



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



RANIBİZUMAB VE AFLİBERCEPT'İN *IN VITRO* OKÜLER TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Eren EKİCİ

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ender YARSAN**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RANİBİZUMAB VE AFLİBERCEPT'İN *IN VITRO*
OKÜLER TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Eren EKİCİ

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ender YARSAN

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ranibizumab ve Aflibercept’in *in Vitro* Oküler Toksisitesinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Eren EKİCİ

Tarih: 06.01.2023

İmza

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Eren EKİCİ tarafından
hazırlanan “Ranibizumab ve Aflibercept’in İn Vitro Oküler Toksisitesinin Araştırılması”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY
BİRLİĞİ/ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Ünvan Ad Soyad
Üniversite
Jüri Başkanı

İmza
Ünvan Ad Soyad
Üniversite (Üye)

İmza
Ünvan Ad Soyad
Üniversite (Üye)

İmza
Ünvan Ad Soyad
Üniversite (Üye)

İmza
Ünvan Ad Soyad
Üniversite (Üye)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. İnsan Gözü Anatomisi ve Histolojisi	2
1.1.1. İnsan Retinası Anatomisi ve Histolojisi	4
1.1.2. Retina Pigment Epiteli Özellikleri ve Fonksiyonları	7
1.1.2.1. Erişkin İnsan Retina Pigment Epiteli Hücre Kültürü (ARPE-19)	9
1.1.3. Vitreous	11
1.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	11
1.3. Anti – VEGF İlaçlar ve Göz Hastalıklarındaki Kullanım Alanları	13
1.3.1. Ranibizumab	13
1.3.2. Aflibercept	14
1.4. Otofaji	15
1.4.1. Otofaji ve Anjiyogenez İlişkisi	17
1.4.2. Beclin1	19
1.4.3. ATG4	20
1.5. Matriks Metalloproteinazlar	22
1.5.1. MMP2	23
1.5.2. TIMP1	24
1.6.1. Tezin Amacı	25
1.6.2. Tezin Hipotezi	25
2. GEREÇ ve YÖNTEM	26
2.1. Gereç	26
2.1.1. MTT Testinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	26
2.1.2. MTT Testinde Kullanılan Sarf Malzemeler	27
2.1.3. MTT Testinde Kullanılan Kullanılan Cihazlar	28
2.1.4. RNA İzolasyon İşleminde Kullanılan Sarf Malzemeler	28
2.1.5. RNA İzolasyon İşleminde Kullanılan Cihazlar	29
2.2.6. Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (qRT-PCR) Analizi	29
2.2.6.1. qRT-PCR’da Kullanılan Kitler	30
2.2.6.2. qRT-PCR’da Kullanılan PCR Primerleri	30
2.2.7. Gen Ekspresyonu Analizinde Kullanılan Cihazlar	30

2.2. Yöntem	31
2.2.1. Ranibizumab ve Aflibercept'in Hazırlanması	31
2.2.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması	31
2.2.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü	31
2.2.2.2. Hücre Pasajlanması	32
2.2.3. Hücelere Ranibizumab ve Aflibercept Uygulanması	33
2.2.4. MTT Deneyi	35
2.2.5. RNA İzolasyon İşlemi	35
2.2.6. RNA Ölçümü (Nanodrop)	36
2.2.7. Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (qRT-PCR) Analizi	36
2.2.8. qPCR İstatistiksel Analizi	37
3. BULGULAR	38
3.1. ARPE-19 Hücrelerinin Morfolojik İncelenmesi	38
3.2. MTT Canlılık Testi Sonuçları	38
3.3. RNA Ekstraksiyonu NanoDrop ND-1000 Sonuçları	40
3.4. ARPE-19 Hücrelerinde Otofaji belirteçlerinin (Beclin1 ve ATG4) İfadesi	41
3.5. ARPE-19 Hücrelerinde TIMP1 ve MMP2 İfadesi	42
3.6. TIMP1 ve MMP2 Değerlerinin Oranlanması	43
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
ÖZET	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

2018 yılı Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya genelindeki görme kaybı sebeplerinin başlıcaları sırasıyla yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, katarakt, diyabetik retinopati ve glokom olarak belirtilmiştir. Yine yakın zamanda yapılmış pek çok çalışmada, senil maküler dejenerasyon ve diyabetik retinopati, gelişmiş ülkelerdeki önlenabilir körlük nedenlerinin başlıcaları arasında gösterilmiştir.

Son yıllarda ise, aylık dozlar şeklinde göz içine (intravitreal) uygulanan monoklonal antikor (Ranibizumab, Bevacizumab, Aflibercept) tedavileri, sağladığı görme artışı ve anatomik düzelme ile hastalar için umut ışığı olmuştur. Senil maküla dejenerasyonu, diyabetik retinopati ve retinal vasküler hastalıkların yol açtığı patoloji; obstrüksiyon, iskemi, hemoraji ve anjiyogenezis süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiogenezisdeki önemli bir sitokindir. VEGF, anjiyogenezi vücut ve göz çevresinde yükselten bir biyokimyasal sinyal proteinidir. VEGF'nin reseptörleri ile bağlanması, endotel hücresi çoğalması ve yeni kan getirir damar büyümesinde ve dolayısıyla anjiogenezinde anahtar rol oynamaktadır. VEGF ailesi, hepsi plasental kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) olan VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E'den ve bir plasental büyüme faktöründen (PIGF) oluşmaktadır. Ranibizumab, VEGF-A'ya bağlanma yoluyla, VEGF'nin reseptörleri ile olan etkileşimine müdahale etmekte ve böylece yeni kan damarlarının oluşmasını engellemektedir. Aflibercept ise; vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve plasental büyüme faktörünü (PIGF) vücudun doğal reseptörlerine göre daha büyük bir afinite ile bağlayan çözünebilir bir tuzak reseptörüdür. VEGF-A'nın doğal reseptörlerinin aktivasyonunu azaltarak, Aflibercept yeni kan damarlarının büyümesini azaltmaktadır.

Mevcut çalışmada, Ranibizumab ve Aflibercept'in farklı dozlarda, sağlıklı insan gözünün ARPE-19 hücre hattı üzerine uygulanıp konsantrasyon ve zamana bağlı, sitotoksik açıdan hücre canlılığına etkileri incelenmiştir. Bunun yanı sıra, söz konusu ilaçların 1)

Otofaji yolağında kritik öneme sahip Beclin1 ve ATG4 ekspresyonları üzerine olan etkileri

2) Hücreler arası yapısal ve kimyasal destekte görevli ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde başlıca öneme sahip enzimlerden MMP2 ve TIMP1 ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Göz hastalıkları klinik pratiğinde, söz konusu hastalıkların tedavisinde günümüzde altın standart olarak kabul edilen ve kısıtlı sayıda hücre kültürü çalışmaları olan bu ajanların in vitro çalışmasının, literatüre önemli bir katkı sağlayacağı kanısındayız.

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde desteklerini benden esirgemeyen başta değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN'a, hücre kültürü ile ilk kez tanışmamı sağlayan, bakış açısı kazandıran, laboratuvar bilgi, becerileri ile Farmakoloji alanında yönlendirmelerini esirgemeyen Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e ve Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI'ya; tez çalışmalarım esnasında yardım ve desteğini esirgemeyen, tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Görkem KISMALI'ya, eğitimim süresince çalışmalarımda destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Levent ALTINTAŞ'a; tez çalışması sürecinde katkılarını ve yardımlarını her daim hissettiren Dr. Sinem PEHLİVAN'a, Dr. Büşra GÖRGÜN'e, Dr. Recep UYAR'a ve Dr. Sedat SEVİN'e; doktora başlangıç sürecinden itibaren bilgi ve tecrübeleri ile bana rehberlik eden sayın Prof. Dr. Zafer KARAER'e ve Dr. Mustafa ULUDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezim sürecinde, her zaman, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, özveri ve sevgilerini her daim hissettiğim eşim K. Büşra KAYNAK EKİCİ'ye, annem Nehir EKİCİ'ye, ve varlığıyla hayatımıza anlam katan oğlum Mustafa Ağâh EKİCİ'ye çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARPE-19	Erişkin İnsan Retina Pigment Epiteli Hücre Hattı
ATG	Otofaji İlişkili Genler
ATG4	Otofajin-1
CNTF	Siliyer Nörotrofik Faktör
DMEM	Dimetilsülfoksit Kültürü
DMÖ	Diyabetik Maküla Ödemi
DRP	Diyabetik Retinopati
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ESM	Ekstraselüler Matriks
FAZ	Foveal Avasküler Zon
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
IC50	Maksimum İnhibitör Konsantrasyonun Yarısı
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IFN	İnterferon
KNV	Koroidal Neovaskülarizasyon
LEDGF	Lens Epiteli Derive Büyüme Faktörü
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MP	Metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NFL	Sinir Lifî Tabakası
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Platelet Derive Büyüme Faktörü
PEDF	Pigment Epiteli Derive Faktörü

RNA	Ribonükleik Asit
ROP	Prematüre Retinopatisi
RPE	Retina Pigment Epiteli
RVO	Retinal Ven Oklüzyonu
TGF- β	Transforming Büyüme Faktörü- Beta
TIMP	Doku Metalloproteinaz İnhibitörü
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
YBMD	Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu
g	Gram
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ m	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
oC	Santigrat derece
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İnsan gözünün anatomisi.	2
Şekil 1.2. Retinanın anatomisi.	4
Şekil 1.3. Maküler zonların sınıflandırılması.	5
Şekil 1.4. Nörosensöryel retinanın histolojik kesiti.	6
Şekil 1.5. Retina Pigment Epiteli (RPE)'nin histolojik kesiti.	8
Şekil 1.6. Otofajinin Evreleri.	17
Şekil 1.7. Otofaji, Beclin1 ve ATG4 ilişkisi.	22
Şekil 1.8. MMP2 ve TIMP1'in protein görünümleri.	24
Şekil 2.1. ARPE-19 Hücrelerinin Farklı Konfluenslerdeki Hücre Görünümleri.	33
Şekil 3.1. Ranibizumab ve Aflibercept'in MTT Absorbans – Klinik Doz ve Katları İlişkisi.	39
Şekil 3.2. ARPE-19 hücrelerinde kontrol (K), Ranibizumab ve Aflibercept örnekleri için Beclin1 (A) ve ATG4 (B) mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.	42
Şekil 3.3. ARPE-19 hücrelerinde kontrol (K), Ranibizumab ve Aflibercept örnekleri için matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) (A) ile doku matriks metalloproteinaz 1 (TIMP1) (B) mRNA ifadelerinin karşılaştırılması ve TIMP1/TIMP2 oranı (C).	43

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. MTT testinde kullanılan kimyasal malzemeler.	26
Çizelge 2.2. MTT testinde kullanılan sarf malzemeler.	27
Çizelge 2.3. MTT testinde kullanılan cihazlar.	28
Çizelge 2.4. RNA izolasyon işleminde kullanılan sarf malzemeler.	29
Çizelge 2.5. RNA izolasyon işleminde kullanılan cihazlar.	29
Çizelge 2.6. qPCR analizi yapılan genlere ait primerler.	30
Çizelge 2.7. Bireysel anti-VEGF ilacı için 'x' konsantrasyonunu gösterir.	34
Çizelge 2.8. cDNA sentez protokolü.	36
Çizelge 2.9. qPCR protokolü.	37
Çizelge 3.1. Her bir doz için Aflibercept ve Ranibizumab'ın istatistiksel olarak kıyaslanması.	40
Çizelge 3.2. NanoDrop ND-1000 Sonuçları.	41

1. GİRİŞ

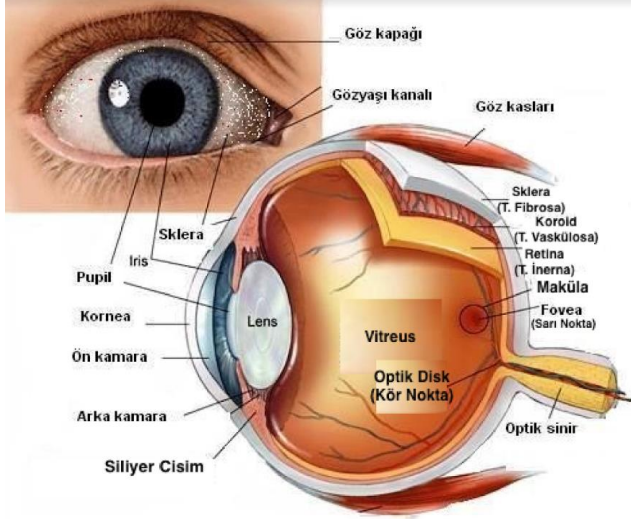
Moleküler kaynaklar, in vivo ve in vitro çalışmalar ve olası ilaç adayları için potansiyel biyolojik ajanlar olarak işlev gören bileşiklerin araştırılmasında giderek daha önemli hale gelmektedir. Genom ve devam eden proteom tarafından sağlanan artan miktarda yeni terapötik hedefe göre, hastalıkla ilişkili proteinlerin spesifik inhibitörlerinin tasarımı, farmakolojik araştırmaların birincil hedeflerinden biri haline gelmiştir.

Anjiyogenez hem normal hem de patolojik koşullarda doku gelişimi ve işlevi için anahtar bir süreçtir. Anjiyogenez sürecinde çok sayıda faktör ve sistem yer almaktadır. En güçlülerinden biri olarak vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) - vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) sistemidir. Bu sinyal molekülleri gelişimsel embriyogenez sırasında vaskülogenezi ve daha ileri dönemlerde yara iyileşmesi, tümör büyümesi, iltihaplanma ve oküler hastalıklardaki anjiyogenez düzenlemektedir. VEGF, oküler homeostazın önemli bir faktörüdür. Sadece vasküler endotel hücreleri veya perisitler tarafından değil, aynı zamanda retina nöronları ve astrositler, Müller hücreleri, retina pigment epitel ve hatta pigmentli siliyer epitel tarafından da üretilmektedir.

Bu güçlü faktörleri (VEGF-VEGFR) bloke etme fikri tıpta yeni tedavi olanaklarına zemin hazırlamıştır. Anti-VEGF ajanlar, sadece damar büyümesini ve neovaskülarizasyonu engellemekle kalmamakta, aynı zamanda patolojik mikrodamarların gerilemesini de indüklemektedir. Yanı sıra, normal damarları stabilize etmekte, sızıntıyı ve buna eşlik eden inflamatuvar yanıtı önlemektedir. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, diyabetik retinopati komplikasyonları ve retinal ven tıkanıklıkları gibi kritik göz hastalıkları ile mücadelede günümüzde anti-VEGF tedavisinin güçlü ve etkili bir silah olduğunu ispatlayan pek çok çalışma yapılmıştır. Oküler hastalıkların tedavisinde anti-VEGF tedavisinin uygulanması her geçen gün artmaktadır. Hem lokal hem de sistemik yan etkilerinin, uygulama sayısına kıyasla nadir olması da bunda önemli bir etkidir. Fakat bu ilaçların daha uzun etkili ya da farklı salım sistemleri içeren formları gibi konular, halen araştırılmaktadır.

1.1. İnsan Gözü Anatomisi ve Histolojisi

Orbita içinde yerleşmiş olan göz küresi (bulbus oculi); erişkinde 21-26 mm ön-arka çapında, 7-9 gr ağırlığında, ortalama 7 cc hacminde (Malkoç, 2006). Göz küresi dıştan içe doğru tunica fibrosa bulbi, tunica vasculosa bulbi ve tunica interna bulbi olmak üzere üç tabakadan oluşur (Eroschenko ve Di Fiore, 2013). En dış tabaka, tunica fibrosa bulbi'dir. Önde kornea ve kornea'nın bitim yerinden itibaren sklera ile gözün arka kutbuna kadar uzanır. Orta tabakası tunica vasculosa bulbi'dir. Üvea veya üveal traktus olarak da isimlendirilir. Koroid, siliyer cisim (corpus ciliare) ve iris'ten oluşmuş kesintisiz bir yapıdır. İç tabaka, tunica interna bulbi (nöral tabaka) olup retinayı ihtiva eder. Bu üç tabaka tarafından sınırlandırılmış olan göz küresinin içinde corpus vitreum, lens ve humör aköz yer alır (Apaydın, 2001; Eroschenko ve Di Fiore, 2013). Gözün yapısı Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. İnsan gözünün anatomisi (Children's Eye Institute, 2023).

Kornea, ışınların göze girdiği dış tabakanın çıkıntılı ve göz küresinin ön bölümündeki damardan yoksun ve saydam kısmıdır. Merkezi kısımlarda humör aköz'den, periferik kısımlarda limbusun kan damarlarından difüzyonla beslenir. Limbus kornea ve skleranın birleştiği gri çizgiye verilen addır. Kornea önden arkaya doğru: epitel, Bowman

membranı, substantia propria, Descement membranı ve endotel olmak üzere beş tabakadan oluşur (Kierszenbaum ve Demir, 2006). Sklera göz küresinin 5/6'lık arka kısmını oluşturan, kollajen liflerden zengin gözün şeklinin korunmasını sağlayan güçlü ve en dıştaki tabakasıdır. Sklera dıştan tenon kapsülü ile sarılmıştır. Bu sayede ön bölümde konjonktiva, arka bölümde orbital dokularla komşuluk yapmaktadır. Aynı zamanda sklera ekstraoküler kaslar için de bir tutunma yeri oluşturur (Barbara Young, 2014).

Koroid; skleranın iç yüzünü retinanın ise dış yüzünü örten, yoğun kapiller ağlardan oluşmuş ve pigmentli bir tabakadır. Lamina suprakoroidea, lamina vasküloza, lamina koriyokapillaris ve Bruch membranı olmak üzere dört kısımdan oluşur. Bruch membranı 1-4 µm kalınlığında, kollajen ve elastik liflerden zengin bir tabaka olup, koroid ve retinanın pigment tabakası arasında yer alır. Siliyer cisim; koroid ile iris arasında bulunan, humör aköz üretimini ve akomodasyonu sağlayan yapıdır. Önünde göze rengini veren ve giren ışık miktarını ayarlayan iris bulunur. İris, önden arkaya ön kenar tabaka, stroma, pigment epiteli tabakası ve iç sınırlayıcı membran olmak üzere dört katmandan oluşmuştur (April, 1997).

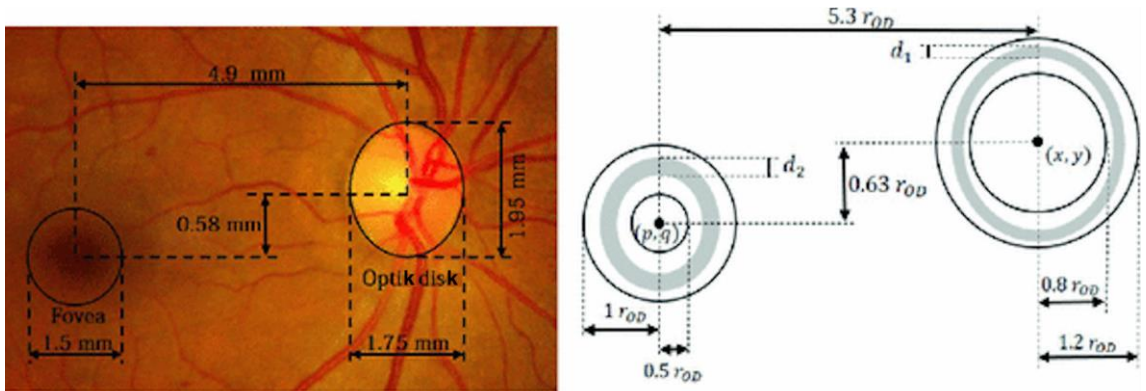
Göz küresinin en içteki, duyuşal ve ışığa en hassas tabakası olan retina, dış tarafında koroid, iç tarafından vitreous (corpus vitreum)'un hyaloid membranı ile çevrili olup optik disk üzerinden optik sinir ile bağlantılıdır. Gözün sinir tabakası olarak da adlandırılan retina; dışta stratum pigmentosum, içte stratum nervosum olmak üzere iki katmandan oluşur. Stratum pigmentosum'da, görme için önemli fonksiyonları olan ve melanin pigmenti içeren epitel hücreleri vardır. Bu hücrelerin, fotoreseptörlerin yakalayamadığı ışığı absorbe edebilme (böylece görüntünün netliğinin bozulmasını önler), fagositoz yapabilme ve kan-retina bariyerini oluşturma özellikleri vardır (Taner, 1999). Nörosensöriyel retina olarak da adlandırılan stratum nervosum; optik diskten sinirsel dokuların sonlandığı girintili çıkıntılı yapıdaki ora serrata'ya kadar uzanır. Ora serrata, retinanın periferde testere dişi şeklinde girintiler yaptığı hattır. Nörosensöriyel retina histolojik olarak on tabakadan oluşur. Retinanın arka bölümünün iç kısmında, optik aksın geçtiği oval, sarı renkli alana maküla lutea (sarı nokta) denir. Maküla lutea'nın merkezinde, fovea centralis retinae adlı çukurluk bulunur ki burası gözün en fazla ışık alan ve renkleri görmenin en iyi olduğu kısmıdır

(Eroschenko ve Di Fiore, 2013; Malkoç, 2006). Maküla lutea'nın 3 mm nasal tarafında retinadan lamina kribrosa'ya uzanarak optik siniri oluşturan liflerin bir araya gelmesiyle optik disk (kör noktayı) oluşur. Lamina kribroza, retina sinir lifi aksonlarının optik diskte toplandıktan sonra gözü terk ettikleri delikli bir destek yapısıdır (Grytz ve ark., 2011). Optik diskin ortasındaki çukurluktan retinanın damarları olan arteriae centralis retinae (santral retinal arter) ve venae centralis retinae (santral retinal ven) geçer (Gökmen, 2003).

1.1.1. İnsan Retinası Anatomisi ve Histolojisi

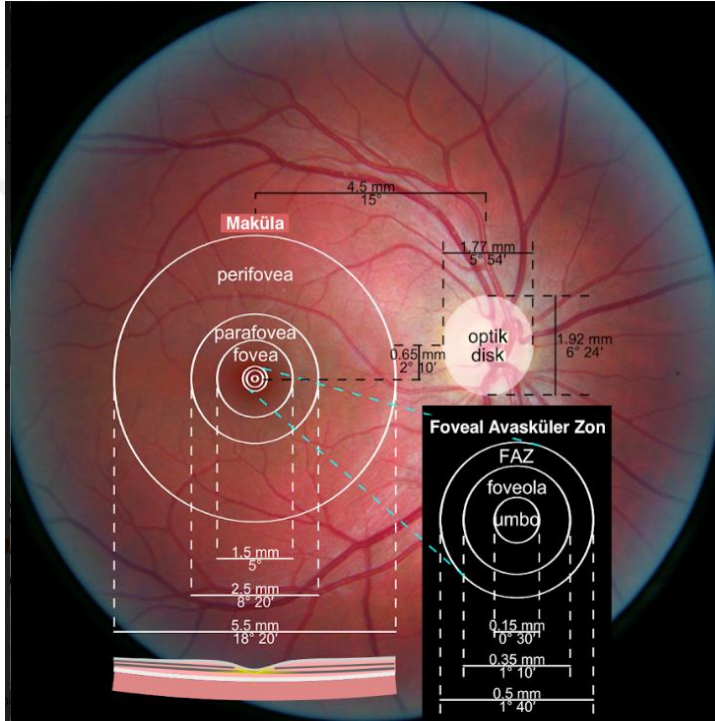
Retina embriyolojik olarak optik vezikülün distal bölümündeki nöral ektodermiden invajinasyon sonucu gelişir. Kalınlığı ora serratada 0,1 mm, ekvatorda 0,2 mm, optik sinir yakınında 0.56 mm olarak değişmektedir (Şekil 1.2.). Sinir lifi tabakası (NFL) haricinde bütün retina tabakaları optik sinir başında sonlanır (Yanoff ve Duker, 2018).

Yaklaşık 5,5 mm çapa sahip olan maküla'nın merkezi, optik diskin 4 mm temporalinde ve 0,8 mm aşağısında yer almaktadır.



Şekil 1.2. Retinanın anatomisi (Dashtbozorg, 2016).

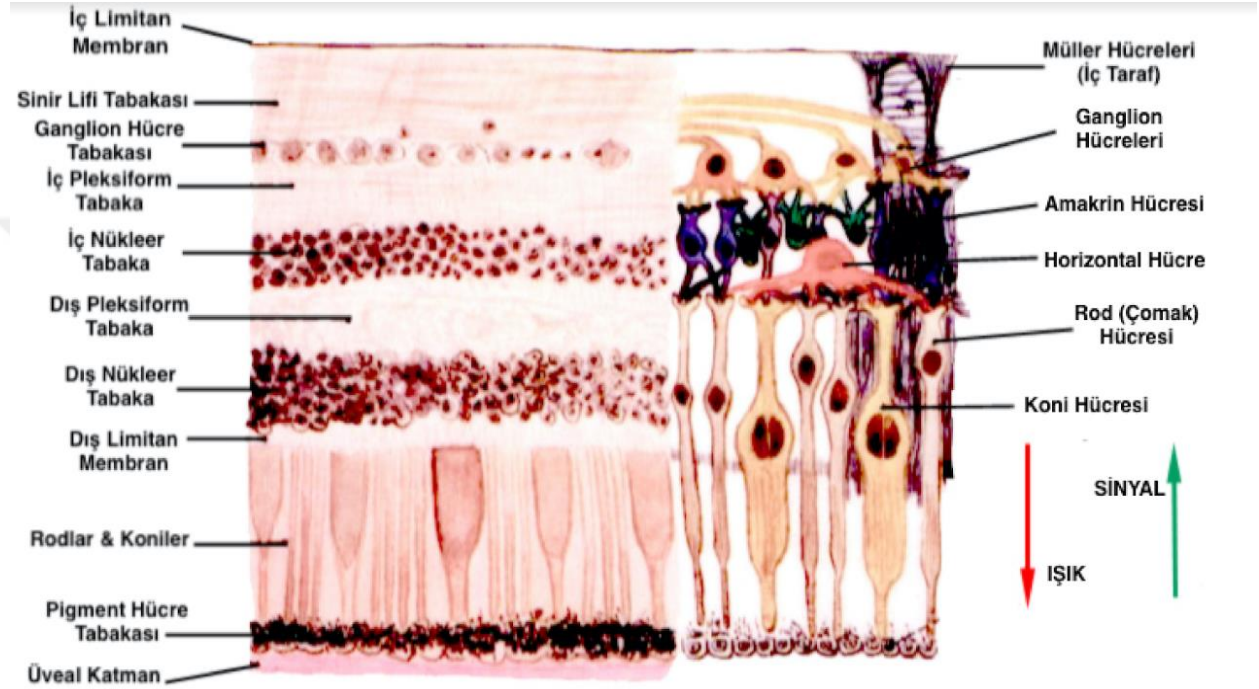
Maküla, topografik olarak klinik öneme sahip 4 konsantrik alana ayrılır (Şekil 1.3.). Bunlar merkezden dışa foveola, fovea, paravoveal alan ve perifoveal alandır (Yanoff ve Duker, 2018).



Şekil 1.3. Maküler zonların sınıflandırılması (Eyewiki AAO, 2021).

Foveola, 350 μ çapında ve 150 μ kalınlığında olup gangliyon hücresi içermez ve retinanın en yüksek kon fotoreseptör yoğunluğuna sahip bölgesidir. Foveola'nın tam merkezindeki 150 mikron genişliğindeki alan 'umbo' olarak adlandırılır ve görme keskinliğinin en yüksek olduğu kısımdır (Gholam A. Peyman, 2006). Fovea; foveolar avasküler zon (FAZ) ve foveola'nın birleşmesinden oluşur. FAZ; 250-600 μ m genişliğinde, iç nükleer tabaka seviyesindeki kapillerlerden oluşan; foveanın içinde ama foveolanın dışında yer alan alandır. Parafovea; ganglion hücre tabakası, iç nükleer tabaka ve dış pleksiform tabakanın en kalın olduğu, fovea etrafındaki 0,5 mm genişliğindeki alana verilen addır (Şekil 1.4.). Koni-basil oranı bu alanda 1:1'dir. Perifovea; parafovea'yı çevreleyen 1,5

mm genişliğinde periferik zon olup, tek kat ganglion hücre tabakası ve 6 kat bipolar hücre tabakası içerir. Koni-basil oranı 1:2'dir (Yanoff ve Duker, 2018).



Şekil 1.4. Nörosensöryel retinanın histolojik kesiti (Caceci, 2021).

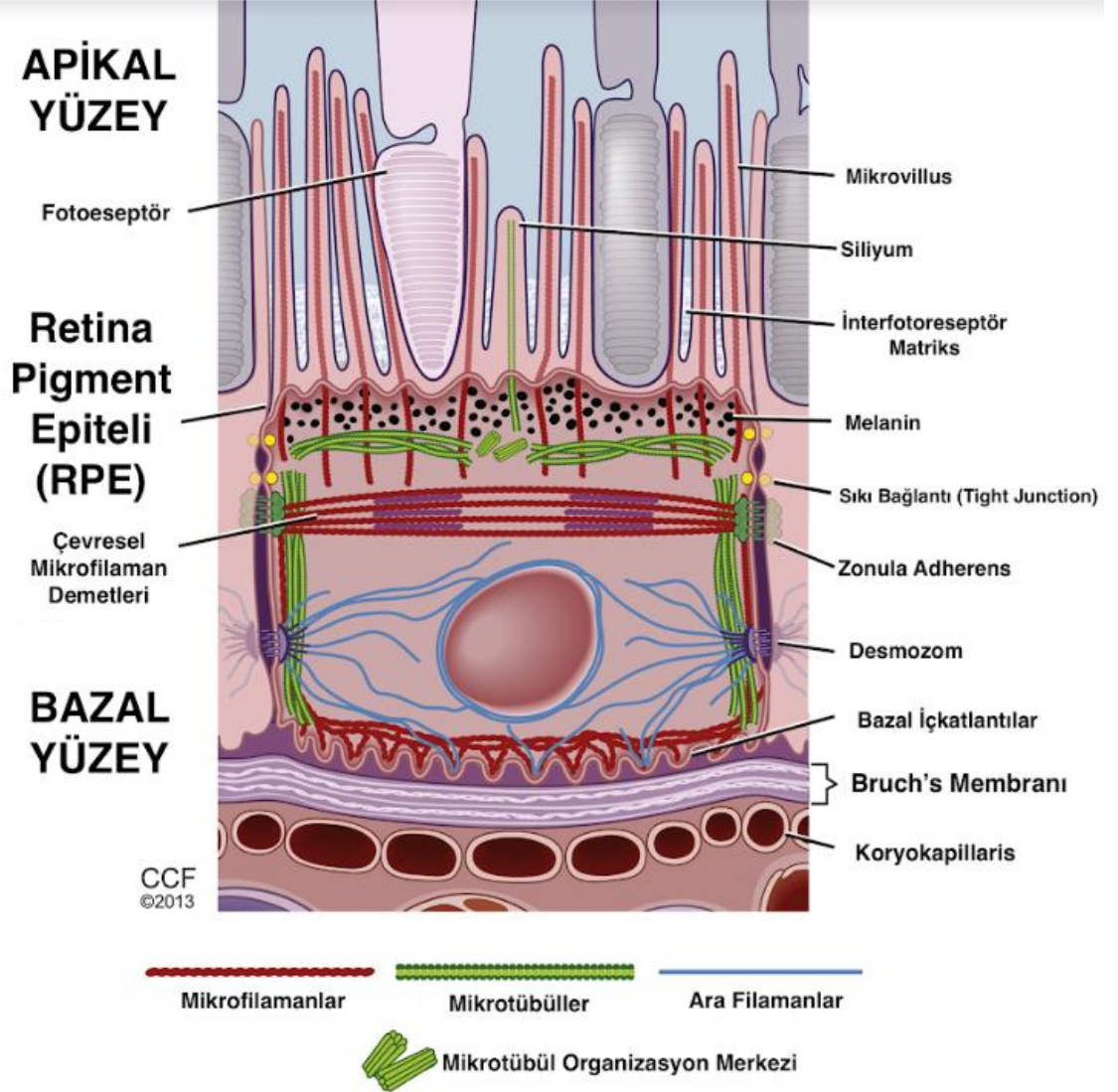
Nörosensöryel retina histolojik olarak on tabakadan oluşur. Bunlar dıştan içe doğru: *Retina pigment epiteli (RPE)* nörosensöryel retina ve koroid arasında uzanır. *Fotoreseptör tabakası* koni ve basillerden oluşur. *Dış limitan membran* komşu fotoreseptörlerin yapışıklıkları ve Müller destek hücrelerinin sitoplazmik uzantılarından oluşur, gerçek bir membran değildir. Bol miktarda fenestrasyonları vardır. Periferik retinadaki dış limitan membran ora serratada pigment epiteli ile birleşir. *Dış nükleer tabaka* koni ve basil nükleuslarını içerir. *Dış pleksiform tabaka* fotoreseptörlerin sinaptik cisimleri ile horizontal ve bipolar hücreler arası sinapsları içerir. Maküla bölgesinde basil ve konilerin aksonları daha uzun ve foveada oblik seyretdikleri için dış pleksiform tabaka daha kalın ve daha fibrözdür. Bu bölgeye Henle tabakası denir. Sistemik hipertansiyon gibi durumlarda lipid ve diğer kan ürünlerinin yıldız paterninde birikmesi Henle tabakasının bu özelliği

nedeniyledir. *İç nükleer tabaka* bipolar hücreler, Müller hücreleri, horizontal ve amakrin hücrelerin nükleuslarını içerir. *İç pleksiform tabaka* bipolar ve amakrin hücre aksonları ile ganglion hücrelerinin dendritlerini ve bunların sinapslarını içerir. *Ganglion hücreleri tabakası* ganglion hücrelerinin çekirdeklerinden oluşur. Ganglion hücrelerinin aksonları optik siniri oluşturur. *Sinir lifleri tabakası* ganglion hücrelerinin aksonlarından oluşur. *İç limitan membran* gerçek bir membran değildir. Müller hücrelerinin ayaksı çıkıntıları ve bazal lamina yapışıklıklarından oluşur (Sibel, 2014).

İnternal karotid arterden ayrılan oftalmik arterin uzantısı olan ‘santral retina arteri’ retina dolaşımı için esas kaynaktır, ancak normal gözlerin % 25’inde diskin yanındaki küçük bir alan siliyoretinal arter tarafından beslenir. Hem retina hem de koroid tabakalarının drenajı büyük oranda santral retinal ven ve dalları ile olmaktadır (Snell ve Lamp, 1998).

1.1.2. Retina Pigment Epiteli Özellikleri ve Fonksiyonları

Retina pigment epiteli (RPE); histolojik kesitlerde arka kutupta altıgen, perifere doğru gidildikçe daha az pigmentli ve tek katlı kübik hücre tabakası olarak görülür. Hücreler zonüla okludens tipi sıkı bağlantılarla birbirlerine bağlanırlar.



Şekil 1. 5. Retina pigment epitelinin histolojik kesiti (Bonilha, 2014).

Su ve iyonların serbest geçişine karşı bariyer görevi görürler. RPE hücreleri, maküler bölgede daha küçük (kabaca 10-14 μm çapında) iken retina periferinde daha geniş (yaklaşık 60 μm çapında) ve düz bir görünüm alırlar. RPE hücresi başına düşen fotoreseptör hücre sayısı (her bir RPE hücresi için yaklaşık 45 fotoreseptör hücresi), retina boyunca sabit kalır. RPE hücreleri, fotoreseptör hücrelere bakan apikal bölgelerinde, fotoreseptör dış segmentlerine ulaşan mikrovilluslar içerir. Bu apikal sonlanmalarda melanin pigmenti (Vücutta melaninin ilk olarak sentezlenmeye başlandığı yer; RPE'dir.) bulunur. Melanin pigmenti, dağılan ışığı emerek göz içinde mümkün olan en az derecede dağılmasını ve serbest radikallerin dengede tutularak toksinlerin bağlanmalarını sağlar. Bir diğer RPE

pigmenti lipofuksin, RPE içinde yaşla birlikte yavaş yavaş birikme özelliğindedir. Lipofuksin'in, ışık veya oksidasyon nedeniyle hasarlanmış dış segmente ait membran lipidlerinden meydana geldiği düşünülmektedir. RPE hücreleri, mitokondrinin yanı sıra süperoksid dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimleri ile lutein, zeaksantin, askorbat, karotenoidler, alfa tokoferol ve beta karoten gibi enzimatik olmayan antioksidanlar içerirler (Altıntaş, 2013).

RPE'nin nörosensöriyel retinanın korunmasında çok önemli fonksiyonları vardır. RPE, içerdiği melanin pigmenti sayesinde ışığı emer ve böylece saçılmayı azaltarak görüş kalitesini artırır. Bu, aynı zamanda retinada fotokimyasal oksidatif stresi azaltmada önemlidir. Görme siklusu içinde 11-cis-Retinal'in tekrar oluşumundaki fotokimyasal izomerizasyon işlemi RPE içinde gerçekleşmektedir (İlhan ve Eldem, 1998). RPE yapısındaki yüksek konsantrasyonlu antioksidanlar (örneğin süperoksit dismutaz, katalaz, lutein ve zeaksantin) ile retinayı oksidatif stresten korur. RPE, dış kan-retina bariyerinin bir bileşeni olup subretinal boşluktaki iyon dengesinin düzenlenmesinde önemli rol sahibidir. Laktik asit ve kolesterol gibi fotoreseptör atık ürünlerini fagositoz ile ortadan kaldırır. RPE ayrıca; VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factors; FGF-1, FGF-2, ve FGF-5), TGF- β (Transforming Growth Factor-Beta), IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I), CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), LEDGF (Lens Epithelium-Derived Growth Factor) ve PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor) gibi çok sayıda büyüme faktörlerinin salgılanmasını, komşu dokuların yapı ve hücrel farklılaşmanın korunmasını sağlar (Strauss, 2005).

1.1.2.1. Erişkin İnsan Retina Pigment Epiteli Hücre Kültürü (ARPE-19)

Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19 (ARPE-19), ilk olarak kazada yaşamını kaybeden 19 yaşındaki bir erkek donörünün göz kürelerinden elde edilmiştir. Olgunun yaşam fonksiyonlarını yitirmesinden 2 saat sonra enükleasyon tekniği ile alınan göz küreleri 12 saat soğuk ortamda saklanmış, sonrasında kalsiyum-magnezyum'dan yoksun ve

streptomisin ile penisilin içeren Puck'ın salin solusyonu ile yıkanmıştır. Ön segment daha sonra ora serrata'da göz küresinin hemiseksiyonu ile çıkarılmıştır. Retina, optik sinirden itibaren diseke edilmiştir ve pigment epitelinden ayrılmıştır. Birkaç kez tekrar eden seçici tripsinizasyon ve zayıf yapışık fibroelastik hücrelerin uzaklaştırılması işlemlerinden sonra ARPE-19 kültürü elde edilmiştir. ARPE-19, bir birincil RPE kültürünün seçici tripsinizasyonu ile saflaştırılmış, hızla büyüyen, kendiliğinden gelişen bir insan hücre hattıdır. Bu işlem, birleşik birincil kültürlerden fibroblastik ve refraktil hücrelerin çıkarılmasını ve ardından kalan bağlı hücrelerin genişlemesini içerir. Bu prosedürün birkaç tekrarından sonra, kültürler düzgün bir epitelyal morfoloji geliştirir. ARPE-19 hücreleri; tanımlanmış hücre sınırları, genel bir 'parke taşı' görünümü ve belirgin pigmentasyon dahil olmak üzere RPE'nin karakteristik özelliklerini korumaktadır. Farklılaşma kültürler birleşik yoğunluğa ulaştıktan sonra 3-4 hafta gerektirir. Uzun vadeli kültürlerin giderek daha koyu hale gelmesiyle kanıtlandığı gibi pigment birikmeye devam etmektedir. ARPE-19 kültürleri ayrıca, iyonları vektörel bir şekilde in vitro pompalama yeteneklerini teyit eden kubbeler oluşturur. Dunn ve ark. çalışmalarında ARPE-19'un morfolojisindeki aşikâr homojeniteye rağmen alternatif morfolojik fenotipleri ifade etmek için farklı yeteneklere sahip hücreler içerdiğini açıkça tespit etmişlerdir. Hücrelerin bölünmesini yaklaşık 24 saat olarak hesaplayan araştırmacılar, elektron mikroskopunda şekilleri küboidal yapıdan kolumnar yapıya değişen, apikal mikrovillus içeren; sıkı adezyon bağlantılarına, bazal katlantılara ve birçok polarize dağılımlı organelle sahip hücreler gözlemlemişlerdir. Ayrıca ARPE-19'un yaşlanma yeteneğine sahip olduğunu ve dolayısıyla ölümsüz bir hücre hattı olmadığını da göstermişlerdir. ARPE-19 hücre kültürünün farklı proteinleri sentezi gibi amaçları içeren çalışmalar için uygun olmayıp, daha çok retinoid metabolizmasının araştırılması, RPE spesifik gen ekspresyonu regülasyonu çalışmaları için verimli olabileceğini ifade etmişlerdir (Dunn ve ark., 1996).

ATCC ürün katoloğunda; ARPE-19 hücre hattının özellikleri arasında hücrelerin diploid olduğundan, 30'dan fazla pasaj için taşınabilme özelliğinden, dondurulmuş halde sıvı azot tankında kriyo tüplerde muhafaza edilebildiğinden söz edilmiştir (ATCC®, 2022).

1.1.3. Vitreous

Nörosensöriyel retinanın iç limitan membranı ile arka lens kapsülü arasındaki, göz küresinin arka ve en büyük kısmını (göz hacminin ~% 80'i) dolduran jelimsi ve berrak sıvıdır. Vitreous iki ana kısımdan oluşur: santral veya çekirdek vitreous, iç kısmı oluşturur ve kortikal vitreous, dış kısmı oluşturur. Vitreous retina ve lens metabolitleri için bir depolama alanıdır ve bu metabolitlerin göz içindeki hareketi için bir yol sağlar. Vitreous, viskoelastik özelliği sayesinde, hızlı göz hareketleri ve yorucu fiziksel aktivite sırasında kırılğan retina dokusunu koruyan bir “amortisör” görevi görür. Işınları iletip kırarak ışığın retinaya odaklamasına yardımcı olur. Kimyasal yapısı, büyük miktarda su bağlayıcı hiyalüronik asit ve bununla yakından ilişkili son derece hassas, embriyonik benzeri kolajen filaman çatısından oluşur (Gholam A. Peyman, 2006; Yanoff ve Duker, 2018; Yanoff ve Sassani, 2020).

1.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiogenez önceden var olan damarlardan yeni damarların gelişmesi ve yenilenmesi demektir. Embriyogenez, kemik gelişimi, yara iyileşmesi, menstrüel siklus ve gebelik sırasında fizyolojik olarak görülebildiği gibi inflamasyon, diyabetik retinopati, ateroskleroz, tümör oluşumu gibi çeşitli olaylarda patolojik olarak da ortaya çıkabilmektedir. Anjiogenezin ana düzenleyicilerinden biri vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). VEGF sinyal yolağının fizyolojik anjiogenezde hız-kısıtlayıcı basamak olduğu kabul edilmektedir (Ferrara ve ark., 2003).

1950’lerde Michaelson ve ark. neovaskülarizasyonun bilinmeyen bir faktör tarafından uyarıldığını; bunun fizyolojik neovaskülarizasyonun yanı sıra patolojik neovaskülarizasyonda da etkili olduğunu düşünmüşler ve bu maddeyi “X faktör” ü tanımlamışlardır (Michaelson, 1948). 1983 yılında Senger ve ark. vasküler geçirgenliği artırdığını düşündükleri “VPF” (vascular permeability factor)’yi tanımlamışlardır (Senger ve

ark., 1983). 1989'da ise Ferrara ve ark. tarafından, hipofiz foliküler hücrelerde endotelial proliferasyonu indükleyen faktör olduğu ileri sürülen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) tanımlanmıştır (Ferrara ve Henzel, 1989).

VEGF ailesi; yeni damar oluşumunda ve damar geçirgenliğinde önemli bir düzenleyici işlevini yürüten VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve Plasental Büyüme Faktörü (PlGF veya PGF), gibi birçok alt grubu içermektedir. VEGF-A, yapısı en iyi tanımlanan ve en çok araştırılmış olan VEGF ailesi üyesidir. İnsan vücudunda en çok VEGF-A121, VEGF-A165 ve VEGF-A189 izoformlarının sentezlendiği gösterilmiştir. Damar endotel hücrelerinde bulunan VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk-1 veya KDR) reseptörleri ile nöronlarda da bulunan nöropilin reseptörlerine (NP-1 ve NP-2) bağlanır. VEGF-A bilinen pro-anjiogenik faktörler arasında en güçlüsüdür. VEGF-A'nın yara iyileşmesi, ovulasyon, menstruasyon ve gebelik gibi birçok fizyolojik anjiogeneze sürecinin yanı sıra kanser, tümör oluşumu gibi patolojik anjiogeneze süreçlerini de etkilediği gösterilmiştir. VEGF-B, özellikle koroner anjiogeneze ile ilişkili olup; kalp-iskelet kası ve kahverengi yağ dokusunda geniş dağılımı göstermektedir. VEGFR-1 ve NP-1'e bağlanır. VEGF-B'nin mitojenik aktivitesi VEGF-A'ya göre daha düşüktür. Hipoksi VEGF-A sentezini artırdığı halde, VEGF-B üretimini etkilememektedir. VEGF-C, en önemli rolü lenfanjiyogeneze aktivatörü olmasıdır. VEGFR-2, VEGFR-3 ve NP-2 reseptörlerine bağlanır. Tiroid bezi, kalp, over, bağırsak ve plasenta gibi dokularda bulunur. Endotel hücrelerinin migrasyonu ve mitogeneze indükler, yaşam sürelerini uzatır. VEGF-D, VEGF-C gibi VEGF-D öncü protein şeklinde sentezlenir, proteolizle olgun protein haline gelir. VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerine bağlanarak endotel hücre proliferasyonu ve lenfanjiogeneze neden olur. VEGF-E, VEGF-E parapox virüslerinde sentezlenmektedir. VEGFR-2'ye bağlanarak damar geçirgenliğinin artmasına ve endotel hücrelerinin proliferasyonuna neden olmaktadır. VEGF-F, yılan zehirlenmelerinde VEGF-F izoformlarının toksin gibi davrandığı düşünülmektedir. İzoformlarına göre VEGFR-1'e ve/veya VEGFR-2'ye bağlanmaktadır. PlGF, ilk kez plasental dokudan izole edilmiş olup kalp ve akciğerlerde de üretilmektedir. VEGFR-1 ve NP-1'e bağlanır. Anjiogeneze seyreden inflamasyon, ödem, kolorektal kanser gibi çeşitli patolojilerle ilişkili bulunmuştur (Vural, 2018).

1.3. Anti – VEGF İlaçlar ve Göz Hastalıklarındaki Kullanım Alanları

Son yıllarda yapılan çalışmalarda VEGF ve reseptörlerinin, oküler neovasküler hastalıkla ilişkisi saptanmıştır. Bu çalışmalarda (örn. diabetik retinopati, retinal ven oklüzyonu, iris neovaskülarizasyonu, prematür retinopatisi, yaşa bağlı neovasküler maküla dejenerasyonu [YBMD], korneal neovaskülarizasyon, üveitler ve göz içi tümörler) VEGF'nin anormal damar büyümesi sürecinde yer aldığını gösteren veriler elde edilmiştir (Anthony P Adamis ve David T Shima, 2005). Doku kültüründe, çok sayıda retinal hücre tipi VEGF üretmektedir ve VEGF üretimi hipoksik mikroçevrede artmaktadır (Lloyd Paul Aiello ve ark., 1995). Hipoksik retina hücrelerinin ürettiği tüm faktörler arasında, VEGF'nin tek endotelial hücre mitojeni olduğu düşünülmektedir (Shima ve ark., 1995). VEGF inhibe edilirse mitojenik kapasite ortadan kalkmaktadır. Retina iskemik hale getirildiğinde VEGF düzeyleri retinada artmaktadır, vitreus ve aközde de yüksek seyretmektedir. VEGF'nün birincil kaynakları; ganglion, müller ve RPE hücrelerinin de dahil olduğu nöral hücrelerdir (Miller ve ark., 1994). VEGF'nün kornea, iris, retina ve koroide ilişkin deneysel yeni damarlanma modellerinde seçimli olarak inhibe edildiğinde, bu dokularda kan damarı büyümesinin baskılandığı gösterilmiştir. Bununla beraber, diğer değerler açısından normal olan bu dokularda VEGF düzeyleri deneysel olarak arttırıldığında, anormal yeni damarlanmanın tetiklendiği tespit edilmiştir (Keklikçi ve ark., 2008).

Son yıllarda oküler neovaskülarizasyon patogenezindeki şifrelerin çözülmeye başlanması ve VEGF'nün bu döngüdeki öneminin daha çok anlaşılmasıyla; pek çok göz hastalığının tedavisinde anti-VEGF ajanlara duyulan ilgi de giderek artmıştır.

1.3.1. Ranibizumab (rhuFab) (LUCENTIS® , Genentech, San Francisco, CA, USA)

Ranibizumab (rhuFab) rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş humanize bir fare antikorudur. Ağırlığı 48 kDa olup ve VEGF-A'nın tüm izoformlarına bağlanarak inhibisyon yapar. Tek bir intravitreal enjeksiyon halinde 0,05ml'de 0,5 mg dozunda uygulanır. İlaç iç

limitan membrana geçerek subretinal alana ulaşır (Çakmak ve ark., 2014; Keklikçi ve ark., 2008). Ranibizumab'ın tüm göz kompartımanlarındaki ortalama yarılanma ömrü ortalama 3 gündür (Gaudreault ve ark., 2005).

Oftalmolojide Ranibizumab neovasküler tip YBMD, diyabetik makula ödemi (DMÖ) ve retinal ven tıkanıklığı tedavisinde FDA (Food and Drug Administration) ve Sağlık Bakanlığı onayıyla kullanılmaktadır. Endoftalmi, göz içi basınç artışı, retina pigment epiteli yırtığı, konjonktival hemoraji, katarakt gibi oküler yan etkilerinin yanı sıra; sistemik kan basıncında artış, inme, miyokard enfarktüsü, tromboembolik olaylar, deri reaksiyonları, nefropati gibi sistemik yan etkileri de bildirilmiştir (Günay ve Çelik, 2015).

1.3.2. Aflibercept (VEGF Trap-Eye) (EYLEA® , Regeneron/Bayer, Tarrytown, NY, USA)

Aflibercept, VEGF-A ve B'nin tüm izoformlarına bağlanan ve inhibe eden rekombinan füzyon proteinidir. Fc kısmı insan immünglobülin G'ye bağlanır. VEGF-A izoformlarına Ranibizumab ve diğer anti-VEGF ajanlara nazaran daha yüksek bir afiniteyle bağlanır. Bunun dışında vitreus içi enjeksiyon sonrası yarı ömrü daha uzundur ve yoğun vasküler geçirgenlikten sorumlu olan PlGF 1 ve 2 gibi diğer VEGF üyelerine de bağlanır (Çelik, 2017). Tek bir intravitreal enjeksiyon halinde 0,05ml'de 2 mg dozunda uygulanır (Papadopoulos ve ark., 2012). Molekül ağırlığı 110 kDa olan Aflibercept'in yarılanma ömrü 4-5 gündür (Stewart ve Rosenfeld, 2008).

Aflibercept uygulamalarına dair konjonktival kanama, ağrı, katarakt, vitreus dekolmanı, gözde uçulan cisimler hissi, göz içi basıncında artış, sulanma, endoftalmi gibi oküler yan etkilerin yanı sıra; inme, miyokard enfarktüsü, tromboembolik olaylar ve allerjik aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi sistemik yan etkiler bildirilmiştir (Brown ve ark., 2013). İlaç YBMD, retinal ven tıkanıklığı ve DMÖ tedavisinde FDA onayı almıştır. Ülkemizde 2015'ten beri kullanılmaktadır.

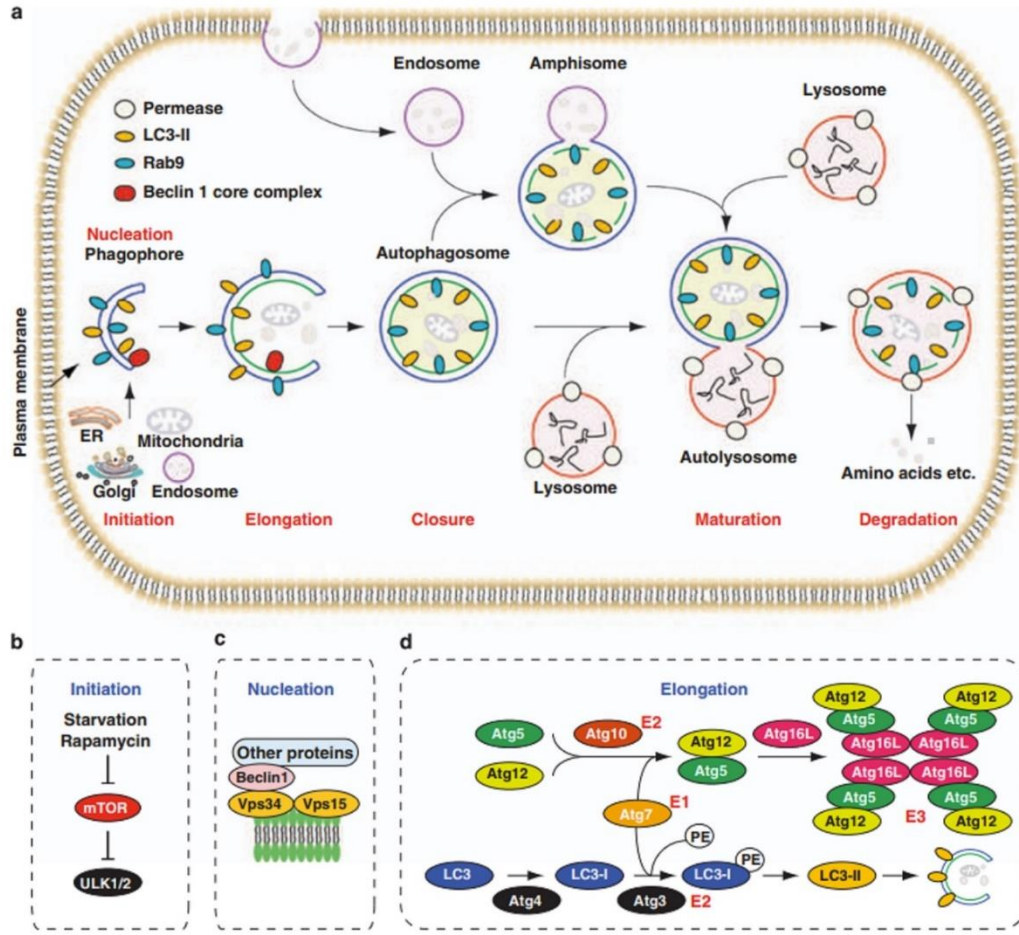
1.4. Otofaji

1974'te Nobel Ödülü sahibi Christian de Duve, altmış yıl önce peroksizomların ve lizozomların keşfi nedeniyle hücrel otofajik yapıları elektron mikroskobu ile gözlemledi. 1990'ların başında Japon bilim adamı Yoshinori Ohsumi, otofagozom oluşumu için gerekli olan otofaji ile ilişkili (ATG) genleri tanımladı ve ökaryotik hücrelerin bileşenlerini nasıl geri dönüştürdüğünü açıkladı (Chang ve ark., 2022). Otofaji, yeni sentez için nükleotidler, şekerler, yağ asitleri ve amino asitler gibi farklı substratlar oluşturmak için seçici adaptörler veya seçici olmayan toplu bozunma (degradasyon) yoluyla hasarlı proteinleri/organelleri lizozomlara alabilir (Ohsumi, 2014). Ohsumi'nin bulguları, normal hücrelerin fizyolojisinde otofajinin rolü ve nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalık ve durumların patogeneğinde araştırmaların önünü açtı. Bu nedenle Yoshinori Ohsumi, 2016 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görüldü.

Üç ana otofaji türü vardır: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji. Her ne kadar üç yol arasında sinyal iletim karışması (crosstalk) meydana gelebilse ve üç yol da bileşenleri parçalanmak üzere lizozomlara iletse de aralarındaki dağıtım mekanizmaları oldukça farklıdır. Makrotofaji, otofajinin en yaygın şekli olduğundan, otofaji genellikle makrotofaji anlamına gelir. Makrotofaji, anormal proteinleri ve organelleri otofagozomlara paketlemek için otofagozom oluşumunu ve içerikleri sindirmek için lizozomlarla füzyonu gerektirir. Makrotofajinin çoğu biçimi seçicidir (Anding ve Baehrecke, 2017). Şaperon aracılı otofaji, HSC-70 adlı şaperona bağlı bir bozunma yoludur. HSC70, KFERQ pentapeptit içeren sitozolik katlanmamış proteinleri tanır ve transmembran reseptörü LAMP-2A ile bağlanarak lizozomlara iletir. LAMP-2A kompleksi daha sonra HSP90 ile birleşerek yer değiştirmiş substrat proteinlerinin bozunma için lizozomlara girmesine yardımcı olur. LAMP-2A kompleksi ayrıca bir monomere ayrıştırılır ve sonunda lipid mikro alanında katepsin A ve bir metaloproteinaz tarafından parçalanır (Kaushik ve Cuervo, 2018). Mikrotofaji, hücrelerde proteinler ve organeller dahil olmak üzere otofajik kargoları yutmak için lizozomal zarın mikro kısmı olarak tanımlanmaktadır. Mikrotofaji, membran deformasyonunun morfolojisine göre üç tipte sınıflandırılmaktadır: Tip 1,

lizozomal çıkıntı; Tip 2, lizozomal invajinasyon; ve Tip 3, endozomal invajinasyon. Bazı ATG proteinleri ya da HSC70 veya ESCRT proteinleri, mikrootofajideki membran deformasyon sürecine dahil olmaktadır (Oku ve Sakai, 2018). Otofajinin ilk adımı, sitoplazmik organellerin ve proteinlerin bir izolasyon zarı (fagofor) içinde çevrelenmesi ve tecrit edilmesidir. Membranın fagofor üretmesi için potansiyel kaynaklar arasında Golgi kompleksi, endozomlar, endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ve plazma membranı bulunur. Gelişmekte olan zarlar, otofagozom adı verilen çift zarlı veziküller oluşturmak için kenarlarında kaynaşır. Otofagozomlar, asidifiye endozomal ve/veya lizozomal veziküller ile füzyon dahil olmak üzere kademeli bir olgunlaşma sürecinden geçer. Nihayet kaynaştıkları (fusion), bozundukları (degradation) ve geri dönüşüme (re-cycling) uğradıkları sitoplazmada, sitoplazmik içeriklerin lizozomal bileşenlere iletilmesini sağlarlar. Memeli otofajisi süreci altı ana aşamaya ayrılır: Başlatma; Nükleasyon; Elongasyon; Kapanma; Olgunlaşma; ve Degradasyon (Bozunma) ya da Ekstrüzyon (Şekil 1.6.) (Kang ve ark., 2011).

Otofaji ile ilişkili 30'dan fazla spesifik gen [otofaji ile ilgili genler (ATG)] bulunmuştur. ATG kodlayıcı protein, işbirlikçi şeklinde otofagozom oluşum aşamalarında yer alır. ATG ve bununla ilgili protein ifade derecesi saptanarak, otofaji düzeyini değerlendirebilir. Organizmada fizyolojik ve patolojik koşullarda belli bir dereceye kadar otofaji vardır ve normal sınırlar içinde hücreler için koruma ve yenileme görevi görür. Bununla birlikte, otofaji aşırı aktive edilirse, hücrelerin hasarına ve hatta ölümüne neden olur (Zhu ve Du, 2018).



Şekil 1.6. Otofajinin Evreleri: Başlatma; Nükleasyon; Elongasyon; Kapanma; Olgunlaşma; ve Degradasyon (Bozunma) ya da Ekstrüzyon (Kang ve ark., 2014).

1.4.1. Otofaji ve Anjiyogenezis İlişkisi

Otofaji, ökaryotik hücrelerde yaygın olarak var olan ve hücrelerin yaşlanan veya hasar görmüş organellerini geri dönüştürerek homeostazı sürdürmesine yardımcı olan bir metabolik süreçtir. Yanı sıra; beslenme eksiklikleri, hipoksi, radyasyon ve kemoterapi gibi çeşitli streslerin varlığında tümör hücreleri de, normal metabolizma gereksinimlerini karşılamak ve hücre sağkalımını sürdürmek için çeşitli yollar yoluyla otofajiyi yukarı doğru (up-regulation) düzenleyebilir (Yorimitsu ve Klionsky, 2007). Otofaji disfonksiyonunun

kanser, enfeksiyon, nöron dejenerasyonu, kardiyomiyopati (Levine ve Kroemer, 2008) ve intraoküler neovaskülarizasyon (Zhu ve Du, 2018) ile yakın ilişkisi olduğu bildirilmiştir.

Otofajinin tümör hücrelerini tümörigenez aşamasında öldürmesi ve tümör büyümesini engellemesi, bir kez tümör oluşumu otofajisinin ise çeşitli olumsuz çevre koşullarına karşı tümör hücrelerinin hayatta kalmasını koruması görüşü oldukça yaygın kabul görmektedir. Örneğin meme ve prostat kanserleri gibi çok sayıda insan kanserinde sıklıkla iki temel otofaji geni olan Beclin1 ve/veya ATG4'ün kaybı olduğundan, otofajinin tümörigenezi baskılamada çok önemli bir rol oynadığı varsayılmıştır (Marino ve ark., 2007; Qu ve ark., 2003). Öte yandan çelişkili bir şekilde artan kanıtlar, yukarı doğru (up-regulation) seyreden otofajik aktivitelerin; tümör hücrelerini hipoksi, kemoterapi ajanları ve radyasyon gibi çeşitli metabolik streslere karşı koruyabileceğini ve ilaç direncine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Chen ve ark., 2010; Karantza-Wadsworth ve ark., 2007).

Otofajinin, farklı oküler hastalıklarda potansiyel katılımı söz konusudur. Otofaji; yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, glokom, optik nöropati ve diyabetik retinopati dahil olmak üzere birçok göz hastalığının patogenezinde yer alır. Genel olarak, otofajik akış, retina hücrelerini oksidatif kaynaklı hasardan korur. Bununla birlikte, aşırı otofajik akış ise hücre ölümüne neden olabilir. Örneğin yaşa bağlı maküla dejenerasyonunda RPE hücrelerinde ve diyabetik retinopatide perisitlerde olduğu gibi retinal dejenerasyona yol açabilir (Chang ve ark., 2022). Klinik araştırmalarda ayrıca VEGF'i engellemenin gözde neovaskülarizasyon oluşumunu etkili bir şekilde engelleyebildiği ve anti-VEGF tedavisinin gözlerdeki neovaskülarizasyonu tedavi etmede birincil seçenek haline geldiği de gösterilmiştir. Yakın zamanda yayınlanan birçok çalışma, otofaji ve VEGF'nin birbiriyle ilişkili olduğunu doğrulamıştır. Örneğin Chu ve ark., sigara içenlerde RPE hücrelerinin otofaji aktivasyonunun, RPE hücrelerini koruyabilen ve hücre apoptozunu azaltabilen VEGF ekspresyonunu desteklediğini bulmuşlardır. Tütün bileşenleri, hücre canlılığını etkilemektedir ve VEGF ile reseptörünün ekspresyonunu indüklemektedir. Eksojen VEGF, otofaji akışlarını artırarak tütün bileşenlerinin neden olduğu RPE hücre ölümünü hafifletmede rol oynar (Chu ve ark., 2013). Ye ve ark., malondialdehitin (MDA) ARPE-19 hücrelerinde VEGF ekspresyonunu artırabildiğini, bu işlemin ise otofaji-lizozom inhibitörü

tarafından inhibe edilebildiğini bulmuşlardır (Ye ve ark., 2016). Li ve ark., hipoksinin rhesus maymunlarının koroid retinal vasküler endotel hücreleri (RF/6A) otofajisini aktive edebildiğini, vasküler endotel hücre göçünü ve tüp oluşumunu indüklediğini bulmuşlardır. İnhibisyon otofajisinin, RF/6A hücre göçünü ve in vitro tüp oluşumunu baskılayabildiği ve hipoksi kaynaklı anjiyogenez oluşumunda otofajinin önemli bir rol oynadığı çıkarımında bulunmuşlardır (Li ve ark., 2016).

1.4.2. Beclin1

Bir memeli mayası ortolog'u (homolog gen sekansı bölgesi) Atg6/Vps30 ya da diğer adıyla Beclin1; bağışıklık, gelişim, tümör baskılama, yaşam süresinin uzatılması ve belirli kardiyak ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerle bağlantılı olan temel bir otofaji proteinidir. İnsanda BECN1 geni tarafından kodlanır. Beclin1, lipid kinaz Vps-34 proteinini düzenlemek (Şekil 1.7.) ve Beclin1-Vps34-Vps15 çekirdek kompleks (core complex) oluşumunu desteklemek için çeşitli kofaktörlerle (Atg14L, UVRAG, Bif-1, Rubicon, Ambra1, HMGB1, nPIST, VMP1, SLAM, IP3R, PINK ve hayatta kalma) etkileşime girer. Böylece otofajiyi indükler. Tersine, Beclin1'in BH3 alanı; Bcl-2 veya Bcl-XL'e bağlanır ve bunlar tarafından inhibe edilir. Bu etkileşim, Bcl-2 ve Beclin 1'in fosforilasyonu veya Beclin 1'in her yerde bulunmasıyla bozulabilir. İlginç bir şekilde, Beclin1'in kaspaz aracılı bölünmesi, apoptoz ve otofaji arasındaki sinyal karışıklığını (crosstalk) teşvik edebilir. Beclin1, alışlagelmişin dışında, bir Bcl-2-homoloji (BH)-3 domain only otofaji proteini olma özelliğini taşımaktadır. Bu özelliğiyle Beclin1, ayrıca kendi kendine ilişki kurma yeteneğine (capability to self-association) de sahiptir. Bu sayede Beclin1 kendi kendine etkileşimi (self-interaction); canlı hücrelerde amino asit yoksunluğu, rapamisin kaynaklı otofaji, PI3KC3/Vps34, Bcl-XL veya UVRAG aşırı ekspresyonundan etkilenmez (Kang ve ark., 2011). Beclin1 yalnızca otofagozom oluşumunda değil, aynı zamanda otofagozom/endozom olgunlaşmasında da işlev görebilir (He ve Levine, 2010).

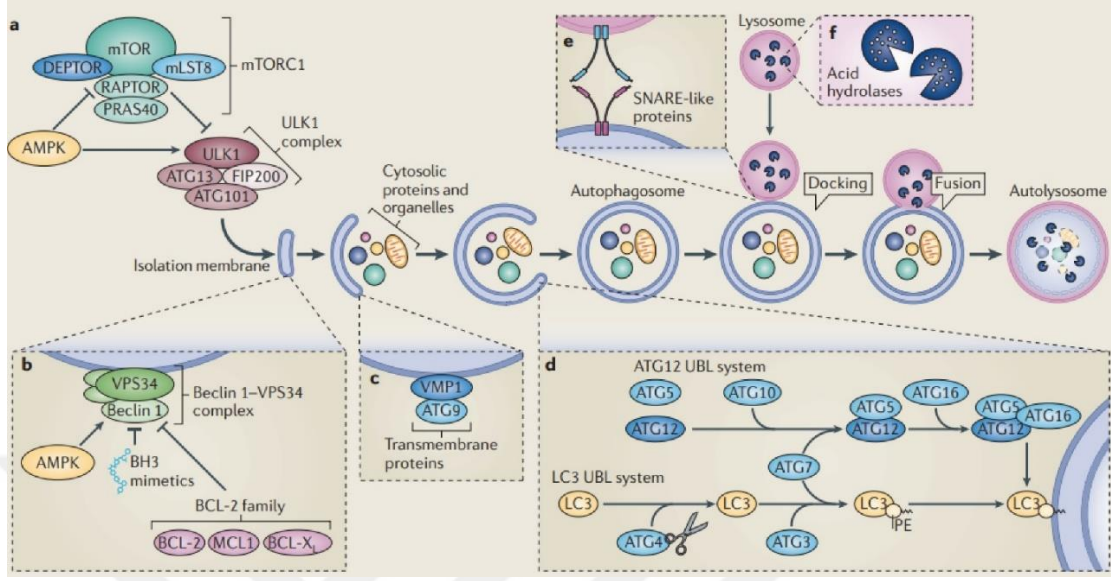
Genel olarak, Bcl-2 ailesinin 'BH3-only' üyeleri, hayatta kalma yanlısı (pro-survival) proteinlere bağlanabilir ve bu proteinleri antagonize ederek artan apoptozise yol açabilir. Fakat, diğer bilinen BH3-only proteinlerinin aksine, Beclin 1 aşırı eksprese edilse bile proapoptotik bir molekül olarak işlev görmez. Bcl-2, Beclin 1 ile etkileşime girdiği için anti-apoptotik potansiyelini kaybetmez. Buna karşılık Beclin 1; TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand), kemoterapi, ışınlama, immünoterapi, besin yoksunluğu, anjiyogenez inhibitörleri ve hipoksi dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda anti-apoptotik bir role sahiptir (Kang ve ark., 2011).

Beclin1 ekspresyonundaki ve/veya fonksiyonel aktivitedeki azalmalar: kansere, Alzheimer hastalığına, Huntington hastalığına ve desmin ile ilişkili kardiyomiyopatiye karşı artan duyarlılıkla; mikrobiyal patogenezdaki değişikliklerle; apoptotik ceset temizliği ve gelişimindeki kusurlarla; ve yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir (Levine ve Kroemer, 2008).

1.4.3. ATG4

ATG4 (Autophagin-1), otofaji sırasında lipidasyonu için gerekli bir reaksiyon olan ATG8/APG8/AUT7'nin karboksil terminalinin bölünmesinden sorumlu benzersiz bir sistein proteazdır (Levine ve Klionsky, 2004). İnsan ATG4 homologları, üç insan ATG8 homologunun, mikrotübüle bağlı protein hafif zincir 3 (LC3), GABARAP ve GATE-16'nın karboksil uçlarını ayırır (Tanida ve ark., 2004). ATG4, çekirdeğin seçici otofajik bozunmasının (nükleofaji) yanı sıra, ayrıca hücrel enerji gereksinimlerini karşılamak ve aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini önlemek için mitokondriyi bazal bir seviyeye çıkararak mitokondriyal miktar ve kaliteyi düzenlemeye katkıda bulunan mitofaji için de gereklidir (Ichimura ve ark., 2000).

ATG8 öncülerini işlemenin yanı sıra, ATG4 başka bir önemli rol daha oynar: C-terminal karboksil kısmı ile fosfatidiletanolaminlerin (PE) amin grubu arasında delipidasyon veya dekonjugasyon olarak adlandırılan ATG8-PE'yi ayırmak. ATG8-PE'nin ATG4 tarafından dekonjugasyonunun en az iki rolü vardır: Biri konjugasyon reaksiyonunun bir sonraki turu için ATG8'i geri dönüştürmek ve diğeri doğrudan izolasyon membranının 'elongasyon' adımını desteklemektir. ATG8'in ATG4 tarafından hem işlenmesi hem de delipidasyon reaksiyonları, otofagozom oluşumu için önemli olduğundan, ATG4'ün inhibisyonu, otofagozom oluşumu aşamasında otofajinin inhibisyonuna yol açar ve bu nedenle ATG4, otofaji inhibitörleri geliştirmek için çekici bir hedeftir (Şekil 1.7.). Örneğin genel olarak, büyüyen tümör hücrelerinin, hücrelerde besin üretmek için otofajiyi aktive ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle ATG4, kanserler için potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edilmiştir. Dört memeli ATG homologu arasında ATG4B, diğer homologlardan çok daha yüksek aktivite sergiler ve bu nedenle ATG4 inhibitörlerini geliştirmek için bir hedef olarak yaygın şekilde kullanılır. Bazı araştırmalar, ATG4B'nin osteosarkoma tümör hücrelerinin büyümesinde olumlu bir rolü veya kronik miyeloid lösemi stem (kök)/progenitör (öncül) hücrelerinde ATG4B'nin yüksek seviyeli ekspresyonu gibi ATG4 ile kanser arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Her insan tümörü, dört ATG4 geninde farklı genetik değişiklik modellerine sahiptir. ATG4 inhibitörlerini taramak için, in vitro ATG4 aktivitesini ölçebilen çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Hatta canlı hücrelerde ATG4 aktivitesini ölçmek için yöntemler de geliştirilmiştir (Maruyama ve Noda, 2018).



Şekil 1.7. Otofaji, Beclin1 ve ATG4 ilişkisi (Marino ve ark., 2014).

1.5. Matriks Metalloproteinazlar

Bir metalloproteinaz veya metalloproteaz (MP), katalitik mekanizması bir metal içeren herhangi bir proteaz enzimidir. Miyogenez olarak bilinen bir süreçte embriyo gelişimi sırasında kas hücrelerinin füzyonunda önemli bir rol oynayan ADAM12'yi buna örnek olarak gösterebiliriz. Çoğu metalloproteinaz çinko gerektirir, ancak bazıları kobalt kullanır. Matriks metalloproteinazlar veya matriksinler olarak da bilinen matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ise, kalsiyuma bağımlı çinko içeren endopeptidazlar olan metalloproteinazlardır. Diğer aile üyeleri adamalysinler, serralysinler ve astasinlerdir. MMP'ler, metzincin süper ailesi olarak bilinen daha geniş bir proteaz ailesine aittir. MMP'ler, ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerinin proteolitik parçalanması, hücre yüzeyi proteinlerinin aktivasyonu ve zara bağlı reseptör moleküllerinin dökülmesi yoluyla ESM'nin yeniden modellenmesinde kritik bir rol oynar. Diğer proteinazların, büyüme faktörlerinin, kemokinlerin ve hücre reseptörlerinin aktivitesini düzenlerler ve çeşitli hücre fonksiyon formlarında hücre göçü, farklılaşması, çoğalması ve hayatta kalması gibi çeşitli biyolojik aktivitelere aracılık ederler. Bugüne kadar insanlarda tespit edilen 23 farklı MMP üyesi vardır (Raeeszadeh-Sarmazdeh ve ark., 2020).

Metalloproteinaz (MP) aktivitesi, zimojen formunun proteolitik aktivasyonu ve bunun doğal inhibitörü olan doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP'ler) ile sıkı bir şekilde düzenlenir. Patolojik koşullar altında, metalloproteinazların aşırı ekspresyonu veya TIMP'lerin yetersiz kontrolü, doku yeniden biçimlenmesinde (remodeling) düzensizliğe yol açarak kanser, nörodejeneratif hastalıklar, artrit, kardiyovasküler hastalıklar ve fibrotik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklara neden olur. MMP'leri hedeflemeye yönelik erken çabalar, klinik deneylerin sonraki aşamalarında büyük ölçüde başarısız olsa da, metalloproteinazlar, çeşitli hastalıkların ilerlemesindeki kilit rollerine dayalı olarak oldukça arzu edilen bir terapötik hedef olmaya devam etmektedir (Verma ve Hansch, 2007).

1.5.1. MMP2

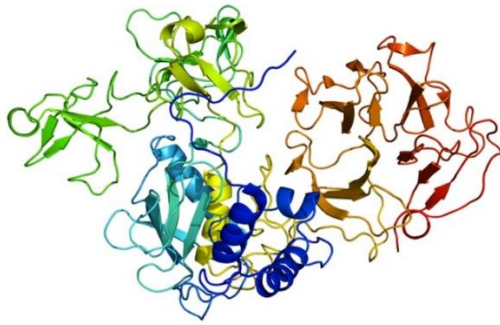
MMP-2 (ve MMP-9) Jelatinazlar ailesine mensuptur. Kompakt bir kollajen bağlama alanı sağlayan ve Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajenleri, jelatini, elastini, proteoglikan çekirdek proteinlerini, miyelin temel proteinini, fibronektini, fibrillin-1'i ve TNF- α ile IL-1b öncüllerini parçalayan üç fibronektin tip II modülü içerirler. Jelatinazlar, implantasyon ve yara iyileşmesi gibi çeşitli fizyolojik durumlarda ekstraselüler matriks (ESM) yıkımında (degradasyon) ve yeniden şekillenmesinde (remodeling) önemli bir role sahiptir. Jelatinaz-A veya 72-kDa Tip IV kollajenaz olarak da adlandırılan MMP-2 (Şekil 1.8.), bazal membranın (BM) ana bileşeni olan kollajen Tip IV'ün yanı sıra bozulmuş kollajen ve bazı kollajen olmayan ESM glikoproteinlerini ayırmakla görevlidir (Amalinei ve ark., 2007). MMP-2 ayrıca doğal Tip I kollajenin de yıkımından sorumludur. TNF- α ve β , MMP-2 üretimini uyarır iken erken konseptus (blastokist) ve IFN- τ , MMP-2 üretimini baskılar (Hashizume, 2007).

1.5.2. TIMP1

Doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP-1), 1975 yılında insan serumunda bulunan ve cilt fibroblastlarından salınan bir kollajenaz inhibitörü formunda keşfedildi. 1985 yılında, eritroid progenitör hücrelerin büyümesini uyardığı açıklanan bir protein klonlandı ve 28-kDa ağırlığında olan TIMP-1 (Şekil 1.8.) ile aynı olduğu bulundu. 1985 ve 1996 yılları arasında, TIMP ailesinin diğer üç üyesi, protein düzeyinde moleküler klonlama ve karakterizasyon ile tanımlandı. Bu dört çeşit TIMP de, MMP'lerin doğal endojen inhibitörleri olma özelliğini taşımaktadır. TIMP ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin, kanser ve kalp yetmezliği dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların ortaya çıkması ve ilerlemesi ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ries, 2014).

Uzun bir süre boyunca, TIMP'ler işlevleri açısından neredeyse yalnızca MMP inhibitörleri olarak incelenmiştir. Bununla birlikte, son on yılda biriken kanıtlar, TIMP'lerin kendi başına sinyal molekülleri olarak hareket ederek, ek biyolojik aktivitelere sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Bu, metalloproteinaz inhibisyonundan bağımsız olarak hücrel tepkileri indüklemek için spesifik yüzey reseptörlerine doğrudan bağlanarak gerçekleşir. TIMP'lerin bu sitokin benzeri aktiviteleri, hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma ve anjiyogenez modülasyonunu içerir (Lambert ve ark., 2004).

MMP2



TIMP1



Şekil 1.8. MMP2 ve TIMP1'in protein görünümü. Görüntüler PDB'den (Protein Data Bank) alınmıştır. (Sırasıyla PDB ID: 1CK7 ve 1D2B)

1.6.1. Tezin Amacı

Ranibizumab ve Aflibercept, klinikte YBMD, DRP, RVO, ROP başta olmak üzere çeşitli endikasyonlarla yaygın kullanıma sahiptir. Bununla birlikte söz konusu ilaçların lokal ve sistemik istenmeyen etkileri toksisite araştırmamız için temel oluşturmuştur. Oküler toksisite testlerinde yaygın kullanılan ve in vivo testlere uyumluluk gösterecek in vitro testlerin, bu ilaçların moleküler toksisitesinin anlaşılmasında önemli bir potansiyeli olacağı düşünülmektedir. Bir diğer önemli nokta söz konusu ilaçların; hücre çoğalması, ölümü, doku yeniden şekillenmesi (remodeling) ve patolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan otofaji ve matriks metalloproteinaz aktivitesi ile ilgili ilişkisinin aydınlatılmasıdır.

1.6.2. Tezin Hipotezi

Bu tezin hipotezini Ranibizumab ve Aflibercept'in insan RPE hücrelerinde toksik etkisinin olup olmayacağının araştırılması ile yine bu iki ilacın insan RPE hücrelerinde otofajiye ve matriks metalloproteinaz aktivitesine tesirinin olup olmayacağının incelenmesi olmaktadır. Bu hipotezi test etmek için öncelikle ARPE-19 hücrelerinde Ranibizumab ve Aflibercept'in sitotoksik etkinliğin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Tezin amacı doğrultusunda Ranibizumab ve Aflibercept'in sitotoksik etkinliğin MTT testi ile analiz edilmesi hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra ARPE-19 hücrelerinde Ranibizumab ve Aflibercept'in otofaji ile ilişkisini ortaya çıkarmak için Beclin1 ve ATG4 mRNA ekspresyon analizi ile matriks metalloproteinaz aktivitesi ile ilişkisini ortaya çıkarmak için MMP-2 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonu analizi yapılması da ayrıca hedeflenmiştir.

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Deneyisel çalışmalar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı in vitro ve Toksikoloji Laboratuvarları ile Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Kas İskelet Sistemi ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Gerekli olan kimyasal ve sarf malzemeler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Kas İskelet Sistemi ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı imkanlarıyla sağlandı.

2.1.1. MTT Testinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

MTT testinde kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. MTT testinde kullanılan kimyasal malzemeler.

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Fetal Bovine Serum	Lonza	DE14-801F
Trypsin/ EDTA	Lonza	BE02-007E
DMEM hücre besiyeri	Lonza	BE12-169F
%1 Penisilin/streptomisin 10000 units/ml	Lonza	DE17-602E
%1 non-essential aminoasit (100X)	Lonza	BE13-114E
DMSO 5X	Sigma-Aldrich	D2650-5X10
PBS (Phosphate buffer saline, 7,4 pH, 1X)	Invitrogen	10010-031
MTT((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma	M5655
Triton X-100	Fisher	BP151-500

2.1.2. MTT Testinde Kullanılan Sarf Malzemeler

MTT testinde kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. MTT testinde kullanılan sarf malzemeler.

Sarf Madde Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Serolojik steril pipetler, 1 ml	Sarstedt	86.1251.001
Serolojik steril pipetler, 5 ml	Sarstedt	86.1253.001
Serolojik steril pipetler, 10 ml	Sarstedt	86.1254.00
Steril tüpler, 15 ml	Sarstedt	62.554.502
Steril tüpler, 50 ml	Sarstedt	62.547.254
Flask T-25	Sarstedt	83.3910.002
Flask T-75	Sarstedt	83.1813.002
96 kuyucuklu plate	Sarstedt	83.1835
Cryo tüp 2 m	Biosigma	N40.3683
Lam	Marienfeld	C100000
Lamel	Marienfeld	C911040
Neubaure hemositometre	Marienfeld	0630010
1000 µl pipet ucu	BIOHIT	791004
200 µl pipet ucu	FL	28052
10 µ filtreli pipet ucu	BIOHIT	790011F
0,2 S PAT enjektör filter	Sarstedt	83.1826.001
0,45 S PAT enjektör filter	Sarstedt	83.1826
1,5 ml mikrosantrifüj tüpü	Bioplastic	B74011
2 ml eppendorf tüp	Bioplastic	B71420

2.1.3. MTT Testinde Kullanılan Cihazlar

MTT testinde kullanılan cihazlara Çizelge 2.3.'de yer verilmiştir.

Çizelge 2.3. MTT testinde kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Laminar akımlı kabin	Holten	1.8
İnvert Mikroskop	Juli BR	JULI-BR04
CO2 inkubatör	Nüve	GP217745
Su arıtma cihazı (ultrasaf su)	Milliporex	Synergy 185
Su banyosu (ısıtmalı)	Nüvex	BM402
SpectraMax	Molecular Devices	İ3x
Pipet 1000 µl	Gilson Pipetman	F123602
Pipet 100 µl	Gilson Pipetman	F144057P
Pipet 10 µl	Gilson Pipetman	F81022
Santrifüj	Sigma	3K30
Vorteks	Biosan	Biovortex VI
Hassas terazi	SELES EHB	PFB.600-2M

2.1.4. RNA İzolasyon İşleminde Kullanılan Sarf Malzemeler

RNA izolasyon işleminde RNA ekstraksiyon kiti (GeneAll, 305-101), RiboEx-RNA izolasyon kiti (GeneAll, 301-001), kloroform (likit kromatografi saflığında) (Merck, 67-66-3) kullanılmıştır. Kullanılan sarf malzemeler Çizelge 2.4. de belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. RNA izolasyon işleminde kullanılan sarf malzemeler.

Kullanılan Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma
Filtreli Pipet Uçları	Sarstedt
Hücre Kültürü Flaskları	Sarstedt
96 Kuyucuklu Hücre Kültürü Plakası	Sarstedt
6 Kuyucuklu Hücre Kültürü Plakası	Sarstedt
Kriyotüp (Hücre Kültürü için)	Sarstedt
Steril Falkon Tüpler	NEST Scientific
Maske	Yerli
Nitril Eldiven	Yerli

2.1.5. RNA İzolasyon İşleminde Kullanılan Cihazlar

RNA izolasyon işleminde kullanılan cihazlar Çizelge 2.5.'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.5. RNA izolasyon işleminde kullanılan cihazlar.

Kullanılan Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma
37°C %5 CO ₂ 'li Ettüv	Nüve
Su Banyosu	Nüve
Otoklav	Panasonic
Mikropipet 1000µl	Eppendorf
Mikropipet 100µl	Eppendorf
Mikropipet 10µl	Eppendorf
Mikropipet 1µl	Eppendorf
Buz Makinası	Yerli
Ultra-Santrifüj	Thermo Fischer Scientific

2.2.6. Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (qRT-PCR) Analizi

Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (qRT-PCR) Analizinde kullanılan malzemeler alt başlıklar halinde incelenmiştir.

2.2.6.1. qRT-PCR’da Kullanılan Kitler

PCR analizinde cDNA sentez kiti (Cat No: E0801-02; EURx) ve BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye (Applied Biological Materials Inc. abm) kiti kullanılmıştır.

2.1.6.2. PCR Primerleri

PCR analizinde GAPDH (Sentegen), ATG4 (Sentegen), Beclin1 (Sentegen), MMP2 (Sentegen), TIMP1 (Sentegen) primerleri kullanılmıştır. Çizelge 2.6.’te qPCR analizi yapılan genlere ait primerler detaylıca belirtilmiştir.

Çizelge 2.6. qPCR analizi yapılan genlere ait primerler.

Primer	Dizilim
Beclin1	İleri (5'-ATTTCAGAGATACCGACTTGTTC-3') Geri (5'-AATCTTGCCCTTCTCCACATCC-3')
ATG4	İleri (5'-CACTGACTACCTAGAAGAATATCC-3') Geri (5'-TTCCTCCAGATCAAACCTCCT-3')
TIMP1	İleri (5'-AATCCGACCTCGTCATCAG-3') Geri (5'-GTTGTGGGACCTGTGGAAGT-3')
MMP2	İleri (5'-TGACGGTAAGGACGGACTC-3') Geri (5'-ATACTTCACACGGACCACTTG-3')
GAPDH	İleri (5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3') Geri (5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3')

2.1.7. Gen Ekspresyonu Analizinde Kullanılan Cihazlar

Termal Döngü Cihazı (Applied Biosystems, ABD) ve Gerçek Zamanlı PCR Analiz Cihazı (Rotor-Gene Q, Qiagen, Almanya) kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Ranibizumab ve Aflibercept'in Hazırlanması

Ranibizumab, her 0,23 ml'si, (rekombinan DNA teknolojisiyle Escherichia coli hücrelerinde üretilmiş ve insanlara uyarlanmış bir monoklonal antikör parçası olan) 2,3 mg ranibizumab içeren, 10 mg/ml renksiz ve şeffaf enjeksiyonluk çözeltiye haiz LUCENTIS® kullanıma hazır flakondan temin edilmiştir.

Aflibercept, tek seferde 50 mikrolitrelik doz uygulanması 2 mg aflibercept'e karşılık gelen 40 mg/ml berrak, renksiz ila soluk sarı arası renkte enjeksiyonluk çözeltiye haiz EYLEA® kullanıma hazır flakondan temin edilmiştir.

Ürünler 2-8°C arası soğuk zincirde ve ışıktan korunarak laboratuvara ulaştırılmıştır. Her iki flakon da 2°C-8°C arasında (buzdolabında) saklanabilme özelliğinde olup açıldıktan sonra da oda sıcaklığında (25°C'nin altında) 24 saate kadar dayanabilmektedir.

2.2.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.2.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalından temin edilen, Sıvı nitrojen tankında dondurulmuş kriyojenik bir tüpte saklanan insan RPE hücre dizisi (ARPE-19, Amerikan Tipi Hücre Kültürü [ATCC], katalog No. CRL-2302, Manassas, Virginia, ABD) 37°C'lik bir su banyosunda hızla çözüldü. Pasaj sayısı 3, 4 ve 5 olan Arpe-19 hücre hattı sterilizasyon koşullarına uyularak laminar akım kabineye yerleştirildi.

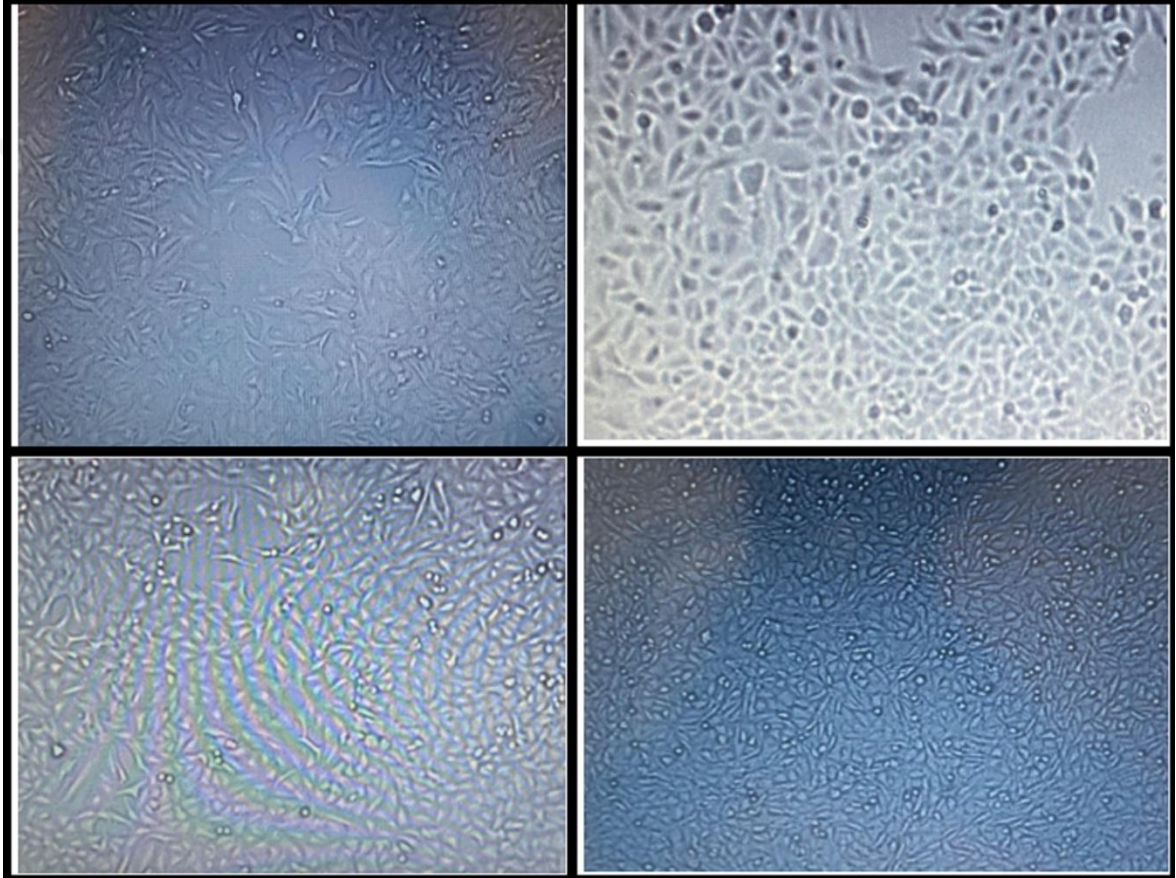
Hücreler pipetasyon işlemi ile tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücrelerin ekimi öncesinde %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom GmbH, Almanya), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 non-essential aminoasit ve Dulbecco's modifiye Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 1:1 (Biochrom GmbH, Almanya) kültür besiyeri hazırlandı. Hazırlanan hücre mediyumu içerisine alınan hücre süspansiyonu 5 dakika, 1500 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler üzerine ise hücre mediyumu eklenerek pipetasyon işlemi yapıldı. Hücreler T25 cm²'lik hücre kültür kaplarına alınarak 37 °C'deki %5 karbondioksit (CO₂) ortamındaki inkübatöre koyuldu.

2.2.2.2. Hücre Pasajlanması

Kültür kaplarının içerisinde bulunan mediyum uzaklaştırıldı ve steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH=7.0) ile hücrelerin yüzey yıkaması yapıldı. PBS, pipet yardımıyla kültür kabından uzaklaştırıldı. %0.05 tripsin - EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit-BM-EdB01-01, Türkiye) solüsyonu eklendi ve kültür kapları inkübatöre kaldırıldı. Yaklaşık 5 dk inkübatörde tutulan hücre kapları tekrar laminar akım kabin içerisine alındı. İçerisine hücre mediyumu eklendi. Pipetasyon işlemi yapıldı ve bu süspansiyon falkon tüpe alınarak 4600 rpm devirde 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dip kısmındaki pelet hücrelerin üzerine, hücre mediyumu koyuldu. Pipetasyon yapılarak 2 tane T25 cm²'lik kültür kaplarına eşit şekilde dağıtıldı. Her bir kültür kabının üzerine yeterli hücre mediyumu eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. Bu şekilde 3 seri pasaj yapılarak çoğaltıldı.

Hücrelerin kültür kaplarının alt yüzeylerine tutunarak çoğalmaları invert mikroskop altında incelendi. Kültür besi yeri, renk değişimi takip edilerek ve hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günlük aralıklarla olacak şekilde değiştirildi. Yapışık bir karaktere sahip olan Arpe-19 hücrelerinin pasaj zamanının (bölünme) geldiğini anlamak için, yapışan hücrelerin %80 kaplanmış (konfluens) olması dikkate alındı (Şekil 2.1.).

Hücreler subkültüre edilerek farklı pasaj numaralarına ait hücreler üretildi. 96 kuyulu hücre pleytlerine aktarılabak hücre sayısını belirlemek amacıyla tripan blue yöntemi ile hücre sayımı yapıldı. Hücreler, 96 kuyulu hücre kaplarına alınarak ilaçların uygulanması için proliferere olmak üzere etüve kaldırıldı.



Şekil 2.1. ARPE-19 Hücrelerinin Farklı Konfluenslerdeki Mikroskopik Görünümleri. JuLI™ FL Fluorescence Cell History Recorder cihazı kullanılmıştır.

2.2.3. Hücelere Ranibizumab ve Aflibercept Uygulaması

Kullanılan anti-VEGF ajanları, Ranibizumab (0,23 mg/0,23 ml; Lucentis; Genentech, San Francisco, California, ABD) ve Aflibercept (4 mg/0,1 ml; Eylea; Bayer/Regeneron, Tarrytown, New York, ABD) ticari preperatları idi. Tıpkı pasajlama işlemindeki gibi, yüzeyi %80-90 oranında kaplamış ve aktif olan hücreler kültür kapları

(T75, 75 cm²) yüzeyinden toplandı. Serum içeren besi ortamı ile süspansiyon haline getirildi ve plaklara aktarıldı. Hemositometre lamı vasıtasıyla hücre sayısı tespiti yapıldı. İnce bir lamel ile lamın üzeri kapatıldı. 200 µl besi yeri ile dilüe edilen 10 µl örnek, steril ependorf içerisinde lamelin kenarına yerleştirildi. Hücre sayısı $\times 10^4$ olarak belirlenen bu sonuç, millilitre süspansiyon başına hücre sayısını elde etmek için seyreltme faktörü olan 20 ile çarpıldı (Butler ve Nowak, 2004; Mather ve Roberts, 1998).

Hücreler için %80 konfluense ulaşılmasının ardından, 96 kuyucuklu plaklara her göze 6000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Klinik doz, intravitreal enjeksiyonlarda klinik olarak kullanılan her ilacın miktarının 4 ml insan vitreousunda eşit olarak dağıldığı varsayılarak (Çizelge 2.7.) hesaplanmıştır (Malik ve ark., 2014). Ranibizumab: Klinik doz 0,5 mg/0,05 ml; 2 $\times$ klinik doz (1 mg/0,1 ml); 4 $\times$ klinik doz (2 mg/0,2 ml) ve 40 $\times$ klinik doz (20 mg/2 ml) olarak dozlanmıştır. Aflibercept de: Klinik doz, 2 mg/0,05 ml; 2 $\times$ klinik doz (4 mg/0,1 ml); 4 $\times$ klinik doz (8 mg/0,2 ml) ve 40 $\times$ klinik doz (80 mg/2 ml) şeklinde dozlanmıştır (Emir ve ark., 2022). 24 saat sonra, Ranibizumab ve Aflibercept her plakta 3 tekrar olmak üzere 3 plakta da en yüksek doz Ranibizumab için 10 mg/ml'den (klinik dozun 40 katı) ve Aflibercept için 40 mg/ml'den (klinik dozun 40 katı) başlayarak hem logaritmik hem de yarı dilüsyonlar halinde uygulandı. Kontrol grupları hücre vasatı pozitif ve negatif kontrol olarak Triton-X kültüre eklendi. Hücreler, 24 saatlik inkübasyon süreci ardından morfolojik olarak incelendi ve hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksosite değerlendirmesi maksadıyla 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi (Präbst ve ark., 2017) uygulandı.

Çizelge 2.7. Bireysel anti- vasküler endotelyal büyüme faktörü (anti-VEGF) ilacı için 'x' konsantrasyonunu gösterir.

Anti-VEGF İlaç	Klinik doz ($\times$) /4 mL vitreous (mg)	4 mL kültür ortamı başına hacim (mL)
Ranibizumab	0,5	0,05
Aflibercept	2	0,05

2.2.4. MTT Deneyi

İlaç uygulanmış hücre plakları 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda kuyulardaki hücre mediumları ve ilaçlar multiple pipet ile ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyudaki hücrelerin yüzey yıkaması PBS ile yapıldı ve sonrasında PBS uzaklaştırıldı. Işığa duyarlı bir yöntem olması nedeniyle karanlık ortamda her bir kuyuya 15 µl MTT solüsyonu eklendi. 96 kuyulu kültür kapları inkübatöre kaldırılarak 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası kuyulara 100 µl DMSO eklenerek formozanın çözündürülmesi sağlandı. Plakların optik dansiteleri 540 nm dalga boyu kullanılarak mikropalak okuyucuda belirlendi (Horakova ve ark., 2001; Mosmann, 1983).

Kontrol grubu, %100 canlı kabul edilen, hiç numune uygulanmayan pozitif kontrol grubu (Maksimal Viabilite, Max V) ve canlılığı %0 kabul edilen, Triton-X uygulanan negatif kontrol grubu (Minimal Viabilite, Min V) olarak iki alt gruptan oluşmaktaydı.

2.2.5. RNA İzolasyon İşlemi

Hücreler kontrol ve uygulama grubu olarak ikiye ayrıldı. İzolasyonda Hybrid-R (GeneAll, Portugal) RNA ekstraksiyon kiti kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plaklarda idi. Kuru buz üzerine aktarıldı ve soğuk 1x PBS ile yıkandı. Toplama işlemi 1000 µl RiboEx çözeltisi ile gerçekleştirildi. İzolasyon üretici kılavuzundaki protokole göre gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR analizi için, totalRNA ölçümlerinde NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı kullanıldı. İntegrite sayı değerleri (RIN) 9,5 üzerinde tespit edildi. RNA uniform olarak yüksek kalitede bulundu.

2.2.6. RNA Ölçümü (Nanodrop)

Frajil bir yapıda olan RNA'nın ekstraksiyonunda yüksek kalitede RNA elde etmek zordur. Ekstraksiyonu gerçekleştirilen numunelerde konsantrasyon ölçümü NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile yapılmıştır.

2.2.7. Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (qRT-PCR) Analizi

Total RNA, gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile Beclin1, ATG4, TIMP1 ve MMP2 mRNA ifadelerini analiz etmek için kullanıldı. İzole edilen RNA örneklerinden NG dART RT kiti (Cat No: E0801-02; EURx) ile cDNA elde edildi. Çizelge 2.8.'de belirtildiği gibi reaktifler eklenerek her örnek için cDNA sentezi yapıldı. Reaksiyonlar PCR cihazında (Applied Biosystems) 50°C'de 40 dakika, 85°C'de 5 dakika koşullarında gerçekleştirildi. qPCR analizleri için BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye kiti (Cat No: MasterMix-S; Applied Biological Materials Inc. ABM) firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Çizelge 2.9.'da belirtilen reaktiflerin olduğu reaksiyonlar gerçek zamanlı PCR analiz cihazı (Rotor-Gene Q, Qiagen, Almanya) kullanılarak, 95°C'de 10 dakika (1 döngü); 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 60 saniye (40 döngü) koşullarında gerçekleştirildi. Her numune 2 kez tekrarlı olacak şekilde çalışıldı ve ortalama değerler alındı. GAPDH'a göre hedef genlerin ekspresyonu, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 2.8. cDNA sentez protokolü.

Reaktifler	Reaksiyon Hacmi
5X NG cDNA Buffer	4 µl
NG dART RT mix	1 µl
Oligo (dT) ₂₀ (50 uM)	1 µl
RNA	2 µl
RNase-free Water	20 µl'ye tamamlandı

Çizelge 2.9. qPCR protokolü.

Reaktifler	Reaksiyon Hacmi
BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye	5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,3 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,3 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz free H ₂ O	10 µl'ye tamamlandı

2.2.8. qPCR İstatistiksel Analizi

Tüm istatistiksel veri analizleri ve grafikler GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak elde edildi. İki den fazla bağımsız grup arasında fark olup olmadığına tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile bakıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak sunuldu. 0,05'ten küçük P değeri farkı istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. ARPE-19 Hücrelerinin Morfolojik İncelenmesi

ARPE-19 hücreleri, Ranibizumab'ın ve Aflibercept'in farklı konsantrasyonlarda (log ve half dilüsyon) 24 saatlik inkubasyonda tutuldu. Ardından invert mikroskopta morfolojik incelemeleri yapıldı. Ranibizumab için her üç pasajda en yüksek doz olan 10 mg/ml'de hücrelerin canlılık oranının yaklaşık %30 civarında olduğu gözlemlendi. Pozitif kontrol grubuyla (sadece hücre vasatı uygulaması yapılan hücreler) yapılan karşılaştırmada gözle ayırt edilebilecek bir morfolojik değişiklik gözlemlenmedi.

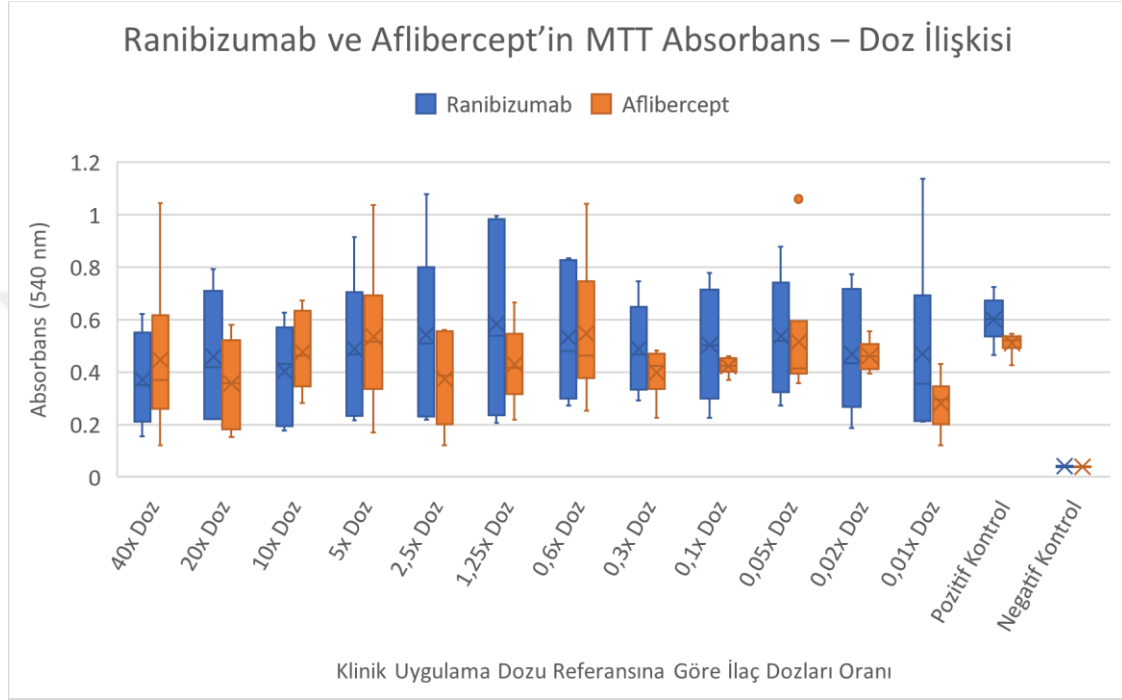
Aflibercept için her üç pasajda en yüksek doz olan 40 mg/ml'de hücrelerin canlılık oranının yaklaşık %33 civarında olduğu gözlemlendi. Pozitif kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada gözle ayırt edilebilecek bir morfolojik değişiklik gözlemlenmedi.

3.2. MTT Canlılık Testi Sonuçları

Kırk katı (40x) dozlardan başlayarak yarım dilüsyonlar halinde (20x, 10x, 5x, ..., 0,02x, 0,01x dozlarda) tüm deneylerde uygulanan Ranibizumab ve Aflibercept ile 24 saatlik inkübasyon sürecinden geçen ARPE-19 hücrelerinin canlılık değişimi, MTT testi ile tayin edildi.

Hiç ilaç uygulanmayan (pozitif kontrol) Ranibizumab ve Aflibercept örneklerinin, tüm zaman aralıkları için canlılığı %100 kabul edildi. Ortalama absorbans değerleri esas alınarak, öteki örneklerin oransal olarak canlılık değerleri hesap edildi. Deneysel çalışma

gruplarının bütününde, artan ilaç dozu ile ortaya çıkan % sitotoksosite değerleri arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi.



Şekil 3.1. Ranibizumab ve Aflibercept'in MTT Absorbans – Klinik Doz ve Katları İlişkisi.

MTT absorbans değerlerine (Şekil 3.1.) göre, her bir doz aralığı için Ranibizumab ve Aflibercept ayrı ayrı kıyaslandığında (Çizelge 3.1.) (Mann-Whitney U testi) iki etken arasında sitotoksosite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda kullanılan Ranibizumab ve Aflibercept etken maddeli preparatların IC50 değerleri, klinik uygulamada kullanılan dozlardan çok daha yüksek olması sebebiyle IC50 değerlerine ulaşamamıştır. Nitekim, Karagöz ve ark. nanopartikül yüklü anti-VEGF inceledikleri ve MTT sitotoksosite analizi yaptıkları çalışmalarında, literatürde IC50 değerine ulaşan bir toksisite çalışmasına rastlamadıklarını belirtmişlerdir (Karagöz ve ark., 2021). Bu sebeple çalışmamızda, kullanılan doz dilüsyonlarından elde edilen grafikten tahmini IC50 değerleri Graphpad Prism programı ile hesaplandı. Bu IC50 değerine göre yapılan hesaplarda yaklaşık IC50/2 değerlerine tekabül eden dozlar, sitotoksosite analizi için

kullanılan dilüsyon aralığında kaldığı için kullanılmıştır. Ranibizumab için IC50/2'ye karşılık gelen dozu 428,12 µg/ml iken, Aflibercept için IC50/2'ye karşılık gelen doz 1260,88 µg/ml idi.

Çizelge 3.1. Her bir doz için Aflibercept ve Ranibizumab'ın istatistiksel olarak kıyaslanması.

	Etken Madde	n	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	U	p
40X	Aflibercept	6	6.67	40.00	17.000	0.873
	Ranibizumab	6	6.33	38.00		
10X	Aflibercept	6	5.50	33.00	12.000	0.337
	Ranibizumab	6	7.50	45.00		
5X	Aflibercept	6	7.50	45.00	12.000	0.337
	Ranibizumab	6	5.50	33.00		
2.5X	Aflibercept	6	6.50	39.00	18.000	1.000
	Ranibizumab	6	6.50	39.00		
1.25X	Aflibercept	6	5.50	33.00	12.000	0.337
	Ranibizumab	6	7.50	45.00		
0.6X	Aflibercept	6	6.17	37.00	16.000	0.749
	Ranibizumab	6	6.83	41.00		
0.3X	Aflibercept	6	6.50	39.00	18.000	1.000
	Ranibizumab	6	6.50	39.00		
0.1X	Aflibercept	6	5.83	35.00	14.000	0.552
	Ranibizumab	6	7.17	43.00		
0.08X	Aflibercept	6	6.50	39.00	18.000	1.000
	Ranibizumab	6	6.50	39.00		
0.04X	Aflibercept	6	7.00	42.00	15.000	0.631
	Ranibizumab	6	6.00	36.00		
0.02X	Aflibercept	6	6.67	40.00	17.000	0.873
	Ranibizumab	6	6.33	38.00		
0.01X	Aflibercept	6	6.00	36.00	15.000	0.631
	Ranibizumab	6	7.00	42.00		

*p<.0,05

3.3. RNA Ekstraksiyonu NanoDrop ND-1000 Sonuçları

NanoDrop ND-1000'de elde edilen konsantrasyon sonuçları Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir. Ölçüm yapılan örneklerden Absorbans 260/280; oranı 2,0-2,3 aralığında

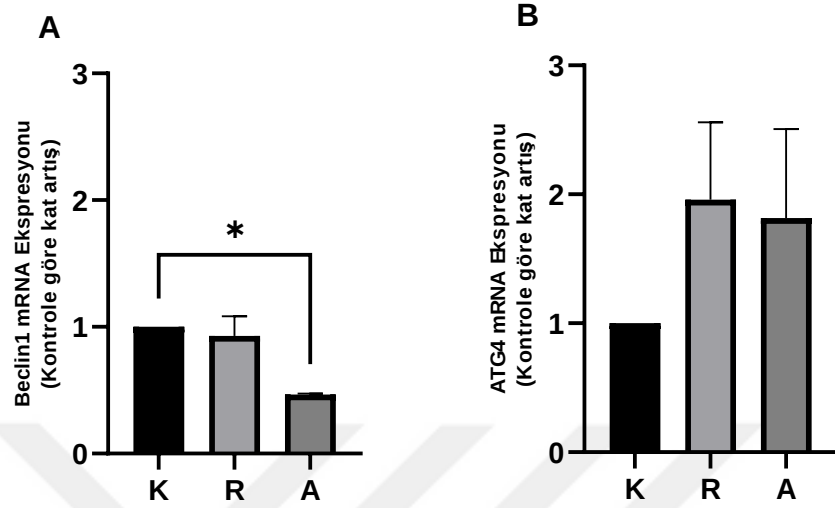
bulunan örnekler çalışmaya dahil edildi. Bu parametreleri sağlayamayan örnekler için yedek örneklerden tekrar RNA ekstraksiyonu yapıldı.

Çizelge 3.2. NanoDrop ND-1000 Sonuçları.

Numune	RNA Konsantrasyonu	260/280	260/230
Kontrol	139.25	2.119	1.93
Ranibizumab	175.45	2.140	2.09
Aflibercept	190.93	2.127	1.98

3.4. ARPE-19 Hücrelerinde Otofaji belirteçlerinin (Beclin1 ve ATG4) İfadesi

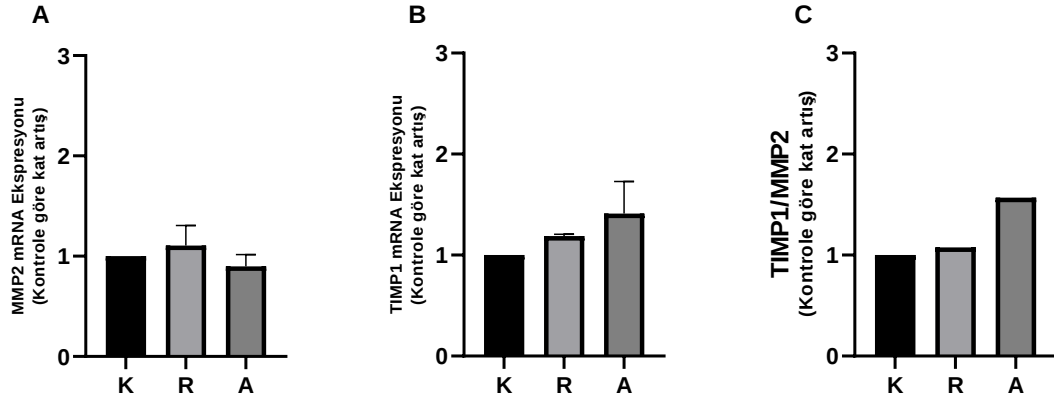
ARPE-19 hücrelerinde Beclin1'in mRNA ekspresyon seviyesine bakıldığında, kontrol ve Aflibercept grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür (* $P \leq 0.05$). ATG4'ün mRNA ekspresyon seviyesine bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P \geq 0.05$) (Şekil 3.2.). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Ranibizumab uygulanan grupta Beclin1'in mRNA ekspresyon seviyesinde %8'lik bir azalma saptanmışken Aflibercept uygulanan grupta %54'lük bir azalma söz konusuydu. Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında, hem Ranibizumab uygulanan grupta (%95) hem de Aflibercept uygulanan grupta (%81) ATG4'ün mRNA ekspresyon seviyesinde artış tespit edildi.



Şekil 3.2. ARPE-19 hücrelerinde kontrol (K), Ranibizumab %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları yarısı (IC50/2) (R), Aflibercept %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları yarısı (IC50/2) (A) örnekleri için Beclin1 (Şekil 3.2.A.) ve ATG4 (Şekil 3.2.B.) mRNA ifadelerinin kat değişim oranlarına göre karşılaştırılması (* $P \leq 0.05$).

3.5. ARPE-19 Hücrelerinde TIMP1 ve MMP2 İfadesi

TIMP1'in mRNA ekspresyon seviyesine bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yine, MMP2'nin mRNA ekspresyon seviyesine bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P \geq 0.05$). TIMP1 ve MMP2 mRNA ekspresyonları oranlandığında özellikle Aflibercept tedavisi uygulanan grupta kontrol ve Ranibizumab grubuna göre TIMP1/MMP2 ekspresyon oranının daha yüksek olduğu izlenmiştir (Şekil 3.2.). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Ranibizumab uygulanan grupta MMP2'nin mRNA ekspresyon seviyesinde %10'lık bir artma saptanmışken Aflibercept uygulanan grupta %11'lik bir azalma söz konusuydu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Ranibizumab uygulanan grupta TIMP1'in mRNA ekspresyon seviyesinde %18'lik bir artış saptanmışken Aflibercept uygulanan gruptaki artış %41 oranındaydı.



Şekil 3.3. ARPE-19 hücrelerinde kontrol (K), Ranibizumab %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları yarısı (IC₅₀/2) (R) ve Aflibercept %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları yarısı (IC₅₀/2) (A) örnekleri için Beclin1 (Şekil 3.3.A.) ve ATG4 (Şekil 3.3.B.) mRNA ifadelerinin kat değişim oranlarına göre karşılaştırılması ve TIMP1/TIMP2 oranı (Şekil 3.3.C.).

3.6. TIMP1 ve MMP2 Değerlerinin Oranlanması

Kontrol grubu ile kıyaslandığında; Ranibizumab MMP2’de ve TIMP1’de hafif bir artışa yol açmışken, Aflibercept MMP2’de hafif bir azalışa ve TIMP1’de ise hafif bir artışa sebep olmuştur (Şekil 3.3.). Bu ilişkiyi daha iyi anlamak için TIMP1’i MMP2’ye oranladık. Çünkü bazı durumlarda enzim miktarı değişmeden inhibitör miktarı değişebilir. Etkinliği daha iyi gözlemleyebilmek için TIMP1’i MMP2’ye oranladığımızda, Aflibercept’in TIMP1/MMP2 oranı, Ranibizumab’ınkine göre daha yüksek bulunmuştur. Aflibercept’teki bu oran, Ranibizumab’dakinin yaklaşık 1,5 katı (1,47) idi.

4. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, çeyrek yüzyıl önce, yaklaşık 45 milyon kör insanın olduğu tahmin edilmekteydi. O dönemde, körlük nedenlerinin büyük bir oranını katarakt ve kırma kusurları oluşturmaktaydı. DSÖ, körlük sayısının ikiye katlanarak 2020'de 90 milyona ulaşacağını öngörmekteydi (WHO, 2013). Vision Loss Expert Group'un yapmış olduğu analiz, konu hakkında dünya genelindeki göz hekimlerinde oluşan farkındalık ve teknolojik ilerlemeler sayesinde, 2010 yılına kadar çok önemli ilerlemeler kaydedildiğini ve körlük prevalansının aslında 32 milyona düştüğünü göstermiştir (Flaxman ve ark., 2017). Bu düşüşte, göz hekimlerinin hızlıca harekete geçip önlenabilir sebepleri ortadan kaldırma çabası, şüphesiz büyük pay sahibidir.

Önlenabilir sebeplerin başlıcalarından olan yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD), gelişmiş ülkelerde 50 yaşın üzerindeki kişilerde geri dönüşü olmayan görme kaybının önde gelen nedeni olarak bulunmuştur (Congdon ve ark., 2004; Pascolini ve ark., 2004). Yanı sıra, diyabetik retinopati (DR) ve komplikasyonlarından biri olan diyabetik maküla ödemi (DMÖ), dünyadaki körlük nedenlerinin en önde gelenlerindendir (Behl ve Kotwani, 2015; Gelişken ve Ziemssen, 2010).

YBMD'de en önemli risk faktörü ilerlemiş yaştır. Gözün yaşlanma sürecine, retina pigment epitelinden (RPE) kaynaklanan ve RPE'nin Bruch membranı ve nörosensör retina ile arayüz temas yerinde toplanan temizlenmemiş hücresel artıkların birikmesi eşlik etmektedir. Söz konusu birikimler, kompleman kaskadında inatçı aktivasyona ve inflamasyonun tetiklenmesine sebep olmaktadır. Membrandaki kalınlaşma ve geçirgenlik azalışına sebep olan bu durum, retina ve koroid arasındaki besin ve artık madde transportunu

sekteye uğratmaktadır. Bu süreçte salgılanan proinflamatuvar ve proanjiyogenik sitokinlerin en önemlilerinden biri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'tir. VEGF, endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü uyarır, anjiyogeneze ve artmış vasküler geçirgenliğe yol açar. Yeni büyüyen kan damarları sıvı sızdırarak fotoreseptör tabakasını bozarak zarar verebilmektedir ve bu durum görme kaybı ile neticelenebilmektedir (Flores ve ark., 2021; Kliffen ve ark., 1997; Miller ve ark., 2017).

Tıpkı YBMD gibi, VEGF düzeylerinin yüksek seviyelere çıktığı bir diğer hastalık DR'dir. Diabetes Mellitus'un (DM) görmeyi tehdit eden mikrovasküler bir komplikasyonu olan DR, retina endotel disfonksiyonu ile başlamakta ve bunu oksidatif stress, protein kinaz C aşırı aktivasyonu, inflamasyon ve iskemi gibi çeşitli patolojik olaylar takip etmektedir. Bu olaylar silsilesi VEGF salınımını yükselterek onu fizyolojik rolünden saptırabilmektedir. Vasküler homeostazın bozulmasıyla karakterize bu durum, ileri süreçte görme kaybı ile neticelenebilir (Behl ve Kotwani, 2015). Gerek YBMD gerekse DR'ye bağlı DMÖ'de yüksek retinal VEGF düzeyleri ve bundan kaynaklanan subretinal neovaskülarizasyonun varlığı oldukça dikkat çekicidir (Saenz-de-Viteri ve ark., 2016). Yine görme kaybının sık görülen nedenlerinden olan retinal ven tıkanıklıklarında (RVT) da iskemiye bağlı artmış VEGF üretimi ve buna bağlı artmış damar geçirgenliği ve yeni damar oluşumu sorumlu tutulmaktadır (Karia, 2010).

Vasküler geçirgenlik faktörü ilk olarak kobay karnından (assit sıvısı) 1983'te izole edilmiştir (Senger ve ark., 1983). Molar bazda, vasküler geçirgenlik faktörünün damarları geçirgen hale getirmede histaminden 50.000 kat daha güçlü olduğu bulunmuştur (Senger ve ark., 1990). Bu süreçte kısmen karakterize olarak kalan vasküler geçirgenlik faktörü, 1989'da klonlanıp eksprese edilince in vitro endotel hücre büyümesinin ve in vivo neovaskülarizasyonun güçlü bir uyarıcısı olduğu ortaya çıkmıştır (Leung ve ark., 1989). Bu yeni keşfedilen biyoaktivitelerle, vasküler geçirgenlik faktörü, kalıcı olduğu kanıtlanmış bir isim olan VEGF olarak yeniden adlandırılmıştır. VEGF'in, kültürde endotel hücrelerine

yerleştirildiğinde, endotel hücrelerinin çoğalması, göçü ve de novo kan damarı oluşumunun ortaya çıkarılması dahil olmak üzere yeni kan damarlarının oluşumunda yer alan birçok bireysel adımı indüklediği gösterilmiştir. VEGF, bazal membranın parçalanması ve kan damarlarının çevre doku stromasına invazyonu için gerekli olan metalloproteinazların üretimini tetiklemektedir. Patolojik anjiyogeneizde rol oynayan bir hücre tipi olan monositler için güçlü bir kemoatraktan özelliğine de sahiptir (Adamis ve Shima, 2005).

Günümüze kadar ulaşan bu kapsamlı veriler, VEGF'in oküler neovaskülarizasyondaki nedensel rolünü desteklemektedir. Doku kültüründeki çoklu retina hücreleri, mikroçevreleri hipoksik olduğunda VEGF yapabilmekte ve üretimini arttırabilmektedir (Aiello ve ark., 1995). Hipoksik retina hücreleri tarafından üretilen tüm faktörler arasından, sadece VEGF, tek endotel hücre mitojeni gibi görünmektedir (Shima ve ark., 1995). VEGF inhibe edilirse, mitojenik kapasite kaybolmaktadır. Retina iskemik hale getirildiğinde, VEGF seviyeleri retina, vitreus ve aközde yükselmektedir. VEGF seviyesi, patolojik damarların büyümesi ve gerilemesi ile uyumlu bir değişim göstermektedir. VEGF'nin birincil kaynakları, ganglion, Müller ve RPE hücrelerini içeren nöral hücrelerdir (Aiello ve ark., 1995).

Bu bilgi birikimi, anti-VEGF ilaçların geliştirilmesini de beraberinde getirmiştir (Kim ve D'Amore, 2012). YBMD, DMÖ ve RVT tedavisi, yeni araştırmaların sonuçları yayımlandıkça gelişmektedir. Göz hekimleri bu hastalıkların tedavisinde son zamanlarda yaygın olarak intravitreal enjeksiyon yolu ile Ranibizumab ve Aflibercept gibi anti-VEGF ajanları kullanmaktadır (Yorston, 2014). Yakın zamanda Karabaş ve ark. yaptığı çalışmada da, Türk göz hekimlerinin YBMD, DMÖ ve RVT tedavisinde anti-VEGF'leri ilk tercih olarak seçtiklerini göstermişlerdir (Karabaş ve ark., 2022).

Söz konusu tez çalışmasında, ARPE-19 hücreleri uygun besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra kültür şişelerine inoküle edildi. Hücreler farklı dozlarda (klinik dozun 0,01×; 0,02 ×; 0,05×; 0,1×; 0,3×; 0,6×; 1,25×; 2,5×; 5×; 10×; 20×; ve 40× katlarında) Ranibizumab ve Aflibercept'e tabi tutuldu. Herhangi bir anti-VEGF maddesi içermeyen ARPE-19 hücre kültürleri pozitif kontrol grubu; triton-x ile tamamen canlılığını yitiren hücre grubu ise negatif kontrol grubu olarak kullanıldı Toksisite, ARPE-19 hücre kültürlerinde MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi ile değerlendirildi. Her bir doz aralığı ayrı ayrı değerlendirildiğinde, Ranibizumab ve Aflibercept grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Malik ve ark., ARPE-19 hücre kültüründe anti-VEGF ajanlardan Bevacizumab, Ranibizumab, Aflibercept ve Ziv-aflibercept'in güvenlik profilini araştırdıkları çalışmalarında; 10 × doz aralığında Bevacizumab, Aflibercept ve Ziv-aflibercept ile tedavi edilen hücrelerin hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdiğini fakat Ranibizumab için kontrol ve ½ × ila 10 × klinik doz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Ranibizumab'ın tüm tedavi dozlarında daha güvenli bir profile sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Fakat hücre canlılığı tespiti için MTT testi yerine; otomatik tripan mavisi boya dışlama testi olan ViCell XR (Beckman Coulter, Fullerton, California, ABD) analiz cihazını kullanmışlardır (Malik ve ark., 2014). Puddu ve ark. ise klinik dozlarda Ranibizumab ve Aflibercept uygulanan 24 saat kültüre edilmiş ARPE-19 hücre hattını; hücre canlılığı ve morfolojisi açısından MTT testi kullanarak pozitif kontrol grubuyla kıyaslamışlar ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır (Puddu ve ark., 2016). Saenz-de-Viteri ve ark. ise farklı bir yaklaşımla anti-VEGF ajanların kümülatif etkilerini incelemeyi hedeflemişlerdir ve ARPE-19 hücre hattına tekrarlayan klinik dozlarda Bevacizumab, Ranibizumab ve Aflibercept uygulamışlardır. Hücre hatlarını gruplandırıp, grup 1'de, hücre hattına gün aşırı (0, 2 ve 4. günler) ilaç uygulaması yapmışlardır. Grup 2'de ise hücrelere 0, 1, 2, 3 ve 4. günlerde günlük olarak ilaç uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Her iki grupta da 5. günde MTT testi yapmışlardır. Herhangi bir gruptaki anti-VEGF uygulanan hücreler ve kontrol grupları arasında hücresel canlılık

açısından istatistiksel anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir (Saenz-de-Viteri ve ark., 2016). Ammar ve ark., Ranibizumab ve Aflibercept'in metabolik etkilerini klinik dozun 2 katına kadar çıkararak MTT ile test etmişlerdir. Aflibercept'in ARPE-19 hücreleri tarafından iyi tolere edildiği ve Ranibizumab ile karşılaştırıldığında, her iki ajan için de sitotoksosite neticelerinin eşdeğer olduğu sonucuna varmışlardır (Ammar ve ark., 2013). Emir ve ark., ARPE-19 hücre hattına Bevacizumab, Ranibizumab ve Aflibercept'i: klinik doz, $2 \times$ klinik doz ve $4 \times$ klinik oranlarında uygulamışlardır. MTT analiz sonuçları; klinik dozda uygulanan Bevacizumab dışında, Bevacizumab'ın diğer tüm dozları ile test edilen tüm Aflibercept ve Ranibizumab dozlarının ARPE-19 hücrelerinde sitotoksosite ile neticelendiğini ortaya çıkarmıştır. Özellikle Ranibizumab ve Aflibercept için doz arttıkça hücre canlılığında da azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Emir ve ark., 2022). Sonuçlarımız literatürle kıyaslandığında uyumluluk arz etmekteydi. Ayrıca literatürde, ARPE-19 hücre hattında çalışmamızdaki kadar yüksek dozlara çıkan başka bir makaleye rastlayamadık.

Bu çalışma kapsamında Ranibizumab uygulanan ARPE-19 hücrelerinde Beclin1'in mRNA ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Aflibercept uygulanan grupta ise, Beclin1'in mRNA ekspresyon seviyesinde yine azalma gerçekleşmiş ve kontrol grubuyla kıyaslandığında arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Anjiyogenez, endotel hücre proliferasyonu, matriks degradasyonu, migrasyon, tüp formasyonu ve damar matürasyonu gibi aşamaları içeren karmaşık bir süreçtir. Patolojik anjiyogenez, kanser, maküler dejenerasyon ve diyabet kaynaklı retinopati gibi bir dizi hastalıkla bağlantılıdır. Bu koşulların her birinde, anjiyogenez inhibisyonunun hastalığın ilerlemesini engellediği gösterilmiştir (Folkman, 2006; Reddy ve ark., 2003). VEGF, endotel hücreleri için transkripsiyonel olarak düzenlenen bir hayatta kalma faktörüdür. PI3K/Akt yolu aracılığıyla VEGF reseptör aracılı sinyalleme blokajı edilmesi, hücre döngüsünün durmasına ve programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır (Folkman, 2007). Otofaji ve apoptoz genellikle aynı hücrede, çoğunlukla otofajinin apoptozdan önce geldiği bir sırayla meydana gelmektedir. Bunun nedeni, özellikle stres seviyesi ölümcül değilse, stresin genellikle bir otofajik tepkiyi

uyarmasıdır. Çoğu durumda otofaji, strese uyum sağlamak ve stresle başa çıkmak için bir strateji oluşturmaktadır (Kroemer ve ark., 2010). Bununla birlikte, hücre apoptozu başlatırsa, kısmen temel otofaji proteinlerinin kaspaz aracılı bölünmesi nedeniyle otofaji etkisiz hale getirilebilmektedir. Bu genel senaryonun ötesinde, özel durumlarda otofaji veya otofajik süreçte yer alan temel proteinler, sırasıyla ya hücrelerin vazgeçilmez kısımlarını katabolize ederek veya sırasıyla apoptotik veya nekrotik programların aktivasyonunu kolaylaştırarak hücre ölümü destekleyebilmektedir (Galluzzi ve ark., 2009). Çalışmamızda, anti-VEGF maruziyeti sonrası Beclin-1 gen ekspresyonu seviyelerindeki azalma literatürdeki bu temel bilgiyle uyumludur. Nitekim halen literatürde anti-VEGF ve otofaji (indüksiyonu – inhibisyonu) ilişkisi konusunda kesin bir görüş birliğine varılamamıştır. Lytvynchuk ve ark., anti-VEGF'lerin, doza bağlı bir şekilde fare fibroblast hücre hattının hayatta kalmasını, mitotik aktivitesini ve proliferasyonunu inhibe ettiğini ve ayrıca hücre heterojenliği, apoptozu ve otofajiyi artırdığını göstermişlerdir. Ranibizumab'ın Aflibercept ve diğer anti-VEGF'lere göre daha düşük antiproliferatif ve apoptotik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Artan dozlara rağmen antiproliferatif ve apoptotik aktivitesinde anlamlı değişme göstermeyen Ranibuzumab'daki bu sonucu, Ranibuzumab'ın otofaji üzerindeki farklı etkisiyle (daha fazla indüklemesi) açıklamışlardır (Lytvynchuk ve ark., 2015). Bizim sonuçlarımızda da Ranibizumab'ın (daha az inhibe etmesi) otofaji geni olan Beclin 1 üzerindeki etkisi Aflibercept'e göre anlamlı olarak farklıydı. Liang ve ark., anti-VEGF olan Bevacizumab'ın glioma tümör hücre hattındaki otofaji ilişkisini araştırmışlar ve otofajiyi indüklediğini tespit etmişlerdir. Bunu; Bevacizumab'ın (ve diğer antianjiyogenik ajanların), tümör vaskülatürünü inhibe ederek tümör mikroçevresinde besin yoksunluğuna ve oksijen stresine neden olup buna bağlı otofaji sürecini indükleyebileceğine dayandırmışlardır (Liang ve ark., 2015). Liu ve ark., otofajinin tümör hücrelerini tümörigenez aşamasında öldürdüğünü ve tümör büyümesini engellediğini; fakat bir kez tümör oluşumu gerçekleşince bu sefer otofajinin çeşitli çevresel koşullara karşı tümör hücrelerinin hayatta kalmasını koruduğunu iddia etmişlerdir. Hatta meme ve prostat kanserleri gibi çok sayıda insan kanserinde, sıklıkla iki temel otofaji geni olan Beclin1 ve/veya ATG4'ün kaybı olduğundan, otofajinin tümörigenezi baskılamada çok önemli bir rol oynadığı varsayılmıştır. Anti-anjiyogeneze tedavilerinin neden olduğu otofajinin hipoksiye yol açmasının da artık dirence

katkıda bulunan önemli bir neden olarak kabul edildiğini belirtmişlerdir (Liu ve ark., 2016). Wang ve ark. ise, rhesus maymunu koroid/retina endotel hücre hattında yaptığı çalışmalarında, Ranibizumab ve Conbercept'in hipoksi koşullarında hücrelerinin otofajisini tetikleyebileceğini fakat Aflibercept'in otofaji üzerinde farklı bir etkisi olduğunu ve Beclin1'in ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Otofaji aktivasyonunun sırayla anjiyogenezi destekleyebileceğini ve böylece anti-anjiyogenik ilaçların rolünü zayıflattığını, bu nedenle uyarılmış otofajinin, anti-anjiyogenik ilaçların zayıf terapötik etkisinin nedeni olabileceğini savunmuşlardır. Sonuçlarının, pek çok klinik araştırmalarda varılan Aflibercept'in mevcut diğer anti-VEGF ajanlara üstünlüğü neticesini desteklediğini belirtmişlerdir (Wang ve ark., 2021). Wang ve ark.'dan farklı bir hücre hattı çalışmış olmamıza rağmen, Aflibercept'in Beclin1'in ekspresyonu inhibisyonu ile neticelenen bu farklı etkisini bizler de kendi çalışmamızda gözlemledik.

Bu çalışma kapsamında Ranibizumab ve Aflibercept uygulanan ARPE-19 hücrelerinde ATG4'ün mRNA ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. p53; BH3-only proteinleri ve BH3 mimetikleri; DAPK (Death associated protein kinase); ve JNK (JUN N-terminal kinase) hem apoptozu hem de otofajiyi indükleyen sinyaller arasında sayılmaktadır (Marino ve ark., 2014). BH3-only protein grubunda olan Beclin1, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), Vps34 ile etkileşime girmekte ve otofajik vezikül çekirdeklenmesinde yer almaktadır (Kihara ve ark., 2001). Yani Beclin1, otofajinin başlangıç aşaması olan çekirdek otofaji yolağında (core complex formation), çoğunlukla mitokondri ve endoplazmik retikulum arasındaki temas bölgelerinde bir izolasyon zarının (fagofor olarak da adlandırılır) oluşumunu başlatmaktadır (Marino ve ark., 2014). Bilinen diğer BH3-only proteinlerinin aksine, Beclin1 proapoptotik bir molekül olarak işlev görmemektedir (He ve Levine, 2010). Bu istisnanın ötesinde, Beclin1 ile etkileşime giren proteinlerin çoğunun otofaji ve apoptozu aynı yönde modüle etmesi dikkate değerdir; yani, her iki süreci de engellemekte veya teşvik etmektedirler (Marino ve ark., 2014). ATG4 ise, düzinelerce ATG proteini arasındaki tek proteazdır ve otofajideki benzersiz mekanizmalardan biri olan ATG8 konjugasyon

sisteminde temel bir faktör olarak işlev görmektedir. ATG8 öncülerini işlemenin yanı sıra, ATG4 başka bir önemli rol oynamaktadır: C-terminal karboksil kısmı ile fosfatidiletanolamin (PE) amin grubu arasında delipidasyon veya dekonjugasyon olarak adlandırılan ATG8-PE'yi ayırmak. Yani, ATG4 Beclin1'den farklı olarak otofajinin daha ileri bir aşaması olan otofagozom oluşumunda önemli bir role sahiptir. ATG8'in ATG4 tarafından hem işlenmesi hem de delipidasyon reaksiyonları, otofagozom oluşumu için önemli olduğundan, ATG4'ün inhibisyonu, otofagozom oluşumu aşamasında otofajinin inhibisyonuna yol açar ve bu nedenle ATG4, otofaji inhibitörleri geliştirmek için çekici bir hedef olarak görülmektedir (Maruyama ve Noda, 2018). Bir önceki paragrafta detaylarıyla belirttiğimiz geçmiş çalışmalarda anti-VEGF ajanların otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (Liang ve ark., 2015; Liu ve ark., 2016; Lytvynchuk ve ark., 2015). Daha yakın zamanda yapılan çalışmalarda da anti-VEGF ve otofaji ilişkisi araştırmacıların ilgi odağı olmayı korumuştur. Örneğin, Segatto ve ark. Yeni Zelanda beyaz tavşan gözlerine Ranibizumab ve Aflibercept uygulamışlar ve enükleasyon sonrası retinalarını in vitro olarak değerlendirmişlerdir. VEGF inhibisyonunun nörotrofin sinyallemedeki değişikliklere yol açtığını ve güçlü bir şekilde apoptozisi ve otofajiyi uyardığını biyobelirteçler aracılığıyla tespit etmişlerdir. Bu süreçte Aflibercept'in neden olduğu erken etkileri, Ranibizumab ile karşılaştırıldığında daha belirgin olarak bulmuşlardır (Segatto ve ark., 2019). Schottler ve ark., domuz RPE hücre hattına uzun süreli (12 hafta) ve tekrarlayan dozlarda Ranibizumab ve Aflibercept uyguladıkları çalışmalarında otofagozom alanının Aflibercept ile karşılaştırıldığında Ranibizumab tarafından daha çok artırılmış olduğunu tespit etmişlerdir (Schottler ve ark., 2018). Bizim sonuçlarımızda da Ranibizumab'ın otofajinin önemli bir belirteci olan ATG4 gen ekspresyonunda yol açtığı artış, Aflibercept'e kıyasla daha yüksek olup bu çalışmayla paralellik arz etmektedir.

Bu çalışma kapsamında kontrol grubu ile kıyaslandığında; Ranibizumab MMP2'de ve TIMP1'de hafif bir artışa yol açmışken, Aflibercept MMP2'de hafif bir azalışa ve TIMP1'de ise hafif bir artışa sebep olmuştur. Bu ilişkiyi daha iyi anlamak için TIMP1'i MMP2'ye oranladığımızda (TIMP1/MMP2), Aflibercept'in TIMP1/MMP2 oranı,

Ranibizumab'inkine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, ARPE-19 hücre hattında Aflibercept'in Ranibizumab'a kıyasla daha güçlü anti-anjiyogenik etki sergilediği yönünde bize fikir vermektedir. MMP'ler, neredeyse tüm hücre dışı matriks türlerini parçalayabilen enzimlerdir. İşlevleri, TIMP dahil olmak üzere çok sayıda mekanizma tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Drankowska ve ark., 2019). Bazal membranları parçalayabilen enzimler olan kollajenazlar grubuna ait olduğu için MMP2'nin rolüne her zaman özel ilgi gösterilmiştir. MMP2 neovaskülarizasyonda da ayrıca önemli bir rol oynamaktadır (Beranek ve ark., 2008). Endotelial hücrelerden eksprese edilen TIMP1 ise anti-anjiyogenik özelliklere sahip olup mikrovasküler endotel hücre göçünü inhibe edmektedir. TIMP1'in ayrıca apoptozu ve farklı hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Akahane ve ark., 2004). Di ve ark., oksijenle indüklenmiş neovaskülarizasyon modeli uygulanan fare retinasında gerçekleştirdiği çalışmalarında, MMP9 ve VEGF düzeylerini yüksek tespit etmişlerdir. İntravitreal TIMP1 uygulamasından sonra MMP9 ve VEGF düzeylerinin gerilediğini göstermişlerdir. Bunun ROP tedavisinde bir umut ışığı olabileceğini bildirmişlerdir (Di ve ark., 2016). Kang ve ark., diyabetik hayvan modeli çalışmalarında TIMP1'in MMP'ları inhibe ederek sitotoksik T hücrelerinin pankreas adacıklarına göçünün azalmasına yol açtığını ve sitokin kaynaklı apoptozu önlediğini göstermişlerdir (Kang ve ark., 2010). Lucio-Eterovic ve ark., insan glioblastoma tümör hücre hattında gerçekleştirdiği çalışmalarında anti-VEGF tedavisi sürecinde TIMP1'de artış gözlemlemişlerdir. Kanser hücrelerindeki artmış MMP düzeylerinin yanıt olarak TIMP1'deki artışa sebep olabileceği çıkarımında bulunmuşlar ve pek çok kanser türü için TIMP1 artışının kötü prognostik faktör olabileceğini belirtmişlerdir (Lucio-Eterovic ve ark., 2009). Shi ve ark., oksijen indüklenmiş retinopati oluşturulan insan ve rat retinal mikrovasküler endotel hücre hattında yaptıkları çalışmalarında Notch1'i hedef alan miR-34a'nın retinal anjiyogenezi zayıflattığını göstermişlerdir. miR-34a ile transfekte edilen hücre hattının adeta anti-VEGF tedavisini taklit edip MMP2 ve MMP9 ekspresyonunda azalışa, TIMP1 ve TIMP2 ekspresyonunda ise artışa yol açtığını tespit etmişlerdir (Shi ve ark., 2019). Sonuçlarımız literatürdeki sonuçlarla uyumlu olup aynı zamanda insan RPE hücre hattında yapılmış olmasıyla da literatürdeki diğer çalışmalardan farklı ve özgündür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde, anti-VEGF moleküllerinin intravitreal enjeksiyonları, neovasküler YBMD tedavisi için altın standart kabul edilmektedir. Yanı sıra; RVT, DMÖ ve prematüre retinopatisi başta olmak üzere yeni damar büyümesi ve damar aşırı geçirgenliği olan diğer oküler patolojilerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavinin genellikle aylık ve tekrarlanan dozlarda uygulanması gerekmektedir. Tedavinin kesilmesi neovaskülarizasyonun nüksüne sebep olabilmektedir. Bu nedenle çoğu durumda tedavinin birkaç yıl sürdürülmesi gerekebilmektedir.

Her ne kadar VEGF antagonistlerinin güvenli olduğu gösterilmiş olsa da, hücrenin hayatta kalabilmesinde VEGF kritik bir faktör olduğu için, bir takım yan etkileri de tespit edilmiştir. Bazı çalışmalar, anti-VEGF tedavisinden sonra, RPE yırtıkları ve göz içi iltihabı bildirmiştir. Dahası, uygulanan intravitreal enjeksiyon sayısının retinal atrofinin ilerlemesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak bu etkilerin hastalığın doğal seyrinin bir sonucu mu yoksa anti-VEGF tedavisinden mi kaynaklandığını ayırt etmek mümkün değildir. Örneğin YBMD’de coğrafik (retinal) atrofi, RPE hasarına neden olan YBMD’nin doğal seyrine atfedilebilir olmasının yanı sıra, RPE düzeyinde VEGF inhibisyonunun bir komplikasyonu da olabilir. Aksine, DMÖ ve RVT’de anti-VEGF ajanların geniş, kontrollü denemelerinde, bu ilaçlara atfedilebilen maküler (retinal) atrofi saptanmamıştır.

Söz konusu tez çalışması kapsamında, çok sayıda randomize klinik çalışmalar neticesinde güvenilirlik profili ispatlanarak FDA onayı alan Ranibizumab ve Aflibercept’in, erişkin insan RPE hücre hattında (ARPE-19) olası toksik etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra, söz konusu ilaçların otofaji yolağında kritik öneme sahip Beclin1 ile ATG4 otofaji proteinleri üzerine olan etkilerinin ve ayrıca

hücrelerarası yapısal ve kimyasal destekte görevli ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde başlıca öneme sahip enzimlerden MMP2 ve TIMP1 ile ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Her ne kadar literatürde söz konusu ilaçlar üzerine çok sayıda klinik pratiğe dayalı yayınlar olsa da, kısıtlı sayıda deneysel in vitro araştırmalar olması, mevcut çalışmayı daha da anlamlı kılmıştır. Sonuç olarak, klinik uygulamada kullanılandan çok daha yüksek dozlarda uygulanan bu iki anti-VEGF ilacın, in vitro olarak RPE'ye önemli bir toksisite oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, Ranibizumab'ın Beclin1 ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etkisi yokken Aflibercept'in Beclin1 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Her iki anti-VEGF de ATG4 ekspresyonunu arttırmaktadır. Kontrol grubuna kıyasla Ranibizumab MMP2 ve TIMP1 ekspresyonunda artışa neden olmuşken; Aflibercept MMP2 ekspresyonunu azaltıp TIMP1 ekspresyonunu arttırmıştır. TIMP1'i MMP2'ye oranladığında bu oran Aflibercept'te daha yüksek bulunmuştur.

Son yıllarda, otofaji ve neovaskülarizasyon üzerine yapılan araştırmalar bir miktar ilerleme kaydetmiştir. Bununla birlikte, gözün neovaskülarizasyonundaki otofaji mekanizması hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmuş değildir. Otofajiyi düzenleyerek, göz içi neovaskülarizasyonun gelişimi daha iyi kontrol edebilir. Ayrıca vasküler inhibitör tedavisi sonrası relaps ve ilaç direnç mekanizmasında, otofaji önemli bir rol oynayabilir. Yakın gelecekte otofaji yollarının hedeflenerek vasküler inhibitörlerin direncinin artırılması ümit edilmektedir. Bununla birlikte, otofaji ve intravitreal neovaskülarizasyonla ilgili çoğu çalışma hala birincil araştırma aşamasındadır ve takip edilen süreçte bu alanda çalışan bilim insanları tarafından daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulacaktır.

ÖZET

Ranibizumab ve Aflibercept'in İn Vitro Oküler Toksisitesinin Araştırılması.

Günümüzde, anti-VEGF moleküllerinin intravitreal enjeksiyonları, neovasküler YBMD tedavisi için altın standarttır. Yanı sıra; RVT, DMÖ ve prematüre retinopatisi başta olmak üzere yeni damar büyümesi ve damar aşırı geçirgenliği olan diğer oküler patolojilerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavinin genellikle aylık ve tekrarlanan dozlarda uygulanması gerekmektedir. Tedavinin kesilmesi neovaskülarizasyonun nüksüne sebep olabilir. Bu nedenle çoğu durumda tedavinin birkaç yıl sürdürülmesi gerekebilir. Her ne kadar VEGF antagonistlerinin güvenli olduğu gösterilmiş olsa da, hücrenin hayatta kalabilmesinde VEGF kritik bir faktör olduğu için, bir takım yan etkileri de tespit edilmiştir. Bazı çalışmalar, anti-VEGF tedavisinden sonra, RPE yırtıkları ve göz içi iltihabı bildirmiştir. Dahası, uygulanan intravitreal enjeksiyon sayısının retinal atrofinin ilerlemesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak bu etkilerin hastalığın doğal seyrinin bir sonucu mu yoksa anti-VEGF tedavisinden mi kaynaklandığını ayırt etmek mümkün değildir. Söz konusu çalışma kapsamında, çok sayıda randomize klinik çalışmalar neticesinde güvenilirlik profili ispatlanarak FDA onayı alan Ranibizumab ve Aflibercept'in, erişkin insan RPE hücre hattında (ARPE-19) olası toksik etkilerini in vitro olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra, söz konusu ilaçların 1) Otofaji yolağında kritik öneme sahip Beclin1 ve ATG4 ekspresyonları üzerine olan etkilerini 2) Hücreler arası yapısal ve kimyasal destekte görevli ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde başlıca öneme sahip enzimlerden MMP2 ve TIMP1 ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Hücrelere sitotoksosite değerlendirilmesi için MTT testi uygulanmıştır. Ardından RNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR ile seçilen otofaji ve matriks metalloproteinaz proteinleri analiz edilmiştir. Sonuç olarak, klinik uygulamada kullanılan çok daha yüksek dozlarda uygulanan bu iki anti-VEGF ilacın, in vitro olarak RPE'ye önemli bir toksisite oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, Ranibizumab'ın Beclin1 ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etkisi yokken Aflibercept'in Beclin1 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Her iki anti-VEGF de ATG4 gen ekspresyonunu arttırmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Ranibizumab MMP2 ve TIMP1 ekspresyonunda artışa neden olmuşken; Aflibercept MMP2 ekspresyonunu azaltıp TIMP1 ekspresyonunu arttırmıştır. TIMP1'i MMP2'ye oranladığımızda bu oran Aflibercept'te daha yüksek bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Aflibercept, ATG4, Beclin1, MMP2, Ranibizumab, TIMP1.

SUMMARY

Investigation of In Vitro Ocular Toxicity of Ranibizumab and Aflibercept.

Currently, intravitreal injections of anti-VEGF molecules are the gold standard for the treatment of neovascular AMD. Besides this, it is also widely used in other ocular pathologies with neovascular growth and vascular hyperpermeability, especially in RVT, DME, and retinopathy of prematurity. Treatment usually needs to be administered in monthly and repeated doses. Discontinuation of therapy may result in the recurrence of neovascularization. Therefore, in most cases, treatment may need to be continued for several years. Although VEGF antagonists have been shown to be safe, since VEGF is a critical factor in cell survival, several side effects have also been identified. Some studies have reported RPE tears and intraocular inflammation after anti-VEGF therapy. Moreover, the number of intravitreal injections administered was found to be significantly associated with the progression of retinal atrophy. However, it is not possible to distinguish whether these effects are a result of the natural course of the disease or are due to anti-VEGF therapy. In our study, we aimed to evaluate the possible toxic effects of Ranibizumab and Aflibercept, which have been approved by the FDA as a result of numerous randomized clinical studies, on the adult human RPE cell line (ARPE-19), in vitro. In addition, we aimed to elucidate the effects of these drugs on 1) Beclin1 and ATG4 expressions, which are critical in the autophagy pathway, 2) MMP2 and TIMP1, which are enzymes that are of critical importance in the regulation of the extracellular matrix involved in intercellular structural and chemical support. The MTT test was applied to the cells for the evaluation of cytotoxicity. Then RNA isolation was performed. Finally, selected autophagy and matrix metalloproteinase proteins were analyzed by Quantitative Reverse Transcription PCR. In conclusion, we observed that these two anti-VEGF drugs, administered at much higher doses than those used in clinical practice, did not cause significant toxicity to the RPE in vitro. Compared to the control group, it was found that Ranibizumab had no significant effect on Beclin1 expression, while Aflibercept significantly reduced Beclin1 expression. Both anti-VEGFs increased ATG4 gene expression. Compared to the control group, Ranibizumab caused an increase in MMP2 and TIMP1 expression; Aflibercept decreased MMP2 expression and increased TIMP1 expression. When comparing TIMP1 to MMP2, this ratio was higher in Aflibercept.

Keywords: Aflibercept, ATG4, Beclin1, MMP2, Ranibizumab, TIMP1.

KAYNAKLAR

- ADAMIS, A. P., SHIMA, D. T. (2005). The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*, **25**(2): 111-118. <https://doi.org/10.1097/00006982-200502000-00001>
- AIELLO, L. P., NORTHRUP, J. M., KEYT, B. A., TAKAGI, H., IWAMOTO, M. A. (1995). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Archives of ophthalmology*, **113**(12): 1538-1544.
- AKAHANE, T., AKAHANE, M., SHAH, A., CONNOR, C. M., & THORGEIRSSON, U. P. (2004). TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp Cell Res*, **301**(2): 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.002>
- ALTINTAŞ, N. (2013). Kalıtsal Retinopatilerde Retina Pigment Epiteli'nin Önemi ve Tünelin Sonundaki Işık: Retinitis Pigmentosa/Leber Congenital Amaurosis' in Genetiği. *Van Tıp Dergisi*, **20**(2): 116-124.
- AMALINEI, C., CARUNTU, I. D., & BALAN, R. A. (2007). Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*, **48**(4): 323-334. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18060181>
- AMMAR, D. A., MANDAVA, N., & KAHOOK, M. Y. (2013). The effects of aflibercept on the viability and metabolism of ocular cells in vitro. *Retina*, **33**(5): 1056-1061. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e31827b646d>
- ANDING, A. L., & BAEHRECKE, E. H. (2017). Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell*, **41**(1): 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.016>
- APAYDIN, C. (2001). Temel Göz Hastalıkları, Güneş basımevi, s: 3-25.
- APRIL, E. W. (1997). Clinical Anatomy. Lippincott Williams and Wilkins basımevi.
- ATCC®. (2022). ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) Cell Line kataloğu.
- BARBARA YOUNG, G. O. D. P. W. (2014). *Wheather's Functional Histology—A text and Colour Atlas* (6th ed.).
- BEHL, T., KOTWANI, A. (2015). Exploring the various aspects of the pathological role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy. *Pharmacological research*, **99**: 137-148.

- BERANEK, M., KOLAR, P., TSCHOPLOVA, S., KANKOVA, K., & VASKU, A. (2008). Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*, **14**: 1114-1121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552985>
- BONILHA, V. L. (2014). Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Experimental eye research*, **126**:38-45.
- BROWN, D. M., HEIER, J. S., CLARK, W. L., BOYER, D. S., VITTI, R., BERLINER, A. J., ZEITZ, O., SANDBRINK, R., ZHU, X., HALLER, J. A. (2013). Intravitreal aflibercept injection for macular edema secondary to central retinal vein occlusion: 1-year results from the phase 3 Copernicus study. *American journal of ophthalmology*, **155**(3): 429-437. e427.
- BUTLER, R., NOWAK, B. (2004). In vitro interactions between Neoparamoeba sp. and Atlantic salmon epithelial cells. *Journal of Fish Diseases*, **27**(6): 343-349.
- CACECI, T. (2021). The Müller Cells. *Doctor C's On Line Histology*. <https://www.doctorc.net/EYE/MULLER.HTM>
- CHANG, K. C., LIU, P. F., CHANG, C. H., LIN, Y. C., CHEN, Y. J., & SHU, C. W. (2022). The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. *Cell Biosci*, **12**(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00736-9>
- CHEN, S., REHMAN, S. K., ZHANG, W., WEN, A., YAO, L., & ZHANG, J. (2010). Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1806**(2), 220-229.
- CHILDREN'S EYE INSTITUTE, (2023). <http://strabismus.net/> Copyright © 2023 Children's Eye Institute | Theme by: Theme Horse | Powered by: WordPress
- CHU, Y. K., LEE, S. C., & BYEON, S. H. (2013). VEGF rescues cigarette smoking-induced human RPE cell death by increasing autophagic flux: implications of the role of autophagy in advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **54**(12): 7329-7337. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12149>
- CONGDON, N., O'COLMAIN, B., KLAVER, C., KLEIN, R., MUÑOZ, B., FRIEDMAN, D. S., KEMPEN, J., TAYLOR, H. R., MITCHELL, P. (2004). Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, **122**(4): 477-485.
- ÇAKMAK, H., KARABULUT, M., KOCATÜRK, T. (2014). Anti-VEGF Ajanlar ve Göz Hastalıklarındaki Kullanım Alanları. *Selçuk Medical Journal*, **30**(2): 93-96.

- ÇELİK, T. (2017). Diyabetik Makula Ödeminin Farmakolojik Yönetiminde Güncel Gelişmeler: İntravitreal Enjeksiyon Uygulamaları Ve Sürekli İlaç Salınım Sistemleri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **18**(1): 37-43.
- DASHTBOZORG B., ZHANG J., HUANG F., HAAR ROMENY B.M. (2016). Automatic optic disc and fovea detection in retinal images using super-elliptical convergence index filters. In *International Conference on Image Analysis and Recognition*, 697-706, Springer, Cham.
- DI, Y., NIE, Q. Z., & CHEN, X. L. (2016). Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression change in experimental retinal neovascularization. *Int J Ophthalmol*, **9**(6): 804-808. <https://doi.org/10.18240/ijo.2016.06.02>
- DRANKOWSKA, J., KOS, M., KOSCIUK, A., MARZEDA, P., BOGUSZEWSKA-CZUBARA, A., TYLUS, M., & SWIECH-ZUBILEWICZ, A. (2019). MMP targeting in the battle for vision: Recent developments and future prospects in the treatment of diabetic retinopathy. *Life Sci*, **229**: 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.038>
- DUNN, K., AOTAKI-KEEN, A., PUTKEY, F., HJELMELAND, L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research*, **62**(2): 155-170.
- EROSCHENKO, V. P., DI FIORE, M. S. (2013). D iFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Lippincott Williams ve Wilkins basımevi.
- FERRARA, N., GERBER, H.P., LECOUTER, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, **9**(6): 669-676.
- FERRARA, N., HENZEL, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **161**(2): 851-858.
- FLAXMAN, S. R., BOURNE, R. R. A., RESNIKOFF, S., ACKLAND, P., BRAITHWAITE, T., CICINELLI, M. V., DAS, A., JONAS, J. B., KEEFFE, J., KEMPEN, J. H., LEASHER, J., LIMBURG, H., NAIDOO, K., PESUDOV, K., SILVESTER, A., STEVENS, G. A., TAHHAN, N., WONG, T. Y., TAYLOR, H. R., VISION LOSS EXPERT GROUP OF THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE, S. (2017). Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, **5**(12): 1221-1234. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30393-5)

- FLORES, R., CARNEIRO, A., VIEIRA, M., TENREIRO, S., SEABRA, M. C. (2021). Age-Related Macular Degeneration: Pathophysiology, Management, and Future Perspectives. *Ophthalmologica*, **244**(6): 495-511. <https://doi.org/10.1159/000517520>
- FOLKMAN, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med*, **57**: 1-18. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131306>
- FOLKMAN, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, **6**(4): 273-286. <https://doi.org/10.1038/nrd2115>
- GALLUZZI, L., AARONSON, S. A., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., ANDREWS, D. W., BAEHRECKE, E. H., BAZAN, N. G., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D. E., BRENNER, C., CASTEDO, M., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., COHEN, G. M., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DESHMUKH, M., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., FLAVELL, R. A., FULDA, S., GARRIDO, C., GOLSTEIN, P., GOUGEON, M. L., GREEN, D. R., GRONEMEYER, H., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HENGARTNER, M. O., ICHIJO, H., JAATTELA, M., KEPP, O., KIMCHI, A., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KORNBLUTH, S., KUMAR, S., LEVINE, B., LIPTON, S. A., LUGLI, E., MADEO, F., MALOMI, W., MARINE, J. C., MARTIN, S. J., MEDEMA, J. P., MEHLEN, P., MELINO, G., MOLL, U. M., MORSELLI, E., NAGATA, S., NICHOLSON, D. W., NICOTERA, P., NUNEZ, G., OREN, M., PENNINGER, J., PERVAIZ, S., PETER, M. E., PIACENTINI, M., PREHN, J. H., PUTHALAKATH, H., RABINOVICH, G. A., RIZZUTO, R., RODRIGUES, C. M., RUBINSZTEIN, D. C., RUDEL, T., SCORRANO, L., SIMON, H. U., STELLER, H., TSCHOPP, J., TSUJIMOTO, Y., VANDENABEELE, P., VITALE, I., VOUSDEN, K. H., YOULE, R. J., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B., & KROEMER, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, **16**(8): 1093-1107. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>
- GAUDREAULT, J., FEI, D., RUSIT, J., SUBOC, P., SHIU, V. (2005). Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Investigative ophthalmology & visual science*, **46**(2): 726-733.
- GELISKEN, F., ZIEMSEN, F. (2010). Diabetische Makulopathie. *Der Ophthalmologe*, **107**(8): 773-788.
- GHOLAM A. PEYMAN, S. A. M., CONWAY, M. D. (2006). *Vitreoretinal Surgical Techniques*, (M. D. C. Gholam A. Peyman, Ed. 2nd ed.). CRC Press.
- GÖKMEN, F. G. (2003). *Sistematik Anatomi*. Güven Kitabevi.

- GRYTZ, R., MESCHKE, G., JONAS, J. B. (2011). The collagen fibril architecture in the lamina cribrosa and peripapillary sclera predicted by a computational remodeling approach. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, **10**(3): 371-382.
- GÜNAY, M., ÇELİK, G. (2015). Prematüre retinopatisinde intravitreal anti-VEGF tedavisi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, **46**(1): 40-44.
- HASHIZUME, K. (2007). Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *Journal of Reproduction and Development*, **53**(1): 1-11.
- HE, C., & LEVINE, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*, **22**(2): 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.01.001>
- HORAKOVA, K., SOVCIKOVA, A., SEEMANNOVA, Z., SYROVA, D., BUSANYOVA, K., DROBNA, Z., FERENCIK, M. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic Biol Med*, **30**(6): 650-664. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00508-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00508-6)
- ICHIMURA, Y., KIRISAKO, T., TAKAO, T., SATOMI, Y., SHIMONISHI, Y., ISHIHARA, N., MIZUSHIMA, N., TANIDA, I., KOMINAMI, E., OHSUMI, M., NODA, T., & OHSUMI, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, **408**(6811): 488-492. <https://doi.org/10.1038/35044114>
- İLHAN, B., ELDEM, B. (1998). Retina Fizyolojisi. *Journal of Retina-Vitreous*, **6**(1): 68-73.
- KANG, R., ZEH, H. J., LOTZE, M. T., & TANG, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, **18**(4): 571-580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- KANG, S., PARK, E. J., JOE, Y., SEO, E., PARK, M. K., SEO, S. Y., CHUNG, H. Y., YOO, Y. H., KIM, D. K., & LEE, H. J. (2010). Systemic delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) elevates levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology*, **151**(12): 5638-5646. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0478>
- KARABAŞ, V. L., TOKUÇ, E. Ö., ŞERMET, F. (2022). Survey of Intravitreal Injection Preferences for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration and Macular Edema Among Members of the Turkish Ophthalmological Association. *Turkish Journal of Ophthalmology*, **52**(3): 179-185.
- KARAGOZ, I.K., ALLAHVERDIYEV A, DEMIRCIOGLU A, ABAMOR ES, DINPARVAR S, BAGIROVA M. (2021) Producing aflibercept loaded poly (lactic co glycolic acid)[plga] nanoparticles as a new ocular drug delivery system and its challenges. *feb fresenius environmental bulletin*. **1**:1481.

- KARANTZA-WADSWORTH, V., PATEL, S., KRAVCHUK, O., CHEN, G., MATHEW, R., JIN, S., & WHITE, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*, **21**(13): 1621-1635. <https://doi.org/10.1101/gad.1565707>
- KARIA, N. (2010). Retinal vein occlusion: pathophysiology and treatment options. *Clin Ophthalmol*, **4**: 809-816. <https://doi.org/10.2147/opth.s7631>
- KAUSHIK, S., & CUERVO, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **19**(6): 365-381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- KEKLİKÇİ, U., ÇİFTÇİ, S., ÜNLÜ, K. (2008). Neovasküler Glokom ile Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün İlişkisi ve Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörlerinin Tedavideki Yeri. *Türkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology*, **17**(2): 124-131.
- KIERSZENBAUM, A. L., DEMİR, R. (2006). Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş. Palme basımevi.
- KIHARA, A., KABEYA, Y., OHSUMI, Y., & YOSHIMORI, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports*, **2**(4): 330-335.
- KIM, L. A., D'AMORE, P. A. (2012). A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. *Am J Pathol*, **181**(2): 376-379. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.006>
- KLIFFEN, M., SHARMA, H. S., MOOY, C. M., KERKVLIT, S., DE JONG, P. T. (1997). Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol*, **81**(2): 154-162. <https://doi.org/10.1136/bjo.81.2.154>
- KROEMER, G., MARINO, G., & LEVINE, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, **40**(2): 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
- LAMBERT, E., DASSÉ, E., HAYE, B., & PETITFRÈRE, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Critical reviews in oncology/hematology*, **49**(3): 187-198.
- LEUNG, D. W., CACHIANES, G., KUANG, W.-J., GOEDDEL, D. V., FERRARA, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**(4935): 1306-1309.

- LEVINE, B., & KLIONSKY, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**(4): 463-477. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00099-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00099-1)
- LEVINE, B., & KROEMER, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, **132**(1): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- LI, R., DU, J., & CHANG, Y. (2016). Role of Autophagy in Hypoxia-Induced Angiogenesis of RF/6A Cells in vitro. *Curr Eye Res*, **41**(12): 1566-1570. <https://doi.org/10.3109/02713683.2016.1145234>
- LIANG, J., PIAO, Y., HENRY, V., TIAO, N., & DE GROOT, J. F. (2015). Interferon-regulatory factor-1 (IRF1) regulates bevacizumab induced autophagy. *Oncotarget*, **6**(31): 31479-31492. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5491>
- LIU, J., FAN, L., WANG, H., & SUN, G. (2016). Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy. *Med Oncol*, **33**(1): 10. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0721-9>
- LUCIO-ETEROVIC, A. K., PIAO, Y., & DE GROOT, J. F. (2009). Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res*, **15**(14): 4589-4599. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0575>
- LYTVYNCHUK, L., SERGIENKO, A., LAVRENUCHUK, G., & PETROVSKI, G. (2015). Antiproliferative, Apoptotic, and Autophagic Activity of Ranibizumab, Bevacizumab, Pegaptanib, and Aflibercept on Fibroblasts: Implication for Choroidal Neovascularization. *J Ophthalmol*, **2015**: 934963. <https://doi.org/10.1155/2015/934963>
- MALIK, D., TAREK, M., CACERES DEL CARPIO, J., RAMIREZ, C., BOYER, D., KENNEY, M. C., & KUPPERMANN, B. D. (2014). Safety profiles of anti-VEGF drugs: bevacizumab, ranibizumab, aflibercept and ziv-aflibercept on human retinal pigment epithelium cells in culture. *Br J Ophthalmol*, **98** Suppl 1(Suppl 1): i11-16. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305302>
- MALKOÇ, İ. (2006). Göz Küresinin Tabakaları: Anatomik ve Histolojik Bir Derleme. *Eurasian J Med*, **38**: 124-129.
- MARINO, G., NISO-SANTANO, M., BAEHRECKE, E. H., & KROEMER, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**(2): 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
- MARINO, G., SALVADOR-MONTOLIU, N., FUEYO, A., KNECHT, E., MIZUSHIMA, N., & LOPEZ-OTIN, C. (2007). Tissue-specific autophagy alterations and increased

- tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem*, **282**(25): 18573-18583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701194200>
- MARUYAMA, T., & NODA, N. N. (2018). Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of antibiotics*, **71**(1): 72-78.
- MATHER, J. P., ROBERTS, P. E. (1998). Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. Springer Science and Business Media basımevi.
- MICHAELSON, I. (1948). The mode of development of the vascular system in the retina: With some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK*, **68**: 137-180.
- MILLER, J. W., ADAMIS, A. P., SHIMA, D. T., D'AMORE, P. A., MOULTON, R. S., O'REILLY, M. S., FOLKMAN, J., DVORAK, H. F., BROWN, L. F., BERSE, B. (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *The American journal of pathology*, **145**(3): 574.
- MILLER, J. W., BAGHERI, S., VAVVAS, D. G. (2017). Advances in Age-related Macular Degeneration Understanding and Therapy. *US Ophthalmic Rev*, **10**(2): 119-130. <https://doi.org/10.17925/USOR.2017.10.02.119>
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**(1-2): 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- OHSUMI, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*, **24**(1): 9-23. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.169>
- OKU, M., & SAKAI, Y. (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *Bioessays*, **40**(6): e1800008. <https://doi.org/10.1002/bies.201800008>
- PAPADOPOULOS, N., MARTIN, J., RUAN, Q., RAFIQUE, A., ROSCONI, M. P., SHI, E., PYLES, E. A., YANCOPOULOS, G. D., STAHL, N., WIEGAND, S. J. (2012). Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*, **15**(2): 171-185.
- PASCOLINI, D., MARIOTTI, S. P., POKHAREL, G. P., PARARAJASEGARAM, R., ETYA'ALE, D., NEGREL, A. D., RESNIKOFF, S. (2004). 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol*, **11**(2): 67-115. <https://doi.org/10.1076/oep.11.2.67.28158>

- PRÄBST, K., ENGELHARDT, H., RINGGELER, S., HÜBNER, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. Springer basımevi.
- PUDDU, A., SANGUINETI, R., TRAVERSO, C. E., VIVIANI, G. L., & NICOLO, M. (2016). Response to anti-VEGF-A treatment of retinal pigment epithelial cells in vitro. *Eur J Ophthalmol*, **26**(5), 425-430. <https://doi.org/10.5301/ejo.5000786>
- QU, X., YU, J., BHAGAT, G., FURUYA, N., HIBSHOOSH, H., TROXEL, A., ROSEN, J., ESKELINEN, E. L., MIZUSHIMA, N., OHSUMI, Y., CATTORETTI, G., & LEVINE, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, **112**(12): 1809-1820. <https://doi.org/10.1172/JCI20039>
- RAEESZADEH-SARMAZDEH, M., DO, L. D., & HRITZ, B. G. (2020). Metalloproteinases and their inhibitors: potential for the development of new therapeutics. *Cells*, **9**(5): 1313.
- REDDY, R. K., MAO, C., BAUMEISTER, P., AUSTIN, R. C., KAUFMAN, R. J., & LEE, A. S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem*, **278**(23): 20915-20924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212328200>
- RIES, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*, **71**(4): 659-672. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1457-3>
- SAENZ-DE-VITERI, M., FERNANDEZ-ROBREDO, P., HERNANDEZ, M., BEZUNARTEA, J., REITER, N., RECALDE, S., GARCIA-LAYANA, A. (2016). Single- and repeated-dose toxicity study of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in ARPE-19 cells under normal and oxidative stress conditions. *Biochem Pharmacol*, **103**: 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.017>
- SCHOTTLER, J., RANDOLL, N., LUCIUS, R., CALIEBE, A., ROIDER, J., & KLETTNER, A. (2018). Long-term treatment with anti-VEGF does not induce cell aging in primary retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, **171**: 1-11.
- SEGATTO, M., FICO, E., GHARBIYA, M., ROSSO, P., CARITO, V., TIRASSA, P., PLATEROTI, R., & LAMBIASE, A. (2019). VEGF inhibition alters neurotrophin signalling pathways and induces caspase-3 activation and autophagy in rabbit retina. *J Cell Physiol*, **234**(10): 18297-18307. <https://doi.org/10.1002/jcp.28462>
- SENGER, D. R., CONNOLLY, D. T., VAN DE WATER, L., FEDER, J., DVORAK, H. F. (1990). Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-

- secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, **50**(6): 1774-1778. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155059>
- SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S., DVORAK, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**(4587): 983-985.
- SHI, S., JIN, Y., SONG, H., & CHEN, X. (2019). MicroRNA-34a attenuates VEGF-mediated retinal angiogenesis via targeting Notch1. *Biochem Cell Biol*, **97**(4): 423-430. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0304>
- SHIMA, D. T., ADAMIS, A. P., FERRARA, N., YEO, K.-T., YEO, T.-K., ALLENDE, R., FOLKMAN, J., D'AMORE, P. A. (1995). Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Molecular Medicine*, **1**(2): 182-193.
- SIBEL, İ. (2014). Retina anatomisi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **15**(3): 355-359.
- SNELL RS, LEMP MA. Clinical anatomy of the eye. The orbital blood vessels. 2nd Edition. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 1998:277-89.
- STEWART, M. W., ROSENFELD, P. J. (2008). Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *British Journal of Ophthalmology*, **92**(5): 667-668.
- STRAUSS, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, **85**(3): 845-881.
- TANER, D. (1999). Fonksiyonel Nöroanatomi. ODTÜ basımevi.
- TANIDA, I., SOU, Y. S., EZAKI, J., MINEMATSU-IKEGUCHI, N., UENO, T., & KOMINAMI, E. (2004). HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem*, **279**(35): 36268-36276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401461200>
- VERMA, R. P., & HANSCH, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*, **15**(6): 2223-2268. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>
- VURAL, P. (2018). Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Rolü. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, **16**(1): 53-62.

- WANG, Y., YAO, Y., LI, R., WU, B., LU, H., CHENG, J., LIU, Z., & DU, J. (2021). Different effects of anti-VEGF drugs (Ranibizumab, Aflibercept, Conbercept) on autophagy and its effect on neovascularization in RF/6A cells. *Microvasc Res*, **138**: 104207. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104207>
- WHO, W. H. O. (2013). *Global Action Plan for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases 2013–2020* Retrieved May 8 from <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-action-plan/en/>
- YANOFF, M., DUKER, J. (2018). *Retina and Vitreous*. Elsevier basımevi.
- YANOFF, M., SASSANI, J. W. (2020). 12 - Vitreous. *Ocular Pathology*. Elsevier basımevi. p: 481-493.
- YE, F., KANEKO, H., HAYASHI, Y., TAKAYAMA, K., HWANG, S. J., NISHIZAWA, Y., KIMOTO, R., NAGASAKA, Y., TSUNEKAWA, T., MATSUURA, T., YASUKAWA, T., KONDO, T., & TERASAKI, H. (2016). Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Free Radic Biol Med*, **94**: 121-134. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.027>
- YORIMITSU, T., & KLIONSKY, D. J. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol*, **17**(6): 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.04.005>
- YORSTON, D. (2014). Anti-VEGF drugs in the prevention of blindness. *Community Eye Health*, **27**(87): 44-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918459>
- ZHU, X. R., & DU, J. H. (2018). Autophagy: a potential target for the treatment of intraocular neovascularization. *Int J Ophthalmol*, **11**(4): 695-698. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.04.26>