligandıdır. Bu ailenin diğer üyeleri ise P-selektin ve L-selektindir (80).

c) İntegrinler

İntegrinler birbirine kovalan olmayan bağlarla bağlı α ve β zincirlerinden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. Ligand bağlanmasında her iki zincir de görev alır. Etkileşimin özgüllüğünden α alt ünitesi sorumludur, β alt ünitesi hücre içinde sinyal iletiminden sorumlu proteinler veya hücre iskeleti ile irtibat halindedir. Adezyon için kalsiyum, magnezyum gibi

iki değerli iyonlar gereklidir. İntegrinler hücre-hücre ve hücre-matriks adezyon molekülleridir. İntegrinler dışardan hücre içine ve hücre içinden dışarıya iki yönlü sinyal iletebilme yeteneğine sahiptirler (80).

d) Kaderinler

Epiteldeki hücre-hücre bağlantılarında yer alırlar. Kalsiyuma bağımlı adezyon molekülleridir. Sitoplazmik fonksiyonel kısımları a, b ve g olarak alt sınıflara ayrılan kateninlerden oluşur. Kaderinler kateninler aracılığı ile hücre iskeletindeki ara filamanlara bağlanırlar. Bu kompleks içinde bulunan ve membranal kısma tutunan p120-katenin hücrede bulunan Rho proteinleri aracılığı ile sinyal iletimini sağlar. Embriyonik dokuları bir arada tutan temel adezyon molekülleri kaderinlerdir. E, N ve P alt tipleri vardır (80).

Sonuç olarak; lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu ilk başlatan moleküller selektinlerdir. Bunu takip eden damar duvarına gerçek yapışma basamağını sağlayanlar integrinlerle immunglobulin süper ailesinin üyelerinden olan ICAM'ın etkileşmesidir.

6.1. DİYABETİK RETİNOPATİDE ENDOTEL HASARI VE HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Endotel damar duvarında fiziksel bir bariyer görevi görür, antitrombojenik özellik gösterir, vasküler tonusu, büyümeyi ve vasküler geçirgenliği düzenleyen mediyatörler salgılar.

Endotel fonksiyon bozukluğu; öncelikle vasküler tonüs ve fibrinolitik aktivitenin bozulmasıyla karakterize, endotelial perfüzyon bozukluğu ve inflamasyonun eşlik ettiği tablodur. Endotel disfonksiyonunda vazokonstriktör mediyatörlerin salımında artış olur, hücre adezyon moleküllerinin salınımı artar, antikoagülan özellik kaybolur. VCAM, ICAM-1 artışı inflamasyona, endotelin-1 artışı vazokonstrüksiyona, büyüme faktörleri artışı anjiyogenezise neden olur.

DM'de hiperglisemi sonucu polyol yolu, PKC aktivasyonu, AGE oluşumu, oksidatif stres mekanizmaları ile endotel hasarı oluşur.

Hiperglisemi sonucu hücre adezyon molekülleri artar ve lökositler endotele yapışırlar (81).

Yapılan klinik çalışmada retinada inflamasyon alanlarındaki damar endotelinde ICAM-1, E-Selektin, PECAM, VCAM, P-Selektin gibi adezyon moleküllerinin arttığı immunhistokimyasal olarak saptanmıştır (82).

Hücre yüzeyinde bulunan adezyon moleküllerinin proteolitik ayrılması ile çözünür formları oluşur. Serumda çözünür hücre adezyon moleküllerinin artması, dokulardaki hücre adezyon moleküllerinin artışı yani inflamasyon aktivitesini yansıtabilir. Plazma düzeyleri, hastalıklarda inflamasyonun önemi ile paralellik gösterir. Nowak ve ark. (83) yaptıkları çalışmada DM'li hastalarda kontrollere göre serumda çözünebilir ICAM-1 ve ELAM-1 düzeylerinin arttığını göstermişlerdir.

Kamiuchi ve ark.'nın (84) yaptıkları çalışmaya göre ICAM-1 469 kk genotipi olan hastalarda retinal damarlara nötrofil adezyonu artar ve retinopati gelişimi hızlanır. Bu çalışma ile ICAM-1 gen polimorfizminin bağımsız genetik risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür.

7. DİYABETİK RETİNOPATİ SINIFLANDIRMASI

DR sınıflamasında günümüzde kabul edilen Early Treatment Diabetic Retinopathy Study'nin yaptığı sınıflamadır. Bu sınıflamada DR, nonproliferatif ve proliferatif olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. NPDR kendi içinde hafif, orta, şiddetli, çok şiddetli olmak üzere dört, PDR ise erken ve yüksek riskli olarak iki alt gruba ayrılmıştır.

1. Non-proliferatif diyabetik retinopati

a) Hafif-orta (background) diyabetik retinopati

Erken dönem değişiklikleridir. Klinik olarak göz dibi değişikliklerine yol açan başlıca fizyopatolojik nedenler; iskemi yapan retina damar tıkanmaları ve artmış retina damar geçirgenliğidir. Diyabete bağlı vasküler hastalıklarda patolojik olay kapiller duvarında perisit kaybı ve bazal membran kalınlaşmasıdır. Retina damarlarının otoregülasyonu sonucu gelişen perfüzyon eksikliği, hipoksik bir durum oluşturur ve retina damarları genişleyerek akımı artırır. Bu tip diyabetik retinopatide görülen lezyonlar şunlardır:

- **Mikroanevrizmalar:**

Bu evrenin ilk belirtisi, kapiller tıkanma bölgeleri nedeniyle gelişen mikroanevrizmalardır. Mikroanevrizmalar, retina kapillerlerinden gelişir ve genellikle, tıkanmış kapillerlerin yoğunlaştığı bölgelerde bulunur. Bunlar yüzeysel ve derin retina

kapiller sisteminde, hatta koroid dolaşımında bile ortaya çıkabilir. Mikroanevrizmalar 12-125 milimikron çapındadır; ancak 30 milimikron üstündekiler muayenede tespit edilebilir. 125 milimikrondan büyükleri hemaraji olarak kabul edilmelidir. Başlangıçta parlak kırmızı renktedirler; tıkanma ve hyalinizasyon sonucu sarı renk alırlar. Küçük anevrizmalar kapiller duvarda perisit kaybının yol açtığı zayıflık ve takiben duvarda keseleşme sonucu oluşurlar. Retinanın iç nükleer tabakasında yerleşmişlerdir. Genelde maküla temporalinde küçük, yuvarlak noktalar şeklinde göze çarparlar. FFA'da erken venöz evrede boyanırlar.

- ***Intraretinal Kanamalar***

Mikroanevrizma, kapiller ya da venüllerin yırtılması sonucu meydana gelir. Bunların şekilleri retinada yerleştikleri yere göre değişir. Dış pleksiform ve iç nükleer tabakalardaki kanamalar yuvarlak veya pençe şeklinde görülürken, yüzeysel sinir lifleri tabakasındakiler alev şeklindedir. Hemorajiler FFA'da hipofluoresans gösterir. Buna karşılık mikroanevrizmalar genellikle hiperfluoresandır. Retina içi kanamalar 6 hafta ila 4 ay arasında rezorbe olurlar. Fovea içindeki kanamalar görmeyi etkileyebilirler.

- ***Sert Eksüdalar***

Dış pleksiform tabakada bulunurlar ve parlak mum renginde veya sarı-beyaz renktedirler. Çizgi biçimli, kümeler halinde veya mikroanevrizmaları çevreleyen halkalar şeklinde olurlar. Eksüda içeriği serum lipoproteinlerinden oluşur. Daha çok makülada toplanırlar ve retina kalınlaşması ile birlikte seyrederek. Sert eksüdalar kendiliklerinden veya laser fotokoagülasyon sonucu tekrar rezorbe olurlar ve makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Kronik olarak sert eksüdalar sert plaklara dönüşerek diskiform tip skar oluşturabilirler. Eksüdalar FFA'da boyayı maskeleyemez.

- ***Maküla Ödemi***

Non-proliferatif diyabetik retinopatideki görme kaybının en sık nedeni iken, tüm diyabetik retinopatilerde (non-proliferatif ve proliferatif) vitreus hemorojisi ile birlikte, en sık görme kaybı nedenidir. İç kan-retina bariyerinin fonksiyon bozukluğu sonucu meydana gelir. Mikroanevrizmalardan, kapillerlerden ve İRMA'dan sızan serum lipoproteinleri ve diğer plazma elamanları hücre dışı boşluklarda birikirler. Maküla ödemi fokal, diffüz veya miks tipte olabilir.

b)Orta-şiddetli (pre-proliferatif) diyabetik retinopati

Hafif non-proliferatif diyabetik retinopatide görülen lezyonlara ek olarak atılmış pamuk görünümlü eksüda, venöz boncuklanma ve İRMA görülür.

- ***Atılmış Pamuk Görünümlü Eksüda***

Sinir fibrillerindeki küçük infarktlardır. Arteriyollerdeki tıkanma sonucu aksoplazmik staz ve retina dokusunda şişme oluşur.

- ***Retina içi kanama***

Nokta pençe kanamalar hemorojik retina infarktlarının sonucudur ve arteriollerdeki tıkanmaya bağlı oluşur. Hemoraji ve atılmış pamuk görünümlü spotlar FFA'da boyayı maskeler.

- ***Venöz Boncuklanma***

Ven duvarında incelmeye birlikte görülen fokal venöz dilatasyon alanlarıdır. Bu değişiklikler, kapiller non-perfüzyon ve retina iskemisiyle bağlantılı ve proliferatif retinopati ile ilgilidir.

- ***İntraretinal Mikrovasküler Anomaliler***

İRMA, hastalıklı kapiller yataktaki tüm patolojik değişiklikleri kapsar. Spesifik olarak hastalıklı arteriyol ve venüller arasındaki genişlemiş, kıvrımlı ve telanjiektazik kanallardır. Bunlar arterioller ve kapiller nonperfüzyon alanlarında bulunur ve ince kanla dolu damarlar olarak görülür. FFA'da aşırı boya sızması göstermez.

2. Proliferatif diyabetik retinopati

Başlıca belirtisi neovaskülarizasyondur. Bunlar retina ve optik diskten gelişen, retina yüzeyi veya vitreus içine doğru ilerleyen yeni damarlardır.

- ***Neovaskülarizasyon***

Non-proliferatif değişiklikler, arteriollerde nonperfüzyon ve anormal geçirgenlikle birlikte proliferatif retinopatiye dönüşür. Neovaskülarizasyon en sık orta periferik kapiller non-perfüzyon bölgesi ile bağlantılıdır ve en çok optik diskin 45 derece çevresinde, optik diskin üstünde görülür. Neovaskülarizasyon, disk üstünde veya optik diskin bir disk çapı içinde yerleşen yeni damarlardır. Retina kapillerinin tıkanıklığına bağlı olarak iç retina katlarının iskemisi sonucunda gelişir. İskemik retina dokusunun yeni damar oluşumuna stimüle eden anjiogenik bir madde salınımına yol açtığı ileri sürülmektedir. Başlangıçta endotelial proliferasyonlar olarak ortaya çıkar, daha sonra internal limitan membrandaki defektlerden geçerek retina ile posterior vitreus korteksi arasındaki potansiyel düzleme uzanırlar. Beraberinde fibröz proliferasyon bulunduğu traksiyonel retina dekolmanı gelişme riski taşırlar.

- **Hemoraji**

Kanamalar vitreus jeli içine olduğu kadar, retrohyaloid boşluğa da olabilir. Yeni damarlar, sıklıkla arka hyoloide yapışık ve retina yüzeyinde veya biraz önünde yerleşmiştir. Arka vitreusa yapışık olan yeni damarlar arka vitre dekolmanında kanarlar. Bu zayıf damarlar üstündeki vitreus traksiyonu kanamalarına yol açar. Bu kan, retina ve dekolle arka hyoloid arasından akarak, retina önü veya subhyoloid kanama şeklini alır ve kayık şeklinde görülür. Arka hyoloid veya iç limitan membranın yırtılması ile kan vitreus içine girer. Bu kan zamanla rezorbe olur.

- **Traksiyonel Retina Dekolmanı**

Optik diskteki neovaskülarizasyon veya retinanın diğer alanlarındaki neovaskülarizasyon ilerledikçe, yeni damarlara karışan fibröz proliferasyon meydana gelir ve arka vitreus yüzüne yapışır. Proliferasyonun artmasıyla fibrovasküler kompleks diskten, özellikle temporal yöne doğru arkadlar boyunca ilerler; diski, üst ve alt arkadlar birleştirir. Eğer bu fibrovasküler kitle büzülürse ve en gergin vitreoretinal yapışıklıklar disk üstünde ise maküla diske doğru çekilir ve maküla dekolmanı gelişir. Fibrovasküler kitlenin proliferasyonu ve büzülmesi ile birlikte vitreus jelinin de büzülmesi, arka vitreus dekolmanda ilerlemeyle birlikte traksiyonel retina dekolmanına yol açar. Bu dekolman en sık maküla dışı bölgelerde görülür.

8. DİYABETİK RETİNOPATİ TEDAVİSİ

Diyabetik retinopati tedavisindeki en önemli kural hastanın hastalığı konusunda bilgilendirilmesi, kan şekeri regülasyonu, varsa diğer hastalıkların (hipertansiyon, hiperlipidemi, enfeksiyonlar, böbrek hastalıkları) tedavisi ve fiziksel aktivite düzenlenmesidir. Diyabetik retinopati tedavisi laser fotokoagülasyon, cerrahi tedavi ve farmakolojik tedavi olarak üç bölümde incelenebilir.

a) Lazer fotokoagülasyonu:

Lazer fotokoagülasyonu DR tedavisinde klasik tedavi yöntemidir. Amacı neovaskülarizasyonu durdurmak veya gerilemesine neden olmaktır. DRS çalışmasında panretinal laser fotokoagülasyonun PDR'li gözlerde 5 yıl içinde ağır görme kaybı görülme sıklığını %50 azalttığı gösterilmiştir (85). Etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar PRP'nin hipoksik retinayı artıda kaldırarak veya retina pigment

epitelinden bazı antianjiyogenik faktörlerin salınımını uyararak vazoproliferatif faktörlerin üretimini azalttığını düşünmektedir. Başka bir hipoteze göre PRP'nin retinayı inceltirerek koroidden oksijen difüzyonunun artmasına yol açıp retinanın oksijenasyonunu arttırmaktadır. Alternatif bir hipotezde PRP'nin retina pigment epitelini vazoproliferasyon inhibitörlerini üretmek üzere direkt olarak uyarılmasıyla vazoinhibitörlerin artmasına yol açtığıdır (86).

Lazer fotokoagülasyonunun görmede geçici bulanıklık, baş ağrısı, korneal abrazyon ve yanıklar, iris yanıkları, lens opasiteleri, ön kamarada sığlaşma, göz içi basınç artması, hatalı odaklama sonucu fovea ve optik sinirin hasarı, maküler ödem, Bruch membranında rüptür ve koroidal kanama, subretinal neovaskülarizasyon, görme alanında skotomlar, epiretinal membran oluşumu, vitreus hemorajisi gibi komplikasyonları vardır.

b) Cerrahi tedavi:

Patogeneizde özellikle vitreomaküler traksiyonun önemli olduğu grupta pars plana vitrektomi ve arka hyaloid membranın ayrılması ve/veya alınması faydalı olabilir. İlk kez Robert Machemer tarafından kullanılmıştır. Major endikasyonlar; temizlenmeyen vitreus hemorajisi, makulayı tutan veya tehdit eden traksiyon retina dekolmanı, kombine traksiyon-regmatojen retina dekolmanıdır (27).

c) Farmakolojik tedavi:

Hiperglisemi ile birlikte reaktif oksijen radikallerinin ve ileri glikolizasyon son ürünlerinin artmakta, PKC ve VEGF aktivasyonu olmakta, glikozun aldoz redüktaz ile sorbitole dönüşümü artmaktadır. Farmakolojik tedavide de hedeflenen bu biyokimyasal ve moleküler düzeydeki olaylara inhibisyon yapmaktır. Bu amaçla kullanılan tedavi seçenekleri şunlardır:

1) Antioksidanlar:

Hayvan çalışmalarında gösterildiği gibi vitamin E kullanımı ile diyabete bağlı vasküler fonksiyon bozukluğu bir derece önlenir. Retinopati bulguları olmayan veya minimal olan DM hastalarının dört aylık yüksek doz vitamin E tedavisi ile retinal kan akım bozukluklarının anlamlı olarak geri döndüğü gösterilmiştir (87).

2) Protein kinaz C inhibitörleri:

PKC aktivasyonu ile bazal mambranda kalınlaşma, vasküler geçirgenlik ve/veya kan akımında değişiklik olmaktadır. PKC'nin birçok izoformu vardır ancak çalışmalar

öncelikli olarak $\beta 2$ izoformunun aktive olduğunu göstermiştir. LY333531 PKC- β izoformuna spesifik, PKC-412 ise multipl PKC izoformunu (α , β ve γ) inhibe eden ajanlardır. Yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmakla birlikte çalışmalar halen devam etmektedir. PKC- β inhibitörü reboksitaurinin, oral kullanımı ile DR'li hastalarda görme kaybında azalma saptanmıştır (87).

3) Aldoz redüktaz ve ileri glikolizasyon son ürün inhibitörleri:

Aldoz redüktazın glikozu sorbitole dönüştüren enzimdir ve patogeneizde önemlidir. Bununla birlikte aldoz redüktaz inhibitörleriyle yapılan klinik çalışmalarda fayda saptanamamıştır (87). Hiperglisemi halinde glikoz proteinlerin yan zincirlerine bağlanarak fonksiyonu az veya fonksiyonu olmayan ürünlerin oluşmasına sebep olur ve bunlar AGE olarak adlandırılır. Aminoguanidin bu ürünlerin oluşmasını engelleyen bir inhibitördür ve deneysel çalışmalarda perisit kaybı ve mikroanevrizma oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. İnsan üzerinde yapılan çalışmalarda alınan ilk sonuçlar, aminoguanidinin retinopati ilerleyişini yavaşlattığını ancak anemiye neden olduğunu göstermiştir (87).

4) Büyüme hormonu inhibitörleri:

Somatostatin analogları endotel hücrelerindeki reseptörleri aracılığı ile direkt olarak, insülin benzeri büyüme hormonu ve VEGF'in postreseptör sinyal olaylarını inhibe ederek indirekt olarak etki eder. Octreotid ile yapılan çalışmalarda DR üzerinde olumlu sonuçlar alınmakla birlikte çalışmalar halen devam etmektedir (87).

5) VEGF inhibitörleri:

VEGF 'nin vasküler geçirgenlik artırıcı etkisi vardır. EYE001 anti-VEGF özelliği olan bir ajan olup hayvan çalışmalarında vasküler geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir bununla birlikte klinik çalışmalar devam etmektedir (87).

Pegaptanib sodyum, VEGF 165 izoformunu spesifik olarak bloke eden oligonükleotid RNA aptameridir. İlk VEGF-A inhibitörüdür. Neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonunda kullanılmaktadır. Mendrios ve ark. PDR'li hastalarda tek doz pegaptanib sodyum ile neovaskülerizasyonlarda gerileme saptamışlar (88). Yine faz 2 çalışmalarda maküler ödemde de etkili olduğu gösterilmiştir (89). Bevacizumab, antianjiyojenik ve antitümör etkinliği olan rekombinant monoklonal VEGF antikorudur. VEGF'in tüm isoformlarını inhibe eder. Küçük non-randomize pilot çalışmalarda PDR'de neovaskülerizasyonları önlediğini bildirilmiştir (90). Ranibizumab (Lucentis), rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş humanize edilmiş bir fare antikorudur. VEGF'nin tüm

formlarını inhibe eder. Neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonunda kullanılmaktadır. Diyabetik makular ödemde etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (90).

Bu ilaçların miyokard enfarktüsü, serebral infarktüs, hipertansiyon, menstüriyel düzensizlikler, diffüz rash gibi nadir ama tehlikeli sistemik ve yan etkileri vardır. Ayrıca intravitreal uygulamaya bağlı endoftalmi ve retina dekolmanı gibi lokal yan etkileri vardır (90).

6) Kortikosteroidler:

Kortikosteroidler (glukokortikoidler ve mineralokortikoidler) insan vücudunda adrenokortikotropik hormon kontrol mekanizmasıyla adrenal glanddan sentezlenen hormonlardır. Kortikosteroidler 1930'lu yıllarda vücut sıvıları ve dokularda elde edilmiş ve 1949'da romatoid artritli hastalarda tedavi amaçlı kullanılarak yararlı sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonra diğer birçok hastalıkta kullanılmaya başlanmıştır. Oftalmolojide ilk olarak 1950 yılında kullanılmıştır (91).

Kortikosteroidler kortizol, kortizon ve kortikosteron gibi adrenal glandda yapılan doğal kortikosteroidler ve bunların kimyasal yapısının değiştirilmesiyle elde edilen prednison, prednisolon, deksametazon, betametazon, triamsinolon, flormetalon gibi sentetik kortikosteroidler olarak iki gruba ayrılabilirler. Kimyasal halka yapısının değiştirilerek sentetik kortikosteroidlerin elde edilmesindeki amaç, antiinflamatuvar etkinliklerinin artırılması, istenmeyen yan etkilerin azaltılmasıdır (91).

Kortikosteroidler; kan damarlarında daralma ve vasküler geçirgenliğin azalması ile hedef bölgede sıvı, protein ve inflamatuvar hücrelerin geçişinin azaltır, polimorfonükleer lökosit, mast hücresi ve bazofillerin degranülasyonunu inhibe eder, T lenfosit (doz arttıkça B lenfositlerde), eozinofil ve monositlerin dolaşımdaki sayısını azaltır, makrofaj toplanmasını inhibe eder, Fosfolipaz A2 'yi inhibe ederek fosfolipidlerden arşidonik asit ve bundan da prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumunu engelleyerek antiinflamatuvar etki gösterirler (91).

Kortikosteroidler oftalmolojide topikal, subkonjonktival, subtenon, intravitreal enjeksiyon, oral ve parenteral olarak kullanılırlar. Topikal kortikosteroidler kornea epitelini geçerek ön kamaraya ulaşabilirler. Kortikosteroidlerin topikal uygulanması ön segment hastalıklarında etkilidir ancak ciddi inflamasyon durumlarında etkiyi artırmak için subkonjonktival enjeksiyon yapılabilir. Ön ve arka üveitler gibi daha ciddi inflamasyonlarda subtenon enjeksiyonlar uygulanabilir. Bazı optik nöritler ve arka üveitlerde ise sistemik olarak verilebilirler (91).

Kortikosteroidlerin intravitreal enjeksiyon yoluyla uygulanması ile retinada daha etkin konsantrasyon elde edileceği düşünülmüş ve ilk olarak 1979'da Machemer tarafından proliferatif vitreoretinopatili hayvan modeli örneğinde İVTA uygulamasının etkinliği gösterilmiştir (9). Daha sonraları İVTA uygulaması klinik uygulamalarda kullanılmaya başlamıştır.

TA diğer steroidler gibi inflamasyonu, vasküler geçirgenliği ve fibrovasküler proliferasyonu azaltır. Fosfolipaz A2 'yi inhibe ederek prostoglandin ve lökotrienler için prekürsör olan araşidonik asit salınımını önler. Aynı zamanda VEGF üretimini de azaltır (54). Suda çözünebilen kortikosteroid intravitreal uygulama sonrası gözden 24 saatte elimine olurken, triamsinolon asetonidin yarı ömrünün vitrektomi yapılmamış gözlerde yaklaşık 19 gün olduğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada 3 ay süre ile gözde ölçülebilir konsantrasyonda kaldığı gösterilmiştir (92). Mc Cuen ve ark.'nın (93) yaptıkları deneysel çalışmada 21 tavşan gözüne 1mg İVTA enjekte edilmiş. İVTA uygulanan gözler, intravitreal salin solüsyonu uygulanan kontrol grubu gözlerle karşılaştırılmış. Biyomikroskopik, elektoretinografik, ışık ve elektron mikroskopik incelemelerde TA'ya ait herhangi bir retinal toksisite olmadığı gösterilmiştir.

Kim ve ark. (20) diyabetik ratlarda İVTA'nın retinada inflamatuvar belirteçler ve damar sızıntısı üzerine etkisini incelemiştir. TA'nın erken dönemdeki damar sızıntısını ve VEGF, ICAM-1, TNF- α gibi inflamatuvar belirteçleri azalttığını bulmuşlardır.

Diyabetik ratlarda yapılan benzer iki çalışmada intravitreal dexametazonun retinada VEGF ve ICAM-1 salınımı, lökosit göçünü ve damar geçirgenliğini azalttığı saptanmıştır (94, 95).

İVTA'nın proliferatif vitreoretinopati, retinal neovaskülarizasyon, eksüdatif yaşa bağlı maküler dejenerasyon, santral retinal ven ve ven dal oklüzyonuna bağlı maküler ödem, postoperatif kistoid maküler ödem, DMÖ, sempatik oftalmi, oküler histoplazmosis sendromu, üveitler, proliferatif DR (PDR), idyopatik jukstafoveal telenjiektazi tedavisinde kullanıldığını bildiren yayınlar mevcuttur (12-19).

Kortikosteroidlerin gözde; glokom, arka subkapsüler katarakt, pitozis, midriyazis, skleral melting, göz kapağı cildinde atrofi, koruyucu bağışıklık mekanizmalarının baskılanması sonucu enfeksiyonların alevlenmesi gibi yan etkilere neden olurlar. Ayrıca intravitreal kullanımda glob perforasyonu ve enfeksiyon riski vardır.

9. DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMASI

Streptozosin pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı hem de insülininden bağımsız DM'a neden olmaktadır. N- (Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır, ışıktan korunmalıdır. Nötral pH'da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için ortamın pH'sı 4-4.5 olmalıdır. Bu nedenle streptozosin çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır.

Yetişkin ratlarda tek doz (40-60 mg/kg) damar içi yolla streptozosin uygulamasının insüline bağımlı DM'ye, yeni doğmuş sıçanlara tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg streptozosin uygulamasının ise insülininden bağımsız DM'ye neden olduğu bildirilmiştir (96).

a) Ratlarda streptozosinle diyabet oluşturulması:

Değişik çalışmalarda bir gece önce aç bırakılan sıçanlara 0.1 M sitrat veya 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH:4.5) içerisinde çözündürülmüş taze olarak hazırlanmış streptozosin çözeltisi (buzlu ortamda saklanmak koşuluyla) 50-65 mg/kg olacak şekilde (tek doz) periton içi yolla sıçanlara enjekte edilerek DM oluşturulmuştur. 72 saat sonra açlık kan şekeri ölçümü yapılarak kan şekeri düzeyi 250-350 mg/dL ve üzerinde olan sıçanların DM'li kabul edilerek çalışmaya alınmıştır. Streptozosin uygulamasından sonra yem ve su alımının serbest bırakıldığı bildirilmiştir (96).

b) Açlık kan şekeri düzeyinin ölçülmesi:

Kan şekeri ölçümü biyokimya laboratuvarlarındaki otoanalizör cihazıyla yapılabileceği gibi, piyasada bulunan ve bir damla kanla ölçüm yapabilen kan ölçüm cihazlarıyla da yapılabilir. Otoanalizör için daha fazla kan gerektiğinden çalışma boyunca bir kez kan ölçümü yapılacak ise bu cihazla ölçüm yapılması uygun olur. Ancak kan glikoz seviyesi gün boyunca belirli aralarla ölçülecek ise bir damla kanla çalışan cihazları seçmek daha uygun olacaktır. Deney hayvanının kuyruğundan alınan bir damla taze kan, ölçüm cihazının stripine emdirilir. Cihazın türüne göre 15 veya 20 saniye sonra kan şekeri düzeyi cihazın ekranından okunur. Bu cihazların kan glikoz seviyesini ölçmesi "glikoz-oksidad peroksidaz" metodu ile olmaktadır (97).

MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurul komitesi onayı alınarak Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Ünitesi ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada 250 ± 20 ağırlığında 20 adet Spraque Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 4 haftalık adaptasyon süresinden sonra her bir kafese (28x28x16 cm ebadında polycarbon kafes) 5'er rat olmak üzere yerleştirildi. 12 saat karanlıkta, 12 saat oda ışığında kaldılar.

Tüm ratlarda streptozosin ile diyabet oluşturuldu. Eter anestezisi uygulanmış 20 rata, 50 mg/kg streptozosin, sitrat tamponadı (pH 4.5) ile çözülerek tek doz halinde intraperitoneal olarak verildi. Ratlarda diyabet gelişimi 3. ve 7. günde kuyruk venlerinden alınan kanda glikoz düzeyleri ölçülerek kontrol edildi. Kan glikoz seviyesi 250 mg/dl ve üzerinde olanlar diyabet kabul edildiler (98, 99).

Tüm ratlara streptozosin verildikten 15 gün sonra intravitreal enjeksiyon uygulandı (100). İşlem öncesi ksilazin HCL (4mg/kg) ve ketamin HCL (10 mg/kg)'nin 1:1 oranındaki karışımı ile anestezi uygulandı. Birinci gruptaki 10 ratın gözlerine TA (Kenakort-A 40 mg/ml ampül, Bristol-Myers Squibb), ikinci gruptaki 10 ratın gözlerine ise dengeli tuz solüsyonu (BSS, Alcon Labs, Inc., Forth Worth, TX) intravitreal olarak uygulandı.

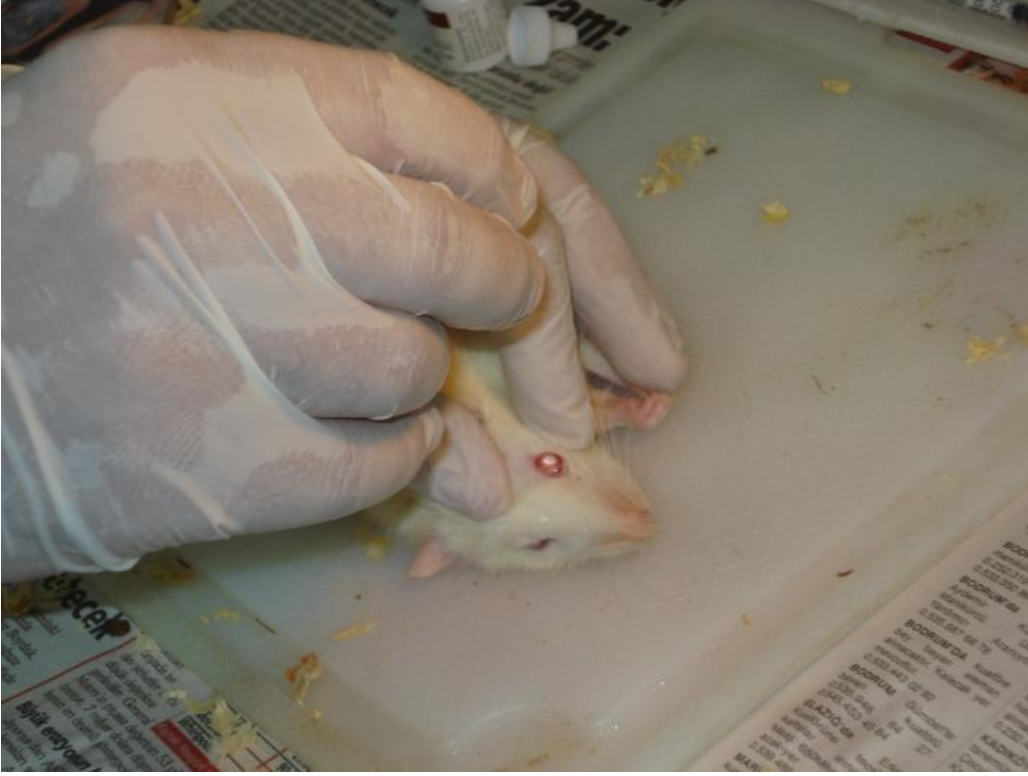
Hayvanların konforu için gözlerine işlem öncesi topikal anestetik madde (Proparacaine hydrochloride of 0.5% (Alcon Labs, Inc., Forth Worth, TX)) damlatıldı. Hamilton mikro-enjektörü (30 gauge) ile enjeksiyon yapılmadan önce 30 gauge iğne ucu ile temporal limbustan 0.5 mm arkaya skleraya insizyon yapıldı (Resim 1) ve intravitreal enjeksiyonlar Hamilton mikro-enjektörü ile bu insizyon yerinden uygulandı (Resim 2). İnsan vitreus hacmi 4 ml , rat vitreus hacmi ise 56 µl (0,056ml) dir (101). Birinci gruptaki ratların gözlerine TA 40 mg/ml orijinal konsantrasyonun yaklaşık 5 katı olacak şekilde 0.32 mg/0,008 ml konsantrasyonda 8 µl hacimde enjekte edildi (101). Beş kat yüksek dozun uygulanma sebebi ratlarda bu ilacın farmakinetiğinin tam olarak bilinmemesidir. Enjeksiyon sonrası beyaz renkli TA süspansiyonunun vitreusları doldurduğu görüldü (102). Kontrol grubundaki ratların gözlerine ise 6 µl BSS intravitreal olarak uygulandı. İşlem sonrası profilaktik olarak topikal antibiyotik (Ciloxan %0.3 5 ml göz damlası, siprofloksasin, Alcon) damlatıldı (Resim 3). Enjeksiyona bağlı lens hasarı ve retina dekolmanı olan ratlar çalışmadan çıkarıldı.



Resim 1: Enjeksiyon öncesi skleraya insizyon yapılması



Resim 2: İntravitreal Triamsinolon Asetonid enjeksiyonu



Resim 3: Enjeksiyon sonrası göze antibiyotik damla uygulanması

Ratlar birinci ayda ketamin anestezisi altında sakrifiye edildi ve gözleri enükle edildi. Ratların retinaları VEGF, Endotelin, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımları yönünden immunhistokimyasal yöntemle analiz edildi.

Doku hazırlanması ve patolojik inceleme:

Enükleasyon yapılan gözler 4% formaldehit ve 0.1 M fosfat tamponadı (pH 7.4) içeren ependorflara ayrı ayrı numaralandırılarak kondu ve patolojiye hangi gözün kontrol hangisi ilaç verilen göz olduğu belirtilmeden incelemeye verildi. Patolojik inceleme için gönderilen materyaller 24 saat %10'luk nötral tamponlu formalinde tespit edildi. Rutin doku işlemi sonrası parafin bloklara gömülen örneklerden 4µm kalınlığında kesitler alındı.

İmmunhistokimyasal boyama Avidin-Biyotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için bloklardan hazırlanan 4 µm kalınlığındaki kesitler poli-L-lysin (MicroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alınarak oda ısısında bekletildi. Tüm örnekler VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin, PECAM immunhistokimyasal boyası uygulandı. VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin, PECAM antikoları ile boyanan rat gözlerinden alınmış kesitlerde retinadaki ganglion hücre tabakası,

iç nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, dış nükleer tabaka, basiller segment, retina pigment epiteli, koroid boyanma düzeyleri incelendi. Boyanma derecelerine göre dört ayrı şekilde (1=boyanma yok, 2=zayıf, 3=orta, 3=kuvvetli) puanlandı (Resim 5).

İmmunhistokimyasal Boyama Tekniği:

Yapılan işlemler sıralanacak olursa,

- 1) Poly-L-lysin kaplı lama alınan kesitler bir gece 37 derecelik etüvde bekletildi.
- 2) 30 dakika 56 derecelik etüvde bulanana ksilolde, 15 dakika oda sıcaklığındaki ksilolde deparafinize edildi.
- 3) Azalan oranlarda alkol serilerinde rehidrate edildi.
- 4) Kesitler önceden hazırlanmış olan pH:7.2 olan phosphate-bufferd-saline(PBS) solüsyonunda beş dakika bekletildi.
- 5) Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için, kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak beş dakika bekletildi.
- 6) Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı.
- 7) Sitrat Buffer (ph:6.0) solüsyon dolu kaplara yerleştirilerek mikrodalga fırında 750 watt'da beş dakika, 500 watt'da 2x5 dakika süre ile inkübasyon işlemi yapıldı. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı.
- 8) Kaynatmadan sonra kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı.
- 9) Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.
- 10) Herbir kesitin üzerine primer antikor solüsyonu dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve bir saat bekletildi.
- 11) Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkanarak bağlanmış antikorlar uzaklaştırıldı.
- 12) Biotine bağlayıcı sekonder antikor eklendi ve 10 dakika bekletildi.
- 13) Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.
- 14) Kesitlere Streptavidin Peroksidaz solüsyonu damlatılarak 10 dakika beklendi.
- 15) Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı.
- 16) Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid (DAB), damlatıldı ve kahverenk gözlenene kadar bekletildi.
- 17) Çeşme suyunda beş dakika yıkandı.

18) Zemin boyanması için kesitlere hematoxilen ile zıt boyama yapıldı.

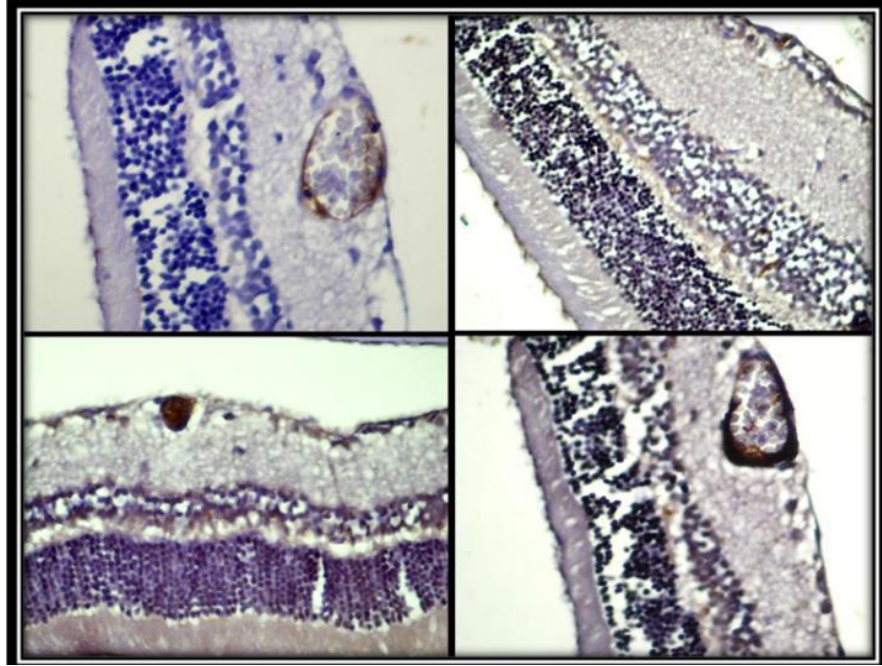
19) Çeşme suyunda beş dakika yıkandı.

20) Dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kaplandı.

Pozitif kontrol için önceden pozitifliği bilinen dokular kullanıldı. Boyanma aşamasında sonra kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında 4, 10, 20 ve 40'luk büyütmelemlerde incelendi. Tüm immunhistokimyasal boyalar; A=boyanma yok(0), B= +1 boyanma, C= +2 boyanma, D= +3 boyanma olacak şekilde olarak semikantitatif olarak skorlandı (Resim 4).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde Mann-Whitney U-testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz için SPSS 10.0 istatistik programı kullanıldı.



Resim 4: Antikorlar ile immünhistokimyasal yöntemle boyanan rat retinalarında boyanma dereceleri (A=boyanma yok(0), B= +1 boyanma, C= +2 boyanma, D= +3 boyanma)

BULGULAR

Birinci ayın sonunda çalışmaya başlanan 20 adet rat sayısı 17'e düştü. 3 adet rat streptozosin ile oluşturulmuş diyabete bağlı nedenler ile exitus oldu. Çalışma sonunda diyabetik hale getirilen ratlardan 17 adet rat değerlendirmeye alındı. Kontrol grubundaki gözlerden 1 tanesi retina dekolmanı, 1 tanesi de katarakt gelişmiş olması sebebiyle çalışmadan çıkarıldı.

İVTA uygulanan ratların retinalarının ganglion, dış nükleer, basiller tabakalarında kontrollere göre VEGF salınımında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p<0,05$). İVTA uygulanan ratların retina pigment epiteli tabakalarında VEGF antikorları ile boyanmada kontrollere göre azalma görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

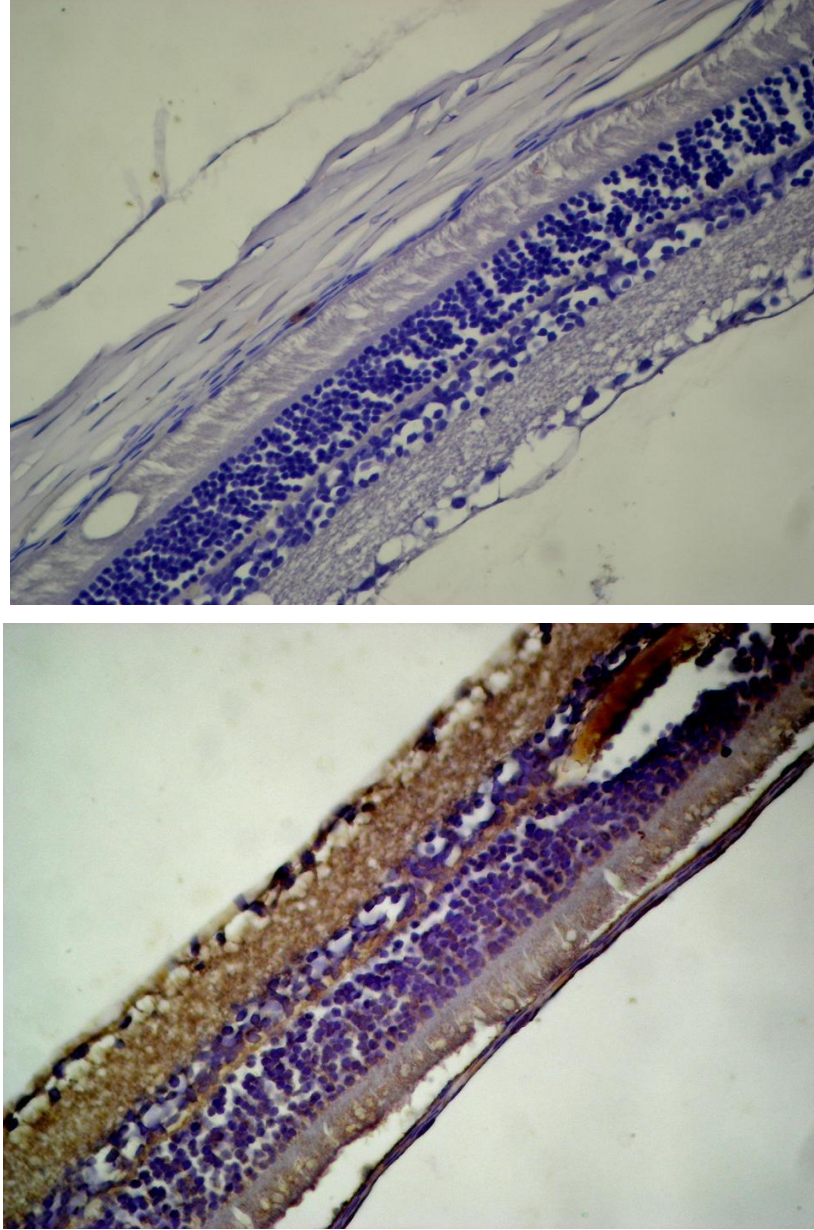
Tablo 1'de VEGF antikoru ile boyanan rat retina tabakalarında VEGF salınım düzeylerinin ortalamaları görülmektedir. Şekil 1'de ise triamsinolon ve BSS verilen rat retina tabakalarındaki VEGF antikoru ile boyanma dereceleri karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Resim 5'te VEGF antikoru ile boyanmış İVTA uygulanmış rat retinası ile kontrol retinaya ait preparat örneklerinin karşılaştırılması görülmektedir.

İVTA uygulanan ratların retinalarının dış pleksiform, dış nükleer, basiller tabakalarında kontrollere göre Endotelin-1 salınımında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p<0,05$). İVTA uygulanan ratların retina pigment epiteli ve ganglion tabakalarının Endotelin-1 antikorları ile boyanmasında kontrollere göre azalma saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 2, şekil 2).

İVTA uygulanan ratların retinalarında ganglion tabakasında kontrollere göre ICAM-1 salınımında azalma bulundu ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Basiller tabakada her iki grupta da antikorlar ile eşit miktarda boyanma görüldü (Tablo 3, şekil 3).

İVTA uygulanan ratların retinalarında ganglion ve dış pleksiform tabakalarında kontrollere göre E-Selektin salınımında azalma saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 4, şekil 4).

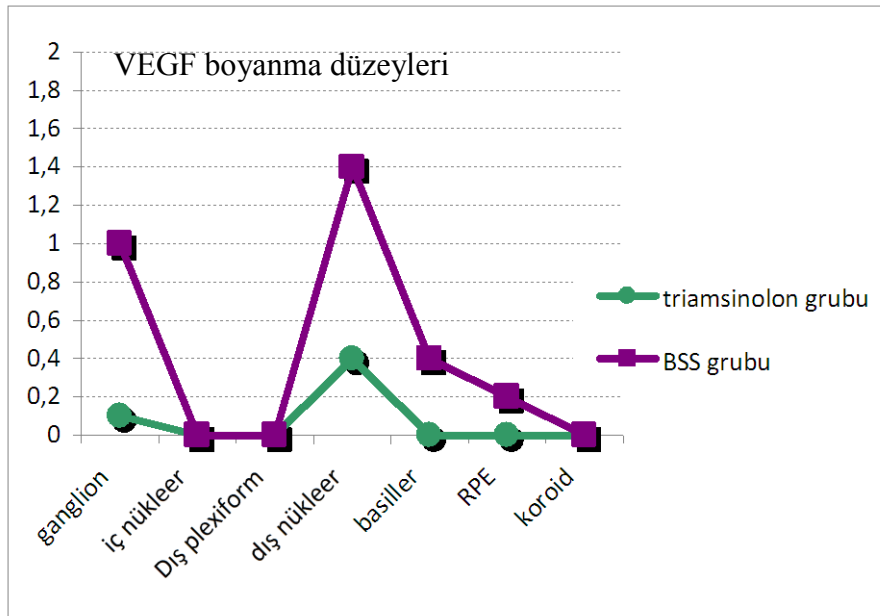
İVTA uygulanan ratların retinalarının dış pleksiform, basiller, retina pigment epiteli tabakalarında kontrollere göre PECAM salınımında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p<0,05$) (Tablo 5, şekil 5).



Resim 5: VEGF antikoru ile boyanmış İVTA uygulanmış rat retinası (A) ve kontrol retinaya (B) ait preparat örneklerinin karşılaştırılması A. VEGF antikoru ile boyanan retinada boyanma görülmemektedir. B.VEGF antikoru ile boyanan retina +3 boyanma görülmektedir.

Tablo 1: Rat retina tabakalarında ortalama VEGF boyanma dereceleri

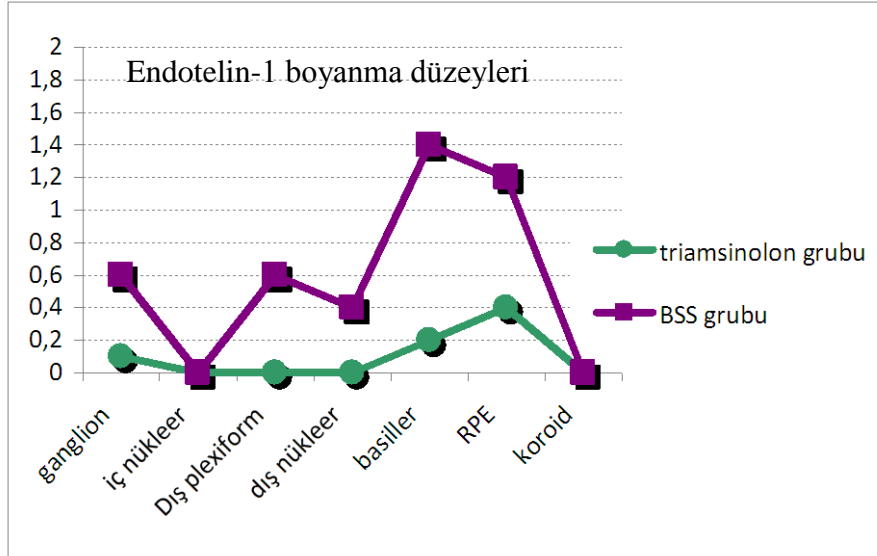
İncelenen Tabaka	VEGF		<i>p</i>
	Triamsinolon n=10	BSS n=5	
Ganglion	0,10	1,00	0,008
İç nükleer	0,00	0,00	1,00
Dış plexiform	0,00	0,00	1,00
Dış nükleer	0,40	1,40	0,034
Basiller	0,00	0,40	0,038
Retina Pigment Epiteli	0,00	0,20	0,157
Koroid	0,00	0,00	1,00



Şekil 1: Rat retina tabakalarının ortalama VEGF boyanma derecelerinin iki grup arasında karşılaştırmalı olarak görünümü

Tablo 2: Rat retina tabakalarında ortalama Endotelin-1 boyanma dereceleri

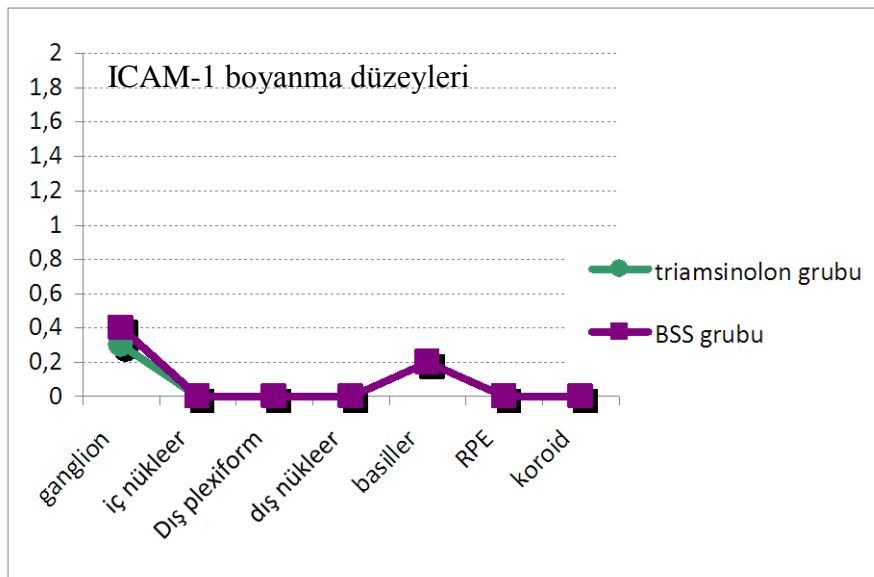
İncelenen Tabaka	Endotelin-1		<i>p</i>
	Triamsinolon n=10	BSS n=5	
Ganglion	0,10	0,60	0,161
İç nükleer	0,00	0,00	1,00
Dış plexiform	0,00	0,60	0,038
Dış nükleer	0,00	0,40	0,038
Basiller	0,20	1,40	0,012
Retina Pigment Epiteli	0,40	1,20	0,061
Koroid	0,00	0,00	1,0



Şekil 2: Rat retina tabakalarının ortalama Endotelin-1 boyanma derecelerinin iki grup arasında karşılaştırmalı olarak görünümü

Tablo 3: Rat retina tabakalarında ortalama ICAM-1 boyanma dereceleri

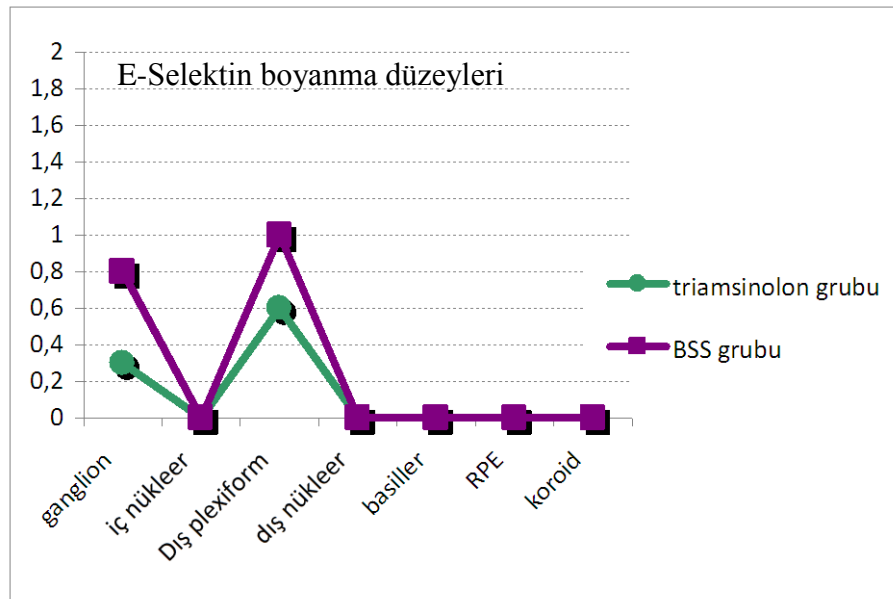
İncelenen Tabaka	ICAM-1		<i>p</i>
	Triamsinolon n=10	BSS n=5	
Ganglion	0,30	0,40	0,708
İç nükleer	0,00	0,00	1,00
Dış plexiform	0,00	0,00	1,00
Dış nükleer	0,00	0,00	1,00
Basiller	0,20	0,20	1,00
Retina Pigment Epiteli	0,00	0,00	1,00
Koroid	0,00	0,00	1,00



Şekil 3: Rat retina tabakalarının ortalama ICAM-1 boyanma derecelerinin iki grup arasında karşılaştırmalı olarak görünümü

Tablo 4: Rat retina tabakalarında ortalama E-Selektin boyanma dereceleri

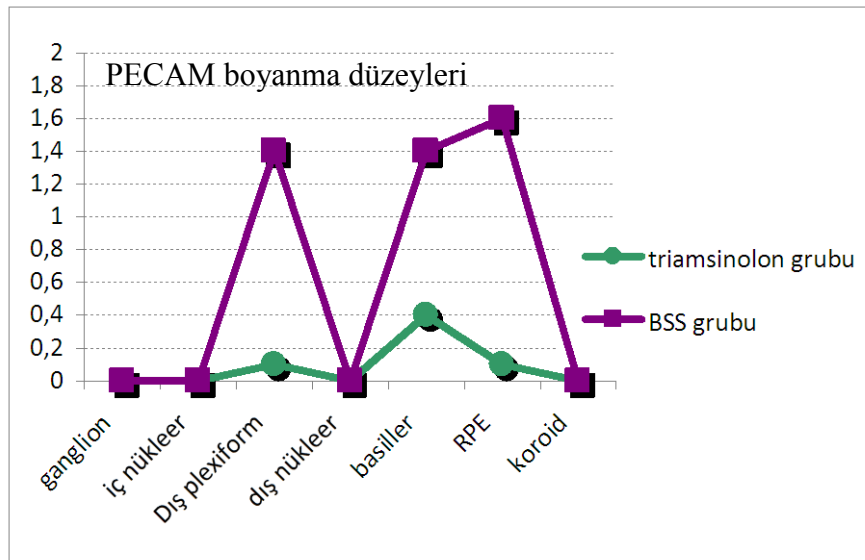
İncelenen Tabaka	E-Selektin		<i>p</i>
	Triamsinolon n=10	BSS n=5	
Ganglion	0,30	0,80	0,077
İç nükleer	0,00	0,00	1,00
Dış plexiform	0,60	1,00	0,258
Dış nükleer	0,00	0,00	1,00
Basiller	0,00	0,00	1,00
Retina Pigment Epiteli	0,00	0,00	1,00
Koroid	0,00	0,00	1,00



Şekil 4: Rat retina tabakalarının ortalama E-Selektin boyanma derecelerinin iki grup arasında karşılaştırmalı olarak görünümü

Tablo 5: Rat retina tabakalarında ortalama PECAM boyanma dereceleri

İncelenen Tabaka	PECAM		<i>p</i>
	Triamsinolon n=10	BSS n=5	
Ganglion	0,00	0,00	1,00
İç nükleer	0,00	0,00	1,00
Dış plexiform	0,10	1,40	0,001
Dış nükleer	0,00	0,00	1,00
Basiller	0,40	1,40	0,011
Retina Pigment Epiteli	0,10	1,60	0,001
Koroid	0,00	0,00	1,00



Şekil 5: Rat retina tabakalarının ortalama PECAM boyanma derecelerinin iki grup arasında karşılaştırmalı olarak görünümü

TARTIŞMA

Bu çalışmada streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratlarda, İVTA uygulamasının, rat retinalarında VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde diyabet oluşturulmuş deneysel hayvan modellerinde İVTA'nın retinadaki Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımına etkisini araştıran bir çalışma bulunamamıştır. Çalışmamız İVTA'in diyabetik ratların retina tabakalarında Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımının etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

DR tüm dünyada önlenebilir körlük nedenlerinin başında gelmektedir. Hastalığın moleküler ve hücresele düzeydeki tanımlayıcı unsuru vasküler geçirgenlikte artış olmasıdır. DR'nin klasik tedavisi retinal fotokoagülasyondur. Laser tedavisi daha çok retinada morfolojik ve fonksiyonel bozuklukların geliştiği DR'nin ileri safhalarında kullanılmaktadır. Panretinal fotokoagülasyon tedavisi daha fazla retinal neovaskularizasyon oluşmasını önler. Ancak yararlı etkilerinin yanında yan etkileri de mevcuttur. Bunlarda bazıları retina, kornea, iris ve lenste termal hasar oluşumu, görme keskinliğinde azalma, kontrast hassasiyet ile gece görmede bozulma, koroid dekolmanı, makula ödemi, aksoplazmik akımın engellenmesi, baş ağrısı, akomodasyonda bozulma, renkli görme kaybı, fotofobi, görme alanı kaybı, göz içi basıncı yükselmesi, arka vitreus dekolmanı, bruch membran yırtığı, koroid neovaskularizasyonu, sert eksüda birikimi, epiretinal ve subretinal fibrozis ve iskemik papillit olarak sayılabilir (103, 104).

Bu nedenle lazer fotokoagülasyon yanısıra alternatif tedavi yöntemleri de araştırılmaya devam etmektedir. 2001 yılından bu yana DMÖ'lü olguların tedavisinde İVTA uygulaması yapılmaya başlanmış ve olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (105).

TA suda çözünmeyen süspansiyon formunda bir kortikosteroiddir. İntravitreal enjeksiyon şeklinde kullanımı ilk olarak deneysel çalışmalarda antiproliferatif etkisinin gösterilmesiyle başlamıştır. İntravitreal uygulama ile kortikosteroidlere ait birçok sistemik yan etkiden hasta kurtarılmakta aynı zamanda vitreus içinde daha yüksek konsantrasyon ve daha uzun etki süresi elde edilebilmektedir (106).

Kortikosteroidler araşidonik asit metabolizmasını inhibe ederek damar geçirgenliğini artırıcı etkisi bulunan prostoglandin oluşumunu azaltmakta ayrıca VEGF üretimini de inhibe etmektedirler. DMÖ patogeneğinde kabul edilen görüş kan-retina bariyerinin bozularak vasküler geçirgenliğin artmasıdır. Yapılan deneysel ve klinik

çalışmalarda da kan-retina bariyeri bozukluğunun İVTA uygulananı ile anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu etkiyi sağlamada prostoglandinlerin ve VEGF'nin etkisi olduğu düşünülmektedir (107, 10, 11). Ayrıca steroidler direkt olarak endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinin bariyer özelliklerini etkileyebilir (108).

DR'de İVTA'nın etkisi daha çok klinik çalışmalara dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda İVTA uygulanan PDR'li olguların ortalama görme keskinliklerinin genellikle 1 ve 3. ayda arttığı, daha sonra ise azalma eğilimine girdiği saptanmıştır. Görme keskinliğindeki bu azalmaya paralel olarak OCT ölçümlerinde elde edilen düşüşler daha sonra enjeksiyon öncesi değerlere ulaşmakta ve FFA'da ödem tablosu geri gelmektedir (105, 109, 110, 111). Sonuç olarak İVTA enjeksiyonunun en önemli dezavantajı etkinin geçici olması ve sonunda nükslerle karşılaşılmasıdır.

Berkant ve ark. (112) yaptıkları çalışmada PDR ve DMÖ olan olguların gözlerine laser fotokoagülasyon öncesi İVTA uygulamışlardır. İVTA uygulanan grupta görme keskinliğinde artma, diğer kontrol gözlerde ise azalma saptamışlardır. İVTA'nın ek tedavi olarak uygulanmasını önermişlerdir.

İVTA uygulaması ile gelişebilecek komplikasyonlar enjeksiyona bağlı ve kortikosteroidlere bağlı komplikasyonlar olarak ele alınır. Enjeksiyon esnasında veya sonrasında göze girebilecek mikroorganizmalara bağlı endoftalmi, vitreus hemorajisi ve retina dekolmanı intravitreal enjeksiyona bağlı olarak gelişebilecek muhtemel komplikasyonlardır. GİB artışı ve katarakt ilerlemesi ise kortikosteroidlere bağlı olarak gelişebilecek yan etkilerdir (113).

Son yıllarda özellikle iskemik olaylara sekonder gelişen makular ödem ve neovaskülarizasyonlarda, TA dışındaki anti-VEGF ilaçlar yeni tedavi seçenekleri olarak gündemdedir. Bu ilaçlar yaşa bağlı makula dejenerasyonunda kullanılmaktadır. Ancak bu yeni farmakolojik ajanların uzun dönem sonuçları belli değildir. DR'de anti-VEGF ajanların kullanımı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

İdeal olan hastalığın çok erken dönemlerinde retina değişikliklerine neden olan mekanizmalarla ilişkiye girerek bu nedenleri ortadan kaldıran tedavilerin bulunmasıdır. Bu amaçla DM'de meydana gelen metabolik ve hematolojik bozuklukları düzenlemeye yönelik tıbbi tedavilerin retinopati üzerindeki etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur.

Bu güne kadar yapılmış çalışmaların DR'de tıbbi tedavi ile ilgili olan yönlerinin tamamına yakını klinik verilerle desteklenerek oluşturulmuştur. Deneysel düzeyde çalışma

çok azdır. Bizim çalışmamızda TA tedavisinin DR üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde kanıtları saptanmaya çalışılmıştır.

Diyabetin retinal mikrovasküler komplikasyonlarında temel rol oynayan faktör anjiojenik ve vasküler geçirgenlik faktörü olan VEGF adlı moleküldür. Ayrıca VEGF retinal iskemisi ile giden retinal neovaskülarizasyon durumlarında önemli bir role sahiptir. Hayvan modellerinde VEGF salınımının neovaskülarizasyon gelişimiyle korele olduğu gösterilmiştir (114, 115).

Yapılan çalışmalarda alınan vitreus örneklerinde PDR'li gözlerde NPDR'li gözlere oranla VEGF konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir (114, 116). VEGF'in yüksek konsantrasyonları kan-retina bariyerinin yıkılmasından ve DR'de fibrovasküler proliferasyondan sorumlu görünmektedir. Bu sebeplerden dolayı VEGF, DR'nin tedavisinde önemli bir hedef halindedir. Patolojik düzeydeki damarlanmayı dolayısıyla direkt olarak VEGF'i ve reseptörlerini inhibe edecek ajanlara ihtiyaç vardır.

Pierce ve ark. (114) tarafından yapılan bir çalışmada 5 adet yeni doğan rat retinasında hipoksi ile neovaskülarizasyon oluşturulmuştur. 10 adet retina dokusu northern blot yöntemi ve konfokal mikroskopisi ile VEGF ve VEGF-mRNA salınımları yönünden incelenmiştir. VEGF ve VEGF-mRNA salınımlarının neovaskülarizasyon gelişimiyle korele olduğu gösterilmiştir. İç nükleer tabakada VEGF salınımını yüksek saptanmış ve bunun Müller hücrelerine bağlı olabileceğini öne sürülmüştür. Çok az miktardaki ganglion hücresinin de VEGF salgılayabileceği belirtilmiştir.

Hans-Peter ve ark. (64) tarafından beş adet diyabetik, altı adet diyabetik olmayan rat üzerinde VEGF salınımının derecelendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Ratlar streptozosin ile diyabetik hale getirilmiştir. Çalışma altı ay sonunda bitirilmiş ve diyabetik ratların retinalarında VEGF-mRNA düzeylerinde artış saptanmıştır. Diyabetik olmayan ratlarda VEGF immünreaksiyonun çok zayıf olduğu rapor edilmiştir. VEGF salınımının özellikle retinanın ganglion hücreleri, iç ve dış nükleer tabakalarında yoğun olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda da kontrol grubundaki diyabetik ratların ganglion, dış nükleer, basiller ve RPE tabakalarında VEGF seviyeleri diğer retina tabakalarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Markus ve ark. (117) yaptıkları bir çalışmada VEGF'in vasküler geçirgenlik ve ödem yapıcı etkileri olduğunu ve hidrokortizon, kortizon ve deksametazonun kültür ortamında

üretilen insan aortik vasküler düz kas hücrelerinde VEGF salınımını baskıladığını rapor etmişlerdir.

Brooks ve ark. (22) 33 diyabetik hastanın 42 diyabetik retinopatili gözünde yaptıkları bir çalışmada olgulara İVTA uygulamışlardır. İşlem öncesi ve enjeksiyondan bir ay sonra ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi için vitreus örnekleri almışlar ve stromal kökenli faktör-1 (SDF-1) ve VEGF salınım düzeylerine ELİSA yöntemiyle bakmışlardır. Olgularda altı ay sonunda makula ödeminde gerileme, görme keskinliklerinde artış saptamışlardır. Vitreus örneklerinde ise İVTA öncesi değerleri yüksek olan SDF-1 ve VEGF düzeylerinde anlamlı azalma saptamışlardır.

Zhang ve ark.'nın (118) bir çalışmasında ise ratlarda İVTA enjeksiyonu sonrası retinadaki VEGF-A ve reseptörleri (Flk-1 ve Flt-1) mRNA ve protein salınımları PCR'la ve immunhistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Kan-retina bariyeri retinal kalınlık ve damar dışına çıkan albuminin ölçülmesi ile gösterilmiştir. Toplam 16 ratın 8'ine streptozosin ile diyabet oluşturulmuş ve diğer 8 rat kontrol olarak alınmıştır. Ratların bir gözlerine İVTA diğer gözlerine ise salin solüsyonu uygulanmıştır. İVTA'in diyabetin erken safhalarında artan VEGF ve Flk-1 salınımını azaltarak, azalan Flt-1 salınımını arttırarak kan-retina bariyerini stabilize ettiği bulunmuştur. VEGF-A ve reseptörlerinin salınımı ile retinal kalınlık ve albumin sızıntısı arasında güçlü ilişki saptanmıştır. VEGF-A ve reseptörlerinin retinanın özellikle ganglion, iç nükleer ve dış pleksiform tabakalarında salınımlarının yoğun olduğu gösterilmiştir. Diyabetik ratlarda, diyabetik olmayanlara göre VEGF-A bu tabakalarda 1.8 kat daha fazla bulunmuştur. Diyabetik ratlarda İVTA uygulananlarda kontrollere göre retinada %32.1 daha az VEGF-A pozitif hücre saptanmıştır. İVTA'nın, diyabetik olmayan ratlarda VEGF-A ve reseptörlerinin salınımında değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Steroidlerin VEGF salınımı üzerine etkisinin olmadığını belirten çalışmalar da vardır. Hua ve ark. (119) 16 adet normal rata İVTA uygulaması yapmışlardır. Ratları üç hafta sonra sakrifiye etmişler ve retinalarını VEGF salınımı açısından incelemişlerdir. Değerlendirmeyi nothern blot yöntemiyle VEGF mRNA düzeylerini ölçerek yapmışlardır. Retina pigment epiteli tabakasında, iç nükleer tabaka ve bazı ganglion hücrelerinde VEGF-mRNA sinyalleri saptamışlardır. TA uygulanan grup ile BSS uygulanan grup arasında VEGF salınımı açısından anlamlı fark saptamamışlardır. TA'nın normal yetişkin ratlarda VEGF salınımına etkisiz olduğunu belirtmişlerdir. TA'nın anormal RPE veya hastalığı mevcut olan retinada patolojik VEGF düzeyine etkili olabileceğini söylemişlerdir.

Deneysel çalışmalardaki farklılık çalışma protokollerinin in vivo ve invitro koşullarda yapılmış olmasına ve steroidlerin farklı mekanizmalarının değerlendirilmiş olmasına bağlı olabilir.

Bizim çalışmamızda İVTA verilen diyabetik ratların retinalarının ganglion, dış nükleer ve basiller tabakalarında immunhistokimyasal yöntemle VEGF seviyelerinde kontrollere göre anlamlı azalma saptanmıştır.

Endotelin-1 güçlü vazokonstüktör peptiddir. Endotelin mRNA prekürsörleri retinada çeşitli hücre tiplerinde, en çokta astrositlerde saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda Endotelin-1'in diyabette arttığı gösterilmiştir (72-77). DM erken evrelerinde endotelin artışının retinal kan akımını azaltarak retinopati gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (3).

DM'de hiperglisemi sonucu polyol yolu, PKC aktivasyonu, AGE oluşumu, oksidatif stres mekanizmaları ile endotel hasarı oluşur. Bunun sonucunda da Endotelin-1 ve VEGF salınımı artar. Endotelin-1 vazokonstrüksiyona ve dolayısıyla hipoksiye neden olur. VEGF permeabilite artışına neden olur. Yokota ve ark. yaptıkları çalışmada diyabetik ratlarda retinada PKC'nin aktive olduğu ve trombosit kökenli büyüme faktörünü arttırdığı, bunun da Endotelin-1 ve VEGF artışına neden olduğu rapor edilmiştir (74).

Deng ve ark. (6) yaptıkları çalışmada diyabetik ratlarda retinal vasküler fonksiyon bozukluklarını ve bunun Endotelin ile ilişkisini incelemişlerdir. Ratlara Endotelin reseptör antagonisti (Bosentan) 1 ve 6 ay sonra vermişlerdir. Retinal kan akımını kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Retinada Endotelin-1, Endotelin-3, Endotelin-A ve Endotelin-B mRNA'larını immunhistokimyasal olarak analiz etmişlerdir. Bir ay sonra Bosentan başlanan grupta retinal kan akımının arttığını saptamışlardır. 6. ayda başlanan grupta ise bu etkiyi görmemişlerdir. Endotelin-1, Endotelin-3, Endotelin-A mRNA salınımları 1. ayda artarken Endotelin-B salınımı 6. ayda arttığını saptamışlardır. Sonuçta Endotelinin diyabette retinal değişikliklere arabuluculuk ettiğini ve etkisinin diyabetin süresine göre değişiklik gösterebileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada diyabetik ratlarda kontrollere göre retinada Endotelin-1'in anlamlı artışı likid kromotografi ile radyoimmunassay olarak gösterilmiştir (7).

Koichi ve ark. (78) streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratların retinalarında ELİSA ve immunhistokimya ile ICAM-1 ve VEGF artışını ve lökostazisi göstermişlerdir.

Aynı çalışmada Endotelin-A reseptör antagonisti (TA-0201) ile ICAM-1 ve VEGF seviyelerinde azalma saptanmıştır.

Koichi ve ark. (79) bir diğer bir çalışmalarında ise streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratların retinalarında kontrollere göre VEGF ve ICAM-1 seviyelerinin arttığını ELİSA yöntemi ile göstermişlerdir. Endotelin-A/B reseptör antagonisti (SB209670)'nin retinada artmış VEGF salınımını azalttığını ancak ICAM-1 seviyelerinin azaltmadığını söylemişlerdir.

Rodlan ve ark.'nın (120) yaptıkları çalışmada diyabetik retinopatili hastaların vitreus ve plazma örneklerinde immunreaktif Endotelin-1 düzeyi araştırılmıştır. 25 PDR, 25 NPDR ve 25 kontrol grubundan alınan plazma ve vitreus örneklerinde radyoimmünassay ile immunreaktif Endotelin-1 düzeyi bakılmıştır. Endotelin-A ve Endotelin-B reseptörleri PCR ile analiz edilmiştir. DR'de kontrol grubuna göre, PDR'de de NPDR'lere göre Endotelin-1'in anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır.

Oku ve ark. (121) ise ratlarda optik sinir hasarından sonra Endotelin-1 ve reseptörlerinin salınımını değerlendirmişlerdir. Endotelin-1'i radyoimmünassay ile Endotelin reseptör mRNA'larını ise PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Endotelin-A reseptörlerini iç retinal tabakalarda, ganglion ve sinir lifi tabakalarında, Endotelin-B reseptörlerini ise dış nükleer tabakada artmış olarak bulmuşlardır.

Yapılan bir çalışmada Endotelin-A reseptörünün damar düz kas hücrelerinde, iç retina tabakalarında ve ganglion hücrelerinde bulunduğu, Endotelin-B'nin ise endotel hücrelerinde, glialarda ve retinada dış pleksiform tabakada ve astrositlerde bulunduğu gösterilmiştir. Endotelin-1'in A reseptörüne afinitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (71).

Literatürde DR'de İVTA'nın Endotelin-1 ile ilişkisini inceleyen çalışma yoktur. Bizim çalışmamızda İVTA verilen diyabetik ratların retinalarının dış pleksiform, dış nükleer ve basiller tabakalarında immunhistokimyasal yöntemle Endotelin-1 seviyelerinde kontrollere göre anlamlı azalma saptanmıştır.

Lökositlerin endotele yapışması erken evre DR'de kritik olaydır ve hücre adezyon molekülleri buna arabuluculuk eder. Sonuçta DR'de kronik düşük seviyeli bir inflamasyon söz konusudur (4).

Yapılan deneysel bir çalışmada retinada inflamasyon alanlarındaki damar endotelinde ICAM-1, E-Selektin, PECAM, VCAM ve P-Selektin gibi adezyon moleküllerinin arttığı immunhistokimyasal olarak saptanmıştır (5).

Yapılan çalışmalarda DM'li hastalarda çözülebilir adezyon moleküllerinin artışının mikrovasküler komplikasyonlarda önemli rol oynadığına işaret edilmektedir. Nowak ve ark. (83) yaptıkları bir çalışmada DM'li hastalarda kontrollere göre serumda çözülebilir ICAM-1 ve ELAM-1 artışını göstermişlerdir. DR progresyonu ile bu moleküllerin seviyesinin arttığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla hücre adezyon moleküllerinin DR'de mikrovasküler komplikasyonlarla bağlantılı olabileceğini söylemişlerdir.

Joanna ve ark. (122) 19 PDR'li hastanın vitreus ve serum örneklerinde ELİSA yöntemi ile çözünebilir ICAM-1, E-Selektin, VCAM-1 ve vwF düzeylerine bakmışlardır. 15 hastayı kontrol olarak almışlardır. PDR'li hastalarda kontrollere göre serum ve vitreusta E-Selektin ve vwF seviyelerini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Bunun DR'de sistemik endotel hasarını gösterdiğini belirtmişlerdir. Yine PDR'li hastalarda serum ve vitreusta çözünebilir ICAM-1 ve VCAM-1 seviyelerini anlamlı olarak yüksek saptamışlardır. Sonuç olarak DM'nin damar endoteline hücre adezyonunu ve endotel hasarını sistemik olarak aktive ettiğini söylemişlerdir.

Funatsu ve ark. (123) 33 DMÖ ve 13 kontrol hastasının vitreuslarında VEGF ve çözünebilir ICAM-1 düzeylerini ELİSA ile incelemişlerdir. DMÖ olan hastalarda kontrollere göre vitreusta VEGF ve çözünebilir ICAM-1 seviyelerinin arttığını saptamışlardır.

Limb ve ark.'nın (124) yaptıkları çalışmada 9 PVR'li gözde kronik inflamasyonla ilişkili moleküllerin ve hücrelerin düzeyleri araştırılmıştır. Kontrol olarak 5 kadavra gözü alınmıştır. İmmunhistokimyasal olarak ICAM-1, E-Selektin, PECAM, VCAM, P-Selektin ve TNF- α ile T-Lenfosit, makrofajların kontrollere göre artışı gösterilmiştir.

Shibo ve ark. (125) 40 PDR'li hastanın epiretinal membranlarındaki damar endotelinde ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerini immunhistokimyasal olarak incelemişlerdir. 36 hastada ICAM-1 artışını ve 32 hastada VCAM-1 artışını saptamışlardır.

Richardson ve ark.'nın (126) çalışmalarında ise laser yapılan normal ratların retinalarında hücre adezyon molekülleri ve hücre infiltrasyonu immunhistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. ICAM-1'in dış nükleer tabaka, RPE, dış limitan membran ve koroidde salınımının arttığı saptanmıştır. E-Selektin'in ise retina tabakalarında salınımında artışa neden olmadığı sadece dış limitan membranda salınımının arttığı gösterilmiştir.

Hughes ve ark. (127) 41 DR'li ve 19 kontrol gözde postmortem retinal damarlarda ICAM-1 ve E-Selektin, P-Selektin, VCAM-1, PECAM düzeylerini immunhistokimyasal olarak incelemişlerdir. E-Selektin, P-Selektin, VCAM-1 boyanmalarında ve damar endotelial

ICAM-1 seviyelerinde de iki grup arasında fark görmemişlerdir. DR'li gözlerde kontrollere göre retina tabakalarında ICAM-1 boyanmalarında artış gözlemişlerdir. Özellikle dış nükleer, iç nükleer, iç pleksiform ve dış pleksiform tabakalarda diffüz boyanma görmüşlerdir. Sonuç olarak DR'de adezyon moleküllerinin retinadaki artışını ICAM-1'in retinadaki bazı hücreler tarafından oluşturulduğu ya da çözünebilir formların damardan sızarak retinada görüldüğü şeklinde açıklamışlardır.

Shen ve ark. (128) tarafından yapılan bir çalışmada laser ile koroidal neovaskülarizasyon oluşturulmuş ratlarda VEGF ve hücre adezyon molekülleri immunhistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. ICAM-1'in dış limitan membran, iç limitan membran, ganglion hücre tabakası, RPE ve koroidde; VEGF'in RPE ve koroidde, E-Selektin'in ise sadece koroidde arttığı rapor edilmiştir.

Scott ve ark.'nın (129) yaptıkları çalışmada postmortem retina ve koroidde ICAM-1, E-Selektin ve P-Selektin seviyeleri ve lokalizasyonları immunhistokimyasal olarak DR'li ve normal insan gözlerinde araştırılmıştır. ICAM-1 ve P-Selektinin normal koroidden de salındığını ancak DR'de arttığı, ICAM-1'in retinada dış limitan membran, RPE ve damar endotelinde arttığı gösterilmiş, ancak E-Selektin salınımında kontrollere göre artış saptanmamıştır.

Limb ve ark. (130) 12 PDR'li hastanın fibrovasküler membranlarında TNF- α ve adezyon moleküllerinin varlığını araştırmışlardır. Fibrovasküler membranlardaki, infiltran hücrelerde, hücre dışı matrikste ve vasküler endotelde immunhistokimyasal olarak TNF- α , ICAM-1, PECAM, E-Selektin, P-Selektin ve VCAM-1 boyanma düzeylerine bakmışlardır. TNF- α 'yı hepsinde, ICAM-1'i 9, PECAM'ı 8, E-Selektin'i 4, P-Selektin'i 3, VCAM-1'i 5 membranda saptamışlardır. Sonuçta bu moleküllerin DR'de proliferasyonun gelişiminde önemli rolü olduğunu söylemişlerdir. Sonuçta endotelde lökosit toplanmasının DR'de patogenezinde önemli bir faktör olduğunu ve insan PDR fibrovasküler membranlarında lokal TNF- α ve adezyon moleküllerinin artışının bu olayları başlatıp devam ettiren faktörler olduğunu söylemişlerdir.

Anjiyogenezis ve inflamasyonda endotel hücre yüzeylerinde PECAM yoğun olarak salınır. Yapılan deneysel bir çalışmada, iskemik retinopati oluşturulmuş PECAM negatif farelerde anjiyogenezis oluşmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla PECAM'ın anjiyogenezis oluşmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (131).

İVTA'nın hücre adezyon molekülleri üzerine etkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma vardır.

Penfold ve ark. (132) yaptıkları çalışmada TA'nın hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerini baskıladığını (ICAM-1) ve vasküler geçirgenliği azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca TA'nın epitel kültüründe hücreler arası geçirgenliği azalttığını ve RPE hücreleri arası bariyer fonksiyonunu güçlendirdiğini ve subretinal sıvıyı azalttığını belirtmişlerdir.

Mizuno ve ark. (21) retinal iskemi oluşturdukları ratlara perioküler TA enjeksiyonu yaparak P-selektin ve ICAM-1 mRNA salınımını PCR ile ayrıca retinal kalınlığı OCT ile ölçmüşlerdir. TA'nın retinada P-selektin ve ICAM-1 salınımını ve retinal kalınlığı azalttığını saptamışlardır. Sonuçta TA'nın retinal vasküler endotelde adezyon moleküllerinin salınımını azaltıp lökosit-endotel ilişkisini inhibe ederek DR seyrinde önemli rol oynadığını söylemişlerdir.

Daisuke ve ark.'nın (133) deneysel çalışmasında retinalarına laser fotokoagülasyon yapılmış ratların bir grubuna subtenon TA uygulanmış, diğer grubu kontrol olarak alınmıştır. Fluorografi ile lökosit dinamikleri, retinada immunhistokimyasal olarak ICAM-1 düzeyleri ve OCT ile retinal kalınlık değerlendirilmiştir. TA uygulanan ratların retinalarında kontrollere göre lökosit yuvarlanmasında %66, toplanmasında %24 azalma saptanmıştır. Ayrıca retinal kalınlıkta da anlamlı azalma saptanmıştır. Sonuçta TA'nın dolaşımdaki lökositlerin dinamiklerini baskıladığı ve ödemi azalttığı söylenmiştir. Lökosit-endotel hücre ilişkisinin baskılanmasının TA'nın tedavi edici etkisindeki mekanizmalardan biri olabileceği sonucuna varılmıştır.

TA'nın VEGF ve hücre adezyon moleküllerinin salınımını azaltmadığını belirten çalışmalar da vardır. Tatar ve ark. (134) koroidal neovasküler membranı olan 11 hastaya İVTA uygulamışlardır. 18 hastayı kontrol olarak almışlardır. Membranları VEGF, ICAM-1, E-Selektin, CD-34, CD-45, CD-68 ile boyamışlardır. TA uygulanan grupta kontrollere göre endotelde ve stromada ICAM-1'in kontrollere göre arttığını, lökosit dansitesinin daha fazla olduğunu ve RPE'de VEGF'in daha fazla olduğunu saptamışlardır. Sonuçta TA'nın VEGF, ICAM-1 salınımında ve makrofaj infiltrasyonunda inhibitör rolü olmadığını saptamışlardır. Böylece TA'nın klinik yararlarının sadece antiinflamatuvar ve VEGF inhibisyonu ile olmayabileceğini söylemişlerdir.

Bizim çalışmamızda İVTA verilen diyabetik ratların retina tabakalarında immunhistokimyasal yöntemle ICAM-1 ve E-Selektin seviyelerinde kontrollere göre azalma saptanmamıştır.

Literatürde DR'de retina tabakalarında PECAM seviyelerinin ve İVTA'nın PECAM üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışma bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda İVTA verilen diyabetik ratların retinalarının dış pleksiform, basiller, RPE tabakalarında immunhistokimyasal yöntemle PECAM seviyelerinde kontrollere göre anlamlı azalma saptanmıştır.

Çalışmamızda ratlarda streptozosin ile diyabet oluşturuldu. Ratlarda İVTA uygulanmasının ile retinada VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımı üzerine etkisi araştırıldı. İVTA'nın diyabetik ratlarda retinanın bazı tabakalarında VEGF, Endotelin-1 ve PECAM salınımında azalmaya neden olduğu, ICAM-1 ve E-Selektin salınımında ise değişikliğe neden olmadığı bulundu.

Bu çalışma TA'nın retinada VEGF salınımını azaltarak anjiogenezisi inhibe ettiğini düşündürmektedir. Hücre adezyon moleküllerinin ve lökosit-endotel hücre ilişkisinin baskılanması da TA'nın klinik etkisinden sorumlu olabilir.

Sonuç olarak DR tedavisinde anti-VEGF ajanlar ve adezyon moleküllerinin blokağı umut vermektedir.

ÖZET

Diyabetik Ratlarda İntravitreal Triamsinolon Asetonidin Retinada VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM Salınımına Etkisi

AMAÇ: Bu çalışmada streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratlarda intravitreal triamsinolon asetonid'in retinada VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımı üzerine etkinliği değerlendirildi.

METOD: Ratlara 50 mg/kg streptozosin tek doz halinde periton içine verildi. Ratların diyabetik olup olmadıkları 3. ve 7. günlerde kuyruk venlerinden alınan kanda glukoz düzeyleri ölçülerek kontrol edildi. Kan glukoz seviyesi 250 mg/dl ve üzerinde olanlar çalışmaya alındı. 14. günde, Hamilton iğnesi (30 gauge) ile intravitreal triamsinolon asetonid (320 µg/ 8 µl) verildi. Kontrol grubuna ise intravitreal dengeli tuz solüsyonu (BSS) yapıldı. Ratlar 1. ayda sakrifiye edildi ve tüm gözler enükle edildi. Tüm gözler VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM salınımları yönünden immunhistokimyasal yöntemle analiz edildi.

BULGULAR: Enükle edilen gözlerden alınan patolojik kesitlerde, retinanın tüm anatomik tabakaları immunhistokimyasal olarak VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM işaretleyici maddelerle incelendi. İstatistiksel olarak triamsinolon verilen gözlerin bazı retina tabakalarında kontrol grubuna göre VEGF, Endotelin-1, PECAM salınımında anlamlı azalma saptanırken, ICAM-1 ve E-Selektin salınımında azalma saptanmamıştır.

SONUÇ: Bu sonuçlar intravitreal triamsinolon asetonid'in diyabetik ratlarda retinanın bazı tabakalarında VEGF, Endotelin-1, PECAM salınımında azalmaya neden olduğunu, ancak E-Selektin ve ICAM-1 salınımında azalmaya neden olmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Diyabetik retinopati, triamsinolon asetonid, VEGF, Endotelin, ICAM-1, E-Selektin ve PECAM

İNGİLİZCE ÖZET

The effect of intravitreal triamcinolone acetonid on retinal expression of VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin and PECAM in diabetic rats

Purpose: In this study we investigated the effect of intravitreal triamcinolone acetonide (IVTA) in streptozotocin-induced diabetic rats on VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin and PECAM expression in the retina.

Materials and Methods: Male wistar rats were included in the study. Diabetes was induced by intraperitoneal single injection of streptozotocin (50 mg/kg). Diabetes was confirmed by measuring blood glucose level using blood samples obtained from the tail vein on the third and seventh days. The rats included in the study if the blood glucose level was higher than 250 mg/dl.

Fifteen days after the injection of streptozotocin, a single dose of triamcinolone acetonide (320 µg/ 8 µl) was injected into the vitreous by using a Hamilton micro-injector (30 gauge) and an equal volume of balanced salt solution into the fellow eyes. Rats were sacrificed four weeks after the injection of streptozotocin, and the eyes were enucleated. The retina specimens obtained from the enucleated eyes were examined with using VEGF, Endotelin-1, ICAM-1, E-Selektin and PECAM markers by immunohistochemistry.

Results: Decreased VEGF, Endotelin-1 and PECAM expressions were found in some retinal layers of rats which were injected TA compared with the control rats. However, ICAM-1 and E-Selektin expressions was not statistically significant difference was found between TA injected and control eyes.

Conclusion: In this study, these findings shows that intravitreal triamcinolone acetonide could decreased VEGF, Endotelin-1 and PECAM expression in some layers of diabetic rats. However no change could seen in expression of ICAM-1 and E-Selektin.

Key Words: Diabetic Retinopathy, triamcinolone acetonide, VEGF, Endotelin, ICAM-1, E-Selektin and PECAM

KAYNAKLAR

1. Merime TJ. Diabetic retinopathy: a synthesis of perspectives. *N Engl J Med* 1990; 322:978-983. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course. Section 12, Part 2.
2. Bayraktar Z, Akar S. Diabetik retinopati epidemiyolojisi. İstanbul. Dilek Ofset. 2000;1-9.
3. Robin Roberts, Hongmei Luan and Bruce A. Berkowitz. Blocking ET-1 Receptors Does Not Correct Subnormal Retinal Oxygenation Response in Experimental Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3550–3555.
4. Miyamoto, K., Khosrof, S., Bursell, S.E., Rohan, R., Murata, T., Clermont, A.C., Aiello, L.P., Ogura, Y., Adamis, A.P., 1999. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10836–10841.
5. Teresa A. Hill, Miles R. Stanford, Elizabeth M. Graham, Dudley C. Dumonde, and K. Alun Brown. A New Method for Studying the Selective Adherence of Blood Lymphocytes to the Microvasculature of Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38:2608-2618.
6. Deng D, Evans T, Mukherjee K, Downey D, Chakrabarti S. Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins. *Diabetologia.* 1999 Oct;42(10):1228-34.
7. Usha Chakravarthy, Ruth G. Hayes, Alan W. Slitt, and Alasdair Douglasf. Endothelin Expression in Ocular Tissues of Diabetic and Insulin-Treated Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:2144-2151.
8. A.N. Witmera, G.F.J.M. Vrensenb, C.J.F. Van Noordenc, R.O. Schlingemann. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 22 (2003) 1–29.
9. Machemer R, Sugita G, Tano Y. Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1979;77:171-80.
10. Edelman J, Lutz D, Castro MR. Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-aqueous barrier breakdown. *Exp Eye Research* 2005;80:249-58.

11. Wilson CA, Berkowitz BA, Sato Y, et al. Treatment with intravitreal steroid reduces blood-retinal barrier breakdown due to retinal photocoagulation. *Arch Ophthalmology* 1992;110:1155-9.
12. Ip MS, Kumar KS. Intravitreal triamcinolone acetonide as treatment for macular edema from central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 2002;120(9):1217-9.
13. Chen SD, Lochhead J, Patel CK, Frith P. Intravitreal triamcinolone acetonide for ischaemic macular oedema caused by branch retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol* 2004;88(1):154-5.
14. Jonas JB, Kreissing I, Degenring RF. Intravitreal triamcinolone acetonide for pseudophakic cystoid macular edema. *Am J Ophthalmol* 2003;136(2):384-6.
15. Jonas JB. Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of sympathetic ophthalmia. *Am J Ophthalmol* 2004;137(2):367-8.
16. Rechtman E, Allen VD, Danis RP, Pratt LM, Harris A, Speicher MA. Intravitreal triamcinolone for choroidal neovascularization in ocular histoplasmosis syndrome. *Am J Ophthalmol* 2003;136(4):739-41.
17. Degenring RF, Jonas JB. Intravitreal injection of triamcinolone acetonide as treatment for chronic uveitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87(3):361.
18. Jonas JB, Sofker A, Degenring R. Intravitreal triamcinolone acetonide as an additional tool in pars plana vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol* 2003;13(5):468-73.
19. Alldredge CD, Garretson BR. Intravitreal triamcinolone for the treatment of idiopathic juxtafoveal telangiectasis. *Retina* 2003;23(1):113-6.
20. Y.H. Kim, M.Y. Choi, Y.S. Kim, C.H. Park, J.H. Lee, I.Y. Chung, J.M. Yoo, W.S. Choi, G.J. Cho, S.S. Kang. Triamcinolone acetonide protects the rat retina from STZ-induced acute inflammation and early vascular leakage. *Life Sciences* 81 (2007) 1167–1173.
21. Shimon Mizuno, Akiko Nishiwaki, Hiroshi Morita, Takatomo Miyake, and Yuichiro Ogura. Effects of Periocular Administration of Triamcinolone Acetonide on Leukocyte–Endothelium Interactions in the Ischemic Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2831–2836.
22. Brooks HL Jr, Caballero S Jr, Newell CK, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with Diabetic retinopathy and

- cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. Arch Ophthalmol. 2004;122:1801-1807.
23. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. pp. 423-429, W.B. Saunders, Philadelphia, USA, 1993.
 24. Bengisu Ü. Göz Hastalıkları. s. 161-166, Palme Yayıncılık, Ankara, 1989.
 25. Tasman W, Jaeger EA, Rullo C, Montzka D, Zacierka MD. Duane's Clinical Ophthalmology. JB Lippincott Company, 1994.
 26. Albert DM, Jakobiec FA. Clinical Practice Principles and Practice of Ophthalmology. W.B. Saunders Company, 1994.
 27. Yanoff M, Duker JS. Ophthalmology, Second Edition. Mosby, St.Louis, USA, 2004.
 28. Flynn HW, et. al. Basic and Clinical Science Course, Section 12, Retina and Vitreous. American Academy of Ophthalmology, San Francisco, USA, 2003- 2004.
 29. Ahmet Taş, M.Zeki Bayraktar, Üzeyir Erdem, Güngör Sobacı, Muharrem Uçar .Diyabetik hastalarda retinopati sıklığı ve risk faktörleri. Gülhane Tıp Dergisi 2005; 47: 164-174.
 30. Kini MM, Leibowitz HM, Colton T, Nickerson RJ, Ganley J, Dawber TR. Prevalence of senile cataract, diabetic retinopathy, senile macular degeneration, and open-angle glaucoma in The Framingham Eye Study. Am J Ophthalmol 1978; 85: 28-34.
 31. Kahn HA, Bradley RF. Prevalence of diabetic retinopathy. Age, sex and duration of diabetes. Br J Ophthalmol 1975; 59: 345- 349.
 32. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. Arch Ophthalmol 1984;102(4):520-6.
 33. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. Arch Ophthalmol 1984;102(4):527-32.
 34. Diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Arc Ophthalmol. 1995;113:36-51.
 35. United Kingdom prospective diabetes study group. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compare with conventional treatment and risk of complications in patients with tip 2 diabetes. 1998;352:837-53.

36. Axer-Siegel R, Hod M, Fink-Cohen S, Kramer M, Weinberger D, Schindel B, Yassur Y. Diabetic retinopathy during pregnancy. *Ophthalmology* 1996;103(11):1815-9.
37. Parving HH. Benefits and cost of antihypertensive treatment in incipient and overt diabetic nephropathy. *J Hypertens Suppl* 1998;16(1):S99-101.
38. Chew EY. Diabetic retinopathy and lipid abnormalities. *Curr Opin Ophthalmol* 1997;8(3):59-62.
39. Rand LI, Krolewski AS, Aiello LM, Warram JH, Baker RS, Maki T. Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 1985;313(23):1433-8.
40. Kohner Eva M. Diabetic retinopathy. *BMJ* 1993;307:1195-9.
41. Aiello LP. The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol*. 2002 Dec;47 Suppl 2:S263-9.
42. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131-42.
43. Levent Akduman , Özay Öz. Diabetik Makula Ödeminde Medikal Tedavi. *Ret - Vit* 2002; 10 : 203-208.
44. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest* 1988;82(2):735-8.
45. Orlidge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987;105(3):1455-62.
46. De la Rubia G, Oliver FJ, Inoguchi T, King GL. Induction of resistance to endothelin-1's biochemical actions by elevated glucose levels in retinal pericytes. *Diabetes* 1992;41(12):1533-9.
47. Ditzel J. Affinity hypoxia as a pathogenetic factor of microangiopathy with particular reference to diabetic retinopathy. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1980;238:39-55.
48. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Noda K, Ozawa Y, Fukamizu A, Tsubota K, Itoh H, Oike Y, Ishida S. (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1485-7.

49. Lieth E, Barber AJ, Xu B, et al, Penn State Retina Research Group: Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental Diabetic retinopathy. *Diabetes* 1998; 47:815-820.
50. Podesta, F., Romeo, G., Liu, et al. Bax is increased in the retina of Diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):1025-32.
51. Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996;114(10):1219-28.
52. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM., Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331(22):1480-7.
53. Ussmann JH, Lazarides E, Ryan SJ. Traction retinal detachment. A cell-mediated event. *Arch Ophthalmol* 1981;99(5):869-72.
54. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003 Sep;47(3):149-61.
55. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular of angiogenesis. *Intern Rev Immunol* 2002;21:33-49.
56. Burak Turgut, Mete Güler, Tamer Demir, Peykan Türkçüoğlu, Ülkü Çeliker. Oküler Anjiyogenezde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün Rolü. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2007, 16:38-46.
57. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
58. Laka KP, Chakraborty C. Role of Nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149- 55.
59. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, et al. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002;5:237-56.
60. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997;18:4-25.

61. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
62. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971;285:1182-6.
63. Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: The role of antiangiogenesis agents. *Adv Cancer Res* 2000;79:1-38.
64. Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background Diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes*. 1998 Mar;47(3):401-6.
65. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al: Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 103:1820–8, 1996.
66. Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, et al. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):697-707.
67. Barbara Wirostko , Tien Y. Wong b, Rafael Simo. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research*. 27 (2008) 608–621.
68. Jousen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the Diabetic retina. *Am J Pathol* 2001;158:147–152.
69. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in Diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 1999;274:23463–23467.
70. Qaum T, Xu Q, Jousen AM, et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Sep;42(10):2408-13.
71. Vanesa Torbidoni, María Iribarne, and Angela M. Suburo. Endothelin Receptors: Do They Have a Role in Retinal Degeneration?. *Recent Advances in Retinal Degeneration*,399-405.
72. Chakrabarti, S. and Sima, A. A. (1997) Endothelin-1 and endothelin-3-like immunoreactivity in the eyes of diabetic and non-diabetic BB/W rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 37 , pp. 109-120.

73. Takagi, C., Bursell, S. E. and Lin, Y. W. (1996) Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37 , pp. 2504-2518.
74. Yokota, T., Ma, R. C. and Park, J. Y. (2003) Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes. *Diabetes.* 52 , pp. 838-845.
75. Chakravarthy, U., Hayes, R. G., Stitt, A. W. and Douglas, A. (1997) Endothelin expression in ocular tissues of diabetic and insulin-treated rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, pp. 2144-2151.
76. Chakrabarti, S., Gan, X. T. and Merry, A. (1998) Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelinA and endothelinB gene expression in chronic diabetes. *Curr Eye Res.* 17 , pp. 301-307.
77. Cukiernik, M., Hileeto, D. and Evans, T. (2004) Vascular endothelial growth factor in diabetes induced early retinal abnormalities. *Diabetes Res Clin Pract.* 65 , pp. 197-208.
78. Koichi Masuzawa , Katsutoshi Goto, Subrina Jesmin, Seiji Maeda, Takashi Miyauchi, Yuichi Kaji, Tetsuro Oshika, Sadao Hori. An Endothelin Type A Receptor Antagonist Reverses Upregulated VEGF and ICAM-1 Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *Current Eye Research*, Volume 31, Issue 1 January 2006 , pages 79 – 89.
79. Koichi Masuzawa, Subrina Jesmin, Seiji Maeda, Sohel Zaedi, Nobutake Shimojo, Takashi Miyauchi, and Katsutoshi Goto. Effect Of Endothelin Dual Receptor Antagonist On Vegf Levels In Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *Exp Biol Med* 231:1090–1094, 2006.
80. Özge DARKA, Hücre Adezyon Molekülleri ve Enflamasyondaki Roller. *T Klin Mikrobiyoloji Enfeksiyon* 2003, 2:36-43.
81. Morigi M, Angioletti S, Imberti B et al (1998) Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion. *J Clin Invest* 101:1905–1915.
82. Teresa A. Hill, Miles R. Stanford, Elizabeth M. Graham, Dudley C. Dumonde, and K. Alun Brown. A New Method for Studying the Selective Adherence of Blood Lymphocytes to the Microvasculature of Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38:2608-2618.

83. Mariusz Nowak, Tomasz Wielkoszynski, Bogdan Marek, Beata Kos-Kudla, Elzbieta Swietochowska, Lucyna Sieminska, Dariusz Kajdaniuk, Joanna Glogowska-Szelag, Katarzyna Nowak. Blood serum levels of vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1), intercellular adhesion molecule (sICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med* (2008) 8:159–164.
84. K. Kamiuchi, G. Hasegawa, H. Obayashi, A. Kitamura, M. Ishii, M. Yano, T. Kanatsuna, T. Yoshikawa and N. Nakamura. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 19, 371–376.
85. Diabetic Retinopathy Study Research Group: Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. *Am J Ophthalmol*, 1976; 81:383-396.
86. Stefansson E, Machemer R, de Juan E Jr, McCuen BW 2nd, Peterson J. Retinal oxygenation and laser treatment in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1992 Jan 15;113(1):36-8.
87. Bandello F, Pognuz R, Polito A, Pirracchio A, Menchini F, Ambesi M. Diabetic macular edema: classification, medical and laser therapy. *Semin Ophthalmol* 2003;18(4):251-8.
88. Mendrinós E, Donati G, Pournaras CJ,. Rapid and persistent regression of severe new vessels on the disc in proliferative diabetic retinopathy after single intravitreal injection of pegaptanib. *Acta Ophthalmol*. 2008 Nov.
89. Macugen Diabetic Retinopathy Study Group. A phase 2 randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2005;112:1747-1757.
90. Maria Stephanie R. Jardeleza and Joan W. Miller. Review of Anti-VEGF Therapy in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Seminars in Ophthalmology*, 24, 87–92, 2009.
91. Zimmerman TJ. et al. *Textbook of Ocular Pharmacology*. Chapter 6.
92. Beer PM, Bakri SJ, Singh RJ, et al. Intraocular concentration and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after a single intravitreal injection. *Ophthalmology*, 2003;110: 681-686.
93. McCuen BW II, Besler M, Tano Y, et al. The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 1981;91:785-88.
94. Kang Wang, Yanling Wang, Lixin Gao, Xinmin LI, Mingming LI and Jianyou Guo. Dexamethasone Inhibits Leukocyte Accumulation and Vascular Permeability in Retina

- of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats via Reducing Vascular Endothelial Growth Factor and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. *Biol. Pharm. Bull.* 31(8) 1541—1546 (2008).
95. Hiroshi Tamura, Kazuaki Miyamoto, Junichi Kiryu, Shinsuke Miyahara, Hideto Katsuta, Fumitaka Hirose, Kunihiro Musashi, and Nagahisa Yoshimura. Intravitreal Injection of Corticosteroid Attenuates Leukostasis and Vascular Leakage in Experimental Diabetic Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:1440–1444.
 96. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
 97. Vitros DT II Operator's Manual Book. Johnson and Jonson Company, 2003, USA.
 98. Osicka TM, Yu Y, Panagiotopoulos S, et al. Prevention of albuminuria by aminoguanidine or ramipril in streptozotocin-induced diabetic rats is associated with the normalization of glomerular protein kinase C. *Diabetes.* 2000 Jan;49(1):87-93.
 99. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, et al. Identification of angiotensin converting enzyme 2 in the rodent retina. *Current Eye Research* 2004, Vol. 29, No. 6, pp. 419–427.
 100. Hua Gao, Xiaoxi Qiao, Rui Gao. Intravitreal triamcinolone does not alter basal vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat retina. *Vision Research* 44 (2004) 349–356.
 101. Berkowitz BA, Lukaszew RA, Mullins CM, Penn JS. Impaired hyaloidal circulation function and uncoordinated ocular growth patterns in experimental retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Feb;39(2):391-6.
 102. Sibi R. Lawsona, Bichoy H. Gabraa, Brigitte Gue´rina. Enhanced dermal and retinal vascular permeability in streptozotocin-induced type 1 Diabetes in Wistar rats: blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *Regulatory Peptides* 124 (2005) 221– 224.
 103. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 3. Techniques for scatter and local photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: *Int Ophthalmol Clin* 1987;27(4):254-64.
 104. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 9. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1991;98(5 Suppl):766-85.
 105. Jonas JB, Sofker A. Intraocular injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2001;132(3):425-7.

106. Hida T, Chandler D, Arena JE, Machemer R. Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations. *Am J Ophthalmol* 1986;101:190-95.
107. Sakamoto T, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura T, Ueno A, Itaya K, Ishibashi T. Triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy improves the surgical procedures and decreases the postoperative blood-ocular barrier breakdown. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240(6):423-9.
108. Felinski EA, Antonetti DA: Glucocorticoid regulation of endothelial cell tight junction gene expression: novel treatments for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 30:949-957, 2005.
109. Martidis A, Duker JS, Greenberg PB, Rogers AH, Puliafito CA, Reichel E, Bauman C. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2002;109(5):920-7.
110. Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Intraocular pressure after intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Br J Ophthalmol* 2003;87(1):24-7).
111. Sutter FK, Simpson JM, Gillies MC. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema that persists after laser treatment: three-month efficacy and safety results of a prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial. *Ophthalmology* 2004;111(11):2044-9).
112. Kaderli B, Avci R, Gelisken O, Yucel AA. Intravitreal triamcinolone as an adjunct in the treatment of concomitant proliferative diabetic retinopathy and diffuse diabetic macular oedema. Combined IVTA and laser treatment for PDR with CSMO. *Int Ophthalmol*. 2005 Dec;26(6):207-14. Epub 2007 Feb 14.
113. Ip MS. Intravitreal injection of triamcinolone: an emerging treatment for diabetic macular edema. *Diabetes Care* 2004;27(7):1794-7.
114. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 31;92(3):905-9.
115. Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R, Smith LE. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):4851-6.

116. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with Diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994 Dec 1;331(22):1480-7.
117. Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, Papakonstantinou E, Roth M. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1998;341:309–315.
118. Xinyuan Zhang, Shisan Bao, Donna Lai, Robert W. Rapkins and Mark C. Gilies. Intravitreal Triamcinolone Acetonide Inhibits Breakdown of the Blood-Retinal Barrier Through Differential Regulation of VEGF-A and Its Receptors in Early Diabetic Rat Retinas. *Diabetes* 57: 1026–1033, 2008.
119. Hua Gao, Xiaoxi Qiao, Rui Gao. Intravitreal triamcinolone does not alter basal vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat retina. *Vision Research* 44 (2004) 349-356.
120. Roldan-Pallares, Manuela Md, Phd; Rollín, Raquel Sc, Phd; Martínez-Montero, Juan Carlos Md, Phd; Fernandez-Cruz, Arturo Md, Phd; Bravo-Llata, Carmen Sc, Phd; Fernandez-Durango, Raquel Md, Phd. Immunoreactive Endothelin-1 In The Vitreous Humor And Epiretinal Membranes Of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy. *Retina: February 2007 - Volume 27 - Issue 2 - Pp 222-235.*
121. Oku H, Fukuhara M, Kurimoto T, Okuno T, Sugiyama T, Ikeda T. Endothelin-1 (ET-1) is increased in rat retina after crushing optic nerve. *Curr Eye Res.* 2008. ul;33(7):611-20.
122. Joanna Adamiec-Mroczek, Jolanta Oficjalska-Młyniczak, Marta Misiuk-Hojło. Proliferative diabetic retinopathy—The influence of diabetes control on the activation of the intraocular molecule system. *diabetes research and clinical practice* 84 (2009) 4 6 – 50.
123. Funatsu H, Yamashita H, Sakata K, Noma H, Mimura T, Suzuki M, Eguchi S, Hori S. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2005 May;112(5):806-16.
124. Limb GA, Chignell AH, Woon H, Green W, Cole CJ, Dumonde DC. Evidence of chronic inflammation in retina excised after relaxing retinotomy for anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996 Apr;234(4):213-20.

125. Shibo Tang, Kim Chi Le-Ruppert, Veit-Peter Gabel. Expression of intercellular adhesion molecule- I (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-I (VCAM-1) on proliferating vascular endothelial cells in diabetic epiretinal membranes. *alofOphthalmology* 1994; 78: 370-376.
126. P R S Richardson, M E Boulton, J Duvall-Young, D McLeod. Immunocytochemical study of retinal diode laser photocoagulation in the rat. *British Journal of Ophthalmology* 1996;80:1092-1098.
127. J M Hughes, A Brink, A N Witmer, M Hanraads-de Riemer, I Klaassen, R O Schlingemann. Vascular leucocyte adhesion molecules unaltered in the human retina in diabetes. *Br J Ophthalmol* 2004;88:566–572.
128. W Y Shen, M J T Yu, C J Barry, I J Constable, P E Rakoczy. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1063–1071.
129. D. Scott McLeod, David J. Lefer, Carol Merges, and Gerard A. Luty. Enhanced Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 and P-Selectin in the Diabetic Human Retina and Choroid. *American Journal of Pathology*, Vol. 147, No. 3, September 1995.
130. G Astrid Limb, Anthony H Chignell, William Green, Frances LeRoy, Dudley C Dumonde. Distribution of TNF- α and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology* 1996; 80: 168-173.
131. Terri A. DiMaio, Shoujian Wang, Qiong Huang , Elizabeth A. Scheef, Christine M. Sorenson, Nader Sheibani. Attenuation of retinal vascular development and neovascularization in PECAM-1-deficient mice. *Developmental Biology* 315 (2008) 72–88.
132. Penfold PL, Wen L, Madigan MC, Gillies MC, King NJ, Provis JM. Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM- 1) expression of the ECV304 cell line: Implications for macular degeneration. *Clin Exp Immunol.* 2000 Sep;121(3):458-65.
133. Daisuke Mizuno, Akihisa Matsubara, and Yuichiro Ogura. Effect of Posterior Sub-Tenon Administration of Triamcinolone Acetonide on Leukocyte Dynamics in Rat Retinal Microcirculation after Panretinal Photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2127–2133.

134. Tatar O, Adam A, Shinoda K, Kaiserling E, Boeyden V, Claes C, Eckardt C, Eckert T, Pertile G, Scharioth GB, Yoeuek E, Szurman P, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S. Early effects of intravitreal triamcinolone acetonide on inflammation and proliferation in human choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol.* 2009 Mar;127(3):275-81.