



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DİYABETİK RATLARDA İNTRAVİTREAL  
TRİAMSİNALON ASETONİDİN RETİNADA  
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ  
SALINIMINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İLKER BERKİT

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sema Oruç DÜNDAR

**AYDIN-2008**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DİYABETİK RATLARDA İNTRAVİTREAL  
TRİAMSİNALON ASETONİD RETİNADA  
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ  
SALINIMINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İLKER BERKİT

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sema Oruç DÜNDAR

**AYDIN-2008**

## ÖNSÖZ-TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanmasında, gerek uygulama gerekse teorik ve bilimsel alanda yetişmemde büyük emeği olan bana her türlü çalışma imkanını hazırlayan, bu konuda hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bilgi, fikir ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, yanında çalışmaktan gurur duyduğum, sayın hocam Prof. Dr. Sema Oruç DÜNDAR'a derin minnet ve saygılarımı sunuyorum.

Ayrıca yine uzmanlık eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, yetişmemde ve çalışmalarımda emekleri geçen bilgi, fikir ve tecrübeleri ile bana ışık tutan merhum Anabilim Dalı başkanımız ve hocamız sayın Prof. Dr. Turgay Orhan AKTUNÇ'a değerli hocalarım Prof. Dr. Seyhan Bahar ÖZKAN, Prof. Dr. Volkan DAYANIR ve Doç. Dr. Erkin KIR'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimim sırasında yardımlarını esirgemeyen başasistanımız Dr. Harun ÇAKMAK ve uzmanlık eğitimim boyunca öğrenme hevesini birlikte paylaştığımız, zorlukları birlikte yendiğimiz asistan arkadaşlarıma, tüm hemşirelere ve klinik personeline teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmamda bana yardım eden Patoloji A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU, Farmakoloji A.D. öğretim üyeleri Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU ve Yrd Doç. Dr. Turhan DOST' a içten teşekkür ederim.

Tüm eğitim ve öğrenim hayatımda desteklerini yanımda hissettiğim aileme sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Dr. İlker BERKİT

İÇİNDEKİLER	SAYFA
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Retinanın Anatomisi	3
2.1.1. Santral Retina	3
2.1.2. Periferik retina	3
2.1.3. Retinanın Katları	4
2.1.4. Retinanın Damarları ve Sinirleri	6
2.2. Koroid	7
2.3. Kan- retina bariyeri	7
2.4. Diyabetik retinopati patogenezi	7
2.4.1. Başlangıç diyabetik retinopatide patogenezi	9
2.4.2. Nonproliferatif diyabetik retinopatide patogenezi	10
2.4.3. Proliferatif diyabetik retinopatide patogenezi	11
2.4.4. Diyabetik makular ödem patogenezi	12
2.5. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	13
2.6. Diyabetik retinopati ve Vasküler endotelial büyüme faktörü	14
2.6.1. Non-proliferatif diyabetik retinopati ve VEGF	15
2.6.2. Proliferatif diyabetik retinopati ve VEGF	16
2.6.3. Diyabetik makular ödem ve VEGF	16
2.7. Diyabetik retinopatinin tedavisi	16
2.8. Kortikosteroidler	18
2.9. Deneysel diyabet oluşturulması	20
2.9.1. Ratlarda streptozosinle diyabet oluşturulması	20
2.9.2. Açlık kan şekeri düzeyinin ölçülmesi	21
3. Gereç ve yöntem	22
4. Bulgular	27
5. Tartışma	31
6. Özet	37
7. İngilizce başlık ve özet	38
8. Kaynaklar	39

## **KISALTMALAR DİZİNİ**

Diyabetes Mellitus (DM)  
Diyabetik retinopati (DR)  
Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)  
Diabetic Retinopathy Study (DRS)  
Diyabetik Makular Ödem (DMÖ)  
Triamsinolon asetonid (TA)  
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)  
İntravitreal triamsinolon asetat ( İVTA)  
Proliferatif diyabetik retinopati (PDR)  
Nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)

## **TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ**

Tablo 1: Diyabetik retinopatide evrelere göre oluşan değişiklikler.

Tablo 2: Rat retina tabakalarının ortalama VEGF boyanma dereceleri.

Resim 1: Anestezi için hazırlanan bir rat.

Resim 2: Sağ gözüne intravitreal enjeksiyon yapılan bir rat.

Resim 3: Rat retinalarında boyanma dereceleri (A=boyanma yok(0), B= +1 boyanma, C= +2 boyanma, D= +3 boyanma).

Resim 4: Retinadan alınmış kesitin histolojik görüntüsü.

Resim 5: İntravitreal TA uygulanmış rat retinası (A) ve kontrol retinaya (B) ait preparat örneklerinin karşılaştırılması.

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

# 1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM) insülin hormonunun yokluğu, yetersizliği veya dokular tarafından kullanılamaması sonucu oluşan pek çok sistemi tutan bir hastalıktır. Dünya nüfusunun % 6'sında DM hastalığı bulunmaktadır ve dünya üzerinde 150 milyondan fazla diyabetik hasta bulunmaktadır (1).

Diyabetik retinopati (DR), DM hastalığının en sık rastlanan mikrovasküler komplikasyonu olup dünyada her yıl yaklaşık 10.000 kişide körlükle sonuçlanmaktadır. Diyabetik hastalarda yasal körlük diyabetik olmayanlara göre 25 kat daha fazla görülmektedir. DR gelişmiş ülkelerde 20- 64 yaş arası olgularda en sık körlük sebebidir. Hastalığın prevalansı olguların yaşı ve hastalık süresi ile ilişkilidir. Tip 1 DM'da 20 yılda %99, tip 2 DM'da ise 20 yılda %60 oranında değişik derecelerde retinopati saptanmıştır (2).

Diyabetik retinopatide saptanan biyokimyasal değişiklikler; artmış oksidatif stres, protein kinaz-C aktivasyonu, enzimatik olmayan glikolizasyon, polyol yolu ve artmış nitrik oksit olarak özetlenebilir (3,4).

Diyabetik Maküler Ödem (DMÖ), retinanın iç nükleer tabakasında hücre dışı sıvı ve lipid birikmesidir. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) ve Diabetic Retinopathy Study (DRS) çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre proliferatif diyabetik retinopatiye (PDR) bağlı ciddi görme keskinliği kaybı insidansı azalmasına rağmen diyabetik makülopati halen diyabetik hastalardaki ana görme keskinliği kaybı nedeni olmayı sürdürmektedir. Makülopati özellikle tip 2 DM'lu hastalardaki en sık görme keskinliği azalması nedenidir (3).

Diyabetik retinopatinin klasik tedavisi laser fotokoagülasyondur. Laser fotokoagülasyon tedavisi etkili bir tedavi yöntemi olsa da tedavi edilen gözlerin %12'sinde tedaviye rağmen orta derecede görme azalması görülmüştür. Bunun yanı sıra 12 ay sonunda tedavi edilen gözlerin %40'ında, 36 ay sonunda ise %25'inde DMÖ'nün sebat ettiği görülmüştür (5).

Laser fotokoagülasyon yapılan olgularda görme keskinliğinde azalma, koroid dekolmanı, makula ödemi, görme alanı kaybı, kornea-iris-lens yanıkları, göz içi basıncı yükselmesi, arka vitreus dekolmanı, foveanın laserlenmesi, retinal-subretinal-koroidal hemoraji, koroid neovaskülarizasyonu, sert eksuda birikimi, epiretinal ve subretinal fibrozis ve iskemik papillit gibi yan etkiler görülebilmektedir (6).

Kortikosteroidler, prostoglandin ve lökotrien oluşumunu sağlayan araşidonik asit yolunu inhibe ederek antienflamatuar etki göstermektedirler. Ayrıca vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üretimini de azaltmaktadır (6-8).

İntravitreal kortikosteroid enjeksiyonu ilk olarak 1979'da Machemer tarafından yapılmış ve bundan sonra deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (9). Bir kortikosteroid süspansiyonu olan triamsinolon asetonidin (TA) deneysel olarak retinal damarlar ve kan-retina bariyerini stabilize ettiği, kapiller geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir. TA'in subtenon uygulanmasının yetersiz penetrasyon nedeniyle kan-retina bariyerine karşı etkisiz olduğu gösterildiği için intravitreal enjeksiyon tercih edilmektedir (7,10). Yapılan çalışmalarda TA'in insan retina dokusuna toksik olmadığı gösterilmiştir (11-14).

İntravitreal triamsinolon asetonid (İVTA), PDR, proliferatif vitreoretinopati gibi intraoküler fibrovasküler proliferasyonlarda, üveitte, koroidal neovaskularizasyonlarda, hipotonide, retinal vasküler oklüzif hastalıklara bağlı maküla ödeminde, psödofovik kistoid maküla ödeminde, idiyomatik juxtafoveal telenjiektaziye bağlı maküla ödemi tedavisinde ve neovasküler glokomda kullanılmıştır. Diffüz DMÖ'nde de kullanılmış ve oldukça iyi sonuçlar bildirilmiştir (15-22).

VEGF muhtemel temel anjiogenik faktör olma özelliğinin yanısıra; VEGF' e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve hücreler arası pencere oluşumuna olanak sağlayarak vasküler geçirgenliği artırır (23-25).

VEGF'in normal retinada fonksiyonel bir rolü vardır. İn vivo olarak, insanlardaki non-proliferatif diyabetik retinopatide (NPDR) ve deneysel NPDR modelinde artmış VEGF-A salınımı tanımlanmaktadır. PDR'de oküler neovaskularizasyon muhtemelen, vitreusta bu faktörün iskemik retinadan kaynaklanan yüksek düzeylerine bağlı olarak meydana gelmektedir. PDR'li hastaların aköz humor ve vitreuslarında yükselmiş VEGF-A düzeyleri saptanmıştır (126).

TA ucuz, uzun dönem sonuçları bilinen güvenilir ve uygulaması basit bir ilaçtır. Bu çalışmada streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratlarda bir kortikosteroid analogu olan TA'in intravitreal uygulamasının retinada VEGF salınımı üzerine etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. RETİNANIN ANATOMİSİ

Retina histolojik olarak üç farklı bölgeye ayrılır: 1-Santral retina ,2-Perifer retina  
3-Ora serrata

#### 2.1.1. *Santral Retina (Makula)*

Makula temporal vasküler arklarla sınırlanan yaklaşık 5 mm'lik alan olup merkezi (fovea) optik disk merkezinin 4 mm temporalinde ve 0.8 mm aşağısındadır. Histolojik olarak 2 veya daha fazla ganglion hücre tabakası içerir. Çoğunlukla henle tabakasında yerleşen karotenoid (ksantin ve lutein ) pigmentler nedeniyle sarı renkli görüldüğü için 'makula lutea' ismi de verilmiştir.

Fovea, makula merkezinde 1.5 mm çapında (yaklaşık optik disk büyüklüğünde) ve iç yüzeyi iç retina katlarının incelmesine bağlı olarak konkav görülen makula santralinde iç retinal yüzeyde bulunan çukurluk olarak tanımlanır.

Foveola, foveanın merkezinde olup bazal lamina kalınlığı azalmıştır ve yalnızca uzamış ve farklılaşmış koniler, müller hücreleri ve diğer glial hücrelerden oluşur ( mm<sup>2</sup> de 38500 koni ). Yaklaşık olarak 0.35 mm çapındadır. Burası retinanın en ince olduğu foveadaki çukur alandır ( 0.13 mm ) ve maksimum görme keskinliğini sağlayan yerdir.

Foveal avasküler zon ( FAZ ) küçük, hafif konkav, retinal kapillerden yoksun ve konileri ihtiva eden yaklaşık 0.5-0.6 mm çaplı makulanın santralinde ki alandır. FAZ'ın boyutları 250 µ ile 600 µ veya daha fazla olarak değişir ve birçok durumda gerçek avasküler veya kapillerden yoksun zon belirlenemez (27).

Parafoveal retina, foveayı çevreleyen yaklaşık 0.5 mm genişliğindeki alandır. Perifovea, parafoveadan makulanın dış sınırına uzanan 1.5 mm genişliğindeki alandır. Ganglion hücreleri periferik retinadaki gibi tek sıralıdır.

#### 2.1.2. *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.

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. (28).

c) *Pars plana* : Uzak periferin ikinci kısmı pars plana bölgesi olup, uç perifer bölgesi olarak da tanımlanmaktadır. Pars plana, retinanın ora serratası ile siliyer cismin pars plikatası arasında bulunur.

### **2.1.3. Retinanın katları**

Retina, embriyolojik olarak optik çukurun iç ve dış katlarının farklılaşmasından oluşan ince ve transparan dokudur. Dış katmanı oluşturan retina pigment epiteli (RPE), iç katmanda bulunan nörosensoryel retinaya oranla daha basit bir yapıya sahiptir. Bütün hücreler ve onların uzantılarının yönü orta ve dış tabakalarda RPE'ye dik, iç tabakalarda ise retina yüzeyine paraleldir. Foveada dış katmanlar yüzeye paralellik gösterirler (Henle katmanı).

Histolojik kesitlerde görülen retina katmanları dıştan içe doğru şu şekilde sıralanabilir:

#### **1-Bruch membranı**

Bruch membranı yaklaşık 7 µ kalınlıktadır ve koriokapillaris RPE'den ayırır. Dış katı koriokapillarisin bazal membranıdır ve ince bir kat kollajenden yapılmıştır. Merkezde bir kat elastik doku lifleri bulunur. Bunun etrafında ise iç ve dışta birer kat olacak şekilde kollajen lifler bulunur.

#### **2-Retina Pigment Epiteli**

Retina pigment epiteli (RPE), bruch membranına yapışık, küboid yapıda melanin pigmenti içeren tek sıra 4-6 milyon hekzagonal hücrelerden oluşur ve optik diskten ora serrataya uzanıp siliyer cismin pigment epiteli ile devamlılık gösterir. A vitamini metabolizması, dış kan-retina bariyerinin oluşturulması, fotoreseptörlerin dış segmentlerinin fagositozu, ışığın emilimi, sıcaklık değişiminin ayarlanması, bazal laminanın oluşturulması, dış segmenti çevreleyen mukopolisakkarit matriksin üretimi, hücre içine girip çıkacak olan materyallerin aktif geçişinin sağlanması gibi görevleri vardır.

RPE hücreleri bağlantı kompleksleri adı verilen “zonula occludens” ve “zonula adherence”ler ile birbirlerine sıkı şekilde yapışmışlardır. Bağlantı kompleksleri yapısal durağanlığın yanısıra dış kan-retina bariyerinin devamlılığında da önemli rol oynarlar ve ışığın koroide geçmesini engellerler. Ayrıca suyun ve iyonların serbest geçişini engellediklerinden sıvının subretinal alana pompalanması için metabolik enerji kullanırlar.

### 3- Fotoreseptörler katı (koni ve basillerin iç ve dış segmentleri)

Gözün kırıcı ortamı tarafından yönlendirilen görüntüyü nöral sinyallere çevirerek görme olayını başlatan özelleşmiş hücrelerdir. Basiller karanlıkta, koniler aydınlıkta işlev yaparlar. Foveada hiç basil bulunmazken koniler en yüksek konsantrasyona sahiptir.

Koniler ışıktaki renk ayırımı, aydınlıkta görme ve keskin görmeden sorumludur. Basiller alacakaranlıkta ve karanlıkta görmeden sorumludurlar. Foveolada sadece koniler vardır.

### 4-Dış limitan membran

Koni ve basillerin dış ve iç segmentlerinin arasından geçer. Gerçek bir zar değildir, fotoreseptörlerin iç segmentleriyle müller hücrelerinin dış uzantılarının aralarındaki bağdan oluşmuştur.

### 5- Dış nükleer tabaka

Fotoreseptörlerin çekirdek ve sitoplazmalarının bulunduğu bölgedir.

### 6- Dış pleksiform tabaka

Fotoreseptörlerin sinaptik gövdeleri ile horizontal ve bipolar hücrelerin birleştiği yerdir. Normal retinada kalınlığı 2 µm olmasına karşılık, fovea çukurluğunun kenarında kalınlığı 50 µm’yi bulur. Foveada konilerin önünü serbest bırakmak için kenarlara çekilerek henle katını oluşturlar.

### 7- İç nükleer tabaka

Bipolar, müller, horizontal ve amakrin hücrelerinin nükleuslarını içerir. İkinci nöron bipolar hücreleri, bağlantı hücreleri, amakrin ve yatay hücreler ile destek hücreleri müller hücrelerinin çekirdeklerinin bulunduğu bölgedir.

### 8- Orta limitan membran

Fotoreseptör hücrelerinin sinaptik gövdelerindeki desmozom benzeri yapışıklıkların oluşturduğu zona verilen isimdir. Gerçek membran değildir. Retinal kan damarları genelde OLM’yi aşmazlar.

#### 9- İç pleksiform tabaka

Bipolar ve amakrin hücrelerinin aksonları ile gangliyon hücrelerinin dendritleri ve sinaps bölgelerini içerir. Gangliyon hücre tabakası, retinanın iç yüzeyine oldukça yakın olan gangliyon hücrelerinin gövdelerini içerir. Sinir lifi tabakası, gangliyon hücrelerinin aksonları ile oluşur.

#### 10-Gangliyon hücre katı

Üçüncü nöron, gangliyon hücreleri katıdır. İç pleksiform katı gibi, foveolada bulunmaz.

#### 11-Sinir lifi tabakası (gangliyon hücre katının aksonları)

Korpus genikulatum lateralede sonlanan 1.2 milyon dolayındaki gangliyon hücresi aksonları, sinir lifleri katını oluşturmaktadır.

#### 12- İç limitan membran

Retinanın en iç katıdır. Gerçek membrandır. Retinayı vitreustan ayırır. Müller hücrelerinin ayaklı çıkıntıları ve bazal laminaya yapışması ile oluşur. Vitreus yüzeyinde iç limitan membran (İLM) pürüzsüz iken retinal tarafta Müller hücrelerinin yüzeyine uygun dalgalanmalar gösterir.

#### **2.1.4. Retinanın damarları ve sinirleri**

Retinada lenfatik damar ve sinir yoktur. Retinanın arter ve venleri sinir lifleri katındadırlar. Retina kan damarları vücudun diğer organlarındaki damarlar gibi elastik lamina ve devamlılık gösteren düz kas dokusu içermezler. Retina kan damarları orta limitan membran düzeyinden daha içeriye girmezler. Arter ve venlerin çaprazlaştığı yerde ortak bazal membrana sahiptirler.

Retina damarları ikinci ve üçüncü nöronların bulunduğu nöroserebral katın beslenmesinde rol oynarlar. Retinanın 1. nöronunun bulunduğu nöroepitel katı damarsızdır ve koroidin koriyokapillarisinden beslenir. Retina nöroserebral katı santral retinal arterden ve var ise siliyoretinal arterden beslenir.

Venler ekvatorun üzerinden arterlerle birlikte seyrederek ve papillada toplanarak retina santral venini oluştururlar. Arter ve venler sık sık çaprazlaşırlar. Santral retinal ven oftalmik vene daha sonra da kavernoöz sinusa dökülür. Arter çapının ven çapına oranı 2/3'tür.

Retina arteriyelleri ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Koriyokapillerlerin duvarlarında geniş pencereleşme bulunmasına ve geçirgen olmalarına karşılık retina kapillerlerinin duvarları sızdırmazdır.

## **2.2. KOROID**

Koroid hemen hemen tümüyle damarlardan oluşmuştur. Klasik olarak dış tabaka (Haller tabakası), koroidal stroma (Sattler tabakası) ve iç tabaka (Koriokapillaris) olmak üzere üç tabakadan oluşmuştur.

Koroidin venöz drenajı vorteks venleri vasıtasıyla olur. Koriokapillaris 700-800 nm çapında pencereci bir endotel yapısına sahiptir.

## **2.3. KAN-RETİNA BARIYERİ**

Fizyolojik kan-retina bariyeri tek sıra endotel hücreleri ve bunların arasında bulunan sıkı bağlantılardan oluşur ve floresan gibi küçük elementlere karşı geçirgen değildir. Endotelin dış kısmını bazal lamina oluşturur. Bazal membran içinde, kendi bazal membranlarıyla çevrelenmiş devamlılık göstermeyen endotel veya mural hücreler bulunmaktadır. Müller hücreleri ve diğer glial elemanlar retinal kan damarlarının bazal laminalarına tutunurlar.

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

2-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.

## **2.4. DİYABETİK RETİNOPATİ PATOGENEZİ**

Diyabetik retinopatinin patogenezinin temelinde yatan olay mikroanjiopatidir. Öncelikli olarak arterioller, kapiller ve venüllerde tutulum görülür ancak hastalık ilerledikçe daha büyük damarlarda da tutulum olabilir. Retinopati tablosunda hem mikrovasküler tıkanıklığa hem de mikrovasküler sızıntıya ait bulgular gözlenir. Mikrovasküler tıkanıklıkta; kapiller endotelial bazal membran kalınlaşması, kapiller endotel ve perisit hücre hasarı ile endotelial proliferasyon, azalmış oksijen transportu, trombosit yapışkanlığı ve kümelenmesinde artış gibi süreçler sorumludur (36).

Diyabet hastalığında DR gelişiminde rolü olduğu bilinen bazı metabolik yollar mevcuttur. Bu yollar artmış oksidatif stres, protein kinaz-C aktivasyonu, enzimatik olmayan glikolizasyon, polyol yolu ve artmış nitrik oksit seviyesidir (29,30).

a-Polyol yolu: Bu yol aracılığıyla artmış glukoz metabolizmasının, ilk olarak diyabetik katarakt gelişimine neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu yolun aynı zamanda periferik nöropati ve DR'ye sebep olduğu ileri sürülmüştür. Hipoteze göre artmış glukoz metabolizması, sorbitol birikimine, myoinositolun azalmasına ve/veya sodyom-potasyum ATPase enzim aktivitesinin azalmasına, sonuç olarak da damarlarda fonksiyon bozukluğuna yol açtığı düşünülmektedir. Aldoz redüktaz polyol yolundaki anahtar enzimdir. Aldoz redüktaz adlı enzim hücre içinde biriken yüksek konsantrasyondaki glikoz moleküllerini alkol moleküllerine çevirir (sorbitol, galaktitol). Bu moleküller osmotik etki ile hücrede su toplanmasına ve hücre hasarına neden olurlar. DM'de retinal perisitler ve Schwann hücrelerinde aldoz redüktazın yüksek konsantrasyonlarda olduğunun gösterilmesi DR ve nöropati gelişiminde aldoz redüktaza bağlı hasarın sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (31).

b-Nonenzimatik glikozilasyon: Bu görüşe göre şeker molekülleri reaktif moleküllere kovalent şekilde bağlanıp proteinlerin, nükleik asitlerin ve makrofaj gibi hücrelerin fonksiyonlarında değişikliğe neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar 2-3 aylık diyabetik kontrolün göstergesi olan glikohemoglobin (hemoglobin A1C) testinin temelini oluşturur (31).

c-Oksidatif stres: Azalmış oksijen transportu sonucu gelişen hipoksi de kapiller endotelial hasar yaratan diğer bir faktördür. Yeterli kontrol edilemeyen diabetiklerde glikolize hemoglobin miktarı artmakta ve eritrosit 2-3-difosfogliserik asit seviyesi azalmaktadır. Bu iki faktör hemoglobinin oksijene bağlanma isteğini arttırmaktadır. Bunun dışında eritrositlerin mikrovizkosite özelliğinin artması, deforme olabilme özelliklerinin azalması hipoksiyi destekleyen diğer faktörlerdir (31).

d-Protein kinaz-C aktivasyonu: Protein kinaz-C, sitoplazma proteinlerinin kalıntılarında serin veya treonine fosfat ekleyen bir moleküldür. Diyabetik farelerde yapılan deneylerde VEGF ve damarsal geçirgenlik faktörüne (VPF) cevap olarak PKC-β2'nin aktive olduğu gözlemlenmiştir. Bu enzim aynı zamanda VEGF ve histaminin sinyal transdüksiyon zincirindeki diğer proteinlerinin de foforilasyonunu sağlayarak, retinal kan akımında değişikliğe ve kan-retina bariyerinde yıkıma neden olmaktadır. Protein kinaz-C-β2'nin oral ajanlarla inhibisyonunun, deneysel diyabetiklerde retinal ve renal vasküler disfonksiyonda azalma sağladığı gösterilmiş olup şu anda Faz III klinik çalışma aşamasındadır (29, 31).

Kapillerleri çevreleyen ve damar duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan perisit hücrelerinin hiperglisemi durumunda fonksiyonları bozulur. Damar duvar bütünlüğünün

bozulması ve kapiller dilatasyon mikroanevrizma oluşumuna neden olur. Hiperglisemi bazal membran kalınlaşmasını, endotelial hücre proliferasyonunu yani yeni damar oluşumunu kolaylaştırır (36).

Mikrovasküler tıkanma sonucu oluşan retinal hipoksi ve iskemi sonucu yeterli beslenemeyen retina, beslenemeyen bölgeleri kanlandırabilmek için normalde mevcut olmayan arteriol-venül arası şant damarları (kollateraller, intraretinal mikrovasküler anomaliler) ve yeni damarlar (neovaskülarizasyon) oluşturur. Neovaskülarizasyonun başlaması ile proliferatif evreye geçilmiş olur (36).

DM, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasının bozulmasına, retinada damar hasarlanmasına ve iç kan retina bariyerinin bozulmasına yol açar. Bunun sonucunda iskemi gelişir ve vasküler geçirgenlik artar. DR temel olarak retina metabolizması ve vasküler destek arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkar. kan içeriği retinaya yönelerek retinal ödem, sert eksuda, yüzeysel ve/veya intraretinal hemoraji şeklinde bulgular oluştur. Kandaki seröz sıvı ve eksuda ismi verilen lipit transudaları makulada birikebilir ve optik sinir şişebilir. Kapiller tıkanma sonucu hipoksi ve iskemi gelişmekte ve bunun sonucu olarakta proliferatif dönemde görülen neovaskülarizasyon, vitreus içi ve/veya preretinal hemoraji, vitreusta opak membran oluşumu, retinada yaygın fibrozis ve neovasküler glomokom fibrovasküler traksiyonel bantlar ve bunların getirdiği retina dekolmanları görülmektedir (4).

#### **2.4.1. Başlangıç Diyabetik Retinopatide Patogenez**

Multifokal elektoretinogram testleri ile diyabetik hastalarda damarsal lezyonlardan önce ERG'de bölgesel depresyonların görülebildiği gösterilmiştir. Bu testler iç retinal katmanlardaki fonksiyon bozukluğunu göstermektedir. Deneysel çalışmalar, diyabetik farelerde tipik damarsal lezyonlardan uzun zaman önce artmış nöral hasarın mevcudiyetini göstermiştir (32). Hızlanmış hücre ölümleri, gangliyon ve iç pleksiform tabakada hücre kaybıyla ve retinada incelmeye sonuçlanmaktadır. Diyabetik farelerde, osilatuar potansiyel ve optik sinirin akson kalınlığındaki azalma değişen glutamat metabolizmasıyla ilgili olabilir (33-35). Görmenin azalması için retinanın gangliyon hücrelerinde %50'lik kayıp gerekir (36). DM ve iskemi nedeniyle biriken fazla miktardaki glutamat, nöronlar için toksiktir ve nöronların ölümüne neden olur (34).

Perifoveal kapillerde gecikmiş lökosit migrasyonu, kan-retina bariyerinde geçirgenlik artışı, diyabetik olmayan kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında artmış retinal kan akımı gibi vasküler değişiklikler tip I diyabetiklerde ilk 5 yıl içinde görülebilmektedir. Yapılan

çalışmalarda diyabetik sıçanlarda tanıdan 1 veya 3 ay içinde artmış kan-retina bariyeri geçirgenliği ve retinal kan akımındaki değişikliklerin başladığı gsterilmiştir. Bu sonuçlar vasküler lezyonlardan önce, vasküler otoreğülasyon mekanizmasının bozulduğunu gstermektedir (37,38).

Diyabetik hastalarda perisit hücrelerindeki dejenerasyon ve fonksiyon kaybı sonucu damar duvarında zayıflıklar oluşur ve buralardan mikroanevrizmalar gelişir (39-41). Kapiller duvarda endotel proliferasyonu olur ve bazal membran kalınlaşır. Kapiller lümende eritrositler kümeleşir ve trombüs ile lumen tıkanır. Bu tıkanıklık neticesinde kapillerlerde dilatasyon ve kan akım artışı gelişir. Kan-retina bariyeri yıkımı ile dilate kapillerlerden yoğun biçimde mukopolisakkarid ve lipoproteinaz materyel damar dışına çıkar. Kan-retina bariyeri yıkımı çoğunlukla endotel hücreleri arasındaki bağlantıların yıkımı sonucu olur (39, 42-44). Fakat endotel sitopazmasındaki fenestrasyonlar veya veziküllerdeki aktif transporttaki artış da kaçak gelişiminde etkili olabilir. Ödem başlangıçta dış plexiform ve iç nükleer tabakada lokalizedir. Daha sonra iç plexiform ve sinir lifleri tabakasına lokalize olur (45-46).

#### **2.4.2. Nonproliferatif Diyabetik Retinopatide Patogenez**

Hipergliseminin DR gelişimi ve ilerlemesi için ana risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Retina, glukozun hücre içine taşınması için insüline gerek duyulmayan az sayıdaki bir kaç dokudan biridir. İnsülin yerine, glukozun retina hücrelerine girmesini glucose-transporter-1 (Glut-1) molekülü kolaylaştırmaktadır. Hiperglisemi, sorbitol yolağı, protein kinaz-C aktivasyonu, serbest radikal formasyonu (oksidatif stress) ve NADH eksilmesi yoluyla hücre içinde yüksek glukoz düzeylerine yol açar. NADH eksikliği hücre içinde bir “yalancı hipoksi” durumuna yol açmaktadır (4).

Hipergliseminin bir diğer etkisi ise, proteinlerin non-enzimatik glikasyonu sonucunda ileri glikolizasyon son ürünlerinin oluşumudur. Diyabetik retinada ileri glikolizasyon son ürünlerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu ürünler artmış oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açarlar. Başlangıç DR'nin erken dönemlerinde dejenere oldukları bilinen perisitler, ileri glikolizasyon son ürün reseptörleri salınımını arttırırlar. Bu nedenle ileri glikolizasyon son ürünlerinin olumsuz ve zararlı etkilerine karşı daha duyarlı olabilirler (4).

Hipergliseminin tüm bu etkileri retinada muhtemelen birlikte etki göstererek retinal hücrelerin kademeli bir şekilde yavaş yavaş kaybına neden olmaktadır. DM'nin retinada artmış apoptozisi uyardığı yönünde giderek artan miktarda kanıtlar mevcuttur.

İnsan diyabetik retinalarında perisitler, apoptozis ile ilişkili bir protein olan Bax'ın artmış düzeylerini sergilemektedir (47).

Apoptotik perisitler endotel hücreleri ile kapiller basal membranı arasında sıkışıp kaldıkları için replase edilememekte ve bu nedenle de perisitlerin ölümü direkt bir şekilde perisit kitlesine bir azalma ile sonuçlanmaktadır. Aksine, retinal endotel hücreleri artmış proliferasyon ile yenilenebilmektedir. Diyabetes mellitusun üzerinden uzun yıllar geçtikten sonra, endotel hücreleri replikatif yaşlılık dönemine ulaşırlar. Bu durum kapillerlerde hücre kaybına ve retinada iskemik alanlara yol açmaktadır. Bu iskemik alanlar klinik olarak, NPDR içinde yer alırlar. Mikrovasküler yaşam süresini arttıran faktörlerin salgısında azalma da, iç retinanın apoptosise daha duyarlı hale gelmesinde etkili olan bir diğer mekanizma olabilir (47).

Nonproliferatif diyabetik retinopati, oftalmoskopik olarak mikroanevrizmalar, intraretinal hemoraji ve vazodilatasyon gibi vasküler lezyonların görülmesiyle değerlendirilir ve derecelendirilir. İncelme retinal iskemiden ve/veya noniskemik nöroretinal dejenerasyondan (apoptozis) kaynaklanabilir. Bu bulgu parasantral skotomları açıklayabilir ve epiretinal membranlar ve makula ödemiyle karışabilir (36).

Kapiller tıkanıklık ilerleyici NPDR'nin karakteristik elementi olabilir. Histopatolojik çalışmalar DR'de glial hücrelerin damar duvarına doğru göç ederek lümeni tıkadığını ortaya koymaktadır (23).

Histopatolojik olarak bazal membran kalınlaşır. Perisitler diyabetin etkilerine karşı fazlaca duyarlıdır ve endotel hücrelerinden daha hızlı kaybedilir. Perisitlerin ve endotel hücrelerinin ölümünün apoptosiz ile gerçekleştiği aşık olmasına rağmen, perisitlerin özellikle DM'a duyarlı olup olmadığı kesin değildir. "Cotton-wool spot"lar sinir tabakasının fokal infarktı olarak bilinsede kötü diyabetik regülasyona sahip hastalardaki zayıf aksonal transporttan kaynaklanabilirler (36).

#### ***2.4.3. Proliferatif Diyabetik Retinopatide Patogenez***

Proliferatif diyabetik retinopati, şiddetli NPDR'de görülen kapiller tıkanıklık ve retinadaki hipoksiyi düzeltmek için ortaya çıktığı düşünülen optik diskin, retinanın ve/veya irisin neovaskülarizasyonudur. Yeni damarlar retina düzlemine dik şekilde vitreus korteksine doğru, tipik olarak perfüzyon ve nonperfüzyon sınırındaki venüllerden oluşurlar. Normal retina damarları glial hücrelerle çevriliyken; neovaskülarizasyon damarları endoteller arası sıkı bağlantılarındaki yetersizlik sonucu fundus flöresein anjiografi'de sızıntıya neden



olan reaktif glial hücrelerle çevrilidirler. PDR, yara iyileşmesinde olduğu gibi önce anjiyogenez ile başlar. Sonra fibröz dokunun yer aldığı yaranın yeniden şekillenmesi ortaya çıkar ve sonuç olarak vasküler doku kollajen dokusu ile yer değiştirir. Tedavi edilmemiş PDR fibrozis ve neovaskülarizasyon üzerinde traksiyonla sonuçlanır. Kontraksiyon sonucunda preretinal hemoraji, intravitreal hemoraji, traksiyonel retinal dekolmanı gelişebilir (23,48).

Neovaskülarizasyonu uyaran hücresel olaylar; retinal hipoksi, endotel hücre proliferasyonunu stimüle eden faktörler ve vitreus kontraksiyonu olarak sıralanabilir. Retinal neovaskülarizasyon'nin oluşumuna neden olan faktörler; büyüme hormonu, “insülin benzeri büyüme faktörü 1” , “temel fibroblast büyüme faktörü” ve VEGF/vasküler geçirgenlik faktörü olarak sayılabilir. neovaskülarizasyon gelişen gözlerin vitreusunda VEGF düzeylerinde artış görülürken, panretinal laser fotokoagülasyon sonrası bu faktörler azalır. Vitreusta kollajen çapraz bağlarının nonenzimatik glikolizasyon nedeniyle oluşması vitreus kontraksiyonunun mekanizmasını oluşturabilir (23,48).

#### **2.4.4. Diyabetik Makular Ödem Patogenezi**

Fovea merkezinden bir disk çapı mesafeye kadar olan alanda diffüz ya da fokal sıvı birikimidir. DMÖ gelişmesinde etki eden patofizyolojik olaylar sırasıyla şu şekilde özetlenebilir; 1- Perisit kaybı, 2- Mikroanevrizma oluşumu, 3- Bazal membran kalınlaşması, 4- Kapiller yatakta kapanma, 5- Kan-retina bariyer yıkımı, 6- Vasküler geçirgenlik artışı.

Artmış intraoküler hidrostatik basınç, sıvının damar duvarını geçmesine neden olur (Starling kanunu) (34).

Erken safhadaki DMÖ'de iç kan-retina bariyerindeki bozulma, dış kan-retina bariyerindeki bozulmadan daha baskın şekilde ortaya çıkmaktadır. Dış kan retina bariyeri kronik DMÖ'de hasar görmektedir. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (tight junctions) içeren proteinler deneysel olarak oluşturulmuş erken diyabetiklerde azalmıştır. Bu durum artmış damar geçirgenliğine katkı sağlayabilir (49).

Tablo 1: Diyabetik retinopatide evrelere göre oluşan değişiklikler

<b>A-Nonproliferatif Evre</b>
1. Perisit hücresi değişimleri → mikroanevrizmalar 2. Bazal membran kalınlaşması → geçirgenlik artışı 3. Arteriyoler hyalinozis → arteriyol lümeninde daralma 4. Venüler dilatasyon ve tortüozite değişimleri 5. Retina komplikasyonları → sert eksudalar, mikrohemoraji 6. Maküla değişimleri → maküla ödemi, iskemik makülopati
<b>B-Preproliferatif Evre</b>
1. Vasküler değişimler → kapiller tıkanma 2. Retina komplikasyonları → yumuşak eksudalar 3. İntraretinal mikrovasküler anormallikler (İRMA)
<b>C-Proliferatif Evre</b>
1. Vasküler değişimler → neovaskülarizasyon 2. Hemorajiler → preretinal, intravitreal 3. Retina dekolmanı (traksiyona bağlı)

## 2.5. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

Yeni damar yapımı (anjiojenez, neovaskülarizasyon) vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi; embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiojenez ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoit artrit vb.), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda mevcuttur (50).

Anjiojenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı vasküler endotelyal büyüme faktörüdür. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak ta bilinir. VEGF ilk kez 1983'te izole edilerek, vasküler geçirgenlik faktörü olarak tanımlanmıştır. 46 kDa homodimer bir glikoproteindir. Retinal endotel hücrelerinde, diğer endotel hücrelerine göre daha yüksek sayıda VEGF reseptörü vardır. VEGF vasküler endotel hücrelerindeki özgül reseptörlere bağlanarak vasküler geçirgenliği artırır. Sinyal proteinler fosforilasyona uğrar, PKC-  $\beta$  aktivasyonu olur. VEGF, damar geçirgenliğini arttırdığı gibi aynı zamanda anjioenezisi de uyarır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya da aminoasit sayılarına göre VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> ve VEGF<sub>145</sub> gibi isoformları bulunmaktadır. VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir.

Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır.

Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan “hypoxia-inducible transcription factor-1” de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır. Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiojenik faktör olma özelliği yanında; VEGF’ e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve hücreler arası bağlantı oluşumuna olanak sağlayarak vasküler geçirgenliği artırır (23-25).

## **2.6. DİYABETİK RETİNOPATİ VE VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ**

Vasküler endotelial büyüme faktörü, primer olarak damarlanması olmayan retina hücreleri, gangliyon hücreleri, müller hücreleri ve astrositler tarafından üretilir (51). Astrositler fetal damarsal yapının gelişiminde önemli rol üstlenirler ve yeni damar oluşumuna etki edebilirler . Astrositler tarafından üretilen VEGF'in bu süreçte yer alan önemli bir sitokin olduğu düşünülmektedir. Astrositler aynı zamanda kan-retina bariyerinin oluşumu ve damarların bariyer özellik kazanması için sinyal görevi görürler ve retinanın endotel hücrelerinde sıkı bağlantıların oluşmasını uyarırlar (52).

İn vitro koşullarda VEGF, serum açlığı (yokluğu) ile tetiklenen apoptozisi önlemektedir. VEGF, önceden gelişmiş damarlardan çok yeni oluşmakta olan damarların endotel hücreleri için daha önemlidir. Endotelin perisitler tarafından kaplanması, VEGF bağımlılığının kaybı ile sonuçlanan anahtar olay olduğu öne sürülmüştür.

İnsan DR'sinde VEGFR-2 varlığı sızıntı yapan retinal damarların varlığı ile korelasyon gösterir. Bu durum, 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 homeostatisde kritik bir faktör olan ama aynı zamanda DR gelişiminde ve ilerlemesinde de rol oynayan angiotensin-II ile direkt bir şekilde arttırılmaktadır. İleri 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 parçalanması hem engellenebilmiş hem de tersine çevrilebilmiştir (53).

Neovaskülarizasyonun gerçekleşmesinden önce vasküler geçirgenlik artışının görüldüğü ve bunun, neovaskülarizasyon için gerekli bir aşama olduğu sanılmaktadır.

### ***2.6.1. Non-proliferatif Diyabetik Retinopati ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü***

Vasküler endotelial büyüme faktörünün normal retinada fonksiyonel bir rolü vardır. VEGF-A'nın retinadaki patolojik durumlarda salınımı artar. Artmış VEGF-A NPDR'de bir geçirgenlik faktörü (endotel hücre göçü, endotel proliferasyonunu tetikler ) olarak etki eder. İskemik retinalarda hipoksinin uyardığı VEGFR-1'in sayı ve duyarlılığının artışı, VEGF-A'nın etkisini artırır.

Glukoz tarafından aktive edilen endotelial protein kinaz C- $\beta$ , VEGF-A'nın proliferatif ve geçirgenlik ile ilgili etkilerinden sorumlu olan sinyalleme kaskadının ana parçasıdır. İnsanlardaki NPDR'de ve deneysel hayvan modellerinde 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 (54).

Diyabetik retinopatide meydana gelen ve fundus floresin anjiyografilerinde koyu şekilde görülen iskemik alanlarda VEGF-A'nın lokal olarak artış gösterdiği bulunmuştur. Maymun gözlerinde tekrarlanan VEGF-A enjeksiyonları yaygın kapiller non-perfüzyona yol açmaktadır (55).

Vasküler endotelial büyüme faktörü-A ile uyarılmış retinopatide retinal kapillerlerin endotel hücreleri kontrol gözleri ile karşılaştırıldığında hipertroftiktir ve kapiller lümeninde ciddi düzeyde bir daralmaya yol açmaktadır. Aynı modelin daha geç dönemlerinde yapılan gözlemler, retinanın daha yüzeysel tabakalarında bozulmuş ve yeniden modellenmiş damarlarda endotelial hücre hiperplazisini göstermiştir. Bu durum, kapiller perfüzyonun olmamasının nedeninin endotelial değişikliklerin olduğunu desteklemektedir (56).

### **2.6.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü**

Proliferatif diyabetik retinopatide oküler neovaskularizasyon muhtemelen, vitreusta bu faktörün iskemik retinadan kaynaklanan yüksek düzeylerine bağlı olarak meydana gelmektedir. 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 (57).

Kalınlaşmış ve sert bir bazal membranı olan retinal bir kapillerde (uzun süren DM'de olduğu gibi), lokal VEGF-A üretimi ile indüklenmiş endotel hücre hiperplazisinin progresif lüminal daralmaya ve kapiller beslenme bozukluğuna yol açacağı düşünülmektedir. Bu durum iskemiye ve sonuçta VEGF-A salınımını arttırdıkça DR'de kısır bir döngü oluşabilir.

### **2.6.3. Diyabetik Makuler Ödem ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü**

Diyabetik makula ödemli olgularda VEGF düzeyleri yükselmiştir (58). VEGF ile uyarılmış kan-retina bariyeri parçalanmasının altında yatan mekanizmalar kompleks gibi görünmektedir. VEGF lökosit-aracılı endotel hasarı (59), pencere formasyonu, sıkı bağlantıların çözülmesi (60), hücreler arası kitlesel akım, gibi çeşitli mekanizmalarla sızıntılı damarlar oluşturabilmektedir. Bu mekanizmalar tek başlarına yada birlikte etki ederek kan-retina bariyerinin parçalanmasına neden olabilirler.

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün inhibe edilmesiyle yada geri çekilmesiyle kan-retina bariyeri yeniden yapılanabilmektedir. Kan-retina bariyerinin parçalanması için gerekli olan VEGF maruziyetinin miktarı ve süresi, yine artmış bir vasküler geçirgenlik gerektiren başka bir süreç olan neovaskularizasyon için gerekli olan temas süresinden ve miktarından daha az olabilir (55).

## **2.7. DİYABETİK RETİNOPATİNİN TEDAVİSİ**

Hastalığın süresi uzadıkça komplikasyon riski artmakta ve eşlik eden sistemik faktörler ilerlemesini hızlandırmaktadır. Bu nedenle öncelikle sistemik durumun düzenlenmesi gerekmektedir. Uzun süre devam eden hiperglisemi ile damar endoteli hasarı gelişmekte ve böbrek hastalığı, sistemik hipertansiyon, gebelik ve hiperlipidemi gibi metabolik faktörler ile hızlanmaktadır. DR'nin tedavi yönetiminde öncelikle kan şekerinin düzenlenmesi ve risk faktörlerinin kontrol altına alınması vardır. Amerikan DM Grubu, HbA1c'nin % 7'nin altında, açlık kan glikoz düzeyinin de 110 mg/dl'nin altında olmasını

önermektedir. Normal değer %3-6 arasındadır. Diyabetli hastalarda önerilen, kan basıncı düzeyi 130/85 mmHg'nin altıdır.

Kan lipid düzeyleri de tedavinin bir parçası konumundadır. ETDRS çalışmasında total kolesterol seviyesi 240 mg/dl'nin üzerinde olan hastalarda, sert eksuda görülme olasılığı 200 mg/dl 'nin altında total kolesterol düzeyi olan hastalara göre 2 kat daha fazladır (61).

Laser fotokoagülasyon, DR tedavisinde klasik tedavi yöntemidir. DRS çalışması, panretinal laser fotokoagülasyonun PDR'li gözlerde 5 yıl içerisindeki ağır görme kaybı görülme sıklığını % 50 oranında azalttığını bildirmiştir (62).

Laser fotokoagülasyonun görmede bulanıklık, koroid dekolmanı, makula ödemi, aksoplazmik akımın engellenmesi, baş ağrısı gibi geçici yan etkileri mevcuttur. Fakat akomodasyon kaybı veya azalması, soluk görme, gece görme güçlüğü, renkli görme kaybı, fotofobi, görme alanı kaybı gibi ciddi olabilecek kalıcı yan etkileri de mevcuttur.

Ayrıca laser tedavisi komplikasyonları arasında kornea, iris ve lenste yanık oluşumu; göz içi basıncı yükselmesi; arka vitreus dekolmanı; foveanın laserlenmesi; retinal, subretinal ve koroidal hemoraj; bruch membran yırtığı ve koroid neovaskülarizasyonu; sert eksüda birikimi; yanıkların genişlemesi; epiretinal ve subretinal fibrozis; iskemik papillit; sayılabilir.

DR'nin medikal tedavisinde antioksidanlar (E vitamini, C vitamini), aldoz redüktaz inhibitörleri ( Sorbinil, Ponalrestat ), ileri glikolizasyon son ürün inhibitörleri ( Aminoguanidin , Pimagedin ), kortikosteroidler (triamsinolon asetonid) çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır.

Medikal tedavi ve laser fotokoagülasyon tedavisinin etkisiz veya yetersiz kaldığı ileri olgularda (proliferatif vitreus retinopati, vitreus hemorajisi, görmeyi tehdit eden traksiyonlar, epiretinal membran oluşumu vb.) vitreoretinal cerrahi yöntemlere başvurulur.

Protein kinaz-C inhibitörleri (ruboksitaurin (LY333531), PKC412 ), VEGF inhibitörleri (bevacizumab , pegaptanib sodyum , ranibizumab , anecortave asetonid) ve intravitreal kortikosteroid implantları (flusinolon asetonid, deksametazon) DR tedavisinde araştırılan yeni tedavi seçenekleridir. Medikal tedavideki gelişmeler ile DR'ye bağlı komplikasyonlar önlenilecek ve daha ileri tedavi yöntemleri olan laser fotokoagülasyon ve vitreoretinal cerrahiye gereksinim azalacaktır.

## 2.8. KORTİKOSTEROİDLER

Kortikosteroidler 1930 'lu yıllarda vücut sıvıları ve dokularda elde edilmiştir. Klinik olarak tedavi amaçlı kullanımında ilk yararlı sonuçlar 1949 'da romatoid artritli hastalarda görülmüş ve bundan sonra diğer birçok hastalıkta kullanılmaya başlanmıştır (61). Kortikosteroidlerin göz hastalıklarında ilk kullanımı 1950 yılında olmuştur. Diğer antiinflamatuvar ilaçlarla yapılan tedaviye dirençli inflamatuvar göz hastalıklarında kortikosteroidler ile tedaviye dramatik cevaplar elde edilmiştir (63).

Kortikosteroidler kortizol, kortizon ve kortikosteron gibi adrenal glandda yapılan doğal kortikosteroidler ve bunların kimyasal halka yapısında yapılan modifikasyonla elde edilen prednison, prednisolon, deksametazon, betametazon, triamsinolon, florometalon gibi sentetik kortikosteroidler olarak iki gruba ayrılabilirler. Kimyasal halka yapısının değiştirilerek sentetik kortikosteroidlerin elde edilmesindeki amaç, antiinflamatuvar etkinliklerinin artırılması, istenmeyen yan etkilerin azaltılması ve bunun yanında değişik hastalıklarda fayda sağlayabilecek çeşitli farmakokinetik tercihleri kazandırmaktır (63).

Oftalmolojide kortikosteroidler uzun süredir sızdıran vasküler yapılardan damar dışına kaçışın engellenmesi ve inflamasyonun baskılanması amacıyla kullanılmıştır. Kortikosteroidlerin göz hastalıklarında ihtiyaca göre topikal, subkonjonktival, subtenon, intravitreal enjeksiyon, oral ve parenteral uygulanma yolları vardır. Topikal uygulamada solüsyon, süspansiyon ve merhem formları vardır. Kortikosteroidlerin fosfat ve hidroklorid şeklinde preparasyonları nispeten hidrofilitiktir ve suda çözünürlüğü fazladır, bununla birlikte asetat ve alkol formları daha hidrofobik ve yağda çözünürlüğü fazladır (63).

Yüksek doz kortikosteroidlerin sistemik yan etkilerinden korunmak için intravitreal kortikosteroid uygulamaları gündeme gelmiştir. İntravitreal kortikosteroid enjeksiyonu ilk olarak 1979 yılında Machemer ve ark. tarafından tavşanlarda yapılan bir çalışmada intraoküler proliferasyonların tedavisinde kullanılmıştır (9). Ancak suda çözünen kortizonun 24 saat içinde intraoküler dokulardan kaybolduğu görüldüğü için uzun etkili kortikosteroidlerin kullanımı gündeme gelmiştir (9).

Kortikosteroidlerin antiproliferatif, antiödematöz, antiinflamatuvar ve anjiyostatik etkileri hayvan deneylerinde ispatlanmış ardından oküler inflamasyon ve neovaskularizasyonda kullanılmaya başlanmıştır (64). Kortikosteroid bilinen anti-anjiyogenik, anti-ödematöz, antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkilerine bağlı olarak da makula ödeminin değişik formlarında etkili bulunmuştur (65-67).

Kortikosteroidlerin etki mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamakla beraber kan retina bariyerini stabilize eder, intraokuler inflamasyonu azaltır ve konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskılar (65). Kortikosteroidlerin VEGF geninin salınımını inhibe ettikleri de gösterilmiştir. İnsan aortik vasküler düz kas hücreleri kültüründe yapılan bir çalışmada kortikosteroidlerin, VEGF geninin platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ile uyarılmış salınımını baskıladıkları gösterilmiştir. Kortikosteroidlerin ayrıca, pro-enflamatuar mediatörler tarafından gerçekleştirilen VEGF uyarımı doza ve süreye bağımlı bir şekilde azalttıkları da gösterilmiştir (68,69).

Hiroshi ve ark. yaptıkları bir çalışmada streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş 6 adet ratın sağ gözlerine intravitreal 10 µl, 40 µg deksametazon uygulamışlar. Kontrol grubu olarak yine streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş başka 6 adet ratın sağ gözü kullanılmıştır. Deksametazon tedavisi alan grupta almayan gruba göre hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), mRNA ve protein seviyelerinde anlamlı derecede azalma saptanmıştır. Tedavi verilen grupta deksametazon diyabetik retinada lökosit göçünü engelleyerek diyabetik retinal ödemini azaltmıştır. Diğer çalışmalarda lökositler VEGF üretimi ile ilişkili bulunmuştur ki lökositlerin damar endoteline yapışması endotel hücreleri arası sıkı bağlantıların bozulmasına ve bu da kan retina bariyerinin yıkılmasına ve vasküler geçirgenliğin artışına sebep olmaktadır. (7,70-73).

TA tıpkı 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 (74).

Geçmiş dönemde yapışmış olan çalışmalar İVTA uygulamasının inflamasyonun azaltılmasında, vasküler geçirgenliğin azaltılmasında, neovasküler ve fibrovasküler proliferasyonun inhibe edilmesinde, ve kısa dönemde makular kalınlığın azaltılmasında, faydalı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Gözün sadece % 0.01'lik bir hacmi olduğu düşünüldüğünde intraokuler hastalıkların oral yerine intravitreal yolla tedavisi daha mantıklı görünmektedir (9,26,75-81).

Triamsinolon asetonid enjeksiyonları intravitreal olarak 4-25 mg dozlarında uygulanmaktadır. İVTA DMÖ'nde tek başına veya laserle birlikte uygulanabilmektedir. İnvitreal kullanıldığında maksimum bioyararlanım elde edilebilmektedir. Klinik anlamlı makula ödemi, diffüz makula ödeminde İVTA uygulamasının altı aya kadar varan takiplerde görme keskinliğinde ve ödemde azalma saptanmıştır. İVTA'nın ödem mevcudiyetinde makula



kalınlığında azalma saptadığı optik kohorens tomografi bulgularıyla da desteklenmiştir (82-84).

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 (85)

Mc Cuen ve ark.'da yaptıkları deneysel çalışmada 21 tavşan gözüne 1mg İVTA enjekte etmişler İVTA, uygulanan gözler, intravitreal salin solüsyonu uygulanan kontrol grubu gözlerle karşılaştırılmış ve biyomikroskopik, elektoretinografik, ışık ve elektron mikroskopik incelemede TA 'ya ait herhangi bir retinal toksisite olmadığını göstermişlerdir (11). Yapılan diğer çalışmalarda da IVTA uygulamasına ait retinal toksisite bildirilmemiştir (13, 14, 86, 87). Ancak bu tedavi yöntemi ile ilgili bazı komplikasyonlar da söz konusudur. En sık bildirilen komplikasyonlar göziçi basınç yüksekliği ve kataraktır. Bir çalışmada olguların yarıya yakınında (%43.5) göziçi basıncı yükselmesi görülmüştür (88).

## **2.9. DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMASI**

Streptozosin pankreas  $\beta$  hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı hem de insülininden bağımsız DM'a neden olmaktadır. N- (Methylnitrosocarbamoyl)- $\alpha$ -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'a, yeni doğmuş sıçanlara tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg streptozosin uygulamasının ise insülininden bağımsız DMe neden olduğu bildirilmiştir (89).

### **2.9.1. Ratlarda streptozosinle DM 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 (89).

### ***2.9.2. 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 (8).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

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 6-8 haftalık 250 ±25 gr ağırlığında 20 adet Vistar cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 4 haftalık adaptasyon süresinden sonra her bir kafese ( 28x28x16 cm ebadında polycarbon kafes ) 5'er erkek 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 (90-91).

Tüm ratlara streptozosin verildikten 15 gün sonra intravitreal enjeksiyon uygulandı. İşlem öncesi ksilazin HCL(4mg/kg) ve ketamin HCL (10 mg/kg )'nin 1:1 oranındaki karışımı ile anestezi uygulandı. Ratların sağ gözlerine TA ( Kenakort-A 40 mg/ml ampül, Bristol-Myers Squibb), sol gözlerine ise dengeli tuz solüsyonu (BSS, Alcon Labs, Inc., Forth Worth, TX) intravitreal olarak uygulandı. Sol gözler kontrol grubunu oluşturdu (Resim 1, 2).

Hayvanların konforu için gözlerine işlem öncesi topikal anestetik madde (Proparacaine hydrochloride of 0.5% (Alcon Labs, Inc., Forth Worth, TX)) ve profilaktik olarak topikal antibiyotik (Ciloxan %0.3 5 ml göz damlası, siprofloksasin, Alcon) damlatıldı. Enjeksiyon işlemi 2.5 kat büyütme ameliyat gözlüğü kullanılarak yapıldı. Hamilton mikro-enjektörü ( 30 gauge) ile enjeksiyon yapılmadan önce 30 gauge iğne ucu ile temporal limbustan 0.5 mm arkaya skleraya insizyon yapıldı ve intravitreal enjeksiyonlar Hamilton mikro-enjektörü ile bu insizyon yerinden uygulandı. İnsan vitreus hacmi 4 ml , rat vitreus hacmi ise 56 µl (0,056ml)dir (93). Ratların sağ gözlerine TA 40 mg/ml orijinal konsantrasyonun yaklaşık 5 katı olacak şekilde 0.32 mg/0,008 ml konsantrasyonda 8 µl hacimde enjekte edildi (Resim 1,2). Beş kat yüksek dozun uygulanma sebebi ratlarda bu ilacın farmakinetiğinin tam olarak bilinmemesidir. Enjeksiyon sonrası beyaz renkli TA süspanسیونunun vitreusları doldurduğu görüldü (92). Ratların sol gözlerine ise 8 µl BSS enjekte edildi (95).

İşlem sonrası gözlere topikal antibiyotik (Ciloxan %0.3 5 ml göz damlası, siprofloksasin, Alcon) damlatıldı. Enjeksiyona bağlı lens hasarı ve retina dekolmanı olan ratlar çalışmadan çıkarıldı.

Ratlar birinci ayda ketamin anestezisi altında sakrifiye edildi ve gözleri enükle edildi. Rat retinaları VEGF salınımları yönünden immunhistokimyasal yöntemle analiz edildi.

#### *a-Doku Hazırlanması ve patolojik inceleme*

Enükleasyon yapılan gözler 4% formaldehit ve 0.1 M fosfat tamponadı (pH 7.4) içeren endorflara 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.

İmunhistokimyasal 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 immunhistokimyasal boyası uygulandı. VEGF antikoları ile boyanan rat gözlerinden alınmış kesitlerin ele alınan her bir tabakası (1=koroid, 2=retina pigment epiteli, 3=dış segment, 4=iç segment,5=dış nükleer tabaka, 6=dış pleksiform tabaka, 7=iç nükleer tabaka, 8=iç pleksiform tabaka, 9=ganglion hücre tabakası, 10=sinir lifi tabakası ), boyanma derecesine göre dört ayrı şekilde ( 1=boyanma yok, 2=zayıf, 3=orta, 3=kuvvetli) puanlandı (Resim 3,4)

#### *İmunhistokimyasal 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 bulan 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-Biyotine bağlayıcı sekonder antikor eklendi ve 10 dakika bekletildi.

13-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.

14-Kesitlere Strepdovidin 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 hematoksilen 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.

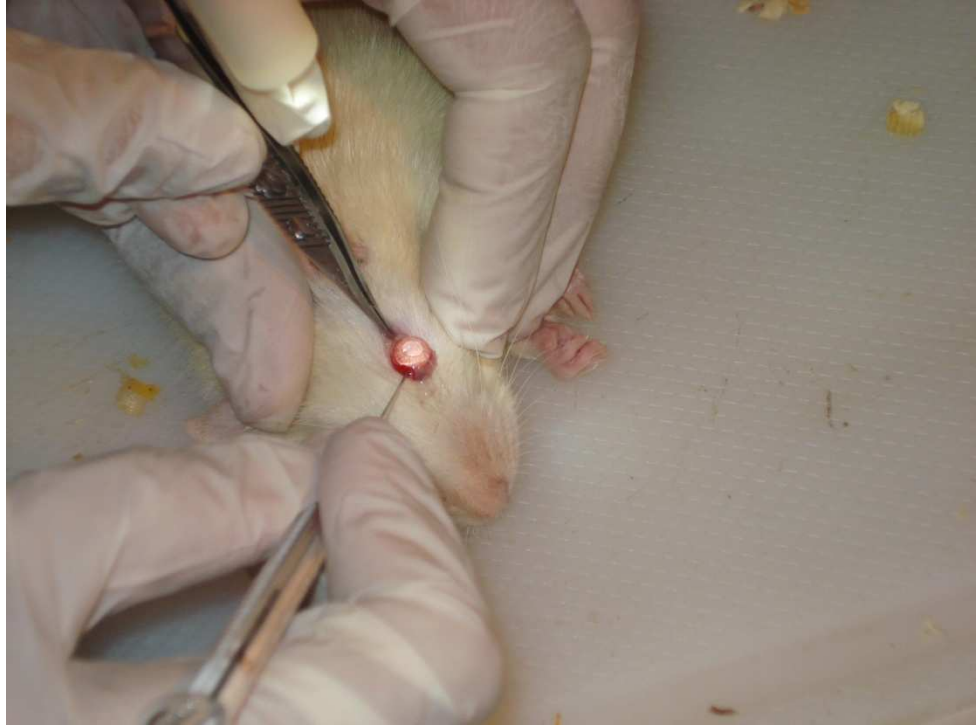
Pozitif kontrol için önceden pozitifliği bilinen dokular kullanıldı. Boyanma aşamasında sonra kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında 4, 10, 20 ve 40'luk büyütmelemlerde incelendi. Tüm immunhistokimyasal boyalar; A=boyanma yok(0), B= +1 boyanma, C= +2 boyanma, D= +3 boyanma olacak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

### **İstatistiksel Analiz**

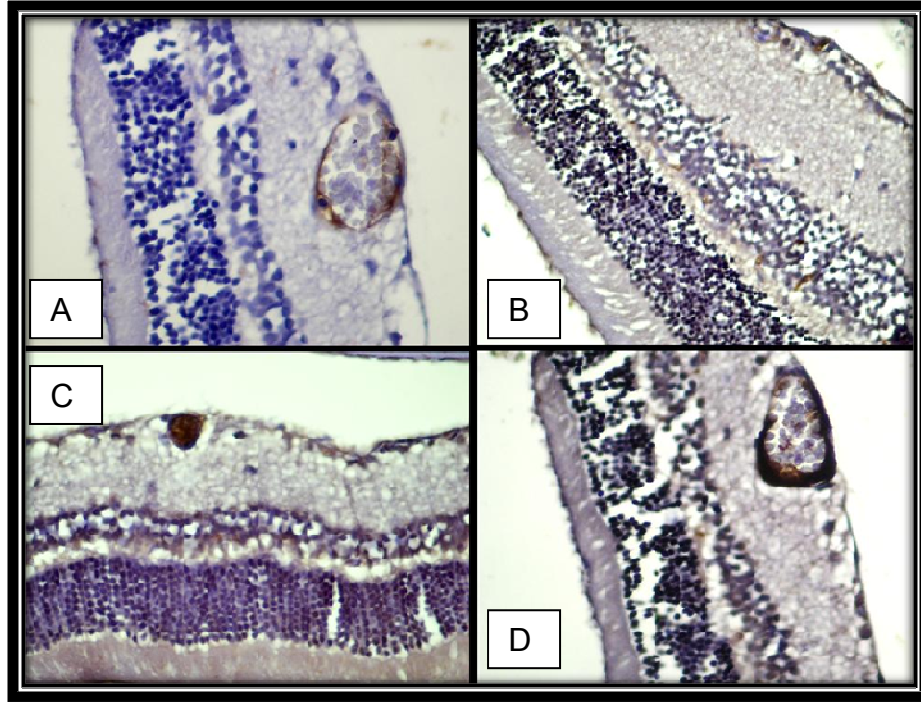
İstatistiksel analizde Mann-Whitney U-testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz için SPSS 10.0 istatistik programı kullanıldı.



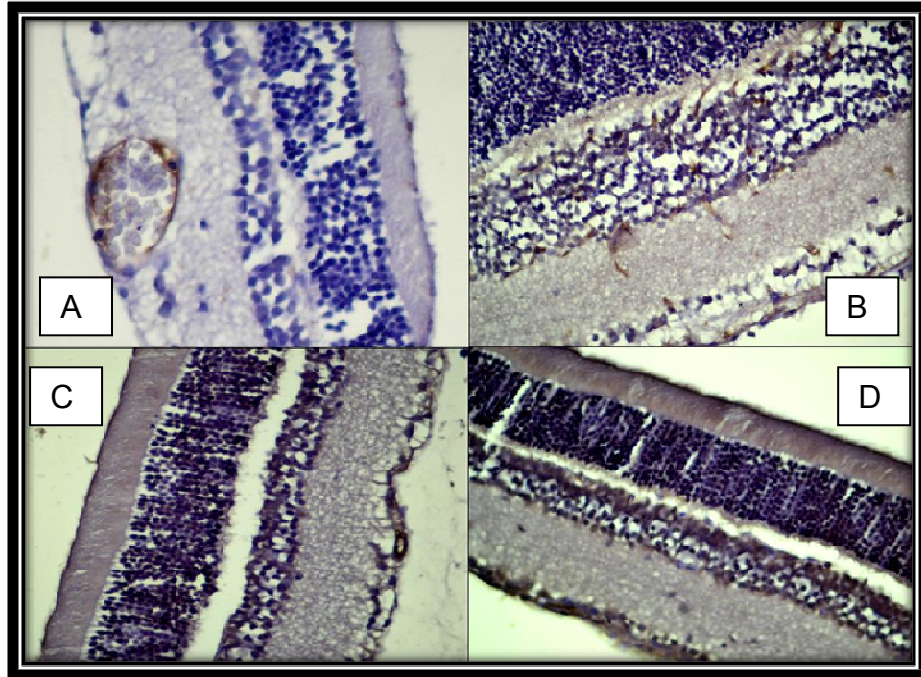
Resim 1: Anestezi için hazırlanan bir rat.



Resim 2: Sağ gözüne intravitreal enjeksiyon yapılan bir rat.



Resim 3: VEGF antikoru ile immünohistokimyasal yöntemle boyanan rat retinalarında boyanma dereceleri (A=boyanma yok(0), B= +1 boyanma, C= +2 boyanma, D= +3 boyanma)



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

#### 4. BULGULAR

Birinci ayın sonunda çalışmaya başlanan 20 adet rat sayısı 8'e düştü. 12 adet rat optimum koşullarda korunmalarına rağmen streptozosin ile oluşturulmuş olunan diyabete bağlı nedenler ile exitus oldu. Çalışma sonunda diyabetik hale getirilen ratlardan 8 adet rat değerlendirmeye alındı. TA uygulanan gözlerden 3 tanesi retina dekolmanı gelişmiş olması sebebiyle çalışmadan çıkarıldı.

Tablo 2'de VEGF antikoru ile boyanan incelenmeye alınmış rat retina tabakalarında VEGF salınım düzeylerinin ortalamaları görülmektedir. Şekil 1'de ise triamsinolon ve BSS verilen rat retina tabakalarındaki VEGF boyanma dereceleri karşılaştırmalı olarak izlenmektedir. Resim 5'te İVTA uygulanmış rat retinası ile kontrol retinaya ait preparat örneklerinin karşılaştırılması görülmektedir.

İVTA uygulanan ratların koroid, RPE ve sinir lifleri tabakalarında ortalama VEGF boyanma derecesi 0.0 saptanırken kontrol gözlerinde 0.125 bulundu ( $p>0.05$ ).

İVTA uygulanan ratların dış segment, dış nükleer ve iç pleksiform tabakalarında ortalama VEGF boyanma derecesi 0.0 saptanırken kontrol gözlerinde 0.25 bulundu ( $p>0.05$ ).

İVTA uygulanan ratların iç segment tabakasında ortalama VEGF boyanma derecesi 0.0 saptanırken kontrol gözlerinde 0.50 bulundu ( $p>0.05$ ).

İVTA uygulanan ratların dış pleksiform tabakasında ortalama VEGF boyanma derecesi 0.80 saptanırken kontrol gözlerinde 1.25 bulundu ( $p>0.05$ ).

İVTA uygulanan ratların iç nükleer tabakasında ortalama VEGF boyanma derecesi 0.40 saptanırken kontrol gözlerinde 0.625 bulundu ( $p>0.05$ ).

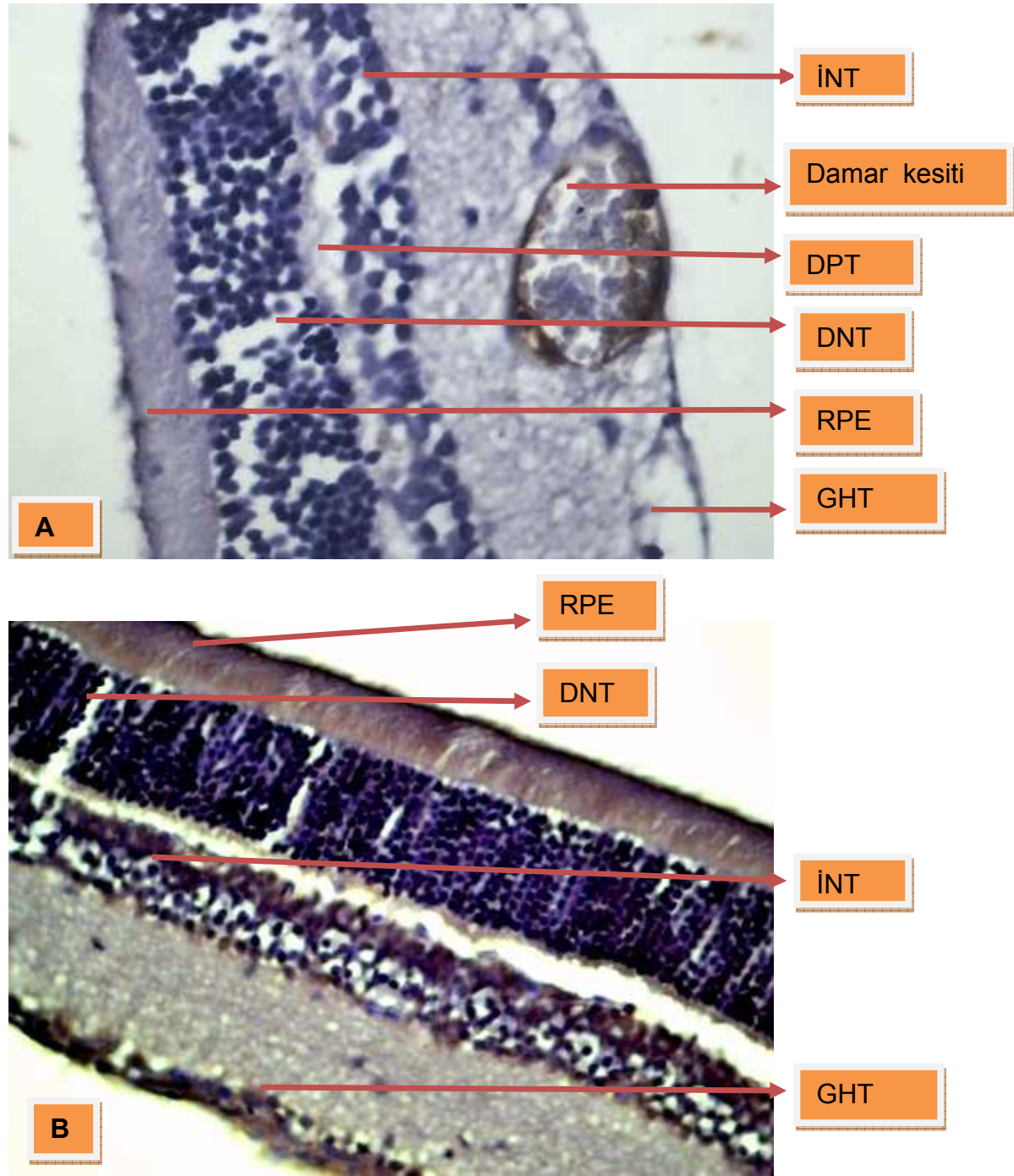
İVTA uygulanan ratların gangliyon hücreleri tabakasında ortalama VEGF boyanma derecesi 0.80 saptanırken kontrol gözlerinde 1.375 bulundu ( $p>0.05$ ).

TA verilen gözlerin retina tabakalarında kontrol grubuna göre VEGF boyanma derecelerinde yaklaşık olarak yarıya yakın azalma görüldü. Ayrıca TA verilen gözlerin retinalarının koroid, RPE, dış segment, iç segment, dış nükleer, iç pleksiform ve sinir lifleri tabakalarında VEGF açısından boyanma skoru sıfır saptandı. BSS verilen kontrol gözlerde ise bu tabakaların tümünde pozitif boyanma görülmektedir (tablo 2). Ancak İVTA verilen gözlerin retina tabakaları ile kontrol gözlerin retina tabakaları arasında VEGF salınımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p\geq 0.005$ ).

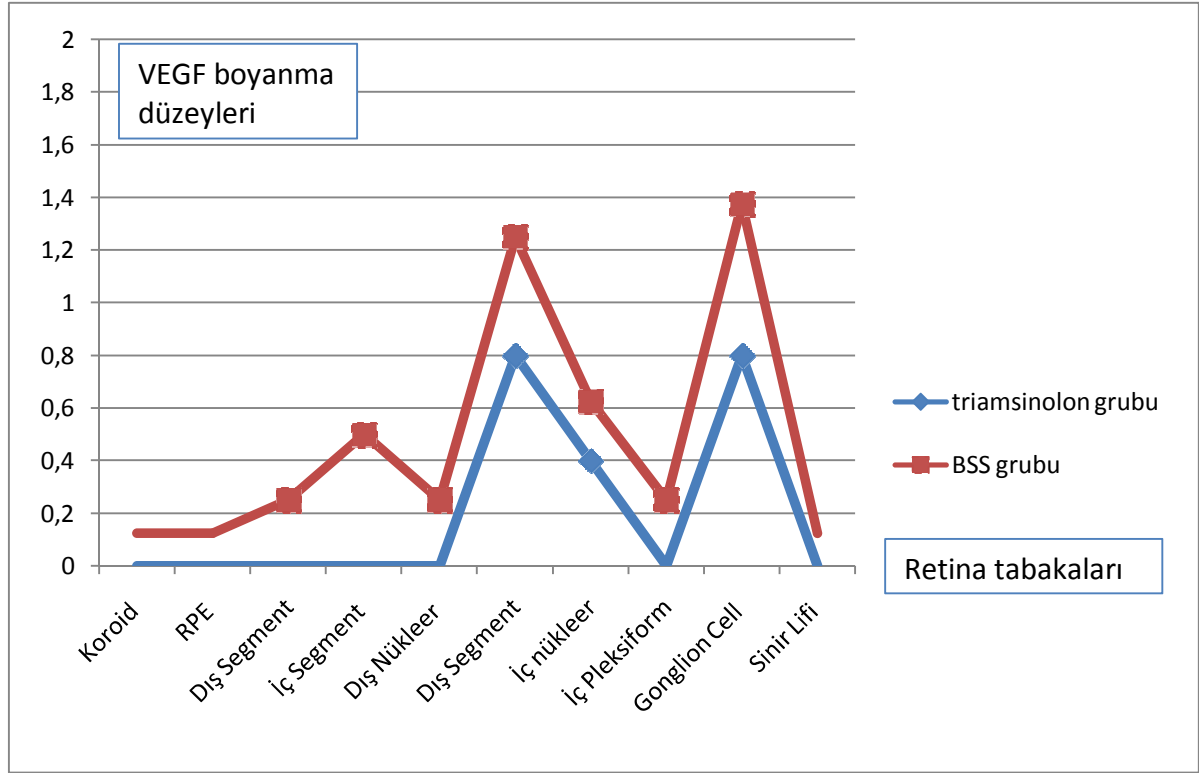


**Tablo 2:** Rat retina tabakalarında ortalama VEGF boyanma dereceleri.

<b>İncelenen Tabaka</b>	<b>VEGF</b>		<i>p</i>
	<b>Triamsinolon n=5</b>	<b>BSS n=8</b>	
<b>Koroid</b>	0.00	0.125	0.429
<b>Retina pigment epiteli</b>	0.00	0.125	0.429
<b>Dış Segment</b>	0.00	0.25	0.243
<b>İç Segment</b>	0.00	0.50	0.137
<b>Dış Nükleer</b>	0.00	0.25	0.429
<b>Dış Pleksiform</b>	0.80	1.25	0.112
<b>İç nükleer</b>	0.40	0.625	0.801
<b>İç Pleksiform</b>	0.00	0.25	0.243
<b>Gangliyon hücreleri</b>	0.80	1.375	0.124
<b>Sinir Lifi</b>	0.00	0.125	0.429



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



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

## 5. TARTIŞMA

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

DR ciddi bir komplikasyondur ve körlüğün önemli bir sebebidir. Hastalığın moleküler ve hücresel düzeydeki tanımlayıcı unsuru vasküler geçirgenlikte artış olmasıdır. DR'nin klasik tedavisi retinal fotokoagülasyondur. Panretinal fotokoagülasyon tedavisi daha fazla retinal neovaskularizasyon oluşmasını önler. Laser tedavisi daha çok retinada morfolojik ve fonksiyonel bozuklukların geliştiği DR'nin ileri safhalarında kullanılmaktadır. Ayrıca yararlı etkilerinin yanında yan etkileri de mevcuttur. Bunlarda bazıları retina, kornea, iris ve lenste termal hasar oluşumu, görme keskinliğinde azalma, kontrast hassasiyet ile gece görmeye 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, iskemik papillit olarak sayılabilir (96,97).

Son yıllarda özellikle iskemik olaylara sekonder gelişen makular ödem ve neovaskularizasyonlarda , 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 (98).

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. DM gibi metabolik yönden değişken seyir gösteren hastalarda sistemik yan etkilerin daha fazla görülmesi olasıdır (12).

İVTA 'nın proliferatif vitreoretinopati, retinal neovaskularizasyon, 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 telenjektazi tedavisinde kullanıldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (15,21,65,77,78,99,100).

İVTA tek başına veya laser fotokoagülasyon tedavisi ile birlikte diffüz DMÖ'nin tedavisinde kullanılmaktadır (15,101,102). Jonas ve ark. diffüz DMÖ 'sü olan 20 olgunun 26 gözüne 25 mg İVTA uygulamışlar ve bu olguları, maküler grid lazer fotokoagülasyon geçiren 16 olgu ile karşılaştırmışlardır. Maküler grid lazer fotokoagülasyon geçiren kontrol grubunun görme keskinliklerinde anlamlı değişiklik olmazken İVTA uygulanan olguların ortalama görme keskinliklerinde 6, 10. hafta ile 5, 6. ayda anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir . Çalışmada olguların İVTA uygulaması sonrası FFA 'da saptanan flöreseinin sızıntısının enjeksiyon öncesine göre anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (82).

Berkant K. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada PDR ve DMÖ olan olguların bir gözlerine laser fotokoagülasyon öncesi İVTA uygulamışlar. İVTA uygulanan grupta görme keskinliğinde artma, kontrol gözlerde ise azalma saptamışlar. İVTA'nın ek tedavi olarak uygulanmasını önermişlerdir (87).

Martidis ve ark. tarafından yapılan prospektif bir çalışmada klinik anlamlı makula ödemi olan ve en az 2'şer kez laser fotokoagülasyon uygulanıp cevap alınamamış 16 göze 4mg/0.1ml TA enjeksiyonu yapılmış ve retina kalınlığında belirgin azalma, 6 aylık takipte 1.3 snellen sırası görme artışı izlenmiştir. Laser tedavisine cevapsız makula ödeminde İVTA'nın iyi bir tedavi seçeneği olabileceği belirtilmiştir (87).

Laser fotokoagülasyon ve 4mg. tek enjeksiyon İVTA grubu ile kontrol grubuna laser fotokoagülasyondan iki hafta sonra grid makula laseri (laser grubu) uygulanarak karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada dokuz aylık takipte İVTA grubunda görme keskinliği ve makula ödemindeki düzelmenin daha anlamlı olduğu görülmüştür. Sonuç olarak İVTA-laser fotokoagülasyon kombinasyonu ile proliferatif DR ve klinik anlamlı makula ödemi olan hastalarda sonuçların olumlu olduğu, ancak ileri araştırmaların gerektiği bildirilmiştir (80,87).

Lam ve ark.nın DMÖ 'lü 17 olgunun 18 gözüne 4 mg İVTA uyguladıkları çalışmada, olguların enjeksiyon öncesi "Optikal Kohorens Tomografi" ile ortalama santral maküler kalınlıkları 552 mikrometre olarak saptanmış, olguların ortalama santral maküler kalınlıklarındaki en fazla azalma 3. ayda görülmüş ve ortalama 326 mikrometre olarak bildirilmiştir. Üçüncü aydan sonra ortalama santral maküler kalınlık artmaya başlamış ve 6. ayda 427 mikrometre olarak bildirilmiştir (61). Ciardella ve ark.nın 22 olgunun 30 gözü

üzerinde yaptığı benzer bir çalışmada da enjeksiyon öncesi ortalama santral maküler kalınlık 476 mikrometre iken enjeksiyon sonrası 1. ayda 277 mikrometre, 3. ayda 255 mikrometre olarak saptanmış, altıncı ayda ise artma eğilimine girerek 331 mikrometre olduğu bildirilmiştir (103).

İVTA uygulamalarında etkinin geçici olması ve nükslerin ortaya çıkması TA'nın vitreustan elimine olmasıyla ilişkilendirilmektedir. TA'nın vitreustan elimine olmasıyla ilişkili olarak Schindler ve ark.nın 0.5 mg, Scholes ve ark.nın 0.4 mg TA'yı vitrektomi yapılmayan tavşan gözlerine enjekte ederek yaptıkları çalışmalarda vitreusta TA kristallerinin saptanma süresi sırasıyla ortalama 41 ve 23.3 gün olarak bildirilmiştir (104,105).

Kortikosteroidlerin DMÖ tedavisindeki faydası bildirilmesine rağmen etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Kortikosteroidler araziidonik asit metabolizmasını inhibe ederek prostoglandin oluşumunu azaltmakta ayrıca VEGF üretimini de inhibe etmektedirler. DMÖ patogenezinde kabul edilen görüş kan-retina bariyerinin bozulmasıyla vasküler geçirgenliğin artmasıdır. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda da kan-retina bariyeri bozukluğunun İVTA uygulanımı ile anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu etkiyi sağlamada prostoglandinlerin ve VEGF'in rolü olduğu düşünülmektedir (6,10).

İdeal olan hastalığın çok erken dönemlerinde retina değişikliklerine neden olan mekanizmalarla ilişkiye girerek bu nedenleri ortadan kaldıran tedavilerin bulunmasıdır. Bu amaçla DM'te meydana gelen metabolik ve hematolojik bozuklukları düzenlemeye yönelik tıbbi tedavilerin retinopati üzerindeki etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur (106).

Bu güne kadar yapılmış çalışmaların DR'de tıbbi tedavi ile ilgili olan yönlerinin tamamına yakını klinik verilerle desteklenilerek oluşturulmuştur. Moleküler düzeyde sonuç veren çalışmalar yok denecek kadar azdır.

VEGF, DR'de önemli bir faktördür. Diyabetin retinal mikrovasküler komplikasyonlarında temel rol oynayan faktör anjiojenik ve vasküler geçirgenlik faktörü olan VEGF adlı moleküldür. Ayrıca retinal iskemi ile giden retinal neovaskülarizasyon durumlarında önemli bir role sahiptir. Hayvan modellerinde VEGF salınımının neovaskülarizasyon gelişimiyle korele olduğu gösterilmiştir (107,108). Alınan vitreus örneklerinde PDR'li gözlerde NPDR'li gözlerle oranla VEGF konsantrasyonunun daha yüksek olduğu da bildirilmiştir (107,109). VEGF'nün geniş konsantrasyonları kan-retina bariyerinin yıkılmasından ve DR'de fibrovasküler proliferasyondan sorumlu gözükmektedir. Bu sebeplerden dolayı VEGF DR'nin tedavisinde önemli bir hedef halindedir. Patolojik

düzydeki damarlanmayı dolayısıyla direkt olarak VEGF'i ve reseptörlerini inhibe edecek ajanlara ihtiyaç vardır. (107-117).

İntravitreal steroidler vazoaktif endotelial büyüme faktörü inhibisyonu, antiinflamatuvar etki ve endotel hücrelerinin sıkı bağlantılarını iyileştirme yoluyla ve prostoglandinlerin üretildiği araşidonik asit yolunu inhibe ederek makula ödemi üzerine olumlu etkilerini göstermektedirler. Bu ajanlar iskemiye karşı gelişen inflamatuvar cevabı azaltmasının yanı sıra, kalsiyum kanal blokajı yoluyla da ödemin çözülmesine yardımcı olur (115, 116).

Steroidlerin retinadaki VEGF salınımına etki mekanizması hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bir kortikosteroid olan TA uzun yıllardan beri hayvan deney modellerinde anti- anjiyogenik ajan olarak kullanılmaktadır. İlk olarak Tano ve ark. Tarafından tavşanda ototransplante edilen fibroblastlarca oluşturulan retinal neovaskülarizasyonu ve fibrozisi azalttığı belirtilmiştir. Bu daha sonra başka araştırmacılar tarafından da onaylanmıştır (9, 80, 100,117-119).

Markus ve ark. yaptıkları bir çalışmada VEGF'in vasküler geçirgenlik ve ödem yapıcı etkileri olduğu belirtilmiş ve hidrokortizon, kortizon ve deksametazonun kültür ortamında üretilen insan aortik vasküler düz kas hücrelerinde VEGF salınımını baskıladığı gösterilmiştir (68).

Fisher ve arkadaşları DR patogeneğinde vasküler geçirgenlik artışı ve yeni damarsal oluşumlardan sorumlu olan VEGF'in metabolik yollarını inhibe edecek olan deksametazonun rolünü araştırmışlardır. Hipoksi ile uyarılmış mikrovasküler VEGF salınımını ve vasküler geçirgenliği deksametazonun azalttığını belirtmişlerdir (120).

Penfold ve ark. yaptığı bir çalışmada bilateral yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan bir hastaya yaptıkları İVTA uygulamasının hastada görme keskinliği artışı sağladığını belirtmişlerdir. Hastanın ölüm sonrası gözlerinde yapılan immunhistokimyasal çalışma TA'nun, MHC-II tarafından uyarılan koroidal neovaskülarizasyonu ve vasküler geçirgenliği inhibe ettiği görülmüştür (121). Penfold ve ark. yaptığı bir başka çalışmada TA'in hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerinin baskılanmasına (ICAM-1) ve vasküler geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca epitel kültüründe hücreler arası geçirgenliği azalttığı ve RPE hücreleri arası bariyer fonksiyonunu güçlendirdiği ve subretinal sıvıyı azalttığı belirtilmektedir (122).

Streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratlarda diyabetin retinal etkileri araştırılmıştır.

Hans-Peter ve ark. tarafından beş adet diyabetik, altı adet diyabetik olmayan ratlar üzerinde VEGF salınımının derecelendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Ratlar streptozosin ile diyabetik hale getirilmiştir. Çalışma altı ay sonunda bitirilmiş, diyabetik ratların retinalarında VEGF-mRNA düzeylerinde artış görülmüştür. Diyabetik olmayan ratlarda VEGF immünreaksiyonun çok zayıf olduğu belirtilmiştir. VEGF salınımının özellikle retinanın gangliyon hücreleri, iç ve dış nükleer tabakalarında yoğun olduğu görülmüştür (54).

Pierce ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada 5 adet yeni doğan rat retinasında hipoksi ile neovaskularizasyon oluşturulmuştur. 10 adet retina dokusu nothern blot yöntemi ve konfokal mikroskopi ile VEGF ve VEGF-mRNA salınımları yönünden incelenmiştir. VEGF ve VEGF-mRNA salınımlarının neovaskularizasyon gelişimiyle korele olduğu gösterilmiştir. İç nükleer tabakada VEGF salınımını yüksek saptamışlar ve bunun müller hücrelerine bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Çok az miktardaki ganglion hücrelerinin VEGF salgılayabileceğini belirtmişlerdir (107).

Brooks ve arkadaşları 33 diyabetik hastanın 42 diyabetik retinopatili gözünde yaptıkları bir çalışmada olgulara intravitreal TA uygulamışlar. İşlem öncesi gözlerden vitreus örnekleri alınmış. Enjeksiyondan bir ay sonra ikinci kez ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi için vitreus örnekleri alınmış. Enjeksiyon öncesi ve bir ay sonrası alınan vitreus örneklerinde stromal kökenli faktör-1 (SDF-1, stromal derived faktör-1) ve VEGF salınım düzeylerine ELİSA yöntemiyle bakılmış. Olgularda altı ay sonunda makula ödeminde gerileme, görme keskinliklerinde artış saptanmış. Vitreus örneklerinde ise İVTA öncesi değerleri yüksek olan SDF-1 ve VEGF düzeylerinde anlamlı azalma saptanmıştır (26).

Steroidlerin VEGF salınımı üzerine etkisinin olmadığını belirten çalışmalar da vardır. İnsanlardaki hemanjiom dokusuna enjekte edilen steroidin hemanjiom dokusundaki VEGF salınımına etkisiz olduğu gösterilmiştir (124). Hua ve ark. tarafından 16 adet normal rata İVTA uygulaması yapılmıştır. Ratlar üç hafta sonra sakrifiye edilmiş ve retinaları VEGF salınımı açısından incelenmiştir. Değerlendirme nothern blot yöntemiyle VEGF mRNA düzeyleri ölçülerek yapılmıştır. Retina pigment epiteli tabakasında, iç nükleer tabaka ve bazı gangliyon hücrelerinde VEGF-mRNA sinyalleri saptanmış. TA uygulanan grup ile BSS uygulanan grup arasında VEGF salınımı açısından anlamlı fark saptanmamış. TA'in normal yetişkin ratlarda VEGF salınımına etkisiz olduğu belirtilmiştir. TA anormal RPE veya



hastalığı mevcut olan retinada patolojik VEGF düzeyine etkili olabilir. Deneysel çalışmalardaki farklılık çalışma protokollerinin in vivo ve invitro koşullarda yapılmış olmasına ve steroidlerin farklı mekanizmalarının değerlendirilmiş olmasına bağlı olabilir (125).

Çalışmamızda ratlarda streptozosin ile diyabet oluşturuldu. Ratlarda bir kortikosteroid analogu olan TA' in intravitreal uygulamada retinada VEGF salınımı üzerine nasıl bir etkisi olacağı araştırıldı. İVTA verilen ratların retina tabakalarının tümünde, BSS verilen ratların retina tabakalarına göre VEGF düzeylerinde yaklaşık olarak yarıya yakın azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamasının nedenlerinden birisi rat sayısının azlığı olabilir.

Bu sonuçlar intravitreal triamsinalon asetonidin diyabetik ratlarda VEGF salınımında değişikliğe neden olmadığını ve dolayısıyla anjiogenezisi inhibe etmeyebileceğini düşündürmektedir.

## 6. ÖZET

### **Diyabetik ratlarda intravitreal triamsinalon asetonidin retinada vasküler endotelyal büyüme faktörü salınımına etkisi**

**Amaç:** : Bu çalışmada streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş ratların retinalarında intravitreal triamsinalon asetonidin (İVTA) vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salınımı üzerine etkinliğini değerlendirdik.

**Gereç yöntem:** Erkek wistar ratlar çalışmaya alındı. Ratlara 50 mg/kg streptozosin tek doz halinde periton içine verildi. Ratların diyabetik olup olmadığı 3. ve 7. günlerde kuyruk venlerinden alınan kanda glikoz düzeyleri ölçülerek kontrol edildi. Kan glikoz seviyesi 250 mg/dL ve üzerinde olanlar çalışmaya alındı.

Streptozosin verildikten 15 gün sonra , hamilton iğnesi ( 30 gauge) ile ratların sağ gözlerine İVTA, diğer gözlerine dengeli tuz solüsyonu enjeksiyonu yapıldı. Ratlar birinci ayda sakrifiye edildi ve tüm gözler enükle edildi. Enükle edilen gözlerin retinaları VEGF antikoları ile boyanarak immunhistokimyasal yöntemle incelendi.

**Bulgular:** İVTA verilen ratların retina tabakalarının tümünde, dengeli tuz solüsyonu verilen ratların retina tabakalarına göre VEGF salınımında yaklaşık olarak yarıya yakın azalma görüldü. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı.

**Sonuç:** Bu sonuçlar intravitreal triamsinalon asetonidin diyabetik ratlarda VEGF salınımında değişikliğe neden olmadığını ve dolayısıyla anjiojenezisi inhibe etmeyebileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Streptozosin, diyabetik rat, vasküler endotelyal büyüme faktörü, triamsinolon asetonid

## 7- İNGİLİZCE BAŞLIK VE ÖZET

### SUMMARY

#### **The effect of intravitreal triamcinolone acetat on retinal expression of vascular endothelial growth factor in diabetic rats**

**Purpose:** In this study we investigated the effect of intravitreal triamcinolone acetate (IVTA) in streptozotocin-induced diabetic rats on vascular endothelial growth factor (VEGF) 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 acetate (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 anti-VEGF markers by immunohistochemistry.

**Results:** Decreased VEGF expressions were found in retinal layers of rats which were injected TA compared with the control eyes. However, no statistically significant difference was found between TA injected and control eyes.

**Conclusion:** In this study, these findings shows that intravitreal triamcinolone acetate administration could not change VEGF expression in diabetic rats. These results suggest that IVTA does not cause any changes in VEGF release in diabetic rats and (probably) may not inhibit angiogenesis.

**Key Words:** Streptozotocin, diabetic rat, vascular endothelial growth factor, intravitreal triamcinolone acetate

## 8. KAYNAKLAR

1. Meetoo D, McGovern P, Safadi R. An epidemiological overview of diabetes across the world. *Br J Nurs*. 2007 Sep 13-27;16(16):1002-7.
2. Ahmet Taş, M.Zeki Bayraktar, Üzeyir Erdem. Diyabetik hastalarda retinopati sıklığı ve risk faktörleri. *Gülhane Tıp Dergisi* 2005; 47: 164-174
3. Fong DS, Ferris FL 3rd, Davis MD, Chew EY. Causes of severe visual loss in the early treatment diabetic retinopathy study: ETDRS report no. 24. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Am J Ophthalmol*. 1999 Feb;127(2):137-41.
4. Ciulla TA, Amodor AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and Diabetic macular edema. Pathophysiology, screening and novel therapies. *Diabetes Care* 2003; 26:2653-2664
5. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Early photocoagulation for Diabetic retinopathy: ETDRS report number 9. *Ophthalmology* 98:766785,1991
6. 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.
7. 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.
8. Vitros DT II Operator's Manual Book. Johnson and Jonson Company, 2003, USA.
9. Machermer R, Sugita G, Tano Y. Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1979;77:171-80.
10. 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.
11. 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.
12. Hida T, Chandler D, Arena JE, Machermer R. Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations. *Am J Ophthalmol* 1986;101:190-95.

13. Ruiz-Moreno JM, Montero JA, Bayon A, Rueda J, Vidal M. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide at high doses in the rabbit. *Exp Eye Res.* 2007 Feb;84(2):342-8.
14. Albin TA, Abd-El-Barr MM, Carvounis PE, Iyer MN, Lakhanpal RR, Pennesi ME, Chevez-Barrios P, Wu SM, Holz ER. Long-term retinal toxicity of intravitreal commercially available preserved triamcinolone acetonide (Kenalog) in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jan;48(1):390-5.
15. Jonas JB, Hayler JK, Sofker A Panda- Jonas S. Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative Diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2001;131:468–71.
16. Antcliff RJ, Spalton DJ, Stanford MR, et al. Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema:an optical coherence tomography study. *Ophthalmology.*2001;108:765-72.
17. Jonas JB, Spandau UH, Kampeter BA, Harder B. Follow-up after intravitreal triamcinolone acetonide for exudative age-related macular degeneration. *Eye.* 2007 Mar;21(3):387-94. Epub 2006 Jan 13.
18. Cakir M, Dogan M, Bayraktar Z, Bayraktar S, Acar N, Altan T, Kapran Z, Yilmaz OF. Efficacy of intravitreal triamcinolone for the treatment of macular edema secondary to branch retinal vein occlusion in eyes with or without grid laser photocoagulation. *Retina.* 2008 Mar;28(3):465-72.
19. Benhamou N, Massin P, Haouchine B, Audren F, Tadayoni R, Gaudic A. Intravitreal triamcinolone for refractory pseudofakic macular oedema. *Am J Ophthalmol.* 2003;135:246-49.
20. Allredge CD, Garretson BR. Intravitreal triamcinolone for the treatment of idiopathic juxtafoveal telangiectasis. *Retina* 2003;23:113-16.
21. Jonas JB, Hayler JK, Sofker A Panda- Jonas S. Regression of neovascular iris vessels by intravitreal injection of crystalline cortisone. *J Glaucoma.*2001;10:284-87.
22. Hauser D, Bukelman A, Pokroy R, Katz H, Len A, Thein R, Parness-Yossifon R, Pollack A. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema: comparison of 1, 2, and 4 mg. *Retina.* 2008 Jun;28(6):825-30.
23. Campochiaro PA, Hackett SF. Ocular neovascularization: a valuable model system. *Oncogene.* 2003 Sep 29;22(42):6537-48.

24. Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007 Nov;18(6):502-8.
25. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005 Feb-Mar;25(2):111-8.
26. 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.
27. *The Eye: Fundamentals and Principles of Ophthalmology*, section II, USA, American Academy of Ophthalmology: LEO.2000:68-88
28. Apaydın C:Anatomi;, Aydın P, Akova YA, Temel Göz Hastalıkları,Güneş kitabevi,2001,18
29. Aiello LP. The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol*. 2002 Dec;47 Suppl 2:S263-9.
30. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131-42.
31. Levent AKDUMAN , Özay ÖZ. Diabetik Makula Ödeminde Medikal Tedavi. *Ret - Vit* 2002; 10 : 203-208
32. Barber AJ, Lieth E, Antonetti DA, et al, Penn State Retina Research Group: Neural apoptosis in the retina during experimental and human Diabetics: early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998;102:783-791.
33. Scott TM, Foote J, Peat B, et al: Vascular and neural changes in the rat optic nerve following induction of Diabetes with streptozotocin. *J Anat* 1986;144:145-152
34. 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.
35. Mizutani N, Gerhardinger C, Lorenzi M: Müller cell changes in human Diabetic retinopathy. *Diabetes* 1998;47:445-449.
36. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 2006 Sep;55(9):2401-11

37. Sander B, Thornit DN, Colmorn L, et al. Progression of diabetic macular edema: correlation with blood retinal barrier permeability, retinal thickness, and retinal vessel diameter. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Sep;48(9):3983-7.
38. Bursell SE, Clermont AC, Oren B, King GL: The in vivo effect of endothelins on retinal circulation in nonDiabetic and Diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:596-607 .
39. Ashton N. Studies of the retinal capillaries in relation to Diabetic and other retinopathies. *Br J Ophthalmol* 1963;47:521–38.
40. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract.* 1995 May;28(2):103-17.
41. Lobo CL, Bernardes RC, Figueira JP. Three-year follow-up study of blood-retinal barrier and retinal thickness alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2004 Feb;122(2):211-7.
42. Krupin T, Waltman SR, Szewczyk P, et al. Fluorometric studies on the blood-retinal barrier in experimental animals. *Arch Ophthalmol* 1982;100:631– 4.
43. Gillies MC, Su T, Stayt J, et al. Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:635–41.
44. Gardner TW, Lieth E, Khin SA, et al. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2423–7.
45. Wallow IHL, Engerman RL. Permeability and patency of retinal blood vessels in experimental Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:447–60.
46. Vinorez SA, Niel EV, Swerdloff JL, et al. Electron microscopic immunocytochemical evidence for the mechanism of blood-retinal barrier breakdown in galactosemic rats. *Exp Eye Res* 1993;57:723– 35
47. 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.
48. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Jan;27 Suppl 1:S84-7.

49. Antonetti DA, Barber AJ, Lieth E, et al: Vascular permeability in experimental Diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: occludin expression is decreased in experimental Diabetic retinopathy. *Diabetes* 1998; 47:1953-1959
50. 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.
51. Gerhardinger C, Brown LF, Roy S, Mizutani M, Zucker CL, Lorenzi M. Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1453-62.
52. Zhang Y, Stone J: Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38: 1653-1666.
53. Quam 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.
54. 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.
55. 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.
56. Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T, Adamis AP, Luty GA. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol.* 2002 Mar;133(3):373-85.
57. 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.
58. Viores SA, Youssri AI, Luna JD, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. *Histol Histopathol* 1997;12:99 –109.
59. 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.



60. 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.
61. Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, et al. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. *Lancet*. 1998 Jan 3;351(9095):28-31.
62. Diabetic Retinopathy Study Research Group : Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. *Am J Ophthalmol*, 1976; 81:383-396.
63. Zimmerman TJ. et al. *Textbook of Ocular Pharmacology*. Chapter 6.
64. Matthew a. Cunningham, BS, Jeffrey I. Edelman, PhD, Shalesh kaushal, MD, PhD. Intravitreal steroids for macular edema: the past, the present, and the future. *Survey of ophthalmology* volume 53, Number 2, March–April 2008
65. Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of intraocular proliferative, exudative, and neovascular diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2005 Sep;24(5):587-611. Epub 2005 Mar 29.
66. Penfold PL, Wen L, Madigan MC, et al: Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line: implications for macular degeneration. *Clin Exp Immunol* 121:458-- 65, 2000 Penfold PL, Wong JG, Gyory J, Billson FA:
67. Grenga P, Lupo S, Domanico D, Vingolo EM. Efficacy of intravitreal triamcinolone acetonide in long standing diabetic macular edema: A Microperimetry and Optical Coherence Tomography Study. *Retina*. 2008 Jul 28.
68. 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.
69. Nauck M, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P, Perruchoud AP: Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids: *Am.J.Resp.Cell.Mol.Biol.*1997; 16:398–406

70. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, et al: Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135: 497--510, 1996
71. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, et al: Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 8: 119--26, 2002
72. Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, et al: Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental Diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1440--4, 2005
73. Jousseaume AM, Poulaki V, Qin W, et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early Diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol* 160:501--9, 2002
74. 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.
75. Martidis A, Duker JS, Puliafito CA. Intravitreal triamcinolone for refractory cystoid macular edema secondary to birdshot retinochoroidopathy. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:1380-1383.
76. Choudhry S, Ghosh S. Intravitreal and posterior subtenon triamcinolone acetonide in idiopathic bilateral uveitic macular oedema. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2007 Nov;35(8):713-8.
77. Degenring RF, Jonas JB. Intravitreal injection of triamcinolone acetonide as treatment for chronic uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:361.
78. Degenring RF, Kampeter B, Kreissig I, Jonas JB. Morphological and functional changes after intravitreal triamcinolone acetonide for retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003;81:548-550.
79. Wuqaas M, Munir, Jose S, Pulido, Mithlesh C, Sharma, Bruce M, Buerk. Intravitreal triamcinolone for treatment of complicated proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Can J Ophthalmol* 2005;40:598--604
80. Danis RP, Bingaman DP, Yang Y, et al. Inhibition of preretinal and optic nerve head neovascularization in pigs by intravitreal triamcinolone acetonide. *Ophthalmology*, 1996; 103: 2099-2104.

81. Hauser D, Bukelman A, Pokroy R, Katz H, Len A, Thein R, Parness-Yossifon R, Pollack A. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema: comparison of 1, 2, and 4 mg. *Retina*. 2008 Jun;28(6):825-30.
82. Early Treatment Diabetic Retinopathy Research Group: ETDRS report number 1. *Arch Ophthalmol*, 1985; 103:1796-1806.
83. Martidis A, Duker JS, Greenberg PB et al.: Intravitreal Triamcinolone for Refractory Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*. 2002;109:920-927
84. Lam DS, Chan CK, Tang EW, Li KK, Fan DS, Chan WM. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular oedema in Chinese patients: six-month prospective longitudinal pilot study. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004;32(6):569-72.
85. 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.
86. McGee DH, Dembinska O, Gruebbel MM. Evaluation of triamcinolone acetonide following intravitreal injection in New Zealand white rabbits. *Int J Toxicol*. 2005 Nov-Dec;24(6):419-25.
87. 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.
88. Lau LI, Chen KC, Lee FL, Chen SJ, Ko YC, Jui-Ling Liu C, Hsu WM. Intraocular Pressure Elevation After Intravitreal Triamcinolone Acetonide Injection in a Chinese Population. *Am J Ophthalmol*. 2008 Jul 18.
89. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
90. 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.
91. 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

92. 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
93. 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.
94. Sibi R, Lawsona, Bichoy H, Gabra. 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
95. Hiroshi Tamura, Kazuaki Miyamoto, Junichi Kiryu. Intravitreal Injection of Corticosteroid Attenuates Leukostasis and Vascular Leakage in Experimental Diabetic Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, April 2005, Vol. 46, No. 4.
96. 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.
97. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 9. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1991;98(5 Suppl):766-85.
98. Astam N, Batioğlu F, Ozmert E. Short-term efficacy of intravitreal bevacizumab for the treatment of macular edema due to diabetic retinopathy and retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol.* 2008 Jun 14.
99. Conway MD, Canakis C, Livir-Rallatos C, et al.: Intravitreal triamcinolone acetonide for refractory chronic pseudophakic cystoid macular edema. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29:27-33.
100. Antoszyk AN, Gottlieb JL, Machemer R, Hatchell DL. The effects of intravitreal triamcinolone acetonide on experimental pre-retinal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1993;231(1):34-40.
101. Reichel E, Bauman C. Intravitreal triamcinolone for refractory Diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2002; 109:920-927.
102. Audren F, Erginay A, Haouchine B, Benosman R, Conrath J, Bergmann JF, Gaudric A, Massin P. Intravitreal triamcinolone acetonide for diffuse diabetic macular oedema: 6-month results of a prospective controlled trial. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006 Oct;84(5):624-30.

- 103.** Ciardella AP, Klancnik J, Schiff W, Barile G, Langton K, Chang S. Intravitreal triamcinolone for the treatment of refractory diabetic macular oedema with hard exudates: an optical coherence tomography study. *Br J Ophthalmol* 2004;88(9):1131-6.
- 104.** Schindler RH, Chandler D, Thresher R, Machemer R. The clearance of intravitreal triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 1982;93(4):415-7.
- 105.** Scholes GN, O'Brien WJ, Abrams GW, Kubicek MF. Clearance of triamcinolone from vitreous. *Arch Ophthalmol* 1985;103(10):1567-9.
- 106.** Kaiser RS, Maguire MG, Grunwald JE, et al. One-year outcomes of panretinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2000 Feb;129(2):178-85.
- 107.** 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.
- 108.** 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.
- 109.** 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.
- 110.** Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative Diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994 Oct 15;118(4):445-50.
- 111.** Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, et al.. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1994 Nov;112(11):1476-82.
- 112.** Joan W. Miller, Anthony P. Adamis, David T. Shima. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*. 1994 Sep;145(3):574-84.
- 113.** Okamoto N, Tobe T, Hackett SF. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol*. 1997 Jul;151(1):281-91

- 114.** A.A. Bosco A.C., Lerario R., F. Santos, B.L. Wajchenberg. Effect of thalidomide and rosiglitazone on the prevention of Diabetic retinopathy in streptozotocin-induced Diabetic rats. *DMologia* (2003) 46:1669–1675
- 115.** Umland SP, Nahrebne DK, Razac S, Beavis A, Pennline KJ, Egan RW, Billah MM. The inhibitory effects of topically active glucocorticoids on IL-4, IL-5, and interferon-gamma production by cultured primary CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 511- 519.
- 116.** Sze PY, Iqbal Z. Glucocorticoid action on depolarization dependent calcium influx in brain synaptosomes. *Neuroendocrinology* 1994; 59: 457 465.
- 117.** Tano Y, Chandler D, Machemer R: Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol.* 1980;90:810-816.
- 118.** Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, Anliker W. Intravitreal triamcinolone acetonide in exudative age-related macular degeneration. *Retina.* 2000;20(3):244-50.
- 119.** Ranson NT, Danis RP, Ciulla TA, Pratt L. Intravitreal triamcinolone in subfoveal recurrence of choroidal neovascularisation after laser treatment in macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2002 May;86(5):527-9.
- 120.** Fischer S, Renz D, Schaper W, Karliczek GF. In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jan 12;411(3):231-43.
- 121.** Penfold PL, Wong JG, Gyory J, Billson FA. Effects of triamcinolone acetonide on microglial morphology and quantitative expression of MHC-II in exudative age-related macular degeneration. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2001 Jun;29(3):188-92.
- 122.** 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.
- 123.** Bosco AA, Lerario AC, Santos RF, Wajchenberg BL. Effect of thalidomide and rosiglitazone on the prevention of Diabetic retinopathy in streptozotocin-induced Diabetic rats. *Diabetologia.* 2003 Dec;46(12):1669-75. Epub 2003 Nov 4.
- 124.** Hasan Q, Tan ST, Gush J. Pediatrics. Steroid therapy of a proliferating hemangioma: histochemical and molecular changes. 2000 Jan;105(1 Pt 1):117-20.

- 125.** 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
- 126.** 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