



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**OKSİJEN ENDÜKTE RETİNOPATİ İN VİVO FARE MODELİNDE  
İNTRAVİTREAL VE İNTRAPERİTONEAL SİYANİDİN-3-GLİKOZİT  
ENJEKSİYONUNUN RETİNAL ENDOTELYAL HÜCRE  
PROLİFERASYONU, RETİNA MORFOLOJİSİ VE APOPTOTİK HÜCRE  
ÖLÜMÜNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
ZEYNEP EYLÜL ERCAN**

**ANKARA, 2016**



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**OKSİJEN ENDÜKTE RETİNOPATİ İN VIVO FARE MODELİNDE  
İNTRAVİTREAL VE İNTRAPERİTONEAL SİYANİDİN-3-GLİKOZİT  
ENJEKSİYONUNUN RETİNAL ENDOTELYAL HÜCRE  
PROLİFERASYONU, RETİNA MORFOLOJİSİ VE APOPTOTİK HÜCRE  
ÖLÜMÜNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
ZEYNEP EYLÜL ERCAN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. İMREN AKKOYUN**

**ANKARA, 2016**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her açıdan eğitimime katkıda bulunan hocam ve değerli tez danışmanım Prof. Dr. İmren Akkoyun ve değerli Anabilim Dalı Başkanımız, hocam sayın Prof. Dr. Gürsel Yılmaz ve uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Sibel Oto, Prof. Dr. Ahmet Akman, Prof. Dr. Dilek Dursun Altınörs, Prof.Dr. Yonca Özkan Arat, Yrd. Doç. Dr. Sezin Akça Bayar, Yrd. Doç. Dr. Sirel Gür Güngör, Uzm. Dr. Leyla Asena ve asistan arkadaşlarıma ve Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim. Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nihan Haberal'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Attila Dađdeviren'e, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Gör. Dr. Fatma Helvacıoğlu' na, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden Vetr. Dr. Didem Bacanlı'ya tezime verdikleri destek için teşekkür ederim. Araştırma Laboratuvarı Teknisyenleri Adem Kurtcuođlu ve Sezai Kölcük'e deneyler sürecindeki sabırlı desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca anlayışları ve sonsuz destekleri için sevgili aileme teşekkür ederim.

**Zeynep Eylül Ercan**

**Ankara, 2016**

## ÖZET

Çalışmamızda in vivo oksijen endükte retinopati (OER) fare modelinde C57BL/J6 tipi fare kullanılarak, Siyanidin-3-Glikozit'in farklı dozlarda retinal endotelial proliferasyonu, retinal ve apoptotik hücre ölümüne etkisi incelenmiştir.

Toplam 40 adet C57BL/J6 fareden 30'u postnatal 7 ile 12. gün arası %75±2 oksijene tabi tutulmuştur. Her grupta 5 fare olmak üzere 8 grup oluşturulmuştur. Grup A işlem görmemiş negatif kontrol grubunu oluşturmuştur. Grup B-S %75±2 oksijene tabi tutulmadan intravitreal lıul DMSO enjeksiyonu yapılan kontrol grubu; Grup C %75±2 oksijene tabi tutulan, enjeksiyon uygulanmayan kontrol grubunu; Grup D-S ise %75 oksijene tabi tutulup lıul DMSO enjeksiyonu yapılan kontrol grubunu oluşturmuştur. Grup E 300ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup, Grup F 600ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grubu oluşturmuştur. Grup G farelerine intraperitoneal 0.05mg/kg; Grup H farelerine ise 0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiştir. Neovaskülarizasyon iç limitan membran vitreal yüzünde endotelial hücre proliferasyon sayımıyla kantifiye edilmiştir. Histolojik inceleme ışık mikroskopi ve ultrastrüktürel inceleme elektron mikroskopi ile gerçekleştirmiştir. Apoptotik aktivite terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UPT-nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile incelenmiştir.

Grup E ve Grup F'nin neovasküler hücre çekirdek sayısında Grup D-S ile karşılaştırıldığında, istatistiksel anlamlı azalma izlenmiştir ( $p<0,0001$ ). Grup H neovasküler hücre çekirdek sayısında grup C ve Grup D-S ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı azalma izlenmiştir (sırasıyla  $p<0.0001$  ve  $p=0.014$ ). E ve F gruplarında mitokondriyal dismorfolojide Grup D-S ile karşılaştırıldığında azalma gösterilmiştir ( $p<0.0001$ ). Grup H mitokondriyal dismorfolojisinde Grup C ve Grup D-S ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gösterilmiştir (sırasıyla  $p=0.006$  ve  $p<0.0001$ ). Grup E ve H'de apoptotik aktivitede azalma izlenmemiş, grup F apoptotik aktivitesi ise Grup D-S ( $p<0.0001$ ) ve grup E'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.025$ ).

Sonuç olarak çalışmamızda intravitreal ve intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjeksiyonlarının OER fare modelinde neovaskülarizasyonu ve mitokondriyal dismorfolojiyi azalttığını; ancak doz bağımlı olarak apoptozisi arttırdığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Siyanidin-3-Glikozit, Antosiyanin, Neovaskülarizasyon, Apoptozis, ROP

## ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effects of different Cyanidin-3-Glucoside concentrations on retinal endothelial cell proliferation, retinal structure and apoptotic activity after intravitreal and intraperitoneal injection in an oxygen induced retinopathy (OIR) mouse model.

A total of 40 of C57BL/J6 mice were used, 20 being exposed to  $75 \pm 2\%$  oxygen from postnatal day 7 to day 12. On day 12, in group D-S  $1\mu\text{l}$  intravitreal DMSO was injected in one eye. In group E  $300\text{ ng}/\mu\text{l}$  intravitreal Cyanidin-3-Glucoside (IVC), in group F  $600\text{ ng}/\mu\text{l}$  IVC was injected. In group G  $0.05\text{mg}/\text{kg}$  intraperitoneal Cyanidin-3-Glucoside (IPC), in group H  $0.1\text{mg}/\text{kg}$  IPC was injected. Control group C mice were exposed to hyperoxia with  $75\% \pm 2$  oxygen without receiving any injection. Control group B-S was maintained in room air and received  $1\mu\text{l}$  of sterile DMSO solution intravitreally. Non-exposed mice served as negative controls (group A). Neovascularization was quantified by counting the endothelial cell proliferation on the vitreal side of the inner limiting membrane of the retina. Histological and ultrastructural changes were examined by light and electron microscopy. Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP-nick end labeling (TUNEL) was used to detect apoptosis.

The endothelial cell count per histological section was lower in groups E ( $p < 0.0001$ ) and F ( $p < 0.0001$ ) compared with group D-S. IPC high dose group H also had lower cell counts compared with groups C and D-S ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.014$  respectively). Electron microscopy revealed hyperoxia induced mitochondrial dysmorphology in group C and D-S. Mitochondrial dysmorphology displayed significant decrease in IVC and high dose IPC injected eyes. Apoptotic cell death did not differ from the control groups in low dose IVC and both IPA groups, but was found significantly higher in high dose IVC group ( $p < 0.0001$ )

In conclusion, Cyanidin-3-Glucoside suppresses endothelial cell proliferation in OIR C57BL/J6 mouse model, leads to a decrease in hyperoxia-induced mitochondrial dysmorphology but increases apoptotic cell death in a dose-dependent fashion.

**Key words:** Cyanidine-3-Glucoside, Anthocyanin, Neovascularization, Apoptosis, ROP

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
RESİM VE DİYAGRAM DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 Prematüre retinopatisi.....	2
2.2 Prematüre retinopatisi patogenezi.....	2
3. PATOGENEZDE ETKİLİ FAKTÖRLER .....	3
3.1 Hiperoksi.....	3
3.2 Hipoksi-indüklenebilir Faktörler.....	4
3.3 Nitrik Oksit.....	5
3.4 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	5
3.5 İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1).....	7
3.6 Basit Fibroblast Büyüme Faktörü ( bFGF).....	7
3.7 Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF).....	7
3.8 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF).....	7
3.9 Tümör Nekroz Faktörü Alfa ( TNF- $\alpha$ ).....	8
3.10 Plasenta Kaynaklı Büyüme Faktörü (PIGF).....	8
3.11 Eritropoetin (Epo).....	8
4. SİYANİDİN- 3- GLİKOZİT.....	8
5. PREMATÜRE RETİNOPATİSİ SINIFLAMASI VE TEDAVİSİ..	10
5.1 Evreleme.....	10
5.2 Tedavi.....	11
6. ANJİYOGENEZ .....	12
7.ANTİANJİYOJENİK AJANLAR.....	13

7.1 Triamnisolon Asetonit.....	13
7.2 Pegabtanib .....	13
7.3 Bevacizumab.....	13
7.4 Ranibizumab.....	14
7.5 Aflibercept.....	14
8. ARAŞTIRMA AŞAMASINDAKİ TEDAVİLER.....	14
8.1 Small Interfering RNA (siRNA).....	14
8.2 Skualamin Laktat.....	14
8.3 Apicibar Pegol.....	14
8.4 Brolucizumab.....	15
8.5 Conbercept.....	15
8.6 Kesintisiz Anti-VEGF Salınımı.....	15
8.7 Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	15
8.8 İntegrinler.....	15
8.9 Fovista.....	15
9. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
9.1 Hayvan Deneyi Protokolü.....	16
9.2 Işık Mikroskopik İnceleme.....	17
9.3 Elektron Mikroskopik İnceleme.....	17
9.4 TUNEL Tekniği.....	18
<i>(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Nick and Labeling)</i>	
9.5 İstatistiksel Analiz .....	18
10. BULGULAR.....	18
10.1 Retinal Endotelyal Hücre Proliferasyon Analizi.....	18
10.2 Elektron Mikroskopi ile Ultrastrüktürel Analiz.....	20
10.3 TUNEL Tekniği ile Apoptozis Analizi.....	22
11.TARTIŞMA .....	23
12.RESİM VE DİYAGRAMLAR.....	30
KAYNAKÇA.....	36

## KISALTMALAR

<b>Akt</b>	:Protein kinaz B, Serin/Treonin spesifik protein kinaz
<b>Bax</b>	:Bcl-2 ilişkili X protein
<b>bFGF</b>	:Basit fibroblast büyüme faktörü
<b>COX-1</b>	:Siklooksijenaz-1
<b>COX-2</b>	:Siklooksijenaz-2
<b>CRYO-ROP</b>	:Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity
<b>DMSO</b>	:Dimetil Sülfoksit
<b>eNOS</b>	:Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
<b>EPO</b>	:Eritropoetin
<b>ERK1</b>	:Ekstrasellüler sinyal regüle kinaz
<b>FLT-1</b>	:Fms-ilişkili tirozin kinaz -1
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	:Hipoksi indükte faktör -1 alfa
<b>ICAM-1</b>	:İntersellüler Adezyon molekülü-1
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	:İnterferon Beta
<b>IGF-1</b>	:İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
<b>IL-1</b>	:İnterlökin-1
<b>IL-10</b>	:İnterlökin-10
<b>IL-6</b>	:İnterlökin-6
<b>IL-8</b>	:İnterlökin-8
<b>IPC</b>	:İntraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit
<b>IVC</b>	:İntravitreal Siyanidin-3-Glikozit
<b>iNOS</b>	:İndükte edilebilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>JAK/STAT</b>	:Janus Kinaz/ Transkripsiyon sinyal Transdüktör ve aktivatörü
<b>KDR</b>	:Kinaz insert domain reseptörü
<b>LDL</b>	:Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>MAPK</b>	:Mitojen Aktive Protein Kinaz
<b>NADPH</b>	:Nikotinamid adenine dinükleotid fosfat
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	:Nükleer Faktör kappaB transkripsiyon faktörü
<b>NO</b>	:Nitrik Oksit
<b>OER</b>	:Oksijen Endükte Retinopati
<b>OIR</b>	:Oxygen Induced Retinopathy



<b>PAF</b>	:Platelet aktive edici faktör
<b>PDGF</b>	:Trombosit kökenli büyüme faktörü
<b>PGD2</b>	:Prostoglandin D2
<b>PGE2</b>	:Prostoglandin E2
<b>PI3K</b>	:Fosfoinositid-3-kinaz
<b>PIGF</b>	:Plasenta kaynaklı büyüme faktörü
<b>PKB</b>	:Protein kinaz B
<b>PR</b>	:Prematüre Retinopatisi
<b>ROP</b>	:Retinopathy of Prematurity
<b>ROS</b>	:Reaktif oksijen türleri
<b>STAT5</b>	:Transkripsiyon sinyal Transdüktör ve aktivatörü 5
<b>TGF</b>	:Transforme edici büyüme faktörü
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	:Transforme edici büyüme faktörü- Beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:Tümör Nekroz Faktörü alfa
<b>TXA2</b>	:Tromboksan A2
<b>VCAM-1</b>	:Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
<b>VEGF 164</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/164
<b>VEGF 165</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/165
<b>VEGF A</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/A
<b>VEGF C</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/C
<b>VEGF D</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü/D
<b>VEGF R1</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü 1
<b>VEGF R2</b>	:Vasküler Endotel Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü 2
<b>VEGF</b>	:Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

## RESİM VE DİYAGRAM DİZİNİ

### **Diyagram-1: Işık mikroskopi ile neovaskülarizasyonun kantifiye analiz sonuçları**

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

### **Diyagram-2: Elektron mikroskopi ile atipik mitokondri analiz sonuçları**

Elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler değerlendirilmiş ve diyagramda gruplardaki atipik mitokondri sayıları ortalama  $\pm$  standart deviasyonu olarak verilmiştir.

### **Diyagram-3: Apoptotik hücre analiz sonuçları**

TUNEL tekniği ile apoptotik aktivite analizi gerçekleştirilmiş ve diyagramda gruplardaki apoptotik hücre sayıları ortalama  $\pm$  standart deviasyonu olarak verilmiştir.

### **Resim-1: Işık Mikroskopik kesitler**

**A ve B:** Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (**Grup A**) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (**Grup B-S**) C57BL/J6 farenin retinasından ışık mikroskopik kesitleri izlenmektedir. **C ve D:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş grup (**Grup C**) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış gruplarda (**Grup D-S**) retinal ILM'nin vitreus tarafında endotelyal hücre çekirdekleri izlenmektedir. **E ve F:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 300ng/ $\mu$ l (**Grup E**) ve 600ng/ $\mu$ l (**Grup F**) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş grupların retinal ışık mikroskopik kesitleri izlenmektedir. **G ve H:** Postnatal 7-12 günde hiperoksiye tabi tutulan, intraperitoneal 0.05mg/kg (**Grup G**) ve 0.1mg/kg (**Grup H**) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş grupların retinal ışık mikroskopik kesitleri izlenmektedir.

### **Resim-2: Elektronmikroskopik inceleme**

**A ve B:** Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (**Grup A**) ve intravitreal steril DMSO enjeksiyonu uygulanmış grup (**Grup B-S**) elektron mikroskopik incelemesinde fotosesepör iç segment bölümünde mitokondri yapılarında dismorfoloji izlenmedi. Mitokondrilerde tipik çift membranlı tübüler transvers düzenli mitokondrial kristalar görülmektedir. **C ve D:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi işlem görmemiş grup (**Grup C**) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş grup (**Grup D-S**). Elektron mikroskopik incelemede fotosesepör iç segment bölümünde irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondriler gözlenmektedir. **E ve F:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 300ng/μl (**Grup E**) ve 600ng/μl (**Grup F**) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş gruplar. Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler ve atipik mitokondri sayısı Grup D'ye göre daha az bulundu. **G ve H:** Postnatal 7-12 günde hiperoksiye tabi tutulan, intraperitoneal 0.05mg/kg (**Grup G**) ve 0.1mg/kg (**Grup H**) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş gruplar. Grup G ile Grup C arasında fark izlenmedi. Grup H atipik mitokondri sayısında Grup C'ye göre anlamlı azalma izlendi. Orijinal büyütme 6000x

### **Resim-3: TUNEL tekniği ile apoptotik hücre analizi**

**A-D:** C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesitinde oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (**Grup A**) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (**Grup B-S**); postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş (**Grup C**) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş (**Grup D-S**) gruplarda TUNEL tekniği ile dış nükleer tabaka ve iç nükleer tabakada benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir. **E:** Oksijene tabi tutulan, intravitreal 300 ng/μl Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (**Grup E**) TUNEL tekniği ile Grup A, B-S, C ve D-S ile benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre görülmüştür. **F:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 600 ng/μl (**Grup F**) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş grupta apoptozis diğer gruplara göre artmış olarak izlendi. **G ve H:** Postnatal 7-12 günde hiperoksiye tabi tutulan, intraperitoneal 0.05mg/kg (**Grup G**) ve 0.1mg/kg (**Grup H**) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş gruplar. Kontrol grupları ile benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre görülmüştür. Orijinal büyütme 100x, İmmersiyon yağı kullanılmıştır.

## 1. GİRİŞ

Neovasküler göz hastalıkları tüm yaş gruplarında ciddi bir sağlık sorunudur. Patolojik retinal anjiyogenez; örneğin prematüre retinopatisi, diyabetik retinopati ve yaşa bağlı maküla dejenerasyonu gibi neovasküler oküler hastalıklarda görme kaybına neden olmaktadır [1]. Neovasküler hastalıklarda tedavi, lazer fotokoagülasyon ile iskemik dokunun tahrip edilerek neovaskülarizasyonu tetikleyen faktörlerin azaltılması esasına dayanır [2]. Lazer fotokoagülasyon tedavisi sonucunda doku hasarı meydana gelmektedir. Alternatif tedavi olarak doku hasarını en aza indirgeyerek, patolojik neovaskülarizasyonu engelleme amacına yönelik olarak vasküler endotel hücre üzerine etkili anjiyojenik maddeleri hedef alan ilaçlar denenmektedir. Bunlardan en önemlileri VEGF blokajı yapan ilaçlardır. Son yıllarda eksudatif yaşa bağlı maküla dejenerasyonu tedavisinde VEGF inhibitörü ilaçlarla iyi sonuçlar alınmaktadır [3]. Ancak prematüre retinopatisinde Bevacizumab, Aflibercept gibi anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik etkili ajanlar tedavi seçenekleri oluşturmakla birlikte yetersiz kalmaktadırlar. Bu nedenle retinal neovasküler hastalıklarda anti-proliferatif, kalıcı, güvenilir ve etkili tedavi seçenekleri aranmaktadır.

Antosiyaninler, özellikle böğürtlen çeşitlerinde bulunan hidrofilik, anti-oksidatif, anti-inflamatuvar, anti-proliferatif ve nöroprotektif flavonoidlerdir. Tüm antosiyanin gruplarının içinde biyoaktivitesi en yüksek bulunan ise Siyanidin-3-glikozit'tir [4]. Yapılan çalışmalarda Siyanidin-3-glikozit'in anti-inflamatuvar, anti-oksidatif ve nöroprotektif etkileri kanıtlanmıştır [5]. Antosiyaninlerin oküler dokulara geçişi olduğu bilinmektedir. Hayvan modellerinde, fare ve tavşan gruplarına 110mg/kg intraperitoneal enjeksiyon olarak verildikten sonra oküler geçişe bakılarak toplam antosiyanin retinal konsantrasyonu 6.89µg olarak bulunmuştur [6]. Ayrıca antosiyaninlerin spesifik olarak Vasküler hücre adezyon molekülü-1, TNF-alfa, IL-1β, Prostaglandin E2 ve COX-2 gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [7-9]. Siyanidin-3-glikozit'in rodopsin rejenerasyonunu arttırdığı, oksijen radikallerini temizleyici aktivitesi ile nöroprotektif olduğu ve VEGF ekspresyonunu arttıran Monosit kemotaktik faktör-1 ekspresyonunu inhibe ettiği in vitro ve in vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır [10-14].

Çalışmamızın amacı oksijen endükte retinopati in vivo fare modelinde C57BL/J6 ırkı fare kullanarak Siyanidin-3-glikozit intraperitoneal ve intravitreal enjeksiyonlarının retinal endotelial hücre proliferasyonuna, retina morfolojisine ve apoptozise etkisinin araştırılmasıdır.

Farede oksijen endükte retinopati, insandakine benzer vasküler yapılanma göstermekte ve oluşan retinal neovaskularizasyon tekrarlanabilir ve kantifiye edilebilir niteliktedir. Bu nedenle retinal neovaskularizasyonun patogenezinine ve tedavi arayışlarına yönelik uygun bir model oluşturmaktadır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 PREMATÜRE RETİNOPATİSİ**

Prematüre retinopatisi, düşük doğum ağırlıklı, erken doğan bebeklerde görülen retinal damarların anormal proliferasyonuna bağlı oluşan ve çocukluk çağında körlüğe yol açan vasküler bir hastalıktır. İlk kez 1942 yılında "Retrolental Fibroplazi" olarak tanımlanmıştır. CRYO-ROP çalışmasındaki veriler sonucunda 750 gr altındaki bebeklerde %90 oranında, 27 haftadan küçük bebeklerde %83 oranında PR geliştiği bildirilmiştir [15]. Hastalığın gelişiminde en önemli risk faktörü postmenstrüel yaş ve düşük doğum ağırlığıdır [16]. Prematüre retinopatisinin olası mekanizmalarının anlaşılması için birçok hayvan modeli çalışması yürütülmüştür. Ashton ve ark. oksijen endükte retinopati modelinde oksijen toksisitesine bağlı damar kaybı (Faz 1) ve takiben hipoksiye bağlı vazoproliferasyon (Faz 2) mekanizmasını ortaya koymuştur [17].

### **2.2 PREMATÜRE RETİNOPATİSİ PATOGENEZİ**

Retina vaskularizasyonu, gestasyonel 14-16. haftada başlar. Retina damarları optik diskten mezenşim iğsi hücreleri olarak yayılır. Takibinde endotel proliferasyonu ve kapiller oluşum başlar. Yeni kapiller damarlardan matür retina damarları oluşur. Gestasyonun 6. haftasında oluşan koroid damarları avaskularize retina alanlarını besler. Bu gelişime endotelial ve mikrogial hücreler – vasküler endotelial hücre, astrosit, mikroglia, perisit ve amakrin benzeri hücreler – öncülük eder. Retinanın nazal bölümü 36. haftada tümüyle vaskularize olurken, temporal alanın vaskularizasyonu 39. haftada tamamlanır [18].

PR bifazik bir hastalıktır ve preterm doğumla normal retinal gelişimin kesintiye uğramasıyla başlar. Retina gelişiminin fizyolojik hipoksiyle indüklendiği bu dönemde (Faz 1) bebek anne karnındayken devam etmesi gereken vaskularizasyon durur ve oluşmuş damarlarda vazooobliterasyona bağlı kayıp gelişir. IGF-1, HIF-1 $\alpha$  ve VEGF düzeylerinde ani bir azalma

görülür ve bebeğin matürasyonu ile vaskülarize olmayan retina alanı metabolik olarak aktif ve hipoksik duruma gelir [19]. Retina neovaskülarizasyonu, prematüre retinopatisinin ikinci fazındaki (Faz 2) hipoksiye bağlıdır ve yaklaşık postmenstrüel 34. haftada meydana gelir [17]. Faz 1’de vazooobliterasyona uğrayan hipoksik ve iskemik retina; Faz 2’de neovaskülarizasyona neden olur. Ancak bu sekonder neovaskülarizasyon, fizyolojik vaskülarizasyondan farklı olarak vitreusa doğru ilerleyen aşırı ve düzensiz bir vaskülarizasyondur. Fizyolojik vaskülarizasyonda astrosit yatak bağlantıları, VEGF kademeli salınımı ve retina yüzeyindeki ganglion hücreleri damarlanmanın retinada sınırlı kalmasını sağlar [2]. Normal koşullarda hipoksi; doku büyüme faktörlerinin - VEGF, EPO, Anjiopoetin/Tie2, IGF-1 gibi - artışını indükleyerek var olan damarlardan yeni damar oluşumunu indükler. Yeni damarlar oluşuktan sonra ise bu damarların büyümesi endotelial uç hücreleriyle yönetilir [20]. Uç hücreler VEGF’e yanıt olarak VEGFR2 ve yönelim faktörlerinden (Nörofilin-1, Netrin reseptörü Unc5b, tirozin kinaz reseptörü Eph) zengin motil filopodialar oluşturur [21-23]. Uç hücrelerini takip eden endotelial hücreler, VEGF’e cevap olarak proliferasyona uğrar. Son olarak aşırı damarlanmayı önlemek için damar yıkımı ve mural hücre (orta boy damarlardaki perisit ve büyük boy damarlardaki düz kas hücre prekürsörleri) migrasyonu gerçekleşir [24]. Patolojik neovaskülarizasyonda ise nöron ve astrositlerin pro-anjiyojenik cevabı, Faz 1’deki vazooobliterasyona tepki olarak orantısız artmıştır. Aşırı VEGF ve EPO salınımı düzensiz ve vitreusa uzanan vaskülarizasyona neden olur [2]. Bu aşırı proliferasyon fibröz skar ve kontraktıl bant oluşumu ve sonuçta retina dekolmanına neden olabilir. Hipoksinin tetiklediği retinal neovaskülarizasyon fazı diğer proliferatif retinopatiler ile benzerdir.

### **3.PATOGENEZDE ETKİLİ FAKTÖRLER**

#### **3.1 Hiperoksi**

Prematüre retinopatisi gelişiminde rölatif oksijen fazlalığı en önemli faktörlerden biridir. Oküler kan akımının sistemik düzenlenmesinde total kardiyak çıkım, lokal perfüzyon basıncı, pH, parsiyel arteryel oksijen basıncı ve parsiyel arteryel karbondioksit basıncı rol oynamaktadır (20). Ancak retinanın otonomik vasküler innervasyon yokluğu, retinal kan akımının esas olarak lokal faktörlerden etkilenmesine ve retinal kan akımının otoregülasyonla düzenlenmesine yol açmaktadır. Pretermelerde ise koroid kan akımı otoregülasyonu bulunmazken, retinal kan akım otoregülasyonu da gelişimini tamamlamamış durumdadır. Bu durum Prostaglandin ve Nitrik Oksit yüksekliğinin otoregülasyonu bozması ile açıklanmaktadır [3]. In utero, normal parsiyel oksijen basıncı 30mmHG iken, normal oda havasına maruz kalan bebeklerde parsiyel oksijen basıncı 60-100 mmHG’ya kadar çıkmaktadır [25]. Bu rölatif hiperoksi durumunda retinal

damarlar yenidoğanda hızla vazokonstrüksiyona uğrarken, koroid damarları gelişen hiperoksiye tepki vermemektedir. Bu nedenle hiperoksi durumunda yenidoğanda retinal ve koroidal kan akımı düzenlenememekte, bu da retinada serbest oksijen radikallerinde artışa neden olmaktadır [26]. Kan otoregülasyonunu bozan başka bir faktör de oksijenin az verildiği mekanik ventilasyon durumunda veya akciğer hasarında gelişen hiperkapnidir. Hiperkapni sonucu endotelial hücrelere kalsiyum geçişine bağlı COX yoluyla aktive olacak ve PGE2 üretilenektir. Bu durumda PGE2 bağımlı eNOS ekspresyon artışı, NO salınımı ve sonuçta karbon dioksit bağımlı kan akımı artışı izlenmekte ve otoregülasyon gene bozulmaktadır [4]. Oksijen dalgalanmaları sonucu hipoksi oluşan retinada ROS gelişimi, buna bağılı olarak NADPH oksidaz artışı izlenmektedir [27]. Bu artış JAK/STAT sinyal yolu aktivasyonu ile intravitreal neovaskularizasyonu artırır [28]. Yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz ve JAK/STAT yolunun baskılanmasıyla apoptozis ve neovaskularizasyonda azalma izlenmiştir [29].

### **3.2 Hipoksi-indüklenebilir Faktörler**

Retina normal şartlarda yüksek oksidatif stres altındadır ve mitokondriden zengindir. Prematür infantlarda yetişkin retinasından farklı olarak antioksidan içeriği azdır ve nöral dokuda daha yüksek demir içeriği bulunmaktadır. Bu durum retinayı oksidatif hasara daha duyarlı hale getirmektedir. Prematür infantlardaki rölatif yüksek oksijen; oksijen hasarına daha duyarlı olan prematür retinasında endotelial hücre ölümü ve sonuçta vazobliterasyona neden olmaktadır [30]. Oksidatif hasar sadece dışarıdan gelen oksijene bağılı değildir. Endotelial hücre enzimleri, Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, COX, NOS, Lipooksijenaz yolları da serbest radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır [31]. Oksijen artışı, oksijene bağılı transkripsiyon faktörü, Hipoksi indükte Faktör 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )'yı da baskılar [1]. HIF-1 $\alpha$  DNA'ya bağlanarak hipoksiye cevap olarak üretilen mediatörlerin - VEGF, Eritropoetin, Anjiyopoetin gibi - gen transkripsiyonunu artırır [32]. Bu faktör vasküler yatak doku hipoksisine bağılı astrosit ve retinal ganglion hücrelerinden VEGF salınımına bağılı olarak gelişir. Normal koşullarda, doku revaskularizasyonu sağlandığı zaman, hipoksik uyarı ortadan kalkmasıyla HIF-1 $\alpha$  hidroksilasyon ile degrade olur. Hipoksi şartlarında ise hidroksilasyon azalması, HIF-1 $\alpha$ 'nın birikmesiyle VEGF promotörüne bağlanmasına ve VEGF ekspresyonunun artmasına neden olur. Çalışmamızda kullanılan Siyanidin-3-glikozit'in kronik hipoksi oluşturulmuş endotel hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ 'yı stabilize ettiği gösterilmiştir [33].

### **3.3 Nitrik Oksit**

Nitrik oksit koroidal ve retinal kan akımının belirlenmesinde rol oynar ve endotelial hücre proliferasyon ve migrasyonunu stimüle eder [34]. COX ve NOS aktivitesi neonatallerde yüksektir ve oküler doku peroksidasyonuna yol açan bir etmendir [35]. Oksidatif stres sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri COX yolağına pozitif feedback yaparak serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır. Artmış COX aktivitesi prostaglandinleri (özellikle PGD2 ve PGE2), eNOS ve NO yapımını arttırarak oküler kan akımı ve dolayısıyla oksidatif stresi daha da arttırmaktadır. Hayvan modellerinde artmış Nitrik oksite bağlı Kaspaz-3, Mitojen-aktive protein kinaz ve Akt fosforilasyonunda artış görülmüş; N-asetilsistein ile nitro-oksidasyon önlendiğinde hastalık seviyesinin azaldığı izlenmiştir [36]. Reaktif oksijen radikalleri, ayrıca NO ile reaksiyona girerek reaktif nitrojen radikalleri (peroksinitrit, nitrojen dioksit, nitrojen trioksit) oluşturmakta, bu nitriatif stres de retinal mikrovasküler dejenerasyona yol açmaktadır [37]. Ayrıca eNOS artışı retinal vasküler dejenerasyon yapmakta; hipoksizde görülen iNOS artışı ise fizyolojik retinal vaskülarizasyonu inhibe ederek vazobliterasyon ve preretinal neovaskülarizasyona yol açmaktadır [38]. Hücre membran fosfolipidlerinin peroksidasyona uğramasıyla membran fonksiyon bozukluğu gelişmektedir. Retina lipidleri yüksek oranda doymamış yağ asitleri (Doksohekaenoik asit, Cis-araşinoik asit, Kolin fosfogliserit) içerdiği için peroksidasyon riski daha fazladır [39]. Oksidatif stres ve peroksidasyona bağlı olarak Araşidonik asitten Fosfolipaz A2 bağımlı prostanoidler oluşur. Prostanoidlerden ise vazokonstrüktör ve sitotoksik bir ajan olan Tromboksan A2 (TXA2) sentezlenir [4]. Tromboksan A2 ve COX inhibitörlerinin oksijen endükte retinopatide etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [40]. Peroksidasyona bağlı gelişen diğer proinflamatuvar mediatörler arasında Lizofosforik asit (LPA) ve Platalet aktive edici faktör (PAF) bulunmaktadır. PAF, aynı TXA2 gibi vazobliterasyon ve vazokonstrüksiyona; LPA ise mikrovasküler sitotoksisteye neden olmaktadır [41]. Çalışmalarda Siyanidin-3-glikozit'in COX-2, iNOS ve PGE2'yi azalttığı gösterilmiştir [42].

### **3.4 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)**

Vasküler büyüme faktörleri plasental büyüme faktörü (PIGF), VEGF-A, VEGF-D ve viral VEGF homologu VEGF-E den oluşan bir protein ailesidir [43]. VEGF, endotelial hücre kültürüne eklendiğinde de novo kan damarı oluşumunu arttırmasının yanı sıra endotelial hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu da içeren kan damarı oluşumunda yer alan çoğu basamağı tetiklemekte ve bazal membran hasarı ile kan damarlarının çevre doku stromasına yayılması için gerekli metalloproteinaz enzimlerin üretimini arttırmaktadır [44, 45]. VEGF in normalde de gözde ekspresyonu vardır [46]. VEGF ganglion, Müller, retina pigment epitel hücreleri ve



nöral hücre kaynaklıdır ve patolojik neovaskülarizasyonda rol oynayan monositler için güçlü bir kemoatraktan görevi görür [45]. Gelişim sırasında VEGF'in ana kaynağı astrositlerdir. Prematüre retinopatisinin ilk fazında hiperoksi ile azalan VEGF ekspresyonu vasküler gelişimin durmasına ve damarların obliterasyonuna sebep olurken, ikinci fazda hipoksi ile ekspresyonu artmaktadır.

VEGF yüksek affiniteli sinyal reseptörü olan tirozin kinaz reseptör ailesinde yer alan VEGFR1 ve VEGFR2' ye bağlanmaktadır [47]. VEGF düzeylerinin retina iskemisinde arttığı gösterilmiştir [48]. VEGF izoformları arasında VEGF164 neovaskülarizasyonla ilişkili en spesifik izoformdur [49]. VEGF164, İntersellüler Adezyon molekülü-1 (ICAM-1) artışı ile lökositlerin neovaskülarizasyon alanlarına adezyonunu sağlamaktadır [50]. Bu inflamatuvar hücrelerin neovaskülarizasyon alanlarına göçü engellendiğinde neovaskülarizasyon baskılanabilmektedir [51]. Prematüre retinopatisinin ilk fazında hiperoksi ile azalan VEGF ekspresyonu vasküler gelişimin durmasına ve damarların obliterasyonuna sebep olurken ikinci fazda ise hipoksi ile ekspresyonu artmaktadır. VEGF, lökosit aracılığı ile endotel hasarı, fenestra oluşumu, sıkı bağlantıların çözülmesi ve hücreler arası yoğun sıvı akışı ile damarların sızdırmasına yol açmaktadır [52].

Anti-VEGF tedavi yaklaşımları yeni damar gelişmesini engellemede oldukça etkili yöntemlerdir [53]. VEGF'i inhibe eden insan monoklonal antikoru Bevacizumab'ın intravitreal kullanımının şiddetli PR gelişimini azalttığı ve kan damarlarının periferde büyümesini sağladığı gösterilmiştir [53]. Daha yakın zamanda Ranibizumab'ın daha kısa yarı ömürlü olduğu için öncelikli tercih olabileceği belirtilmiştir [54].

Ancak VEGF vücuttaki damar gelişimi için de gereklidir. In vivo VEGF supresyonu yapılan çalışmalarda in utero vasküler gelişimde kesintiye bağlı fare ölümleri izlenmiştir [48, 55]. Anti-VEGF ilaçların ise yeni oluşan damarlara etki ettiği izlenmiştir. Yeni gelişen damarlar 14 gün içinde olgunlaşmakta ve perisitler sayesinde VEGF'e dirençli hale gelmektedir. Bu perisitlerin gelişen damarlardan uzaklaştırılmasının, damarları VEGF blokajına karşı duyarlılaştırdığı izlenmiştir [56]. Perisitlerin olgunlaşmasında trombositlerden türeyen büyüme faktörü-B önemli bir yere sahiptir [56]. Bu faktörlerin engellenmesi ile yeni oluşan damarların yanı sıra daha önceden oluşmuş olan patolojik damarların regresyonu sağlanabilir. Matsumoto ve ark.'nın çalışmasında antosiyandinlerden Siyanidin, Delfidin ve Malvidin içeren böğürtlen ekstraktlarının VEGF etkisini azalttığı gösterilmiş, bu etki Delfidin'e bağlanmıştır [57].

### **3.5 İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)**

IGF-1 düz kas hücreleri için mitojen ve antiapoptotik bir faktördür ve damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarır [58]. IGF-1 ekspresyonunda hipoksi, hücre yoğunluğu, TGF- $\beta$ , bFGF, PDGF ve VEGF rol oynar [59]. IGF-1 mikrovasküler damarlarda aminoasit, glukoz alımı ve DNA sentezini artırır; migrasyonu ve anjiyogenezi düzenler, endotel hücrelerindeki inflamatuvar ve vazodilatör cevabı güçlendirir [60, 61]. Endotel üzerine olan etkiler eNOS ve VEGF ile düzenlenir [62]. Term bebeklerde IGF-1 düzeyleri üçüncü trimesterde en yüksek düzeyine ulaşırken preterm bebeklerde IGF-1 düzeyi düşük kalır [63]. IGF-1 ayrıca endotel hücrelerinde VEGF-bağımlı Akt aktivasyonunu artırarak damar survivalını artırır. Pretermelerde IGF-1'in düşük seviyeleri nedeniyle Akt aktivasyonu düşük olur ve vitreusta VEGF birikimine yol açar [64]. Faz 2'de ise artmış VEGF, IGF-1'e pozitif feedback yaparak MAPK ve Akt sinyal yolu aktivasyonu ile neovaskülarizasyonu tetikler [5]. IGF-1 antagonistlerinin retinal anjiyogenezi VEGF üzerinden in vivo baskıladığı gösterilmiştir [62].

### **3.6 Basit Fibroblast Büyüme Faktörü ( bFGF)**

İn vitro ve in vivo olarak anjiyojenik olan bFGF, normal retinada hücre sitoplazmasında bulunur [65]. VEGF gibi tirozin kinaz reseptörleri üzerine etki ederek Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (MAPK) aktivasyonunu ile endotelde migrasyon ve proliferasyona neden olur [66].

### **3.7 Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)**

Monosit ve trombositlerin alfa granüllerinde bulunan PDGF, erken anjiyogenezde mezenşim hücrelerinden perisit diferansiasyonunu sağlar ve hipoksi sonucu artan VEGF salınımını potansiyelize eder [67].

### **3.8 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF)**

Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, düşük dozda anjiyojenik, yüksek dozda anti-anjiyojenik özellikler gösterir. Monositleri uyarak fibroblast büyüme faktörü, PDGF, TNF, IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar [68].

### **3.9 Tümör Nekroz Faktörü Alfa ( TNF- $\alpha$ )**

Düşük dozda endotelial hücre çoğalmasını sağlarken, yüksek dozda ters etki gösterir. VEGF salınımını direkt indükler ve ekstrasellüler matriks komponentlerinin, plazminojen aktivatörlerinin ve proteaz inhibitörlerinin üretimini artırır. Pro-inflamatuvar özellikleri ile in vivo olarak yeni damar oluşumuna yol açar [69].

### 3.10 Plasenta Kaynaklı Büyüme Faktörü (PIGF)

VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. VEGFR- 1'e bağlanarak etki gösterir [70]. Retinal neovaskülarizasyon sürecinde VEGF'in aktivasyonunu ve ekspresyonunu artıran bir kofaktördür. VEGF ve PIGF birleşerek FMS-ilişkili tirozin kinaz -1 (FLT-1)'e bağlanır. FLT-1 de; MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1, MAP kinaz sinyal yolağı ve Akt-1 sinyal yolağını aktive ederek anjiyogeneze yol açar [71].

### 3.11 Eritropoetin (Epo)

Eritropoetin ve Eritropoetin reseptörü (EpoR) normal retinada bulunmaktadır. Epo'nun NF- $\kappa$ B yolağını uyararak, retinal ganglion hücrelerinin TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin inflamatuvar hasarına karşı direncini arttırdığı gösterilmiştir [72]. Ayrıca Epo STAT5, MAPK/ERK ve PI3K/Akt yolak aktivasyonu ile retinal ganglion hücrelerini apoptozise karşı korumaktadır [73]. Epo ayrıca Akt1 fosforilasyonu ile retinayı hipoksik hasara karşı da korumaktadır [73]. Hipoksi Eritropoetin salınımını stimüle ederek eritrosit sayısını ve anjiyogenezi artırır. Hipoksik şartlarda Epo ve VEGF, HIF-1 $\alpha$  tarafından stimüle edilir. Ancak VEGF ve Epo'nun birbirlerine antagonistik etkileri olduğu da gösterilmiştir. VEGF, STAT3 aktivasyonu yaparak Epo ekspresyonu azaltır [74]. İntravitreal Epo enjeksiyonunun vitreusta VEGF konsantrasyonunu azalttığı da izlenmiştir [75]. Proliferatif retinopati fare modelinde büyüme fazında Epo inhibisyonunun neovaskülarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [76].

## 4. SİYANİDİN- 3- GLİKOZİT

Antosiyaninler, yunanca 'anthos' (çiçek), 'kyanos' (mavi) anlamına gelen iki kelimenin birleşmesiyle adlandırılır ve flavonoidler familyasına giren doğal renk maddeleridir. Çiçeklerde, meyvelerde ve sebzelerde yaygın olarak bulunur. Antosiyaninler reaktif oksijen radikallerine kimyasal yapılarındaki elektron eksikliği nedeniyle duyarlıdır. Çeşitli antosiyaninler arasındaki reaktivite farkı, moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı, bu hidroksil gruplarından metoksillenmiş olanların konumu ve bunların sayısı, moleküle bağlanmış şekerlerin sayısı, türü ve bağlanış pozisyonu ile ilişkilidir [77]. Antosiyaninlerden Siyanidin-3-glikozit'in en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [78]. Antosiyaninlerin in vitro ve in vivo antioksidan aktiviteleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. In vitro çalışmalarda Siyanidinler DNA hidroksillenmesine karşı DNA-Siyanidin kompleksi oluşturarak DNA'yı oksidatif hasardan korumaktadır [10]. In vitro Siyanidin-3-glikozit ATP

bağımlı intrasellüler kalsiyum çıkışını engelleyerek ATP bağımlı reaktif oksijen radikali oluşumunu azaltmaktadır [43].

Wang ve ark.'nın çalışmasına göre antosiyanin ekstraktı aynı konsantrasyonda Vitamin E ekstraktı ile karşılaştırıldığında lipozomlarda daha yüksek oranda lipid peroksidasyonu azaltıcı etki göstermiştir [78]. Başka bir çalışmada tek başına Siyanidin-3-glikozitin LDL oksidasyonunu Askorbik asitten daha iyi azalttığı da gösterilmiş, bu etki antosiyanin reaktif oksijen radikallerini toplayıcı etkisine bağlanmıştır [8]. Amorini ve ark.'nın in vitro çalışmasında iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan fare miyokard hücrelerinde Siyanidin verildiğinde oksijen radikallerinin oluşumunda azalma izlenmiştir [79]. İn vitro oluşturulan kortikal nöron oksijen-glikoz deprivasyonu iskemisinde Siyanidin-3-glikozit'in mitokondriyel transmembran potansiyel kaybını önleyerek nöroprotektif etki gösterdiği izlenmiştir [80]. Siyanidin-3-glikozitin ayrıca iNOS ekspresyonu ve aktivitesinin azalttığı ve NO üretimini azalttığı da izlenmiştir [81].

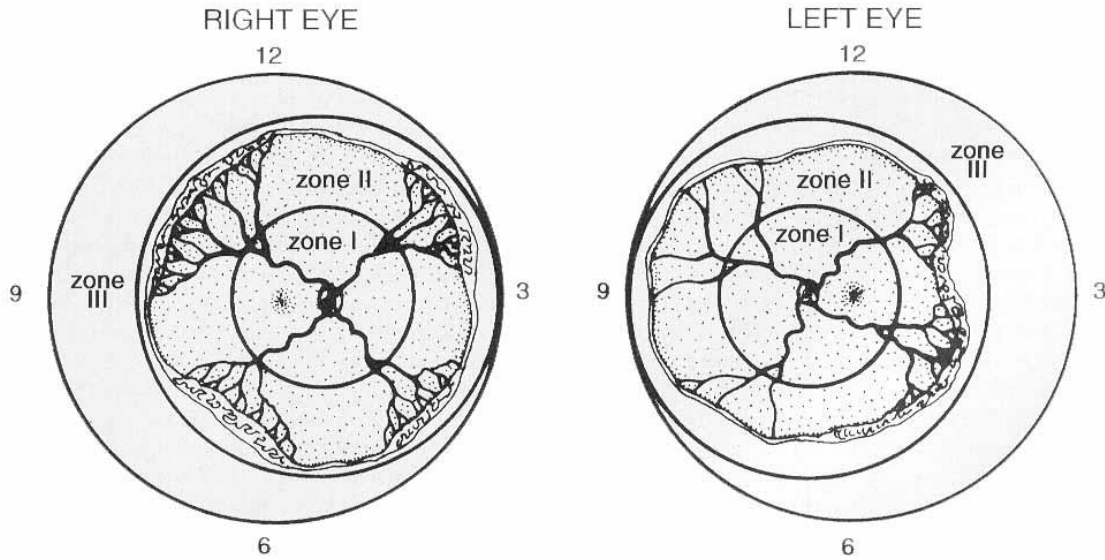
Siyanidin-3-Glikozit'in fare retina dejenerasyon modelinde fotoreseptör hasarını azalttığı da gösterilmiştir [82]. Ultraviyoleye maruz kalmış fare derisine topikal Siyanidin-3-glikozit uygulanmasıyla COX-2, iNOS, PGE2, IL-8 konsantrasyonlarını azaltarak inflamasyonu baskılayıcı etkisi izlenmiştir [42]. İn vitro çalışmalarda bu inhibisyonu Nükleer Faktör kB regülasyonu üzerinden yaptığı gösterilmiştir [83]. İn vitro endotelial hücre kronik hipoksi modeline Siyanidin-3-glikozit'in HIF-1 artışını inhibe ettiği bulunmuştur [33].

Matsunaga ve ark. hücre kültür çalışmasında antosiyaninlerden Siyanidin, Delfidin ve Malvidin'in VEGF etkisini azalttığı; ancak tek başlarına etkilerinin toplam etkilerinden daha az olduğunu göstermişlerdir [57]. Matsumoto ve ark.'nın in vivo çalışmasında antosiyanin içerikli böğürtlen ekstraktı (50mg/ml) fareye intraperitoneal enjekte edilmiştir. Solüsyon içerisindeki Antosiyaninlerin tek başına dozu 108mg/kg olarak hesaplanarak oküler doku geçişine bakılmış ve antosiyanin geçiş konsantrasyonları koroid>kornea>siliyer cisim ve iris>retina>aköz hümör>vitreus>lens şeklinde izlenmiştir [12]. İn vivo çalışmalarda antosiyaninlerden zengin böğürtlen ekstraktı verilen farelerde fosforilize ekstrasellüler kinaz ½ (ERK ½) ve Serin/Treonin protein kinaz B (Akt) inhibisyonu gelişmiş ve in vivo anjiogenezin inhibe olduğu izlenmiştir. Bu çalışmada VEGF-A endükte fosforilize Akt oluşumunun inhibe olduğu görülmüş ve bu etki Delfidin'e bağlanmıştır [57]. Fare oksijen endükte retinopati modelinde intravitreal 300 nanogram böğürtlen ekstrakt enjeksiyonu sonucunda tuftlarda azalma izlenmiştir [13].

## 5. PREMATÜRE RETİNOPATİSİ SINIFLAMASI VE TEDAVİSİ

Prematüre retinopatisinin evrelendirilmesi, ICROP'a (International Classification of Retinopathy of Prematurity) göre vasküler ve avasküler retina bölgelerinin birleşimindeki damarlanma durumuna göre yapılır ve retina tutulumunun yerleşimi zonlarla ifade edilir [84].

Zon 1 en içteki alandır. Optik disk merkezinden, maküla merkezine uzanan mesafenin iki katı çaptadır. Zon 2 sınırları Zon 1 sınırından nazal ora serrataya uzanan alanı kapsar. Zon 3 ise Zon 2'yi çevreleyen hilal şeklinde retina alanıdır. Retina tutulumunun yaygınlığı saat kadranı, retinopatinin ciddiyeti ise evre olarak ifade edilir.



### 5.1 Evreleme

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

**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 olabilir.

**Evre 4 (Kısmi retina dekolmanı):** Evre 4A: Ekstrafoveal ve Evre 4B: Foveal olmak üzere retinal dekolmanı gelişimiyle karakterizedir.

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

Arka kutup arterlerinde kıvrımlanma artışı, venlerde dilatasyon olması, vitreus hemorajisi ve bulanıklığı, iris damarlarında genişleme ve kıvrımlarına artışı, pupil dilatasyonunda azalma varsa Plus hastalık olarak ifade edilir. Herhangi bir evrede Plus hastalık görülürse evrenin yanına (+) işareti konularak gösterilir. Plus hastalık mevcudiyetinde hızlı progresyon izlenir.

Agresif Posterior PR ise nadir görülen hızlı ilerleyen ciddi bir durumdur, klasik evreleri geçirmez. Tedavisiz bırakıldığında genellikle kısa sürede Evre 5'e ilerler.

## 5.2 Tedavi

Prematüre retinopatisinde halen altın Standard kabul edilen tedavi avasküler retinanın ablasyonu ile hastalığın progresyonunun engellenmesi, avasküler retinanın ortadan kaldırılarak anjiyogenik ajan üretiminin durdurulmasıdır. Tedavi için ETROP çalışması sonucu geliştirilen algoritma göz önüne alınır [85]. Buna göre periferel retinal ablasyon gerektiren gözler Tip 1, lazer tedavisi gerektirmeyip yakın takip gerektiren gözler Tip 2 Prematüre retinopatisi olarak sınıflandırılmıştır.

### Tip 1 Prematüre retinopatisi

- A) Zon 1 'de Plus hastalığının olduğu bütün evreler
- B) Zon 1 'de Evre 3 (Plus hastalık +/-)
- C) Zon 2' de Plus hastalık ile Evre 2 veya Evre 3

### Tip 2 Prematüre retinopatisi

- A) Zon 1 'de Plus hastalığının olmadığı Evre 1 veya 2
- B) Zon 2' de Plus hastalığının olmadığı Evre 3

İntravitreal anti-VEGF tedavisinin tek başına veya cerrahi ile kombine tedavisi ile olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir. BEAT-ROP çalışmasında Bevacizumab'ın yaygın Zon 1 Evre 3 plus ve agresif posterior hastalık tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin konvansiyonel lazer tedavisi ile azalmayan vitreus VEGF düzeylerinin intravitreal Bevacizumab sonrası azalması olduğu düşünülmektedir [86]. Ranibizumab tedavisinin de

kombine veya monoterapi olarak uygulandığında agresif posterior hastalık ve Evre 3 plus hastalıkta etkili olduğu gösterilmiştir [87]. Evre 4a, evre 4b ve evre 5 hastalıkta serklaj cerrahisi veya vitrektomi uygulanmaktadır.

## 6. ANJİYOGENEZ

Anjiyogenez var olan kapiller damarlardan yenilerinin oluşmasıdır. Anjiyogenezin ilk basamağı damarlarda dilatasyon ve geçirgenlik artışıdır. Çevredeki matriksin yıkımı ile birlikte endotel hücreleri göç ederek tüp yapılarını oluştururlar. Tomurcuklanan yeni damarların çevredeki diferansiye olmuş endotel hücrelerinden ve matriksten destek aldığı düşünülmektedir. Takiben olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazı ile birlikte yeni bir damar ağı oluşur. Endotelyal hücre göçü ve invazyonu sitokinler, fibroblast büyüme faktörü ve VEGF-A gibi anjiyojenik faktörlerle artar [88]. Aktive olmuş endotel hücreleri matriks içinde yayılır ve daha sonra çoğalmaya başlar. Takiben yeni oluşmuş kapillerlerin endotel hücreleri yeni bazal membran sentezler. Yeni kapillerlerin sağlamlığını ise perisit ve düz kas hücrelerinin sağladığı düşünülmektedir ve bu süreç PDGF tarafından düzenlenmektedir [89].

Anjiyogenezi düzenleyen mekanizmalarda aksaklık sonucunda patolojik anjiyogenez meydana gelir. Oküler hastalıklarda patolojik anjiyogenez önemli rol oynar. Örneğin diyabetik retinopatide hiperglisemi, mitokondride üretilen yüksek miktardaki reaktif oksijen türleri, glikasyon son ürünleri retinal endotel hücre hasarına neden olur. Oluşan inflamasyon hücre adezyon moleküllerinin aktivasyonuna neden olurken; oluşan iskemi ise VEGF, IGF-I, Anjiyopoetin-1 ve 2, Fibroblast büyüme faktörü ve TNF artışı yaparak bazal membran kalınlaşması, perisit ve endotel hücre kaybına ve sonuçta neovaskülarizasyona neden olur [90]. Koroidal neovaskülarizasyonda ise retina pigment epiteli ve Bruch membranı arasında biriken depozitler koryokapillaristen retina pigment epiteli tabakasına oksijen geçişini kesintiye uğratır. Oluşan hipoksi sonucu başta VEGF olmak üzere anjiyojenik maddeler salınır. VEGF endotel hücre proliferasyonunu ve oküler inflamasyonu uyarır, post kapiller venüllerde fenestrasyona yol açar [91]. İnflamatuar sitokinlerin salınımıyla retina pigment epiteli, koroid kökenli endotel hücreleri ve makrofajlardan salınan doku metalloproteinazları Bruch membran proteolizine ve membran üzerinde çatlakların oluşmasına neden olur ve anjiyojenik faktörlerin uyardığı koroid endotel hücreleri de bu çatlaklardan geçerek retina pigment epiteli altı alana yerleşir ve neovaskülarizasyona yol açar [92]. Santral retinal ven tıkanıklıklarında da vasküler endotel

hasarı prostoglandinler, lökotrienler, ICAM-I, integrinler, TNF-a ve VEGF'i arttırarak neovaskülarizasyona neden olur [92].

## **7.ANTİANJİYOJENİK AJANLAR**

### **7.1 Triamnisolon Asetonit**

Sentetik bir steroid olup antiinflamatuvar ve anjiyostatik etkiye sahiptir. İnflamasyonu baskılar, retina pigment epitel migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır, vasküler endotel hücre ekstrasellüler matriksinin yapımını da etkiler [93]. Oksijen endükte retinopati fare modelinde in vivo koşullarda neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir [94]. İntravitreal Triamnisolon enjeksiyonu sonrası komplikasyonlar katarakt oluşumu, göz içi basınç yüksekliği, endoftalmi ve regmatojen retina dekolmanıdır [95].

### **7.2 Pegabtanib (Macugen; Pfizer Inc, ABD)**

28-baz ribonükleik asit molekülüne, polietilen glikol parçalarının bağlanmasından oluşmaktadır. Selektif olarak VEGF165'e bağlanabilme özelliği vardır [96]. İmmünojenik değildir. Hücre kültüründe 0.15µg/ml'de antiproliferatif etkinliği gösterilmiştir [97]. In vivo etkinlik gösterdiği en düşük doz 0,3 mg olarak belirlenmiştir [98].

### **7.3 Bevacizumab (Avastin; Genentech, ABD)**

İnsan VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize eden monoklonal IgG antikordur. Kolon kanseri nedeniyle sistemik Bevacizumab tedavisi alan hastalarda yaşa bağlı maküla dejenerasyonu bulgularında belirgin bir düzelme olduğunun fark edilmesi üzerine intravitreal kullanılmaya başlanmıştır. VEGF-A'nın endotel yüzeyindeki Flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek endotel hücre proliferasyonunu engeller. İntravitreal uygulama dozu 1.25-2,5mg aralığındadır [99]. Oküler kullanımda 1 haftadan daha uzun bir süre sistemik dolaşımda kalır. Bütün bir IgG molekülünün yaklaşık 149kDa olması retinaya geçişinin az olacağını düşündürse de yapılan çalışmalarda retina pigment epiteline, koroid ve fotoreseptör dış segmentlerine geçişi gösterilmiştir [100].

### **7.4 Ranibizumab (Lucentis; Genentech/Novartis, ABD)**

VEGF monoklonal antikoruna antijen bağlayan kısmın pepsin ayırma yöntemiyle ayrılması sonucu elde edilen yaklaşık 48 kDa boyutunda antikor parçasıdır. Monoklonal antikorunun



sadece Fab kısmını içerir. Fc parçası içermediği için inflamatuvar cevaba daha az neden olduğu düşünülmektedir [101]. Hücre kültüründe 12,5µg/ml'de antiproliferatif etkisi gösterilmiştir. FDA onaylı olarak 4mL vitreus için 0,5mg intravitreal olarak kullanılmaktadır [97].

### **7.5 Aflibercept (Eylea; Bayer HealthCare, Almanya)**

VEGF reseptör 1 ve 2'nin antijen bağlayan kısımlarıyla İmmunoglobulin G'nin Fc parçalarının birleştirilmesiyle oluşturulan bir füzyon proteindir. VEGF-A, VEGF-B, Plasental büyüme faktörü 1 ve 2'ye yüksek affiniteli bağlanır [102]. Hücre kültüründe 0.04µg/ml'de antiproliferatif etkisi gösterilmiştir. FDA onayıyla 2mg/4ml olarak intravitreal kullanılmaktadır [97].

## **8. ARAŞTIRMA AŞAMASINDAKİ TEDAVİLER**

### **8.1 Small Interfering RNA (siRNA)**

Hipoksik hücre kültür çalışmalarında siRNA kullanılarak VEGF inhibisyonunun sağlanabildiği gösterilmiştir [103]. siRNA, protein sentezini mRNA'nın yıkımını hızlandırarak durdurmaktadır ve spesifik bir nükleotid sekansını hedefleyecek şekilde üretilmektedir.

### **8.2 Skualamin Laktat**

Skualamin laktat aktive endotel hücrelerine alınarak Kalmodulin'e bağlanır ve VEGF ile integrin ekspresyonlarını inhibe ederek anti-anjiyojenik etki gösterir [104]. Topikal kullanımı için klinik araştırma fazındadır [105].

### **8.3 Apicibar Pegol (Allergan)**

Apicibar Pegol, VEGF proteinine yüksek affinite gösteren Designed Ankyrin Repeat Proteini adı verilen ve antikor benzeri bağlanmayı taklit eden yeni bir tür bağlayıcı proteindir. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu için Faz 1 ve 2 çalışması sonucunda intravitreal doza bağımlı retinal ödemde azalma görülmüştür [106]. Klinik çalışması devam etmektedir.

### **8.4 Brolucizumab (ESBA1008)( RTH-258 )(Alcon)**

VEGF-A tüm izomerlerine affinite gösteren tek zincirli antikor parçasıdır. Ranibizumab ve Aflibercept karşılaştırmalı çalışmaları yapılmıştır. Faz 3 çalışması devam etmektedir [105].

### **8.5 Conbercept (Chengdu Kanghong Pharmaceutical Group, Çin)**

VEGF reseptör ve IgG füzyonundan oluşan antikordur. Çin’de onaylanmış ve kullanımdadır. Faz 2 çalışmasında Bevacizumab ile karşılaştırılarak etkinliği gösterilmiştir [107].

### **8.6 Kesintisiz Anti-VEGF Salınımı**

Günümüzde biyo-bozunabilir implantlar, mikrosferler, nanopartiküller ve lipozomlar, jel ve ön ilaç gibi birçok ilaç dağıtım yöntemi araştırılmaktadır. Bunlardan NT-501 (Renexus)’ın etkisi tavşan gözünde gösterilmiştir [108]. Bir başka strateji ise adeno-ilişkili viral vektörlerle göz içinde lokal ekspresyon sağlama yöntemidir. Bu yöntemin etkinliği oksijen endükte retinopati fare modeli ile gösterilmiştir [109].

### **8.7 Tirozin Kinaz İnhibitörleri**

VEGF reseptörleri VEGF molekülünün bağlanması ile aktive olan tirozin kinaz aktivitesine sahiptirler. Pazopanib, Vatalanib gibi çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri anti-anjiojenik tedavi açısından araştırılmaktadır. Vatalanib’in oksijen endükte retinopati modelinde intravitreal 40µl verildiğinde antiproliferatif olduğu gösterilmiştir [110].

### **8.8 İntegrinler**

İntegrinler yeni kan damarı oluşumunda hücreler organizasyon için gerekli olan hücre adezyon molekülleridir. ALG-1001 (Luminate, Allegro, ABD) adlı peptid integrinlerle oluşan hücre adezyonunu inhibe etmektedir. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu hastalarında yapılan bir çalışmada santral fovea kalınlığında anlamlı azalma sağladığı gösterilmiştir [111].

### **8.9 Fovista (Ophthotech, ABD)**

Endotel hücreleri yeni oluşan damarları stabilize eden perisitlerin çoğalmasını sağlayan PDGF salgılar. Bu stabilizasyon sonucunda antikorların neovaskülarizasyon dokusuna penetrasyonu azalır ve anti-VEGF tedavilere yanıtızlık ortaya çıkabilir. PDGF antagonisti olan Fovista ve Ranibizumab kombine tedavisinin tek başına Ranibizumab’dan daha etkili olduğu gösterilmiştir ve anti-VEGF tedavisine dirençli olgularda kullanışlı olabileceği düşünülmektedir [112].

## **9. GEREÇ VE YÖNTEM**

## 9.1 Hayvan Deneyi Protokolü

Tüm deneyler Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu Hayvan Hakları komitesinin onayı ve Etik Kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir (Proje No:DA15/10). Deneyler Smith ve ark.'nın 1994 yılında geliştirdikleri in vivo oksijen endükte retinopati fare modeli C57BL/J6 kullanılarak yapıldı. Yeni doğan C57BL/J6 fareler anneleriyle birlikte postnatal 7. güne kadar oda ortamında yaşadıkdan sonra, postnatal 7. günden 12. güne kadar %75±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. Enjeksiyonlar için Siyanidin-3-Glikozit steril DMSO ile çözülerek solüsyon haline getirildi. Siyanidin-3-Glikozit intravitreal olarak 300ng/µl ve 600ng/µl; intraperitoneal olarak ise 0.05mg/kg ve 0.1mg/kg olarak enjekte edildi. Analizler için fareler altı gruba ayrıldı.

**Grup A:** Negatif kontrol grubu, oksijene tabi tutulmamış ve işlem görmemiş (n=5)

**Grup B-S:** Kontrol grubu, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmamış (n=5)

**Grup C:** Kontrol grubu, oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş (n= 5)

**Grup D-S:** Kontrol grubu, 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n=5)

**Grup E:** 300ng/µl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n=5)

**Grup F:** 600ng/µl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n=5)

**Grup G:** 0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n= 5)

**Grup H:** 0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjeksiyonu, oksijene tabi tutulmuş (n= 5)

İntravitreal enjeksiyonlar farenin bir gözüne 32 gauge iğne ve Hamilton şırıngası ile stereoskopik mikroskop altında korneoskleral bölgede saat 6 hizasından gerçekleştirildi. 30 C57BL/J6 fare postnatal 7-12. günler arasında oksijene tabi tutuldu. On ikinci gün 5 farenin sağ gözüne (Grup D-S) 1µl İntravitreal steril DMSO, 5 farenin sağ gözüne intravitreal 300 ng/µl Siyanidin-3-Glikozit (Grup E), 5 farenin sağ gözüne 600 ng/µl Siyanidin-3-Glikozit (Grup F), 5 fareye 0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit (Grup G) ve 5 fareye 0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit (Grup H) enjekte edildi.

Kontrol grubundaki farelerin gözlerine 1µl intravitreal steril DMSO solüsyon enjekte edildi (Grup B-S, kontrol grubu). 5 tane yaş uyumlu işlem görmemiş, oda ortamında tutulmuş fare (Grup A) negatif kontrol grubunu oluşturdu. Fareler postnatal 12-17. günlerinde oda ortamında tutuldu ve postnatal 17. gün intraperitoneal ketamin hidroklorür (100mg/kg) ve Xylazine hidroklorür (5mg/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 deoxynucleotidyl transferase deoxy-UPT-nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile incelendi. TUNEL çalışması, ışık mikroskopi için hazırlanmış olan parafin kesitlerinde yapıldı.

## **9.2 Işık Mikroskopik İnceleme**

Işık mikroskop incelemesi için gözler enükleasyon sonrası %4 paraformaldehit çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan 4µm 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 boyama uygulandı. Neovaskülarizasyon internal limitan membran'ın vitreus tarafındaki endotelial hücre proliferasyonunun bir kesitteki sayımı ile kantifiye edildi. Morfolojik incelemede retinanın çeşitli katmanları kistik dejenerasyon, hücre kaybı nükleer tabaka incilmesi açısından değerlendirildi. Kesitler ışık mikroskopi (OLYNIPUS 13X51, Germany) kullanılarak analiz edildi. Retina neovaskülarizasyonun değerlendirilmesinde sonuçlar endotelial hücre çekirdek sayısı ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

## **9.3 Elektron Mikroskopik İnceleme**

Elektron mikroskopi incelemesi için retinal doku %2,5 gluteraldehit içeren fosfat tampon çözeltisinde 2-3 saat bekletildikten sonra %1 osmiyum tetraoksit içinde fikse edildi. Alkole seri olarak muamele edilerek dehidre edildi. Propilen oksite geçtikten sonra örnekler Araldyte CY212, DDSA (2-dodecenylsuccinic anhydtrate), BDMA (benzilyldimethyl amine) ve dibutylpytalate içinde bekletildi. Yarı-ince kesitler Toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Ultra-ince kesit alınarak Uranyl Acetat ve Lead Sitrait ile boyanarak LEO 906 EM transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

## **9.4 TUNEL Tekniği (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Nick and Labeling)**

Gözler enükleasyon sonrası %4 paraformaldehit çözeltisinde en az 24 saat bekletildikten sonra parafin bloklara alındı. Parafin bloklardan 4µm kalınlığında optik sinire paralel olacak şekilde sagittal düzlemde retinal kesitler alındı. Optik diskten sonra ikinci veya üçüncü kesit incelemeler için hematoksilin-eosin ile boyandı. Her gözden bir kesit analiz edildi. TUNEL çalışması In Situ Cell Death Detection Kit, AP, ROCHE Diagnostics GmbH, Mannheim ile gerçekleştirildi. TUNEL pozitif hücreler her kesit üzerinde randomize seçilmiş alanlarda 100x büyütme (immersiyon yağı) ile tarandı. Apoptotik TUNEL-pozitif hücreler 10 randomize seçilmiş alanda sayıldı. TUNEL incelemesi iki bağımsız araştırmacı tarafından çift kör olarak yapıldı.

## **9.5 İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS inc, Chicago IL, USA) kullanıldı. Gruplar arası analizler one-way ANOVA ile yapıldı. Anlamli değerlerde ( $p < 0.05$ ) post-hoc analiz yapıldı ve gruplar aralarında karşılaştırıldı.

## **10. BULGULAR**

### **10.1 Retinal Endotelial Hücre Proliferasyon Analizi**

Hiperoksi endükte neovaskülarizasyon gelişimi retinal parafin kesitlerinde İnternal limitan membranın vitreus tarafındaki endotelial hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edildi (Resim-1).

Negatif kontrol grubu (Grup A) ve oksijene tabi tutulmadan intravitreal DMSO uygulanan kontrol grubunda (Grup B-S) retinal ILM'nin vitreus tarafında az sayıda endotelial hücre çekirdeği gözlemlendi (Diyagram-1). Karşılaştırıldığında endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamli fark bulunmadı ( $p=0.88$ ).

Negatif kontrol grubu (Grup A) ve oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu (Grup C) arasında endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel olarak anlamli fark bulundu ( $p < 0.0001$ ). Oksijene tabi tutulmuş, işlem görmemiş (Grup C) ve oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubu (Grup D-S) arasında istatistiksel anlamli fark bulunmadı ( $p=0.165$ ). Grup B-S ve Grup D-S karşılaştırıldığında endotelial hücre çekirdeği sayısında istatistiksel anlamli fark bulundu ( $p < 0.0001$ ).

300ng/µl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup E) ve 600 ng intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup F) retinal ILM'nin vitreus tarafında  $6,3 \pm 1,3$  ve  $5,6 \pm 1,3$  endotelial hücre çekirdeği gözlemlendi. Her ne kadar doz arttırıldığında

neovaskularizasyonda azalma izlense de; bu düşüş Grup E ve Grup F karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0.57$ ).

300ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup E) ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubunda (Grup D-S) retinal ILM'nin vitreus tarafında  $6,3\pm 1,3$  ve  $22,6\pm 2$  endotelyal hücre çekirdeği gözlemlendi. Bu iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark izlendi ( $p<0.0001$ ).

600ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup F) ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubunda (Grup D-S) retinal ILM'nin vitreus tarafında  $5,6\pm 1,3$  ve  $22,6\pm 2$  endotelyal hücre çekirdeği gözlemlendi. Bu iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark izlendi ( $p<0.0001$ ).

0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup G) retinal ILM'nin vitreus tarafında  $22,3\pm 1,6$  endotelyal hücre çekirdeği gözlemlendi. Grup G ile oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu (Grup C) arasında (endotelyal hücre çekirdeği  $24,3\pm 3$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.098$ ).

Grup G ile intravitreal 300 ng/ $\mu$ l ve intravitreal 600 ng/ $\mu$ l Siyanidin-3-Glikozit verilen gruplar arasında (endotelyal hücre çekirdek sayıları sırasıyla  $22,3\pm 1,6$ ;  $6,3\pm 1,3$  ve  $5,6\pm 1,3$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$  ve  $p<0.0001$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup H) retinal ILM'nin vitreus tarafında  $15,3\pm 1,3$  endotelyal hücre çekirdeği gözlemlendi. Grup H ile oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu C (endotelyal hücre çekirdeği  $24,3\pm 3$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ve 0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup G (endotelyal hücre çekirdek sayısı sırasıyla  $15,3\pm 1,3$  ve  $22,3\pm 1,6$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup ile 300ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup E (endotelyal hücre çekirdek sayısı sırasıyla  $15,3\pm 1,3$  ve  $6,3\pm 1,3$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ile 600ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup F (endotelyal hücre çekirdek sayısı sırayla 15.3±1.3 ve 5.6±1,3) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol Grup D-S (endotelyal hücre çekirdek sayısı sırayla 15.3±1.3 ve 22,6±2) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.( $p=0.014$ )

## **10.2 Elektron Mikroskopisi ile Ultrastrüktürel Analiz**

Elektron mikroskopik incelemede özellikle iç ve dış fotoreseptör bölgesinde mitokondriler değerlendirildi. Mitokondriyal dismorfolojiyi kantifiye edebilmek için atipik mitokondri (yoğun litik benekli matriks ve kristalizis şeklinde olan mitokondri) belirlendi. Tüm gruplarda 6000x büyütme ile seçilmiş bir görüş alanında bulunan atipik mitokondri sayısı belirlendi (Resim-2).

Negatif kontrol grubunda (Grup A) ve oksijene tabi tutulmamış intravitreal DMSO grubunda (Grup B-S) mitokondriler dahil, belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı. Oksijene tabi tutulmuş kontrol gruplarında (Grup C ve Grup D-S) fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptandı.

Negatif kontrol grubu (Grup A), oksijene tabi tutulmamış intravitreal DMSO Grubu B-S ile karşılaştırıldığında (atipik mitokondri sayısı sırayla 2,3±1,3 ve 2,1±0.9) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.79$ ).

Negatif kontrol grubu (Grup A) ve oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu C (atipik mitokondri sayısı sırayla 2,3±1,3 ve 11.8±1.4) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.0001$ ).

Oksijene tabi tutulmuş kontrol grup C ve oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol Grup D-S (atipik mitokondri sayısı sırayla 11.8±1.4 ve 13±0.8) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.98$ )

300ng intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup E) ve 600ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup F) atipik mitokondri sayısı her iki grupta da 6.16±1.1 olarak izlendi ve istatistiksel fark bulunmadı (Diyagram-2)

300ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup E) ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubu D-S (atipik mitokondri sayısı sırayla 6,16±1,1 ve 13±0.8) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi (p<0.0001).

600ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup F) ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubunda (Grup D-S) atipik mitokondri sayısı sırayla 6.16±1.1 ve 13±0.8 olarak gözlemlendi. Bu iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark izlendi (p<0.0001).

0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup G) 12.1±1.1 atipik mitokondri gözlemlendi. Grup G ile oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu C arasında (atipik mitokondri sayısı 11.8±1.4) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.61).

Grup G ile intravitreal 300ng/μl ve intravitreal 600ng/μl Siyanidin-3-Glikozit verilen gruplar arasında (atipik mitokondri sayıları sırasıyla 12.1±1.1; 6.16±1,1 ve 6.16±1,1) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0.0001).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup H) 7.3±0.8 atipik mitokondri gözlemlendi. Grup H ile oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu C (atipik mitokondri 11.8±1.4) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0.006).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ve oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış Grup D-S (atipik mitokondri sayıları sırasıyla 7.3±0.8 ve 13±0.8) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0.0001).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ve 0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup G (atipik mitokondri sayısı sırayla 7.3±0.8 ve 12.1±1.1) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0.0001).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ile 300ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup E ve 600ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup F (atipik mitokondri sayısı sırayla 7.3±0.8; 6,16±1,1 ve 6.16±1,1) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.89).

### **10.3 TUNEL Tekniği ile Apoptozis Analizi**



Negatif kontrol grubunda (Grup A) ve oksijene tabi tutulmamış intravitreal DMSO Grup B-S'de dış nükleer tabakada ve iç nükleer tabakada benzer düzeyde apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edildi ( $2.66\pm 0.8$  ve  $2.83\pm 0.9$ ) ve  $p=0.77$  ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Resim-3).

300ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup E) apoptotik TUNEL-pozitif hücre  $4.16\pm 1.1$  ve 600ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup F)  $6.3\pm 1$  olarak bulundu ve iki grup arasında istatistiksel fark  $p=0.025$  ile anlamlı bulundu (Diyagram-3).

300ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup E) ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubu D-S (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla  $4.16\pm 1.1$  ve  $3.16\pm 0.7$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ( $p=0.74$ ).

600ng/ $\mu$ l intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup (Grup F) ile oksijene tabi tutulmuş, intravitreal DMSO uygulanmış kontrol grubu D-S arasında (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla  $6.3\pm 1$  ve  $3.16\pm 0.7$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ( $p<0.0001$ ).

0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup G ile oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu C arasında (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla  $3.0\pm 0.6$  ve  $3.5\pm 1.3$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.99$ ).

Grup G ile intravitreal 300ng/ $\mu$ l Siyanidin-3-Glikozit verilen grup E arasında (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla  $3\pm 0.6$  ve  $4.16\pm 1.1$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ( $p=0.57$ ).

Grup G ile intravitreal 600ng/ $\mu$ l Siyanidin-3-Glikozit verilen grup F arasında (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla  $3\pm 0.6$  ve  $6.3\pm 1.0$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ( $p<0.0001$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H apoptotik TUNEL-pozitif hücre sayısı  $3.5\pm 0.5$  bulundu. Grup H ile oksijene tabi tutulmuş kontrol grubu C (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sayısı  $3.5\pm 1.3$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.99$ ).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ve 0.05mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup G (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla 3.5±0.5 ve 3.0±0.6) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.74).

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ile 300 ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup E arasında (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla 3.5±0.5 ve 4.1±1.1) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.79)

0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup H ile 600 ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grup G arasında (apoptotik TUNEL-pozitif hücre sırayla 3.5±0.5 ve 6.3±1.0) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0.012).

## 11.TARTIŞMA

Çalışmamızda gerçekleştirilen deneylerin sonucunda Siyanidin-3-Glikozit'in farklı dozlarda oksijen endükte fare modelinde in vivo neovaskülarizasyonu baskılayıcı etkilerini gözlemledik.

İntravitreal olarak enjekte edilen Siyanidin-3-Glikozit'in kullandığımız düşük ve yüksek dozda retinal endotelyal hücre çekirdeği sayısını azalttığı tespit edildi. 0.1mg/kg intraperitoneal Siyanidin-3-Glikozit enjeksiyonu yapılan grupta da endotelyal hücre çekirdek sayısında intravitreal gruptan daha az olmak üzere endotelyal hücre çekirdek sayısında azalma izlendi. Bu etki düşük doz intraperitoneal enjeksiyonda izlenmemiştir. Bu bulgu Siyanidin-3-Glikozit'in retinal endotelyal hücre proliferasyonuna doza bağlı anti-anjiyojenik etkisi olduğunu göstermektedir.

Literatürde Matsunaga ve ark. hücre kültür çalışmasında antosiyaninlerden Siyanidin, Delfidin ve Malvidin'in VEGF etkisini azalttığı; ancak tek başlarına etkilerinin toplam etkilerinden daha az olduğunu göstermişlerdir [57]. Matsumota ve ark. çalışmalarında oksijen endükte fare modelinde intravitreal 300ng böğürtlen ekstraktının neovaskülarizasyonu azalttığını göstermiştir [13]. Bu çalışmada ayrıca antosiyaninlerin hücre kültürüne VEGF-endükte tüp formasyonunu, VEGF endükte fosforilize ekstrasellüler kinazı (ERK ½), VEGF endükte Serin/Treonin protein kinaz B (Akt) fosforilasyonunu doz bağımlı olarak azalttığı izlenmiştir. ERK ½ fosforilasyonu endotelyal hücre proliferasyonu için gereklidir ve yapılan çalışmalarda ERK ½ fosforilasyon inhibitörlerinin VEGF endükte endotelyal hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir [113]. Akt fosforilasyonu ise endotelyal hücre proliferasyonu ve migrasyonu için gereklidir. Çalışmanın sonucunda anjiyogenezin fosforilize ERK ½ ve

fosforilize Akt inhibisyonu yaparak hücre proliferasyon ve migrasyonunu engellediği sonucuna varılmıştır. Ancak bu çalışmada kullanılan solüsyon içinde Siyanidin'e ek olarak 14 farklı antosiyanin bulunmaktadır. Bu antosiyaninlerden biri de Delfidin'dir. Sylvie ve ark. çalışmalarında Delfidin'in VEGF bağımlı tirozin fosforilasyonunu doz bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir [44]. Bu nedenle Matsumota ve ark. oksijen endükte retinopatide neovaskülarizasyon azalmasını Delfidin'in etkisi olarak yorumlamışlardır. Anwar ve ark. ise in vitro endotelial hücre kronik hipoksi modeline Siyanidin-3-glikozit'in HIF-1 artışını inhibe ettiğini göstermiştir [33]. HIF-1 DNA'ya bağlanarak hipoksiye cevap olarak üretilen mediatörlerin - VEGF, Eritropoetin, Anjiyopoetin gibi - gen transkripsiyonunu artırarak neovaskülarizasyona katkıda bulunmaktadır [32]. Gözlemediğimiz antiproliferatif etkide Siyanidin-3-Glikozit'in bu VEGF endükte faktörlere olan baskılayıcı etkisinin rolü olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda neovaskülarizasyonun 300ng/μl intravitreal Siyanidin-3-Glikozit ve 600ng/μl Siyanidin-3-Glikozit verilen gruplarda azaldığını gözlemledik. Ancak bu iki doz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Düşük doz Siyanidin-3-Glikozit grubunda neovaskülarizasyon oksijene tabi kontrol grubundan farklı çıkmamıştır. İntraperitoneal 0.1mg/kg grubunda ise neovaskülarizasyonda azalma oksijene tabi kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Ancak bu düşüşün intravitreal gruplardan daha az olduğu görülmüştür. İntravitreal 300ng/μl ve 600ng/μl Siyanidin-3-Glikozit gruplarında endotelial hücre sayısı  $6.3 \pm 1.3$  ve  $5.6 \pm 1.3$  iken; bu sayı 0.1mg/kg intraperitoneal grubunda  $15.3 \pm 1.3$  olarak bulunmuştur. Bu durumun antosiyaninlerin vitreusa geçiş sırasında biyoyararlanımlarındaki azalmayla açıklanabilir [12].

Prematüre retinopatisinde rol oynayan başka bir yolak da oksidatif streştir. Oksijen dalgalanmaları sonucu hipoksi oluşan retinada oluşan oksijen radikalleri NADPH oksidaz artışına; bu da JAK/STAT indüksiyonuyla intravitreal neovaskülarizasyon aktivasyonuna yol açarak neovaskülarizasyonu artırır [28]. Yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz ve JAK/STAT yolunun inhibe edilmesiyle apoptozis ve neovaskülarizasyonda azalma izlenmiştir [29]. Reaktif oksijen radikalleri; COX yolağına pozitif geri dönüş yapar ve artan COX aktivitesi prostaglandinleri, eNOS ve NO yapımını artırarak oksidatif stresi artırır. Reaktif oksijen radikalleri, ayrıca NO ile reaksiyona girerek reaktif nitrojen radikalleri oluşturarak retinal mikrovasküler dejenerasyona yol açmaktadır [37]. Oksijen endükte retinopati modelinde hiperoksi takibinde oluşan hipoksi mitokondrilerde şişme, kristal fragmentasyonu, matriks kondansasyonu, iç/dış membran ayrılmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak oksijen endükte retinopati grubunu oluşturan kontrol grubunda (Grup C ve D-

S) fotoreseptör iç segmentinde bulunan mitokondrilerde yoğun kesiflik içeren litik-benekli matriks ve kristalizis şeklinde ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler saptandı. Hiperoksiye maruz kalan grupta tespit edilen bulgular C57BL/J6 ırkı farenin retinal hiperoksi endükte mitokondriyal hassasiyeti olduğunu göstermektedir. Antosiyanin grubu antioksidan aktiviteye sahiptir ve bu etkileri peroksil ve alkoksil radikallerini toplama, metal iyonlarıyla şelat oluşturma, protein bağlama özelliklerine dayanmaktadır [46]. Antosiyaninlerin şeker gruplarının yeri ve sayısı antioksidan aktivite üzerine etki etmektedir. Genel olarak, 3. karbona glikoz bağlanmasıyla oluşan antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi daha yüksektir [78]. Peerven ve ark. hücre kültürü çalışmalarında Siyanidin-3-Glikozit'in ATP endükte mitokondriyal depolarizasyonu mitokondriyal kalsiyum alınımını inhibe ederek azalttığını; bunun da ATP endükte oksijen radikal oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir [43]. Siyanidinler ayrıca DNA hidrosillenmesine karşı DNA-Siyanidin kompleksi oluşturarak DNA'yı oksidatif hasardan korumaktadır [10]. Serraino ve ark. Siyanidin-3-Glikozit'in doz bağımlı olarak endotel hücrelerinde peroksinitrat endükte oksidatif hasarını azalttığını göstermiştir [114]. Wang ve ark. in vitro retina pigment epitel ultraviyole hasarına antosiyaninlerin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada antosiyaninlerin - en fazla Siyanidin olmak üzere - oksijen radikallerini azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada Siyanidin-3-glikozitin oksidatif strese bağlı retina pigment epitelinden VEGF salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir [11]. Amorini ve ark.'nın in vitro çalışmasında iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan fare miyokard hücrelerinde Siyanidin verildiğinde oksijen radikallerinin oluşumunda azalma izlenmiştir [79]. İn vitro oluşturulan kortikal nöron oksijen-glikoz deprivasyon iskemisinde Siyanidin-3-glikozit'in mitokondriyal transmembran potansiyel kaybını önleyerek nöroprotektif etki gösterdiği izlenmiştir [80]. Siyanidin-3-glikozitin ayrıca iNOS ekspresyonu ve aktivitesinin azalttığı ve NO üretimini azalttığı da izlenmiştir [81]. Tsuda ve ark. oral olarak Siyanidin-3-Glikozit verilen farelerde iskemi/reperfüzyon hasarının baskılandığını göstermiştir [6]. İn vivo Siyanidin-3-Glikozit'in fare karaciğerinde Glutatyon antioksidan sistemi sentezini arttırdığı gösterilmiştir [115].

Çalışmamızda Siyanidin-3-Glikozit uygulanan gruplarda antiproliferatif etkilerin yanı sıra, elektron mikroskopide mitokondrilerin oksijene tabi tutulan diğer gruplara göre daha az hasarlandığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda intravitreal düşük ve yüksek doz Siyanidin-3-Glikozit gruplarında atipik mitokondrideki azalma doz bağımlı izlenmemiştir. İntraperitoneal gruplarda ise doza bağlı etki çıkmıştır; düşük doz intraperitoneal grup mitokondrilerde fark oluşturmazken yüksek doz intraperitoneal grupta atipik mitokondrilerde azalma izlenmiştir.

Anjiyogenezi tetikleyen önemli faktörlerden biri de inflamatuvar süreç ve bu süreçte üretilen çeşitli sitokinlerdir. Siyanidin-3-Glikozit'in çeşitli mekanizmalar üzerinden antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bilinmektedir. Transkripsiyon faktörü Nükleer faktör-kB; inflamatuvar cevap, hücre proliferasyonu ve adezyonunu düzenlemekte ve aktivasyonu ile COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$  ve IL-1 salınımları regüle olmaktadır [47].

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) familyasından olan ERK (ekstrasellüler sinyal regüle kinaz) fosforilize olduğu zaman iNOS, COX-2 ve TNF- $\alpha$  üretimini arttırmaktadır[48]. Seraam ve ark. antosiyaninlerin hücre kültüründe COX-1 ve COX-2 inhibisyonu yaptığını göstermiştir. Ultraviyoleye maruz kalmış fare derisine topikal Siyanidin-3-Glikozit uygulanmasıyla COX-2, iNOS, PGE2, IL-8 konsantrasyonlarının azalarak inflamasyonu azaltıcı etkisi izlenmiştir [42]. Min ve ark. hücre kültüründe Siyanidin-3-Glikozit'in MAPK ve NF-kB yolak inhibisyonu ile TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, PGE2, iNOS ve COX-2 düzeylerini azalttığını göstermiştir [55]. Fare akciğer akut hasar hücre kültürü modelinde Siyanidin-3-Glikozit'in doz bağımlı olarak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve IFN- $\beta$  yapımını azalttığı gösterilmiştir [116].

Ogawa ve ark. , mavi-led diod ışığa bağlı retinal fotoreseptör hücre apoptozisinde Siyanidin-3-Glikozit'in NF- kB, p38 MAPK ve Kaspaz 3-7'yi azalttığını göstermiştir [117]. Mavi ışık fotoreseptörlerde mitokondriyal DNA hasarı ve serbest radikal oluşumuna yol açarak apoptozis yapmaktadır [118]. Bu nedenle Siyanidin-3-Glikozit inhibitör etkisi oksijen radikal azalmasına bağlanmıştır.

Çalışmamızda oksijen endükte retinopati modelinde C57BL/J6 fare ırkında retinal endotelial hücre proliferasyonunun Siyanidin-3-Glikozit intravitreal 300ng/ $\mu$ l, 600ng/ $\mu$ l ve intraperitoneal 0.1 mg/kg intraperitoneal enjeksiyonları ile baskılandığı gösterilmiştir. Bu etkinin VEGF inhibisyonuna ek olarak anjiyogenez sürecinde rol alan birçok sinyal yolu üzerinde gösterdiği etkilerinin de rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Işık mikroskopik incelemede retina katmanlarında histolojik kesitlerde morfolojik hasar yaratmadığı ve hücre bütünlüğünü bozmadığı görülmüştür. Bu bulgunun Siyanidin-3-Glikozit'in antiinflamatuvar ve sitoprotektif karakterinden kaynaklanabileceği akla gelmektedir. Bu etkiler düşük doz Siyanidin-3-Glikozit (0.05 mg/kg) intravitreal enjeksiyonunda izlenmemiştir. Bu durum literatürde izlenen antosiyanin gruplarını doz bağımlı etki sonuçlarına uymaktadır. Biz intravitreal dozu uygularken Matsumota ve ark.nın intravitreal böğürtlen ekstraktını göz önüne aldık [13]. Bu çalışmadaki verilen solüsyon etki gösteren farkı antosiyanin grupları ve aynı antosiyanin grubunun farklı konfigürasyonlarını içermektedir. Çalışmamızdaki minimal

intravitreal Siyanidin-3-Glikozit konsantrasyonu sinerjistik etki kaybı göz önüne alınarak 300ng'dan azaltılmamıştır. Bu etki 600 ng/μl intravitreal dozda yüksek oranda izlense de, bu iki grup arasında istatistiksel olarak fark izlenmemiştir. İntraperitoneal grupta bu etki 0.1mg/kg dozunda izlenmiştir.

Çalışmamızda apoptotik hücre ölümünü incelemek için TUNEL çalışması uygulanmıştır. Negatif kontrol grubunda ve oksijene tabi tutulmuş kontrol gruplarında apoptozis görülmüştür.

Apoptozis değişik yollar ile aktive edilmektedir. İntrinsik yolda Kaspaz-3 aktivasyonu sonucu DNA fragmentasyonu, nükleer protein degradasyonu ve sonuçta apoptozis oluşmaktadır. Klasik yolda ise apoptozis Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü- l'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir [119]. Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle DNA hasarına bağlı tümör süpresör gen p53 indüksiyonuyla da başlatılabilir [120]. Mitokondriyel dış membran permeabilizasyonu sitoplazmaya sitokrom c çıkışına yol açarak kaspaz yolunu uyarır ve apoptozisi başlatır. Mitokondriyel dış membran permeabilite kontrolü B hücre lenfoma (BCL)-2 gen ailesi düzenlemektedir [121]. Skemiene ve ark. iskemi/reperfüzyon modelinde kardiyak hücrelerin iskemiden önce Siyanidin-3-Glikozit ile perfüze edildiğinde iskemi endükte kaspaz aktivasyonunun ve sitokrom c salınımını blokladığını göstermiştir [122]. İnsan kolon adenokarsinom hücre kültürü çalışmasında Siyanidin-3-Glikozit'in peroksil radikal endükte apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiş ve bu etki antosiyaninlerin peroksil radikal toplayıcı etkilerine bağlanmıştır [123]. Li et al, PC12 hücre kültüründe Sisplatin endükte sitotoksisite modelinde Siyanidin-3-Glikozit'in etkilerini incelemiştir. Sisplatin oksijen radikali oluşturarak sitotoksisite yapmaktadır ve bu çalışmada Sisplatin öncesi Siyanidin-3-Glikozit verilen hücrelerde Kaspaz-3 inhibisyonu izlenmiştir. Bu apoptozis inhibisyonu Siyanidin-3-Glikozit'in oksijen radikal toplayıcı etkisine bağlanmıştır [124]. Endotel hücre kültürü çalışmasında Siyanidin'in TNF-alfa endükte p53 asetilizasyonunu engellediğini ve apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir [125]. Helikobakter pylori ile insan gastrik hücre ko-kültüründe Siyanidin-3-Glikozit Kaspaz 3 aktivasyonunu azaltmıştır [126]. Fare hepatosit hücrelerinin Siyanidin-3-Glikozit ile hiperglisemiye bağlı apoptozisi Kaspaz 3 inhibisyonu, pro-apoptotik BAX gen inhibisyonu ile azalttığı gösterilmiştir [127]. Pankreatik β hücrelerinde hidrojen peroksidad endükte Kaspaz 3 aktivasyonunun Siyanidin-3-Glikozit ile inhibe olduğu gösterilmiştir [128]. Siyanidin-3-Glikozit'in koruyucu etkilerinin doz bağımlı olduğu apoptozis üzerinde de gösterilmiştir. Kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarında Siyanidin-3-Glikozit dozu arttırıldığında reperfüzyon sırasında pro-oksidatif etkiye yol açtığı gösterilmiştir [129].

Ancak Siyanidin-3-Glikozit'in pro-apoptotik olduğunu gösteren yayınlar da bulunmaktadır [130]. Yan ve ark. fare aortik düz kas hücrelerinde Siyanidin-3-Glikozit'in NF-kB aktivasyon inhibisyonuyla apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir [131]. Siyanidin-3-Glikozit'in prostat ve akciğer kanser hücre kültürlerinde kaspaz-3 aktivasyonu yaptığı da izlenmiştir [132, 133]. İnsan hepatoma hücrelerinde Siyanidin-3-Glikozit içeren antosiyanin karışımı doz bağımlı olarak DNA fragmentasyonunu arttırmış ve BCL-2 inhibisyonu yapmıştır [134]. Siyanidin-3-glikozit lösemi hücrelerinde apoptozise yol açmıştır [135-137]. Ancak aynı doz antosiyaninin perifer kan monositlerinde apoptotik etki yapmazken; kronik lenfositik lenfoma hücrelerinde apoptozis yaptığı gösterilmiştir [138].

Zikri ve ark. bu apoptotik özelliğin selektif olduğunu göstermiştir. Özefagus hücre kültür çalışmalarında, Siyanidin-3-Glikozit ileri tümörojenik hücre grubunda apoptozise yol açarken, zayıf tümörojenik grupta apoptozis izlenmemiştir. Bunun nedeni olarak yüksek aktivite grubunun hücre içine Siyanidin alınımının artması veya Siyanidin-3-Glikozit reseptörlerinin hücre yüzeyinde fazla eksprese edilmesi ile endositoz artışı olmak üzere iki mekanizma öne sürmüştür [139]. Primer kolorektal ve metastatik kolorektal kanser hücre çalışmasında da Siyanidin-3-Glikozit sadece metastatik hücrelerde apoptozis yapmıştır [140]. Bu çalışma sonucunda antosiyaninlerin yüksek metabolizmalı hücrelerde radikal oksijen birikimi yaparak apoptotik etki oluşturduğu ileri sürülmüştür. Antosiyaninlerin radikal oksijen toplayıcılık özelliklerinin intrasellüler pH azalması ile kaybolması da olası mekanizmalardandır [141]. Siyanidin-3-Glikozit'in rodopsin rejenerasyonuna pH bağımlı olarak etki ettiği bilinmektedir [142, 143].

Çalışmamızda Siyanidin-3-Glikozit grupları ile apoptozis yüksek oksijen alan kontrol grupları azalmamış, yüksek doz intravitreal doz ise apoptoziste artışa neden olmuştur. Hiperoksiye bağlı intrasellüler asidoz oluşumu bunun nedeni olabilir [144]. Bu etkileşim kültür bazında endotelial hücreler üzerinde ve in vivo olarak hayvan sayısı ve ilaç dozu artırılarak prospektif incelenmelidir. Ayrıca Siyanidin-3-Glikozit profilaktik etkisinin değerlendirilmesi ve hiperoksik intrasellüler asidoz oluşmadan önce verildiğinde apoptozis üzerine olan etkisinin gösterilmesi için enjeksiyonların oksijen endükte retinopati oluşturulmadan postnatal 7.günde yapılarak prospektif incelenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak Siyanidin-3-Glikozit oksijen endükte fare modelinde neovaskularizasyonu anlamlı düzeyde baskılamakta ve mitokondriler üzerine koruyucu etki göstermekte; ancak

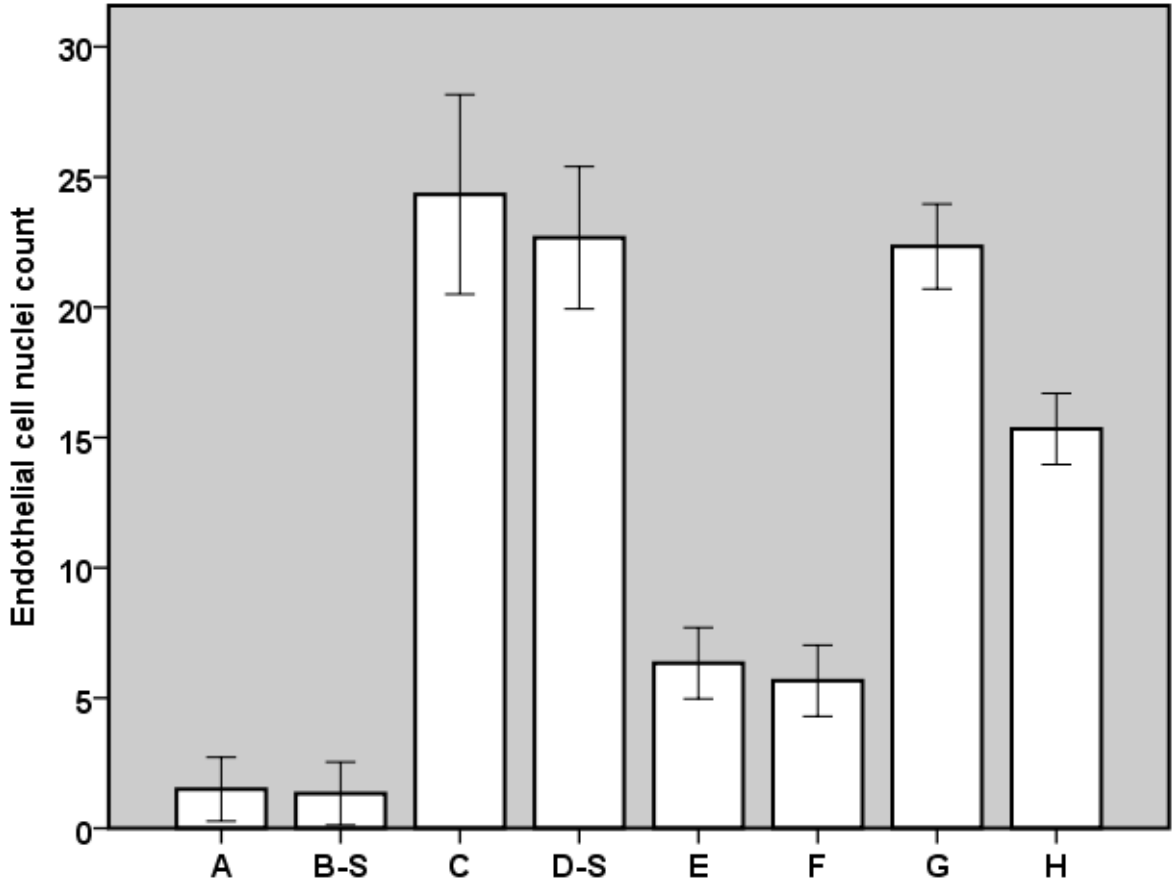
apoptoziste doz bağımlı artışa neden olmaktadır. Farklı dozlarda ve dokularda ilaç etkisi ve farmakokinetik analiz için prospektif randomize deneysel çalışmalar gerekmektedir.



## 12.RESİM VE DİYAGRAMLAR

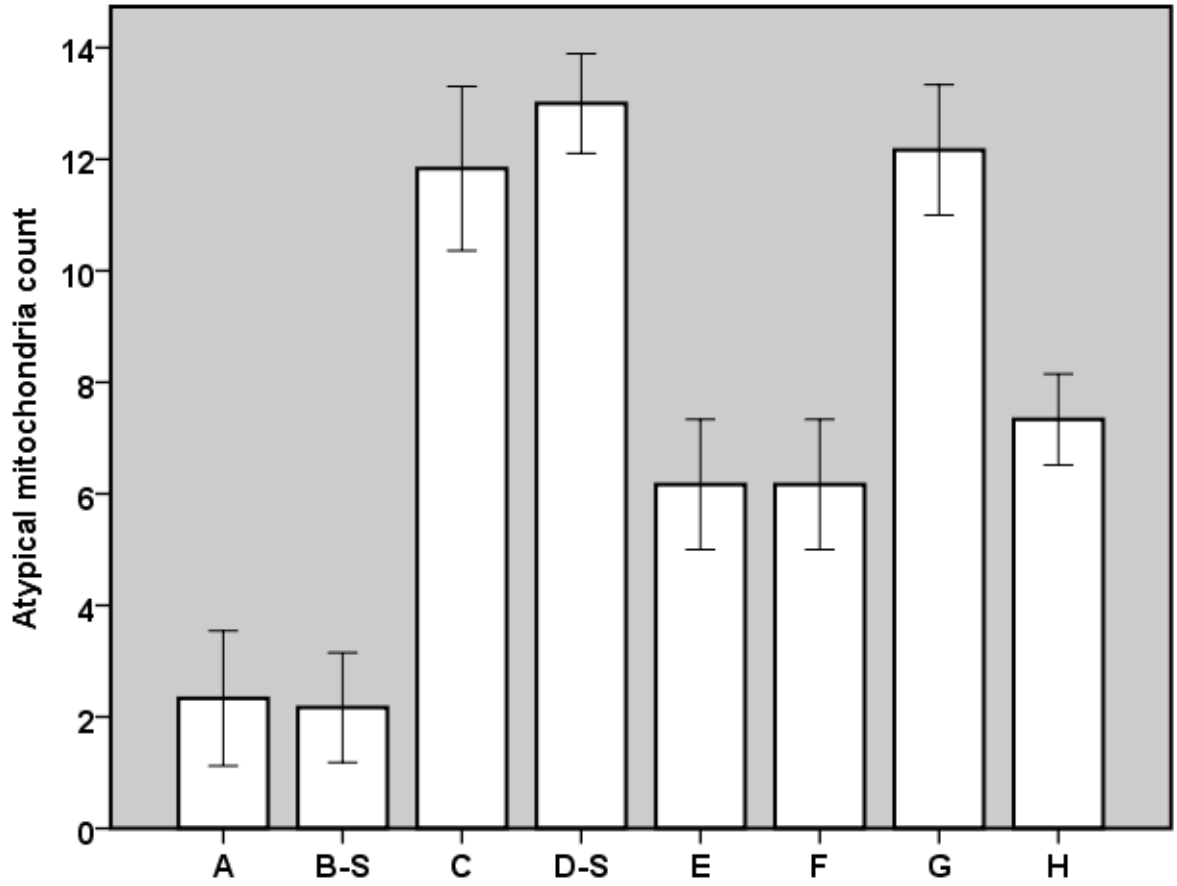
### Diyagram-1: Işık mikroskopi ile neovaskülarizasyonun kantifiye analiz sonuçları

*Neovaskülarizasyon internal limitan membranın vitreosa bakan yüzeyindeki vasküler hücre çekirdeklerinin sayımıyla kantifiye edilmiştir ve diyagramda gruplarda vasküler hücre çekirdeklerinin sayısının değeri ortalama  $\pm$  standart deviasyonu olarak verilmiştir.*



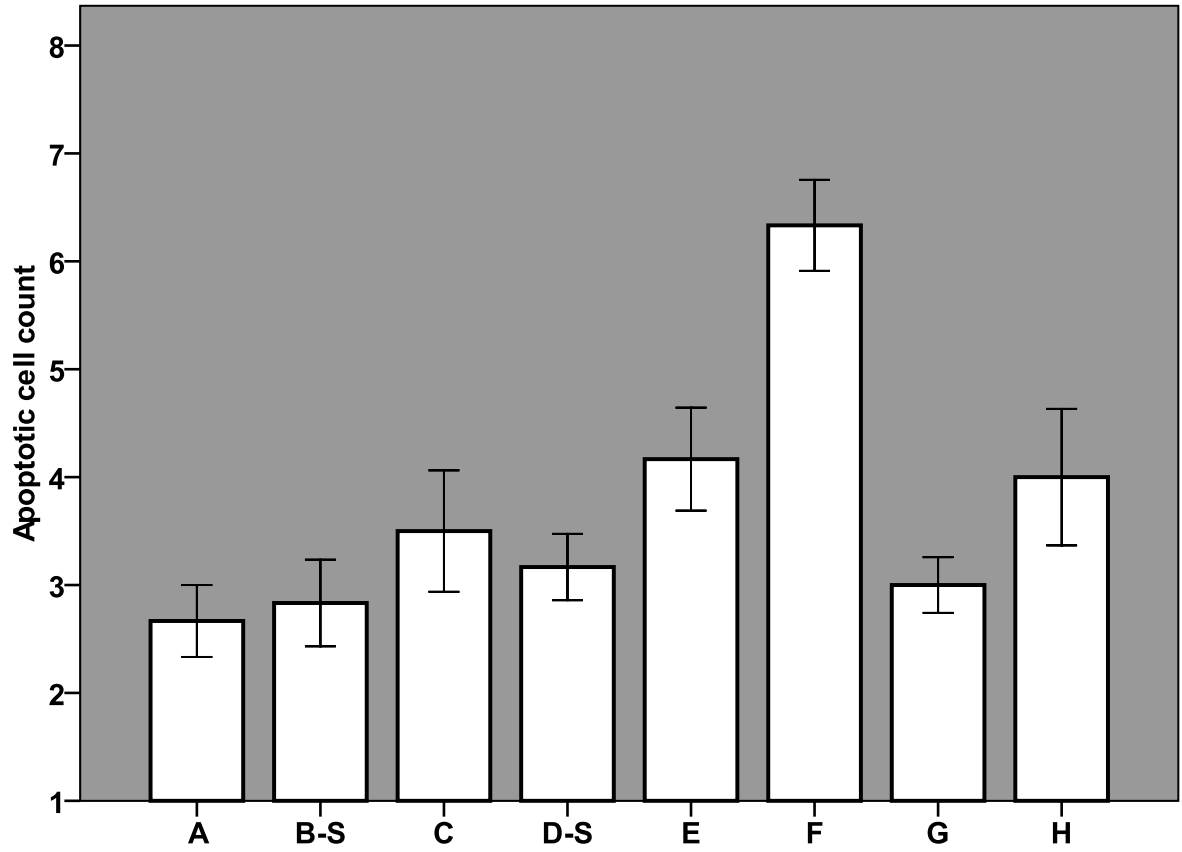
## Diyagram-2: Elektron mikroskopi ile atipik mitokondri analiz sonuçları

*Elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler değerlendirilmiş ve diyagramda gruplardaki atipik mitokondri sayıları ortalama  $\pm$  standart deviasyonu olarak verilmiştir.*

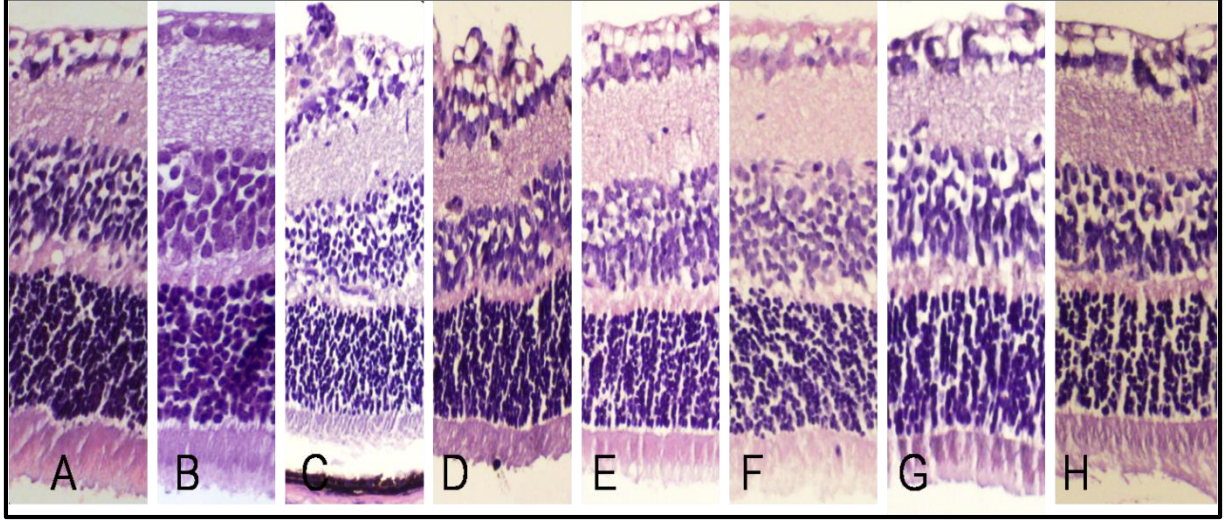


### Diyagram-3: Apoptotik hücre analiz sonuçları

*TUNEL tekniği ile apoptotik aktivite analizi gerçekleştirilmiş ve diyagramda gruptaki apoptotik hücre sayıları ortalama  $\pm$  standart deviasyonu olarak verilmiştir.*



### Resim-1: Işık Mikroskopik kesitler



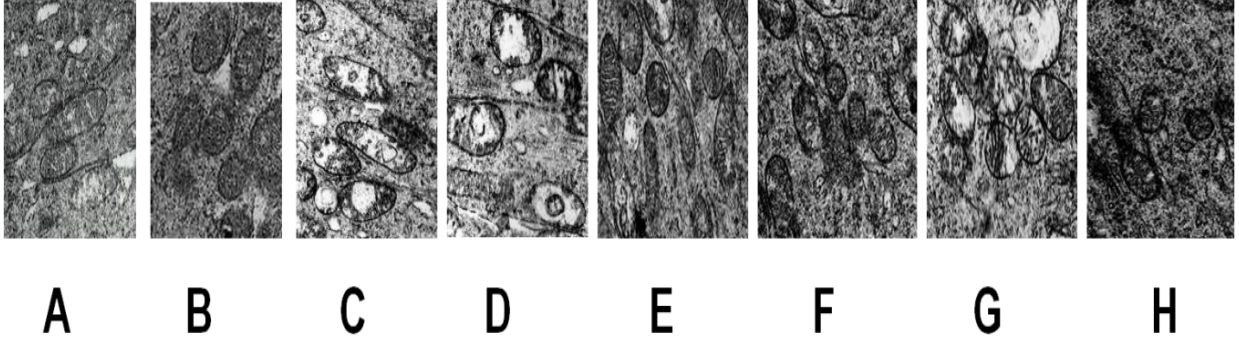
*A ve B:* Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (Grup B-S) C57BL/J6 farenin retinasından ışık mikroskopik kesitleri izlenmektedir.

*C ve D:* Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş grup (Grup C) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış gruplarda (Grup D-S) retinal ILM'nin vitreus tarafında endotelial hücre çekirdekleri izlenmektedir.

*E ve F:* Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 300 ng/μl (Grup E) ve 600ng/μl (Grup F) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş grupların retinal ışık mikroskopik kesitleri izlenmektedir.

*G ve H:* Postnatal 7-12 günde hiperoksiye tabi tutulan, intraperitoneal 0.05mg/kg (Grup G) ve 0.1mg/kg (Grup H) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş grupların retinal ışık mikroskopik kesitleri izlenmektedir.

## Resim-2: Elektronmikroskopik inceleme



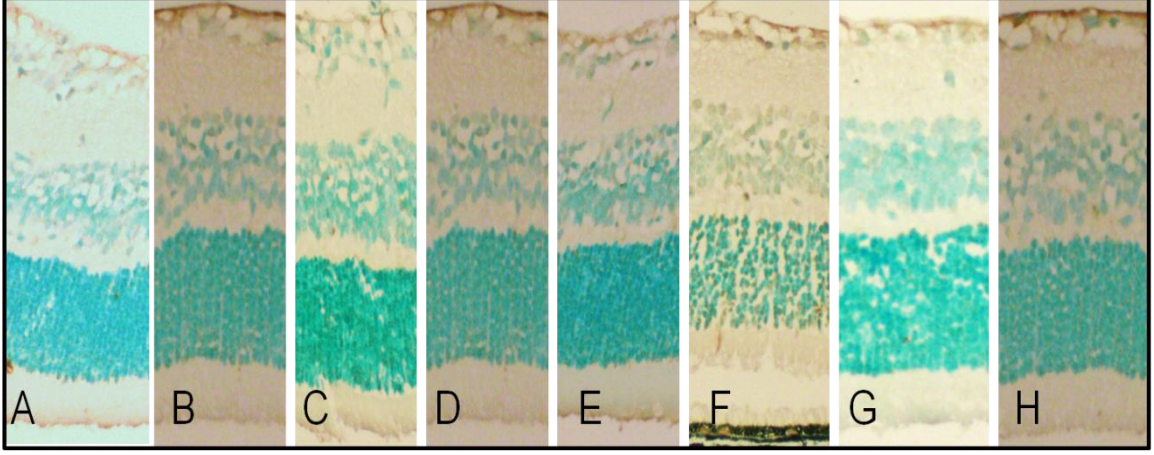
**A ve B:** Oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup A) ve intravitreal steril DMSO enjeksiyonu uygulanmış grup (Grup B-S) elektron mikroskopik incelemesinde fotosesepör iç segment bölümünde mitokondri yapılarında dismorfoloji izlenmedi. Mitokondrilerde tipik çift membranlı tübüler transvers düzenli mitokondrial kristalar görülmektedir.

**C ve D:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi işlem görmemiş grup (Grup C) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş grup (Grup D-S). Elektron mikroskopik incelemede fotoreseptör iç segment bölümünde irregüler mitokondri, litik matriks, elektron dens madde içeren mitokondriler gözlenmektedir.

**E ve F:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 300 ng/μl (Grup E) ve 600ng/μl (Grup F) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş gruplar. Ultrastrüktürel mitokondriyal değişiklikler ve atipik mitokondri sayısı Grup D'ye göre daha az bulundu.

**G ve H:** Postnatal 7-12 günde hiperoksiye tabi tutulan, intraperitoneal 0.05mg/kg (Grup G) ve 0.1mg/kg (Grup H) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş gruplar. Grup G ile Grup C arasında fark izlenmedi. Grup H atipik mitokondri sayısında Grup C'ye göre anlamlı azalma izlendi. Orijinal büyütme 6000x

### Resim-3: TUNEL tekniği ile apoptotik hücre analizi



**A-D:** C57BL/J6 fare retinasından ışık mikroskopi kesitinde oda ortamında tutulmuş, işlem görmemiş (Grup A) ve intravitreal steril DMSO intravitreal enjeksiyonu uygulanmış (Grup B-S); postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, işlem görmemiş (Grup C) ve intravitreal steril DMSO enjekte edilmiş (Grup D-S) gruplarda TUNEL tekniği ile dış nükleer tabaka ve iç nükleer tabakada benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir.

**E:** Oksijene tabi tutulan, intravitreal 300 ng/μl Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilen grupta (Grup E) TUNEL tekniği ile Grup A, B-S, C ve D-S ile benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre görülmüştür.

**F:** Postnatal 7-12. günde hiperoksiye tabi tutulan, intravitreal 600 ng/μl (Grup F) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş grupta apoptozis diğer gruplara göre artmış olarak izlendi.

**G ve H:** Postnatal 7-12 günde hiperoksiye tabi tutulan, intraperitoneal 0.05mg/kg (Grup G) ve 0.1mg/kg (Grup H) Siyanidin-3-Glikozit enjekte edilmiş gruplar. Kontrol grupları ile benzer sayıda apoptotik TUNEL-pozitif hücre görülmüştür. Orijinal büyültme 100x, İmmersiyon yağı kullanılmıştır.

## KAYNAKÇA

1. Asano, M.K. and P.B. Dray, Retinopathy of prematurity. *Dis Mon*, 2014. 60(6): p. 282-91.
2. Gariano, R.F. and T.W. Gardner, Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, 2005. 438(7070): p. 960-6.
3. Sapieha, P., et al., Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest*, 2010. 120(9): p. 3022-32.
4. Rivera, J.C., et al., Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis. *Neonatology*, 2011. 100(4): p. 343-53.
5. Kermorvant-Duchemin, E., et al., Understanding ischemic retinopathies: emerging concepts from oxygen-induced retinopathy. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 51-60.
6. Tsuda, T., F. Horio, and T. Osawa, The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors*, 2000. 13(1-4): p. 133-9.
7. Galvano, F., et al., Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem*, 2004. 15(1): p. 2-11.
8. Amorini, A.M., et al., Activity and mechanism of the antioxidant properties of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Free Radic Res*, 2001. 35(6): p. 953-66.
9. Acquaviva, R., et al., Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D -glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol Toxicol*, 2003. 19(4): p. 243-52.
10. Sarma AD, S.R., Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry* 1999. 52:1313–8.
11. Wang, Y., et al., The protective effects of berry-derived anthocyanins against visible light-induced damage in human retinal pigment epithelial cells. *J Sci Food Agric*, 2015. 95(5): p. 936-44.
12. Matsumoto, H., et al., Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Exp Eye Res*, 2006. 83(2): p. 348-56.
13. Matsunaga, N., et al., Vaccinium myrtillus (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010. 7(1): p. 47-56.
14. Smith LE, W.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: 101–111.
15. Palmer, E.A., et al., Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Ophthalmology*, 1991. 98(11): p. 1628-40.
16. Hardy, R.J., et al., Outcome-based management of retinopathy of prematurity. Multicenter Trial of Cryotherapy for Retinopathy of prematurity Cooperative Group. *J AAPOS*, 1997. 1(1): p. 46-54.

17. Ashton, N., B. Ward, and G. Serpell, Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol*, 1954. 38(7): p. 397-432.
18. Foos R, K.S., Development of retinal vasculature in paranatal infants *Surv Ophthalmol*, 1973. 117–127.
19. Arjamaa, O. and M. Nikinmaa, Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res*, 2006. 83(3): p. 473-83.
20. Fletcher, E.L., et al., The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 67-86.
21. Gerhardt, H., et al., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 2003. 161(6): p. 1163-77.
22. Liu, D., et al., Role of *unc5b* in retinal neovascularization in mice with oxygen-induced retinopathy. *International Journal of Ophthalmology*, 2011. 4(2): p. 137-142.
23. Marcus, R.C., et al., Eph family receptors and their ligands distribute in opposing gradients in the developing mouse retina. *Dev Biol*, 1996. 180(2): p. 786-9.
24. Valdez, C.N., et al., Retinal Microangiopathy in a Mouse Model of Inducible Mural Cell Loss. *The American Journal of Pathology*, 2014. 184(10): p. 2618-2626.
25. Leduc, M., et al., Hypercapnia- and trans-arachidonic acid-induced retinal microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity. *Semin Perinatol*, 2006. 30(3): p. 129-38.
26. Rezzola, S., et al., In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 2014. 17(3): p. 429-42.
27. Li, S.Y., Z.J. Fu, and A.C. Lo, Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. 2012: p. 426769.
28. Byfield, G., S. Budd, and M.E. Hartnett, The role of supplemental oxygen and JAK/STAT signaling in intravitreal neovascularization in a ROP rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(7): p. 3360-5.
29. Hartnett, M.E., The Effects of Oxygen Stresses on the Development of Features of Severe Retinopathy of Prematurity. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 25-39.
30. Hartnett, M.E., Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*, 2015. 122(1): p. 200-10.
31. Wang, H., S.X. Zhang, and M.E. Hartnett, Signaling pathways triggered by oxidative stress that mediate features of severe retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol*, 2013. 131(1): p. 80-5.
32. Vadlapatla, R.K., A.D. Vadlapudi, and A.K. Mitra, Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases. *Curr Drug Targets*, 2013. 14(8): p. 919-35.



33. Anwar, S., et al., Cyanidin-3-O-glucoside modulates intracellular redox status and prevents HIF-1 stabilization in endothelial cells in vitro exposed to chronic hypoxia. *Toxicol Lett*, 2014. 226(2): p. 206-13.
34. Hardy, P., et al., Major role for neuronal NO synthase in curtailing choroidal blood flow autoregulation in newborn pig. *J Appl Physiol* (1985), 2001. 91(4): p. 1655-62.
35. Kaur, C., et al., Cellular and vascular changes in the retina of neonatal rats after an acute exposure to hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(11): p. 5364-74.
36. Abdelsaid, M.A., et al., Early intervention of tyrosine nitration prevents vaso-obliteration and neovascularization in ischemic retinopathy. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. 332(1): p. 125-34.
37. Brooks, S.E., et al., Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(1): p. 222-8.
38. Ando, A., et al., Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol*, 2002. 191(1): p. 116-24.
39. Goldstein, I.M., P. Ostwald, and S. Roth, Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res*, 1996. 36(18): p. 2979-94.
40. Beauchamp, M.H., et al., Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J Appl Physiol* (1985), 2001. 90(6): p. 2279-88.
41. Beauchamp, M.H., et al., Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. 43(10): p. 3327-37.
42. Pratheeshkumar, P., et al., Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014. 280(1): p. 127-37.
43. Perveen, S., et al., Cyanidin-3-glucoside Inhibits ATP-induced Intracellular Free Ca(2+) Concentration, ROS Formation and Mitochondrial Depolarization in PC12 Cells. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014. 18(4): p. 297-305.
44. Lamy, S., et al., Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*, 2006. 27(5): p. 989-996.
45. Seeram, N.P., et al., Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 2001. 8(5): p. 362-9.
46. Ayoub, M., A.C. de Camargo, and F. Shahidi, Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food Chem*, 2016. 197(Pt A): p. 221-32.
47. Barnes, P.J. and M. Karin, Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 1997. 336(15): p. 1066-71.
48. Chen, C., Y.H. Chen, and W.W. Lin, Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. *Immunology*, 1999. 97(1): p. 124-9.

49. Ishida S, U.T., Yamashiro K, et al. , VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 2003. 198:483– 489.
50. Miyamoto, K., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol*, 2000. 156(5): p. 1733-9.
51. Sakurai E, T.H., Anand A, et al. , Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest OphthalmolVis Sci* 2003. 44:2743–2749.
52. Antonetti DA, B.A., Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW., Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 1999. 274:23463–23467.
53. Akkoyun, I., et al., Structural consequences after intravitreal bevacizumab injection without increasing apoptotic cell death in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol*, 2012. 90(6): p. 564-70.
54. Menke, M.N., et al., Intravitreal ranibizumab monotherapy to treat retinopathy of prematurity zone II, stage 3 with plus disease. *BMC Ophthalmology*, 2015. 15: p. 20.
55. Min, S.W., S.N. Ryu, and D.H. Kim, Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *Int Immunopharmacol*, 2010. 10(8): p. 959-66.
56. Bergers G, S.S., Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D., Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 2003. 111:1287–1295.
57. Matsunaga, N., et al., Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis. *Phytother Res*, 2010. 24 Suppl 1: p. S42-7.
58. Arnqvist, H.J., et al., The insulin-like growth factor system in vascular smooth muscle: interaction with insulin and growth factors. *Metabolism*, 1995. 44(10 Suppl 4): p. 58-66.
59. Boes, M., B.L. Dake, and R.S. Bar, Interactions of cultured endothelial cells with TGF-beta, bFGF, PDGF and IGF-I. *Life Sci*, 1991. 48(8): p. 811-21.
60. King, G.L., et al., Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *Journal of Clinical Investigation*, 1985. 75(3): p. 1028-1036.
61. Shigematsu, S., et al., IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J*, 1999. 46 Suppl: p. S59-62.
62. Smith, L.E., et al., Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med*, 1999. 5(12): p. 1390-5.

63. Iniguez, G., et al., IGF-IR signal transduction protein content and its activation by IGF-I in human placentas: relationship with gestational age and birth weight. *PLoS One*, 2014. 9(7): p. e102252.
64. Lee, J.E., 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): p. 234-5.
65. Gaudric, A., et al., Quantification of angiogenesis due to basic fibroblast growth factor in a modified rabbit corneal model. *Ophthalmic Res*, 1992. 24(3): p. 181-8.
66. Steiling, H. and S. Werner, Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. 14(5): p. 533-7.
67. Stavri, G.T., et al., Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1995. 358(3): p. 311-5.
68. Govinden, R. and K.D. Bhoola, Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*, 2003. 98(2): p. 257-65.
69. Distler, J.H., et al., Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med*, 2003. 47(3): p. 149-61.
70. Clauss, M., Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*, 2000. 26(5): p. 561-9.
71. Roberts, D.M., et al., The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *Am J Pathol*, 2004. 164(5): p. 1531-5.
72. Chang, Z.Y., et al., Erythropoietin protects adult retinal ganglion cells against NMDA-, trophic factor withdrawal-, and TNF-alpha-induced damage. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e55291.
73. Luo, W., L. Hu, and F. Wang, The Protective Effect of Erythropoietin on the Retina. *Ophthalmic Research*, 2015. 53(2): p. 74-81.
74. Wang, H., et al., VEGF-mediated STAT3 activation inhibits retinal vascularization by down-regulating local erythropoietin expression. *Am J Pathol*, 2012. 180(3): p. 1243-53.
75. Zhang, J., et al., Anti-VEGF effects of intravitreal erythropoietin in early diabetic retinopathy. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2010. 2: p. 912-27.
76. Shen, W., et al., Systemic administration of erythropoietin inhibits retinopathy in RCS rats. *PLoS One*, 2014. 9(8): p. e104759.
77. Munin, A. and F. Edwards-Lévy, Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 2011. 3(4): p. 793.

78. Wang, H., G. Cao, and R.L. Prior, Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. 45(2): p. 304-309.
79. Amorini, A.M., et al., Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside protects myocardium and erythrocytes from oxygen radical-mediated damages. *Free Radic Res*, 2003. 37(4): p. 453-60.
80. Bhuiyan, M.I., et al., The Neuroprotective Potential of Cyanidin-3-glucoside Fraction Extracted from Mulberry Following Oxygen-glucose Deprivation. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2011. 15(6): p. 353-61.
81. Wang, J. and G. Mazza, Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(4): p. 850-7.
82. Lee, S.H., et al., Cyanidin-3-glucoside extracted from mulberry fruit can reduce N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Curr Eye Res*, 2014. 39(1): p. 79-87.
83. Serra, D., et al., Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e73001.
84. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*, 2005. 123(7): p. 991-9.
85. Good, W.V. and G. on behalf of the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative, Final results of the early treatment for retinopathy of prematurity (ETROP) randomized trial. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 2004. 102: p. 233-250.
86. Mintz-Hittner, H.A., K.A. Kennedy, and A.Z. Chuang, Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*, 2011. 364(7): p. 603-15.
87. Arambulo, O., et al., Intravitreal ranibizumab as a primary or a combined treatment for severe retinopathy of prematurity. *Clin Ophthalmol*, 2015. 9: p. 2027-2032.
88. Conway, E.M., D. Collen, and P. Carmeliet, Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, 2001. 49(3): p. 507-21.
89. Hellström, M., et al., Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 2001. 153(3): p. 543-554.
90. Heng, L.Z., et al., Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabet Med*, 2013. 30(6): p. 640-50.
91. Campochiaro, P.A., Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*, 2015. 49: p. 67-81.
92. Campochiaro, P.A., Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl)*, 2013. 91(3): p. 311-21.
93. Ishibashi, T., et al., Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovascularization in the subhuman primate. *Archives of Ophthalmology*, 1985. 103(5): p. 708-711.

94. Akkoyun, I., et al., Impact of triamcinolone acetonide on retinal endothelial cells in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol Scand*, 2007. 85(7): p. 791-4.
95. Sivaprasad, S., P. McCluskey, and S. Lightman, Intravitreal steroids in the management of macular oedema. *Acta Ophthalmol Scand*, 2006. 84(6): p. 722-33.
96. Ju, M., et al., Simultaneous but not prior inhibition of VEGF165 enhances the efficacy of photodynamic therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(2): p. 662-70.
97. Lytvynchuk, L., et al., Antiproliferative, Apoptotic, and Autophagic Activity of Ranibizumab, Bevacizumab, Pegaptanib, and Aflibercept on Fibroblasts: Implication for Choroidal Neovascularization. *Journal of Ophthalmology*, 2015. 2015: p. 934963.
98. Basile, A.S., et al., Population pharmacokinetics of pegaptanib sodium (Macugen((R))) in patients with diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*, 2015. 9: p. 323-35.
99. Grisanti, S., Ziemssen, Focke, Bevacizumab: Off-label use in ophthalmology. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2007. 55(6): p. 417-420.
100. Heiduschka, P., et al., Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. 48(6): p. 2814-23.
101. Spitzer, M.S., et al., Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*, 2006. 90(10): p. 1316-21.
102. Browning, D.J., et al., Aflibercept for age-related macular degeneration: a game-changer or quiet addition? *Am J Ophthalmol*, 2012. 154(2): p. 222-6.
103. Jiang, J., L. Zhang, and X.-B. Xia, Small interfering RNA targeting PGC-1 $\alpha$  inhibits VEGF expression and tube formation in human retinal vascular endothelial cells. *International Journal of Ophthalmology*, 2015. 8(5): p. 877-883.
104. Connolly, B., et al., Squalamine lactate for exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmol Clin North Am*, 2006. 19(3): p. 381-91, vi.
105. Pecun, P.E. and P.K. Kaiser, Current phase 1/2 research for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*, 2015. 26(3): p. 188-93.
106. Souied, E.H., et al., Treatment of exudative age-related macular degeneration with a designed ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: a phase I/II study. *Am J Ophthalmol*, 2014. 158(4): p. 724-732 e2.
107. Nguyen, T.T. and R. Guymer, Conbercept (KH-902) for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2015. 8(5): p. 541-8.
108. Kauper, K., et al., Long-Term, Sustained Intraocular Delivery of a VEGF Antagonist Using Encapsulated Cell Technology Implant for the Treatment of Choroidal Neovascular Diseases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012. 53(14): p. 455-455.
109. Pechan, P., et al., Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene Ther*, 2009. 16(1): p. 10-6.

110. Maier, P., et al., Intravitreal injection of specific receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222 584 improves ischemia-induced retinopathy in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2005. 243(6): p. 593-600.
111. Ishikawa, M., et al., Future Therapies of Wet Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Ophthalmology*, 2015. 2015: p. 10.
112. Jaffe, G.J., et al., A Phase 1 Study of Intravitreal E10030 in Combination with Ranibizumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*.
113. Buonocore, G., S. Perrone, and R. Bracci, Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate*, 2001. 79(3-4): p. 180-6.
114. Serraino, I., et al., Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. *Life Sci*, 2003. 73(9): p. 1097-114.
115. Zhu, W., et al., The anthocyanin cyanidin-3-O-beta-glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. *Free Radic Biol Med*, 2012. 52(2): p. 314-27.
116. Fu, Y., et al., Cyanidin-3-O-beta-glucoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by reducing TLR4 recruitment into lipid rafts. *Biochem Pharmacol*, 2014. 90(2): p. 126-34.
117. Ogawa, K., et al., Protective effects of bilberry and lingonberry extracts against blue light-emitting diode light-induced retinal photoreceptor cell damage in vitro. *BMC Complement Altern Med*, 2014. 14: p. 120.
118. Godley BF, S.F., Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M, Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem*, 2005. 280:21061–21066.
119. Rai NK, T.K., Sharma D, Shukla vk, Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 2005. 4:138-44.
120. Meyer N, K.S., Penn LZ, The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 2006. 16:275-87.
121. Roy, M.J., Vom, A., Czabotar, P. E., Lessene, G, Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *British Journal of Pharmacology*, 2014. 171:1973–1987.
122. Skemiene, K., et al., Anthocyanins block ischemia-induced apoptosis in the perfused heart and support mitochondrial respiration potentially by reducing cytosolic cytochrome c. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. 45(1): p. 23-9.
123. Elisia, I. and D.D. Kitts, Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Mol Cell Biochem*, 2008. 312(1-2): p. 139-45.

124. Li, D.W., et al., Attenuation of Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Cyanidin, a Natural Inhibitor of ROS-Mediated Apoptosis in PC12 Cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2015. 35(7): p. 995-1001.
125. Xu, J.W., K. Ikeda, and Y. Yamori, Inhibitory effect of polyphenol cyanidin on TNF-alpha-induced apoptosis through multiple signaling pathways in endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2007. 193(2): p. 299-308.
126. Kim, S.H., et al., Cyanidin 3-O-glucoside reduces Helicobacter pylori VacA-induced cell death of gastric KATO III cells through inhibition of the SecA pathway. *Int J Med Sci*, 2014. 11(7): p. 742-7.
127. Jiang, X., et al., Cyanidin-3-O-beta-glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway. *Biochem Pharmacol*, 2014. 90(2): p. 135-44.
128. Lee JS, Song IG, Kim YE, Baek N, Hong EK. Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruit protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Int J Mol Med*, 2015. 35: 405-412.
129. Skemiene, K., et al., Protecting the heart against ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis: the effect of anthocyanins. *Medicina (Kaunas)*, 2013. 49(2): p. 84-8.
130. Lazze, M.C., et al., Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*, 2004. 25(8): p. 1427-33.
131. Yan, X., et al., Cyanidin-3-O-glucoside Induces Apoptosis and Inhibits Migration of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Treated Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Cardiovascular Toxicology*, 2015: p. 1-9.
132. Sorrenti, V., et al., Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 2015. 47(4): p. 1303-10.
133. Chen, P.N., et al., Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutr Cancer*, 2005. 53(2): p. 232-43.
134. Shin, D.Y., et al., Induction of apoptosis and inhibition of invasion in human hepatoma cells by anthocyanins from meoru. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1171: p. 137-48.
135. Fimognari, C., et al., In vitro antitumor activity of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Chemotherapy*, 2005. 51(6): p. 332-5.
136. Hyun, J.W. and H.S. Chung, Cyanidin and Malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. *J Agric Food Chem*, 2004. 52(8): p. 2213-7.
137. Katsuzaki, H., et al., Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside isolated from skin of black *Glycine max* and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncol Rep*, 2003. 10(2): p. 297-300.

138. Alhosin, M., et al., Bilberry extract (Antho 50) selectively induces redox-sensitive caspase 3-related apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the Bcl-2/Bad pathway. *Scientific Reports*, 2015. 5: p. 8996.
139. Zikri, N.N., et al., Black raspberry components inhibit proliferation, induce apoptosis, and modulate gene expression in rat esophageal epithelial cells. *Nutr Cancer*, 2009. 61(6): p. 816-26.
140. Cvorovic, J., et al., Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010. 501(1): p. 151-157.
141. Jhin, C. and K.T. Hwang, Prediction of Radical Scavenging Activities of Anthocyanins Applying Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) with Quantum Chemical Descriptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. 15(8): p. 14715-14727.
142. Yanamala, N., et al., pH-dependent interaction of rhodopsin with cyanidin-3-glucoside. 1. Structural aspects. *Photochem Photobiol*, 2009. 85(2): p. 454-62.
143. Tirupula, K.C., et al., pH-dependent interaction of rhodopsin with cyanidin-3-glucoside. 2. Functional aspects. *Photochem Photobiol*, 2009. 85(2): p. 463-70.
144. Tripathi, B.J. and R.C. Tripathi, Cellular and subcellular events in retinopathy of oxygen toxicity with a preliminary report on the preventive role of vitamin E and gamma-aminobutyric acid: a study in vitro. *Curr Eye Res*, 1984. 3(1): p. 193-208.