



**T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı**

**OKSİJEN ENDÜKTE RETİNOPATİ İN VİVO FARE MODELİNDE  
İNTRAVİTREAL VE İNTRAPERİTONEAL APİGENİN  
ENJEKSİYONUNUN RETİNAL ENDOTELYAL HÜCRE  
PROLİFERASYONUNA, RETİNA MORFOLOJİSİNE VE  
APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. ALMİLA SARIGÜL SEZENÖZ**

**ANKARA, 2017**



**T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı**

**OKSİJEN ENDÜKTE RETİNOPATİ İN VİVO FARE MODELİNDE  
İNTRAVİTREAL VE İNTRAPERİTONEAL APİGENİN  
ENJEKSİYONUNUN RETİNAL ENDOTELYAL HÜCRE  
PROLİFERASYONUNA, RETİNA MORFOLOJİSİNE VE  
APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. ALMİLA SARIGÜL SEZENÖZ**

**Tez Danışmanı: PROF. DR. İMREN AKKOYUN**

**ANKARA, 2017**

Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: DA15/19.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, eğitimime büyük katkıları olan, tezimin planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması aşamalarında değerli bilgi, emek ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. İmren Akkoyun'a çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimi yapmaktan büyük gurur duyduğum Başkent Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, klinik ve cerrahi tecrübelerini esirgemediğim paylaştığım, mesleki eğitimime büyük katkıları olan, mesleki ve insani olarak çok şey öğrendiğim Anabilim Dalı Başkanımız, değerli hocam sayın Prof. Dr. Gürsel Yılmaz ve saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Sibel Oto, Prof. Dr. Ahmet Akman, Prof. Dr. Dilek Dursun Altınörs, Prof. Dr. Yonca Özkan Arat, Yard. Doç. Dr. Sezin Akça Bayar, Yard. Doç. Dr. Sirel Gür Güngör ve Yard. Doç. Dr. Leyla Asena'ya; Konya Başkent Hastanesi'nde eğitimimize destek veren hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Saygıdeğer hocalarımdan eğitimim süresince verdikleri tüm emekleri için minnettarım.

Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nihan Haberal, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Attila Dağdeviren, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Gör. Dr. Fatma Helvacıoğlu'na; Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden Vet. Dr. Didem Bacanlı'ya tezime verdikleri destek için teşekkür ederim. Araştırma laboratuvarı teknisyenleri sayın Adem Kurtcuoğlu ve Sezai Kölcük'e deneyler sürecindeki sabırlı desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince çok şey paylaştığım değerli dostlarım Uzm. Dr. Ali Küçüködük ve Uzm. Dr. Mustafa Aksoy'a, birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve tüm klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında karşılıksız sevgi ve desteğini esirgemeyen değerli annem, babam ve kardeşime; hayatı paylaştığım sevgili eşim Burak Sezenöz'e, anlayışları ve sonsuz destekleri için çok teşekkür ederim.

Dr. Almıla Sarıgül Sezenöz  
Şubat 2017, Ankara

## ÖZET

Çalışmamızın amacı, oksijen endükte retinopati (OER) in vivo fare modelinde, Apigenin'in intravitreal ve intraperitoneal farklı dozlarda retinal endotelyal hücre proliferasyonu, retina morfolojisi ve apoptoz üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

Toplam 50 adet yeni doğan C57BL/6J ırkı fare çalışmaya dahil edilmiştir. Otuz beş adet fare, anneleriyle birlikte postnatal 7. güne kadar oda ortamında yaşadktan sonra, postnatal 7-12. günler arasında %75 ± 2 oksijene tabi tutulmuştur ve postnatal 12. günde tekrar oda ortamına (%21 oksijen) alınarak enjeksiyon uygulamaları yapılmıştır. Postnatal 17. gün fareler enükle edilmiştir ve preretinal neovaskularizasyonun kantitatif analizi, apoptotik hücre ölümü ve morfolojik yapı incelenmesi yapılmıştır. Analizler için her biri 5 fareden oluşan 10 grup oluşturulmuştur. Grup-A oksijene tabi tutulmamış, işlem görmemiş; Grup-B oksijene tabi tutulmadan 1 µl intravitreal steril dimetil sülfoksit (DMSO) solüsyon enjeksiyonu uygulanmış; Grup-C oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş; Grup-D oksijene tabi tutulmuş, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu uygulanmış; Grup-E ve -F sırasıyla oksijen sonrası 10 µg/ml ve 20 µg/ml intravitreal Apigenin enjeksiyonu uygulanmış; Grup-G ve -H sırasıyla oksijen sonrası 10 mg/kg ve 20 mg/kg intraperitoneal Apigenin enjeksiyonu uygulanmış; Grup-I oksijene tabi tutulmadan 3 µl intraperitoneal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu uygulanmış; Grup-J oksijene tabi tutularak, 3 µl intraperitoneal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu uygulanmış grupları temsil etmektedir.

Kontrol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, oksijene tabi tutulan gruplarda endotel hücre çekirdeği ve atipik mitokondri sayısında anlamlı artış saptanırken ( $p<0,0001$ ), apoptotik hücre sayısında farklılık izlenmemiştir. Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-E, -F, -G ve -H'de endotelyal hücre çekirdeği, atipik mitokondri ve apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu izlenmiştir (tümü için  $p<0,0001$ ). Işık mikroskopisi ile bakıldığında Apigenin gruplarında kistik dejenerasyon veya hücre kaybı tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak Apigenin, neovaskularizasyon, mitokondriyal dismorfoloji ve apoptotik aktiviteyi baskılamakta, oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde umut vaat etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Apigenin, Apoptozis, Flavonoid, Neovaskularizasyon, Prematüre retinopatisi

## ABSTRACT

### **Effects of Intravitreal and Intraperitoneal Apigenin Injection on Retinal Endothelial Cell Proliferation, Retinal Morphology and Apoptotic Cell Death in an Oxygen Induced Retinopathy In Vivo Mouse Model**

The aim of our study was to investigate the effects of different concentrations of Apigenin on retinal endothelial cell proliferation, retinal morphological structure and apoptotic cell death in an in vivo oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model.

A total of 50 newborn C57BL/6J mice were included in the study. Thirty-five mice, with their mothers, were exposed to  $75 \pm 2$  % oxygen between postnatal 7-12th days and the injections were held on postnatal 12th day after they were taken back to room air (21% oxygen). On postnatal 17th day, mice were enucleated and quantitative analysis of preretinal neovascularization, apoptotic cell death and morphological structure analyses were performed. For the analyses, 10 groups, each consisting of 5 mice were organised. The groups were represented as: Group-A without any oxygen exposure or injections; Group-B injected with 1  $\mu$ l intravitreal sterile dimethyl sulfoxide (DMSO) solution without oxygen exposure; Group-C oxygen exposed but not treated; Group-D injected with intravitreal 1  $\mu$ l sterile DMSO solution after oxygen exposure; Group-E and -F treated with 10  $\mu$ g/ml and 20  $\mu$ g/ml intravitreal Apigenin respectively after oxygen exposure; Group-G and -H treated with 10 mg/kg and 20mg/kg intraperitoneal Apigenin respectively after oxygen exposure; Group-I injected with 3  $\mu$ l intraperitoneal sterile DMSO solution without oxygen exposure; Group-J injected with 3  $\mu$ l intraperitoneal sterile DMSO solution after oxygen exposure.

When the control groups were compared, a significant increase in endothelial cell and atypical mitochondrion counts were detected in the oxygen exposed groups ( $p < 0,0001$ ), while no significant difference was noted in apoptotic cell counts. When compared with Group-C, statistically significant decrease in endothelial cell, atypical mitochondrion and apoptotic cell counts of Group-E, -F, -G and -H were observed ( $p < 0,0001$  for all). None of the groups with Apigenin injections revealed cystic degeneration nor cell loss under light microscopy.

In conclusion, Apigenin suppresses the neovascularisation, mitochondrial dysmorphology and apoptosis and is promising for the treatment of ocular neovascular diseases.

**Key words:** Apigenin, Apoptosis, Flavonoid, Neovascularisation, Retinopathy of prematurity

# İÇİNDEKİLER

*Sayfa*

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Normal ve Patolojik Oküler Vaskülarizasyon.....	3
2.2. Anjiogenezde Etkili Mediatorler.....	5
2.2.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü.....	5
2.2.2. Anjiopoetinler/Tie 2.....	5
2.2.3. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1.....	6
2.2.4. Alternatif Kompleman Yolu.....	6
2.3. Oküler Neovasküler Hastalıklar.....	7
2.3.1. Korneal Neovaskülarizasyon.....	7
2.3.2. İris Neovaskülarizasyonu.....	7
2.3.3. Retinal Neovasküler Hastalıklar.....	8
2.4. Prematüre Retinopati.....	9
2.4.1. Prematüre Retinopati Patogenezi.....	9
2.4.2. Prematüre Retinopati Sınıflandırma ve Tedavisi.....	12

2.5. Güncel Anti-Anjiojenik Tedaviler.....	15
2.5.1. Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Etkili Ajanlar.....	15
2.5.2. Ruboxistaurin Mesilat.....	17
2.5.3. Multi-Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	17
2.5.4. Alternatif Kompleman Yolu İnhibitörleri.....	17
2.5.5. İntegrin Antagonistleri.....	17
2.5.6. Gen Terapisi.....	17
2.5.7. Sonepcizumab.....	18
2.5.8. Triamsinolon Asetat.....	18
2.5.9. Deksametazon (Ozurdex).....	18
2.5.10. Fovista.....	18
2.5.11. Anti-Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör Etkili Ajanlar.....	18
2.6. Apigenin.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3. 1. Hayvan Deneyi Protokolü.....	22
3. 2. Işık Mikroskopik İnceleme.....	24
3. 3. Elektron Mikroskopik İnceleme.....	24
3. 4. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı Deoksi-UTP-Nick End Labeling Tekniği.....	25
3. 5. İstatistiksel Analiz.....	25
4.BULGULAR.....	26
4.1. İn vivo Oksijen ile İndüklenebilir Retinopati Fare Modelinde İntravitreal Apigenin Enjeksiyonunun Farklı Konsantrasyonlarda Retinal Endotelyal Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	26

4.2. Işık Mikroskopi ile Morfolojik Analiz.....	28
4.3. Elektron Mikroskopi ile Ultrastrüktürel Analiz.....	28
4. 4. TUNEL Tekniği ile Apoptozis Analizi.....	31
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ.....	42
7. KAYNAKLAR.....	43



## KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

<b>ANG</b>	: Anjiopoetin
<b>ANOVA</b>	: Varyans analizi
<b>BEAT-ROP</b>	: Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity
<b>CRYO-ROP</b>	: Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity
<b>CTGF</b>	: Bağ doku büyüme faktörü
<b>DARPin</b>	: Designed ankyrin repeat protein
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DRP</b>	: Diyabetik retinopati
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>EPO</b>	: Eritropoetin
<b>ETROP</b>	: Early Treatment for Retinopathy of Prematurity
<b>Fc</b>	: Kristalize olabilen parça
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>gr</b>	: Gram
<b>HE</b>	: Hematoksilen eosin
<b>HIF</b>	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
<b>Hsp90</b>	: Isı şok proteini 90
<b>HUAEC</b>	: İnsan umbilikal arter endotel hücresi
<b>ICROP</b>	: International Classification of Retinopathy of Prematurity

<b>Ig</b>	: İmmünglobülin
<b>IGF-1</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>ILM</b>	: İnternal limitan membran
<b>IPA</b>	: İnteraperitoneal Apigenin
<b>IVA</b>	: İntravitreal Apigenin
<b>IVB</b>	: İntravitreal Bevacizumab
<b>JAK/STAT</b>	: Janus kinaz/ transkripsiyon sinyal iletim ve aktivatörleri
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>MAPK</b>	: Mitojen aktiveli protein kinaz
<b>mg</b>	: Miligram
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinaz
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>OER</b>	: Oksijen endükte retinopati
<b>OIR</b>	: Oxygen induced retinopathy
<b>PAS</b>	: Periodic acid-schiff
<b>PDGF</b>	: Platelet derive büyüme faktörü
<b>PEDF</b>	: Pigment epitelinden derive faktör
<b>PIGF</b>	: Plasental büyüme faktörü
<b>PR</b>	: Prematüre retinopatisi
<b>PUFA</b>	: Çoklu doymamış yağ asitleri

<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RPE</b>	: Retina pigment epiteli
<b>RVO</b>	: Retinal ven oklüzyonu
<b>SD</b>	: Standart deviasyon
<b>SRVO</b>	: Santral retinal ven oklüzyonu
<b>TGF</b>	: Transforme edici büyüme faktörü
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TUNEL</b>	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı Deoksi-UTP Nick End Labeling
<b>uPA</b>	: Ürokinaz tipi plasminojen aktivatörü
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
<b>YBMD</b>	: Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.4.2.1. : Prematüre retinopatisi değerlendirilmesinde retinal zonlar.....	13
Şekil 2.6.1. : Apigenin'in kimyasal yapısı.....	21
Şekil 4.1.1 : Işık mikroskopi kesitleri.....	27
Şekil 4.1.2 : Grup-A-H'de ışık mikroskopi ile neovaskülarizasyonun kantitatif analizi.....	28
Şekil 4.3.1 : Elektron mikroskopi kesitleri.....	30
Şekil 4.3.2 : Grup-A-H'de elektron mikroskopi ile atipik mitokondrilerin kantitatif analizi..	31
Şekil 4.4.1. : Grup-A-H'de apoptotik hücrelerin kantitatif analizi.....	33
Şekil 4.4.2. : TUNEL tekniği ile apoptotik hücrelerin analizi.....	34

# 1. GİRİŞ

Embriyonal yaşamda vaskülogenez ve anjiogenez mekanizmaları ile vasküler sistemler gelişmektedir. Erişkin dönemde ise gelişim tamamlandıktan sonra vaskülogenez ve endotel hücre proliferasyonu durmaktadır. Ancak bazı patolojik süreçlerde anormal endotel hücre proliferasyonu ve neovaskülarizasyon izlenmekte, kornea, iris, optik disk, retina yapıları etkilenebilmektedir. Patolojik neovaskülarizasyon sonucu oluşan damarlar kırılğan yapıda olup sızıntı, hemoraji, eksudasyon ve fibrozise neden olarak görme azalması ile sonuçlanabilmektedir (1).

Retinal vasküler hastalıklar, tüm yaş gruplarını ilgilendiren görme kaybının majör nedenlerindendir (2). Patolojik oküler neovaskülarizasyon, başta diyabetik retinopati (DRP), retinal ven tıkanıklıkları, prematüre retinopatisi (PR), yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD) olmak üzere daha birçok hastalıkta önemli bir görme kaybı ve körlük nedenidir (3, 4).

Neovasküler oküler hastalıklarda güncel medikal tedavide sıklıkla anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) etkili ajanlar kullanılmaktadır. Ancak, çalışmalar patogeneizde VEGF dışında birçok immun mediatörün rol oynadığını göstermektedir (5). Sato ve arkadaşlarının çalışmasında PR olgularında 27 sitokinin vitreustaki seviyesi incelenmiş ve interlökin (IL) -6, IL-7, IL-10, IL-15, eotaksin, fibroblast büyüme faktörü (FGF), granülosit koloni stimülan faktör, granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör, interferon- $\gamma$ -indüklenebilir protein-10, siklooksijenaz gibi faktörlerin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu mediatörlerin preretinal neovaskülarizasyonun gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (6).

Apigenin, (4', 5, 7,-trihidroksiflavon) meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir (7). Literatürde daha önce Apigenin'in anti-oksidatif, anti-tümöral, anti-inflamatuar aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir (8-10). Daha önce in vitro çalışmalarda Apigenin'in, endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu engellediği gösterilmiştir (11). İnsan retina pigment epiteli (RPE) hücrelerinden uyarılmış VEGF salınımının, Apigenin ile azaldığı gösterilmiştir (12). Bir diğer çalışmada ise Apigenin'in PR patogenezinde önemli yer tutan hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ve VEGF genlerinin ekspresyonunu azalttığı izlenmiştir (13). Apigenin'in daha önce hayvan modelinde laser ile indüklenen koroidal neovaskülarizasyonu intraperitoneal uygulama ile azalttığı gösterilmiştir (7).

Çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda vasküler yatak ve dokuda yayılım tarzı farklılık göstermekle beraber, patolojik düzeyde oluşan damarsal yapılar tüm oküler neovasküler hastalıklarda benzer özellikleri taşımaktadır (14, 15). Bu sebeple 1994 yılında Smith ve arkadaşları tarafından oluşturulan oksijen endükte retinopati (OER) fare modeli kullanılarak başta PR olmak üzere retinal vasküler hastalıklarda etkin ve güvenli olabilecek tedavi yöntemleri araştırmak mümkündür (16).

Çalışmamızda hedefimiz, OER in vivo fare modelinde, C57BL/6J ırkı fare kullanarak, Apigenin'in intravitreal ve intraperitoneal farklı dozlarda uygulandığında retinal endotelial hücre proliferasyonu, retina morfolojisi ve apoptoz üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Normal ve Patolojik Oküler Vaskülarizasyon

Embriyogenez sırasında endotel hücreleri mezodermal adacıklardan farklılaşır ve yeni damar oluşumu için çoğalır (17, 18). Normal damar oluşumu vaskülogenez ve anjiogenez mekanizmaları aracılığıyla mümkün olmaktadır. Vaskülogenez, anjioblast adı verilen endotelyal prekürsör hücrelerin farklılaşmasıyla de novo olarak yeni damar oluşumu iken, anjiogenez ise var olan damarlardan tomurcuklanma ile yeni kapiller gelişimini tanımlamaktadır (1, 17).

Normal retinal vasküler gelişim sürecinde, öncelikle vaskülogenez ile vasküler prekürsör hücreler tarafından ana vasküler pleksus oluşmakta, daha sonra gelişmekte olan retinanın artan metabolik ihtiyaçları doğrultusunda anjiogenez ile vasküler ağ genişlemektedir (19).

Retinal damar oluşumunda oksijenin rolü olduğu bilinmektedir. Rosen ve arkadaşları in vitro olarak endotel hücre proliferasyonunun ortamdaki oksijen yoğunluğu ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir (20). Gelişen nöronların metabolik ihtiyaçlarının yarattığı fizyolojik hipoksinin, normal retinal vaskülarizasyonda önemli bir faktör olduğu ortaya konulmuştur (21). Hipoksi sonucu glial hücrelerden başta VEGF olmak üzere pro-anjiogenik mediatörlerin salınımı ile endotel hücre göçü, farklılaşması ve çoğalması uyarılmaktadır (22). Hiperoksik durumda ise anti-anjiogenik faktörler salınarak, pro-anjiogenik faktörler azalmaktadır (21). Böylelikle anjiogenez bir denge içinde tutulmaktadır.

Vasküler sistem gelişimi tamamlandıktan sonra vaskülogenez gerilemekle birlikte, anjiogenez yara iyileşmesi, doku tamiri gibi durumlarda erişkin dönemde de varlığını sürdürebilmektedir (23).

Fizyolojik rollerinin yanı sıra, anjiogenez patolojik süreçlerde de ortaya çıkmaktadır. Patolojik anjiogenez birçoğu tanımlanmış pro-anjiogenik ve anti-anjiogenik mediatörler arasında dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır (15, 23, 24). Oküler dokularda anormal anjiogenez tüm yaş gruplarında önemli körlük nedeni oluşturan oküler neovasküler hastalıkların temelini oluşturur (25). Çocukluk döneminde PR, erişkin dönemde DRP ve ileri yaşta YBMD bu hastalıkların en önemlileri arasındadır (26-30).

Yeni oluşan damarlar kornea, retina, koroid, iris ve optik disk gibi tüm oküler dokuları etkileyebilmekte, bu damarlarda normal damar duvarında mevcut olan sıkı bağlantıların yokluğu nedeniyle sızıntı ve kırılma yapı nedeniyle hemorajiler oluşabilmektedir (1).

Oküler anjiogenez, yara iyileşmesine benzer şekilde inflamasyon ve miyofibroblast formasyonu ile birlikte görülmektedir. Bu sebeple, hastalık sürecinde transforme edici büyüme faktörü (TGF)  $\beta$ 1 ve bağ doku büyüme faktörü (CTGF) gibi pro-fibrotik mediatörlerin artışıyla anjiogenik fazı takip eden fibrotik faz görülebilmekte ve sonuçta fibrozis, traksiyonel retina dekolmanı tablolarına neden olarak kalıcı görme kaybına yol açabilmektedir (31, 32).

Oküler anjiogenez ile ilişkili patolojilerde, anjiogenez muhtemelen nöronal metabolizmadan kaynaklı lokal doku hipoksisi, inflamasyon ve oksidatif stres ile tetiklenmektedir. Neovaskülarizasyonun başlıca sorumlusu olarak değerlendirilen VEGF salınımının, RPE, astrosit, Müller hücresi, endotel hücresi, ganglion hücresi olmak üzere en az beş farklı retinal hücre tipi tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir (23).

İlk defa 1948 yılında iskemik retinopatilerde, iskemik retinadan neovaskülarizasyondan sorumlu anjiogenik faktör salınımı olduğu öne sürülmüştür ve bu tarihten itibaren bu faktörleri tanımlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (33).

Hastalıkların anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde hayvan modellerinin geliştirilmesi oldukça önemli yer tutmuştur. Oksijen endükte iskemik retinopati fare modeli, bu modellerin en faydalısı olarak öne çıkmıştır (16). Oksijen endükte iskemik retinopati fare modelinde spesifik bir VEGF antagonistinin retinal neovaskülarizasyonu baskıladığının gösterilmesi ile ilk defa VEGF'nin retinal neovaskülarizasyonu uyardığı net olarak gösterilmiştir. Çalışmalarda ayrıca VEGF'nin normal retinal gelişim için gerekli olduğu, yüksek oksijen konsantrasyonlarının VEGF'nin baskılanması, yeni damar oluşumunun gerilemesi ve böylece perfüze olmayan iskemik retina alanlarının ortaya çıkmasına sebep olduğu gösterilmiştir (34, 35). Hiperoksik ortam sonrası tekrar oda oksijenine geçilmesi ise iskemik alanlarda hipoksiye neden olmakta ve bu alanlardan artmış VEGF salınımı ile retinal neovaskülarizasyon gelişimi ortaya çıkmaktadır (36, 37). Yine bu modelde iskemik retinadan salınan HIF-1 $\alpha$  düzeyleri ile VEGF düzeylerinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (38).



Takiben ilerleyen dönemde, HIF-1 ilişkili faktörler olan plasental büyüme faktörü (PIGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), stromal kökenli büyüme faktörünün, ayrıca TGF, epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekroz faktörü (TNF) - $\alpha$ , insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), vasküler endotelial-kadherin, IL'lerin ve FGF ailesinin iskemik retinada neovaskülarizasyona katkı sağladığı gösterilmiştir (23, 39-42).

Oküler neovasküler hastalıkların anlaşılması ve tedavisinde kullanılabilecek anjiogenez kaskadını farklı basamaklarda inhibe eden moleküllere yönelik arayışlar devam etmektedir (14, 24, 43).

## **2.2. Anjiogenezde Etkili Mediatörler**

Anjiogenez, anjiogenetik ve anjiostatik faktörlerin arasındaki dengenin anjiogenetik faktörler lehine bozulması ile ortaya çıkmaktadır (17, 44). Yakın dönemde yapılan çalışmalar anjiogenezin başta VEGF ailesi olmak üzere TGF, EGF, PDGF, FGF ailesi, TNF- $\alpha$ , IGF, vasküler endotelial kadherin, IL'ler, integrinler, prostaglandinler, eritropoetin (EPO) ve diğer büyüme faktörleri tarafından uyarıldığını göstermiştir. Endojen anjiostatik düzenleyiciler ise trombospondin, anjiostatin, endostatin, pigment epitelinden derive faktör (PEDF), çeşitli kemokinler, IL'ler, TGF- $\beta$  olarak sıralanabilmektedir (45, 46).

### **2.2.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü**

Vasküler büyüme faktörleri; PIGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve viral VEGF homoloğu VEGF-E den oluşan bir protein ailesidir (47-50).

Vasküler endotelial büyüme faktörü-A, anjiogenezin temel düzenleyici ajanıdır ve endotel hücre göçü, proliferasyonu, damarsal geçirgenlik artışından sorumludur (51). Vasküler endotelial büyüme faktörü-B'nin düşük anjiogenik aktivite gösterdiği, VEGF-C'nin ise özellikle retinal anjiogenezde önemli rolü olduğu ve VEGF-A azalmasında kompensatuar olarak arttığı gösterilmiştir (52, 53). Vasküler endotelial büyüme faktörü-D'nin rolü ise henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Plasental büyüme faktörünün, VEGF ile heterodimerler oluşturarak neovaskülarizasyona katkı sağladığı hayvan modellerinde gösterilmiştir (54, 55).

### **2.2.2. Anjiopoetinler/Tie 2**

Tie-2, endotel hücreleri üzerinde bulunan, damarsal ağların gelişimi ve remodeling süreci için önemli olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. Anjiopoetin (Ang) ailesi ise bu

reseptörlerin ligandıdır. Bu ailenin en çok araştırılan iki üyesinden Ang-1 aktivatör, Ang-2 ise inhibitör etkiye sahiptir (56).

Hayvan modellerinde Ang-1'in anormal anjiogenezi durdurduğu, Ang-2'nin ise pro-inflamatuar sitokinlere bağlı olarak salındığı ve vasküler endotel stabilizasyonunu bozduğu, oküler neovaskülarizasyona katkı sağladığı gösterilmiştir (57-60).

### **2.2.3. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1**

Hipoksi ile indüklenebilir faktör, hipoksik şartlarda indüklenen HIF-1 $\alpha$  ve yapısal olarak eksprese olan HIF-1 $\beta$  alt gruplarından oluşan heterodimer protein yapıda bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 heterodimeri, hipoksi cevap elemanları aracılığı ile transkripsiyonel aktiviteyi uyarır. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 $\beta$  normal koşullar altında hücrelerde bulunmakta iken, HIF-1 $\alpha$  ise normal koşullarda saptanamamakta, hipoksik koşullarda artmaktadır (61). Hipoksik koşullar altında, HIF prolin hidroksilazları inaktive olur, böylece HIF-1 $\alpha$  artar ve hipoksi cevap genlerinin transkripsiyonu artar (62).

Özellikle DRP, retinal ven oklüzyonu (RVO), PR gibi retinal iskemi ile seyreden hastalıklarda hipoksi anahtar faktördür. Bu hastalıklarda ortaya çıkan hipoksi sonucunda HIF-1 artışına bağlı olarak VEGF, PDGF, PIGF, Ang-2 ve bu araçların reseptörleri olan vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) -1/2, kemokin reseptör tip 4, PDGF- $\beta$ , Tie-2 artışı, bunun sonucunda neovaskülarizasyon izlenmektedir (63-66). Bu yol ile öncelikle vasküler endotel hücre aktivasyonu, takiben bazal membran degradasyonu, endotel hücre proliferasyonu ve göçü, tüp formasyonu, uzaması ve matürasyonu ile oküler neovaskülarizasyon gelişmektedir (37, 67, 68). Anjiopoetin-2, reseptörüne bağlanarak bazal membran yıkımını sağlamakta böylece VEGF'ye cevabı arttırmakta, takiben VEGF aracılığıyla endotel hücre proliferasyonu ve göçü olmakta, PDGF- $\beta$  aracılığı ile matürasyon sağlanmaktadır (69-71). Fotoreseptör ve RPE hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak, YBMD gibi neovaskülarizasyonla seyreden hastalıklarda HIF-1 artışı olduğu izlenmiştir.

### **2.2.4. Alternatif Kompleman Yolu**

Çeşitli çalışmalarda kompleman faktörü H, B ve D'nin YBMD neovaskülarizasyon riskinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (72-74). Kompleman faktörleri C3a ve C5a'nın ise hayvan modellerinde neovaskülarizasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (75, 76).

Matriks metalloproteinaz (MMP) aktivasyonu ile alternatif kompleman yolunun aktivasyonu ile VEGF düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (77).

### **2.3. Oküler Neovasküler Hastalıklar**

#### **2.3.1. Korneal Neovaskülarizasyon**

Kornea normalde avasküler bir yapı olmasına karşın belli koşullar altında limbal vasküler pleksustan kaynaklanan kapiller damarların oluşumu ile vaskülarize olabilmektedir (1). Genel popülasyonda korneal vaskülarizasyon insidansını gösteren yeterli çalışma olmasa da 1996 yılında yapılan bir çalışmada genel oftalmoloji kliniğine başvuran hastaların yaklaşık %4'ünde korneal neovaskülarizasyon izlendiği gösterilmiştir. Korneal vaskülarizasyon; yüzeysel vaskülarizasyon, vasküler pannus ve derin stromal vaskülarizasyon olmak üzere farklı paternlerde ortaya çıkabilmektedir (1). Bu durum, enfeksiyonlar, uzamış kontakt lens kullanımına bağlı hipoksi, travma, alkali yanıklar, immunolojik ve dejeneratif hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkmakta, görme düzeyinde ciddi azalmaya sebep olabilmektedir.

#### **2.3.2. İris Neovaskülarizasyonu**

İris neovaskülarizasyonu (NVİ) başta diyabet ve RVO olmak üzere çeşitli oküler ve sistemik hastalıklara sekonder olarak ortaya çıkmaktadır. Proliferatif DRP mevcut hastaların %2.3-2.5'inde, santral retinal ven oklüzyonu (SRVO) olan hastalar %20'sinde, iskemik SRVO mevcut hastaların ise %45-80'inde NVİ oluşmaktadır (78-80). Diğer NVİ nedenlerinden bazıları ise oküler iskemik sendrom, vaskülitler, karotikokavernöz fistül, PR, üveit, retina dekolmanı, Coats hastalığı, göz içi cerrahisi, travma, orak hücreli anemi, retinoblastom, melanom olarak belirtilmektedir. Neovaskülarizasyon çoğunlukla retinal hipoksi, iskemi ve buna sekonder salınımı artan anjiyojenik ajanlar ile uyarılmaktadır (78).

Yeni damar oluşumları iris ön yüzeyi ve ön kamara açısında ortaya çıkmaktadır. Neovasküler yapılar öncelikle iris kökü yakınında ve pupil marjinde bulunan kapiller yataklardan köken alarak iris stroması içinde gelişmekte ve takiben iris ön yüzünde pupil kenarı ve açıda damar yumakları şeklinde ortaya çıkmaktadır. Normal iris damarlarının aksine bu yapılar oldukça kırılğan olup floressein sızıntısına neden olabilmektedir. Uzun süre belirti vermeden sessiz kalabilse de fibröz doku gelişiminin eşlik etmesi ve açının işgali ile ikincil neovasküler glokoma neden olarak şiddetli ağrı ve görme kaybına neden olabilmektedir. İris neovaskülarizasyonu enükleasyon için önemli bir endikasyon

oluşturmaktadır ve çeşitli serilerde enükleasyon yapılan gözlerin %12-15'inde NVİ olduğu gösterilmiştir (1).

### **2.3.3. Retinal Neovasküler Hastalıklar**

Retina dual bir vasküler sisteme sahiptir: dış 1/3'ü koroidden, iç 2/3'ü ise santral retinal arter tarafından beslenmektedir. Embriyolojik süreçte koroidal damarların oluşumu erken dönemde RPE'den VEGF-A üretiminde artış ile gelişmektedir (81). İç tabakalar ise erken embriyolojik dönemde hiyaloid sistem ile beslenmektedir. Oküler gelişimin geç döneminde hiyaloid sistem gerilemekte, gelişmekte olan nöronların metabolik ihtiyacı artmakta, retina hipoksik hale gelmekte ve yeni damar oluşumu böylece uyarılmaktadır (23). Retinal vasküler yapıların oluşumu 14. gestasyonel haftada prekürsör anjioblastların farklılaşmasıyla başlamaktadır. Primordial damarların gelişimi sonrası retinal anjiogenez optik sinir başında yüzeyel olarak başlamakta, bu merkezi noktadan iç retina yüzeyi boyunca radyal olarak devam etmektedir. Derin vasküler pleksus ise yüzeyel arterlerden tomurcuklanma ile kapiller ağın derin retinal tabakalara doğru ilerlemesi ile oluşur. Retinal anjiogenez oksijen ihtiyacı ile yakından ilişkilidir. Yüksek oksijen konsantrasyonu, hipoksi ile indüklenen VEGF üretimini baskılar ve yeni damar oluşumu azalır (15, 19, 82, 83). Böylece koroid gelişimi 3. gestasyonel ayda tamamlanırken, retina damarlarının gelişimi ise nazal retinada 36. hafta, temporal retinada ise 40-42. haftaya kadar devam edebilmektedir (82).

Lokal doku hipoksisi, inflamasyon ve oksidatif stres gibi durumlar bu normal gelişim süreci dışında retinal anjiogeneze neden olabilmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü bu süreçte temel rolü oynamaktadır ve in vitro çalışmalar hipoksi durumunda artan VEGF düzeylerinden özellikle Müller hücreleri ve astrositlerin sorumlu olduğunu göstermektedir (19, 84, 85). Retinada neovasküler hastalıklar retinal damarlardan köken alarak preretinal veya koroidden köken alarak subretinal anjiogenezis nedeniyle ortaya çıkmaktadır (23).

Preretinal anjiogenez, kapiller nonperfüzyon ve lokal iskemi ile seyreden, iskemik retinopatiler olarak değerlendirilen RVO, DRP, PR gibi hastalıklarda ortak bir sonuç olarak gelişmektedir. İskemik retina alanlarından salınımı artan anjiogenik faktörler, vitreus kavitesinde fibrovasküler membranların oluşumu ve buna bağlı komplikasyonlara neden olmaktadır.

Subretinal anjiogenez ise RPE, Bruch membranı ve koroidi etkileyen patolojiler sonucu ortaya çıkar. İnflamasyon, hipoksi, oksidatif stres ile birlikte Bruch membranı bütünlüğünde bozulmaya bağlı bir yara iyileşmesi cevabı olarak ortaya çıkmaktadır. Koroidal neovaskülarizasyon, RPE-Bruch membranı arasında ya da RPE ile nörosensoriyal retina arasında yerleşebilmektedir. İlerleyen dönemde neovaskülarizasyon atrofik bir alan bırakarak gerileyebilmekte veya fibrotik skar oluşumuna neden olabilmektedir (23).

## **2.4. Prematüre Retinopatisi**

### **2.4.1. Prematüre Retinopatisi Patogenezi**

Prematüre retinopatisi ilk defa 1942 yılında Terry tarafından tanımlandığından beri patogenezinin anlaşılmasında birçok gelişme olmasına rağmen hala özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağındaki körlüklerin önemli bir nedenidir (86, 87).

Prematüre retinopatisi, anjiogenezin devamlılığını sağlayan fizyolojik koşulların bozulmasıyla ortaya çıkar (88). Prematüre infantların retina vaskülarizasyonu tamamlanmamıştır ve gestasyonel yaş ile orantılı periferik avasküler bir retinal zon mevcuttur (89, 90).

Prematüre retinopatisi, vazo-obliteratif faz ve vazo-proliferatif faz olmak üzere birbirini takip eden iki fazdan oluşmaktadır (91). İlk basamak olan vazo-obliteratif faz, doğumda başlar ve postmenstrüel 30-32. haftaya kadar devam eder. Prematüre infantlarda in utero devam etmesi gereken vasküler gelişim yavaşlamaktadır ve gelişmiş damarlarda gerileme görülmektedir. Ekstrauterin ortamdaki rölatif hiperoksi ve prematürelere verilen destek oksijen tedavisi bu süreçten sorumlu tutulmaktadır (90). İntrauterin koşullarda kanda %70 olan oksijen saturasyonu ekstrauterin ortamda %100 olmaktadır. İntrauterin koşullarda arteriyel oksijen basıncı 30 mmHg iken, ekstrauterin ortamda bu düzey 60-100 mmHg arasında değişmektedir. Artan oksijen düzeyleri ile hipoksi bağımlı anjiojenik faktörler azalmakta, damar gelişimi gerilemekte, daha önceden oluşmuş damarlarda ise konstriksiyon ve retraksiyon olmaktadır (91, 92).

İkinci basamak olan vazo-proliferatif faz ise postmenstrüel 32-34. haftalarda başlamaktadır ve karakteristik özelliği hipoksi ile indüklenen neovaskülarizasyondur. Prematüre retinopatisinin bu fazı, diğer proliferatif iskemik retinopatilere benzerlik göstermektedir (90). Bu fazda; infantın gelişimi devam ettikçe, vaskülarizasyonu tamamlanmamış retina alanları gittikçe metabolik olarak daha aktif hale gelmektedir, vazo-obliteratif fazda hasar

görmüş damarlar retinada artan oksijen ihtiyacını karşılayamamakta ve bu durum doku hipoksisine neden olmaktadır. Bu hipoksiye ikincil olarak ise daha önce baskılanan HIF'lerin artışı olmakta ve bu durum avasküler-vasküler retina sınırında yeni damar oluşumuna yol açmaktadır (92). Zamanla damarların bu patolojik gelişimi retinadan vitreusa uzanan fibröz skarlara, retina dekolmanı ve potansiyel olarak körlüğe yol açabilmektedir.

Prematüre retinopatisini anlamak için kedi, köpek, rat ve farelerde OER hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller arasından fare OER modeli, retinal neovaskülarizasyonun ve özellikle PR'nin ikinci fazının tekrarlanabilir, ölçülebilir, güvenilir ve ucuz bir modeli olması dolayısıyla en popülerleri olmuştur. Fare modelini uygun kılan birçok etken vardır. Öncelikle, fare retinasının normal gelişimi doğum sonrası 2 hafta içinde olmakta ve vasküler gelişimin tüm aşamalarının gözlemlenmesine izin vermektedir. Yeni doğan farenin retinal damarlarının gelişim aşaması, prematüre infantların 4-5. gestasyonel aylardaki gelişimleri ile uyumludur. Vasküler gelişim insandakine benzer şekilde yüzeyel tabakayı oluşturan prekürsör hücrelerle başlamakta, daha sonra derin tabaka oluşmaktadır (16). Bu modelde fareler postnatal 7-12. gün arası %75 oksijene maruz bırakılmaktadır. Farelerin hiperoksiye maruz kaldıkları bu dönemde, PR'nin ilk fazını taklit eder şekilde damarlarda gerileme, normal radyal damar gelişiminde yavaşlama görülmektedir. Daha sonra fareler oda ortamına alınmakta, nonperfüze retina alanları böylece hipoksik kalmakta, anjiyojenik faktörler salınmakta ve retinal neovaskülarizasyon ortaya çıkmaktadır. Oksijen endükte retinopati modelinin bu neovasküler fazı hem PR'nin ikinci fazına hem de diğer proliferatif retinopatilere benzerlik göstermektedir (90).

## **Hipoksi İle İndüklenebilir Faktörler Ve Prematüre Retinopatisi Gelişimi**

### **Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü**

Vasküler endotelyal büyüme faktörü salınımı primer olarak HIF-1 ile kontrol edilmektedir. Fare OER modelinde, hiperoksi durumunda 6 saat sonrasında hem VEGF mesajcı ribonükleik asit (mRNA) hem de VEGF proteininin azaldığı gösterilmiştir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü azalmasına bağlı olarak da damar gelişimi yavaşlamakta ve oluşmuş damarlar gerilemektedir. Eksojen olarak VEGF ve VEGFR-1 spesifik ligand PlGF-1 verildiğinde vazo-obliterasyonun engellenebildiği böylece VEGF'in PR'nin 1. fazında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Oda koşullarına dönen farelerde 6-12 saat sonra

VEGF düzeylerinin arttığı ve neovaskülarizasyon başlayana kadar korunduğu gösterilmiştir (35, 37, 93).

### **Eritropoetin**

Fetal karaciğerden salgılanan bir hormon olan EPO kemik iliğinde eritropoezi arttırmakta, vasküler hücrelerde apoptozu inhibe etmekte, anjiogenez regülasyonunda görev almaktadır (94). Eritropoetin ekspresyonu HIF-1 ile kontrol edilmektedir.

Fare modelinde retina damarlarında EPO proteini ve reseptörünün varlığı gösterilmiştir. Hiperoksik koşullarda EPO mRNA ekspresyonu azalmakta, PR'nin ikinci fazında ise artmaktadır (95).

### **Maternal Kökenli Faktörler Ve Prematüre Retinopatisi Gelişimi**

#### **İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1**

Normal anjiogenez için büyüme hormonu ve efektörü IGF-1 gereklidir (96). İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 defekti olan farelerde normal damar gelişiminin olmadığı gösterilmiştir (97).

Oksijen endükte retinopati fare modelinde, eksojen IGF-1 reseptör antagonisti verildiğinde retina neovaskülarizasyonunda azalma olduğu gösterilmiş, IGF-1 düzeyindeki azalmanın endotel hücre proliferasyonu için gerekli olan VEGF aracılı mitojen aktiveli protein kinaz (MAPK) yolu aktivasyonu ve Akt/Protein kinaz B yolunu baskıladığı gösterilmiştir. Vasküler endotelial büyüme faktörünün endotel hücreleri üzerinde etkili olabilmesi için IGF-1 gerekmektedir (98).

Preterm infantta düşük düzeydeki IGF-1, infant gelişimi sürecinde endojen üretim ile artmakta, böylece VEGF ilişkili neovaskülarizasyon ortaya çıkmaktadır (88). İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ayrıca normal vasküler gelişim için gereklidir. Çalışmalarda PR gelişimi öncesi pretermlere IGF-1 desteği yapılmasının PR gelişimini engelleyebildiği ve normal vaskülarizasyonu uyardığı, ancak PR'nin proliferatif fazında verildiğinde ise neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (24, 98).

#### **Omega-3 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri**

Anneden bebeğe özellikle 3. trimesterde çoklu doymamış yağ asitlerinin transferi olduğu için yenidoğan pretermlerde genellikle bu faktörün eksikliği söz konusudur (99, 100).

Omega-3 ve -6 yağ asitleri arasındaki denge retinada nöronal ve vasküler hücre canlılığı için büyük önem taşımaktadır (101-103).

Oksijen ile indüklenen retinopati fare modelinde omega-3 yağ asidi desteği anti-VEGF tedaviye benzer etki göstermektedir (92).

#### **2.4.2. Prematüre Retinopatisi Sınıflandırma ve Tedavisi**

Hastalığın son sınıflandırılması 1984 yılında kabul edilen ve 1987 yılında geliştirilen “International Classification of Retinopathy of Prematurity (ICROP)” temel alınarak yapılmaktadır. 2005 yılında uluslararası sınıflandırmanın güncellenmiş şekli yayınlanmıştır. Uluslararası sınıflandırma sistemine göre hastalığın şiddetini 4 etken belirler (104).

- Hastalığın retinada yerleşimi; zonlarla ifade edilir.
- Retina tutulumunun yaygınlığı; saat kadranı olarak ifade edilir.
- Hastalığın vasküler proliferasyon derecesi; evre olarak ifade edilir.
- Retina arka kutup damarlarında tortuosite ve dilatasyon varlığı (plus hastalık).

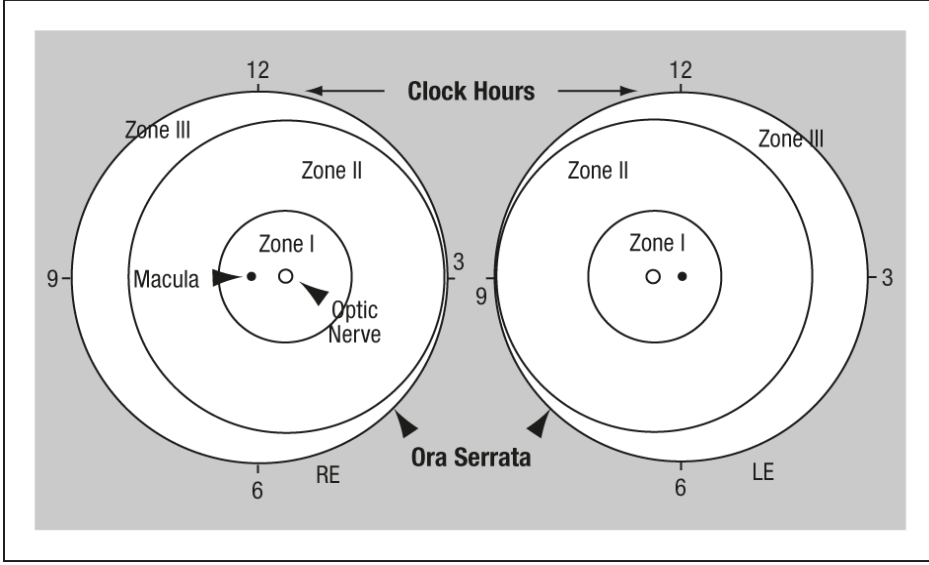
#### **Zon Tanımı**

**Zon I:** Merkezi optik disk olan, yarıçapı disk-maküla mesafesinin 2 katı olan dairesel alandır.

**Zon II:** Zon I sınırından başlayan, nazalde ora serrataya temporalde anatomik ekvatora uzanan dairesel alandır.

**Zon III:** Temporalde ora serratada sonlanan yarımay şeklindeki alandır. (Şekil 2.4.2.1.)





**Şekil 2.4.2.1. : Prematüre retinopatisi değerlendirilmesinde retinal zonlar**

Prematüre retinopatisi değerlendirilmesinde kullanılan zonlar ve saat kadrantlarının şematik görünümü izlenmektedir.

### **Evreleme**

**Evre 1** (Demarkasyon hattı): Öndeki avasküler retina ile arkadaki vasküler retinayı ayıran ince beyaz bir çizgi ile karakterizedir.

**Evre 2** (Ridge): Demarkasyon hattının yükseklik, genişlik ve hacim kazanmasıyla karakterizedir.

**Evre 3** (Ekstraretinal fibrovasküler proliferasyon): Ridge posteriorundan uzanan fibrovasküler dokunun vitreusa doğru ilerlemesi ile karakterizedir. Vitreusa uzanan ekstraretinal fibrovasküler dokunun yaygınlığına göre bu evre hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üçe ayrılır.

**Evre 4** (Kısmi retina dekolmanı):

**Evre 4A:** Ekstrafoveal

**Evre 4B:** Foveal

**Evre 5** (Total retina dekolmanı): Retina dekolmanı sıklıkla traksiyona bağlı olmakla birlikte eksudatif olabilmektedir ve sıklıkla huni (açık huni/kapalı huni) şeklindedir.

**Plus Hastalık:** Arka kutup damarlarında arterlerde tortuosite artışı ve venlerde dilatasyon olması, vitreus hemorajisi ve bulanıklığı, iris damarlarında genişleme ve kıvrımlanma artışı, pupil dilatasyonunda azalma (rijid pupil) plus hastalık olarak ifade edilir. Herhangi bir evrede plus hastalığı görülebilir. Evrenin yanına + veya – işareti konularak gösterilir. Plus hastalık mevcudiyetinde PR progresyonu hızlı olur.

**Pre-plus Hastalık:** Posterior polde plus hastalık kriterlerine göre yetersiz fakat normalden daha fazla arteriyel tortuosite artışı ve venöz dilatasyon olması.

**Agresif Posterior PR:** Nadir görülen hızlı ilerleyen ciddi bir durumdur, klasik evreleri geçirmez. Tedavisiz bırakıldığında kısa sürede Evre 5'e ilerler.

Tedavi endikasyonu ve tedavinin sonuçları değerlendirilirken göz önünde bulundurulmakta olan kriterler “Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity” (CRYO-ROP) ve “Early Treatment for Retinopathy of Prematurity” (ETROP) çalışmalarında tanımlanmıştır.

**Threshold (Eşik) Hastalık** (Tedavi evresi): Zon 1 veya Zon 2'de, plus hastalık varlığında ardışık 5 saat kadranı veya ardışık olmayan 8 saat kadranı boyunca Evre 3 hastalık görülmesi eşik hastalık olarak ifade edilmektedir. Eşik hastalık tespit edilen bebekler 72 saat içinde periferik ablatif tedaviye alınmalıdırlar.

**Pre-threshold (eşik öncesi) hastalık:**

**Pre-threshold Sınıflaması:** ETROP çalışmasına göre tedavi kriterleri yeniden belirlenmiş, buna göre hastalar 2 gruba ayrılmıştır.

**A-Tip 1 (yüksek riskli pre-threshold):**

Zon 1: Plus hastalığın bulunduğu herhangi bir evre veya plus hastalığın eşlik etmediği Evre 3

Zon 2: Plus hastalıkla birlikte olan Evre 2 veya Evre 3

**B- Tip 2 (düşük riskli hastalık):**

Zon 1: Plus hastalığın eşlik etmediği Evre 1 veya Evre 2

Zon 2: Plus hastalığın olmadığı Evre 3

“Early Treatment for Retinopathy of Prematurity” çalışması verilerine göre Tip 1 PR'de ablatif tedavi önerilmekte, Tip 2 PR'de ise “bekle ve gör” yaklaşımı önerilmekte, Tip 1 ya da eşik PR'ye ilerleme durumunda ablatif tedavi önerilmektedir.

Eşik hastalık durumunda damarlanmamış ön retinaya ablatif tedavi önerilmektedir. Güncel olarak bu hastalarda kriyoterapiye karşılık laser fotokoagülasyon daha sık tercih edilmektedir.

Henüz nispeten yeni bir tedavi olması ve geniş serili yeterli çalışmanın olmaması nedeniyle anti-VEGF tedaviler genellikle ilk tercih olarak kullanılmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalar tek enjeksiyon ile sistemik ve oküler yan etki izlenmeden olumlu cevaplar alındığını göstermektedir (105, 106). “Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity” (BEAT-ROP) çalışması, Bevacizumab enjeksiyonu ve konvansiyonel laser fotokoagülasyon ile ablasyon tedavisini karşılaştırmış, Zon 1 Evre 3+ PR’li hastalarda Bevacizumab’ın daha etkin olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Bevacizumab tedavisinden sonra retinal damarların vaskülarizasyonun kesildiği noktadan daha ileriye gittiği fakat perifer retinanın tam vaskülarize olmadığı görülmüştür. Bevacizumab monoterapisinin laser fotokoagülasyonun yan etkileri olan görme alanı kaybı ve miyopi indüklenmesi gibi durumlardan kaçınmayı sağladığı bildirilmiştir. Ancak; anti-VEGF tedavinin fibröz membranlar üzerinde olumsuz etki göstererek kontraksiyona ve retina dekolmanına neden olabileceği gösterilmiştir ve güvenilirlik ve etkinliği konusunda daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (106).

Prematüre retinopatisinde seröz, traksiyonel ve ileri olgularda geç komplikasyon olarak regmatojen retina dekolmanı gelişebilmektedir. Evre 4 ve 5 hastalarda retinanın yatışmasını sağlamak için skleral çökertme ve vitrektomi cerrahi seçenekler olarak kullanılabilir (107).

## **2.5. Güncel Anti-Anjiojenik Tedaviler**

### **2.5.1. Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Etkili Ajanlar**

Ranibizumab, Aflibersept ve Pegaptanib intraoküler kullanım için onay almış, Bevacizumab onaylı olmasa da yaygın olarak kullanılan anti-VEGF ajanlardır (24). Birçok ajan üzerinde çalışmalar devam etmektedir (33).

MP0112, yaş tip YBMD ve diyabetik maküler ödemde etkinliği araştırılmakta olan, VEGF’ye bağlanarak etki gösteren bir *designed ankyrin repeat protein* (DARPin)’dir (108).

Conbersept, VEGFR-1 ve VEGFR-2 için domain içeren bir insan füzyon proteinidir. Faz 1 çalışmalarında tek enjeksiyon ile koroidal neovaskülarizasyon alanında azalma olduğu izlenmiştir (109, 110).

### **Pegaptanib (Macugen)**

(Macugen; Eyetech Pharmaceuticals Inc, New York ve Pfizer Inc, New York, ABD)

Pegaptanib, polietilen glikol zinciri bağlanmış bir ribonükleik asit (RNA) oligonükleotid ligandır (24). Patolojik neovaskülarizasyondan birincil olarak sorumlu olduğu düşünülen VEGF<sub>164</sub> izomerine bağlanarak VEGF'nin reseptörüne bağlanmasını engeller ve böylece neovaskülarizasyonu inhibe eder (111). Subfoveal neovasküler YBMD için 2004 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almıştır.

### **Ranibizumab (Lucentis)**

(Lucentis; Genentech Inc, South San Francisco, CA, ABD)

Ranibizumab, intraoküler uygulama için üretilmiş, tüm VEGF izoformlarını hedef alan bir humanize antikor fragmanıdır (112). İlk defa 2006 yılında yaş tip YBMD'de kullanılmak üzere FDA onayı almıştır ve bu tarihten beri çok çeşitli oküler neovasküler hastalıklarda tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır (24).

### **Bevacizumab (Avastin)**

(Avastin; Genentech Inc, South San Francisco, CA, ABD)

Bevacizumab, VEGF-A'nın tüm izoformlarına karşı etkili bir humanize monoklonal antikordur. Bevacizumab, metastatik kolon kanserinde intravenöz kullanılmak üzere geliştirilmiş ve bu endikasyonla FDA onayı almıştır. İntravitreal Bevacizumab uygulamasının şiddetli PR gelişimini azalttığı ve kan damarlarının periferde büyümesini sağladığı gösterilmiştir (113). Endikasyon dışı olarak özellikle Ranibizumab ve Aflibersept gibi diğer anti-VEGF ajanlar yaygınlaşmadan önce sıklıkla oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (24).

### **Aflibersept (Eylea)**

(Eylea; Bayer HealthCare, Almanya)

İnsan immünglobülin (Ig) G1'in kristalize olabilen parçası (Fc) ile VEGF reseptörleri olan VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin Ig domain'lerinden oluşan bir reseptör füzyon proteinidir (114). Plasental büyüme faktörü ve tüm VEGF-A izoformlarını inhibe etmektedir. 2011 yılında FDA onayı almıştır (24).

### **2.5.2. Ruboxistaurin Mesilat**

Protein kinaz-C'nin selektif inhibitörüdür. Oral kullanım ile diyabetik hastalarda güvenli bir şekilde görme kaybı riskini azalttığı gösterilmiştir (115).

### **2.5.3. Multi-Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri**

Tirozin kinaz reseptörleri arasında neovaskularizasyonda etkin rol alan VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR gibi reseptör aileleri vardır. Çeşitli çalışmalarda hayvan deneylerinde intravitreal ve oral uygulanan tirozin kinaz inhibitörlerinin, damar proliferasyonunu azalttığı, laser ile indüklenen koroidal neovaskularizasyon gelişimini azalttığı gösterilmiştir. Bu moleküller üzerinde klinik çalışmalar devam etmektedir (116-118).

### **2.5.4. Alternatif Kompleman Yolu İnhibitörleri**

Oküler neovasküler hastalıkların patogeneğinde inflamatuvar mediatörlerin artışı önemli rol oynamaktadır (119). Kompleman yolunun birçok elemanını hedef alan ajanlar ile YBMD hastaları üzerinde klinik çalışmalar devam etmektedir (120). Fare koroidal neovaskularizasyon modelinde kompleman yolu inhibisyonu ile VEGF üretiminin ve anjiogenezin baskılandığı gösterilmiştir (121, 122).

### **2.5.5. İntegrin Antagonistleri**

İntegrinler endotel hücre canlılığını, proliferasyonunu ve göçünü düzenleyen adhezyon molekülleridir (123). İntegrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonistleri anjiogenezde önemli bir basamak olan fibronektinle tutunmayı engeller (124). Bu amaçla JSM6427 ve Volociximab olmak üzere iki  $\alpha 5\beta 1$  antagonisti araştırılmaktadır (125, 126).

### **2.5.6. Gen Terapisi**

Anti-anjiogenik proteinlerin gen transferinin tekrarlayan intraoküler enjeksiyonlara karşı alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir (127). Gen terapisi ile amaç, tek bir enjeksiyon ile vektörün aktarılması ve takip eden süreçte bu vektör aracılığıyla anti-anjiogenik proteinlerin sürekli salınımıdır (119).

Özellikle viral vektörler kullanılarak yapılan çalışmalar oküler gen terapisinde gelecek vaat etmektedir. Bu alanda *small interfering RNA*'ları da içeren birçok ajan araştırılmaktadır (65). Sirna-027; VEGF-1 reseptörüne karşı bir *small interfering RNA*'dır. Gen düzeyinde VEGF-1 reseptörü sentezini inhibe etmektedir. Faz 2 klinik çalışmaları devam etmektedir (24).

### **2.5.7. Sonepcizumab**

Bir anti-sfingozin-1-fosfat monoklonal antikordur, anti-VEGF ajanlara cevapsız YBMD hastalarında faz-2 çalışmaları devam etmektedir (120).

### **2.5.8. Triamsinolon Asetat**

Anti-inflamatuar ve anjiostatik etkiye sahip bir sentetik steroiddir. Oksijen endükte retinopati fare modelinde neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir (128). Katarakt ve glokom gelişimi önemli komplikasyonlarıdır.

### **2.5.9. Deksametazon (Ozurdex)**

(Ozurdex; Allergan Inc, CA, ABD)

Retinal ven oklüzyonu, DRP ve üveite sekonder maküler ödemde endikasyon almış intravitreal depo steroid implantıdır (129).

Steroid ajanların kullanılmasında en büyük sorunlar, non-spesifik olmaları ve katarakt, glokom gibi önemli yan etkilere neden olmalarıdır (130).

### **2.5.10. Fovista**

(Fovista; Ophthotech, ABD)

Bir PDGF-B aptameridir ve neovasküler perisitlerin yapısını bozarak koroidal neovaskülarizasyonda regresyon sağlamaktadır (131).

### **2.5.11. Anti-Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör Etkili Ajanlar**

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, PDGF-B, stromal hücre derive faktör-1, EPO gibi birçok pro-anjiyojenik faktörü aktive eden HIF sinyal yolunun blokajının, tüm bu faktörlerin baskılanmasına ve böylece oküler neovaskülarizasyonun engellenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Hayvan oküler neovaskülarizasyon modellerinde başarılı

olarak test edilmiş anti-HIF ajanları kardiyak glikozidler, antrasiklinler, YC-1 ve Honokiol bu alanda umut vaat eden ajanlardır (114).

## 2.6. Apigenin

Flavonoidler, günlük diyetle en fazla miktarda bulunan polifenollerdir (132). Flavonoidlerin tümü bir benzen halkası (A), buna bağlı 6 elemanlı bir halka (C) ve bu halkanın ikinci pozisyonunda bir fenil halkası (B) içerir (133). Flavonoidler, B ve C halkalarının yerleşimi ile C halkasındaki doygunluk ve hidroksilasyon derecesine göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavan-3-ol, izoflavonlar ve antosiyanidinler olmak üzere 6 alt gruba ayrılır (134).

Flavonoidlerin, anjiogenezin hedef hücresi olan endotel hücresi üzerindeki etkileri ilk defa Fotsis ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu çalışmada farklı flavonoidler incelenmiş ve bizim çalışmamızda araştırdığımız Apigenin dahil olmak üzere birçoğunun endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile in vitro anjiogenez üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (133).

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon), maydanoz, kereviz, soğan, portakal, çay başta olmak üzere birçok meyve ve sebze yaygın olarak bulunan flavon grubuna dahil besinsel bir flavonoiddir (Şekil 2.4.1.) (135-137). Yapılan çalışmalarda belirgin toksisitesinin olmadığı ve normal hücreler üzerinde belirgin etkisinin olmadığı gösterilmiştir (138, 139). Daha önceki çalışmalarda, Apigenin'in anti-oksidan, anti-mutajenik, anti-karsinojenik, anti-inflamatuar özellikleri olduğu gösterilmiştir (137). Farklı çalışmalarda Apigenin'in farklı etki mekanizmaları ile anti-anjiogenik özellik gösterdiği kanıtlanmıştır (7, 61, 132, 133, 140-145).

Fotsis ve arkadaşları, Apigenin'in endotel hücre proliferasyonu ve VEGF/FGF aracılığı ile in vitro anjiogenezin potent bir inhibitörü olduğunu göstermişlerdir (133). Fibroblast büyüme faktörü ve VEGF'nin, endotel hücrelerden MMP ve ürokinaz tipi plasminojen aktivatörlerinin (uPA) salınımını arttırdığı, böylece damar duvarında bazal membran degradasyonuna neden olduğu, neovaskülarizasyonu tetiklediği bilinmektedir. Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Apigenin'in, hem endojen anjiogenez inhibitörleri olan doku metalloproteinaz inhibitörü-1 ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 regülasyonu, hem de VEGF ile stimüle olan MMP ve uPA aktivasyonunun engellenmesi ile anti-anjiogenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (132). Bir diğer çalışmada, Apigenin'in anjiogenezde

görev alan FGF reseptörünü protein kinaz C inhibisyonu ile engellediği gösterilmiştir (146).

Çalışmalarda Apigenin'in endotel hücrelerinde ve akciğer, prostat, over kanserlerinde hipoksi ile indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 $\alpha$  inhibisyonu aracılığı ile angiogenezi baskıladığı gösterilmiştir (61, 140-142).

Osada ve arkadaşları, Apigenin'in insan umbilikal arter endotel hücre (HUAEC) ve Hep3B hücrelerinde, şaperon proteini, ısı şok proteini 90 (Hsp90)'nın HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanmasını bozarak HIF-1 $\alpha$  degradasyonuna neden olduğunu ve böylece hipoksi ile indüklenen VEGF mRNA ve EPO mRNA ekspresyonunu baskıladığını, göstermişlerdir (61).

Liu ve arkadaşları, Apigenin'in angienez ve VEGF ekspresyonunda aracılık eden Akt sinyal yolunu inhibe ettiğini, hem in vitro hem in vivo VEGF ve HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu azalttığını ve bu sırada kültür hücrelerinde apoptoza neden olmadığını göstermişlerdir (142).

İnflamasyon ve angienez arasında yakın ilişki olduğu bilinmektedir (147, 148). Retinal neovaskülarizasyonla seyreden hastalıklarda inflamasyon patogeneze oldukça önemli bir yer tutmaktadır. İnterlökin-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , PDGF'nin VEGF aracılı angienezde önemli desteği olduğu bilinmektedir (149, 150). İnflamasyon sürecinin endotel hücrelerini uyarak angiogenezi stimüle ettiği bilinmektedir (151). İnflamasyonda görev alan multifonksiyonel bir sitokin olan IL-6'nın doku iyileşmesi sürecinde vaskülarizasyonu desteklediği, angienezde oldukça önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (152). İnterlökin-6 bu etkisini Janus kinaz/ transkripsiyon sinyal iletim ve aktivatörleri (JAK/STAT) kaskadının aktivasyonu, böylece STAT-3 aktivasyonu ve bunun sonucunda VEGF ekspresyonunun artışı ile sağlamaktadır (153, 154). Lamy ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Apigenin'in IL-6R $\alpha$  gen ekspresyonunu azalttığı, JAK/STAT-3 ve MAPK sinyal yollarını bozduğu ve böylece IL-6'nın potent bir inhibitörü olduğu göstermiştir. Apigenin'in bu etkisinin, insan vasküler endotel hücre kültüründe migrasyon, proliferasyonu ve farklılaşmayı belirgin olarak azalttığını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada, Apigenin'in, IL-6'nın inhibisyonu ile endotel hücre tomurcuklanması ve migrasyonunda önemli rol oynayan MMP-2 salınımında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (143).



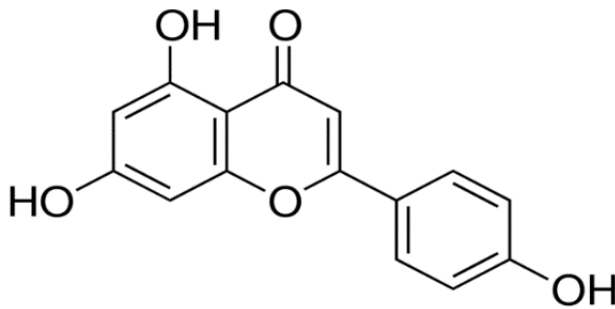
Mirzoeva ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Apigenin'in TGF- $\beta$  tarafından uyarılan SMAD-2 ve SMAD-3 proteinlerinin aktivasyonunu inhibe ettiği ve ayrıca Sarkom ilişkili kinaz/Fokal adezyon kinaz/Akt yolunu etkilediği, böylece VEGF inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir (144).

Lamy ve arkadaşları, Apigenin'in, in vivo olarak FGF-2 ve VEGF ile indüklenen anjiogenezi baskıladığını göstermişlerdir. Ayrıca, HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu arttırdığı bilinen PDGF reseptörü PDGFR- $\beta$  aktivitesini inhibe ettiğini ve böylece vasküler düz kas hücrelerinin göçü, invazyonu ve VEGF ekspresyonunu azaltarak anjiogenezi etkilediğini kanıtlamışlardır (145).

Zou ve arkadaşları, Apigenin'in insan umbilikal ven endotel hücre ve koroidal endotel hücre kültürlerinde, endotel hücrelerinin proliferasyon ve göçünü azalttığını göstermiştir. Ayrıca, laser ile indüklenen koroidal neovaskülarizasyon rat modelinde 4 hafta boyunca 15 ve 30 mg/kg intraperitoneal Apigenin enjeksiyonunun koroidal neovaskülarizasyon gelişimini kontrol grubuna göre sırasıyla %84.5 ve %83.6 oranında azalttığı gösterilmiştir (7).

Zou ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında Apigenin'in oküler kan akımını arttırdığı ve iskemik hasara uğramış rat gözlerinde 10 mg/kg intraperitoneal dozda verildiğinde elektroretinografide b dalgasında iyileşme sağladığı gösterilmiştir (155).

Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak biz çalışmamızda, Apigenin'in kanıtlanmış anti-anjiyogenik etkisinden iskemik retinal neovasküler hastalıkların tedavisinde faydalanılabileceğine dair hipotezimizi araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, Smith ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş in vivo OER fare modelinde intravitreal ve intraperitoneal Apigenin enjeksiyonunun retina morfolojisine, neovaskülarizasyona ve apoptozise etkisini inceledik (16).



Şekil 2.6.1. : Apigenin'in kimyasal yapısı

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Hayvan Deneyi Protokolü

Tüm deneyler Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu Hayvan Hakları komitesinin onayı ve Etik Kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi (Proje No: DA15/19, Onay Tarihi: 15/06/2015). Deneyler Smith ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdikleri in vivo OIR fare modelinde C57BL/6J fare kullanılarak gerçekleştirildi (16). Yeni doğan C57BL/6J ırkı fareler anneleriyle birlikte postnatal 7. güne kadar oda ortamında yaşadıkdan sonra, anneleriyle birlikte postnatal 7-12. günler arasında  $75 \pm 2$  oksijene tabi tutuldu. Postnatal 12. günde fareler tekrar oda ortamına ( $21$  oksijen) alındı. Aynı gün fareler tartılarak, ketamin hidroklorür (40mg/kg) ve Xylazine hidroklorür (5mg/ml) intraperitoneal enjeksiyonu ile derin anestezi yapıldı. İntravitreal ve intraperitoneal enjeksiyonlar için, maydonozdan derive edilmiş ticari Apigenin tozu (Sigma Aldrich) literatürde önerildiği gibi dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek elde edilen solüsyonlar kullanıldı.

Çalışmamızda kullanılan C57BL/6J farenin vücut ağırlığı enjeksiyon döneminde yaklaşık 5-7 gr ve glob hacmi 5.3 µl olarak verilmektedir. Çalışmaya postnatal 17. gün 6.3-7.5 gr aralığında olan fareler dahil edilmiştir (156).

Literatürde C57BL/6J fareler için Apigenin'in intraoküler ve intravitreal enjeksiyon uygulanmasına dair çalışmalar mevcut değildir. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada RPE hücre kültüründe 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 ve 100 µM dozda kullanılan Apigenin'in doza bağımlı olarak VEGF sekresyonunu azalttığı, ancak 100 µM doza çıktığında nekroza neden olduğu gösterilmiştir. Zou ve arkadaşlarının çalışmasında ise insan umbilikal ven endotel hücre kültürü ve koroidal hücre kültüründe, 1, 3 ve 10 µg/ml kullanılan Apigenin'in, 3 ve 10 µg/ml dozlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde endotel hücresi proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir. Biz çalışmamızda intravitreal enjeksiyon dozu olarak 10 µg/ml ve 20 µg/ml kullandık.

Apigenin intraperitoneal uygulaması için, literatürde farelerde yapılan bir çalışma olmamasına karşın, Zou ve arkadaşları tarafından laser ile indüklenen koroidal neovaskülarizasyon rat modelinde intraperitoneal enjeksiyon dozları 5, 15 ve 30 mg/kg olarak verilmektedir ve 5 mg/kg doz uygulandığında yeterli etkinlik sağlanamazken, 15 ve 30 mg/kg dozlarda belirgin anti-anjiyogenik etki izlenmiştir. Biz çalışmamızda intraperitoneal dozlarımızı 10 mg/kg ve 20 mg/kg olarak belirledik.

Analizlerimiz için fareler 10 grupta incelendi:

**Grup-A:** Negatif kontrol grubu, oksijene tabi tutulmamış ve işlem görmemiş

**Grup-B:** Kontrol grubu, 1 µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmamış

**Grup-C:** Kontrol grubu, oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş

**Grup-D:** Kontrol grubu, 1 µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş

**Grup-E:** 10 µg/ml Apigenin intravitreal enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş

**Grup-F:** 20 µg/ml Apigenin intravitreal enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş

**Grup-G:** 10 mg/kg Apigenin intraperitoneal enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş

**Grup-H:** 20 mg/kg Apigenin intraperitoneal enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş

**Grup-I:** Kontrol grubu, 3 µl intraperitoneal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmamış

**Grup-J:** Kontrol grubu, 3 µl intraperitoneal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş

İntravitreal enjeksiyonlar uygulanırken, 1 µl intravitreal Apigenin enjeksiyonu farenin bir gözüne 32 gauge iğne ve Hamilton şırıngası ile stereoskopik mikroskop altında korneoskleral bölgede saat 6 hizasından enjekte edildi. Otuz beş adet C57BL/6J fare postnatal 7-12. günler arasında %75±2 oksijene tabi tutuldu. On ikinci gün 5 farenin sağ gözüne (Grup-D, n=5 göz) 1 µl intravitreal steril DMSO, 5 farenin sağ gözüne 10 µg/ml intravitreal Apigenin (IVA) (Grup-E, n=5 göz), 5 farenin sağ gözüne 20 µg/ml (Grup-F, n=5 göz) IVA, 5 fareye 10 mg/kg intraperitoneal Apigenin (IPA) (Grup-G, n=5) ve 5 fareye 20 mg/kg IPA (Grup-H, n=5), 5 fareye 3 µl intraperitoneal DMSO solüsyon (Grup-J, kontrol grubu, n=5) enjekte edildi. Beş tane yaş uyumlu işlem görmemiş, oda ortamında tutulmuş fare (Grup-A, n= 5 göz) negatif kontrol grubunu oluşturdu. Kontrol grubunda oda ortamında tutulmuş 5 farenin sağ gözüne 1 µl intravitreal steril DMSO (Grup-B, n=5 göz), 5 fareye 3 µl intraperitoneal DMSO solüsyonu (Grup-I, kontrol grubu, n=5) enjeksiyonu yapıldı.

Fareler postnatal 12-17. günlerinde oda ortamında tutuldu ve postnatal 17. gün intraperitoneal ketamin hidroklorür (100 mg/kg) ve Xylazine hidroklorür (5 mg/ml) enjeksiyonunu takiben sakrifiye edildi ve gözler enükle edildi. Enükle edilmiş gözlerde histolojik/morfolojik inceleme ışık mikroskopi ve ultrastrüktürel inceleme elektron mikroskopi (her grupta 3 göz) ile gerçekleştirildi. Apoptotik aktivite, terminal deoksinükleotidil transferaz deoksi-UTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile incelendi. Bu TUNEL çalışması, ışık mikroskopi için hazırlanmış olan parafin kesitlerinin 3. kesiti kullanılarak yapıldı (her grupta 3 göz).

### **3.2. Işık Mikroskopik İnceleme**

Işık mikroskop incelemesi için gözler enükleasyon sonrası %4 paraformaldehid çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde retinal kesitler alındı. Optik sinirden sonra ikinci veya üçüncü kesitler incelemeler için kullanıldı. Kesitlere, retinal neovaskülarizasyonun kantitatif analizi ve morfolojik inceleme için *periodic acid-schiff* (PAS) ve hematoksilin eosin (HE) boyama uygulandı. Neovaskülarizasyon internal limitan membran (ILM)'ın vitreus tarafındaki endotelial hücre proliferasyonunun bir kesitteki sayımı ile kantifiye edildi.

Morfolojik incelemede retinanın çeşitli katmanları kistik dejenerasyon, hücre kaybı ve nükleer tabaka incilmesi açısından değerlendirildi.

Kesitler ışık mikroskopi (OLYMPUS BX51, Germany) kullanılarak analiz edildi.

Retinal neovaskülarizasyonun değerlendirilmesinde sonuçlar endotelial hücre çekirdek sayısı ortalaması  $\pm$  standart deviasyon (SD) olarak verildi.

### **3.3. Elektron Mikroskopik İnceleme**

Elektron mikroskopi incelemesi için retinal doku %2,5 gluteraldehit içeren fosfat tampon çözeltisinde 2-3 saat bekletildikten sonra %1 osmium tetraoksit (OsO<sub>4</sub>) içinde fikse edildi. Alkole seri olarak muamele edilerek dehidrate edildi. Propilen oksite geçtikten sonra örnekler Araldit CY 212, 2-dodesenil süksinik anhidrit, benzildimethyl amin, dedibutilpatalat içinde bekletildi. Semi-ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelendi. Ultra-ince kesit alınarak, uranil asetat ve lead sitrat ile boyanarak LEO 90 EM transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

### **3.4. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı Deoksi-UTP Nick End Labeling Tekniği**

Gözler enükleasyon sonrası %4 paraformaldehit çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde retinal kesitler alındı. Optik diskten sonra ikinci veya üçüncü kesit incelemeler için HE ile boyandı. Her gözden bir kesit analiz edildi. Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksi-UTP nick end labeling (TUNEL) çalışması “In Situ Cell Death Detection Kit, AP, ROCHE Diagnostics GmbH, Mannheim” ile gerçekleştirildi. Apoptotik TUNEL pozitif hücreler her kesit üzerinde randomize seçilmiş alanlarda 100x büyütme (immersiyon yağı) ile tarandı. Apoptotik TUNEL pozitif hücreler 10 randomize seçilmiş alanda sayıldı.

Tüm biyomikroskopik ve elektron mikroskopik incelemeler iki bağımsız araştırmacı tarafından çift kör olarak gerçekleştirildi.

### **3.5. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler için IBM<sup>R</sup> SPSS<sup>R</sup> Statistics 17.0 (SPSS Inc, Chicago IL, USA) kullanıldı. Gruplar arası analizler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı, anlamlı değerlerde ( $p < 0.05$ ) post-hoc analiz yapıldı ve gruplar aralarında karşılaştırıldı.

Gruplardaki hayvan sayısı literatürde yapılmış ön çalışmalarda verilen önerilere göre belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İn vivo Oksijen Endükte Retinopati Fare Modelinde İnvitreal Apigenin Enjeksiyonunun Farklı Konsantrasyonlarda Retinal Endotelyal Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Hiperoksi endükte neovaskularizasyon gelişimi retinal parafin kesitlerinde ILM'nin vitreus tarafındaki endotelyal hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edildi (Şekil 4.1.1.). Negatif kontrol grubu (Grup-A) ve invitreal DMSO uygulanan kontrol grubunda (Grup-B) retinal ILM'nin vitreus tarafında endotel hücre çekirdeği gözlenmedi (Şekil 4.1.2.). Grup-A ve Grup-B karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ( $p=1.00$ ).

Oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-C) ve oksijene tabi tutulmuş, invitreal DMSO uygulanmış kontrol gruplarında (Grup-D) retinal ILM'nin vitreus tarafında sırasıyla  $24.33\pm 3.8$  ve  $22.67\pm 2.7$  endotel hücre çekirdeği gözlendi (Şekil 4.1.2.). Grup-C ve -D karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.20$ ).

Grup-A ve -C karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ). Grup-B ve -D karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ).

Oksijene tabi tutulmuş,  $10 \mu\text{g/ml}$  invitreal Apigenin uygulanmış grupta (Grup-E) ve oksijene tabi tutulmuş,  $20 \mu\text{g/ml}$  invitreal Apigenin uygulanmış grupta (Grup-F) retinal ILM'nin vitreus tarafında sırasıyla  $14.67\pm 1.86$  ve  $5.17\pm 0.75$  endotelyal hücre çekirdeği gözlendi (Şekil 4.1.2.). Grup-E ve -F karşılaştırıldığında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı fark izlendi ( $p<0.0001$ ).

Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-E ve -F'de endotelyal hücre çekirdeği sayısında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu izlendi (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ). Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-E'de endotelyal hücre çekirdeği sayısının %39.71 ve Grup-F'de %78.76 oranında azaldığı tespit edildi.

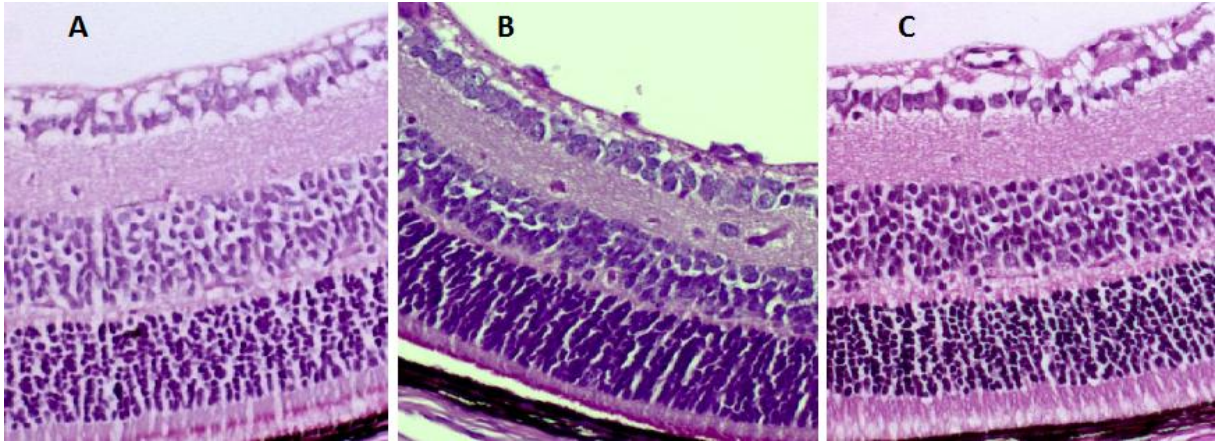
Oksijene tabi tutulmuş,  $10 \text{mg/kg}$  intraperitoneal Apigenin uygulanmış grupta (Grup-G)  $15.50\pm 2.25$ ; oksijene tabi tutulmuş,  $20 \text{mg/kg}$  intraperitoneal Apigenin uygulanmış grupta (Grup-H) ise  $4.83\pm 2.22$  endotel hücre çekirdeği izlendi (Şekil 4.1.2.). Grup-G ve -H

karşılaştırıldığında iki grup arasında endotel hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ).

Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-G ve -H'de endotelial hücre çekirdeği sayısında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu izlenmiştir (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ). Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-G'de endotelial hücre çekirdeği sayısının %36.30, Grup-H'de ise %80.15 oranında azaldığı gözlemlendi.

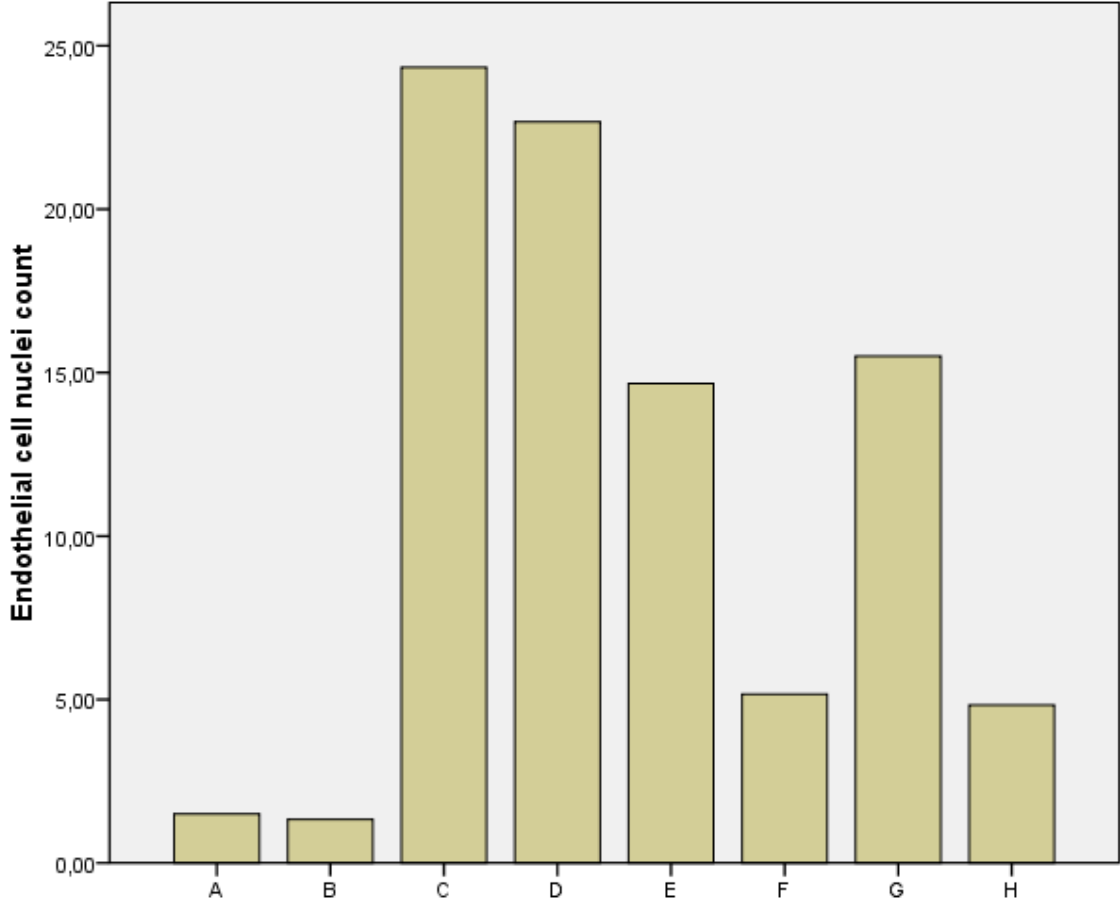
Grup-I, Grup-A ve Grup-B'de endotelial hücre çekirdeği sayısı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.90$ ).

Grup-J, Grup-C ve Grup-D'de endotelial hücre çekirdeği sayısı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.90$ ).



#### Şekil 4.1.1. : Işık mikroskopi kesitleri

**A.** Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup-A) C57BL/6J fare retinasının ışık mikroskopi kesitleri görülmektedir. **B.** Postnatal 7-12. günler arasında hiperoksiye tabi tutulan işlem görmemiş kontrol grubunda ILM iç yüzünde endotel hücreleri görülmektedir. **C.** Postnatal 7-12. günler arasında hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 10 µg/ml Apigenin uygulanmış (Grup-E) C57BL/6J fare retinasının ışık mikroskopi kesitleri görülmektedir (PAS & HE, 20x).



**Şekil 4.1.2. : Grup-A-H’de ışık mikroskopi ile neovaskülarizasyonun kantitatif analizi**

Neovaskülarizasyon internal limitan membranın vitreusa bakan yüzeyindeki vasküler hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edilmiştir ve diyagramda gruplarda vasküler hücre çekirdeklerinin sayısının değeri ortalama olarak verilmiştir.

#### **4.2. Işık Mikroskopi ile Morfolojik Analiz**

Retina katmanlarının morfolojik analizinde negatif kontrol grubunda, intravitreal ve intraperitoneal DMSO uygulanan gruplarda ve Apigenin gruplarında kistik dejenerasyon veya hücre kaybı tespit edilmedi (Bkz. Şekil 4.1.1).

#### **4.3. Elektron Mikroskopi ile Ultrastrüktürel Analiz**

Elektron mikroskopik incelemede utrastrüktürel morfolojik değişiklikler ile özellikle iç ve dış fotoreseptör bölgesindeki mitokondriler değerlendirildi. Mitokondriyal dismorfolojiyi kantifiye edebilmek için atipik mitokondriler belirlendi. Yoğun litik-benekli matriks ve kristalizis içeren mitokondriler “atipik mitokondri” olarak değerlendirmeye alındı. Tüm



gruplarda 6000x büyütme ile seçilmiş bir görüş alanında bulunan atipik mitokondri sayısı belirlendi (Şekil 4.3.1.).

Negatif kontrol grubunda (Grup-A) ve Grup-B’de mitokondriler dahil, belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı. Oksijene tabi tutulmuş kontrol grupları olan Grup-C ve -D’de fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptandı. Grup-C’de  $11.83 \pm 1.47$ , Grup-D’de ise  $13.00 \pm 0.89$  atipik mitokondri sayıldı (Şekil 4.3.2.). İki grup karşılaştırıldığında atipik mitokondri sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.11$ ).

Grup-A ve -C karşılaştırıldığında atipik mitokondri sayısının Grup-C’de istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ). Grup-B ve -D karşılaştırıldığında atipik mitokondri sayısının Grup-D’de istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ).

Oksijene tabi tutularak düşük doz intravitreal Apigenin uygulanan Grup-E ve oksijene tabi tutularak yüksek doz intravitreal Apigenin uygulanan Grup-F’de sırasıyla  $2.50 \pm 1.05$  ve  $6.33 \pm 1.21$  atipik mitokondri sayıldı (Şekil 4.3.2.). Grup-E ve -F karşılaştırıldığında atipik mitokondri sayısında istatistiksel anlamlı fark olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ).

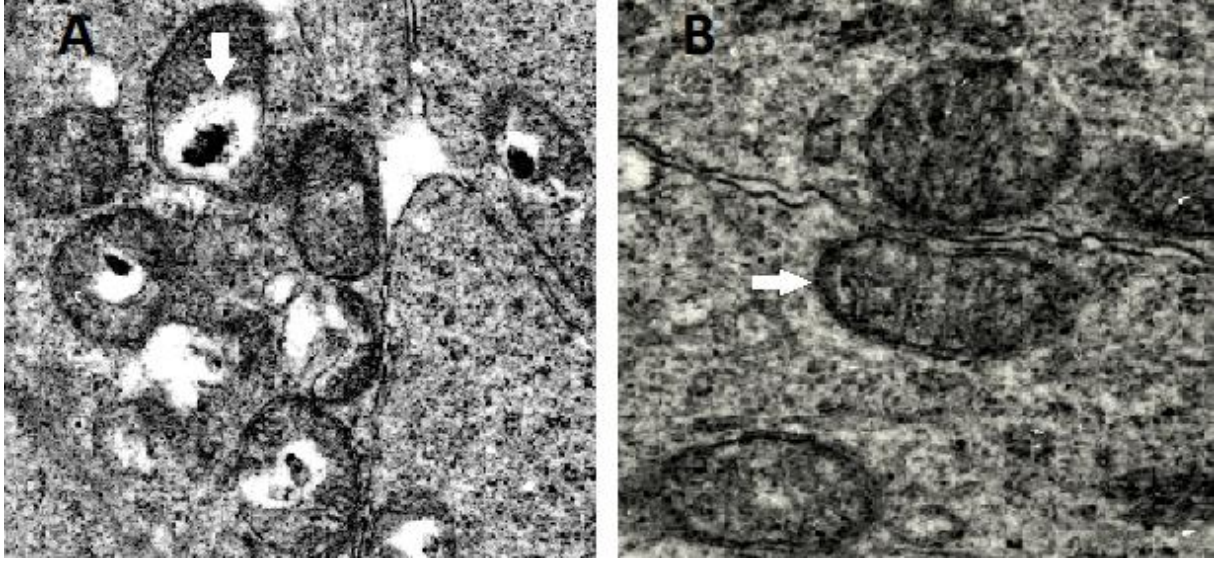
Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-E ve -F’de atipik mitokondri sayısında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu izlendi (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ). Grup-D ile karşılaştırıldığında, Grup-E ve -F’de atipik mitokondri sayısında her iki grup karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu izlendi (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ). Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-E’de atipik mitokondri sayısının % 78.87 ve Grup-F’de % 46.75 oranında azaldığı tespit edildi.

Oksijene tabi tutularak düşük doz intraperitoneal Apigenin uygulanan Grup-G’de  $2.67 \pm 0.82$ , oksijene tabi tutularak yüksek doz intraperitoneal Apigenin uygulanan Grup-H’de ise  $6.67 \pm 1.86$  atipik mitokondri saptandı (Şekil 4.3.2.). Grup-G ve -H karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ).

Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-G ve -H’de atipik mitokondri sayısında her iki grup ile karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu izlendi (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ).

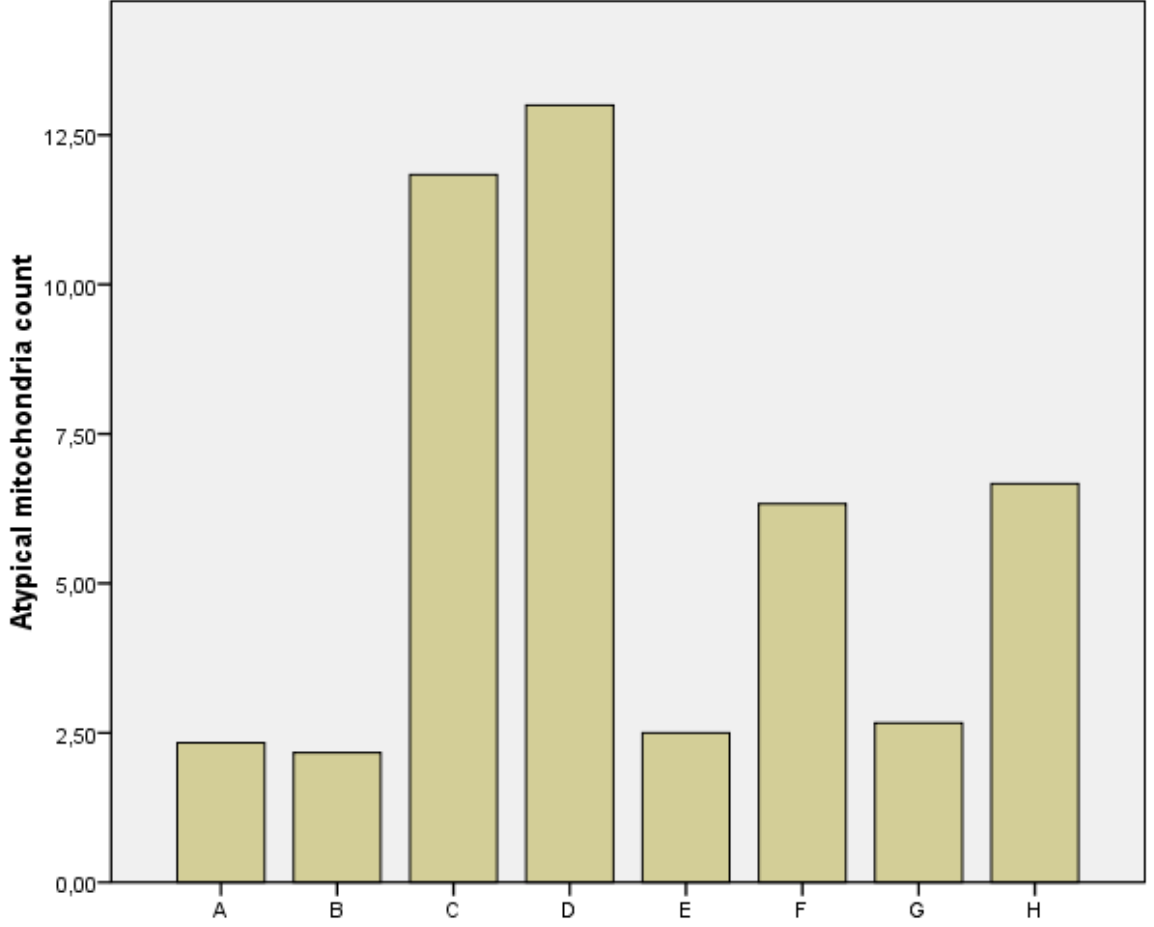
Grup-I, Grup-A ve Grup-B’de atipik mitokondri sayısı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.90$ ).

Grup-J, Grup-C ve Grup-D’de atipik mitokondri sayısı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.90$ ).



#### Şekil 4.3.1. : Elektron mikroskopi kesitleri

**A.** Fotreseptör iç segment bölümünde irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren atipik mitokondrilerin (beyaz ok) izlendiği, hiperoksi maruziyeti sonrası işlem görmemiş Grup-C’ye ait elektron mikroskopi kesiti görülmektedir. **B.** Mitokondrilerde tipik çift membranlı tübüler transvers düzenli mitokondrial kristalların (beyaz ok) izlendiği, hiperoksi maruziyeti sonrası Apigenin enjeksiyonu yapılan Grup-E’ye ait elektron mikroskopi kesiti görülmektedir (6000x).



**Şekil 4.3.2. : Grup-A-H’de elektron mikroskopi ile atipik mitokondrilerin kantitatif analizi**

Elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler değerlendirilmiş ve diyagramda gruplardaki atipik mitokondri sayıları ortalama olarak verilmiştir.

#### **4.4. TUNEL Tekniği ile Apoptosis Analizi**

Negatif kontrol grubunda (Grup-A) ve Grup-B’de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL pozitif hücre tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0.78$ ).

Grup-C ve -D’de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL pozitif hücre tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0.70$ ). Grup-A ve -C karşılaştırıldığında apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısı arasında

istatistiksel anlamlı fark izlenmedi ( $p=0.16$ ). Grup-B ve -D karşılaştırıldığında apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısında anlamlı fark olmadığı izlendi ( $p=0.58$ ).

Oksijene tabi tutularak düşük doz intravitreal Apigenin uygulanan Grup-E ve oksijene tabi tutularak yüksek doz intravitreal Apigenin uygulanan Grup-F'de sırasıyla  $0.33\pm 0.52$  ve  $0.17\pm 0.41$  apoptotik TUNEL pozitif hücre sayıldı (Şekil 4.4.1.). Grup-E ve -F karşılaştırıldığında apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel anlamlı fark olmadığı izlendi ( $p=0.74$ ).

Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-E ve -F'de apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısında anlamlı azalma olduğu izlendi (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ) (Şekil 4.4.2.). Grup-D ile karşılaştırıldığında, Grup-E ve -F'de apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma olduğu izlendi (her iki karşılaştırma için  $p<0.0001$ ).

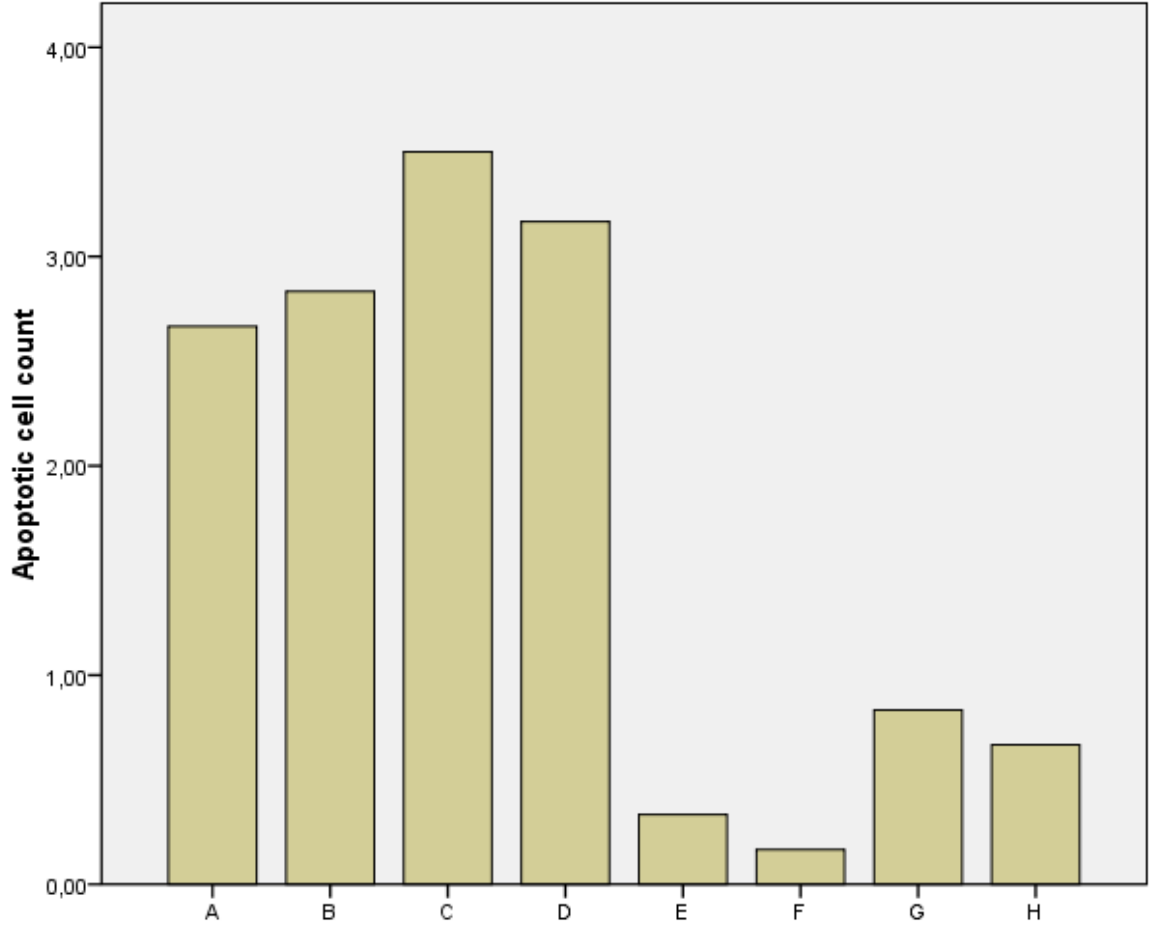
Oksijene tabi tutularak düşük doz intraperitoneal Apigenin uygulanan Grup-G'de  $0.83\pm 0.75$ , oksijene tabi tutularak yüksek doz intraperitoneal Apigenin uygulanan Grup-H'de ise  $0.67\pm 0.82$  apoptotik TUNEL pozitif hücre saptandı (Şekil 4.4.1.). Grup-G ve -H karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı izlendi ( $p=0.74$ ).

Grup-C ile karşılaştırıldığında, Grup-G ve -H'de apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel anlamlı azalma olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ).

İntravitreal ve intraperitoneal Apigenin uygulanan gruplar olan Grup-E ve -G, Grup-E ve -H, Grup-F ve -G, Grup-F ve -H kendi aralarında karşılaştırıldığında, hiçbir grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık izlenmedi (sırasıyla  $p=0.31$ ;  $p=0.50$ ;  $p=0.18$ ;  $p=0.31$ ).

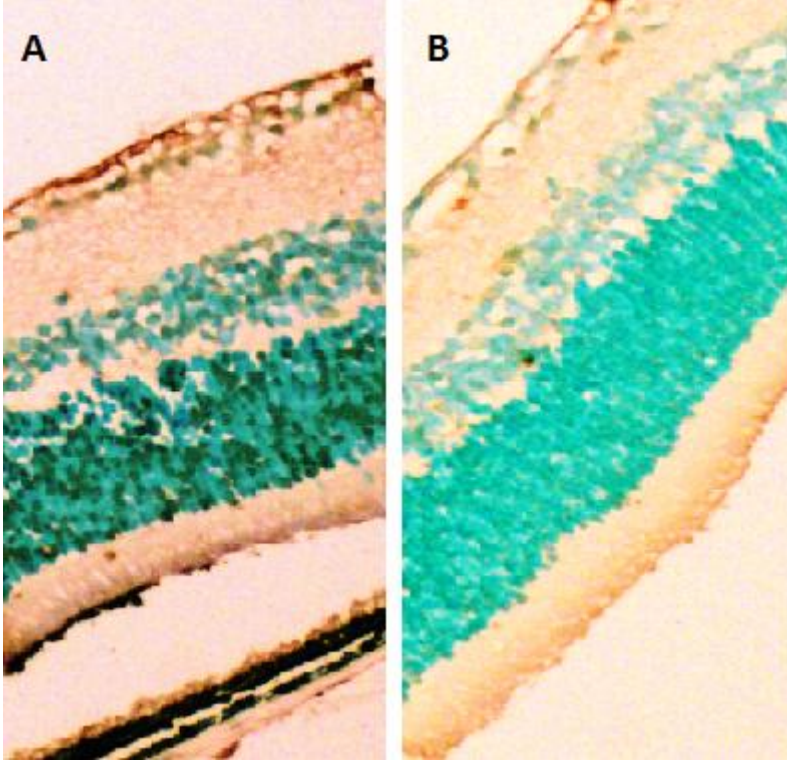
Grup-I, Grup-A ve Grup-B'de apoptotik TUNEL-pozitif hücre sayısı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.90$ ).

Grup-J, Grup-C ve Grup-D'de apoptotik TUNEL-pozitif hücre sayısı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0.90$ ).



**Şekil 4.4.1. : Grup-A-H’de apoptotik hücrelerin kantitatif analizi**

TUNEL tekniği ile apoptotik aktivite analizi gerçekleştirilmiş ve diyagramda gruptaki apoptotik hücre sayıları ortalama olarak verilmiştir.



**Şekil 4.4.2. : TUNEL tekniği ile apoptotik hücrelerin analizi**

**A.** Postnatal hiperoksi maruziyeti sonrası işlem görmemiş Grup-C fare retinasında TUNEL tekniği ile iç ve dış nükleer tabakada koyu renkli olarak görülen yoğun apoptotik hücreler izlenmektedir. **B.** Oksijene tabi tutulan ve intravitreal Apigenin enjeksiyonu yapılan Grup-E fare retinasında apoptotik TUNEL pozitif hücre sayısının belirgin olarak daha az olduğu izlenmektedir (TUNEL, 100x).

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda OER fare modelinde C57BL/6J ırkı fare kullanarak intravitreal ve intraperitoneal uygulanan Apigenin'in, retinal endotelial hücre proliferasyonuna, retinal morfolojik yapıya ve apoptozise olan etkisi incelendi.

Intravitreal uygulanan düşük ve yüksek doz Apigenin'in, doza bağlı olarak retinal endotelial hücre sayısını sırasıyla %37.71 ve %78.76 oranında azalttığı saptandı. Sistemik etkisi değerlendirilmek üzere düşük ve yüksek doz intraperitoneal uygulanan Apigenin'in doza bağlı olarak endotelial hücre sayısını sırasıyla %36.30 ve %80.15 oranında azalttığı saptandı. Önceki benzer çalışmalarda retinal endotelial hücre proliferasyonunun baskılanma oranı 0.625 µg intravitreal Bevacizumab (IVB) ile %67, 20 µg intravitreal triamsinolon (IVTA) ile %92, 1.25 µg IVB ile %93, 2.5 µg IVB ile %97 ve 40 µg IVTA ile %95 olarak saptanmıştır (113, 128). Bulgularımız Apigenin'in retinal endotelial hücreler üzerinde anti-anjiyogenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Literatürde, daha önce çeşitli çalışmalarda Apigenin'in anti-anjiyogenik özellikleri olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (7, 11, 13, 140-145). Neovaskülarizasyon; RVO, DRP, YBMD, PR başta olmak üzere her yaş grubunu ilgilendiren çok sayıda çeşitli oküler patolojilerde önemli rol oynamaktadır (1). Bu sebeple patolojik oküler neovaskülarizasyon üzerinde sıklıkla çalışılmaktadır ve bu durum anjiyogenez sürecinde altta yatan pro-anjiyogenik faktörlerin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Özellikle retinal ve korneal neovasküler hastalıklarda hipoksi ve iskemi ile tetiklenen bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 ve VEGF, PDGF, PGF başta olmak üzere birçok mediatörün temel rolü oynadığı bilinmektedir (65).

Anjiyogenezi ve apoptozu tetikleyen önemli faktörlerden biri de inflamatuvar süreç ve bu süreçte üretilen çeşitli sitokinlerdir. İnflamasyon sürecinin endotel hücrelerini uyararak anjiyogenezi stimüle ettiği bilinmektedir (151). Apigenin'in çeşitli mekanizmalar üzerinden anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği bilinmektedir (143, 144). Mirzoeva ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Apigenin'in TGF-β tarafından uyarılan SMAD-2 ve SMAD-3 proteinlerinin aktivasyonunun inhibisyonu ve Sarkom ilişkili kinaz/Fokal adezyon kinaz/Akt yolunu etkilemesi ile VEGF inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (144). Sato ve arkadaşlarının çalışmasında PR olgularında 27 sitokinin vitreustaki seviyesi incelenmiş ve IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, eotaksin, FGF, granülosit-koloni stimülan faktör, granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör, interferon-γ-indüklenebilir protein-10,

siklooksijenaz gibi faktörlerin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu mediatörlerin preretinal neovaskularizasyonun gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (6). Prematüre retinopatisi Faz-II gelişiminde inflamatuvar mediatörler önemli rol oynamaktadır. Prematüre retinopatisi gelişen gözlerde postnatal 0-3. günde sistemik IL-6 ve C-reaktif protein seviyelerinin yüksek, nörotrofin-4 ve IL-17 seviyelerinin düşük seyrettiği, postnatal 7-21. gün IL-18 seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür (157). İnflamasyonda görev alan multifonksiyonel bir sitokin olan IL-6'nın doku iyileşmesi sürecinde vaskularizasyonu desteklediği, angiogenezde oldukça önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (152). Lamy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Apigenin'in potent bir IL-6 inhibitörü olduğunu ve böylece vasküler endotel hücre kültüründe migrasyon, proliferasyonu ve farklılaşmayı belirgin olarak azalttığını belirtmişlerdir (143). Çalışmamızda OER in vivo fare modelinde Apigenin uygulanması ile elde ettiğimiz verilere dayanarak prematüre bebeklerde sistemik veya intraoküler Apigenin tedavisinin antiinflamatuvar ve/veya antiproliferatif etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Melstrom ve arkadaşları, insan pankreas kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Apigenin'in, HIF-1 $\alpha$  ve VEGF'nin hem transkripsiyon hem de translasyon aşamasında hipoksi aracılı up-regülasyonunu engellediğini göstermişlerdir (13). Liu ve arkadaşları ise akciğer kanseri hücrelerinde Apigenin'in benzer şekilde HIF-1 $\alpha$  ve VEGF transkripsiyonunu engellediğini göstermişlerdir (142). Chen ve arkadaşlarının besinsel flavonodilerin insan RPE kültür hücrelerine etkisini inceledikleri araştırmada Apigenin'in doza bağımlı olarak VEGF salınımını azalttığı gösterilmiştir (12). Lamy ve arkadaşlarının çalışmasında Apigenin'in, PDGFR- $\beta$  aktivitesi inhibisyonu aracılığıyla düz kas hücresi migrasyonu, invazyonu ve VEGF sekresyonunu azalttığı izlenmiştir (145). Fang ve arkadaşları, Apigenin'in HIF-1 ve VEGF ekspresyonunun inhibisyonu aracılığıyla tümör angiogenezini azalttığını göstermişlerdir (141). Mirzoeva ve arkadaşları ise, Apigenin'in TGF- $\beta$  aracılı VEGF salınımını azalttığını ortaya koymuşlardır (144). Zou ve arkadaşları ise, Apigenin'in hem insan umbilikal ven endotel hücre kültürü hem de koroidal endotel hücre kültürü üzerinde proliferasyon ve migrasyonu engelleyici etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (7). Ayrıca, laser ile indüklenen koroidal neovaskularizasyon rat modelinde intraperitoneal Apigenin enjeksiyonunun koroidal neovaskularizasyon gelişimini kontrol grubuna göre belirgin oranda azalttığı gösterilmiştir (7). Çalışmamızda gösterdiğimiz Apigenin'in anti-anjiyogenik etkisinin literatürdeki çalışmalar ışığında başta HIF-1 $\alpha$  olmak



üzere VEGF salınımını etkileyen sinyal yolları ve anti-inflamatuar etkiler aracılığıyla ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda pigmente dokuya sahip olan C57BL/6J fare ırkında OER modelinde 10 µg/ml ve 20 µg intravitreal ile 10 mg/kg ve 20 mg/kg intraperitoneal uyguladığımız Apigenin'in, ışık mikroskopik incelemede retina katmanlarında histolojik kesitlerde belirgin değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda Apigenin'in belirgin toksisitesinin olmadığı ve normal hücreler üzerinde belirgin etkisinin olmadığı gösterilmiştir (138, 139). Çalışmamızdaki bulgularımız bu verilerle uyumludur. Literatürde henüz yeterli sayıda oküler veya intravitreal Apigenin uygulaması ile in vivo ve/veya in vitro çalışmalar mevcut değildir. Bu sebeple etkin doz ve yan etki profili analizi için prospektif intravitreal Apigenin uygulamasını içeren farmakokinetiğe yönelik çalışmalar ile dozların incelenmesi gerekmektedir.

Oksijen endükte retinopati modelinde hiperoksi deprivasyonu dokuda relatif hipoksiye neden olmakta ve oluşan hipoksi mitokondrilerde şişme, krista fragmentasyonu, matriks kondansasyonu, iç/dış membran ayrılmasına neden olmaktadır (158). Mitokondrilerin iç yapısı, fizyolojik aktiviteleri gereği hipoksi, hiperoksi, tedavi amaçlı kullanılan ajanlar gibi stres sinyallerine cevap olarak değişkenlik gösterir (159). Oluşan stres seviyesi mitokondride morfolojik ve fonksiyonel değişikliği belirlemektedir. Oluşan değişiklikler hücrenin kurtulmasına veya apoptozise neden olur (160). Çalışmamızda hiperoksi durumuna maruz bırakılmayan negatif kontrol grubu (Grup-A) ve hiperoksiye maruz bırakılmayarak yalnızca intravitreal DMSO uygulanan grupta (Grup-B) morfolojik değişiklik izlenmemiştir. Literatürle uyumlu olarak OER grubunu oluşturan kontrol grubunda (Grup-C) ise elektron mikroskopik ultrastrüktürel morfolojik incelemede fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptanmıştır. Benzer değişiklikler OER oluşturulan ve yalnızca intravitreal DMSO uygulanan kontrol grubunda da izlenmekte olup iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir. Hiperoksiye maruz kalan grupta tespit edilen bulgular C57BL/6J ırkı farenin retinal hiperoksi maruziyeti ile indüklenen mitokondriyal vulnerabilitesi olduğunu, DMSO uygulamasının ise mitokondriler üzerinde bağımsız olarak ek olumsuz etki yapmadığını göstermektedir.

Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, oküler neovaskülarizasyon oluşumunda birbiriyle iç içe geçmiş birçok mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmaların önemli bir basamağını oksidatif strese bağlı mediatörlerin hücrenin çeşitli yapıları üzerinde yarattığı hasar oluşturmaktadır. Çalışmamızda düşük doz ve yüksek doz intravitreal ve intraperitoneal Apigenin uygulanan gruplarda, oksijene tabi tutularak Apigenin uygulanmayan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde atipik mitokondri sayılarında azalma olduğu izlenmiştir. Bu durum, Apigenin'in mitokondriler üzerinde sitoprotektif etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda Apigenin uygulanan gruplarda oksijene tabi tutulan kontrol gruplarına göre mitokondriyal değişikliklerin daha az yoğunlukta izlenmesinin, Apigenin'in mitokondriler üzerindeki oksidatif strese karşı koruyucu etkisini in vivo olarak göstermesi açısından literatüre katkı sunacağını düşünmekteyiz. Apigenin uygulanan gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında, yüksek doz intravitreal ve intraperitoneal Apigenin uygulanan gruplarda düşük doz Apigenin uygulanan gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek atipik mitokondri oranları olduğu izlenmiştir. Bu durumun, Apigenin'in düşük doz ve yüksek dozda sitoprotektif etkinliğinin olduğu; ancak yüksek dozlarda bu etkinliğin azaldığı olarak yorumlanabileceğini düşünmekteyiz.

Apigenin'in önceki çalışmalarda biyolojik aktiviteleri arasında anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-apoptotik, anti-karsinojenik, anti-mutajenik etkileri olduğu literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (137). Çalışmamızda Apigenin uygulanan gruplarda anti-proliferatif etkilerin yanı sıra, elektron mikroskopide mitokondrilerin oksijene tabi tutulan diğer gruplara göre daha az hasarlandığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra apoptotik hareket Apigenin uyguladığımız grupta daha düşük saptanmıştır. Bu bulgular Apigenin'in anti-oksidatif etkilerini ve bunun sonucu olarak gelişen anti-apoptotik ve sitoprotektif etkilerini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda apoptotik hücre ölümünü incelemek için TUNEL çalışması uygulanmıştır. Tüm kontrol gruplarında benzer düzeyde apoptozis görülmüştür. Düşük ve yüksek doz, intravitreal ve intraperitoneal Apigenin uygulanan tüm gruplarda kontrol gruplarına kıyasla apoptozis oranlarında anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Düşük ve yüksek doz Apigenin uygulamaları arasında apoptozisin benzer oranda azaldığı izlenmiştir. İntravitreal ve intraperitoneal Apigenin uygulamaları arasında apoptozisin benzer oranda azaldığı izlenmiştir. Daha önceki benzer bir çalışmada Bevacizumab ile atipik mitokondrilerde artış saptanırken apoptotik aktivitenin ise anlamlı farklılık göstermediği belirtilmiş ve

Bevacizumab'ın bu sebeple geri dönüşümsüz hasara yol açmadığı belirtilmiştir (113). Bizim çalışmamızda ise Apigenin hem mitokondriyal atipiyi azaltmakta hem de tüm gruplarda kontrollere göre apoptotik aktiviteyi belirgin olarak azaltmaktadır. Apigenin'in anti-oksidatif ve anti-inflamatuar etkilerinin çeşitli mekanizmalarla hücresel ve mitokondriyal stresi azaltarak dismorfolojik bulguların önüne geçtiğini düşünmekteyiz. Bulgularımız Apigenin'in oksidatif yollardan ve mitokondriyal yollardan uyarılan apoptozis üzerindeki inhibe edici etkisini doğrulamaktadır.

Apoptozis programlı hücre ölümüdür (161). Apoptozis normal hücre döngüsü, immün sistemin normal fonksiyonu, hormon ilişkili atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal aracılı hücre ölümünün önemli bir bileşenidir (162). Çalışmamızda negatif kontrol grubunda ve oksijene maruz bırakılmayan kontrol gruplarında TUNEL çalışması ile fizyolojik apoptozis gözlemlenmiştir. Uygunsuz apoptozis nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve kanserlerde rol oynar (162). Apoptozisin iki temel mekanizması vardır; ekstrensek-reseptör aracılı yol ve intrinsek-mitokondriyal yol (163). Ekstrensek yol Fas ve TNF reseptörleri aktivasyonu ile gerçekleşir. Bu yolda kaspazlar (kaspaz 8 ve 3) aracılık etmektedir. İntrensek yol ise mitokondriyal membran potansiyeli ve mitokondriyal membran geçirgenliğinde değişiklik ile sitokrom c ve apoptozis indükleyen faktörlerin sitoplazmaya salınımı, bunun sonucunda kaspaz 9 ve 3 aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (164). Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. Bu durumda indüklenen p53, bir proapoptotik B hücreli lenfoma (Bcl)-2 ailesi üyesi olan Bax, Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır (165). Apoptozis büyüme faktörlerinin ortamdaki eksilmesiyle de başlatılabilir. Ayrıca bir proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması yoluyla da gerçekleşebilir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salınan granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (166, 167).

Literatürde Apigenin'in apoptozis ile ilişkisi hakkında çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bir kısım çalışmada Apigenin'in apoptozisi arttırdığı savunulurken bir kısım çalışmada ise aksine apoptozisi engellediği belirtilmektedir (142, 164, 168-174).

Liu ve arkadaşları tarafından Apigenin'in in vitro akciğer tümör hücresi kültüründe apoptozise neden olmadığı gösterilmiştir (142). Ancak aynı çalışmada in vivo olarak farelere akciğer tümörü hücresi ile birlikte uygulanan Apigenin'in ise, bu tümör hücrelerinde TUNEL tekniği ile tespit edilen apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Bu durumu Liu ve arkadaşları Apigenin'in in vivo ortamda anjiogenezi baskılaması ile ilişkili olarak yorumlamıştır. Seo ve arkadaşları insan meme kanseri hücre kültüründe Apigenin'in ekstrinsek yol ile apoptozisi indüklediğini, intrinsek yol üzerinde ise etkisiz olduğunu göstermişlerdir (164). Seo ve arkadaşları bir başka çalışmada ise Apigenin'in kaspaz 8 aracılığıyla apoptozisi arttırdığını göstermişlerdir (168). Lim ve arkadaşları ise koryokarsinoma hücre kültüründe Apigenin'in doza bağımlı olarak apoptozisi arttırdığı ve mitokondri membran potansiyelini baskıladığını göstermiştir (169). Shukla ve arkadaşları prostat kanseri hücreleri üzerinde Apigenin'in Bax aktivasyonu ve Bcl-2 düzeyinde azalma ile birlikte apoptozisi arttırdığını göstermişlerdir (170). Liao ve arkadaşları ise Apigenin'in fare makrofaj hücrelerinde apoptozisi arttırdığını göstermişlerdir (171).

Qin ve arkadaşları insan umbilikal ven endotelial hücre ve insan aortik endotelial hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada, Apigenin'in Bax ekspresyonu ve kaspaz 3 aktivitesini azaltarak apoptozisi azalttığını göstermişlerdir (172). Kim ve arkadaşları Apigenin'in proteozom inhibitörlerini inhibe ederek Bcl-2 düzeylerinde artış, Bax ve p53 düzeylerinde azalma, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını engellenmesi, sitokrom c ve kaspaz 8, 9 ve 3 aktivasyonunun engellenmesine neden olarak nöronal hücre apoptozisini azalttığını göstermişlerdir (173). Balez ve arkadaşları ise çalışmalarında Apigenin'in potent anti-inflamatuar özelliğinin yanında nöronlar üzerinde kaspaz aracılı apoptozisi belirgin şekilde azalttığını kanıtlamışlardır (174).

Apigenin'in çeşitli dokular üzerinde apoptozis üzerine etkisini araştıran bahsi geçen çalışmaların yanında oküler dokular üzerinde etkisini araştıran güncel çalışmalar mevcuttur. Xu ve arkadaşları 2016 yılında yayınladıkları çalışmalarında, Apigenin'in insan RPE üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bunun için *tert*-butil hidroperoksit ile muamele edilerek oksidatif hasar oluşturulmuş insan RPE hücresi kültürü kullanmışlardır. Oksidatif hasar oluşturulan hücreleri Apigenin ile inkübasyona bırakmışlardır. Bunun sonucunda 800 µM'e kadar Apigenin konsantrasyonu uygulanan hücrelerde, Apigenin'in hücre canlılığını azaltmadığını ve toksik etki göstermediğini, oksidatif hasara uğratılan gruplarda canlılık oranlarını arttırdığını, akım-sitometri testi ile tespit edilen apoptoziste belirgin düzeyde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Böylelikle Apigenin'in hücreleri oksidatif hasara

bağlı apoptozisten koruduğunu ortaya koymuşlardır (175). Chen ve arkadaşlarının yine insan RPE hücre kültürü üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise çeşitli polifenollerin etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada Apigenin'in anti-VEGF etkisi olması ile birlikte yüksek dozlarda (100  $\mu$ M üzerinde) toksik etki göstererek hücre ölümünde artışa neden olduğu; ancak etkin ve toksik doz aralığının geniş olduğu belirtilmiştir (12). Fu ve arkadaşları rat retinal gangliyon hücreleri üzerinde Apigenin'in doza bağımlı olarak akım sitometri ile belirlenen apoptozisi azalttığını göstermişlerdir. Yine bu çalışmada Apigenin'in TNF- $\alpha$  ile indüklenen apoptozisi kaspaz bağımlı apoptotik yolun inhibisyonu ve nükleer faktör-kappa B aktivasyonu aracılığıyla engellediği gösterilmiştir (176).

Biz çalışmamızda Apigenin dozlarımızı belirlerken literatürde toksik olduğu belirtilen dozlardan daha düşük dozlarda kullandık. Chen ve arkadaşlarının çalışmasında hücre kültüründe toksik doz olarak belirlenen 100  $\mu$ M Apigenin 27  $\mu$ g/ml doza denk gelmektedir (12). Bu sebeple intravitreal yüksek dozumuzu belirlerken üst doz olarak 20  $\mu$ g/ml kullandık. Çalışmamızda, bu dozda in vivo koşullarda toksik etki görülmediğini ve apoptozisin anlamlı olarak baskılandığını saptadık. İntraperitoneal dozlarımızı ise daha önce ratlar ile yapılmış intraperitoneal dozları temel alarak hesapladık ve hem düşük doz hem yüksek doz uygulamada anlamlı anti-VEGF etki elde edilmesi ile birlikte, apoptozis oranlarında da anlamlı azalma olduğunu gözlemledik (7).

## 6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmanın sonucunda C57BL/6J OIR in vivo fare modelinde intravitreal ve intraperitoneal yolla uygulanan Apigenin'in vasküler endotel üzerine anti-proliferatif etkili olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda kullandığımız düşük ve yüksek doz uygulamalar arasında anti-proliferatif etki açısından anlamlı farklılık olduğu izlendi ve böylece Apigenin'in anti-proliferatif etkisinin doza bağımlı olduğu görüldü. Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde Apigenin enjekte edilmiş olan gözlerde retina katmanlarının morfolojik analizinde hücresel düzeyde toksik etkisinin olmadığı gözlemlendi. Oksijene tabi tutularak intravitreal ve intraperitoneal, düşük ve yüksek doz Apigenin uygulanan gruplarda ise kontrol gruplarına göre belirgin olarak atipik mitokondri sayısının azaldığı görüldü. Böylece Apigenin'in mitokondriler üzerinde koruyucu etkileri olduğu saptandı. Apoptozisin intravitreal ve intraperitoneal, düşük ve yüksek doz Apigenin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre belirgin olarak baskılandığı izlendi.

Literatürde Apigenin'in anti-anjiyojenik özelliklerini vurgulayan çok sayıda çalışma olsa da ilk kez çalışmamızda Apigenin'in in vivo koşullarda lokal ve sistemik uygulamalarının retinal endotel hücreleri üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Apigenin elde ettiğimiz sonuçlara göre OER fare modelinde neovaskülarizasyonu doza bağımlı olarak baskılamaktadır. Ayrıca lokal ve sistemik uygulamalarda Apigenin sitoprotektif etki göstermekte, hiperoksi deprivasyonuna bağlı mitokondriyal hasarı ve apoptozisi baskılamaktadır.

Sonuç olarak, Apigenin retinal endotel hücreleri üzerinde anti-anjiyojenik ve sitoprotektif özellikleri olması nedeniyle retinal vasküler hastalıkların gelecekteki tedavisi açısından umut vaat edicidir. İlaç etkisi, doz etkisi ve farmakokinetik analizleri içeren prospektif randomize kliniğe yönelik deneysel çalışmalar gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Lee P, Wang CC, Adamis AP: Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998, 43(3):245-269.
2. Hasegawa E, Sweigard H, Husain D, Olivares AM, Chang B, Smith KE, Birsner AE, D'Amato RJ, Michaud NA, Han Y, Vavvas DG, Miller JW, Haider NB, Connor KM: Characterization of a spontaneous retinal neovascular mouse model. *PLoS One* 2014, 9(9):e106507.
3. Stolk RP, Vingerling JR, de Jong PT, Dielemans I, Hofman A, Lamberts SW, Pols HA, Grobbee DE: Retinopathy, glucose, and insulin in an elderly population. The Rotterdam Study. *Diabetes* 1995, 44(1):11-15.
4. Mitchell P, Smith W, Wang JJ, Attebo K: Prevalence of diabetic retinopathy in an older community. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1998, 105(3):406-411.
5. Yanai R, Thanos A, Connor KM: Complement involvement in neovascular ocular diseases. *Adv Exp Med Biol* 2012, 946:161-183.
6. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T: Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2009, 116(11):2165-2169.
7. Zou Y, Chiou GC: Apigenin inhibits laser-induced choroidal neovascularization and regulates endothelial cell function. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006, 22(6):425-430.
8. Singh JP, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D: Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine* 2004, 11(4):309-314.
9. Shukla S, Gupta S: Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther* 2006, 5(4):843-852.
10. Li RR, Pang LL, Du Q, Shi Y, Dai WJ, Yin KS: Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010, 32(3):364-370.
11. Trochon V, Blot E, Cymbalista F, Engelmann C, Tang RP, Thomaidis A, Vasse M, Soria J, Lu H, Soria C: Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression. *Int J Cancer* 2000, 85(5):691-696.
12. Chen R, Hollborn M, Grosche A, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L: Effects of the vegetable polyphenols epigallocatechin-3-gallate, luteolin, apigenin, myricetin, quercetin, and cyanidin in primary cultures of human retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 2014, 20:242-258.
13. Melstrom LG, Salabat MR, Ding XZ, Strouch MJ, Grippo PJ, Mirzoeva S, Pelling JC, Bentrem DJ: Apigenin down-regulates the hypoxia response genes: HIF-1alpha, GLUT-1, and VEGF in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 2011, 167(2):173-181.
14. Schlingemann RO, Witmer AN: Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Prog Brain Res* 2009, 175:253-267.
15. Gariano RF, Gardner TW: Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 2005, 438(7070):960-966.
16. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA: Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994, 35(1):101-111.

17. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997, 386(6626):671-674.
18. Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11:73-91.
19. Hughes S, Yang H, Chan-Ling T: Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41(5):1217-1228.
20. Rosen P, Boulton M, Moriarty P, Khaliq A, McLeod D: Effect of varying oxygen concentrations on the proliferation of retinal microvascular cells in vitro. *Exp Eye Res* 1991, 53(5):597-601.
21. Chan-Ling T, Gock B, Stone J: The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36(7):1201-1214.
22. Provis JM: Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 2001, 20(6):799-821.
23. Siemerink MJ, Augustin AJ, Schlingemann RO: Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators. *Dev Ophthalmol* 2010, 46:4-20.
24. Andreoli CM, Miller JW: Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007, 18(6):502-508.
25. Rezzola S, Belleri M, Gariano G, Ribatti D, Costagliola C, Semeraro F, Presta M: In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis* 2014, 17(3):429-442.
26. Mechoulam H, Pierce EA: Retinopathy of prematurity: molecular pathology and therapeutic strategies. *Am J Pharmacogenomics* 2003, 3(4):261-277.
27. Chen J, Stahl A, Hellstrom A, Smith LE: Current update on retinopathy of prematurity: screening and treatment. *Curr Opin Pediatr* 2011, 23(2):173-178.
28. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Munoz B, Friedman DS, Kempen J, Taylor HR, Mitchell P, Eye Diseases Prevalence Research G: Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004, 122(4):477-485.
29. Klein BE: Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic Epidemiol* 2007, 14(4):179-183.
30. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J, Eye Diseases Prevalence Research G: Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004, 122(4):564-572.
31. Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, Vogels IM, Goldschmeding R, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, Klaassen I: Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, 48(9):4267-4276.
32. Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA, de Smet MD, van Meurs JC, Tanck MW, Oliver N, Klaassen I, Van Noorden CJ, Goldschmeding R, Schlingemann RO: The angio-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 2008, 3(7):e2675.
33. Campochiaro PA, Aiello LP, Rosenfeld PJ: Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents in the Treatment of Retinal Disease: From Bench to Bedside. *Ophthalmology* 2016, 123(10S):S78-S88.
34. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E: Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995, 1(10):1024-1028.
35. Pierce EA, Foley ED, Smith LE: Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996, 114(10):1219-1228.



36. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE: Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(23):10457-10461.
37. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(3):905-909.
38. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, Hackett SF, Okamoto N, Zack DJ, Semenza GL, Campochiaro PA: Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40(1):182-189.
39. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001, 7(5):575-583.
40. Seo MS, Okamoto N, Viores MA, Viores SA, Hackett SF, Yamada H, Yamada E, Derevjanik NL, LaRochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA: Photoreceptor-specific expression of platelet-derived growth factor-B results in traction retinal detachment. *Am J Pathol* 2000, 157(3):995-1005.
41. Mori K, Gehlbach P, Ando A, Dyer G, Lipinsky E, Chaudhry AG, Hackett SF, Campochiaro PA: Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, 43(6):2001-2006.
42. Lima e Silva R, Shen J, Hackett SF, Kachi S, Akiyama H, Kiuchi K, Yokoi K, Hatara MC, Lauer T, Aslam S, Gong YY, Xiao WH, Khu NH, Thut C, Campochiaro PA: The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. *FASEB J* 2007, 21(12):3219-3230.
43. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO: Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003, 22(1):1-29.
44. Adams RH, Alitalo K: Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8(6):464-478.
45. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI: Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 2007, 39(2):212-220.
46. Tabruyn SP, Griffioen AW: Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 355(1):1-5.
47. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U: Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(20):11709-11714.
48. Eriksson U, Alitalo K: Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, 237:41-57.
49. Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)* 1999, 77(7):527-543.

50. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T: Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, 237:31-40.
51. Shibuya M: Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* 2013, 153(1):13-19.
52. Li X, Kumar A, Zhang F, Lee C, Tang Z: Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends Mol Med* 2012, 18(2):119-127.
53. Puddu A, Sanguineti R, Durante A, Nicolo M, Viviani GL: Vascular endothelial growth factor-C secretion is increased by advanced glycation end-products: possible implication in ocular neovascularization. *Mol Vis* 2012, 18:2509-2517.
54. Rakic JM, Lambert V, Devy L, Lutun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noel A, Munaut C: Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44(7):3186-3193.
55. Kowalczyk L, Touchard E, Omri S, Jonet L, Klein C, Valamanes F, Berdugo M, Bigey P, Massin P, Jeanny JC, Behar-Cohen F: Placental growth factor contributes to micro-vascular abnormalization and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *PLoS One* 2011, 6(3):e17462.
56. Eklund L, Olsen BR: Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006, 312(5):630-641.
57. Lee J, Kim KE, Choi DK, Jang JY, Jung JJ, Kiyonari H, Shioi G, Chang W, Suda T, Mochizuki N, Nakaoka Y, Komuro I, Yoo OJ, Koh GY: Angiopoietin-1 guides directional angiogenesis through integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5 signaling for recovery of ischemic retinopathy. *Sci Transl Med* 2013, 5(203):203ra127.
58. Pfaff D, Fiedler U, Augustin HG: Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *J Leukoc Biol* 2006, 80(4):719-726.
59. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM: Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998, 83(3):233-240.
60. Peters S, Cree IA, Alexander R, Turowski P, Ockrim Z, Patel J, Boyd SR, Jousseaume AM, Ziemssen F, Hykin PG, Moss SE: Angiopoietin modulation of vascular endothelial growth factor: Effects on retinal endothelial cell permeability. *Cytokine* 2007, 40(2):144-150.
61. Osada M, Imaoka S, Funae Y: Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 $\alpha$  protein. *FEBS Lett* 2004, 575(1-3):59-63.
62. Garcea G, Doucas H, Steward WP, Dennison AR, Berry DP: Hypoxia and angiogenesis in pancreatic cancer. *ANZ J Surg* 2006, 76(9):830-842.
63. Nakajima T, Nakajima E, Shearer TR, Azuma M: Concerted inhibition of HIF-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  expression markedly suppresses angiogenesis in cultured RPE cells. *Mol Cell Biochem* 2013, 383(1-2):113-122.
64. Kumar R, Harris-Hooker S, Kumar R, Sanford G: Co-culture of Retinal and Endothelial Cells Results in the Modulation of Genes Critical to Retinal Neovascularization. *Vasc Cell* 2011, 3:27.
65. Rubio RG, Adamis AP: Ocular Angiogenesis: Vascular Endothelial Growth Factor and Other Factors. *Dev Ophthalmol* 2016, 55:28-37.

66. Hackett SF, Ozaki H, Strauss RW, Wahlin K, Suri C, Maisonpierre P, Yancopoulos G, Campochiaro PA: Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol* 2000, 184(3):275-284.
67. Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF: Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996, 114(10):1210-1217.
68. Lu M, Amano S, Miyamoto K, Garland R, Keough K, Qin W, Adamis AP: Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40(13):3281-3286.
69. Oshima Y, Deering T, Oshima S, Nambu H, Reddy PS, Kaleko M, Connelly S, Hackett SF, Campochiaro PA: Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol* 2004, 199(3):412-417.
70. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M: Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005, 436(7048):193-200.
71. Campochiaro PA: Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl)* 2013, 91(3):311-321.
72. Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G: The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2006, 51(2):137-152.
73. Liu X, Zhao P, Tang S, Lu F, Hu J, Lei C, Yang X, Lin Y, Ma S, Yang J, Zhang D, Shi Y, Li T, Chen Y, Fan Y, Yang Z: Association study of complement factor H, C2, CFB, and C3 and age-related macular degeneration in a Han Chinese population. *Retina* 2010, 30(8):1177-1184.
74. Loyet KM, Deforge LE, Katschke KJ, Jr., Diehl L, Graham RR, Pao L, Sturgeon L, Lewin-Koh SC, Hollyfield JG, van Lookeren Campagne M: Activation of the alternative complement pathway in vitreous is controlled by genetics in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012, 53(10):6628-6637.
75. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J: Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(7):2328-2333.
76. Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, Wang Y, Kaliappan S, Kaplan HJ, Bora NS: Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol* 2005, 174(1):491-497.
77. Bandyopadhyay M, Rohrer B: Matrix metalloproteinase activity creates pro-angiogenic environment in primary human retinal pigment epithelial cells exposed to complement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012, 53(4):1953-1961.
78. Hayreh SS, Rojas P, Podhajsky P, Montague P, Woolson RF: Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion-III. Incidence of ocular neovascularization with retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 1983, 90(5):488-506.
79. Diabetic retinopathy study. Report Number 6. Design, methods, and baseline results. Report Number 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Prepared by the Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981, 21(1 Pt 2):1-226.
80. Sinclair SH, Gragoudas ES: Prognosis for rubeosis iridis following central retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol* 1979, 63(11):735-743.

81. Gogat K, Le Gat L, Van Den Berghe L, Marchant D, Kobetz A, Gadin S, Gasser B, Quere I, Abitbol M, Menasche M: VEGF and KDR gene expression during human embryonic and fetal eye development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45(1):7-14.
82. Saint-Geniez M, D'Amore PA: Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 2004, 48(8-9):1045-1058.
83. Hasegawa T, McLeod DS, Prow T, Merges C, Grebe R, Luttly GA: Vascular precursors in developing human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49(5):2178-2192.
84. Patan S: Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 2000, 50(1-2):1-15.
85. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C: VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003, 161(6):1163-1177.
86. Gilbert C, Foster A: Childhood blindness in the context of VISION 2020--the right to sight. *Bull World Health Organ* 2001, 79(3):227-232.
87. Gilbert C, Muhit M: Twenty years of childhood blindness: what have we learnt? *Community Eye Health* 2008, 21(67):46-47.
88. Heidary G, Vanderveen D, Smith LE: Retinopathy of prematurity: current concepts in molecular pathogenesis. *Semin Ophthalmol* 2009, 24(2):77-81.
89. Smith LE: Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 2004, 14 Suppl A:S140-144.
90. Chen J, Smith LE: Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007, 10(2):133-140.
91. Ashton N, Ward B, Serpell G: Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 1954, 38(7):397-432.
92. Smith LE: Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49(12):5177-5182.
93. Shih SC, Ju M, Liu N, Smith LE: Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J Clin Invest* 2003, 112(1):50-57.
94. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M: Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003, 33(10):891-896.
95. Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE: Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008, 118(2):526-533.
96. Hellstrom A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, de Lacerda L, Savage M, Svensson E, Smith L, Weinberger D, Albertsson Wikland K, Laron Z: IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(7):3413-3416.
97. Lee JE: Low IGF-1 suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity, by A. Hellstrom, C. Perruzzi, M. Ju, E. Engstrom, A Hard, J. Liu, K. Albertson-Wikland, B. Carlsson, A. Niklasson, L. Sjodell, D. LeRoith, D. Senger, and L. Smith. PNAS 98:5804-8, 2001. *Surv Ophthalmol* 2003, 48(2):234-235.
98. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR: Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 1999, 5(12):1390-1395.

99. Zhang P, Lavoie PM, Lacaze-Masmonteil T, Rhainds M, Marc I: Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for extremely preterm infants: a systematic review. *Pediatrics* 2014, 134(1):120-134.
100. Koletzko B, Sauerwald U, Keicher U, Saule H, Wawatschek S, Bohles H, Bervoets K, Fleith M, Crozier-Willi G: Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. A randomized clinical trial. *Eur J Nutr* 2003, 42(5):243-253.
101. Mukherjee PK, Chawla A, Loayza MS, Bazan NG: Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007, 77(5-6):233-238.
102. Lukiw WJ, Bazan NG: Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr* 2008, 138(12):2510-2514.
103. Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, Hong S, Pravda EA, Majchrzak S, Carper D, Hellstrom A, Kang JX, Chew EY, Salem N, Jr., Serhan CN, Smith LE: Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 2007, 13(7):868-873.
104. International Committee for the Classification of Retinopathy of P: The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol* 2005, 123(7):991-999.
105. Mintz-Hittner HA, Kuffel RR, Jr.: Intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for treatment of stage 3 retinopathy of prematurity in zone I or posterior zone II. *Retina* 2008, 28(6):831-838.
106. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernandez-Rojas ML, Salazar-Teran N, Chan RV: Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina* 2008, 28(3 Suppl):S19-25.
107. Klufas MA, Patel SN, Chan RV: Surgical management of retinopathy of prematurity. *Dev Ophthalmol* 2014, 54:223-233.
108. Campochiaro PA, Channa R, Berger BB, Heier JS, Brown DM, Fiedler U, Hepp J, Stumpp MT: Treatment of diabetic macular edema with a designed ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: a phase I/II study. *Am J Ophthalmol* 2013, 155(4):697-704, 704 e691-692.
109. Wang Q, Li T, Wu Z, Wu Q, Ke X, Luo D, Wang H: Novel VEGF decoy receptor fusion protein conbercept targeting multiple VEGF isoforms provide remarkable anti-angiogenesis effect in vivo. *PLoS One* 2013, 8(8):e70544.
110. Zhang M, Zhang J, Yan M, Luo D, Zhu W, Kaiser PK, Yu DC, Group KHPS: A phase 1 study of KH902, a vascular endothelial growth factor receptor decoy, for exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2011, 118(4):672-678.
111. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR, Group VISiONCT: Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004, 351(27):2805-2816.
112. Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR, Leff SR, Rosenfeld PJ, Ciulla TA, Dreyer RF, Gentile RC, Sy JP, Hantsbarger G, Shams N: Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology* 2006, 113(4):633 e631-634.
113. Akkoyun I, Karabay G, Haberal N, Dagdeviren A, Yilmaz G, Oto S, Erkanli L, Akova YA: Structural consequences after intravitreal bevacizumab injection without increasing apoptotic cell death in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol* 2012, 90(6):564-570.
114. Subhani S, Vavilala DT, Mukherji M: HIF inhibitors for ischemic retinopathies and cancers: options beyond anti-VEGF therapies. *Angiogenesis* 2016, 19(3):257-273.

115. Group P-DS: The effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with moderately severe to very severe nonproliferative diabetic retinopathy: initial results of the Protein Kinase C beta Inhibitor Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS) multicenter randomized clinical trial. *Diabetes* 2005, 54(7):2188-2197.
116. Wang FE, Shi G, Niesman MR, Rewolinski DA, Miller SS: Receptor tyrosine kinase inhibitors AG013764 and AG013711 reduce choroidal neovascularization in rat eye. *Exp Eye Res* 2007, 84(5):922-933.
117. Takahashi H, Obata R, Tamaki Y: A novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor, SU11248, suppresses choroidal neovascularization in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006, 22(4):213-218.
118. Kinose F, Roscilli G, Lamartina S, Anderson KD, Bonelli F, Spence SG, Ciliberto G, Vogt TF, Holder DJ, Toniatti C, Thut CJ: Inhibition of retinal and choroidal neovascularization by a novel KDR kinase inhibitor. *Mol Vis* 2005, 11:366-373.
119. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J: Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005, 308(5720):385-389.
120. Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD: Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol* 2013, 13(6):438-451.
121. Rohrer B, Long Q, Coughlin B, Renner B, Huang Y, Kunchithapautham K, Ferreira VP, Pangburn MK, Gilkeson GS, Thurman JM, Tomlinson S, Holers VM: A targeted inhibitor of the complement alternative pathway reduces RPE injury and angiogenesis in models of age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 2010, 703:137-149.
122. Rohrer B, Coughlin B, Bandyopadhyay M, Holers VM: Systemic human CR2-targeted complement alternative pathway inhibitor ameliorates mouse laser-induced choroidal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012, 28(4):402-409.
123. Reynolds AL, Kent D, Kennedy BN: Current and emerging therapies for ocular neovascularisation. *Adv Exp Med Biol* 2014, 801:797-804.
124. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA: Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 2000, 156(4):1345-1362.
125. Ramakrishnan V, Bhaskar V, Law DA, Wong MH, DuBridge RB, Breinberg D, O'Hara C, Powers DB, Liu G, Grove J, Hevezi P, Cass KM, Watson S, Evangelista F, Powers RA, Finck B, Wills M, Caras I, Fang Y, McDonald D, Johnson D, Murray R, Jeffry U: Preclinical evaluation of an anti-alpha5beta1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J Exp Ther Oncol* 2006, 5(4):273-286.
126. Zahn G, Vossmeier D, Stragies R, Wills M, Wong CG, Loffler KU, Adamis AP, Knolle J: Preclinical evaluation of the novel small-molecule integrin alpha5beta1 inhibitor JSM6427 in monkey and rabbit models of choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2009, 127(10):1329-1335.
127. Campochiaro PA: Gene transfer for ocular neovascularization and macular edema. *Gene Ther* 2012, 19(2):121-126.
128. Akkoyun I, Yilmaz G, Oto S, Kahraman B, Haberal N, Akova YA: Impact of triamcinolone acetonide on retinal endothelial cells in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol Scand* 2007, 85(7):791-794.
129. Haller JA, Bandello F, Belfort R, Jr., Blumenkranz MS, Gillies M, Heier J, Loewenstein A, Yoon YH, Jiao J, Li XY, Whitcup SM, Ozurdex GSG, Li J: Dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema related to

- branch or central retinal vein occlusion twelve-month study results. *Ophthalmology* 2011, 118(12):2453-2460.
130. Kiernan DF, Mieler WF: The use of intraocular corticosteroids. *Expert Opin Pharmacother* 2009, 10(15):2511-2525.
  131. Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT: Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2006, 168(6):2036-2053.
  132. Kim MH: Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem* 2003, 89(3):529-538.
  133. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L: Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 1997, 57(14):2916-2921.
  134. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB: Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food* 2005, 8(3):281-290.
  135. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004, 79(5):727-747.
  136. Duthie G, Crozier A: Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000, 3(6):447-451.
  137. Patel D, Shukla S, Gupta S: Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol* 2007, 30(1):233-245.
  138. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H: Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 287(4):914-920.
  139. Chiang LC, Ng LT, Lin IC, Kuo PL, Lin CC: Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. *Cancer Lett* 2006, 237(2):207-214.
  140. Mirzoeva S, Kim ND, Chiu K, Franzen CA, Bergan RC, Pelling JC: Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Mol Carcinog* 2008, 47(9):686-700.
  141. Fang J, Zhou Q, Liu LZ, Xia C, Hu X, Shi X, Jiang BH: Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1alpha and VEGF expression. *Carcinogenesis* 2007, 28(4):858-864.
  142. Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH: Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005, 68(3):635-643.
  143. Lamy S, Akla N, Ouanouki A, Lord-Dufour S, Beliveau R: Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Exp Cell Res* 2012, 318(13):1586-1596.
  144. Mirzoeva S, Franzen CA, Pelling JC: Apigenin inhibits TGF-beta-induced VEGF expression in human prostate carcinoma cells via a Smad2/3- and Src-dependent mechanism. *Mol Carcinog* 2014, 53(8):598-609.
  145. Lamy S, Bedard V, Labbe D, Sartelet H, Barthomeuf C, Gingras D, Beliveau R: The dietary flavones apigenin and luteolin impair smooth muscle cell migration and VEGF expression through inhibition of PDGFR-beta phosphorylation. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008, 1(6):452-459.

146. Huang YT, Kuo ML, Liu JY, Huang SY, Lin JK: Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin. *Eur J Cancer* 1996, 32A(1):146-151.
147. Kobayashi H, Lin PC: Angiogenesis links chronic inflammation with cancer. *Methods Mol Biol* 2009, 511:185-191.
148. Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM: Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 2005, 65(23):10637-10641.
149. Angelo LS, Kurzrock R: Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 2007, 13(10):2825-2830.
150. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996, 271(2):736-741.
151. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674.
152. Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH, Kuo ML: Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol* 2004, 123(6):1169-1175.
153. Chen Z, Han ZC: STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev* 2008, 28(2):185-200.
154. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H: Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002, 21(13):2000-2008.
155. Xu XR, Park YH, Chiou GC: Effects of dihydrogenation of flavones and number of hydroxy groups in the molecules on ocular blood flow in rabbits and retinal function recovery in rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004, 20(4):311-320.
156. Stahl A, Chen J, Sapieha P, Seaward MR, Krah NM, Dennison RJ, Favazza T, Bucher F, Lofqvist C, Ong H, Hellstrom A, Chemtob S, Akula JD, Smith LE: Postnatal weight gain modifies severity and functional outcome of oxygen-induced proliferative retinopathy. *Am J Pathol* 2010, 177(6):2715-2723.
157. Sood BG, Madan A, Saha S, Schendel D, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard D, Shankaran S, Carlo W, network Nnr: Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 2010, 67(4):394-400.
158. Chantelau E, Volaco A, Meyer-Schwickerath R: New insights into the pathogenesis of diabetic retinopathy--hormonal rather than metabolic factors are important. *Vasa* 2004, 33(4):205-210.
159. Natoli R, Provis J, Valter K, Stone J: Expression and role of the early-response gene *Oxr1* in the hyperoxia-challenged mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49(10):4561-4567.
160. Benitez-Bribiesca L, Gomez-Camarillo M, Castellanos-Juarez E, Mravko E, Sanchez-Suarez P: Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 926:165-179.
161. Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS: Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch Pharm Res* 2007, 30(10):1318-1327.
162. Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007, 35(4):495-516.



163. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK: Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012, 45(6):487-498.
164. Seo HS, Jo JK, Ku JM, Choi HS, Choi YK, Woo JK, Kim HI, Kang SY, Lee KM, Nam KW, Park N, Jang BH, Shin YC, Ko SG: Induction of caspase-dependent extrinsic apoptosis by apigenin through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signalling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. *Biosci Rep* 2015, 35(6).
165. Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A: The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ* 2005, 12(5):473-481.
166. Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C: Caspase activation precedes PTP opening in TNF-alpha-induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion* 2004, 3(5):261-278.
167. Piret JP, Minet E, Cosse JP, Ninane N, Debacq C, Raes M, Michiels C: Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005, 280(10):9336-9344.
168. Seo HS, Ku JM, Choi HS, Woo JK, Jang BH, Go H, Shin YC, Ko SG: Apigenin induces caspase-dependent apoptosis by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing SKBR3 breast cancer cells. *Mol Med Rep* 2015, 12(2):2977-2984.
169. Lim W, Park S, Bazer FW, Song G: Apigenin Reduces Survival of Choriocarcinoma Cells by Inducing Apoptosis via the PI3K/AKT and ERK1/2 MAPK Pathways. *J Cell Physiol* 2016, 231(12):2690-2699.
170. Shukla S, Fu P, Gupta S: Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis* 2014, 19(5):883-894.
171. Liao Y, Shen W, Kong G, Lv H, Tao W, Bo P: Apigenin induces the apoptosis and regulates MAPK signaling pathways in mouse macrophage ANA-1 cells. *PLoS One* 2014, 9(3):e92007.
172. Qin W, Ren B, Wang S, Liang S, He B, Shi X, Wang L, Liang J, Wu F: Apigenin and naringenin ameliorate PKCbetaII-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose. *Vascul Pharmacol* 2016, 85:39-49.
173. Kim A, Nam YJ, Lee MS, Shin YK, Sohn DS, Lee CS: Apigenin Reduces Proteasome Inhibition-Induced Neuronal Apoptosis by Suppressing the Cell Death Process. *Neurochem Res* 2016.
174. Balez R, Steiner N, Engel M, Munoz SS, Lum JS, Wu Y, Wang D, Vallotton P, Sachdev P, O'Connor M, Sidhu K, Munch G, Ooi L: Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2016, 6:31450.
175. Xu X, Li M, Chen W, Yu H, Yang Y, Hang L: Apigenin Attenuates Oxidative Injury in ARPE-19 Cells thorough Activation of Nrf2 Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2016:4378461.
176. Fu MS, Zhu BJ, Luo DW: Apigenin prevents TNF-alpha induced apoptosis of primary rat retinal ganglion cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2014, 60(4):37-42.