

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DOKU PLAZMİNOJEN AKTİVATÖRLERİNİN RETİNA PİGMENT
EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Havvanur BAYRAKTAR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Arif KOYTAK

TEMMUZ 2020

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DOKU PLAZMİNOJEN AKTİVATÖRLERİNİN RETİNA PİGMENT
EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Havvanur BAYRAKTAR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Arif KOYTAK

TEMMUZ 2020



Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tıpta uzmanlık öğrencisi Havvanur BAYRAKTAR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Doku Plazminojen Aktivatörlerinin Retina Pigment Epitel Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik, Genotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Arif KOYTAK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. İbrahim Arif KOYTAK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Hakan Özdemir
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Fevzi Şentürk
Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi

BEYAN FORMU

Uzmanlık Tezi olarak sunduğum “Doku Plazminojen Aktivatörlerinin Retina Pigment Epitel Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik, Genotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İbrahim Arif KOYTAK‘ın sorumluluğunda tamamladığımı, tezin planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynakçada eksiksiz gösterdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Havvanur BAYRAKTAR



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, bana bazen hocalık bazen abilik yaparak yol gösteren, hem akademik hem de mesleki hayatıma büyük katkıları olan, her daim örnek aldığım tez danışmanım kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim Arif Koytak'a;

Cerrahi ve tıbbi retina alanında kliniğimize ve eğitimime büyük katkı sağlamış, eğitimci kişiliği ve engin tecrübesi ile bana her anlamda ışık tutan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Hakan Özdemir'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, gerek klinik gerekse cerrahi anlamda eğitimime büyük katkı göstermiş kliniğimizin değerli hocaları Sayın Prof. Dr. Betül Tuğcu'ya, Doç. Dr. Jülide Canan Umurhan Akkan'a, Doç. Fadime Nuhoglu'na ve Doç. Dr. Ahmet Elbay'a;

Birlikte çalıştığımız kısa süre içerisinde mesleki tecrübelerini yorulmadan bana aktarmaya çalışan, oftalmolojinin her alanında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal Arıcı'ya;

Tezimdeki biyokimyasal çalışmalarda emeği geçen Sayın Prof. Dr. Abdurrahim Koçyiğit'e ve Dr. Eray Metin Güler'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca kendileriyle beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum her biri birbirinden kıymetli tüm asistan arkadaşlarıma;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her türlü medikal ve paramedikal sohbetlerimizi özleyeceğim, kliniğimizin çalışkan uzmanları Uzm. Dr. Cansu Ekinci ve Uzm. Dr. Furkan Kırık'a;

Polikliniğimizi ve ameliyathanemizi huzurlu bir ortama çeviren, her türlü işimizi kolaylaştıran, yaptığım tüm çalışmalarda veri toplamamda yardımlarını esirgemeyen başta Gamze ve Gülçin olmak üzere tüm klinik personeline ve hemşire arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemde en büyük katkıyı sağlayan, beni her türlü fedakârlıklarla yetiştiren aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Havvanur BAYRAKTAR

İÇİNDEKİLER

BEYAN FORMU	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ:	x
KISALTMALAR	xi
ÖZET	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1 Retinanın Topografik Anatomisi ve Histolojisi	4
2.1.1. Makula (Area santralis, makula lutea)	4
2.1.2 Ora Serrata	6
2.1.3 Periferik retina	6
2.2 Retinanın Yapısal Hücreleri ve Tabakaları	6
2.2.1 Fotoreseptör Hücre Tabakası	8
2.2.2 Dış Limitan Membran.....	9
2.2.3 Dış Nükleer Tabaka	9
2.2.4 Dış Pleksiform Tabaka.....	9
2.2.5 İç Nükleer Tabaka.....	10
2.2.6 İç Pleksiform Tabaka	10
2.2.7 Ganglion Hücre Tabakası	10
2.2.8 Sinir Lifi Tabakası	11
2.2.9 İç Limitan Membran	11
2.3 Glial Hücreler	11
2.4 Retina Pigment Epiteli.....	13
2.5 Koroid Anatomisi ve Histolojisi.....	18
2.6 Retinanın Vasküler Dolaşımı:	20
2.7 Vitreus:	22
2.8 Subretinal Kanama	23
2.8.1 Etyoloji.....	23

2.8.2 Patofizyoloji.....	29
2.8.3 Prognoz	30
2.8.4 Tedavi	31
2.9 Doku Plazminojen Aktivatörleri.....	32
2.9.1 Moleküler yapı ve etki mekanizması.....	32
2.9.2 Rekombinant doku plazminojen aktivatörleri (rtPA)	34
2.10 Dna Hasarı	37
2.10.1 Tek hücre jel elektroforez (Comet testi)	38
2.11 Apoptoz	39
2.11.1 Apoptoz morfolojisi	39
2.11.2 Apoptoz mekanizmaları	40
2.11.3 Apoptotik hücre ölümünü tespit etme yöntemleri	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1 Gereç	44
3.1.1 Cihazlar	44
3.1.2 Kimyasallar	45
3.2 Yöntem	46
3.2.1 Hücre kültürü çalışmaları.....	46
3.2.2 Hücre Sayımı ve Ekimi.....	47
3.2.3 Hücre Canlılık/Sitotoksosite Testi (ATP Testi).....	47
3.2.4 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeyinin ölçümü (iROS Ölçümü)....	47
3.2.5 DNA hasarı ölçümü	48
3.2.6 Apoptoz testi.....	50
3.2.7 Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) tayini.....	50
3.2.8 Hücre içi glutatyon düzeylerinin ölçümü.....	51
3.2.9 Hücre içi kalsiyum düzeyinin ölçümü (Ca ²⁺ Ölçümü)	51
3.2.10 Enflamasyon	52
3.3 İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR:	53
4.1 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve IC50 Değerinin (%50 inhibitör konsantrasyon) Saptanması	53
4.2 Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	54
4.3 Genotoksisitenin Değerlendirilmesi	55
4.4 Apoptozun Değerlendirilmesi	58
4.5 Mitokondriyal Membran Potansiyelinin (MMP) Değerlendirilmesi.....	60

4.6 Hücre içi Kalsiyum Düzeyinin Değerlendirilmesi	61
4.7 Hücre içi Glutasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	62
4.8 İnflamasyonun Değerlendirilmesi	63
4.8.1 İnterlökin 1-beta (IL1- β) analizi	63
5. TARTIŞMA:	64
6. SONUÇ	72
7. KAYNAKLAR	73



TABLO LİSTESİ

Tablo 2-1 : Subretinal kanama etyolojisi.....	24
Tablo 2-2 : Subretinala kanama tedavi seçenekleri.....	32
Tablo 2-3 : Üçüncü kuşak fibrinolitiklerin özellikleri.....	35
Tablo 2-4 : Alteplaz ve tenekteplazın klinik özellikleri.....	37
Tablo 2-5 : Apoptotik hücre ölümünü tespit etme yöntemleri	42
Tablo 3-1 : Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar.....	44
Tablo 3-2 : Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar.....	45
Tablo 3-3 : Çalışma kapsamında kullanılan kitler.....	46

ŞEKİL LİSTESİ:

Şekil 2-1: Makülanın Topografik Anatomisi.....	5
Şekil 2-2: Retina Tabakaları.....	7
Şekil 2-3: Henle Tabakası.....	9
Şekil 2-4: Retinanın vasküler yapılanması.....	21
Şekil 2-5 : Vitreus anatomisi.....	23
Şekil 2-6 : Travma sonrası subretinal kanama gelişen bir olgunun fundus fotoğrafi.....	24
Şekil 2-7 : Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olan bir olguda gelişmiş subretinal kanama.....	26
Şekil 2-8 : Fibrinoliz mekanizması.....	33
Şekil 2-9 : Alteplaz ve tenekteplazın moleküler yapısı.....	37
Şekil 2-10 : Comet deneyinde ‘kuruklu yıldız görünümü’.....	38
Şekil 2-11 : Kuyruklu yıldızların görsel puanlaması.....	39
Şekil 3-1 : Alteplaz ve tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığı üzerine etkisi.....	54
Şekil 3-2 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında hücre içi ROS düzeyine etkisi.....	55
Şekil 3-3: Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE- 19 hücreleri üzerindeki genotoksik etkisi.....	57
Şekil 3-4 : DNA hasarının değerlendirilmesi.....	57
Şekil 3-5: Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE- 19 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.....	59
Şekil 3-6: Apoptoz görüntüleri.....	59
Şekil 3-7 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE- 19 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim.....	60
Şekil 3-8 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE- 19 hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeyin etkisi.....	61
Şekil 3-9 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE- 19 hücrelerinde hücre içi glutatasyon düzeyine etkisi.....	62
Şekil 3-10 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE- 19 hücrelerinde IL1-β düzeyine etkisi.....	63
Şekil 3-11 : Şekil 3-10 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücrelerinde VEGF düzeyine etkisi.....	64

KISALTMALAR

FAZ: Foveal Avasküler Zon

FFA: Fundus Floresein Anjiografi

GİB: Göz içi basıncı

GSH: Glutatyon

KNV : Koroid Neovaskülarizasyonu

OKT: Optik Kohorens Tomografi

PKV: Polipoidal Koroidal Vaskülopati

RAM: Retinal Arteriyolar Makroanevrizma

RAP: Retinal Anjiyomatöz Proliferasyon

RPE: Retina Pigment Epiteli

rtPA :Rekombinant Doku Plazminojen Aktivatörü

tPA : Doku Plazminojen Aktivatörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

YBMD: Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu

DOKU PLAZMİNOJEN AKTİVATÖRLERİNİN RETİNA PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, farklı konsantrasyonlardaki rekombinant doku plazminojen aktivatörlerinin (rtPA) insan retina pigment epitel (RPE) hücreleri üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada alteplaz ve tenekteplazın insan RPE hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi luminometrik ATP testiyle, genotoksik etkisi alkalen tekli hücre jel elektroforez (Comet Assay) yöntemiyle, apoptotik etkisi akridin turuncusu/etidyum bromür yöntemiyle ölçüldü. Ek olarak, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP), hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri farklı florometrik yöntemlerle ve glutatyon (GSH) seviyeleri ise luminometrik yöntem ile tayin edildi. Ayrıca inflamasyon belirteçleri incelendi.

Bulgular: Alteplaz ve tenekteplaz doza bağımlı olarak RPE hücrelerinde GSH ve MMP seviyelerini anlamlı şekilde düşürürken, sitotoksisite, DNA hasarı, apoptoz, hücre içi Ca^{2+} ve ROS düzeylerini anlamlı derecede arttırmıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlardaki alteplazın, tenekteplaza göre daha fazla sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğunu tespit ettik.

Sonuç: Bulgular hem alteplaz hem de tenekteplazın RPE hücrelerinde doza bağlı olarak sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmamız, alteplaz ve tenekteplaz molekülerinin RPE hücrelerinde apoptotik yolu indükleyen MMP azalması ve Ca^{2+} artışı ile sitotoksisite ve DNA hasarını indükleyen hücre içi ROS düzeyinin artışı ve GSH düzeyinin azalmasını bir arada göstermesi nedeniyle literatüre ışık tutmuştur. Ayrıca çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda uygulanan alteplazın tenekteplaza göre sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, rt-PA moleküllerinden tenekteplazın klinik kullanımda daha güvenli olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Doku plazminojen aktivatörleri, Retina pigment epiteli, Toksisite

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATORS ON RETINA PIGMENT EPITHELIAL CELLS

SUMMARY

Objective: The aim of this study is to investigate cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects of different concentrations of recombinant tissue plasminogen activators (rtPA) on human retina pigment epithelial (RPE) cells.

Materials and Methods: In this study, the cytotoxic effect of alteplase and tenecteplase on human RPE cells was measured by luminometric ATP test, the genotoxic effect was measured by alkaline single-cell electrophoresis (Comet Assay) method, and apoptotic effect by acridine orange/ethidium bromide method. In addition, mitochondrial membrane potential (MMP), intracellular calcium (Ca^{2+}), and reactive oxygen species (ROS) levels were measured by different fluorometric methods, and glutathione (GSH) levels were determined by the luminometric method. Also, inflammation markers were examined.

Results: Alteplase and tenecteplase reduced statistically significantly GSH and MMP levels while increased cytotoxicity, DNA damage, apoptosis, intracellular Ca^{2+} , and ROS levels in RPE cells dose-dependent manner. In addition, we found that alteplase at high concentrations had more cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects than that of tenecteplase.

Conclusion: The findings showed that both alteplase and tenecteplase have a dose-dependent cytotoxic, genotoxic and apoptotic effect on RPE cells. This study sheds light on the existing literature in the sense that it presents concomitantly the MMP decrease and Ca^{2+} increase of the alteplase and tenecteplase molecules which induces the apoptotic pathway in the RPE cells and the increase of the intracellular ROS level and the decrease of GSH level inducing cytotoxicity and DNA damage. Moreover, this study shows that alteplase applied at high concentrations have more cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects than the tenecteplase. These findings point to the potential reliability of the tenecteplase, one of the rt-PA molecules, in clinical use.

Keywords: Tissue plasminogen activators, Retinal pigment epithelium, Toxicity

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subretinal kanama, retinal ve/veya koroidal dolaşımdaki patolojiler sonucu oluşan ve özellikle ileri yaş hasta grubunda ciddi görme kaybına yol açabilen komplikasyonlardan biridir. Subretinal kanama sıklıkla yaşa bağlı maküla dejenerasyonuna (YBMD) sekonder gelişen koroidal neovaskülarizasyondan (KNV) kaynaklanmaktadır. Ayrıca, retinal arteriyolar makroanevrizma (RAM), künt travma, miyopik KNV, olası oküler histoplazmozis sendromu, valsalva retinopatisi, göz içi tümörler ve skleral çökertme cerrahisi gibi bazı cerrahiler sonrası komplikasyon olarak görülen postoperatif kanamalar gibi çok çeşitli patolojiler sonucunda da subretinal kanama gelişimi izlenebilmektedir [1-2]. Subretinal kanama sonucu hemoglobinin parçalanmasıyla açığa çıkan serbest demir iyonu fotoreseptörler için toksik etki göstermektedir. Retina altı kanama aynı zamanda fotoreseptörlerle koryokapillaris arasındaki oksijenin, besin maddelerinin ve atıkların değişimini engelleyen bir difüzyon bariyeri oluşturur. Kan, dış retina tabakaları ile retina pigment epiteli (RPE) arasındaki difüzyonu bloke ederek zamanla fotoreseptör atrofisine neden olmaktadır. Diğer bir hasar mekanizması ise retina altındaki kanda bulunan fibrin ağının kontrakte olmasıyla fotoreseptörlerde yırtılmalara neden olmasıdır [3-5].

Subretinal kanamanın doğal seyrinde prognoz kötüdür. Görsel prognoz, başlangıçtaki görme keskinliğine, kanamanın boyutuna ve konumuna, kanamanın başlangıcı ile tedavi arasındaki süreye, eşzamanlı ön veya arka segment tutulumuna bağlıdır. Özellikle YBMD zemininde gelişen ve/veya masif seyreden subretinal kanamalar, ileri derecede görme kaybı ile sonuçlanmaktadır [1,6].

Subretinal kanama gelişen retina altındaki kanın fotoreseptörleri ve RPE'ye kalıcı olarak zarar verme riski nedeniyle kanın bu plandan optimal zamanda uzaklaştırılıp fotoreseptörlerin ve dolayısıyla görme işlevinin korunması önem taşımaktadır.

Günümüzde subretinal kanamanın tedavisinde konsensus oluşturulmuş standart bir tedavi prosedürü olmamasına rağmen; genellikle küçük kanamaların tedavisinde intravitreal vasküler endotelyal büyüme faktörü inhibitörlerinin (anti-VEGF) enjeksiyonu ve gaz/ rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) enjeksiyonu, daha geniş ve kalın kanamaların tedavisinde ise vitrektomi ile beraber intravitreal/subretinal rt-PA enjeksiyonu ve pnömatik yer değiştirme prosedürü tercih edilmektedir.

Fibrin-spesifik trombolitik aktivitesi olan rtPA, plazminojen ile reaksiyona girdiğinde plazmin oluşur ve fibrini eriterek kan pıhtısının likefiye olmasını sağlar. Böylece; vitreus kavitesine veya subretinal alana enjekte edildiğinde, kan pıhtısının çözünmesi ve intravitreal gazın yüzey gerilimi ile yer değiştirerek uzaklaştırılması kolaylaşır. Akut miyokard enfarktüsü, akut pulmoner emboli ve akut iskemik inme tedavisinde yerini almış alteplaz (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Almanya), subretinal kanamanın tedavisinde de sıklıkla kullanılan rt-PA molekülüdür [7]. Son yıllarda, alteplazın bazı eksikliklerini gidermek için üçüncü nesil trombolitik ajanlar geliştirilmiştir. Tenekteplaz; çok noktalı mutasyonlara uğramış, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş bir tPA varyantıdır. Tenekteplaz (Metalysse, Boehringer Ingelheim, Sidney, Avustralya) alteplaz ile karşılaştırıldığında daha yüksek fibrin özgülüğüne, düşük retina toksisitesi potansiyeline ve intravitreal enjeksiyonu takiben daha yüksek oranda retinaya nüfuz etme yeteneğine sahiptir [8-10]. McAllister ve ark. YBMD'ye bağlı subretinal kanama tedavisi için intravitreal tenekteplaz enjeksiyonları uygulamış ve pozitif sonuçlarını bildirmiştir [11].

Subretinal kanamanın tedavisinde kullanımı yaygınlaşan rt-PA moleküllerinin güvenlik profilini belirlemek için yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Rt-PA moleküllerinin dış retina ve RPE'ye potansiyel toksisitesi çok sayıda hayvan çalışması ile belgelenmiştir. Yapılan bazı hayvan çalışmaları subretinal kanama tedavisinde intravitreal 25-50 µg ve daha düşük dozlarda alteplaz kullanımının olumlu bir güvenlik profiline sahip olduğunu göstermiştir. Lewis ve ark. bir tavşan modelinde 25 veya 50 ug dozlarında subretinal uyguladığı rt-PA ile hiçbir morfolojik retina toksisitesi kanıtı gözlemediğini raporlamıştır [12]. Alteplaza göre avantajları gösterilmiş olan tenekteplaz molekülünün güvenli doz aralığını belirlemek için yapılan hayvan çalışmaları da mevcuttur. Rowley ve ark. tavşanlara uygulanan 50 ug tenekteplaz dozunun güvenli olduğunu göstermiştir [9]. Ancak hayvan türleri,

insanlardan önemli ölçüde daha küçük vitreus hacmine sahiptir. Bu nedenle, insanlarda kullanılacak intravitreal ilaç konsantrasyonları hayvan çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar ile eşdeğer olmayacaktır. Bununla birlikte, insanlarda retina toksisitesi değişkendir ve bazı yazarlar tarafından terapötik dozlar olarak kabul edilen dozlarda toksik etkiler bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda intravitreal rt-PA uygulanan hastalarda, eksüdatif retina dekolmanı, RPE hiperpigmentasyonu, RPE değişiklikleri ve elektroretinografide b dalga kaybı gibi retina toksisitesi belirtileri raporlanmıştır [13].

Literatür gözden geçirildiğinde, rtPA kaynaklı RPE toksisitesini araştıran in vitro çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda, iki farklı rt-PA molekülünün(alteplaz ve tenekteplaz) RPE üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini ve bu etkilere neden olabilecek mekanizmaları in vitro deneylerle incelemek amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Retinanın Topografik Anatomisi ve Histolojisi

Retina, postmortem gözlerde dekole edilmiş retinanın ağ yapısına benzer özellikler göstermesi nedeniyle Yunanca ağ anlamına gelen “rete” kelimesinden köken almıştır. Retina; gözün en iç yüzeyini kaplayan, ışığı algılamayı sağlayan özelleşmiş hücrelerden oluşan şeffaf bir yapıdır. İç yüzeyi vitreus korteksi ile bağlantılı iken, dış kısmı Bruch membranı aracılığıyla koroide komşudur [14]. Retinanın şeffaf yapısı nedeniyle vaskülarize bir yapı olan koroid bu komşuluğu ile fundus muayenesinde kırmızı refle oluşturmaktadır. Retina periferden arka kutba doğru yaklaştıkça anatomik ve histolojik olarak değişiklikler gösterir.

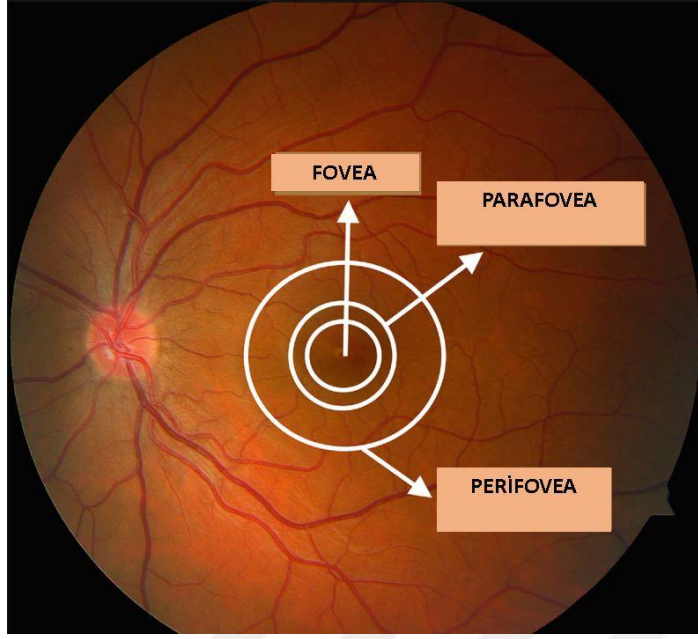
Retina topografik olarak 3 bölümde incelenebilir:

1. Makula (Area santralis, makula lutea)
2. Periferik retina
3. Ora serrata

2.1.1. Makula (Area santralis, makula lutea)

Makula anatomik olarak, alt ve üst temporal arkadlar arasında optik sinir başı merkezinden 4 mm temporal ve 0,8 mm inferiorda yer alan, horizontal çapı 5,5 mm olan santral retina alanıdır. Sinir lifi tabakasının bulunmaması, buna karşılık iki veya daha fazla ganglion hücre tabakasına sahip olması nedeniyle diğer retina bölgelerinden histolojik olarak ayrılır. Bu bölge perifer retinaya göre daha yüksek konsantrasyonlarda karotenoid pigmentler (lutein ve zeaksantin) içermesi nedeniyle ‘makula lutea’ olarak da adlandırılır [15].

Makroskopik olarak keskin sınırlarla ayıramamakla birlikte, makulayı anatomik olarak farklı bölümlerde incelemek fonksiyonel anatominin de daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu bölümler periferden santrale doğru perifovea, parafovea, fovea, foveal avasküler zon (FAZ) , foveola ve umbo olarak sıralanmaktadır(Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Makülanın Topografik Anatomisi

Perifovea, parafoveyayı çevreleyen yaklaşık 1,5 mm genişliğindeki dairesel alandır. Makülanın perifer sınırını oluşturmaktadır. Bu bölge birkaç kat ganglion hücre tabakası ve 6 kat bipolar hücre tabakası içermektedir.

Parafovea, foveayı çevreleyen 0,5 mm genişliğindeki alandır. Parafoveal bölgede 4-6 kat ganglion hücre tabakası ve 7-10 kat bipolar hücre tabakası bulunmaktadır.

Fovea, makülanın merkezinde retinanın iç yüzeyinde hafif depresyon oluşturan anatomik bölgedir. Bu bölge yaklaşık 1.5 mm çapında (optik disk boyutu), ortalama 250 µm kalınlığındadır. İç yüzeyi retina tabakalarının incelmesine bağlı olarak konkavdır. Yaklaşık 22°' lik bir konkaviteye sahip olan bu alanda koni ve müller hücreleri yoğun miktarda bulunurken, basil hücreleri bulunmamaktadır.

Foveola, foveanın santralindeki 0.35 mm çapındaki alana verilen isimdir. Bu alan retinanın en ince bölgesi olup ganglion hücre tabakası ve iç nükleer tabakadan yoksundur. Bu bölge koroidden beslenir, vasküler yapı içermez. Bu avasküler alanda uzamış ve dış limitan membran ile bağlantı kurmuş yoğun koni paketleri bulunmaktadır [16].

Umbo; foveolanın merkezinde yaklaşık 150-200 µm çapındaki çukurluğa verilen isimdir. Umbo makülanın tam merkezini temsil etmektedir. Fundus muaynesinde görülen foveolar ışık reflexine karşılık gelir. Koni hücrelerinin en yoğun bulunduğu bölge olması nedeni ile en yüksek görme keskinliğini sağlayan noktadır.

FAZ, makülanın kapillerlerden yoksun ve etrafı retinal kapiller ağ ile çevrili bölgesini tanımlar. Fovea içinde foveolayı da kapsayacak şekilde yerleşmiştir. Bu bölgenin net sınırları özellikle floresein anjiyografi'nin erken fazlarında tespit edilebilir. Yaşla birlikte boyutları değişse de yaklaşık 600 µm çapındadır [17].

2.1.2 Ora Serrata

Ora serrata; retina ve silyer cisim arasında yer alan dentat prosesler adı verilen girinti ve çıkıntılara sahiptir alan olup, nazalde 0.7-0.8 mm, temporalde ise 2.1 mm genişliğindedir. Ora serratanın optik sinire olan ortalama uzaklığı nazalde 27 mm, temporalde 32.5 mm, üst ve altta 31 mm'dir. Ora serratada fotoreseptörler yer almaz. Bu alanda nörosensöriyel retinanın çok katlı yapısı aniden pigmentsiz silyer epitele dönüşür.

2.1.3 Periferik retina

Vasküler arkadlar dışında kalan retinal alan periferik retina olarak adlandırılır.

2.2 Retinanın Yapısal Hücreleri ve Tabakaları

Retina, dış kısmında RPE ve iç kısmında nörosensöriyel retina olmak üzere 2 bölümden oluşmaktadır. Nörosensöriyel retina periferde ora serratada non-pigmente silyer epitel ile devam ederken posteriorda sinir lifi tabakası hariç optik sinir başında sonlanır. RPE hücrelerinin apikal yüzeyleri ve nörosensöriyel retina arasında oluşan potansiyel boşluk 'subretinal alan' olarak isimlendirilir. Nörosensöriyel retina ile RPE arasında anatomik bir bağlantı bulunmamakta, sadece optik sinir ve ora serrata bölgesinde sıkı yapışıklık görülmektedir.

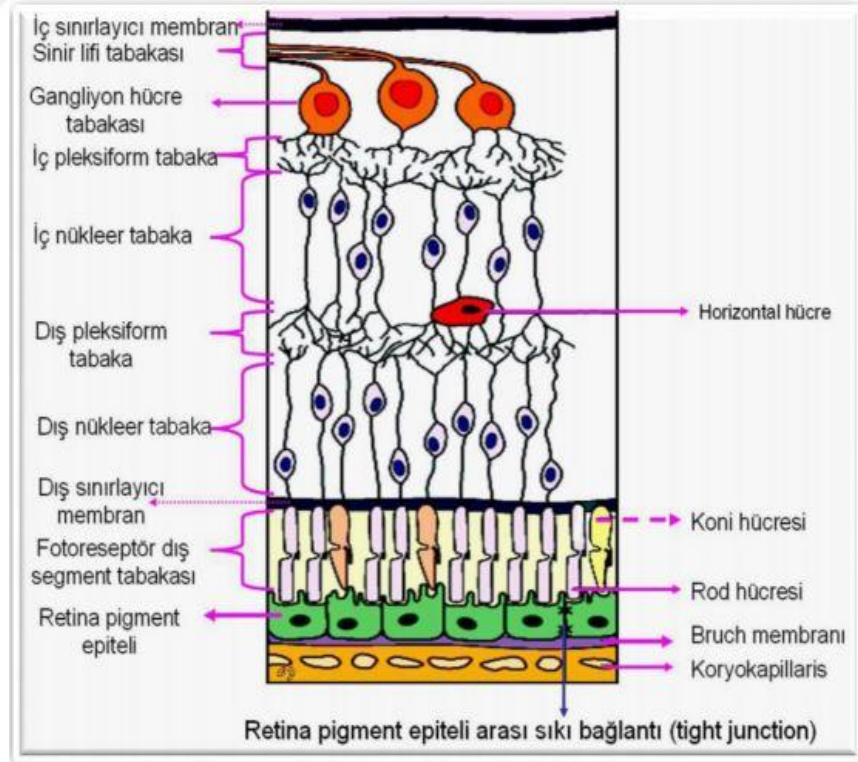
Nörosensöriyel retina incelendiğinde her biri farklı fonksiyona sahip ve belirli bir düzen içerisinde dizilmiş çeşitli hücre gruplarından oluştuğu görülür. Nörosensöriyel retinanın farklı tabakalarında 5 temel hücre grubu yer almaktadır; fotoreseptör hücreler, bipolar hücreler, horizontal hücreler, Amakrin hücreler ve ganglion hücreleri [18].

Retinada fotoreseptörler en dışta, bipolar hücreler ortada, ganglion hücreler ise en içte organize olmuşlardır. Bu hücreler arasındaki bağlantıyı sağlayan sinaptik yapılar ise retinanın pleksiform tabakalarını oluşturmaktadır. Bu sinir hücreleri ve sinapslar

görsel bilginin fototransdüksiyonunu yürütmek için hassas bir sinir ağı olarak birlikte işlev görür [19].

Nörosensöriyel retinayı sinapslar aracılığıyla bağlanmış, birbirine komşu dokuz belirgin tabakaya ayırarak inceleyebiliriz. Bu tabakaların içte RPE'den dışta vitreusa doğru sıralanışı şu şekildedir (Şekil 2):

1. Fotorseptör hücre tabakası
2. Dış limitan membran
3. Dış nükleer tabaka
4. Dış pleksiform tabaka
5. İç nükleer tabaka
6. İç pleksiform tabaka
7. Ganglion hücre tabakası
8. Sinir lifi tabakası
9. İç limitan membran



Şekil 2-2: Retina Tabakaları.

2.2.1 Fotoreseptör Hücre Tabakası

Fotoreseptör hücre tabakası, basil ve koni olarak adlandırılan yüksek düzeyde özelleşmiş nöroepitelyal hücrelerden oluşmaktadır. Fotoreseptörlerin temel işlevi bir dizi karmaşık fotokimyasal reaksiyonlar sonucunda fotopik uyarıyı merkezi sinir sistemi tarafından yorumlanabilen elektriksel iletiye dönüştürerek (fototransduksiyon) görme fonksiyonunu sağlamaktır. Yüksek ışık hassasiyetine sahip, tek bir fotona bile duyarlı olan basiller loş ışıktaki görmeden (skotopik görme) sorumlu hücrelerdir. Buna karşılık koniler basillere göre ışığa 100 kat daha az hassas olup, parlak ışıktaki görmeden (fotopik görme) sorumludurlar [20].

Fotoreseptörler dış segment, iç segment, sinaptik terminal ve nükleus olmak üzere dört hücresel kompartmandan oluşur. Dış segment, fotonların yakalandığı ve fototransdüksiyon kaskadının başladığı yerdir. İç segment ise metabolik faaliyetlerin sürdürüldüğü bölümdür. Fotoreseptör dış segmentlerinin iki önemli bağlantısı vardır. Bunlardan biri iç ve dış segment arasında 'silyum' adı verilen ince bir sitoplazmik köprüdür. Diğeri ise dış segmenti RPE'den ayıran glikoprotein içerikli hücre dışı matriks ile olan bağlantıdır. Dış segmentte bulunan en önemli membran protein yapısı rodlarda rodopsin, konlarda da renk pigmentleri olan opsinlerdir. Membranlardan difüze olarak transdusin aktiflenmesi ve ışık sinyalinin amplifiye edilmesini sağlarlar. Diğeri membran proteinleri yine fototransdüksiyonda görevli olan guanilil siklaz, transdusin, fosfodiesteraz 6, recoverin, guanilil siklaz aktive edici proteinlerdir. Sinaptik terminal, şerit (ribbon) olarak adlandırılan ve içinde glutamat veziküllerini barındıran yapıları içerir. Glutamat salınımı ile ikinci sıra retinal nöronlara (bipolar ve horizontal hücreler) eksitator sinyaller iletilir [21].

Basiller 100-120 µm uzunluğundadır. Dış segmentlerinde yaklaşık 1000 adet disk ve her bir diskte yaklaşık bir milyon adet ışığa duyarlı bir pigment olan rodopsin molekülü bulunur. Koniler yaklaşık 65 - 75 µm uzunluğunda hücrelerdir. Dış segmentlerinde bulunan diskleri çevreleyen zar plazma membranı ile devamlılık gösterir. Konilerin en yoğun olarak bulunduğu bölge fovea iken, basiller retinanın orta periferinde yoğunlaşmıştır [22]

2.2.2 Dış Limitan Membran

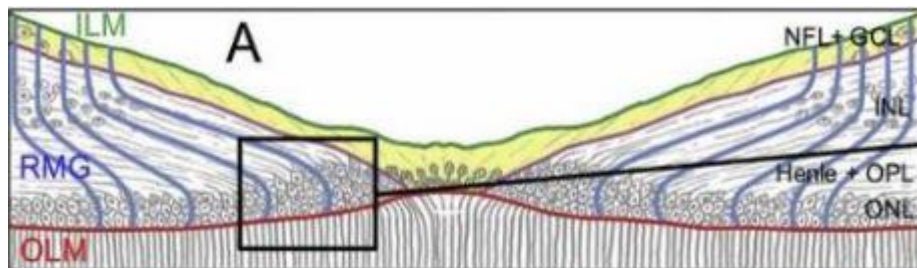
Dış limitan membran ışık mikroskobu ile görülebilen, metabolik bariyer fonksiyonu olan tabakadır. Gerçek bir membran olmayan bu tabaka, fotoreseptörlerin iç segmentleriyle Müller hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların kesişme bölgesidir. Foveada yer alan konilerin dış segmentlerinin uzantıları nedeniyle dış limitan membran retinanın iç yüzeyine doğru bir elevasyon göstermektedir. Bu fenomen fovea eksterna olarak adlandırılır [16].

2.2.3 Dış Nükleer Tabaka

Basil ve konilerin hücre gövdelerinin ve nükleuslarının bulunduğu tabakadır. Optik diskin nazal kenarında bu tabaka 45 µm kalınlığında ve 8-9 katlı iken, temporal disk kenarında 22 µm kalınlığında ve 4 katlı yapıdadır.

2.2.4 Dış Pleksiform Tabaka

Dış pleksiform tabakada fotoreseptörlerin aksonları ve bu hücrelerin bipolar ve horizontal hücrelerin dendritleri ile yaptıkları bağlantılar yer almaktadır. Böylece retinanın birinci sıra nöronları ile ikinci sıra nöronlarının sinaps yaptığı tabakadır. Makülada konilerin aksonları, iç retina ve ganglion hücrelerinin ekssantrik konumlu nöronlarını karşılamak için oblik bir seyir izler. Bu nedenle, bu bölgede dış pleksiform tabaka daha kalın olarak izlenir ve 'Henle tabakası' olarak adlandırılır (Şekil 3). YBMD ve diyabetik retinopati gibi retinal patolojilerin Henle tabakasındaki liflerin organizasyonunu bozduğu bilinmektedir. Ayrıca, Henle tabakası retinadan uzanan damarların uç noktasında yer alması nedeniyle kistik oluşumların, kanamaların ve eksüda birikimlerinin sıklıkla görüldüğü bölgedir [23].



Şekil 2- 3: Henle Tabakası.

2.2.5 İç Nükleer Tabaka

İç nükleer tabakada dıştan içe doğru horizontal hücreler, bipolar hücreler, Müller hücrelerinin nükleusları ve amakrin hücreler yer almaktadır. Bipolar hücreler bu tabakanın orta segmentinde yer alır ve fotoreseptörlerden aldığı görsel uyarıları vertikal olarak iç pleksiform tabakaya iletmekle görevlidir. Amakrin hücreler ise iç segmentte yer alır ve bipolar hücrelerden aldıkları uyarıları ganglion hücrelerine aktarmakla sorumludur [24].

2.2.6 İç Pleksiform Tabaka

Bipolar hücreler ile gangliyon hücreleri ve amakrin hücreler arasındaki aksodendritik sinapsların ve amakrin hücrelerin lateral uzantılarının yer aldığı tabakadır. Dolayısıyla ikinci sıra ve üçüncü sıra nöronların sinaps bölgesidir. İçerdiği yoğun sinaptik ağ nedeniyle dış pleksiform tabakadan daha kalın olarak izlenmektedir. Fovealada iç pleksiform tabaka bulunmaz [24].

2.2.7 Ganglion Hücre Tabakası

Bu tabakada üçüncü sıra nöron olan ganglion hücrelerinin gövdeleri ve nükleusları yer almaktadır. Ayrıca ganglion hücre tabakasında Müller hücre uzantıları ve retinal damar dallanmaları göze çarpar. Multipolar olan ganglion hücrelerinin dendritleri bipolar ve Amakrin hücrelerin aksonları ile bağlantılar yapmaktadır. Ganglion hücreleri dendritleri ile aldığı uyarıları aksonları aracılığıyla iletir ve optik sinir halinde gözü terk eder. Dış ve iç nükleer tabakalara göre rölatif olarak ince olan bu tabaka retinanın büyük bölümünde tek kat halinde seyrederek. Makülaya yaklaştıkça kalınlığı artar ve fovea kenarında 6-8 kat olarak yer alır.

Ganglion hücreleri boyut, ileti hızı ve fonksiyonlarına göre W, X ve Y hücreleri olarak üç tip olarak incelenmektedir. Fotoreseptörler tarafından üretilen uyarının beyindeki görme merkezine iletilmesini sağlayan bu hücreler ışık uyarısı olmasa dahi bazal aktivite göstermektedir [24].

2.2.8 Sinir Lifi Tabakası

Optik diske uzanan ganglion hücre aksonları sinir lifi tabakasını oluştururlar. Sinir lifi tabakasının kalınlığı bölgesel olarak farklılıklar gösterir. Aksonlar optik diske yaklaşırken sinir lifi tabakasının kalınlığı artar. En kalın olduğu yer diskin üst temporal ve alt temporal kenarıdır. Sinir liflerinde lamina kribrozaya ulaşana kadar miyelin kılıf bulunmamaktadır.

2.2.9 İç Limitan Membran

İç limitan membran, retina ve vitreus boşluğu arasındaki sınırı histolojik olarak tanımlayan bir bazal membrandır. İç limitan membran, embriyonik gelişim sürecinde optik sinir aksonlarının büyümesinde ve gangliyon hücre tabakasının düzgün gelişiminde kritik bir rol oynar [25]. Fonksiyonel olarak iç limitan membran, vitreusun retina ile bağlantısını kolaylaştıran yapışkan bir tabaka olarak kabul edilir. Bu nedenle, iç limitan membran vitreomaküler arayüzü etkileyen bozuklukların patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir [26].

İç limitan membran ışık mikroskobu ile görülmez, ancak bazal membran bileşenlerinin herhangi birine karşı antikorlar kullanılarak immünohistokimya ile kolayca görselleştirilebilir. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde Müller hücrelerinin bazal uzantılarını içeren lamina lucida ve elektron yoğun lamina densa tabakalarından oluştuğu görülür [27].

2.3 Glial Hücreler

Glial hücreler retina için esansiyel hücrelerdir. Santral sinir sisteminde yer alan nöroglial hücreler gibi nöronların bariyer, beslenme ve yalıtım fonksiyonlarında görev alırlar. Ayrıca hasar sonrası sinir dokusunun onarımında ve rejenerasyonunda aktif rol oynarlar. Retinanın glial hücreleri embriyolojik köken ve morfolojik açıdan mikrogliya ve makrogliya olmak üzere iki farklı hücre grubuna ayrılmaktadır. Bir istisna olarak, oligodendrositler tavşanların miyelinli sinir lifi demetlerinde dördüncü tip glial hücre olarak bulunabilir. Makrogliya hücreleri nöral krestten köken alır; Müller hücreleri ve astrositleri içerir. Mikrogliya hücreleri ise damar endotel hücreleri ve perisitler gibi mezodermden köken almaktadır. Mikrogliyal yardımcı immün hücreler, makrogliyal ise retinal nöronların fonksiyonlarını destekleyen hücrelerdir [28].

Retinanın başlıca makroglial hücreleri olan Müller hücreleri, iç limitan membrandan subretinal boşluğa kadar radyal olarak uzanan bipolar morfolojide hücrelerdir. Nükleusları iç nükleer tabakada yer almaktadır. Müller hücrelerinin radyal uzantıları arasında zonüla adherens tipi bağlantılar bulunur. Işık mikroskopunda koyu boyanan bir çizgi olarak görülen bu yapı dış limitan membranı temsil etmektedir. Müller hücrelerinin bazal uzantıları ise iç limitan membran lamina lusida tabakasını oluşturmaktadır.

Müller hücrelerinin horizontal sitoplazmik uzantıları tüm retinal nöron gövdelerini sararak intersellüler boşlukları doldurur. Bu morfolojik ilişki, nöronlar ve Müller hücreleri arasında metabolik süreçler ve görsel bilginin işlenmesi dahil olmak üzere çok sayıda fonksiyonel etkileşime neden olur. Müller hücreleri retinal hücre dışı ortamın (iyonlar, su, nörotransmitter molekülleri ve pH regülasyonu) homeostazının sağlanmasından sorumludur. Ayrıca, kan retina bariyerinin oluşumuna ve korunmasına katkıda bulunur. Müller hücreleri nörotrofik faktörleri salgılayarak ve atık maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayarak nöronları korumaktadır. Müller hücrelerinin destekleyici işlevlerindeki herhangi bir bozulma, nöronların hastalıklı retinadaki stresli uyarılara duyarlılığını artırarak nöronların fonksiyon bozukluğuna ve kaybına neden olur [29].

Astrositler retinada vasküler yapılar ve nöronlar arasında yaygın olarak bulunmaktadır. Nöronlar ve vasküler yapılar arasında bal peteği benzeri bir iskelet yapı oluştururlar. Morfolojik ve sitoplazmik özelliklerine göre fibröz astrosit, protoplazmik astrosit ve lemosit olmak üzere sınıflandırılırlar. Astrositlerin hücre gövdeleri ganglion hücre tabakasında yer alır ve burada retinal vasküler ağın gelişimi için gerekli fonksiyonları yerine getirirler. Retinanın embriyonik gelişimi sırasında astrositler optik sinirden büyüyen kan damarlarına göç eder. Postnatal dönemde retina olgunlaşması sırasında, vaskülarizasyon ile astrositlerin dağılımı arasında korelasyon vardır. Dış pleksiform tabaka, dış nükleer tabaka, ora serrata yakınlarında ve FAZ' da astrositler yer almamaktadır [30]

Astrositler retinanın gelişiminde ve fonksiyonunda önemli rol oynarlar; nörotrofik işlevi yerine getirirler, hasarlı nöronlar için mekanik bir destek sağlarlar, retinal mikroçevreyi düzenlerler. Ayrıca astrositler plazma membranlarında çok sayıda potasyum kanalı eksprese ederek aktif sinaptik iletim sırasında aşırı hücre dışı K^{+} nın

uzaklaştırılmasına ve nöronların aşırı uyarılmasının önlenmesine katkıda bulunurlar [31].

Mikroglia hücreleri mezodermal orjinli olmaları ile diğer nöroektoderm kökenli retina hücrelerinden ayrılır. Mikroglialar mikroorganizmalara karşı konakçı savunmada önemli bir role sahip olan intraretinal immün hücrelerdir. İstirahat halinde iken dallı, çıkıntılı morfolojide, retinanın pleksiform tabakalarında yoğunlaşmışlardır. Retina hasarı gerçekleştiğinde aktive olarak ameboid şekil alır, dış retina katlarına ve subretinal alana migrasyon gösterirler. Premaküler bölgede bulunan Henle tabakasında yer alan tek glial hücre tipi mikroglia'dır. Foveada ise mikroglia bulunmaz [32].

2.4 Retina Pigment Epiteli

Nörosensöriyel retina ve Bruch membranı arasında yerleşmiş RPE; içerisinde melanin pigmentleri içeren tek sıra halinde dizilmiş, hegzogonal yapıda hücrelerden meydana gelir. Optik sinirden ora serrataya kadar uzanır ve ora serratadan itibaren siliyer cismin pigmentli epiteli olarak devam eder.

Erişkin insan gözünde yaklaşık 3.5 milyon RPE hücresi bulunmaktadır. RPE hücreleri yaşla kaybedilir, düşüş yaşamın on yılı başına toplam RPE'nin yaklaşık% 2,3'üdür. Perifer retinada yaşla birlikte RPE hücre yoğunluğu azalırken, foveada RPE hücre yoğunluğunda yaşa bağlı bir değişiklik gözlenmez. Bu durumun foveadaki RPE kaybını kompanse etmek için perifer retinadan RPE göçü nedeniyle olduğu düşünülmektedir. RPE hücrelerinin boyutları retinadaki konumlarına göre değişmektedir. Foveadaki RPE hücreleri ince ve uzun yapılı iken (14-16 µm genişliğinde, 10-14 µm çapında) perifere doğru gidildikçe daha düz ve geniş (60 µm çapında) yapıda izlenirler [33].

Nörosensöriyel retina ve RPE, subretinal boşluk olarak adlandırılan potansiyel bir boşluk ile birbirinden ayrılır. RPE hücrelerinin apikal yüzeylerinden hem koni hem basil fotoreseptörlerinin dış segmentlerini kaplamak için mikrovilluslar uzanır. Bu apikal mikrovilluslar RPE'nin yüzey alanını 30 kat genişletir, böylelikle fotoreseptör hücreleri ile fonksiyonel ilişki sağlanması kolaylaşır. Her bir RPE hücresi yaklaşık 40 fotoreseptör hücresi ile temas halindedir. Fotoreseptörlerin yoğunluğu retinanın farklı bölgelerinde değişse de, her bir RPE hücresine karşılık gelen fotoreseptör sayısı sabit kalır. Bu sabitliğin fizyolojik önemi vardır, çünkü her RPE hücresi üstteki

fotoreseptörlere destek fonksiyonu sağlamaktan sorumludur [34]. Apikal kısımda ayrıca sitoplazmik filamanlar, mikrotübüller ve ışığın absorpsiyonundan sorumlu olduğu düşünülen melanin pigmentleri bulunmaktadır. RPE hücrelerinin orta kısmında ise nükleus, sitoplazmik organeller, düz endoplazmik retikulum, fagozomlar ve lipofuskin granülleri yer almaktadır.

RPE hücrelerinin fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, görme fizyolojisinde ve retina hücrelerinin metabolik işlevlerinin sürdürülmesinde kritik öneme sahip birçok görevi üstlendiği gösterilmiştir. Bu görevlerin başlıcaları şunlardır:

- a. Fotoreseptör dış segment fagositozu
- b. Kan- retina bariyeri
- c. Transepitelyal transport
- d. Görsel siklus ve Vitamin A metabolizması
- e. Oksidatif strese karşı koruma
- f. İmmün fonksiyon
- g. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı

a. Fotoreseptör dış segment fagositozu

Fotoreseptörler, membranlara zarar verebilecek serbest radikallerin üretimine neden olan radyasyona (ışığa) ve oksijene maruz kalırlar. Ayrıca, antioksidan bir enzim olan glutatyon redüktaz içermezler ve böylelikle serbest oksijen radikallerine karşı savunmasız hale gelirler [35]. Bu nedenle, fotoreseptörler kronik oksidatif strese karşı bir savunma olarak hücresel yenilenme sürecine ihtiyaç duyarlar. RPE'nin en önemli işlevlerinden biri fotoreseptör membran döngüsüne aktif olarak katılmaktır. Her gün fotoreseptörlerin distal ucundaki 100'den fazla dejenere disk RPE tarafından fagositozlanırken, yeni diskler sentezlenir [36]. Hücresel yenileme sürecinin sirkadiyen bir ritmi vardır. Her bir fotoreseptör hücresi yaklaşık her 14 günde bir dış segmentini yeniler [34]. RPE içinde fagosite edilmiş diskler fagozom adı verilen veziküller içinde enkapsüle edilirler. Lizozomal enzimler fagolizozom içinde hapsedilmiş olan dış segmentleri hidrolize ederek küçük moleküllere dönüştürür. Bu küçük moleküller hücre içine dağılarak tekrar kullanılır. Sindirilemeyen atıklar ise

hayat boyu hücre içinde birikir ve hücrelerin lizozomal kompartmanında lipofuksin granüllerini oluşturur [37].

b. Kan- retina bariyeri

Kan-retina bariyeri , optimum retina fonksiyonu için uygun bir ortamın oluşturulması ve sürdürülmesinde elzemdir. İç kan-retina bariyeri retina endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşurken; dış kan-retina bariyeri, RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar tarafından oluşturulur.

Dış kan-retina bariyeri iyonların ve besin maddelerinin koroidden subretinal boşluğa moleküler hareketini düzenleme ve filtreleme görevi görür [38]. RPE'nin bariyer fonksiyonunun iki temel yapıtaşı vardır. Birincisi RPE hücreleri arasındaki sıkı kavşak-bağlantı kompleksleri, ikincisi ise RPE membran proteinlerinin polarize dağılımıdır. Kavşak bağlantılar üç farklı hücreler arası bağlantı türü içerir; zonula adherens, gap junctionlar ve zonula ocludens [39]. Komşu RPE hücrelerini bağlayan bu sıkı bağlantılar, plazma bileşenlerinin ve toksik moleküllerin retinaya hareketini bloke eder ve koroid damar sisteminden dış retinaya ozmotik bir gradyent boyunca kontrollü bir şekilde madde akışına izin verir. RPE sıkı kavşak-bağlantı komplekslerinin moleküllerin paraselüler hareketini önlemedeki rolü, RPE hücrelerini dış kan-retina bariyerinin anahtar hücresi haline getirir.

c. Transepitelyal transport

RPE hücrelerinin diğer bir önemli görevi; nörotransmitterleri, iyonları ve suyu subretinal alandan koroid dolaşımına taşıyarak iyon dengesinin ve hemostazın korunmasını sağlamaktır. Ayrıca subretinal alanda biriken toksik metabolik atıkların temizlenmesinde görevli bir çok transport proteinini yapısında bulundurarak nörosensöriyel retinayı koruyucu fonksiyon görür RPE'nin taşıma fonksiyonunun iyi düzenlenmiş bir retinal mikro çevre için kritik öneme sahiptir [40].

RPE'nin su taşıma kabiliyeti çok güçlüdür ve RPE, sıvıyı önemli bir hidrostatik veya ozmotik basınç derecesine karşı pompalayabilir. Bununla birlikte, RPE bariyer fonksiyonu bozulursa göz içi basıncı ve koroidden ozmotik gradyent nedeniyle sıvı subretinal boşluğu daha hızlı terkedecektir. Başka bir ifadeyle, retinanın nöral ortamını korumak için sıkı kavşaklar gereklidir ve bunlar mevcut olduğundan, subretinal boşluğu kuru tutmak için RPE tarafından aktif taşınmaya ihtiyaç vardır. Bu işlevler için gerekli vektöriyel kuvvet, RPE hücrelerinin apikal ve bazolateral bölgelerindeki

kanalların ve taşıyıcıların asimetrik dağılımına bağlıdır. Su ve elektrolitlerin subretinal aralıktan dışarıya aktif olarak pompalanması Na^+/K^+ pompası ve HCO_3^- transport sistemi ile gerçekleştirilir. Ayrıca, erişkin ve fetal RPE hücrelerinde tespit edilmiş membran proteini olan Aquaporin 1, suyun transportunda bir kanal görevi görür [41]. RPE hücrelerinin apikal kısmında yer alan Na^+/K^+ ATPase pompası, membran potansiyelleri oluşturarak suyun ve elektrolitlerin subretinal boşluktan koroide taşınması için gerekli enerjiyi sağlar [42]. Na^+/K^+ ATPase pompası, subretinal alanda yüksek Na^+ konsantrasyonu ve RPE sitoplazmasında yüksek K^+ konsantrasyonu oluşturur. Subretinal alandaki yüksek Na^+ konsantrasyonu, fotoreseptör karanlık akımı için gereklidir, burada Na^+ iyonları açık cGMP-bağımlı kanallara girer ve fotoreseptörleri depolarize eder [43].

d.Görsel siklus ve vitamin A metabolizması

Işığı algılama ve görme süreci retinada bulunan fotoreseptörlerin (basil ve koniler) siliyer dış segment organellerinin içinde yer alan sıkıca paketlenmiş görsel pigment molekülleri tarafından fotonların emilimi ile başlar. Fotoreseptör ve RPE arasında gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ve transport mekanizmaları ile bu pigmentler geri dönüştürülür. Bu kompleks olaylar zinciri görsel siklusu oluşturur. Fotoreseptör hücrelerindeki ışığı algılamaktan sorumlu görsel pigmentler, 11- cis- retinaldehit kromoforu ve bir G-protein-bağlı reseptör olan opsin'den oluşur [44].

Görme süreci, rhodopsin pigmentinde ışık enerjisinin 11-cis retinal tarafından emilmesi ile başlar. Görsel pigmentler tarafından bir fotonun absorpsiyonu, 11- cis - retinalin all- trans -retinale izomerizasyonunu indükler. Bu fotoizomerizasyon, ışık sinyalini fotoreseptörlerde elektrik sinyaline dönüştüren fototransdüksiyon kademesindeki ilk ve tek ışığa bağlı reaksiyondur. Opsinden ayrılan izomerleştirilmiş 11-trans-retinal redükte olarak 11-trans retinole çevrilir ve fotoreseptör arası bağlayıcı protein (IRBP) ile RPE'ye taşınır. Burada trans- to- cis izomerizasyon reaksiyonu oluşur. Rejenere kromofor, fotoreseptör hücrelere girer ve yenibir görsel siklus başlar [45].

e. Oksidatif strese karşı koruma

RPE, birçok metabolik yolağın sonucunda reaktif oksijen radikallerinin (ROS) üretildiği oksidatif stres ortamında bulunur. Retina hücreleri enerji talebini karşılayabilmek için yüksek düzeyde oksijene bağımlıdır. Böylece, RPE 70-90 mm Hg'lik ortam oksijen basıncına maruz kalır [46]. Dış segmentlerin fagositozu ROS'un bir başka eşsiz kaynağıdır; H_2O_2 , fagosomlarda NADPH oksidaz veya peroksizomlardaki lipitlerin β -oksidasyonundan üretilir [47]. Ayrıca, retina eksojen oksidatif stres kaynağı olan ışığa doğrudan maruz kalan tek nöral dokudur. Bu nedenle RPE, bu yüksek oksidatif stres ortamında kendini korumak için önemli bir antioksidan sistemle donatılmıştır [48].

RPE'nin antioksidan yanıtının merkezinde, hücrel redoks homeostazını ve hücreyi oksidatif hasardan koruyan koordineli, kapsamlı bir transkripsiyonel programı düzenleyen transkripsiyon faktörü nükleer faktör-eritroid 2 p45 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) bulunur [49]. RPE hücreleri enzimatik antioksidan olarak yüksek oranda süperoksit dismutaz ve katalaz içerir. RPE'de bol miktarda bulunan lutein, zeaksantin ve askorbat gibi karotenoidler, melanin ve glutatyon gibi moleküller RPE'nin antioksidan kapasitesine katkıda bulunurlar. Ayrıca, RPE nin ana pigmenti olan melanin ışığı absorbe ederek fotooksidasyona karşı etkili bir antioksidan görevi görür [50].

f. İmmün fonksiyon

Normal bir gözde immün yanıtı kontrol etmek için immün baskılayıcı mekanizmalar yer almaktadır. Oküler bağışıklık ayrıcalığı ilk kez, Sir Peter Medawar tarafından 1948'de, ön kamaraya implante edilen deri allogreftlerinin hayatta kaldığının tespit edilmesi ile gösterilmiştir [51]. RPE, bağışıklık ayrıcalığını destekleyen hem çözümlü molekülleri (TGF- β , PEDF), hem de hücre yüzeyi moleküllerini (TGF- β CD95 (FAS) ligandı, CD59, CD46) eksprese eder [52].

g. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı

RPE hücreleri canlılıklarını sürdürebilmek ve hücre hasarına yanıt verebilmek için gerekli olan hücrel yolakların çoğunu düzenleyen birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılar. Bu faktörlerden en iyi bilinenleri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF)'dür. Yapısal olarak RPE'nin bazal

yüzeyinden koryokapillaris doğru salgılanan VEGF, endotelial hücre apoptozisini önler ve koryokapillaris endotelini korur [53]. PEDF ağırlıklı olarak RPE'nin apikal yüzeyinden salgılanır ve fotoreseptörler için antianjiyojenik ve nöroprotektif etki gösterir. Bu faktörlerin çoğu YBMD, diyabetik retinopati ve proliferatif vitreoretinopati gibi retina hastalıklarının patofizyolojisinde rol oynar [54].

2.5 Koroid Anatomisi ve Histolojisi

Koroid üveal traktusun posterior bölümü olup optik diskten pars planaya kadar uzanmaktadır. Mezoderm ve nöral krest hücreleri olmak üzere iki embriyolojik kökeni bulunur. Kan damarları, melanositler, fibroblastlar, immün hücreler ve kollajen ve elastik bağ dokusundan oluşur. İnsanlarda koroid doğumda yaklaşık 200 µm kalınlığındadır ve yaşla birlikte kalınlığı azalır. Ayrıca koroid kalınlığı intraoküler basınç, damar tonusu, endojen katekolamin ve nitrik oksit düzeyi gibi faktörlerden etkilenmektedir [55].

Vücudun en yüksek vaskülarize dokularından biri olarak, temel görevi dış retinaya oksijen ve besin maddeleri sağlamak. Diğer işlevleri arasında ışığın absorpsiyonu ve ısı dağılımı yoluyla termoregülasyonu düzenlemek yer alır. Koroid ayrıca, kan akımının vazomotor kontrolü ve üveoskleral yol aracılığıyla göz içi basıncının (GİB) modülasyonunda önemli rol oynar. Histolojik olarak koroid beş tabaka olarak tanımlanır: Bruch membranı, koryokapillaris, iki vasküler katman (Haller ve Sattler) ve suprakoroid [56].

Bruch membranı, hem retinal hem de koroidal elementlerin bir birleşimi olan ve koroidin iç tabakasını oluşturan yapıdır. Gerçek bir membran olmayan asellüler yapıdaki Bruch membranı optik diskten ora serrataya kadar uzanır. Bruch membranı Hogan'ın sınıflandırmasına göre beş katmandan oluşur; RPE'nin bazal membranı, iç kollajen tabaka, elastin tabakası, dış kollajen tabaka, koryokapiller bazal membranı [57]. Bruch membranının RPE bazal membranı tabakası ile iç ve dış kollajen tabakaları devamlı membran yapısında iken koryokapiller bazal membranı ve elastin tabakası ise kesintili membran yapısındadır. Bruch membranı, retina ve koroid arasında karşılıklı metabolik ürünlerin taşınması için yarı geçirgen bir filtre görevi görür. Filtrasyon özelliklerine ek olarak, Bruch membranı RPE hücreleri için fiziksel destek sağlayarak bir bağlanma bölgesi görevi görür. Son yıllarda YBMD, dejeneratif miyopi ve anjiyoid

streaks gibi patolojilerde hastalığın seyri açısından Bruch membranındaki defektler odak noktası haline gelmiştir [58].

Koryokapillaris, Bruch'un membranı ile orta büyüklükte koroid damarları arasında yer alan anastomozdan zengin kapiller ağı içeren vasküler tabakadır. Bu yoğun kılcal damar ağı altıgen şekilli lobüller halinde organize olmuştur. Koryokapillarisin lobüler yapılanması floresein anjiyografide karakteristik dolun paterni gösterir. Bu tabakadaki kapiller endotelin fibröz bazal membranları Bruch membranı'nın en dış katmanını oluşturur. Koryokapillaris, yüksek metabolik aktivitenin olduğu foveada yaklaşık 10 µm kalınlığında iken perifer retinada yaklaşık 7 µm kalınlığındadır. Bu tabakadaki kapillerler pencere yapıda olup damar duvarlarında kontraktıl yapıda perisitler yer alır. Pencere yapıdaki kapillerlerin proteinlere karşı oldukça geçirgen yapısı ekstrasvasküler stromadaki yüksek onkotik basınca katkıda bulunarak, sıvıların retinadan koroide hareketini kolaylaştırır [59].

Koroidin vasküler tabakası, içte koryokapillaris besleyen orta ve küçük boyutlu arter ve arteriollerini içeren Sattler tabakası, dışta kapiller ağı besleyen daha büyük boyutlu arter ve arteriollerin yer aldığı Haller tabakasından meydana gelmektedir [59]. Bu damarlar kanı koroid içerisinde dağıtarak koryokapillariste göreceli olarak düşük arteriyel basıncı sağlar. Sattler tabakasının orta boy damarları ile Haller tabakasının büyük boy damarları arasındaki geçiş, histolojik çalışmalarda belirtildiği gibi belirgin olmayabilir. Bu nedenle, bazı anatomistler bu büyük damarların iki ayrı katmandan ziyade tek bir vasküler yatak oluşturduğunu düşünmektedir [60]. Bu iki tabakadaki ekstrasvasküler stroma kollajen, elastik lifler, fibroblastlar, non - vasküler düz kas hücreleri ve vasküler yapıya komşu melanositler içermektedir. Ayrıca diğer bağ dokusu tiplerinde olduğu gibi mast hücresi, makrofaj ve lenfositler zengindir.

Suprakoroid, sklera ve koroid arasında yer alan, kollajen lifler, melanosit ve fibroblast içeren geçiş bölgesidir. Lamina fusca, suprakoroidin en dış tabakasıdır. Yaklaşık 30 µm kalınlığındadır ve birkaç kat melanosit ve fibroblast benzeri hücrelerden oluşur. Bazı anatomistler lamina fusca'yı skleranın en iç tabakası olarak tanımlar [61].

2.6 Retinanın Vasküler Dolaşımı:

Retina, vücutta birim doku ağırlığı başına en fazla oksijen tüketen dokudur. Bu metabolik ihtiyacı karşılamak için iki ayrı dolaşım sisteminden beslenir: Retinal damar ağı ve koroidal damar ağı. Her iki sistem de internal karotis arterin ilk dalı olan oftalmik arterden köken alır. Bu iki sistem anatomik ve fizyolojik olarak birbirinden farklı özelliktedir. Koroid dolaşımı daha yüksek akımlı ve değişken olup, metabolitlerin koroid ve çevre dokulardan serbest transferine izin verir. Retina dolaşımı ise daha düşük ancak sabit bir akıma sahiptir ve daha fazla oksijen sağlar. Retina arterleri aralarında kapiller düzeyinde anastomoz bulunmayan end-arter özelliğindedir [62].

Oftalmik arterin majör dalları, santral retinal arter, posterior siliyer arterler ve göz kaslarına giden dallardır. Santral retinal arter oftalmik arterin ilk dalıdır, globun 8–15 mm gerisinden optik sinire penetre olur ve optik sinirin ortasından geçerek glob içine doğru uzanır. Santral retinal arter lamina kribrozadan geçince retina içinde dallara ayrılır ve bu dallar genellikle sinir ağına uygun dağılım gösterir. %6-20 olguda oftalmik arterin bir dalı olan posterior siliyer arterden çıkan siliyoretinal arter optik diskin temporal riminden makülaya doğru kanlanma sağlamaktadır [62].

Retina iç 2/3 kısmı santral retinal arterden kaynaklanan retinal kapillerlerden beslenmekte iken, dış retina katları avaskülerdir ve metabolik ihtiyaçları kısa posterior siliyer arterlerden beslenen koryokapillaristen sağlanmaktadır. Retinal vasküler beslenme ve koryokapiller difüzyon arasındaki sınır topografik lokalizasyona, retina kalınlığına, ışık miktarına göre değişmekle birlikte dış pleksiform tabaka esas sınır bölgesidir (watershed area).

Arter ve ven arasında bağlantıyı sağlayan yapı kapiller damarlardır. Kapillerler, retina hücrelerine yeterli perfüzyonu sağlamak için laminer ağlar şeklinde düzenlenmiştir. Kapiller ağlar retinanın kalınlığına göre arka kutupta üç tabaka, periferde ise tek tabaka halinde bulunur.

Makulada 4 retinal kapiller damar ağı bulunmaktadır (Şekil 2-4):

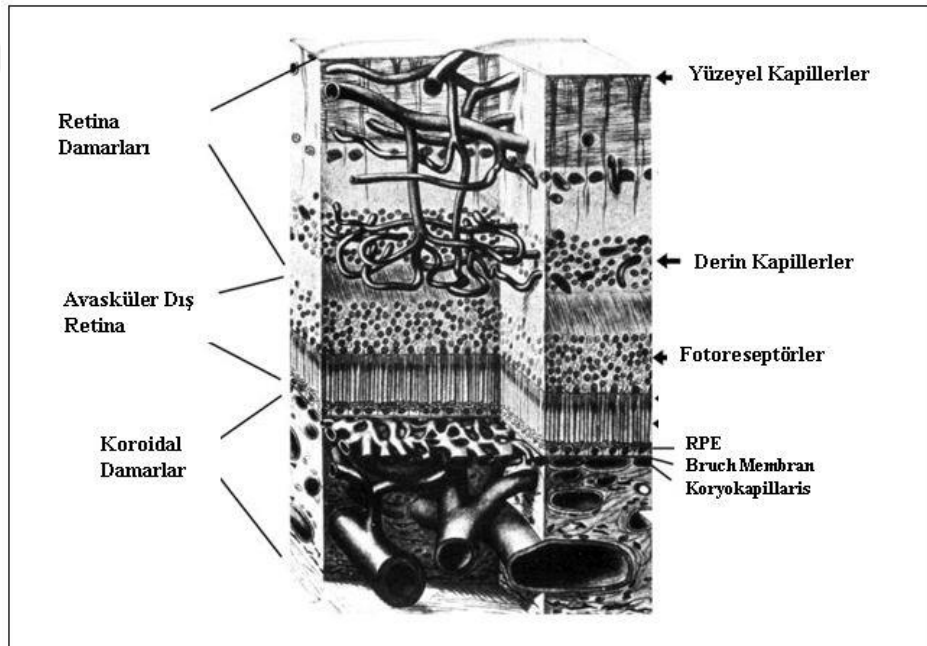
- Yüzeysel kapiller pleksus, gangliyon hücre tabakasında yer alır.

- Orta kapiller pleksus iç nükleer tabakanın üstünde, derin kapiller pleksus ise altında yer almaktadır. Bu kapiller pleksuslar yüzeyel damar ağından vertikal anastomoz ile beslenmektedir. Lobüler anatomik konfigürasyon gösterir.

- Radial peripapiller kapiller pleksus, derin kapiller pleksusdan farklı olarak lobüler yapıda değildir. Retina sinir liflerine paralel konfigürasyon gösterir.

Retinada kapillerlerin olmadığı 3 bölge mevcuttur: Ora serratadan 1,5 mm gerisine kadar olan perifer retina, fovea santralinde ortalama 0,5 mm'lik bölge (FAZ), büyük arterlere ve venlere komşu retina alanları.

Retinal venler genellikle arteriyel dolaşımı takip eder. Venlerin çapı eşlik ettikleri arterlerin çapından daha büyüktür ve genellikle arterler daha yüzeyel seyreder ve venleri üstten çaprazlama eğilimindedirler. Bu çaprazlaşma bölgelerinde arter ve ven tunika adventisya olarak adlandırılan ortak bir kılıf ile sarılır. Retina venleri santral retina venine drene olurlar. Santral retina veni ise ya superior oftalmik ven yoluyla veya direk olarak kavernöz sinüse drene olur [62].



Şekil 2-4: Retinanın vasküler yapısı

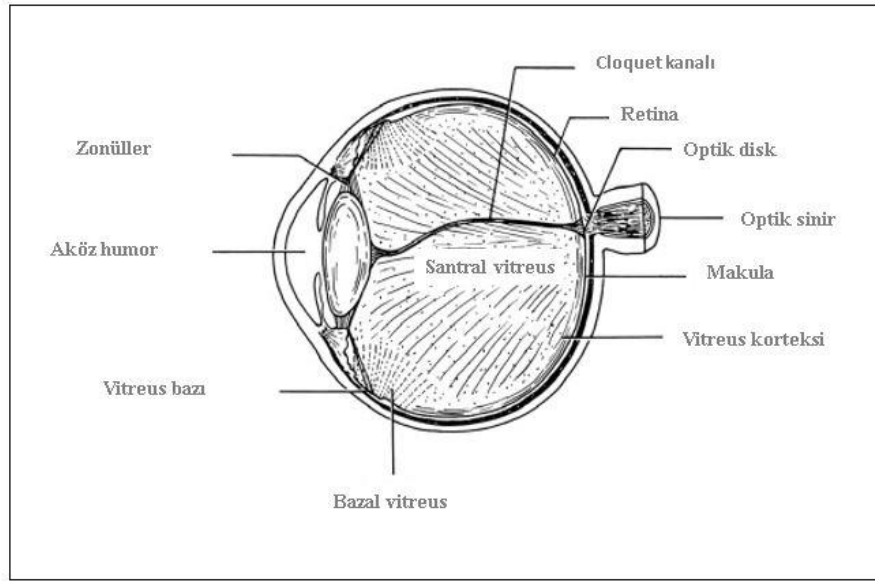
2.7 Vitreus:

Vitreus gözün içindeki en büyük yapıdır ve lens ile retina arasındaki boşluğu dolduran jel yapısında özelleşmiş bir bağ dokusudur. Vitreus hacmi erişkin gözünde 4 cc kadardır ve hacmi glob hacminin %70-80'ine karşılık gelir. Kırma indeksi 1,334'tür, suya göre yaklaşık iki kat daha yoğundur. Vitreus kollajenlerden oluşan düşük bir makromolekül yüzdesine (% 0.1) sahiptir. Vitreusun jel yapısını sağlayan uzun kollajen fibrilleridir. Hiyarulonik asit vitreusta bulunan başlıca glikozaminoglikandır ve kollajen fibrillerin arasına yayılarak stabilizasyona destek vermektedir [63]. Vitreusun iki önemli fonksiyonundan söz edilebilir. Birinci fonksiyonu göz küresinin major hacmini sağlayan şeffaf bir ortam oluşturmak, ikincisi ise göz küresine gelen kuvvetleri absorbe ederek çevre dokulara yaymaktır.

Vitreus 3 bölüme ayrılır: Hyaloid membranlar, kortikal (periferal) vitreus, santral (kor) vitreus. Hyaloid membranlar vitreusun en dış yüzeyini oluşturur. Kortikal vitreus yaklaşık 100 µm kalınlıktadır ve ön ve arka hyaloidi içerir. Vitreus total hacminin %2'sini oluşturur. Yoğun kollajen fibriller ve hylaronik asit salgılayan hyalositleri içerir. Vitreusun metabolik merkezidir.

Vitreusun ön yüzeyi lens arka kapsülü, zonuller, siliyer cisim, pars plana ile arkada ise retinanın iç limitan membran tabakası ve optik disk ile temas halindedir. Vitreus; ön tarafta lens komşuluğundaki depresyon olan vitreopatellar fossa nedeniyle konkav şekilde iken, diğer yerleri sferik bir yapıdadır. Lensin arka yüzeyinde vitreokapsüler bağ (Wieger ligamanı) ile lense yapışıktır. Bu bağın ortasında ise Berger boşluğu bulunmaktadır. Optik diskten lensin arka kutbuna doğru 1-2 mm genişliğinde dar bir kanal ilerler. Hyaloid kanal (Cloquet kanalı) adı verilen bu yapı fetal gelişim esnasında hyaloid arteri içerir [64].

Vitreus ile retina arasındaki vitreoretinal bağlantılar vitreus tabanı ve optik sinir başında oldukça güçlüdür. Vitreus tabanı 2,6 mm genişliğindedir ve pars plananın arka yüzü ile periferal retinanın ön yüzünün çoğunu çevreler. Hyaloid fossanın periferinde, retina damarları ve maküla çevresinde de vitreus ile retina yapışıklıkları mevcuttur [64].



Şekil 2-5 : Vitreus anatomisi

2.8 Subretinal Kanama

Subretinal kanama, retinal veya koroidal dolaşımdan kaynaklanan kanın nörosensöriyal retina ile RPE arasındaki potansiyel boşlukta birikmesi olarak tanımlanır.

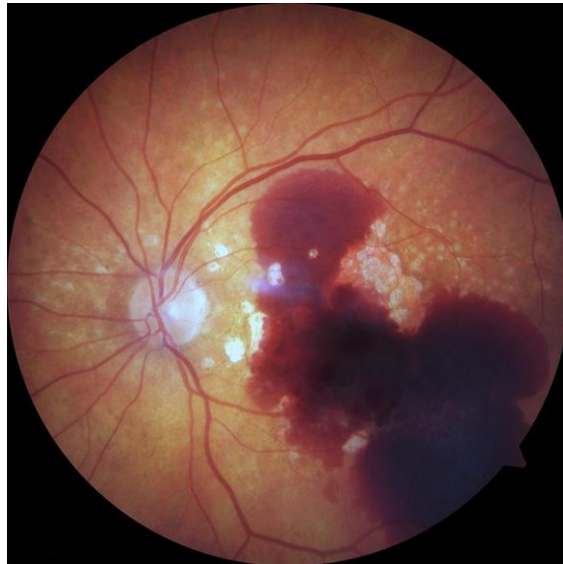
2.8.1 Etiyoloji

Subretinal kanama'nın etyolojik nedenleri arasında en sık neovasküler tip YBMD, polipoidalkoroidal vaskülopati (PKV), retinal anjiyomatöz proliferasyon (RAP), travma, RAM ve yüksek miyopi yer almaktadır. Diğer nedenler ise olası oküler histoplazmozis sendromu, anjioid streak, göz içi tümörler ve skleral çökertme cerrahisi gibi bazı cerrahilerin komplikasyonu olarak ortaya çıkan postoperatif kanamalar olarak sıralanabilir [3].

KNV'ye eşlik eden ve eşlik etmeyen subretinal kanama arasında bir ayrım yapılabilir (Tablo 2-1). KNV ilişkili olan ve olmayan subretinal kanama arasındaki fark prognoz ve tedavi açısından önemlidir.

Tablo 2-1 : Subretinal kanama etyolojisi

SUBRETİNAL KANAMA - ETYOLOJİ	
KNV ilişkili olan nedenler	KNV ilişkili olmayan nedenler
Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu	Retinal Arteriyal Makroanevrizma
Polipoidal Koroidal Vaskülopati	Oküler travma
Miyopi	Terson Sendromu
Anjioid Streak	Valsalva Retinopatisi
Oküler Histoplazmozis	Orak hücreli anemi
Koroid rüptürü	Koagülopatiler
İdiyopatik KNVM	Santral retinal ven tıkanıklığı
İnflamatuvar hastalıklara bağlı KNVM	



Şekil 2-6 : Travma sonrası subretinal kanama gelişen bir olgunun fundus fotoğrafı

2.8.1.1 Yaşa bağı maküla dejenerasyonu (YBMD)

YBMD, fotoreseptör-RPE kompleksinin nörodejenerasyonunun neden olduğu progresif görme kaybı ile karakterize kronik bir hastalıktır. Popülasyon temelli çalışmaların meta-analizinde, 45-85 yaş aralığındaki bireylerde YBMD prevalansının %8.7 olduğu gösterilmiştir [65]. Wong ve ark.'nın yaptığı analize göre dünya genelinde 2020 yılında 196 milyon YBMD olgusu olacağı ve bu sayının 2040 yılında 288 milyona ulaşacağı öngörülmektedir [65].

YBMD'de risk faktörlerinin tanımlanması hastalık açısından yüksek riskli olguların saptanmasına olanak sağlar. İleri evre YBMD olgularında daha önce tanımlanmış olan risk faktörlerinin değerlendirildiği 24 çalışmayı içeren bir meta analizde, ileri yaş, aktif sigara kullanımı, geçirilmiş katarakt cerrahisi ve aile öyküsü ileri evre YBMD açısından yüksek risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Obezite, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, yüksek plazma fibrinojen düzeyi orta düzey risk faktörleri olarak değerlendirilmiştir. Cinsiyet, etnik köken, diyabet, iris pigmentasyonu, lipid profil bozukluğu ise düşük risk faktörleri olarak saptanmıştır [66].

YBMD patogenezinin temelindeki mekanizmalar yeterince tanımlanamamıştır ancak, devam eden çalışmalardan elde edilen bulgular hastalık ve altta yatan mekanizmalar hakkındaki bilgilerimizi artırmaktadır. YBMD patogenezinin metabolik, fonksiyonel, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Günümüze kadar YBMD patogenezinde birçok biyolojik yolağın rol oynadığı gösterilmiştir. Bunlar arasında oksidatif hasar, lipofuksin birikimi, kronik inflamasyon ve apoptozis ile ilişkili kompleman sistemindeki mutasyonlar yer alır [67].

YBMD'nin iki formu olan, “kuru” (non-eksüdatif) ve “yaş” (neovasküler, eksüdatif) formları kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır. Non-eksüdatif form olarak da bilinen kuru tip YBMD, en sık görülen tiptir ve teşhis edilen tüm vakaların % 90'ını kapsar. Ağır görme kayıpları kuru tipte %10-12; yaş tipte ise %88 oranında görülmektedir [68].

RPE ile Bruch membran arasında asellüler lipoproteinöz depozitlerin birikimi kuru tip YBMD olarak karşımıza çıkar. Druzen olarak adlandırılan bu birikimler, maküla ve periferik retinada küçük sarı noktalar olarak görülür. RPE, koryokapillaris

ve fotoreseptörlerin progresif atrofisinin meydana geldiği coğrafik atrofi ise kuru tipin en ileri formudur.

YBMD olgularının yaklaşık %10'nda görülen neovasküler tip, neovaskülarizasyon gelişiminin ve bununla ilişkili pigment epitel dekolmanı (PED), RPE yırtığı, diskiform skar ve vitreus hemorajisi gibi komplikasyonların görüldüğü formdur. Klinik ve histopatolojik çalışmalar YBMD olgularında KNV gelişiminde, Bruch membranının druzenle ilişkili diffüz olarak kalınlaştığını ve sonrasında koryokapillaristen yeni damarların büyümesine zemin hazırlayan Bruch membran çatlaklarının oluştuğunu göstermektedir. Fundus muaynesinde görülen gri- yeşil subretinal kabarıklık, subretinal hemoraji ve lipid sızıntıları neovaskülarizasyona işaret etmektedir.

YBMD'ye bağlı subretinal hemoraji, koroid neovaskülarizasyonu veya PED alanında oluşan yırtık nedeniyle gelişebilir (Şekil 2-7). Poliner ve ark.'nın çalışmasında PED lezyonu görülen YBMD olgularının % 17'sinde takip sırasında subretinal kanamanın geliştiği bildirilmiştir [69]. Antikoagülan ilaç kullanan neovasküler YBMD olgularında özellikle de hipertansiyon eşlik ediyorsa subretinal kanama riskinin arttığı gösterilmiştir [70]. Bazı raporlarda, anti-VEGF ajanlarla tedavi edilen veya fotodinamik tedavi uygulanan neovasküler YBMD hastalarının subretinal hemoraji gelişimi açısından risk altında olduğu bildirilmiştir [71,72]. Tek gözde neovasküler YBMD saptanan olgularda, diğer gözde herhangi bir düzeyde hemoraji ile birlikte olan neovasküler lezyon gelişimi oranının 4 yıllık takip süresi sonunda %19 olduğu saptanmıştır [73].



Şekil 2-7 : Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olan bir olguda gelişmiş subretinal kanama

2.8.1.2 Polipoidal koroidal vaskülopati (PKV)

Polipoidal koroidal vaskülopati (PKV), polipoidal anevrizmal vasküler lezyonların varlığı ile birlikte tekrarlayan seröz ve hemorajik pigment epitelyal dekolmanı (PED) ve/veya subretinal hemoraji ile karakterize bir eksüdatif makülopatidir. Neovasküler tip YBMD'nin bir alt tipi olarak bilinse de, koroid kalınlığında artış saptanması nedeniyle bir koroidal vaskülopati olarak sınıflandırılır [74].

Hemorajik komplikasyonların PKV'de neovasküler YBMD'ye göre daha sık görüldüğü ve 10 yıl içindeki kümülatif insidansın% 30 olduğu bildirilmektedir [75]. Subretinal kanama gelişimi, PKV'nin major komplikasyonlarından biridir ve ani gelişen, ciddi ve kalıcı görme kayıplarına neden olabilmektedir. PKV'de subretinal kanama, damar duvarının anevrizmal dilatasyonu olarak tanımlanan polipoidal lezyonların rüptürü sonucunda gelişir. Poliplerin rüptürü, hastalığın doğal eksüdatif seyri sırasında polipler içinde artan gerilim ile ortaya çıkabilir [76].

2.8.1.3 Patolojik miyopi

Patolojik miyopi eşlik eden dejeneratif değişikliklerle birlikte, -6 ve üzeri diyoptri kırma kusuru ve/veya globun 26,5 mm üzerindeki aksiyel uzunluğu olarak tanımlanır. Patolojik miyopide retina, koroid ve sklerada görülebilen patolojik değişiklikler arasında; posterior stafilom, peripapiller atrofi, diffüz veya yamalı koryoretinal atrofi, lacquer çatlakları, Fuchs lekesi, koroidal neovasküler membran, foveoskizis ve maküler delik yer alır [77].

Lacquer çatlakları, miyopik gözlerde maküla ve çevresinde oftalmoskopik olarak görülen sarımsı renkte lineer lezyonlardır. KNV'li olguların %82'sinde, tüm patolojik miyopi olgularının %4,3'ün de görülmektedir. RPE, Bruch membran ve koryokapillaris kompleksinin mekanik kırılmaları sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Göz küresinin eksensel uzamasının doku gerilimine neden olarak Lacquer çatlaklarının oluştuğuna inanılsa da, patolojik çalışmaların yetersizliği nedeniyle gerçek etyolojisi belirsizdir.

KNV gelişimi, patolojik miyopinin santral görmeyi azaltan en ciddi komplikasyonlarından biridir. 50 yaşın altındaki bireylerde KNV'nin en yaygın nedeninin patolojik miyopi olduğu bildirilmiştir [78]. Literatürde yer alan çalışmalarda, miyopik KNV prevalansının patolojik miyopisi olan bireylerde % 5-% 11 olduğu gösterilmiştir. Miyopik KNV gelişimi için tespit edilmiş risk faktörleri; ileri yaş, kadın cinsiyet, Lacquer çatlakları ve yama şeklinde atrofi alanlarının bulunması, koroid kalınlığında azalma ve diğer gözde miyopik KNV olmasıdır [79].

Miyopik gözlerin %3.1'inde subretinal kanama komplikasyonunun geliştiği gösterilmiştir [80]. Lacquer çatlakları geliştiğinde koryokapillarisin zarar görmesi sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. KNV'siz subretinal kanama yeni lacquer çatlakları oluşumunun bir işareti olarak kabul edilir [81].

2.8.1.4 Retinal arteriyolar makroanevrizma (RAM)

Retinal arteriyal makroanevrizma (RAM), tipik olarak santral retinal arterin ilk üç bifurkasyon bölgesi içinde meydana gelen akkiz fokal dilatasyonlar olarak tanımlanır [82]. Makroanevrizmalar sıklıkla arter ve venin çaprazlaşma bölgelerinde ortak bir kılıfı paylaştıkları yerde oluşurlar. Bu bölgelerin yapısal desteğin daha az olması ve damar duvarının daha zayıf olması nedeniyle anevrizma gelişimine yatkın olduğuna inanılmaktadır. Literatürde sakküler ve füziform (iğ şeklinde) şekilde olmak üzere iki tip RAM tanımlanmıştır [83].

RAM'lar sıklıkla ileri yaş kadınlarda görülür, birçok çalışma 66-74 yaş arası kadın olgulardaki prevalansın yaklaşık % 70 olduğunu bildirmektedir [84-86]. Hipertansiyon, RAM ile ilişkili en yaygın sistemik hastalıktır; RAM saptanan olguların yaklaşık % 75'inde hipertansiyon saptanmıştır. Ayrıca, ateroskleroz ve lipid profil bozuklukları da sıklıkla eşlik eder [86].

RAM oluşumunun patofizyolojisi tam olarak anlaşılammıştır. RAM'ların, yaşlanma ile aterosklerozun neden olduğu arteriyel duvardaki fokal zayıflıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaşlanma ile arter duvarları incilir, fibrotik değişikliklere uğrar ve elastikiyetini kaybeder. Bu olaylar dizisi, hipertansiyonda görüldüğü gibi artmış hidrostatik basınca karşı duyarlılık oluşturur ve arteriyal dilatasyon ile sonuçlanır. Anevrizma oluşumundaki bir diğer teori ise, emboli ya da

arter içindeki lokal trombozun damar duvarındaki endotel ya da adventisyal kılıfa mekanik hasarı ile anevrizma oluştuğunu ileri sürer. RAM'ların histolojik çalışmaları, trombüs ve kolesterol kristallerinin anevrizmayı kısmen doldurduğunu ve bu teorilere destek verdiğini göstermiştir [82].

RAM için dört ayrı klinik formdan söz edilebilir. Sızıntı ve hemoraji olmaksızın sadece anevrizma ile karakterize sessiz tip, sirsine sert eksuda ve/veya seröz dekolman ile karakterize sızdıran tip, subretinal, preretinal ya da vitreus hemorajisi ile birlikte olan rüptüre tip ve spontan gerileme göstermiş olan hayalet tip [82].

RAM'in yaygın bir komplikasyonu, preretinal, intraretinal, subretinal veya vitreus hemorajisi gibi çeşitli anatomik tabakalarda kanamaya yol açabilen ve akut görme kaybı ile sonuçlanan anevrizma rüptürüdür [87]. Kum saati kanama hem preretinal hem de subretinal kanamanın aynı anda izlenmesidir. Bu görünüm RAM için tipiktir. Subretinal kanama en kötü görsel prognoz ile ilişkilendirilen kanama tipidir [88]. Maküla deliği ve subretinal neovaskülarizasyonun nadiren subretinal kanamanın bir sonucu olarak ortaya çıkabildiği bildirilmiştir [89].

2.8.2 Patofizyoloji

Subretinal kanama gelişimi sonucunda fotoreseptörlerde ve RPE'de hasar meydana gelmektedir. Subretinal kanamanın neden olduğu hasarın patogenezi ilişkin bilgilerin çoğu hayvan çalışmalarından elde edilmiştir. Deneysel hayvan modellerinde, subretinal alana kan enjekte edildiğinde fotoreseptörlerde 25 dakika gibi kısa bir süre içerisinde ilk değişikliklerin izlendiği ve 7 gün içinde ciddi hasarın meydana geldiği gösterilmiştir. Retina hasarına neden olan mekanizmalar ilk olarak 1982 yılında Glatt ve Machemer tarafından tanımlanmıştır. Yazarlar subretinal kanamanın toksik, traksiyon ve bariyer etkisi ile fotoreseptör ve RPE hasarına neden olduğunu ileri sürmüştür [3].

Kanın absorpsiyonu sırasında makrofajlarca fagosite edilen eritrositlerden salınan ferritin formundaki demir, doğrudan toksik etki ile fotoreseptörlerde ve RPE'de destrüktif değişikliklere yol açar. Demir toksisitesi zamana ve doza bağımlı olarak değişmektedir. Ayrıca, subretinal alanda biriken kan içerisinde bulunan kemoatraktan ajanlar makrofajlar ve fibroblastların kemotaksisini indükleyerek skar oluşumuna neden olabilir. Retina hasarına yol açan diğer mekanizma subretinal kanın pıhtılaşması

sonucu meydana gelen mekanik bariyer etkisidir. Subretinal kan pıhtı haline geldiğinde difüzyon bariyeri gibi davranarak; koryokapillaris, RPE ve fotoreseptörler arasında esansiyel besin maddelerinin transferine engel olmaktadır. Ayrıca subretinal kanın pıhtılaşması sonucu oluşan fibrin ağının kontrakte olmasıyla fotoreseptörlerde kopmalar meydana gelebilir. Subretinal kanamaya bağlı retina hasarı tanımlanan bu mekanizmaların birden fazlasının kombinasyonu sonucu oluşmaktadır [4-5].

2.8.3 Prognoz

Subretinal kanamada tedavi planını belirlerken hastalığın doğal seyrini ve prognozunu etkileyen unsurların göz önünde bulundurulması gerekir. Subretinal kanama gelişen olgularda altta yatan hastalığın seyri, kanamanın yeri ve büyüklüğü, kanamanın başlangıcı ile tedavi arasında geçen süre, başvuru sırasındaki görme kekinliği, eşlik eden oküler komorbiditeler (iridodiyaliz, lens dislokasyonu, travmatik katarakt, vitreus hemorajisi) gibi çeşitli faktörler görsel prognozu etkilemektedir [2]. Bu nedenle detaylı anamnez alınması ve dikkatli bir oftalmolojik muayene yapılması önem taşır. Antikoagülan ilaç kullanımının sorgulanması ve eğer mümkünse INR değerinin görülmesi de doğru bir yaklaşım olacaktır. Ayrıca, görüntüleme yöntemlerinden optik koherens tomografi (OKT) aracılığıyla elde edilebilen iç segment / dış segment tabakalarının bütünlüğü, fovea kalınlığı, hemoraji alanı gibi bilgiler, iç segment-dış segment bağlantılarında düzensizlikler ve foveal incelme varlığında görsel rehabilitasyon ihtimali daha düşük olduğundan, prognostik açıdan önem taşımaktadır [90-91].

Bennet ve ark. subretinal kanama gözlenen 29 gözü değerlendirdiği çalışmasında etiyolojinin nihai görsel sonucu öngörmede en önemli faktör olduğunu raporlamıştır [92]. Birçok çalışmada, YBMD'ye sekonder gelişen subretinal kanamada görsel prognozun daha kötü olduğu gösterilmiştir. YBMD'ye bağlı subretinal kanama gelişen olgularda; hemorajiye ek olarak YBMD'nin doğal seyrinde gelişen RPE atrofisi, fibrovasküler proliferasyon ve diskiform skar oluşumu nedeniyle tedaviye alınan cevap sınırlı olmaktadır. Olguların prognozunu etkileyen diğer önemli faktör hemorajinin genişliği ve kalınlığıdır. Birçok rapor, daha kalın hemorajilerin skar dokusu oluşumu ve fotoreseptör kaybı nedeniyle daha kötü prognoza sahip olduğunu ve kendiliğinden rezorbe olma olasılığının daha düşük olduğunu göstermiştir [3].

Tedavisiz bırakılan subretinal hemorajili gözlerde geri dönüşümsüz görme kaybı gelişeceği için zamanında yapılan müdahale önem kazanır. İki ay süreli hemorajilerde dramatik ve hızlı bir anatomik iyileşme gözlenen olguların bildirildiği raporlar olmasına rağmen, genellikle 14 günden daha kısa süreli hemorajiler tedaviye daha iyi yanıt verir [2]. YBMD'ye bağlı subretinal kanama gelişen 60 gözün 24 ay boyunca tedavisiz izlendiği bir çalışmada; olguların %80'inde son vizitte, başlangıca göre daha kötü görme keskinliği saptanmıştır. Ayrıca, gözlerin %38'inde fibrotik skar, %25'inde atrofik skar ve %21.6'sında RPE yırtığı geliştiği gösterilmiştir. Günümüze kadar, YBMD ile ilişkili subretinal kanama gelişen olguların değerlendirildiği en geniş seri Submaküler Cerrahi Grubu B'nin gözlem kolunda yer alır. Bu çalışmada 2 yıl boyunca takip edilen 168 gözün sadece% 10'unda görme keskinliğinin 20/200 ve daha iyi olduğu raporlanmıştır [93].

2.8.4 Tedavi

Subretinal kanama tedavisinde hedef, kanamayı tamamen ortadan kaldırarak veya santral maküla alanından yer değiştirme yoluyla uzaklaştırarak yukarıda bahsedilen mekanizmalar ile daha fazla hasar oluşumunu önlemek ve altta yatan etyolojinin tanısını ve tedavisini kolaylaştırmaktır.

Günümüzde subretinal kanama için konsensus oluşturulmuş optimal bir tedavi yöntemi bulunmadığından, her olgunun kendi özellikleri göz önünde bulundurularak tedavi planını belirlemek gerekmektedir. Kanın hangi teknikle uzaklaştırılıcağına kanamanın nitelikleri (lokasyon, kalınlık, kanamanın yaygınlığı, diğer gözün durumu) dikkate alınarak karar verilmelidir.

Subretinal kanama tedavisinde uygulanmakta olan güncel yaklaşımlar, 2 geniş kategori altında toplanabilir: Vitrektomi içermeyen teknikler; t-PA, intravitreal gaz, anti-VEGF enjeksiyonları veya bunların kombinasyonlarını içerirken; vitrektomi içeren teknikler ise t-PA, anti-VEGF ajanlar, gaz veya bunların subretinal ve/veya intravitreal enjeksiyon uygulamalarının kombinasyonlarını içermektedir [94,95] (Tablo 2-2). Tedavi yöntemleri ile ilgili literatürün çoğu az sayıda olguyu içeren çalışmalardan ve vaka raporlarından oluşmaktadır. Bu nedenle prosedürlerin güvenliğini ve etkinliğini tam olarak anlamak için daha fazla araştırma ve daha büyük klinik çalışmalar gereklidir.

Tablo 2-2 : Subretinala kanama tedavi seçenekleri.

SUBRETİNAL HEMORAJİ - TEDAVİ SEÇENEKLERİ

- 1) İntravitreal anti-VEGF monoterapi
- 2) İntravitreal anti-VEGF + gaz enjeksiyonu
- 3) İntravitreal anti-VEGF + tPA + gaz enjeksiyonu
- 4) İntravitreal gaz ile pnömatik yer değiştirme
- 5) İntravitreal tPA enjeksiyonu
- 6) İntravitreal tPA + gaz enjeksiyonu
- 7) Pars plana vitrektomi ameliyatı ile birlikte:
 - a) Subretinal tPA + anti-VEGF + gaz tamponadı
 - b) Submaküler KNVM eksizyonu ve RPE grefti
 - c) Submaküler KNVM eksizyonu + maküla translokasyonu
 - d) Subretinal lavaj + anti-VEGF + gaz tamponadı
 - e) Anterior retinotomi + KNVM eksizyonu + subretinal kanım boşaltılması gibi kombinasyonlar / modifikasyonlar

2.9 Doku Plazminojen Aktivatörleri

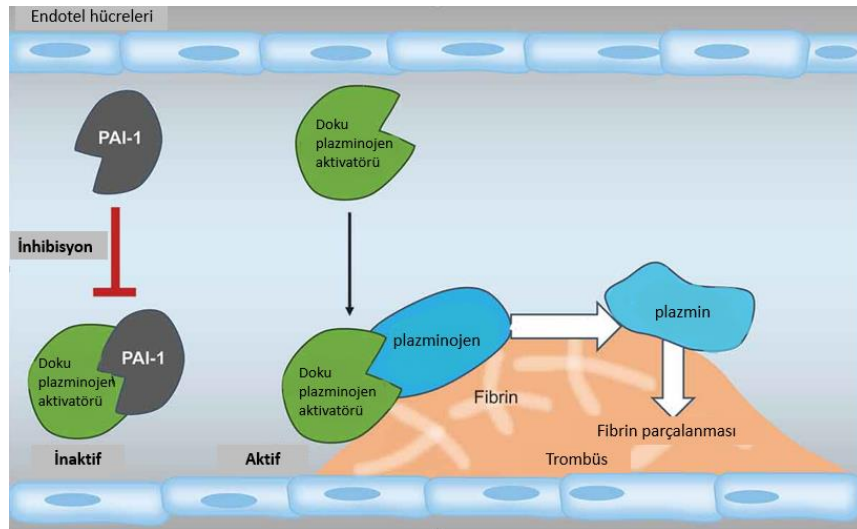
2.9.1 Moleküler yapı ve etki mekanizması

Hemostaz, kanı sıvı halde tutmak ve bir kan damarı duvarının hasar görmesi durumunda kan kaybını önlemek için tasarlanmış biyokimyasal ve hücrel süreçleri içerir. Fibrinoliz, hemostatik sistemin pıhtılaşma sürecine karşı koyma ve çözünmeyen fibrin pıhtılarını çözme işlevi gören bileşenlerinden biridir. Fibrinoliz, doku plazminojen aktivatörü (tPA) ile aktif enzim olan plazmine dönüştürülebilen inaktif bir proenzim olan plazminojenden oluşan bir proteolitik enzimatik işlemidir. Plazminojen, zimojen olarak bilinen bir protein sınıfına aittir. Bu proteinler fibrin içinde bulunur ve hidroliz, kinaz bağlı reaksiyon veya konfigürasyon değişikliği yoluyla aktive edilene kadar inaktif bir formda kalır [96-97].

İnsan doku plazminojen aktivatörü, fibrin yıkımını dolaylı olarak indükleyerek kan pıhtılarının çözünmesini kolaylaştıran bir serin proteazdır. T-PA fibrine bağlı plazminojenin, fibrini parçalayan bir proteolitik enzim olan aktif plazmine dönüşümünü katalize eder ve böylece lokal fibrinolizi başlatır (Şekil 2-8). Serbest t-PA, fibrin varlığında yaklaşık 100 katına çıkan intrinsik katalitik aktiviteye sahiptir [96-97].

Endojen t-PA yapısal olarak çift zincirli, 527-amino asitten oluşan ve parmak (F alanı), epidermal büyüme faktörü (E alanı), iki kringle alanı (K1 ve K2) ve proteaz bölgesi (P alanı) dahil olmak üzere beş alandan oluşan 70 kDa ağırlığında bir proteindir. Parmak ve ikinci kringle alanı fibrin bağlanmasında rol alırken, F ve E alanı tPA klerensinde görev alır. Proteaz bölgesi ise, plazminojene özgü proteolitik aktivite gösteren bölgedir [98,99]. tPA esas olarak endotel hücreleri tarafından sentezlenmektedir; bununla birlikte, tPA nöronlarda da tespit edilmiştir [100].

T-PA'nın aktivitesi, proteaz alanının aktif bölgesi içinde kovalent olarak bağlanarak t-PA'yı geri dönüşümsüz olarak inaktive eden plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) tarafından düzenlenir; bu negatif düzenleme mekanizması t-PA ve plazminojenin sistemik aktivasyonunu önler. Bu şekilde fibrinolitik süreç sistemik fibrinolizi, dolayısıyla aşırı kanamayı önlemek için hassas bir şekilde düzenlenmiştir [101].



Şekil 2-8 : Fibrinoliz mekanizması

2.9.2 Rekombinant doku plazminojen aktivatörleri (rtPA)

TPA'nın sentetik formları rekombinant doku plazminojen aktivatörleri (rtPA) veya fibrinolitik (trombolitik) ajanlar olarak adlandırılmaktadır. rtPA'lar, endojen tPA'nın DNA sekansındaki mutasyonlar yoluyla genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Bu yeni terapötik ajanlar endojen tPA'dan daha uzun yarı ömre sahiptir. Geliştirilmiş yapısal özellikleri ile uygun bolus dozlaması, artmış fibrin spesifitesi ve PAI -1 ile inaktivasyona direnç sağlamaktadır. Günümüzde mevcut olan tPA analoglarının ortak etki mekanizması, inaktif plazminojenin aktif proteolitik bir enzim olan plazmine dönüştürülmesidir. Plazminojen, fibrinolitikler ile reaksiyona girdiğinde plazmin oluşur; plazmin de fibrini eriterek kan pıhtısının sıvılaşmasını sağlar [101].

Akut miyokard enfarktüsü , akut iskemik inme ve pulmoner emboli tedavisinde rtPA'ların klinik kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır [102]. Rt-PA'lar oftalmoloji alanında da çeşitli endikasyonlarda kullanılmak üzere araştırılmıştır. Bu endikasyonlar arasında, vitrektomi sonrası fibrinin çözünmesini hızlandırma, santral retinal ven tıkanıklığının lokal ve sistemik tedavisi ve subretinal kanama tedavisi yer alır. Rt-PA vitreus kavitesine veya subretinal alana enjekte edildiğinde, kan pıhtısının çözünmesi ve intravitreal gazın yüzey gerilimi ile yer değiştirerek submaküler alandan uzaklaştırılması kolaylaşır [103].

Günümüzde mevcut olan fibrinolitik ilaçlar dört grupta toplanmaktadır:

- Birinci kuşak ilaçlar; streptokinaz, ürokinaz.
- İkinci kuşak ilaçlar; alteplaz, anistreplaz (izole edilmemiş plazminojen streptokinaz aktivatör kompleks APSAC), pro-ürokinaz.
- Üçüncü kuşak ilaçlar; tenekteplaz , reteplaz, lanoteplaz, monteplaz, pamiteplaz, rekombinant stafilokinaz, desmoteplaz.
- Dördüncü kuşak ilaçlar: Plazminojen Aktivatör İnhibitörleri (PAI)

Birinci kuşak fibrinolitik ajanlar olan streptokinaz ve ürokinaz, trombolizde etkili olmalarına rağmen fibrin spesifik değildirler. Bu nedenle dolaşımdaki plazminojeni de plazmine çevirerek sistemik fibrinolyze neden olurlar. Ayrıca, ilaç direnci, ateş ve alerjik reaksiyonlarla sonuçlanan immünolojik yanıtlara neden olabilirler.

İkinci kuşak fibrinolitik ajanlar olan alteplaz ve proürokinaz fibrin selektiftir, immünolojik reaksiyonlara neden olmaz ve daha kısa bir yarı ömre sahiptir.

Üçüncü kuşak fibrinolitik ajanlar arasında reteplaz, tenekteplaz, lanoteplaz, monteplaz, pamiteplaz ve bakteriyel (stafilococcus aureus) kökenli stafilokinaz yer alır. Bu ajanlar enzimatik etkinliğin, plazma proteaz inhibitörlerine karşı direncin ve fibrine bağlanma selektivitesinin artırılması amaçlanarak geliştirilmiştir [104] (Tablo 2-3).

Tablo 2-3 : Üçüncü kuşak fibrinolitiklerin özellikleri

D=Dalton. dk= dakika. PAi=Plazminojen aktivatör inhibitör

	Molekül ağırlığı	Yarılanma ömrü dk	Fibrin spesifitesi	PAI ile inhibisyon
TENEKTEPLAZ	70.000	20-24	+++	Hayır
RETEPLAZ	39.000	14-18	+	Evet
MONTEPLAZ	68.000	23	++	Evet
LANOTEPLAZ	53.500	23-37	+	Hayır
PAMİTEPLAZ	-	30-47	++	Evet
STAFİLOKİNAZ	16.500	6	++++	Hayır

2.9.2.1 Alteplaz

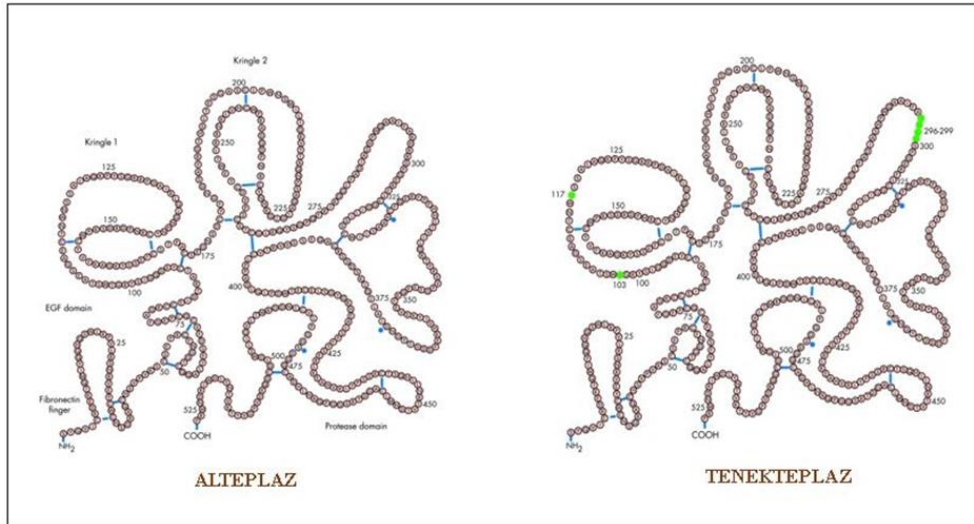
Alteplaz (Actilyse, Boehringer Ingelheim) ilk FDA onaylı rekombinant doku plazminojen aktivatörüdür. Alteplaz ilk olarak 1987'de akut miyokard enfarktüsünün tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır, ardından 1990'da akut masif pulmoner emboli ve 1996'da akut iskemik inme tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. İkinci jenerasyon fibrinolitik ilaç olan alteplaz; insan melanom hücrelerinin endojen doku plazminojen aktivatörünün tamamlayıcı DNA'sından (cDNA) sentezlenen 527 amino asitlik saflaştırılmış bir glikoproteindir. Endojen doku plazminojen aktivatörü gibi alteplaz; fibronektin parmağı, insan epidermal büyüme faktörü, kringle 1, kringle 2 ve serin proteaz alanlarını içerir. Molekül ağırlığı 63.000-65.00 daltondur. Alteplazın lizin bağlanma bölgeleri kringle 2 alanı üzerinde olması nedeniyle trombine yüksek bağlanma afinitesi göstermektedir. Alteplazın plazma yarılanma ömrü <5 dakikadır ve

klerens öncelikle karaciğerde gerçekleşir. Ayrıca, alteplaz PAI-1 tarafından geri dönüşümsüz olarak inaktive edilebilir [102].

2.9.2.2 Tenekteplaz

Yeni bir üçüncü kuşak trombolitik ajan olan tenekteplaz (Metalyse, Boehringer Ingelheim, Sydney, Avustralya), rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen bir doku plazminojen aktivatörüdür. Alteplaz gibi tenekteplaz da fibronektin parmağı, epidermal büyüme faktörü, kringle 1, kringle 2 ve serin proteaz alanlarını içeren bir glikoproteindir. Bununla birlikte, tenekteplaz alteplaz ile karşılaştırıldığında yapısal farklılıklara yol açan 3 farklı bölgede aminoasit değişikliği içermektedir. Polipeptidin 103. Pozisyonunda yer alan aminoasit treonin, yeni bir glikozilasyon bölgesine yol açan asparagin ile değiştirilmiştir. Bu bölgeye bağlı karbonhidrat zinciri molekülü genişletir, böylece eliminasyonunu azaltır ve plazma yarı ömrünü uzatır. 117. pozisyonda asparaginin yerini glutamin almıştır. Bu amino asidin değişikliği ile hepatik eliminasyonu kolaylaştıran karbonhidrat yan zinciri çıkarılmıştır. Bu nedenle, plazma yarı ömrü daha da uzar. Son olarak, 296-299. Pozisyonda, lizin, histidin, arginin ve arginin amino asitlerinin yerini dört amino asit alanin almıştır (Şekil 2-9). Sonuç olarak, PAI-1 tarafından inhibisyon alteplaz ile karşılaştırıldığında 80 kat azalır [102].

Tenekteplazın diğer bir avantajı, dış retina ve RPE üzerinde toksik etkisi olduğu düşünülen L-arginin'i daha az miktarda (Alteplaz'ın üçte birinden daha az) içermesidir [9,105]. Bu farklılık, oftalmolojik uygulamalarda önemli avantajlar sağlayabilir. Alteplaz ile tenekteplazın klinik özellikleri Tablo 2-4'te özetlenmiştir.



Şekil 2-9 : Alteplaz ve tenekteplazın moleküler yapısı

Tablo 2-4 : Alteplaz ve tenekteplazın klinik özellikleri

	ALTEPLAZ	TENEKTEPLAZ
Plazma yarılanma ömrü	<5	20-24
Plazma klerens, mL/dk	380-570	99-119
Atılım yolu	Hepatik	Hepatik
Fibrin spesifitesi	++	++++

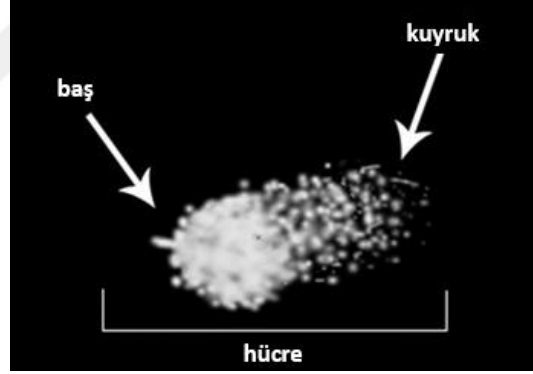
2.10 Dna Hasarı

Kalıtımın temel birimi olan DNA'nın, reaktif bir molekül olduğu ve endojen ve eksojen ajanların kimyasal modifikasyonlarına oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir. DNA hasarı, kökenine göre iki ana sınıfa ayrılabilir: endojen ve eksojen. Endojen DNA hasarının çoğunluğu, kimyasal olarak aktif DNA'nın sırasıyla su ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile hidrolitik ve oksidatif reaksiyonlara girmesinden kaynaklanır. Eksojen DNA hasarı ise çevresel, fiziksel ve kimyasal ajanlar DNA'ya zarar verdiğinde ortaya çıkar. Kullanılan çeşitli biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanlar insan sağlığını etkilediğinden, bu ajanların genotoksitesinin test edilmesi ve kullanımlarının düzenlenmesi önemli hale gelmiştir [106].

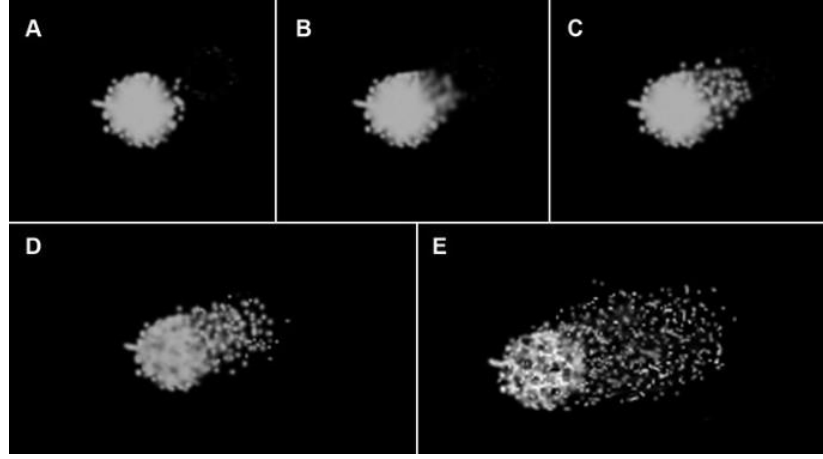
2.10.1 Tek hücre jel elektroforez (Comet testi)

“Tek hücreli jel elektroforez testi” olarak da bilinen Comet testi, tek bir hücrede DNA hasarını veya onarımını tespit etmek için kullanılan hızlı bir yöntemdir. Genotoksisitenin değerlendirilmesinde günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Comet testi, bölünmüş ve denatüre DNA fragmanlarının hücre dışındaki bir elektrik alanının etkisi altında göç etme yeteneğine dayanmaktadır. Eğer DNA herhangi bir kırık içeriyorsa, kırılmış DNA parçaları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru hareket ederek kuyruklu yıldız görüntüsü verdiği için bu nedenle hasarlı hücreler Comet (kuyruklu yıldız) olarak adlandırılmıştır [107].

Testin prosedürü (1) analiz edilen hücrelerin bir mikroskop lamı üzerine sabitlenmesi, (2) hücre lizizi ve (3) doğru elektrik akımında agaroz jel elektroforezinden oluşur. Son olarak DNA boyanır ve görselleştirilir. DNA ipliği kırılmaları varsa, kuyruklu yıldız jelde gözlenir [107].



Şekil 2-10 : Comet deneyinde ‘kuyruklu yıldız görünümü’



Şekil 2-11 :Kuyruklu yıldızların görsel puanlaması. Kuyruklu yıldızlar, DNA hasarına göre beş kategoriye ayrılır: A sınıfı 0 - hasar yok veya çok düşük hasar, B düşük hasar, C orta hasar, D uzun DNA göçü, E apoptotik veya nekrotik DNA göçü

2.11 Apoptoz

Apoptoz, hücrelerdeki karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle ilişkili programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Bu programlanmış hücre ölümü, bir dizi fizyolojik ve patolojik sürecin oluşumunda rol oynar. Bu nedenle, hücresel metabolizma ile ilgili araştırmalarda apoptoz belirtilerini tespit etmek önem taşımaktadır. Ayrıca, apoptozun tespiti ilaçların ve kimyasalların neden olduğu hücre toksisitesinin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir [108].

2.11.1 Apoptoz morfolojisi

Işık ve elektron mikroskopunun kullanılmasıyla birlikte apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri tanımlanmıştır. Apoptoz sırasındaki morfolojik değişiklikler arasında hücrenin küçülmesi, piknoz (kromatin yoğunlaşması) ve karyoreksis (çekirdek parçalanması) ve ardından DNA parçalanması yer alır. Apoptozun geç evresinde apoptotik cisimler oluşur. Erken apoptoz süreci sırasında, hücre küçülmesi ve piknoz ışık mikroskobu ile görülebilir. Hücre küçülmesi ile hücreler daha küçük boyutta olur, sitoplazma yoğundur ve organeller daha sıkı paketlenir. Piknoz, kromatin yoğunlaşmasının sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilin&eoziin boyası ile histolojik incelemede

apoptotik hücre, koyu renkli eozinofilik sitoplazmalı ve yoğun mor nükleer kromatin parçacıklı yuvarlak veya oval bir kütle olarak görünür [109].

2.11.2 Apoptoz mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları oldukça karmaşık ve enerjiye bağlı moleküler olaylar zincirini içerir. Günümüze kadar, araştırmalar iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir. Birincisi; intrinsik yol diğer adı ile mitokondriyal yoldur, ikincisi ise ekstrinsik yoldur. Bununla birlikte, T hücre aracılı sitotoksisiteyi ve hücrenin perforin-granzime bağlı ölümünü içeren ek bir yol vardır. İntrinsik, ekstrinsik ve granzim B yolları, aynı terminalde veya uygulama yolunda birleşmektedir [108].

Intrinsik yol

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içindeki hedefler üzerine doğrudan hareket eden ve mitokondri tarafından başlatılan hücre içi sinyaller üreten çeşitli reseptör aracılı olmayan uyaran dizisini içerir. Apoptozun intrinsik yolağı aynı zamanda mitokondriyal yol olarak da adlandırılır. Çok çeşitli sitotoksik uyaranlar veya çevresel etkenler tarafından aktive edilir. Bu uyaranların apoptozu tetiklediği mekanizmalar farklı görünse de, hepsinin ortak sonucu proapoptotik proteinlerin mitokondriden salgılanmasına neden olmaktadır.

Tüm bu uyaranlar, mitokondri iç membranında por oluşumu ile sonuçlanan değişikliklere ve mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) kaybına neden olur. Apoptozun intrinsik yolağında iki ana pro-apoptotik protein grubu rol oynar. Birinci grup proapoptotik proteinler, sitokrom c, Smac / DIABLO ve serin proteaz HtrA2 / Omi'den oluşur. Bu proteinler, "kaspazlar" adı verilen bir grup sistein proteazın aktivasyonuna neden olurlar. Sitokrom c, iç mitokondriyal zarın dışında ve zarlar arası boşlukta lokalizedir. ATP üretimi için hücre içi elektron transport zincirinde önemli bir işlevi vardır. Apoptotik süreç sırasında sitokrom c, sitozolde salınır ve apoptoz proteaz aktive edici faktöre (Apaf-1) bağlanır. Sitokrom c ve Apaf-1, prokaspaz-9'u aktif proteolitik enzim olan kaspaz-9'a aktive eden bir kompleks oluşturur. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur [108, 110]

İkinci pro-apoptotik protein grubu, apoptoz indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G ve kaspaz ile aktifleştirilmiş DNaz (CAD) apoptoz sırasında mitokondriden salınır.

AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde işlev görür. CAD ise mitokondriden salınır ve çekirdeğe geçer, burada kaspaz-3 tarafından bölündükten sonra oligonükleozomal DNA fragmantasyonuna ve daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına yol açar [111].

İntrinsik yolaktaki mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir. Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya anti-apoptotik davranış gösterebilir. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir [108].

Ekstrinsik yol

Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörleri aracılı etkileşimleri içerir. Hücre yüzeyindeki reseptörlere (Fas, TNRF, DR5) apoptoz sinyallerinin (FasL, TNF- α , TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapıya dönüşür. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspaz-8 ile birleşerek prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 ise spesifik olarak endonükleaz CAD'i aktive eder. CAD daha sonra çekirdeklerdeki kromozomal DNA'yı bozar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. [112,113].

2.11.3 Apoptotik hücre ölümünü tespit etme yöntemleri

Apoptozun tespiti, membran değişiklikleri, DNA fragmantasyonu, sitotoksisite ve hücre proliferasyonu, mitokondriyal hasar, immünolojik mekanizmalara dayalı deneyler ile ilgili yöntemleri içerir [114] (Tablo 2-5).

Tablo 2-5 : Apoptotik hücre ölümünü tespit etme yöntemleri.

Sitomorfolojik değişikliklerin tespiti
<ul style="list-style-type: none">• Hematoksilen- eozin boyama• Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM)
DNA fragmentasyonunun tespiti
<ul style="list-style-type: none">• TdT aracılı dUTP Nick-End Etiketleme (TÜNEL) testi• DNA merdiven testi
Kaspazların, parçalanmış substratların, düzenleyicilerin ve inhibitörlerin tespiti
Membran değişikliklerinin tespiti
<ul style="list-style-type: none">• Plazma membran geçirgenliğini ölçen radyoaktif ve radyoaktif olmayan testler• Kolorimetrik tahliller <p>- Anneksin V canlılık testi</p> <p>- Laktat dehidrojenaz (LDH) testi</p> <p>- Flöresein Boyama</p>
Mitokondriyal deneyler

2.11.3.1 Flöresein boyama

Sağlam hücre zarına giren boyalar arasında en önemlileri, DNA'ya spesifik bağlanmaları nedeniyle DNA'yı saptamak ve ölçmek için kullanılan floresan boyalardır. Apoptotik hücreler, akridin turuncusu (AO), Nil mavisi sülfat (NBS) ve nötr kırmızı (NR) gibi boyalar kullanılarak görselleştirilebilir. Bu boyalar asidofilik

olduklarından, yüksek lizozomal ve fagositotik aktiviteye sahip alanlarda yoğunlaşırlar [115].

2.11.3.2 Mitokondriyal transmembran potansiyeli

Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP- $\Delta\psi_m$), mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir. MMP'nin düşmesi proapoptotik sinyalin başlatılmasını yansıtan mitokondriyal zar bütünlüğünün kaybına işaret eder. Apoptoz araştırmalarındaki yeni tekniklerden biri, floresan lipofilik molekülleri kullanarak mitokondriyal transmembran potansiyelini ölçmektir. Sağlıklı hücrelerde bu lipofilik moleküller, parlak kırmızı floresan ile bir polimer oluşturarak mitokondride toplanır. Apoptotik hücrelerde, transmembran potansiyeli azalmıştır ve lipofilik moleküller, yeşil bir floresansla sitoplazmada monomerik formlarında kalmaktadır [116].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3-1’de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
Soğutmalı Santrifüj	Hermle	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Derin Dondurucu (-20°C / -80°C)	Uğur / Haier	FBS, , Pen/Strep gibi sıvıların saklanması için kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4)	Uğur	Örnek, kit, medyum, tampon vb.’nin saklanması için kullanılmıştır.
Hassas Terazi	Mettler Toledo	Numunelerin tartılmasında kullanılmıştır.
Dejiyize su cihazı	Sartorius Stedim	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Vortex	Stuart	Stok solüsyonu hazırlarken kullanılmıştır.
Hücre Kültürü Kabini (Class II)	Safe Fast Classic Faster Air	Hücre kültürü ve transfeksiyon işlemleri için kullanılmıştır.
Karbondioksit İnkübatörü	ESCO - Panasonic	Hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır.
Ters Işık Mikroskobu	Novel	Hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır.
Floresans Mikroskop	Leica DM 1000	Apoptoz, DNA Hasarı ve Transfeksiyon kontrolünde kullanılmıştır.
Multiplaka Okuyucu	Thermo Varioskan	Fotometrik, Luminometrik ve Florometrik okumalar bu cihazda yapılmıştır.
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo	DNA Hasarı’nda jel yürütürken kullanılmıştır.
Otomatik Pipetler	Eppendorf	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı	Biocote, Stuart CB162	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Orbital karıştırıcı	Biosan, OS20	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Sıcak su banyosu	Hellma Analytics	Tüm deneylerde kullanılmıştır.
Buz makinası	Maestrogen Inc	Tüm deneylerde kullanılmıştır.

3.1.2 Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar Tablo 3-2’de listelenmiştir.

Tablo 3-2: Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
Sodyum Klorür (NaCl)		
Potasyum Klorür (KCl)		
Sodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat		
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Sigma-Aldrich	Genel laboratuvar solüsyon ve tamponları için kullanılmıştır.
Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)		
Tris HCl		
Tris Baz		
Fetal Sığır Serumumu		
Penisilin/Streptomisin	Gibco	Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
DMEM: F-12 Medyumu		
Cryopreservation Medyum	ABM	Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
Actilyse	Boehringer Ingelheim	Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
Metalyse		
Diklorofloroscein Diasetat		
Akridin turuncusu		
Etidyum Bromür		
Normal Melting Agar		
Low Melting Agar		
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
Triton X		
Sodyum Hidroksit (NaOH)		
HCl		
Tripsin-EDTA		
Fura-2AM		
3,3'-dihexyloxacarbocyanine Iodide	Santa Cruz	Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.

3.1.3 Kitler

Çalışma kapsamında kullanılan kitler Tablo 3-3’de listelenmiştir.

Tablo 3-3: Çalışma kapsamında kullanılan kitler.

Kit Adı	Marka	Kullanım Amacı
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit	Promega	Sitotoksikite deneyleri için kullanılmıştır.
GSH-Glo™ Glutathione Assay Kit	Promega	Hücre kültüründe glutatyon düzeylerini ölçmek için kullanılmıştır.
ELISA Kitleri	Elabscience	Enflamasyon ve büyüme faktörlerinin ölçümü için kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre kültürü çalışmaları

Laboratuvarımızda kullanılacak Göz Retina Pigment Epitel Hücre Hattı (ARPE-19) ticari olarak kültür bankalarından temin edildi ve prospektüslerinde belirtilen özel *complete* medyumlarında (DMEM:F12 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% Penisilin/Streptomisin) 37°C’de %5 CO₂ ve % 95 hava bulunan inkübatörde çoğaltıldı. Tüm hücre hazırlama işlemleri BCL-2 laminar flow’da steril ortamda gerçekleşti. Hücreler temin edildikten sonra 37°C’de 1 dakika içinde eritilip, laminar flow’da hazırlanan *complete* medyumla karıştırılıp, steril falkonda 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Dipteki kalan pellet pipetaj yapıp içinde önceden hazırlanan *complete* medyum olan 25 cm² hücre kültürü flaskına ekildi. Hücreler bu flaskta konflue olduktan sonra besiyeri ortamdan alındı ve dPBS ile yıkandı. Hücrelerin üstüne 0,5 mL Tripsin-EDTA çözeltisi (0,25%) eklendi ve Tripsin-EDTA’nın iyi etki edebilmesi için hücreler kalkıncaya kadar inkübatörde 2-5 dakika arası inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Tripsin-EDTA’yı nötralize etmek için flaskın içine hazırlanan 5 mL *complete* medyum eklendi ve oluşan hücre süspansiyonu 15 mL steril falkon tüplere aktarılıp 800xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelleti 2 mL taze *complete* besiyeri eklendi ve steril pipetle süspansiyon haline getirilip, daha önceden

inkübatörde bulunan içinde *complete* besiyeri olan 75 cm² hücre kültürü flaskına eklendi. Hücre pasajlama sirkülasyonu bu şekilde devam edilip çoğaltılan hücreler birkaç kere pasajlanıp, hücre sayımı yapıldıktan sonra *cryopreservation* ile -80°C ve azot tankında stok yapıldı [117].

3.2.2 Hücre Sayımı ve Ekimi

Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan alınan 10 µL hücre, 10 µL tripan mavisi solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışımın 10 µL'si Thoma lamına pipetlenerek hücreler mikroskop altında sayıldı ve hücre sayısı belirlendi. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 ml lik falkon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu hazırlandı. Hücre canlılığı/sitotoksosite için 96'lık beyaz *platelere* kuyu başı $1,5 \times 10^4$ hücre/100 µL, hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeyi, mitokondriyal membran potansiyeli ve hücre içi kalsiyum düzeyi için 96'lık siyah *platelere* kuyu başı $1,5 \times 10^4$ hücre/200 µL, DNA Hasarı ve apoptoz için 6'lık well'lere kuyu başı 5×10^4 hücre/2 mL ekim yapıldı. *Platelerdeki* ARPE-19 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki alteplaz ve tenekteplaz verilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Tüm konsantrasyonlar 3 kere tekrarlanarak çalışıldı [117].

3.2.3 Hücre Canlılık/Sitotoksosite Testi (ATP Testi)

Çalışmada kullanılan olan Göz Retina Pigment Epitel Hücre Hattı (ARPE-19) hücre hattı birkaç kez pasajlanıp, çoğaltıldıktan sonra 96'lık beyaz kültür *platelerine* ekilip ($1,5 \times 10^4$) 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Ardından alteplaz ve tenekteplazın farklı konsantrasyonlarına karşı 24 saatteki hücre canlılığa etkisini tespit etmek için luminometrik ATP testi (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay) ile *multiplate* okuyucuda canlılık ölçüldü. Kontrol grubu olarak %0,1 olacak şekilde DMSO kullanıldı. IC₅₀ dozları ölçümden sonra hesaplandı ve diğer çalışmalar bu dozun altındaki konsantrasyonlarda gerçekleşti [118,119].

3.2.4 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeyinin ölçümü (iROS Ölçümü)

Çalışmada kullanılan olan Göz Retina Pigment Epitel Hücre Hattı (ARPE-19) hücre hattı birkaç kez pasajlanıp, çoğaltıldıktan sonra 96'lık siyah kültür *platelerine* ekilip ($1,5 \times 10^4$) 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Ardından alteplaz ve tenekteplazın farklı konsantrasyonlarına karşı 24 saatteki hücre içi ROS'a etkisini 2,7 diklorodihidrofloreseindiasetat (H₂DCF-DA) floresans boyası kullanılarak

ölçüldü. Prosedürde hücreler 24 saatlik alteplaz ve tenekteplaz inkübasyonundan sonra besiyerleri aspire edilip 1xPBS ile 3 kere yıkandı. Kuyulara 100 µL 10 µM H₂DCF-DA eklenip 30 dakika 37°C'de inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan floresans yoğunluğu Ex:488nm/Em:525nm floresans plate okuyucusu (Varioskan Flash Çok Modlu Okuyucu, Thermo, Waltham, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar %0,1 DMSO eklenen kontrol grubuna göre relatif olarak ATP ile kıyaslanarak (ROS/ATP) hesaplandı [117].

3.2.5 DNA hasarı ölçümü

Genotoksik hasar yani DNA Hasarı Singh ve arkadaşları tarafından modifiye edilen alkali tekli hücre elektroforezi yöntemi (*comet assay*) ile ölçüldü [120]. 6'lık well'lere ekilen hücreler IC₅₀ altındaki dozlarda ilaçlar uygulandıktan 24 saat sonra tripsin-EDTA ile kaldırılıp 800g'de 5 dakika santrifüj ardından süpernatantlar enflamasyon çalışmaları için saklandı. Hücreler 1xPBS ile yıkanan hücreler +4°C'de 800g'de 5 dakika santrifüj edilip DNA hasarı prosedürüne geçildi.

3.2.5.1 Yöntemin prensibi

Comet Assay metodu DNA'nın farklı elektriksel yük ve ağırlığına göre elektrik alanında farklı göç etmesine dayalı bir yöntemdir. Hücreler agarozaya yerleştirilip lizise uğrattılır. Eğer DNA'da herhangi bir hasar (genotoksisite) yoksa DNA görünümü kompakttır yani herhangi bir kuyruk (comet) oluşturmaz. Oysa DNA hasara uğrayıp fragmente olmuşsa, oluşan bu fragmentler farklı elektriksel yük ve molekül ağırlığına sahip oldukları için elektroforetik ortamda farklı hareket edeceklerinden, DNA lar floresan boya olan etidyum bromür ile boyandıklarında kuyruklu bir görüntü oluşturacaklardır.

3.2.5.2 Yönteminin Uygulanışı

Slaytların hazırlanması

45°C'de NMA %1'lik ddH₂O beher içinde hazırlanır ve lamlar behere batırılıp bir tarafı silinerek kurutmaya bırakıldı. Agarlı lamlar hazırlandıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılan hücre ve 40°C'de ddH₂O ile hazırlanan %0,65'lik LMA (80:15) ependorf içinde karıştırıldı. 85 µl karışımdan çekilir ve önceden hazırlanmış olan agarlı lama

damlatılıp, lamel kapatılır. Agarozun donması için buzdolabında 5 dakika bekletildikten lamel lamdan çıkartılır ve sonra lizis aşamasına geçildi.

Lizis aşaması

Lizis aşamasına hazırlanan lamalar maksimum bir gece lizis solüsyonunda (pH:10 - 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris Baz ve %1 triton X-100) buzdolabında inkübe edildi. Lizis solüsyonu hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağlar ve DNA'da kırık varsa ve parçalanmışsa fragmente bölgeyi tutan bağları kopmasını sağlandı.

Elektroforez aşaması

Lizis aşamasından sonra lamalar 1xPBS ile yavaşça 5 kez yıkanır. Elektroforez tankına yerleştirilen lamalar elektroforezden önce +4°C'de 30 dakika elektroforez tamponun (pH:10 - 1mM EDTA, 300 mM NaOH) inkübe edilir. İnkübasyon sonrası 300 mA, 14 volt'ta 25 dakika elektroforez gerçekleştirildi.

Nötralizasyon aşaması

Elektroforezden sonra lamalar 5 dk süre ile 5 kez nötralizasyon tamponu (pH:7,5 - 0.4 M Tris-HCl,) ile oda sıcaklığında muamele edildi.

Boyama aşaması

Boyama aşamasında kullanılan boya nükleik asitlere özgü olan etidyum bromürdür. Nötralizasyon aşamasından sonra lamaların üstündeki jellere 2 µg/ml etidyum bromür damlatılıp lamelle kapatılır. Örnekler leica floresans mikroskop ile (20X, Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 20 nm) DNA'ların görüntüsü değerlendirilip, kaydedildi.

Analiz

Floresans mikroskoptan kaydedilen görüntüler bilgisayardaki analiz programı (Comet Assay IV, Perpective Ins.) ile değerlendirildi. Hartmann'a göre DNA hasarı ölçümündeki ilk kriter kuyruk yoğunluğunun ölçülmesidir. Programdan DNA'lardaki kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) ölçülerek hesaplandı.

3.2.6 Apoptoz testi

Akridin turuncusu (AT) / etidyum bromür (EB) çift boyaması

Akridin turuncusu/etidyum bromür boyası (AT/EB), hücrelerde morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için kullanılan çift boyamadır. Akridin turuncusu boyası vital bir boyadır ve hem canlı hem de ölü hücreleri boyar. Etidyum bromür boyası ise sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyar. Canlı hücreler homojen bir yeşil, erken apoptotik hücreler ise kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma dolayısıyla özellikle çekirdeklerinde parlak yeşil noktalar içerecektir. Geç apoptotik hücreler hem AT hem de EB içerdiğinden dolayı turuncu rengi alacaktır. Fakat nekrotik hücreler sağlıklı hücrelerin aksine yoğunlaşmış kromatin içerdiğinden farklı bir nükleer morfoloji ve boya yoğunluğuna sahip olduğundan bozuk şekilli kırmızı görünür [121].

6'lık well'lere ekilen hücreler IC₅₀ altındaki dozlarda ilaçlar uygulandıktan 24 saat sonra tripsin-EDTA ile kaldırılıp 800g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatantlar atıldı. 1xPBS ile yıkanan hücreler +4°C'de 800g'de 5 dakika santrifüjün ardından boş lamın üzerine 10 µL hücre pelleti ve 10 µL AT/EB solüsyonu (100 µg/mL AT + 100 µg/mL EB) eklenip lamel kapatıldı. Görüntüler floresans mikroskopta (Leica DM 1000) değerlendirilip kaydedildi. Rastgele kaydedilen hücrelerde her konsantrasyonda 3 tekrar ve minimum 100 hücre sayıldı.

3.2.7 Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) tayini

Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP- $\Delta\psi_m$), mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir. MMP'nin düşmesi proapoptotik sinyalin başlatılmasını yansıtan mitokondriyal zar bütünlüğünün kaybına işaret eder.

Çalışmada kullanılan olan Göz Retina Pigment Epitel Hücre Hattı (ARPE-19) hücre hattı birkaç kez pasajlanıp, çoğaltıldıktan sonra 96'lık siyah kültür *platerine* ekilip (1,5 x 10⁴) 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Ardından alteplaz ve tenekteplazın farklı konsantrasyonlarına karşı 24 saatteki mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim 3,3'-diheksiloksikarbosiyanin iyodür (DiOC6(3)) floresans boyası kullanarak ölçüldü. Prosedürde hücreler 24 saatlik Actilyse ve Metalyse inkübasyonundan sonra besiyerleri aspire edilip 1xPBS ile 3 kere yıkandı. Kuyulara 100 µL 40 nM (DiOC6(3)) eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe

edidi. Daha sonra oluşan floresans yoğunluğu Ex:485nm/Em:535nm floresans plate okuyucusu (Varioskan Flash Çok Modlu Okuyucu, Thermo, Waltham, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar %0,1 DMSO eklenen kontrol grubuna göre relatif olarak ATP ile kıyaslanarak (MMP/ATP) hesaplandı [122].

3.2.8 Hücre içi glutatyon düzeylerinin ölçümü

Çalışmada hücre içi glutatyon (GSH) düzeylerini ölçmek için luminometrik glutatyon kiti kullanıldı. Ticari olarak satın alınan *GSH-Glo™ Glutathione Assay* luminesans glutatyon kiti glutatyonu glutatyon-s transferaz enzimiyle indirgerken kitte bulunan lusiferin-NT substratını lusiferine dönüştürür.

Bu dönüşüm sırasında ortamda ATP çıkar. Ortamda meydana gelen lusiferin rekombinant lusiferaz enzimi ile oksilusiferine dönüşerek luminesans yayar [123]. Opak beyaz 96'lık plate'lere ekilen $1,5 \times 10^4$ hücreye 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan alteplaz ve tenekteplaz eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından glutatyon solüsyonu eklenip 5 dakika içinde Thermo Varioskan multiplate okuyucuda luminesans ölçüm alındı.

3.2.9 Hücre içi kalsiyum düzeyinin ölçümü (Ca²⁺ Ölçümü)

Çalışmada kullanılan olan Göz Retina Pigment Epitel Hücre Hattı (ARPE-19) hücre hattı birkaç kez pasajlanıp, çoğaltıldıktan sonra 96'lık siyah kültür *platelerine* ekilip ($1,5 \times 10^4$) 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Ardından alteplaz ve tenekteplazın farklı konsantrasyonlarına karşı 24 saatteki hücre içi kalsiyuma etkisini Fura-2AM floresans boyası kullanılarak ölçüldü. Prosedürde hücreler 24 saatlik alteplaz ve tenekteplaz inkübasyonundan sonra besiyerleri aspire edilip 1xHBSS ile 3 kere yıkandı.

Kuyulara 100 µL 5 µM Fura-2AM eklenip 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler 1xHBSS ile 2 kere yıkandıktan sonra 1xHBSS ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra oluşan floresans yoğunluğu Ex:340nm/Em:380nm floresans plate okuyucusu (Varioskan Flash Çok Modlu Okuyucu, Thermo, Waltham, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar %0,1 DMSO eklenen kontrol grubuna göre relatif olarak ATP ile kıyaslanarak (Ca²⁺/ATP) hesaplandı [124].

3.2.10 Enflamasyon

6'lık well'lere 50×10^3 ekilen hücelere IC_{50} altındaki dozlarda ilaçlar uygulandıktan 24 saat sonra tripsin-EDTA ile kaldırılıp 800g'de 5 dakika santrifüj ardından süpernatantlar enflamasyon çalışmaları için kullanıldı. Süpernatantlarda Bradford yöntemiyle total protein tayini yapıldıktan sonra ticari olarak satın alınan insan IL1 β ELISA kitleriyle fotometrik yöntemlerle IL1 β düzeyleri ölçüldü [125].

3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS (Statistical Package for Social Science) (SPSS Inc. Chicago, IL, USA, v.20.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. İn vitro deneylerden elde edilen tüm veriler üç tekrarın ortalama \pm standart sapması (Ortalama \pm SS) olarak sunulmuştur. Değişkenlerin normal dağılıma uyumlulukları 'Shapiro-Wilk testi' ile değerlendirilmiştir. Tüm deneylerden elde edilen veriler, varyans analizleri (One-Vay ANOVA) kullanılarak istatistiksel anlamlılık açısından analiz edilmiştir. Farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için post hoc analizler yapılmıştır. Alteplaz ve Tenekteplaz için IC_{50} değerleri, doğrusal olmayan regresyon analizi ile hesaplanmıştır. Parametreler arasındaki ilişki düzeyini veya derecesini değerlendirmek için normal dağılıma uyan verilere 'Pearson korelasyon analizi', normal dağılıma uymayan verilere 'Spearman korelasyon analizi' uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR:

4.1 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi ve IC50 Değerinin (%50 inhibitör konsantrasyon) Saptanması

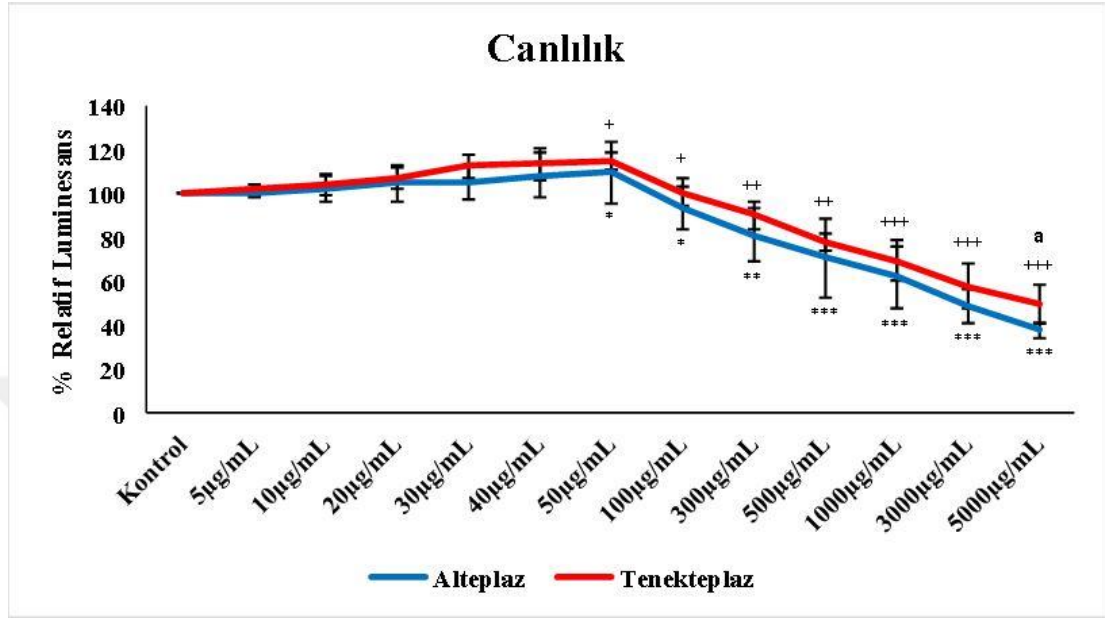
Alteplaz ve Tenekteplaz'ın farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 300, 500, 1000, 3000 ve 5000 µg/mL) 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için luminometrik ATP deneyi kullanılmıştır. Hücre canlılığı yüzdesi, bir kontrol paneli ile normalize edilerek hesaplanmıştır. Kontrol hücrelerinin canlılığı 100 olarak referans alınmıştır. Artan dozlardaki sonuçlar kontrole göre rölatif olarak hesaplanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda Alteplaz uygulanan ARPE-19 hücre hattında sırasıyla; 5 µg'da %100, 10 µg'da %102, 20 µg'da %105, 30 µg'da %106, 40 µg'da %109, 50 µg'da %110, 100 µg'da %94, 300 µg'da %81, 500 µg'da %71 , 1000 µg'da %62, 3000 µg'da %49 ve 5000 µg'da %38 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 3-1).

Farklı konsantrasyonlarda Tenekteplaz uygulanan ARPE-19 hücre hattında sırasıyla; 5 µg'da %102, 10 µg'da %104, 20 µg'da %107, 30 µg'da %113, 40 µg'da %114, 50 µg'da %115, 100 µg'da %101, 300 µg'da %91, 500 µg'da %78 , 1000 µg'da %70, 3000 µg'da %58 ve 5000 µg'da %50 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 3-1).

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde Alteplazın 50 µg/mL ve altındaki, Tenekteplazın ise 100 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Bu konsantrasyonların üzerinde uygulandığında, sitotoksitenin konsantrasyon bağımlı olarak arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen hücre canlılığı ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır ($r = -0,755$, $p = 0.005$ Alteplaz için ve $r = -0,866$ $p = 0.001$ Tenekteplaz için). Alteplaz 5000 µg/mL uygulandığında, aynı konsantrasyonda uygulanan Tenekteplaza göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon değeri (IC₅₀) Alteplaz için 2830,76 µg/mL Tenekteplaz için 4894,39 µg/mL olarak hesaplanmıştır. IC₅₀ dozlarının altındaki dozlarda genotoksisite ve apoptoz analizleri yapılmıştır.



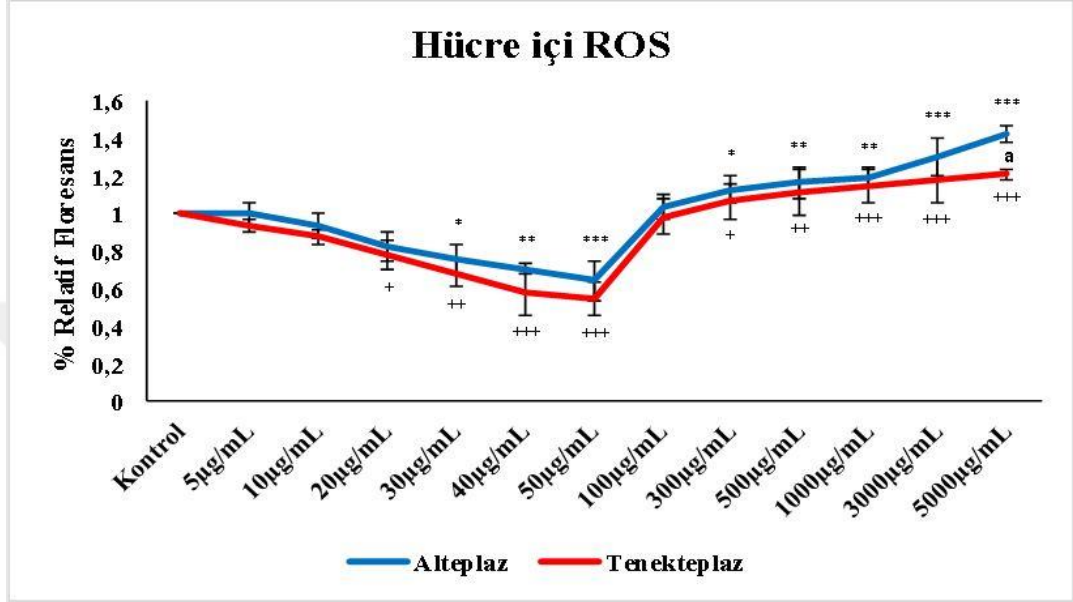
Şekil 3-1 : Alteplaz ve tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığı üzerine etkisi.

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * = p <0.05, ** = p <0.01, *** = p <0.001; Tenekteplaz için + = p <0.05, ++ = p <0.01, +++ = p <0.001 ile gösterilmiştir. Alteplaz ve tenekteplaz aynı konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığı arasındaki anlamlı fark a = p <0,05, aa = p <0,01, aaa = p <0,001 ile gösterilmiştir

4.2 Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Düzeyinin Değerlendirilmesi

Hücre içi ROS düzeyinin inceleyebilmek için indirgenmiş floresans özellik gösteren H₂DCF-DA probu kullanılmıştır. Elde edilen değerler ATP değerleri ile oranlanıp relatif floresans olacak şekilde verilmiştir. Alteplaz ve Tenekteplazın 50 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda hücre içi ROS üretimini azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Alteplaz ve Tenekteplazın konsantrasyon bağımlı olarak hücre içi ROS üretiminin arttığı ve bu artışın 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p < 0.001) (Şekil 3-2). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen hücre içi ROS düzeyi ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif

korelasyon saptanmıştır ($r= 0,764$, $p=0.004$ Alteplaz için ve $r= 0,627$ $p=0.029$ Tenekteplaz için). Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan hücre canlılığı ile ROS düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü negatif korelasyon saptanmıştır ($r=-0,940$, $p<0.001$ Alteplaz için ve $r=-0,894$ $p<0.001$ Tenekteplaz için).



Şekil 3-2 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında hücre içi ROS düzeyine etkisi.

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; Tenekteplaz için + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$ ile gösterilmiştir. Alteplaz ve Tenekteplaz aynı konsantrasyonlarda uygulandığında hücre içi ROS düzeyi arasındaki anlamlı fark a = $p < 0,05$, aa = $p < 0,01$, aaa = $p < 0,001$ ile gösterilmiştir.

4.3 Genotoksisitenin Değerlendirilmesi

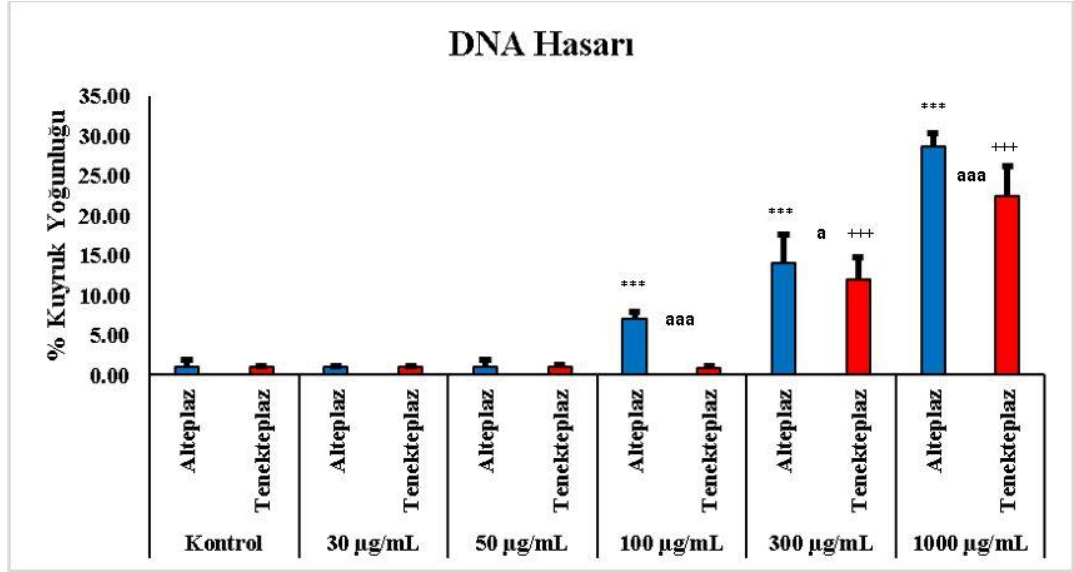
DNA hasar analizi için ARPE-19 hattına 24 saat boyunca IC_{50} dozlarının altında farklı konsantrasyonlardaki Alteplaz ve Tenekteplaz uygulanmış ve DNA hasarı *comet assay* yöntemi ile kuyruk yoğunluğuna göre değerlendirilmiştir. Alteplaz ve Tenekteplazın ARPE-19 hücre hattı üzerindeki genotoksik etkileri kuyruklu yıldız oluşumu olarak görselleştirilmiştir. Hasarlı DNA parlak bir baş ve kuyruk görülürken, hasarsız DNA kuyuksuz sadece yuvarlak olarak görülmektedir.

50 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda Alteplaz uygulandığında DNA kuyruk yoğunluğu yüzdesi açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Şekil 3-3'de gösterildiği gibi 100 µg/mL , 300 µg/mL ve 1000 µg/mL Alteplaz uygulandığında kuyruk yoğunluğu sırasıyla %7,06, %14,11 ve %28,7 olarak saptanmıştır. Bu veriler değerlendirildiğine 100 µg/mL , 300 µg/mL ve 1000 µg/mL Alteplaz uygulanan hücre hattında DNA kuyruk yoğunluğu yüzdesi kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p<0.001$).

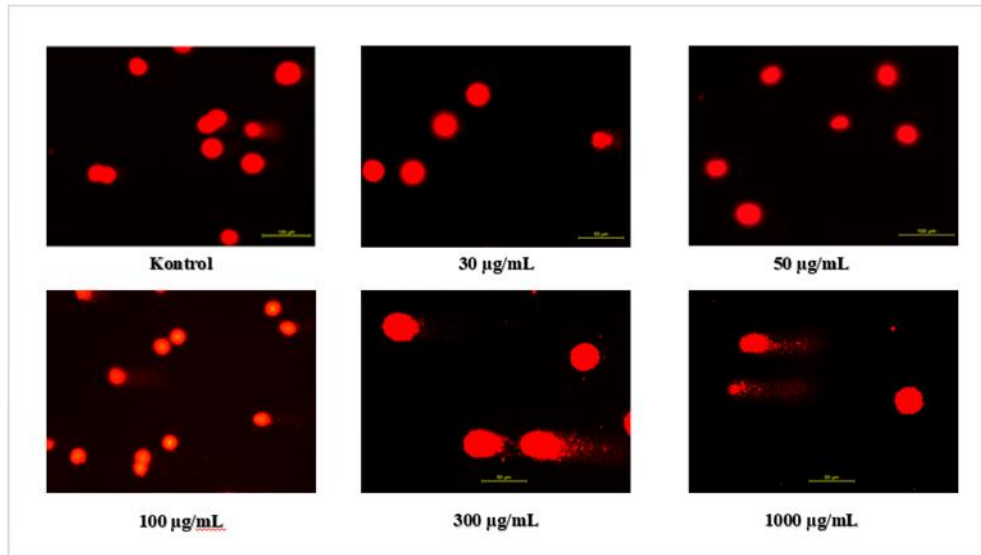
Tenekteplaz 100 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda uygulandığında DNA kuyruk yoğunluğu yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmadığı gözlenmiştir. Tenekteplaz 100 µg/mL, 300 µg/mL ve 1000 µg/mL uygulandığında DNA kuyruk yoğunluğu sırasıyla %0,93, %11,99 ve %22,45 olarak saptanmıştır. 300µg/mL ve 1000 µg/mL Tenekteplaz uygulanan hücre hattında DNA kuyruk yoğunluğu yüzdesi kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p<0.001$). 100 µg/mL ve üstündeki konsantrasyonlarda Alteplaz'ın neden olduğu DNA hasarının Tenekteplaz ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen DNA kuyruk yüzdesi ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($r= 0,972$, $p=0.006$ Alteplaz için ve $r= 0,667$ $p=0.029$ Tenekteplaz için). Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan DNA hasarı ile ROS düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($r=0,900$, $p=0.037$ Alteplaz için ve $r=0,875$ $p=0.048$ Tenekteplaz için).

Bu bulgular, ARPE-19 hücrelerindeki DNA hasarının uygulanan ilaç dozuna bağlı olarak artış gösterdiğine işaret etmektedir. Artan hasarla oluşan DNA kuyruklu yıldız görüntülerinin mikrografları şekil 3-4'de sunulmuştur.



Şekil 3-3: Altepplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücreleri üzerindeki genotoksik etkisi.

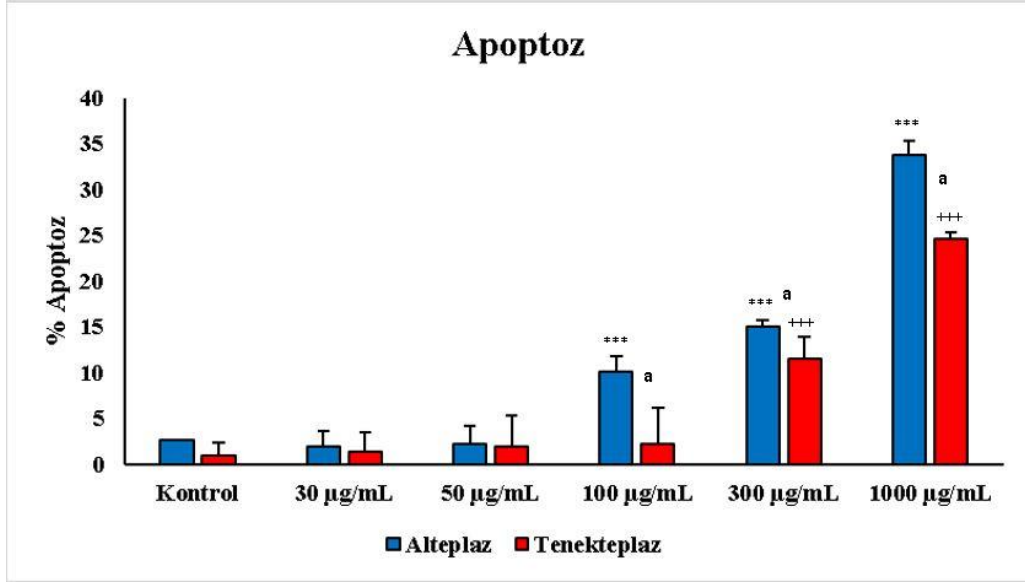
Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Altepplaz için * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; Tenekteplaz için + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$ ile gösterilmiştir. Altepplaz ve Tenekteplaz aynı konsantrasyonlarda uygulandığında DNA kuyruk yüzdeleri arasındaki anlamlı fark a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$ ile gösterilmiştir.



Şekil 3-4 : DNA hasarının değerlendirilmesi.

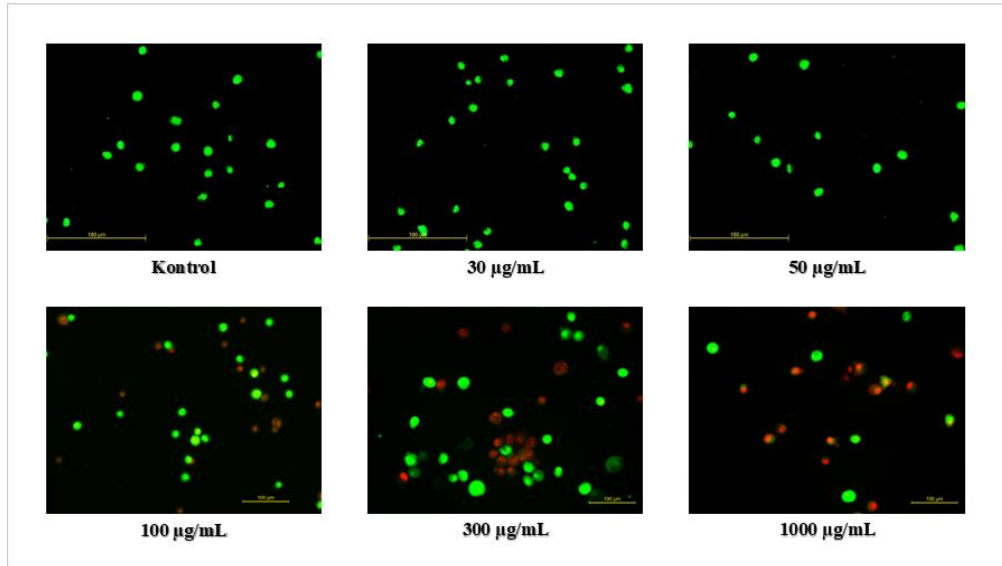
4.4 Apoptozun Değerlendirilmesi

Çalışmamızda IC₅₀ dozlarının altındaki farklı konsantrasyonlarda uygulanan Alteplaz ve Tenekteplazın hücrelerde neden olduğu morfolojik ve apoptotik değişimi izlemek için akridin turuncusu / etidyum bromür çift boyası kullanılmıştır. Boyamanın ardından hücreler floresans mikroskopisi ile incelenmiştir. Şekilx’de gösterildiği gibi her iki ilacın uygulanan dozu arttıkça, yeşil görümlü canlı hücre oranları azalmış ve sarı-turuncu görümlü apoptotik hücre oranları artmıştır. 100 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda Alteplaz uygulanan hücrelerdeki apoptoz oranı kontrol hücrelerindeki apoptoz oranı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p<0.001). Tenekteplaz ise 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulandığında apoptoz oranı kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.001). 100 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan Alteplazın aynı konsantrasyonlarda uygulanan tenekteplaza göre daha yüksek apoptoz oranına neden olduğu tespit edilmiştir (p<0.05) (Şekil 3-5). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen apoptoz oranı ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (r= 0,976, p=0.004 Alteplaz için ve r= 0,985 p=0.002 Tenekteplaz için). Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan apoptoz oranı ile ROS düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir (r=0,900, p=0.037 Alteplaz için ve r= 0,882 p=0.048 Tenekteplaz için). Şekil 3-6’da Alteplazın ARPE-19 hücrelerine apoptotik etkisinin floresans mikroskoptaki görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 3-5: Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.

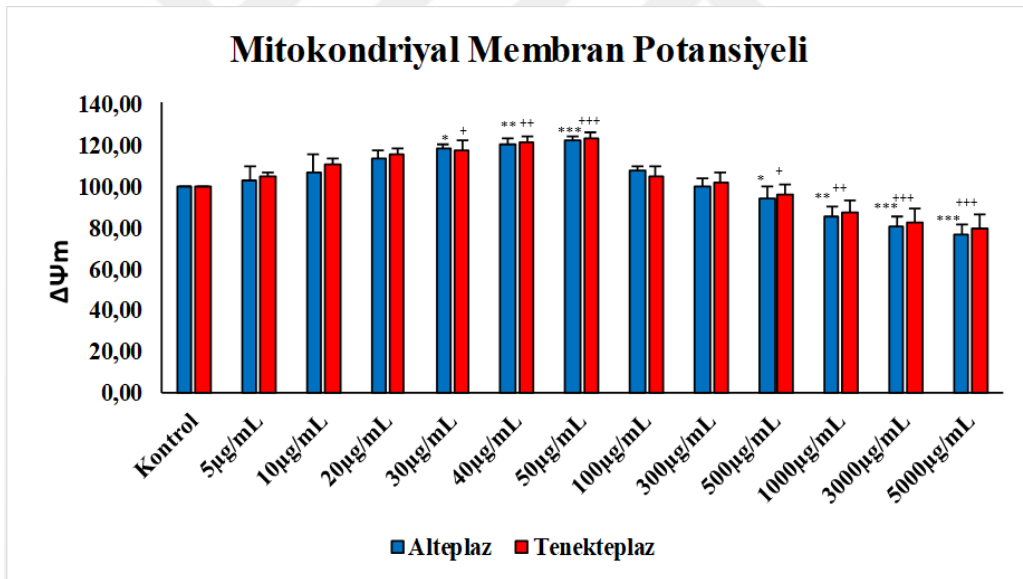
Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; Tenekteplaz için += $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$ ile gösterilmiştir. Alteplaz ve Tenekteplaz aynı konsantrasyonlarda uygulandığında apoptoz oranındaki anlamlı fark a = $p < 0,05$, aa = $p < 0,01$, aaa = $p < 0,001$ ile gösterilmiştir.



Şekil 3-6: Apoptoz görüntüleri.

4.5 Mitokondriyal Membran Potansiyelinin (MMP) Değerlendirilmesi

Alteplaz ve Tenekteplazın IC₅₀ dozlarının altındaki farklı konsantrasyonları ARPE-19 hücre hattına muamele edildikten 24 saat sonra mitokondriyal membran potansiyelini değerlendirmek için akış sitometrisinde ölçüm yapılmıştır. Akış sitometrisi analizden elde edilen sonuçlara göre, Alteplaz ve Tenekteplaz 500 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulandığında MMP kaybının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p < 0.001) (Şekil 3-7). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen MMP ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır (r= -0,798, p=0.002 Alteplaz için ve r= -0,790 p=0.002 Tenekteplaz için). Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan MMP düzeyi ile ROS düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon tespit edilmiştir (r=-0,977, p<0.001 Alteplaz için ve r=-0,955 p<0.001 Tenekteplaz için).

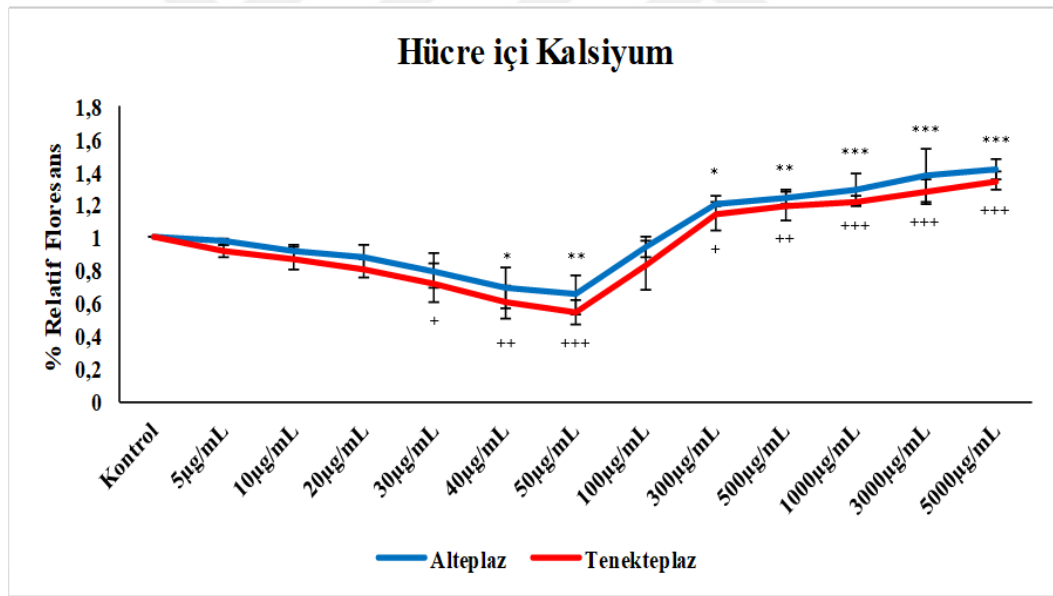


Şekil 3-7 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim.

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * = p <0.05, ** = p <0.01, *** = p <0.001; Tenekteplaz için += p <0.05, ++ = p<0.01, +++ = p <0.001 ile gösterilmiştir.

4.6 Hücre içi Kalsiyum Düzeyinin Değerlendirilmesi

ARPE-19 hücre hattında gerçekleşen apoptotik indüksiyona neden olan mekanizmaları araştırmak için hücre içi Ca^{2+} seviyesi ölçülmüştür. 300 $\mu\text{g/mL}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan Alteplaz ve Tenekteplazın ARPE-19 hücrelerinde hücre içi Ca^{2+} düzeyini kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 3-8). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen hücre içi Ca^{2+} düzeyi ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır ($r = 0,720$, $p = 0.008$ Alteplaz için ve $r = 0,707$ $p = 0.010$ Tenekteplaz için). Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan Ca^{2+} düzeyi ile apoptoz arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($r = 0,897$, $p = 0.039$ Alteplaz için ve $r = 0,867$ $p = 0.047$ Tenekteplaz için)

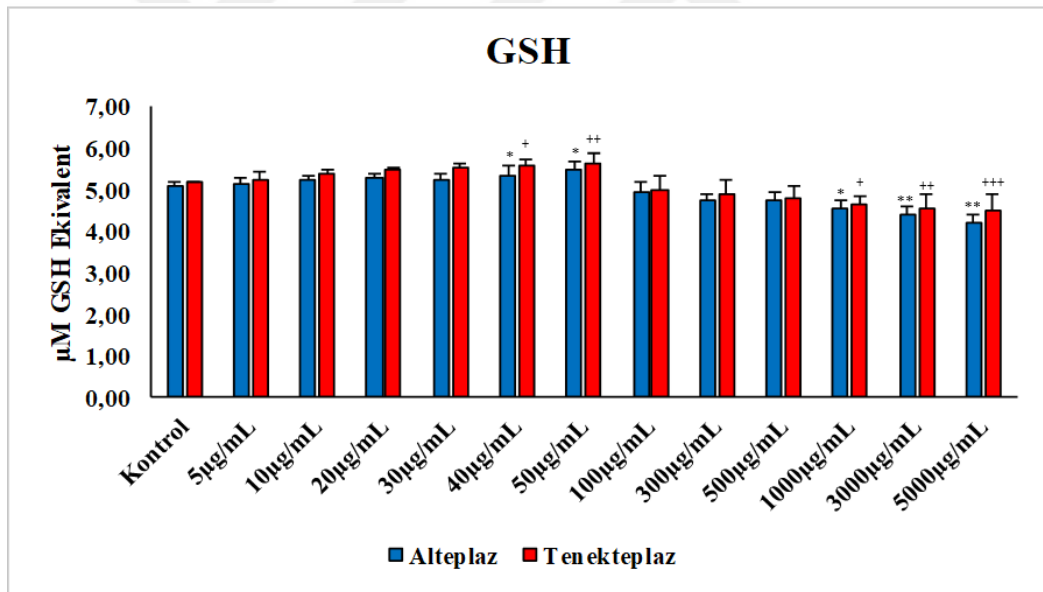


Şekil 3-8 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeyine etkisi.

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; Tenekteplaz için + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$ ile gösterilmiştir.

4.7 Hücre içi Glutatyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

Alteplaz ve Tenekteplazın farklı konsantrasyonları ARPE-19 hücre hattına uygulandıktan 24 saat sonra hücre içi glutatyon düzeyleri luminometrik olarak ölçülmüştür. 1000 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan Alteplaz ve Tenekteplazın ARPE-19 hücrelerinde glutatyon düzeyini kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil3-9). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen hücre içi GSH düzeyi ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır ($r = -0,812$, $p = 0.001$ Alteplaz için ve $r = -0,729$ $p = 0.005$ Tenekteplaz için). Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan GSH düzeyi ile ROS düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon tespit edilmiştir ($r = -0,970$, $p < 0.001$ Alteplaz için ve $r = -0,963$ $p < 0.001$ Tenekteplaz için).



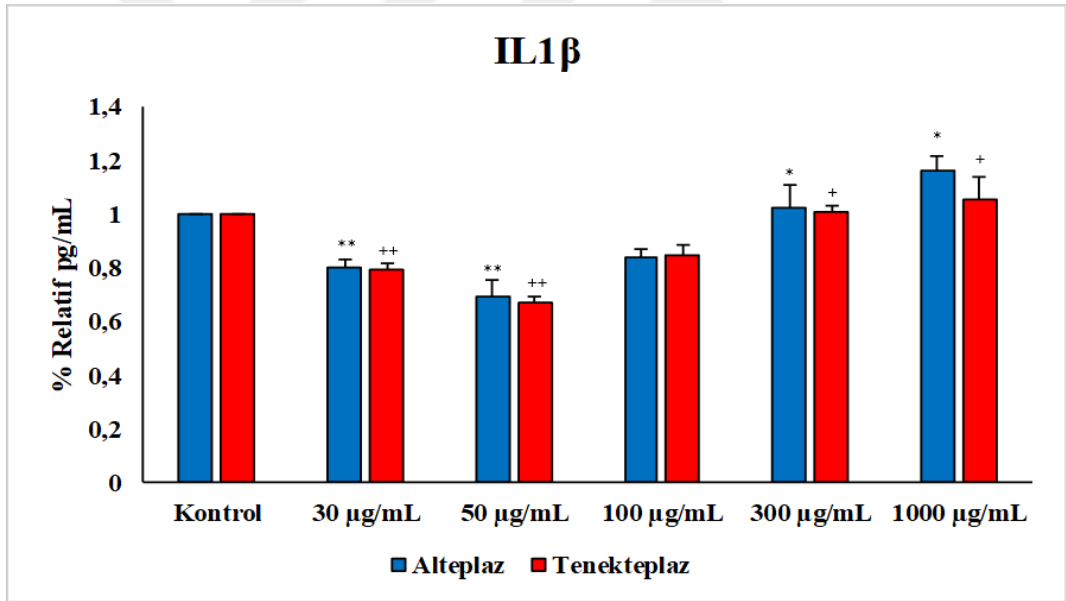
Şekil 3-9 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücrelerinde hücre içi glutatyon düzeyine etkisi.

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; Tenekteplaz için + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ ile gösterilmiştir.

4.8 İnflamasyonun Değerlendirilmesi

4.8.1 İnterlökin 1-beta (IL1-β) analizi

Alteplaz ve Tenekteplazın IC₅₀ dozlarının altındaki farklı konsantrasyonları ARPE-19 hücre hattına muamele edildikten 24 saat sonra IL1-β düzeyleri değerlendirilmiştir. Şekil x'de gösterildiği gibi 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan Alteplaz ve Tenekteplazın ARPE-19 hücrelerinde IL1-β düzeyini kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir (p < 0.05) (Şekil 3-10). ARPE-19 hücre hattında tespit edilen IL1-β düzeyi ile uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (r= 0,933, p=0.020 Alteplaz için ve r= 0,904 p=0.035 Tenekteplaz için).



Şekil 3-10 : Alteplaz ve Tenekteplaz farklı konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücrelerinde IL1-β düzeyine etkisi.

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark Alteplaz için * p < 0.05, ** p < 0.01 ***p < 0.001; Tenekteplaz için + p < 0.05, ++ p < 0.01, +++ p < 0.001 ile gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA:

Subretinal kanama; genç travma hastalarından, ilerleyici görme azalması seyri üzerinde ani bir görme azalması ile karşılaşan ileri yaş YBMD hastalarına kadar geniş bir klinik spektrumda görme keskinliğini ciddi şekilde tehdit eden bir patolojidir. Subretinal kanamanın en sık etyolojik nedenleri arasında neovasküler tip YBMD, PKV, RAP, travma, RAM ve yüksek miyopi yer almaktadır. Diğer nedenler ise olası oküler histoplazmozis sendromu, anjiyoid çatlaklar, göz içi tümörler ve skleral çökertme cerrahisi gibi bazı cerrahiler sonrası komplikasyon olarak görülen postoperatif kanamalar yer alır. Subretinal kanamanın fotoreseptörlere ve RPE'ye verdiği hasar; koroidden retinaya doğru sınırlı besin difüzyonu, fibrin ve demir gibi toksik maddelerin birikimi ve pıhtı kontraksiyonunun mekanik etkisi gibi birçok mekanizma ile gerçekleşmektedir [125]. Bu nedenle mümkün olan en kısa sürede kanamanın maküla altından uzaklaştırılması, merkezi görmenin en az hasarla kurtarılabilmesi için önem taşımaktadır. Günümüzde uygulanmakta olan tedavi yöntemlerinin birbirine üstünlüğü henüz kanıtlanamamış olduğu için, her olgunun kendi özellikleri göz önünde bulundurularak dikkatlice düşünülmüş bir tedavi planı belirlemek gerekmektedir. Çok sayıda çalışma, prognozu kötü olabilecek subretinal kanamalı hastaların artık nispeten güvenli cerrahi müdahalelerle etkili bir şekilde tedavi edilebileceğini göstermektedir. Günümüzde de orta dereceli veya geniş kanamalar için cerrahi uygulamalarda son trend, vitrektomi sonrası rtPA'nın subretinal/intravitreal enjeksiyonu ve ardından gaz tamponadının kombine uygulanması yönünde olmaktadır [95].

Rekombinant doku plazminojen aktivatörleri, fibrin varlığında plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederek fibrin pıhtısını parçalayan enzimlerdir. Rt-PA moleküllerinden alteplaz , miyokart enfarktüsü, iskemik inme ve pulmoner emboli tedavisinde tromboliz için FDA tarafından onaylanmıştır. Günümüzde alteplaz, off-label olarak oftalmolojide subretinal kanama tedavisinde fibrinoliz gerçekleştirmek için kullanılmaktadır [103]. Rekombinant tPA'nın intraoküler kullanım amacıyla ticari olarak hazırlanmasındaki en önemli sorunlardan biri, göz içi olarak kullanılabilen dozu

sınırlayan retina üzerindeki potansiyel toksisitesidir. Alteplazın ticari preparatının retina toksisitesinin esas olarak içindeki L-argininin nedeniyle olduğu düşünülmektedir [105]. Ancak, L-arginin bileşeni olmadan ticari alteplaz preparatları mevcut değildir. Tenekteplaz, miyokard enfarktüslerinin tedavisinde alteplaza avantaj sağlayan özellikleri nedeniyle geliştirilmiş üçüncü nesil bir trombolitiktir. Alteplazdan daha uzun plazma yarı ömrüne, daha yavaş plazma klerensine, daha yüksek fibrin özgülüğüne ve PAI-1 ile inaktivasyona 80 kat daha fazla dirence sahiptir. Tenekteplaz, daha yüksek fibrin özgülüğü ve trombüse nüfuz etme kabiliyeti nedeniyle, daha kısa bir pıhtı temas süresi gerektirir. Diğer bir önemli avantajı, eşdeğer alteplaz dozunun içerdiği L-arginin'i üçte birinden daha az içermesidir. Bu durum oftalmolojik uygulamalarda yarar sağlayabilir [8,9,11].

Subretinal kanamanın tedavisinde giderek yaygınlaşmakta olan rt-PA molekülleri fibrin pıhtısının çözünmesine etkili bir şekilde katkıda bulunsa da, retina hasarına neden olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle rt-PA moleküllerinin retina üzerindeki toksik etkilerini ve güvenli oftalmolojik kullanım dozlarını araştıran çalışmalar önem taşımaktadır. Alteplaz ve tenekteplaz molekülünün retina üzerindeki toksik etkileri hayvan deneyleri ve az sayıda vaka serileri ile sunulmuş olsa da bu konudaki *in vitro* çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatürde alteplaz ve tenekteplaz moleküllerinin retina hücreleri üzerinde sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini değerlendiren; aynı zamanda bu moleküllerin apoptozu indüklediği mekanizmaları araştıran *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda alteplaz ve tenekteplaz moleküllerinin ARPE-19 hücre hattındaki RPE hücrelerine sitotoksik etkileri, sitotoksik aktiviteyi en hassas gösteren test olan luminometrik ATP hücre canlılığı deneyi yaparak gösterilmiştir. Alteplaz ve tenekteplaz molekülleri RPE hücrelerinde doza bağlı sitotoksisiteyi arttırmıştır. Çalışmamızda alteplazın 50 µg/mL ve altındaki , tenekteplazın ise 100 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda 24. Saatte kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Literatürde intravitreal ve subretinal olarak uygulanan rt-PA moleküllerinin sitotoksik dozunun saptanması için yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar sunulmuştur. Jhonsan ve ark.'nın hayvan çalışmasında 25 µg/ 0.1 mL intravitreal rt-PA enjeksiyonu sonrası hiçbir tavşan gözünde toksisite bulgusunun olmadığını göstermiştir [126]. Aynı çalışmada 50 µg/ 0.1 mL rt-PA enjekte edilen dört gözden birinde, 75 µg/ 0.1 mL enjekte edilen dört gözden üçünde

ve 100 µg/0.1 mL enjekte edilen tüm gözlerde fotoreseptör hücrelerinin kaybolduğunu ışık mikroskopik inceleme ile tespit etmiştir. Hrach ve ark. 50 µg / 0.1 mL veya daha yüksek dozlarda intravitreal enjeksiyonlardan sonra tavşan gözlerinde ticari t-PA solüsyonunun doza bağlı retina toksisitesi gösterdiğini raporlamıştır. Aynı yazarın kedi gözlerine enjeksiyon uyguladığı diğer bir hayvan çalışmasında 50 µg tPA 3 gözden 1'inde, 75 µg uygulanan 3 gözden 2'sinde ve hem 100 hem de 200 µg uygulanan tüm gözlerde fundus pigment değişiklikleri olduğunu gösterilmiştir [105]. Enjeksiyondan 30 dakika sonra vitrektomi yapılmamış tavşan gözlerinde intravitreal tPA konsantrasyonlarının, daha uzak bölgelere kıyasla enjekte edilen kadranda yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca histopatolojik incelemeden elde edilen bulgular, oftalmoskopik anormallikleri olan tüm gözlerde fotoreseptör elemanlarının kaybı ve RPE hasarını göstermiştir. Bazı klinisyenler, daha büyük vitreus hacmi ve vaskülarize retinası nedeniyle insan gözünde daha yüksek toksik eşik olduğunu varsayarak, insanlarda daha yüksek intravitreal dozlar kullanmışlardır. Klinik çalışmalarda bildirilen güvenli dozlar 10 ila 100 µg / 0.1 ml arasında değişmektedir. Hesse ve ark. 100 µg ile tedavi edilen tüm hastalarda eksüdatif retina dekolmanı ve RPE hiprepigmentasyonu geliştiğini, 50 µg uygulanan hastalarda ise herhangi bir komplikasyon görülmediğini raporlamıştır [13]. Benzer şekilde Rowley ve ark. 50 µg / 0.1 ml'ye kadar artan dozlarda rt-PA uyguladığı hastalarda retinal toksisite gözlemlenmemiştir [9]. Chen ve ark.'nın vaka raporunda ise intravitreal 50 µg rtPA uygulanan hastada RPE değişiklikleri gözlemlendiği sunulmuştur [127]. Literatürde yer alan in vitro çalışmalar incelendiğinde rt-PA'nın RPE hücreLERİ üzerindeki sitotoksik etkilerini araştıran sadece bir çalışma mevcuttur. Kamao ve ark.'nın bu çalışmasında rt-PA(monteplaz) uygulanan ARPE-19 hücre hattında 24. Saatte 50 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenmiştir [128]. Bizim çalışmamızda da 50 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlardaki alteplazın, 100 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlarda tenekteplazın sitotoksisiteye neden olduğu saptanmıştır. TPA'nın retina toksisitesinin mekanizmaları tam olarak belirlenmemiş olmasına rağmen yazarlar, tPA proteininin kendisinden ziyade ticari olarak temin edilebilen çözeltilinin L-arginin içeriğinin toksik etki göztereabileceği hipotezini öne sürmüştür. L-argininin, retinotoksik potansiyeli bilinen bir amino asit olan lizine yapısal benzerliğinden dolayı dış retina üzerinde toksik etkilere sahip olabileceği raporlanmıştır [105]. Bizim çalışmamızda da 5000 µg/mL konsantrasyonunda uygulanan alteplazın tenekteplazdan daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği

saptanmıştır. Elde ettiğimiz veriler, tenekteplazın alteplaza göre daha az miktarda L-arginin içermesi nedeniyle daha az toksisiteye neden olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda değerlendirilen diğer bir parametre alteplaz ve tenekteplazın artan konsantrasyonlarının hücre içi ROS düzeyine etkisidir. Alteplaz ve tenekteplazın konsantrasyon bağımlı olarak hücre içi ROS üretimini arttırdığı ve bu artışın 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Alteplaz ve tenekteplazın uygulanan konsantrasyonları arttıkça hücre içi ROS üretiminin konsantrasyon bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Alteplaz ve tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında ARPE-19 hücre hattında saptanan hücre canlılığı ile ROS düzeyleri arasında negatif, DNA hasarı ve apoptoz ile ROS düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Reaktif oksijen türleri, hücrenin normal oksijen metabolizması tarafından sürekli üretilir ve normal fizyolojik koşullarda hücre içi ROS seviyesinin korunması redoks potansiyeli ve hücre proliferasyonu için önemlidir. Yüksek ROS seviyesi başta DNA olmak üzere lipitlere ve proteinlere hasar verebilir ve apoptotik kaskadı başlatabilir [129]. Hücre canlılığı ile hücre içi ROS düzeyi arasında güçlü negatif korelasyonun; apoptoz ve DNA hasarı ile ROS düzeyi arasında ise pozitif korelasyonların saptanması bize ARPE-19 hücrelerinin ölümünde rt-PA moleküllerinin artan dozları ile birlikte artan hücre içi ROS seviyelerinin etkili olabileceğini göstermektedir.

Apoptoz normal dokularda gelişimde ve homeostazda kritik rol oynayan farklı biyokimyasal ve genetik yolları olan çok sıkı programlanmış bir hücre ölümüdür. Merkezi sinir sisteminde tPA'nın, N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) yoluyla kalsiyum akışını indükleyerek ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK 1/2) aktivasyonuna neden olarak eksitotoksik nöronal ölüme neden olduğu gösterilmiştir [130,131]. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda tPA, NMDAR'ı plazminojenden bağımsız bir mekanizma yoluyla aktive edebilir ve nöronları eksitotoksisiteden koruyan ERK 1/2-CREB-Atf3 yolunu açabileceği raporlanmıştır [132,133]. Bu bilgiler ışığında konsantrasyona bağlı olarak rtPA'nın, pro- veya antiapoptotik özellik gösterebildiği ortaya konulmuştur. Çalışmamızdaki sonuçlara baktığımızda akridin turuncusu/etidyum bromür boyasıyla floresans mikroskopta değerlendirilen apoptotik hücre oranı doza bağımlı olarak arttığı diğer bir ifadeyle proapoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda 100 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda alteplazın, 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise

tenekteplazın kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında apoptozu arttırdığı saptanmıştır. Elde ettiğimiz diğer veri ise 100 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda alteplazın tenekteplaza göre apoptozu daha fazla indüklediğidir.

Çalışmamızda apoptozu indükleyen mekanizmaları araştırmak için MMP ve hücre içi Ca^{2+} seviyeleri değerlendirilmiştir. Mitokondriyal disfonksiyonun apoptozu indüklediği ve apoptotik yolağın merkezi olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda alteplaz ve tenekteplazın doza bağımlı bir şekilde ARPE-19 hücrelerinde MMP'de önemli ölçüde azalma meydana getirdiği saptanmıştır. Alteplaz ve tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan MMP düzeyi ile ROS düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. MMP, Krebs döngüsünün aktivitesiyle ilişkili redoks dönüşümlerinden kaynaklanır ve ATP sentazın ATP'yi üretmek için kullandığı bir ara enerji depolama biçimi olarak çalışır. Bu dönüşümler yalnızca elektriksel bir potansiyel değil aynı zamanda bir proton gradienti oluşturur ve birlikte hidrojen iyonlarının transmembran potansiyelini oluştururlar. Sağlıklı hücreler için hücre içi ATP ve MMP seviyeleri hücrenin metabolizma faaliyeti için belirli bir seviyede tutulmalıdır. MMP'deki değişikliklerin uzun süreli olmasının, hücre canlılığını tehlikeye sokarak patolojik sonuçlara yol açabileceği öne sürülmektedir [134]. MMP kaybı, membran geçirgenliğine yol açarak proapoptotik proteinlerin mitokondri iç membranına geçip apoptozu indüklemesine neden olur. Çalışmamızda elde edilen veriler rt-PA'ların artan konsantrasyonlarda MMP kaybına neden olarak apoptozu indüklediğini desteklenmektedir.

Hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) homeostazı bir çok hücrel fonksiyonu kontrol eden sinyal mekanizmalarından biridir. Çalışmamızda 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan Alteplaz ve Tenekteplazın ARPE-19 hücrelerinde hücre içi Ca^{2+} düzeyini kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığını tespit edilmiştir. Uygulanan alteplaz ve tenekteplaz konsantrasyonu arttıkça doza bağımlı olarak hücre içi Ca^{2+} düzeyinin arttığı saptanmıştır. Alteplaz ve Tenekteplaz artan konsantrasyonlarda uygulandığında, ARPE-19 hücre hattında saptanan Ca^{2+} düzeyi ile apoptoz arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir. L-argininin retina toksisitesinin hücrelerdeki nitrik oksidi (NO) artırdığı bildirilmiştir [135]. NO, siklik guanozin monofosfat (siklik-GMP) üretmek için retinanın fotoreseptör tabakasındaki guanilat

siklazı aktive eder [136]. Artan siklik-GMP, katyon kanallarının açılmasını sağlayarak Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının hücre içine girmesine neden olmaktadır. Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları, hücre zarından veya özel iyon kanalları yoluyla endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} iyonlarına bağlıdır ve değişimlere karşı hassastır. Hücrelerde artan Ca^{2+} konsantrasyonlarının proapoptotik mekanizmaları tetiklediği bilinmektedir [137,138]. Daruich ve ark. 200 $\mu\text{g} / 0,1 \text{ ml}$ uygulanan rt-PA'nın benzer mekanizmalar üzerinden hücre içi Ca^{2+} iyonlarını artırarak retina gangliyon hücrelerinde toksisiteye neden olduğunu göstermiştir [139]. Kumada ve ark. tPA'nın NMDA ile indüklenen retina hücre hasarını kolaylaştırdığını bildirmiştir. Çalışmanın sonucunda tPA'nın NMDA ile indüklenen retina hücre hasarını kolaylaştırdığını, ancak tPA'nın NMDA tarafından indüklenen retinal hücre hasarını teşvik ettiği mekanizmaların belirsizliğini koruduğunu vurgulamıştır [140]. NMDA'nın nöronal hasarı, NMDA reseptörü yoluyla kalsiyum girişinden kaynaklanır ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının yükselmesi, kalsiyum bağımlı proteazı aktive ederek nöronal ölüme yol açtığı bilinmektedir [141]. Bu çalışmalar ışığında bizim çalışmamızda rt-PA'ların farklı mekanizmalar üzerinden hücre içi Ca^{2+} iyonlarını artırarak ARPE-19 hücrelerinde apoptozu ve hücre ölümünü tetiklediği düşünülmektedir.

Çalışmamızda alteplazı ve tenekteplazın genotoksik aktivitesini alkali tek hücre elektroforezi ile değerlendirmek için IC_{50} altındaki dozlarını ARPE-19 hücrelerine 24 saat muamele ettik. Genotoksisiteyi yani DNA Hasarını değerlendirmek için comet assay metodu en önemli yöntemlerden biridir. Çalışmamızda 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan alteplazın; 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan tenekteplazın DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda alteplazın neden olduğu DNA hasarının tenekteplaza göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. DNA hasarının artan rt-PA konsantrasyonları ile pozitif korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur. Ayrıca artan ROS seviyeleri ile DNA hasarının pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu veriler artan ROS düzeylerinin DNA hasarını indüklediğini desteklemektedir.

Hücre içi GSH düzeyi hücreki anti-oksidan savunmada serbest radikallere karşı merkezi bir rol oynar ve mitokondri içinde aşırı hücre içi ROS üretimine karşı önemli bir savunmadır. GSH bir antioksidan molekül olarak hücreleri ROS'a karşı koruduğundan hücrel hemostaz için önemli bir göstergedir [142]. Bu bağlamda

hücre döngüsünün ilerlemesi ve apoptozun düzenlenmesi için çok önemli olduğu gösterilen hücre içi GSH düzeylerini değerlendirmek önem taşımaktadır. GSH'nin çeşitli dokularda oksidatif strese karşı ilk savunma hattı olduğu bilindiğinden, retina hücrelerinde rt-PA moleküllerinin neden olduğu artmış ve azalmış hücre içi GSH düzeylerinin etkilerini araştırdık. Çalışmamızda 1000 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan alteplaz ve tenekteplazın ARPE-19 hücrelerinde GSH düzeyini kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda artan hücre içi ROS seviyeleri ile GSH seviyeleri arasında güçlü negatif korelasyon saptanmıştır. Elde ettiğimiz veriler azalan GSH miktarı ve artan ROS düzeylerinin göstermiş olduğu ters sinerjik etki hücrenin sitotoksitesini, genotoksitesini ve apoptozunu arttırdığını desteklemektedir.

TPA genel olarak serin proteaz ailesine ait güçlü bir proteaz olarak kabul edilse de, artan kanıtlar tPA'nın ayrıca çeşitli fizyolojik ve patolojik ortamlarda proteolitik aktivitesinden ayrı olan çeşitli işlevlere sahip olduğunu göstermektedir. TPA'nın birçok hastalık modelinde enflamasyon modülasyonunda geniş bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [143]. IL-1, bilinen bir pro-enflamatuar sitokindir. IL-1'in iki formu vardır: IL-1 α ve IL-1 β . Bu moleküller benzer biyolojik aktivitelere sahiptir ve çeşitli hücrelerde ifade edilen aynı reseptörleri kullanır [144]. Çalışmamızda rt-PA moleküllerinin inflammatuar etkilerini değerlendirmek için IL-1 β düzeyi ölçülmüştür. Alteplaz ve tenekteplazın 300 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda IL-1 β seviyesini anlamlı şekilde arttırdığı tespit edilmiştir.

Kamao ve ark.'nın rt-PA moleküllerinden monteplazın toksistesinin değerlendirildiği çalışmasında monteplaz uygulanan ARPE-19 hücre hattında hücre hasarı oranları 1. günde önemli ölçüde artarken, 7. ve 28. günlerde ARPE-19 hücreleri ve kontrol arasında önemli bir fark saptanmamıştır [128]. Çalışmamızda alteplaz ve tenekteplaz molekülü ARPE-19 hücre hattına 24 saat muamele edildikten sonra deneyler yapılmıştır. Alteplaz ve tenekteplaz moleküllerinin konsantrasyon bağlı sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini değerlendirmenin yanı sıra aynı etkilerin zamana bağımlı olarak değerlendirilmemiş olması çalışmamızın potansiyel sınırlamalarından biridir. Göz önünde bulundurulması gereken diğer durum subretinal kanamalı hastaların RPE'sinin kan bileşenlerinden veya dış basınçtan etkilendiğidir. Bu koşullar, hücre işlevini ve hücre ölümünü olumsuz etkileyebilir ve hasta RPE'si, rt-PA'dan daha da fazla etkilenebilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer önemli veri, alteplazın yüksek konsantrasyonlarda tenekteplaza göre sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin daha fazla olduğudur. Bu duruma alteplazın içerdiği L-arginin molekülünün neden olabileceği tartışılmıştır. Gelecekte rt-PA molekülleri ile yapılan toksisite çalışmalarında L-arginin uygulanan hücre grubu kolunun da yer aldığı çalışmalar ile bu hipotezin desteklenmesi faydalı olacaktır.



6. SONUÇ

Subretinal kanamanın tedavisinde kullanımı yaygınlaşmakta olan rt-PA molekülleri fibrin pıhtısının çözünmesine etkili bir şekilde katkıda bulunsa da, retina hasarına neden olabileceği çok sayıda araştırmada gösterilmiştir. Bu nedenle rtPA moleküllerinin retina üzerindeki toksik etkilerini ve güvenli oftalmolojik kullanım dozlarını araştıran çalışmalar önem taşımaktadır.

Çalışmamız, alteplaz ve tenekteplaz moleküllerinin RPE hücrelerinde apoptotik yolu indükleyen MMP azalması ve Ca^{2+} artışı ile sitotoksikite ve DNA hasarını indükleyen hücre içi ROS düzeyinin artışı ve GSH düzeyinin azalmasını bir arada göstermesi nedeniyle literatüre ışık tutmuştur. Ayrıca çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda uygulanan alteplazın tenekteplaza göre sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, rt-PA moleküllerinden tenekteplazın klinik kullanımda daha güvenli olabileceğine işaret etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Berrocal MH, Lewis ML, Flynn HW, Jr. Variations in the clinical course of submacular hemorrhage. *Am J Ophthalmol.* 1996;122(4):486-93.
2. Malik FF, Poulaki V. Management of submacular hemorrhage. *Int Ophthalmol Clin.* 2014;54(2):51-9.
3. Hochman MA, Seery CM, Zarbin MA. Pathophysiology and management of subretinal hemorrhage. *Surv Ophthalmol.* 1997;42(3):195-213.
4. Glatt H, Machemer R. Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *Am J Ophthalmol.* 1982;94(6):762-73.
5. Toth CA, Morse LS, Hjelmeland LM, Landers MB, 3rd. Fibrin directs early retinal damage after experimental subretinal hemorrhage. *Arch Ophthalmol.* 1991;109(5):723-9.
6. Viestenz A. [Rupture of the choroid after eyeball contusion--an analysis based on the Erlangen Ocular Contusion Registry (EOCR)]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2004;221(8):713-9.
7. Chester KW, Corrigan M, Schoeffler JM, Shah M, Toy F, Purdon B, et al. Making a case for the right '-ase' in acute ischemic stroke: alteplase, tenecteplase, and reteplase. *Expert Opin Drug Saf.* 2019;18(2):87-96.
8. Kwan AS, Vijayasekaran S, McAllister IL, Yu PK, Yu DY. A study of retinal penetration of intravitreal tenecteplase in pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(6):2662-7.
9. Rowley SA, Vijayasekaran S, Yu PK, McAllister IL, Yu DY. Retinal toxicity of intravitreal tenecteplase in the rabbit. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(4):573-8.
10. Davydov L, Cheng JW. Tenecteplase: a review. *Clin Ther.* 2001;23(7):982-97; discussion 1
11. McAllister IL, Chen SD, Patel JI, Fleming BL, Yu DY. Management of submacular haemorrhage in age-related macular degeneration with intravitreal tenecteplase. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(2):260-1
12. Lewis H, Resnick SC, Flannery JG, Straatsma BR. Tissue plasminogen activator treatment of experimental subretinal hemorrhage. *Am J Ophthalmol.* 1991;111(2):197-204.
13. Hesse L, Schmidt J, Kroll P. Management of acute submacular hemorrhage using recombinant tissue plasminogen activator and gas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999;37(4):273-7.
14. Yannuzzi LA. *The Retinal Atlas.* Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 1-6.
15. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. *Histology of the human eye: an atlas and textbook.* Philadelphia: Saunders; 1971. p. 508-19., Schubert HD. Structure of the Neural Retina. In: Yanoff M, Duker JS, editors. *Ophthalmology.* Philadelphia: Elsevier; 2014. p. 419-22.
16. Schubert HD. Structure of the Neural Retina. In: Yanoff M, Duker JS, editors. *Ophthalmology.* Philadelphia: Elsevier; 2014. p. 419-22
17. Kanski JJ, Bowling B. *Clinical ophthalmology: a systematic approach:* Elsevier Health Sciences; 2011.

18. Masland, R.H., The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 2012. 76(2): p. 266-
19. Morgan J, Wong R. Development of Cell Types and Synaptic Connections in the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center
20. Özdemir H., Arf S., Karaçorlu M. *Makula Hastalıklarında Optik Kohorens Tomografi* 2015
21. Fain, G. and A.P. Sampath, Rod and cone interactions in the retina. *F1000Res*, 2018.
22. Chen J and Sampath AP. Structure and Function of Rod and Cone Photoreceptors. In *Ryan's Retina*. 6th Edition. Editors Schachat AP, Wilkinson CP, Hinton DR, et al. Elsevier. 2018
23. Weber, A., et al., Relationship between foveal birefringence and visual acuity in neovascular age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*, 2007. 21(3): p. 353-61.
24. Leslie P. Gartner PhD *Textbook of Histology*, Fifth Edition 6.chapter.
25. Gelman, R., et al., Retinal Damage Induced by Internal Limiting Membrane Removal. *J Ophthalmol*, 2015. 2015: p. 939748.
26. Semeraro, F., et al., Current Trends about Inner Limiting Membrane Peeling in Surgery for Epiretinal Membranes. *J Ophthalmol*, 2015. 2015: p. 671905.
27. Chawla, R., et al., Internal limiting membrane: The innermost retinal barrier. *Med Hypotheses*, 2017. 98: p. 60-62.
28. Bringmann, A., et al., Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*, 2006. 25(4): p. 397-424.
29. Bringmann, A. and P. Wiedemann, Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*, 2012. 227(1): p. 1-19.
30. Wolter, J.R., Glia of the human retina. *Am J Ophthalmol*, 1959. 48(5)Pt 2: p. 370-93.
31. Rossi, D., Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol*, 2015. 130: p. 86-120.
32. Telegina, D.V., O.S. Kozhevnikova, and N.G. Kolosova, Changes in Retinal Glial Cells with Age and during Development of Age-Related Macular Degeneration. *Biochemistry (Mosc)*, 2018. 83(9): p. 1009-1017.
33. Del Priore, L.V., Y.H. Kuo, and T.H. Tezel, Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. 43(10): p. 3312-8.
34. Ben-Shabat, S., et al., Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of retinal pigment epithelial lipofuscin. *J Biol Chem*, 2002. 277(9): p. 7183-90. Winkler, B.S., An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: renewal as a surrogate antioxidant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(8): p. 3259-61.
35. Winkler, B.S., An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: renewal as a surrogate antioxidant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(8): p. 3259-61.
36. Young, R.W., Visual cells and the concept of renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1976. 15(9): p. 700-25.
37. Weiter, J.J., et al., Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986. 27(2): p. 145-52. Cunha-

- Vaz, J., R. Bernardes, and C. Lobo, Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*, 2011. 21 Suppl 6: p. S3-9.
38. Cunha-Vaz, J., R. Bernardes, and C. Lobo, Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*, 2011. 21 Suppl 6: p. S3-9.
 39. Naylor, A., et al., Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. *Int J Mol Sci*, 2019. 21(1).
 40. Hamann, S., et al., Cotransport of H⁺, lactate, and H₂O in porcine retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 2003. 76(4): p. 493-504.
 41. Stamer, W.D., et al., Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. 44(6): p. 2803-8.
 42. Miller, S.S., R.H. Steinberg, and B. Oakley, 2nd, The electrogenic sodium pump of the frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol*, 1978. 44(3-4): p. 259-79.
 43. Rizzolo, L.J., Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol*, 2007. 258: p. 195-234.
 44. Kusakabe, T.G., et al., Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009. 364(1531): p. 2897-910.
 45. Saari, J.C., et al., Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron*, 2001. 29(3): p. 739-48.
 46. Winkler, B.S., et al., Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 1999. 5: p. 32.
 47. Miceli, M.V., M.R. Liles, and D.A. Newsome, Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res*, 1994. 214(1): p. 242-9.
 48. Cai, J., et al., Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res*, 2000. 19(2): p. 205-21.
 49. Nguyen, T., P.J. Sherratt, and C.B. Pickett, Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. 43: p. 233-60.
 50. Newsome, D.A., et al., Antioxidants in the retinal pigment epithelium. *Progress in retinal and eye research*, 1994. 13(1): p. 101-123.
 51. Medawar, P.B., Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, 1948. 29(1): p. 58-69.
 52. Masli, S. and J.L. Vega, Ocular immune privilege sites. *Methods Mol Biol*, 2011. 677: p. 449-58.
 53. Blaauwgeers, H.G., et al., Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol*, 1999. 155(2): p. 421-8.
 54. Sonoda, S., et al., Attainment of polarity promotes growth factor secretion by retinal pigment epithelial cells: relevance to age-related macular degeneration. *Aging (Albany NY)*, 2009. 2(1): p. 28-42.
 55. Ramrattan, R.S., et al., Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. 35(6): p. 2857-64.
 56. Nickla, D.L. and J. Wallman, The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res*, 2010. 29(2): p. 144-68.

57. Hogan, M.J., Ultrastructure of the choroid. Its role in the pathogenesis of chorioretinal disease. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet*, 1961. 42: p. Booij, J.C., et al., The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*, 2010. 29(1): p. 1-18.
58. Booij, J.C., et al., The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*, 2010. 29(1): p. 1-18.
59. Krebs, W. and I.P. Krebs, Ultrastructural evidence for lymphatic capillaries in the primate choroid. *Arch Ophthalmol*, 1988. 106(11): p. 1615-6.
60. Li, X.Q., et al., Enhanced-Depth Imaging Optical Coherence Tomography of the Human Choroid In Vivo Compared With Histology After Enucleation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016. 57(9): p. Oct371-6.
61. Borrelli, E., et al., OCT angiography and evaluation of the choroid and choroidal vascular disorders. *Prog Retin Eye Res*, 2018. 67: p. 30-55.
62. Snell RS, Lemp MA. *Clinical anatomy of the eye. The orbital blood vessels*. 2nd Edition. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 1998:277-89. (Schubert HD. *Structure and function of neural retina*. In: Yanoff M, Duker JS (Editors). *Ophthalmology*. Mosby, 2009:511-4.
63. de Smet, M.D., A.M. Gad Elkareem, and A.H. Zwinderman, The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease. *Ophthalmologica*, 2013. 230(4): p. 165-78.
64. Kishi, S., Vitreous anatomy and the vitreomacular correlation. *Jpn J Ophthalmol* 2016. 60(4): p. 239-73.
65. Wong, W.L., et al., Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 2014. 2(2): p. e106-16.
66. Chakravarthy, U., et al., Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol*, 2010. 10: p. 31.
67. Zarbin, M.A., Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 2004. 122(4): p. 598-614.
68. Klein, R., et al., The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*, 1997. 104(1): p. 7-21.
69. Poliner, L.S., et al., Natural history of retinal pigment epithelial detachments in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 1986. 93(5): p. 543-51.
70. Kuhli-Hattenbach, C., et al., Subretinal hemorrhages associated with age-related macular degeneration in patients receiving anticoagulation or antiplatelet therapy. *Am J Ophthalmol*, 2010. 149(2): p. 316-321.e1.
71. Goverdhan, S.V. and J. Lochhead, Submacular haemorrhages after intravitreal bevacizumab for large occult choroidal neovascularisation in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 2008. 92(2): p. 210-2.
72. Chaudhry, N.A., et al., Large submacular hemorrhage following PDT with verteporfin in patients with occult CNVM secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2007. 38(1): p. 64-8.
73. Solomon, S.D., et al., Incident choroidal neovascularization in fellow eyes of patients with unilateral subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: SST report No. 20 from the Submacular Surgery Trials Research Group. *Arch Ophthalmol*, 2007. 125(10): p. 1323-30.
74. Wong, R.L. and T.Y. Lai, Polypoidal choroidal vasculopathy: an update on therapeutic approaches. *J Ophthalmic Vis Res*, 2013. 8(4): p. 359-71.

75. Cho, J.H., et al., Incidence Rate of Massive Submacular Hemorrhage and its Risk Factors in Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Am J Ophthalmol*, 2016. 169: p. 79- 88.
76. Uyama, M., et al., Polypoidal choroidal vasculopathy: natural history. *Am J Ophthalmol*, 2002. 133(5): p. 639-48.
77. Chang, L., et al., Myopia-related fundus changes in Singapore adults with high myopia. *Am J Ophthalmol*, 2013. 155(6): p. 991-999.e1.
78. Cohen, S.Y., et al., Etiology of choroidal neovascularization in young patients. *Ophthalmology*, 1996. 103(8): p. 1241-4.
79. Wong, T.Y., et al., Epidemiology and disease burden of pathologic myopia and myopic choroidal neovascularization: an evidence-based systematic review. *Am J Ophthalmol*, 2014. 157(1): p. 9-25.e12.
80. Asai, T., Y. Ikuno, and K. Nishida, Macular microstructures and prognostic factors in myopic subretinal hemorrhages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014. 55(1): p. 226-32.
81. Imamura, Y., et al., Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in central serous chorioretinopathy. *Retina*, 2009. 29(10): p. 1469-73.
82. Rabb, M.F., D.A. Gagliano, and M.P. Teske, Retinal arterial macroaneurysms. *Surv Ophthalmol*, 1988. 33(2): p. 73-96.
83. Abdel-Khalek, M.N. and J. Richardson, Retinal macroaneurysm: natural history and guidelines for treatment. *Br J Ophthalmol*, 1986. 70(1): p. 11.
84. Adamczyk, D.T., G.E. Olivares, and G.T. Petito, Retinal arterial macroaneurysm: a longitudinal case study. *J Am Optom Assoc*, 1989. 60(11): p. 840-5.
85. Lavin, M.J., et al., Retinal arterial macroaneurysms: a retrospective study of 40 patients. *Br J Ophthalmol*, 1987. 71(11): p. 817-25.
86. Panton, R.W., M.F. Goldberg, and M.D. Farber, Retinal arterial macroaneurysms: risk factors and natural history. *Br J Ophthalmol*, 1990. 74(10): p. 595-600.
87. Speilburg, A.M. and S.A. Klemencic, Ruptured retinal arterial macroaneurysm: diagnosis and management. *J Optom*, 2014. 7(3): p. 137. Tonotsuka, T., et al., Visual prognosis for symptomatic retinal arterial macroaneurysm. *Jpn J Ophthalmol*, 2003. 47(5): p. 498-502.
88. Tonotsuka, T., et al., Visual prognosis for symptomatic retinal arterial macroaneurysm. *Jpn J Ophthalmol*, 2003. 47(5): p. 498-502.
89. Murthy, K., P. Puri, and J.F. Talbot, Retinal macroaneurysm with macular hole and subretinal neovascular membrane. *Eye (Lond)*, 2005. 19(4): p. 488-9.
90. Cheung CM, Bhargava M, Xiang L, et al. Six-month visual prognosis in eyes with submacular hemorrhage secondary to age-related macular degeneration or polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251:19–25.
91. Ueda-Arakawa N, Tsujikawa A, Yamashiro K, et al. Visual prognosis of eyes with submacular hemorrhage associated with exudative age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol*. 2012;56:589–598.
92. Bennett SR, Folk JC, Blodi CF, Klugman M. Factors prognostic of visual outcome in patients with subretinal hemorrhage. *Am J Ophthalmol*. 1990;109(1):33-7.
93. Scupola A, Coscas G, Soubrane G, Balestrazzi E. Natural history of macular subretinal hemorrhage in age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. 1999;213(2):97-102.
94. Steel, D.H. and Sandhu, S.S. Submacular haemorrhages associated with neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95: 1051–1057.

95. Van Zeeburg EJ, van Meurs JC. Literature review of recombinant tissue plasminogen activator used for recent-onset submacular hemorrhage displacement in age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. 2013;229:1–14.
96. Rinder HM. Hemostasis and coagulation. *Clin Lab Med*. 2009;29(2):xi.
97. Stassen, J.M., J. Arnout, and H. Deckmyn, The hemostatic system. *Curr Med Chem*, 2004. 11(17): p. 2245-60.
98. Collen, D. and H.R. Lijnen, The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(8): p. 1151-5.
99. Longstaff, C., et al., The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood*, 2011. 117(2): p. 661-8.
100. Sappino, A.P., et al., Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest*, 1993. 92(2): p. 679-85.
101. Gebbink MF. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:174-81.
102. Chester KW, Corrigan M, Schoeffler JM, Shah M, Toy F, Purdon B, et al. Making a case for the right '-ase' in acute ischemic stroke: alteplase, tenecteplase, and reteplase. *Expert Opin Drug Saf*. 2019;18(2):87-96.
103. Lewis H. Intraoperative fibrinolysis of submacular hemorrhage with tissue plasminogen activator and surgical drainage. *Am J Ophthalmol*. 1994;118(5):559-68.
104. Yaşar A, Bier A, Turhan H, Şaşmaz H. Çalışmalar Kılavuzluğunda Üçüncü Kuşak Trombolitik Ajanlar. *Türk Kardiyol Dem Arş* 2004; 32 : 564-570
105. Hrach CJ, Johnson MW, Hassan AS, Lei B, Sieving PA, Elner VM. Retinal toxicity of commercial intravitreal tissue plasminogen activator solution in cat eyes. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(5):659-63.
106. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235-63.
107. Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*. 2018;33(1):1-7.
108. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
109. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):5-17.
110. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861-74.
111. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
112. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305-8.
113. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo j*. 1995;14(22):5579-88.
114. Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep*. 2018;45(5):1469-78.
115. Meyer M, Essack M, Kanyanda S, Rees J. A low-cost flow cytometric assay for the detection and quantification of apoptosis using an anionic halogenated fluorescein dye. *Biotechniques*. 2008;45(3):317-20.

116. Teodoro JS, Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. *Methods Mol Biol.* 2018;1782:109-19.
117. Kocyigit A, Guler EM, Karatas E, Caglar H, Bulut H. Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018;829:50-60.
118. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1993;160(1):81-8.
119. Kocyigit, A., Guler, E. M., Haznedaroglu, I. C., & Malkan, U. Y. (2017). Ankaferd hemostat induces DNA damage, apoptosis and cytotoxic activity by generating reactive oxygen species in melanoma and normal cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(2), pp. 2116-2126.
120. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res.* 1990;237(3-4):123-30.
121. Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzell, E., & Green, D. R. (2006). Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(3), p. prot4493.
122. Rottenberg H, Wu S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1404(3):393-404.
123. Günes-Bayir, A., Kiziltan, H. S., Kocyigit, A., Güler, E. M., Karataş, E., & Toprak, A. (2017). Effects of natural phenolic compound carvacrol on the human gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro. *Anti-cancer drugs*, 28(5), pp. 522-530.
124. Untario, N., Dewi, T. C., Widodo, M. A., & Rahaju, P. (2017). Effect of Tetrodotoxin from Crude Puffer Fish (*Tetraodon fluviatilis*) Liver Extract on Intracellular Calcium Level and Apoptosis of HeLa Cell Culture. *Journal of Tropical Life Science*, 7(1), 23-29.
125. Kim, L.A. and D. Elliott, Management of Submacular Hemorrhage in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*, 2018. 2(3): p. 177-179.
126. Johnson MW, Olsen KR, Hernandez E, Irvine WD, Johnson RN. Retinal toxicity of recombinant tissue plasminogen activator in the rabbit. *Arch Ophthalmol.* 1990;108(2):259-63.
127. Chen SN, Yang TC, Ho CL, Kuo YH, Yip Y, Chao AN. Retinal toxicity of intravitreal tissue plasminogen activator: case report and literature review. *Ophthalmology.* 2003;110(4):704-8.
128. Kamao H, Miki A, Kiryu J. Evaluation of Retinal Pigment Epithelial Cell Cytotoxicity of Recombinant Tissue Plasminogen Activator Using Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *J Ophthalmol.* 2019;2019:7189241.
129. Liao YJ, Bai HY, Li ZH, Zou J, Chen JW, Zheng F, et al. Longikaurin A, a natural ent-kaurane, induces G2/M phase arrest via downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):e1137.
130. Tsirka, S.E., et al., Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature*, 1995. 377(6547): p. 340-4.
131. Nicole, O., et al., The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med*, 2001. 7(1): p. 59-64.

132. Wu, F., et al., Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci*, 2013. 52: p. 9-19.
133. Haile, W.B., et al., Tissue-type plasminogen activator has a neuroprotective effect in the ischemic brain mediated by neuronal TNF- α . *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. 32(1): p. 57-69.
134. Zamzami, N., et al., Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*, 1995. 182(2): p. 367-77.
135. Oh, H.S., et al., Retinal toxicity of commercial tissue plasminogen activator is mediated by the induction of nitric oxide in the mouse retinal primary cells. *Curr Eye Res*, 2005. 30(4): p. 291-7.
136. Moncada, S. and R.M. Palmer, Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol*, 1991. 15(1): p. 16-9.
137. Rohrer, B., et al., Multidestructive pathways triggered in photoreceptor cell death of the rd mouse as determined through gene expression profiling. *J Biol Chem*, 2004. 279(40): p. 41903-10.
138. Berridge, M.J., Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium*, 2006. 40(5-6): p. 405-12.
139. Hajnóczky, G. and G. Csordás, Calcium signalling: fishing out molecules of mitochondrial calcium transport. *Curr Biol*, 2010. 20(20): p. R888-91.
140. Kumada, M., et al., Endogenous tissue type plasminogen activator facilitates NMDA-induced retinal damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004. 200(1): p. 48-53.
141. Hahn, J.S., E. Aizenman, and S.A. Lipton, Central mammalian neurons normally resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular Ca²⁺: toxicity is blocked by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(17): p. 6556-60.
142. Traverso, N., et al., Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. 2013: p. 972913.
143. Lin L, Hu K. Tissue plasminogen activator and inflammation: from phenotype to signaling mechanisms. *Am J Clin Exp Immunol*. 2014;3(1):30-6.
144. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:21-9.

