T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Lokman AYAZ

PROLİFERATİF DİYABETİK RETİNOPATİDE ANGİOPOETİN-1, ANGİOPOETİN-2 VE TİE2 GENLERİNİ HEDEFLEYEN miRNA'LARIN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hilal Sancar

EDİRNE-2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Lokman AYAZ

PROLİFERATİF DİYABETİK RETİNOPATİDE ANGİOPOETİN-1, ANGİOPOETİN-2 VE TİE2 GENLERİNİ HEDEFLEYEN miRNA'LARIN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hilal Sancar
Destekleyen Kurum: TÜBAP- 2020/124

Tez no:

EDİRNE-2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Lokman Ayaz danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Hilal Sancar tarafından tez başlığı "Proliferatif Diyabetik Retinopatide Angiopoetin-1 Angiopoetin-2 ve Tie2 Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 02/01/2023 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Lokman AYAZ
(Jüri Başkanı)

İmza
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
(Üye)

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Bahadır ERCAN
(Üye)

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Necdet Süt
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimde ve tez çalışma sürecinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, verdiği emek, sabır ve desteklerinden dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Lokman Ayaz olmak üzere, tez çalışmamda büyük destekleri olan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr Sadık Altan Özal'a ve Dr. İrfan Akaray'a, yardımlarından dolayı Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Suat Erdoğan'a ve Arş. Gör. Rıza Serttaş'a, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……1
GENEL BİLGİLER……3
DİABETES MELLİTUS……..3
DİABETİK RETİNOPATİ……..6
mikroRNA……...…19
PROLİFERATİF DİABETİK RETİNOPATİ VE miRNA İLİŞKİSİ……...27
GEREÇ VE YÖNTEMLER…….31
BULGULAR……..38
TARTIŞMA……44
SONUÇLAR……...52
ÖZET……..54
SUMMARY……56
KAYNAKLAR……...58
ŞEKİLLER LİSTESİ……71
ÖZGEÇMİŞ……...72
EKLER……...73

SİMGE VE KISALTMALAR

ADA:	Amerikan Diyabet Cemiyeti
AGE:	İleri glikasyon son ürünleri
AMO:	Anti-miRNA oligonükleotitleri
Ang-1:	Anjiyopoietin 1
Ang-2:	Anjiyopoietin 2
AntimiR:	Anti-miRNA'lar
ASO:	Modifiye antisens oligonükleotidlerdir
CDS:	mRNA'ların kodlama dizileri
DAG:	Diaçilgliserol
DGCR8:	Protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8
DM:	Diabetes Mellitus
DMÖ:	Diyabetik Makula Ödemi
DN:	Diyabetik nefropati
DR:	Diyabetik retinopati
ELISA:	Enzim-Linked İmmunsorbent Assay
ETDRS:	Erken Tedavi Diyabetik Retinopati Çalışması
FDA:	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
GlcNAc:	N-asetilglukozamin-6-fosfat
HbA1c:	Hemoglobin A1c

HIF1:	Hipoksi indükleyeci faktör-1
HREC:	İnsan retinal endotel hücreleri
LNA:	Locked nükleik asitler
miRNA:	mikroRNA
NDR:	Retinopatisi bulunmayan diyabetik
NPDR:	Proliferatif olmayan diyabetik retinopati
OIR:	Oksijenle indüklenmiş retinapati
PDR:	Proliferatif diyabetik retinopati
PKC:	Protein kinaz C
PNA:	Peptit nükleik asitleri
PPAR:	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör
PPV:	Pars plana vitrektomi
RAGE:	AGE reseptörü
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SPSS:	Stastistical Package for Social Sciences version
T1DM:	Tip 1 diyabetes mellitus
T2DM:	Tip 2 diyabetes mellitus
Tie2:	Reseptör Tirozin Kinaz 2
UKPDS:	Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışması
VE-PTP:	Vasküler endotelyal protein tirozin fosfataz
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetik retinopati (DR), Diyabetes Mellitus'un (DM) yaygın bir mikrovasküler komplikasyonu olup, yaşa bağlı görme kaybının önde gelen başlıca nedenlerinden biridir (1). DR, proliferatif olmayan DR (NPDR) ve proliferatif DR (PDR) olarak sınıflandırılmaktadır. NPDR, intraretinal mikrovaskülatür değişiklikleri içerirken, PDR ise yeni kan damarlarının oluşumunu ve büyümesi ile karakterizedir (2). PDR'de anjiyogenez süreci önemli rol oynamakta olup, endotel hücrelerde bulunan reseptörleri aktive eden anjiyojenik büyüme faktörlerinin salınması ile bu süreç başlamaktadır (3). Retina dokusunun yüksek glikoz seviyesinden kaynaklanan metabolik gereksinimi, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), anjiyopoietin 1 (Ang-1) ve anjiyopoietin 2 (Ang-2) gibi anjiyojenik sinyallerin salınmasıyla birlikte neovaskülarizasyon DR patogenezinde kritik bir değişikliğin habercisidir (4).

Ang/Reseptör Tirozin Kinaz 2 (Tie2) yolu, anjiyojenik sürecin son aşamalarında kan damarı yeniden şekillenmesini ve olgunlaşmasını düzenleyen önemli bir sinyal yolağıdır (5). Tie2, kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan, Ang-1 ve Ang-2'in bağlandığı bir transmembran reseptörü olarak işlev görmektedir. Ang-1'in Tie2'ye bağlanarak reseptörün fosforilasyonuna neden olmakta ve vasküler geçirgenliği inhibe edici etkilerini başlatarak vasküler stabilite üzerinde koruyucu etki göstermektedir. Ang-2 ise Tie2 reseptörüne bağlandığında fosforilasyonu inhibe eder ve tüm yolu deaktive ederek anjiyogenezi hızlandırmaktadır (6)

mikroRNA'lar (miRNA), gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak işlev gören yaklaşık 22 nükleotitten oluşan kodlama yapmayan, küçük RNA molekülleridir. Memeli miRNA'larının tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği belirtilmiştir (7). miRNA'ların tüm hücresel süreçlerin düzenlenmesine katıldığını ve ekspresyonlarındaki değişikliklerin birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (8). miRNA'lar serum, plazma, idrar ve tükürük gibi farklı vücut sıvılarında da tespit edilebilmiştir. Ayrıca gözyaşı, aköz humor ve vitreus humor sıvısı gibi oküler sıvı örneklerinde de miRNAların varlığı tespit edilmiştir (9). Çok sayıda retinal miRNA'nın anormal ekspresyonu ve değişen aktivitesi, DR dahil olmak üzere yaygın retinal bozuklukların etiyolojisi ile ilişkilendirilmiştir. miRNA'ların DR patogenezindeki potansiyel rolü tedavide ve biyobelirteç olarak kullanılmak için araştırılmaktadır (10).

Bu çalışmada ile miRWalk2.0 ve Targetscan veritabanlarının taranması sonucunda PDR patogenezinde önemli rol oynayan Ang-1, Ang-2 ve Tie2 genlerini hedefleyen, miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p ve miR-204-5p'nin ekspresyon profilleri belirlenerek hastalığın ilerleyişini azaltan veya durdurulmasını sağlayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmaktadır. Ayrıca bu çalışma, olası biyobelirteç sayısını arttırmak ve erken tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine yönelik önemli katkılarda bulunacaktır.

GENEL BİLGİLER

DİAEBETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus, pankreasın β hücrelerinin disfonksiyonu, insülin direnci veya her iki durumun birlikte görülmesiyle, insülin eksikliğinden kaynaklanan yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize kronik metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (11). Devam eden yüksek kan glukoz seviyesi ile oluşan fizyolojik olarak anormal bir durum olan hiperglisemi, insülin salgılanmasında oluşan anomalilerden kaynaklanmaktadır. Hiperglisemi sebebiyle karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında işlev bozuklukları ortaya çıkmaktadır (12).

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı verilere göre DM, son yıllarda dünya genelinde katlanarak artmaktadır. DM prevalansı 1980'de 108 milyon (%4,7) iken 2017'de 425 milyona (%8,5) yükselmiştir. 2045'te ise 629 milyon olacağı tahmin edilmektedir (13).

Ülkemizde şu an yaklaşık 7,2 milyon yetişkinin DM hastası olduğu düşünülmekte ve bunların yaklaşık 3 milyonunun hala teşhis edilmemiş durumda olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca ülkemizde bulunan DM hastalarının %28'i DR'ye sahip olduğu ve DM hastalarının %50'sinden fazlasının, en az iki adet diyabetle ilişkili komplikasyona sahip olduğu bildirilmiştir (14).

2021 yılında Amerikan Diyabet Cemiyeti (ADA) göre DM'yi farklı kategorilerde sınıflandırmıştır. Tablo 1'de bu sınıflandırma açıklanmaktadır (15).

Tablo 1: DM'un sınıflandırılması (15)

DM Sınıfı	Tanımlama
T1DM	Genellikle insülin eksikliğine yol açan otoimmün β hücre yıkımı içeren diyabet sınıfıdır. • İmmün aracılı T1DM • İdiyopatik T1DM
T2DM	İnsülin direnci sebebi ile oluşan diyabet sınıfıdır.
Diğer nedenlere bağlı diyabet	Aşağıdaki nedenlerin herhangi birinin sebep olduğu diyabet sınıfıdır. • B hücre fonskiyonunda genetik defekt • İnsülin etkisinde genetik defekt • Ekzokrin pankreas hastalıkları • Endokrinopati • İlaç ve kimyasal maddelerle oluşan diyabet • Enfeksiyonlar
Gestasyonel DM	Gebeliğin 2 veya 3. Trimesterında tanımlanan karbonhidrat intoleransıdır.

DM; Diabetes Mellitus, **T1DM;** Tip 1 Diabetes Mellitus, **T2DM;** Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 Diabetes Mellitus

İnsülin etkisi ile insülin sekresyonu arasındaki feedback mekanizmaları tam olarak çalışmadığında, insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi insüline duyarlı dokular ve pankreasta bulunan β hücreleri etkilenmektedir. Bu durum anormal kan glikoz seviyelerinin oluşumuna neden olmaktadır. T2DM'de insülin direnciyle birlikte karaciğerde glikoz üretimi artmaktadır. Ayrıca kas ve yağ dokusunda belirli bir insülin seviyesinde glikoz alımı azalmaktadır (16).

Tip 2 DM'li bireylerin diyabet komplikasyonları geliştirmeden önce teşhis edilmemiş ve tedavi edilmemiş olması önemli bir halk sağlığı sorunudur (17). T2DM komplikasyonları makrovasküler komplikasyonlar ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır (11). Genel olarak, makrovasküler komplikasyonlara koroner arter hastalığı, periferik arter

hastalığı ve felç örnek verilmektedir. Mikrovasküler komplikasyonlar ise diyabetik nefropati, nöropati ve retinopati olarak sınıflandırılmaktadır (18).

Diyabetik nefropati: Diyabetik nefropati (DN), artmış idrar albümin atılımı, azalmış glomerüler filtrasyon hızı, diyabetik glomerüler lezyonlar ve artmış arteriyel kan basıncı ile karakterizedir. DN, böbreklerdeki kan damarlarını etkileyerek işlev bozukluğuna neden olan yüksek kan şekerinden kaynaklanmaktadır (19).

Diabetes mellitusun neden olduğu DN, dünya çapında son dönem böbrek yetmezliğinin başlıca nedenlerinden biri olarak görülmektedir (20). T2DM bulunan kişilerde ölümlerin yaklaşık %10'u böbrek yetmezliğine bağlı olduğu belirtilmiştir. DM, ABD'de son dönem böbrek hastalığı vakalarının %44'üne neden olmaktadır (16). DN sıklıkla albüminüri ile birlikte ortaya çıkan, hiperglisemiye bağlı böbrek fonksiyonunun azalması ile tanımlanan ilerleyici bir hastalıktır (11). Klinik olarak mikroalbüminüri, DN'nin ilerlemesini değerlendirmek için önemli indekslerdendir (20). Diyabet durumunda 24 saat içinde proteinüri> 500 mg olarak tanımlanırken mikroalbüminüri ise 30-299 mg/24 saat albümin atılımı olarak tanımlanmaktadır. Müdahale olmaksızın, mikroalbüminürili diyabetik hastalar tipik olarak proteinüri ve diyabetik nefropatiye doğru ilerlemektedir. Bu ilerleme hem T1DM hem de T2DM'de görülmektedir. T2DM hastalarının yaklaşık %7'si, diyabet teşhisi konulduğunda mikroalbüminüriye sahip olabileceği düşünülmektedir (18).

Diyabetik nefropatinin risk faktörleri arasında dislipidemi, hipertansiyon, zayıf glisemik kontrol ve sigara içmenin yanı sıra bir kişinin genetik profili de hastalığa yakalanmada önemli rol oynamaktadır. DN'nin aile öyküsü olan bireylerde gelişmeye yatkın olduğu düşünülmektedir (19).

Diyabetik Nöropati: Diyabetin komplikasyonları arasında, periferal ve otonom sinir sistemlerine verilen hasarın neden olduğu nöropati, en yaygın görülen komplikasyonlar arasındadır. Fokal sinir sistemi hasarından kaynaklanan nöropatiler diyabetli tüm bireylerin yarısından fazlasında ortaya çıkmaktadır. Nöropati insidansı T2DM'ye bireylerde 100.000 kişide yıl başına 6.100 iken T1DM bireylerde 100.000 kişide yıl başına 2.800'dür (21).

Diyabetik periferik nöropati, nöropatilerin en yaygın şekli olan diyabetik komplikasyondur. Bazı sakatlıkların, ayak ülserinin ve en sonunda amputasyonun önde gelen nedenidir. Ayrıca, diyabetik periferik nöropati hastalarının %20-30'u, genellikle kronik, şiddetli, tedavi edilmesi ve yönetilmesi zor olan nöropatik ağrıdan muzdariptirler (22).

Diyabetik nöropatinin ana belirtilerinden olan nöropatik ağrılar, alt ekstremiteleri etkileyen simetrik duyusal ağrılar olarak tanımlanır. Diğer bulguları arasında atipik ağrı, uyuşma, karıncalanma, sıcaklık veya yanma hissi bulunur. Ayrıca kas güçsüzlüğü, zayıf denge ve düşme eğilimi gibi diğer sinir motor disfonksiyonu belirtilerini de içerebilir (22).

DİYABETİK RETİNOPATİ

Diyabetik retinopati, T1DM ve T2DM'nin en yaygın komplikasyonlarından bir olup, küresel çapta görme kaybı ve körlüğün önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (23).

Gelişmiş ülkelerde yaklaşık 13 milyon kişide teşhis edilen DR, klinik olarak retinal neovaskülarizasyon, mikroanevrizmaların oluşumu, vitrözde protein eksüdalarının varlığı ve hastalarda görme keskinliğinde sürekli bir düşüş ile karakterize edilmektedir (24). DR ölümcül bir hastalık olmamasına rağmen, günlük yaşam işlevselliğini azaltmakta ve insanların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (25).

Diyabet prevalansının artması ve daha uzun yaşayan diyabetli insanların sayısının artmasıyla birlikte, DR ve bu hastalığa bağlı görme bozukluğu olanların sayısı dünya çapında hızla artmaktadır (26). DR'li kişilerin sayısının 2017'de 424,9 milyondan 2045'e kadar 628 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Prevalansındaki bu artış DR'yi temel halk sağlığı sorunlarından biri haline getirmektedir. Bu nedenle, görme kaybını önlemek veya geciktirmek için DR'nin erken teşhis edilmesi ve gelişiminin önlenmesi gerekmektedir (25).

Diyabetik retinopatinin ana patofizyolojisi, hipergliseminin neden olduğu retinal kapillerde bazal membranın kalınlaşması, artmış retinal vasküler geçirgenlik, doku iskemisi gibi çeşitli değişikliklerdir. Neovaskülarizasyona yol açan çeşitli vazoaktif maddelerin salınması ile retina yüzeyinde yeni kan damarları oluşmaya başlar. Yeni kan damarlarından damar içeriğinin (kan ve hücre dışı sıvılar) dışarı sızması daha kolaydır, bu da vitröz kanama ve retina dekolmanı ile sonuçlanmaktadır. Bu patofizyolojik değişiklikler görme kaybına da yol açabilen PDR oluşumuna sebep olmaktadır (27).

Diyabetik Retinopati Epidemiyolojisi

Dünya çapında DM prevalansı artmaya devam ederken, DR birçok gelişmiş ülkede görme kaybının önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Diyabet gözü birçok yönden etkilese de (örneğin, katarakt riskinin artması), DR en yaygın ve ciddi oküler komplikasyonlardan biridir (28).

Dünya çapında popülasyon temelli çalışmalar ile DR ve aşamalarının prevelansı ortaya çıkarılmıştır. Diyabetli 20.000'den fazla katılımcıyla yapılan 35 çalışmanın tümünden elde edilen verilere dayanarak, diyabetli bireyler arasında genel DR prevalansının %34,6 bulunurken PDR'nin %7 ve PDR'ye bağlı gelişen Diyabetik Makula Ödemi (DMÖ) %6,8 olduğu saptanmıştır (29).

Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda, DR veya DMÖ geliştirme risklerini ölçümlenmiş bu çalışma sonuçlarına göre T1DM veya T2DM hastalar arasında önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Hem glisemik kontrol durumu hemde DM süresinin, DR ve DMÖ gelişiminde dikkate değer risk faktörleri olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, 25 yıllık bir sürede DR gelişme oranı TDM'1li hastalarda %95'in üzerinde iken, T2DM hastalarda bu oran %60 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 10 yıllık bir sürede DMÖ gelişme oranı TDM l hastalarda %20, insülin alan T2DM hastalarda %25 ve insülin almayan T2DM hastalarda ise %14 olarak saptanmıştır. Genel olarak, T1DM'li hastalar DR ve PDR geliştirme eğilimindeyken, insülin alan T2DM hastalarında DMÖ gelişme riski daha yüksek olduğu gözlenmiştir (23,30).

Şu ana kadar en kapsamlı araştırma Wisconsin'de yapılan epidemiyolojik çalışma olup, Wisconsin epidemiyolojik DR çalışmasındaki olgular, hastaların insülin gereksiniminden bağımsız olarak diyabet başlangıcına göre iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup; 30 yaş altı insüline bağımlı diyabet grubu olarak erken başlangıçlı grubu temsil etmektedir. İkinci grup ise geç başlangıçlı grubu temsil eder ve 30 yaş sonrası insülin bağımlı ve insülin bağımsız diyabet grubu şeklinde iki alt gruba ayrılmıştır. Erken başlangıçlı birinci grupta DR, 20 yıl diyabet sonrası PDR ve 15 yıl diyabet sonrası DMÖ prevalans oranları sırasıyla %70, %50 ve %18 olarak bildirilmiştir. 5 yıldan az süreli diyabeti bulunan hastalarda DR prevalansı %17, 15 yıldan fazla diyabeti olanlarda DR prevalansı ise %97,5 olarak bildirilmiştir. 10 yıldan az diyabeti bulunan hastalarda PDR prevalansı yalnızca %1,2 iken 35 yıldan fazla diyabet geçmişi olan hastalarda PDR prevalansı %67 olarak belirlenmiştir. (31).

Diyabetik Retinopatinin Sınıflandırılması

Diyabetik retinopati gelişiminin aşamalarını belirlemek için günlük klinik uygulamada en yaygın kullanılan sınıflandırma, çok merkezli Erken Tedavi Diyabetik Retinopati Çalışmasının (ETDRS) sonuçlarına dayanmaktadır (25,32).

Bu çalışmaya göre DR, gözle görülür oftalmolojik değişikliklere ve retina neovaskülarizasyonun durumuna göre NPDR ve PDR olarak sınıflandırılmaktadır (25).

Değişen retinal kan akışı ve vasküler geçirgenlik, membran kalınlaşması, perisitlerin kaybı ve aselüler kapillerlerin oluşumu, mikroanevrizmalar ve intraretinal mikrovasküler

anormallikler gibi bulgular NPDR oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir. İskemi arttıkça hastalar, vitröz kanama veya vitröz içine kan damarları büyüdükçe retina dekolmanı gibi neovasküler komplikasyonlara bağlı önemli bir görme kaybı riski ile ilişkili PDR geliştirebilmektedir (23).

Erken Tedavi Diyabetik Retinopati Çalışmasının derecelendirme şemasına göre DR şiddetine göre de sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırma Tablo 2'de detaylı olarak açıklanmıştır. Hafif ve orta derecede NPDR arka plan PDR şeklinde adlandırılırken, şiddetli NPDR ise pre-PDR olarak belirtilmiştir. PDR ise yüksek riskli olmayan PDR ve yüksek riskli PDR olarak ikiye ayrılmıştır (32).

Tablo 2: DR'nin sınıflandırılması (25)

Retinopati	Tanımlanan Özellikler
Retinopati yok	Mikrovasküler lezyon bulunmamaktadır
Hafif derece NPDR	Sadece mikroanevrizma bulunur.
Orta derece NPDR	Mikroanevrizma ve diğer mikrovasküler lezyonlar bulunur.
Şiddetli derece NPDR	Hastalarda "4-2-1 kuralı" olarak bilinen unsurlardan en az biri bulunmaktadır. Bu unsurlar: 1) 4 kadran intraretinal kanama veya mikroanevrizma 2) 2 kadranda önemli venöz boncuklanma 3) 1 kadran intraretinal mikrovasküler anormallikleridir.
Aşırı şiddetli NPDR	Yukarıda bahsedilen 4-2-1 kuralındaki unsurlardan en az ikisi bu evrede gözlenmektedir.
Erken evre PDR	Yeni kan damarlarının oluşumu ile karakterizedir.
PDR	Hastalar aşağıda belirtilen unsurlardan en az birine sahiptir. 1)Diskin neovaskülarizasyonu> 1/3 ila 1/4'üncü disk çapında 2) Vitreusta veya pre-retinal bölgede hemoraji ile diskin neovazkülarizasyonu <1/3 ila 1/4'üncü disk çapı 3) Vitreus/preretinal hemoraji ile neovaskülarizasyon gözlenebilir

NPDR: Proliferatif olmayan diyabetik retinopati, **PDR**: Proliferatif diyabetik retinopati

Retinopati makulayı etkilediğinde DMÖ olarak adlandırılır ve diyabetik hastalarda körlüğün en yaygın nedenidir (25). İskemiye de bağlı olarak, DMÖ retina kılcal damarlarının geçirgenliğinin artması ve mikroanevrizmalardan gelişerek hücre dışı sıvının birikmesine ve normalde kompakt olan maküler dokunun kalınlaşmasına yol açar. DR'nin şiddeti arttıkça, DMÖ gelişme riski de benzer şekilde artar (23).

Diyabetik Retinopatide Risk Faktörleri

Diyabetik retinopatinin risk faktörleri, değiştirilebilir (hiperglisemi, hipertansiyon, hiperlipidemi ve obezite) ve değiştirilemez (diyabet süresi, ergenlik, gebelik, katarakt cerrahisi, DM tipi ve DR'nin aile öyküsü) risk faktörleri olarak ikiye ayrılmaktadır (33).

Değiştirilebilir risk faktörleri:

1-Hiperglisemi: Diyabet Kontrol ve Komplikasyonlar Çalışmasında Tip 1 DM popülasyonunda sıkı glisemik kontrolün yeni DR oluşturma riskini %76 ve mevcut retinopatinin ilerleme riskini %54 oranında azalttığı bulunmuştur (34). Son zamanlarda, tedavi hedefi olarak Hemoglobin A1c (HbA1c) düzeyini %7,6'nın (60 mmol / mol) altında tutmanın Tip 1 DM hastalarda PDR'yi 20 yıla kadar önlediği bildirilmiştir (35).

Tip 2 DM hastalarına ait en detaylı verilere, Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışması (UKPDS) ile ulaşılmaktadır. 3867 yeni tanı almış TDM 2 hastasını içeren randomize kontrollü klinik çalışmada sıkı kan şekeri kontrolü yapılan grup ile konvansiyonel grup kıyaslandığında DR progresyon hızının %21, lazer fotokoagülasyon ihtiyacının ise %29 azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca HbA1c değerindeki her %1'lik düşüşün; DR gelişiminde %40, PDR'de %25, lazer fotokoagülasyon ile tedavi ihtiyacında %25 ve körlük oranında %15 oranında azalma olduğu belirtilmiştir (31).

2-Hipertansiyon: Hipertansiyonun, DR gelişimi ile pozitif bir ilişkisi olduğu belirtilmektedir (36). UKPDS, Tip 2 DM olan 1148 hipertansif hastada kaptopril veya atenol kullanılarak gerçekleştirilen kan basıncı kontrolünün mikrovasküler komplikasyonlar üzerindeki etkisini incelemiştir. 7,5 yıl tedavi edilen grupta DR geliştirme riskinde %34 azalma olmuştur (32).

3-Hiperlipidemi ve Obezite: Hiperlipidemi ve obezite ile ilgili olarak, serum lipidleri PDR veya DMÖ gelişimi üzerinde daha az etkiye sahip gibi görünmektedir. Yüksek serum lipid düzeylerinin makulada eksuda oluşumuna neden olduğu, tedavi ile serum lipid düzeyleri kontrol altına alındığında makuladaki eksudasyonun gerilediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, DR şiddetinin Tip 1 DM'de artan trigliseritlerle ve kolesterol ile pozitif ve HDL ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (37).

Değiştirilemez risk faktörleri:

1-Diyabet süresi: Diyabetin süresi değiştirilemeyen risk faktörleri arasında en önemlisidir. Hastalık süresi uzadıkça DR ve DMÖ sıklığı ve ciddiyeti artmaktadır Skri-varhaug ve ark (38) yaptıkları bir çalışmada, T1DM olan olguların tanı aldıktan 25 yıl sonra %90'ında DR ve %10'unda PDR geliştiğini saptadılar. T2DM olgularının ise tanı anında %20'sinde DR olduğunu ve bu oran diyabet süresi ile arttığın belirlediler

2-Ergenlik ve gebelik: Ergenlik ve gebelik, T1DM'i bulunan kişilerde DR için iyi bilinen risk faktörlerindendir. WESDR çalışma sonuçlarına göre, ergenlik başlangıcının bir göstergesi olan menstrüasyon sonrası diyabet süresi, menstrüasyon öncesi diyabet süresine kıyasla %30'dan fazla DR riski ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, gebelik DR kötüleşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, T1DM hastalarda ergenlik sonrası ve gebelik süresince planlı retina muayenesi önerilmektedir (28).

3-Diğer Faktörler: Herhangi bir DR türünde insidans, erkeklerde ve kadınlarda benzer bulunmuştur. Ancak ırka göre kıyas yapıldığında en yüksek Afroamerikalılarda DR görülürken en düşük olarak Asya toplumlarında DR gelişimi bulunmuştur (29).

Önceki epidemiyolojik çalışmaların sonuçları ayrıca DR, DN, obezite, alkol tüketimi ve hematolojik anemi belirteçleri, hipotiroidizm, inflamasyon ve endotel disfonksiyonu dahil olmak üzere diğer birçok sistemik ve yaşam tarzı faktörüyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak bu tür faktörlerin DR patogenezindeki rolü iyi tanımlanmamıştır (28).

Diyabetik Retinopati Patogenezi

Diyabetik retinopatinin moleküler patofizyolojisi oldukça karmaşıktır ve hastalığın altında yatan mekanizmaların çoğu henüz tam olarak anlaşılmamıştır. DR'nin yetersiz yönetimi, metabolik disfonksiyona neden olan hiperglisemik epizotlara yol açmaktadır. Bu durum oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır. Mitokondriyal anormallikler apoptozu indükleyebilir ve inflamatuar faktörler hipoksinin aracılık ettiği VEGF sekresyonunu artırabilmektedir. Nörovasküler disfonksiyon, vasküler geçirgenlik ve neovaskülarizasyon, PDR ve DMÖ' ye yol açabilmektedir (39).

Hiperglisemiye ve hipertansiyon gibi risk faktörlerine kronik olarak maruz kalmak, mikrovasküler hasara ve retina işlev bozukluğuna yol açan bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik değişikliğin başlamasına sebep olmaktadır(28). DR ile ilgili ana metabolik anormallikler, poliol ve heksosamin yolaklarından artan glikoz akışı, protein kinaz C (PKC) yolağının aktivasyonu ve ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumudur (4)

Biyokimyasal değişiklikler:

1- İleri Glikasyon Son Ürünlerinin Oluşumu: Diyabet hastalarında uzun dönem boyunca devam eden hiperglisemiye bağlı olarak, glukoz ve fruktoz gibi indirgen şekerler veya lipidlerin serbest amino asitlerin, proteinlerin veya peptitlerin serbest amino grupları ile arasında

gerçekleşen ve enzimatik olmayan kompleks oluşturmasına Maillard reaksiyonu denir. Bu reaksiyon sonucu Amadori ürünleri oluşur. Bu ürünlerin oksidasyonu ile ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşmaktadır ve bu ürünler vasküler komplikasyonların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Diyabetik dokularda AGE birikiminin yüksek glukoz seviyeleri ile artmaktadır. AGE'lerin düzeyi ise komplikasyonların şiddeti ile ilişkili olduğu ve AGE reseptörün (RAGE) diyabetik retinopatinin ilerlemesinde de önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (40).

AGE retinal vasküler hücrelerde, nöronlarda ve gliada birikerek retinal perisitlerde ve vasküler endotel hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Bu nedenle, AGE'ler ve reseptörleri, DR gelişiminin altında yatan iki anahtar komplikasyonda rol oynamaktadır. Bu komplikasyonlar inflamasyon ve mikrovasküler disfonksiyona yol açmaktadır (41).

AGE'ler diyabet sırasında retinal perisitlerde birikmekte ve perisit sağkalımına ve sonuç olarak perisit kaybına yol açan fonksiyona aracılık etmektedir. Çalışmalar, retinal perisitlerde ROS üretimini uyaran AGE'lerin, perisitlerin apoptotik hücre ölümünü ortaya çıkarabildiğini ortaya koymuştur. AGE oluşumunun inhibisyonu ile, retinal kapiller dejenerasyon ve erken diyabetik retinopati bulgularının inhibe edildiği belirtilmiştir (42).

Bu sonuçlara dayanarak, AGE oluşumunun inhibisyonu, AGE'ler/RAGE etkileşiminin bloke edilmesi ve AGE'ler/RAGE aracılı sinyal basamaklarının bastırılması diyabetik retinopati için terapötik hedef olarak bildirilmiştir (43).

2- Poliol yolağı: Poliol yolu olarak da bilinen sorbitol-aldoz redüktaz yolu, hiperglisemi ve DR'yi birbirine bağlayan ana yollardan biridir. Bu yolakta yer alan 2 ana enzim vardır, bunlar aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenazdır. Hücrede aşırı miktarda glikoz bulunduğunda, aldoz redüktaz glikozu sorbitole dönüştürmekten sorumludur (44). Sorbitol, hücresel zarlardan geçemediği için hücre içinde birikir ve diğer zararlı etkilerin yanı sıra ozmotik hasara da neden olmaktadır (24). Ozmotik hasar retina kılcallarında hücre ölüne yol açmaktadır (27).

Sonuç olarak, Poliol yolunun aktivasyonu, diyabetik mikrovasküler disfonksiyon, nöronal apoptoz, glial reaktivite ve kompleman birikimine neden olmaktadır (45).

3- Heksoamin Yolağı: Diyabetik retinopatinin patogenezinde yer alan bir diğer önemli yol da fruktoz-6-fosfatın glukozamin-6-fosfata dönüştürüldüğü nispeten küçük bir glikoliz dalı olan heksosamin yoludur (4). Heksosamin yolunda fruktoz-6-fosfat, glutamin Fruktoz 6-fosfat amidotransferaz ile N-asetilglukozamin-6-fosfata (GlcNAc) dönüştürülür. GlcNAc daha sonra

çok sayıda sitoplazmik ve nükleer proteinin anahtar düzenleyicisi olan üridin-5-difosfo-N-asetilgalaktozamine (UDP-GlcNAc) dönüştürülür (24). Kronik hiperglisemi, heksosamin yolu ile oluşan bu subsratlarla birlikte retina hücrelerinin bozulmasına neden olmktadır. Ayrıca, diyabetik hastaların retina dokularında heksozamin seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir (4).

Heksozamin yolunun aktivasyonu ile üretilen yüksek glukozamin, mitokondride aşırı ROS üretimini uyarmakta ve mitokondriyal solunuma zarar vererekoksidatif stresi daha da şiddetlendirebilir, vasküler geçirgenliği artırabilir ve anjiyogenezi teşvik edebilmektedir (27).

4- Protein Kinaz C Aktivasyonu: Protein Kinaz C yolu, DR'nin oksidatif-stres kaynaklı patogenezinde kritik rol oynamaktadır. Sinyal iletiminde yer alan bir tür serin/treonin kinaz olan PKC, spesifik hormon, nöron ve büyüme faktöründen gelen uyarılara yanıt verebilir (27). Diyabetik retinada, yüksek glikoz seviyeleri, PKC'yi aktive eden toplam diaçilgliserol (DAG) seviyelerini arttırır (27,46). DAG, hücrelerdeki PKC'nin kritik aktivatörüdür (27). Aktive edilmiş PKC, vasküler geçirgenlik, anjiyogenez, hücre büyümesi, apoptoz, endotel disfonksiyonu, bazal membran kalınlaşması ve VEGF düzenlenmesi dahil olmak üzere birçok vasküler ve hücresel süreci etkilemektedir (46).

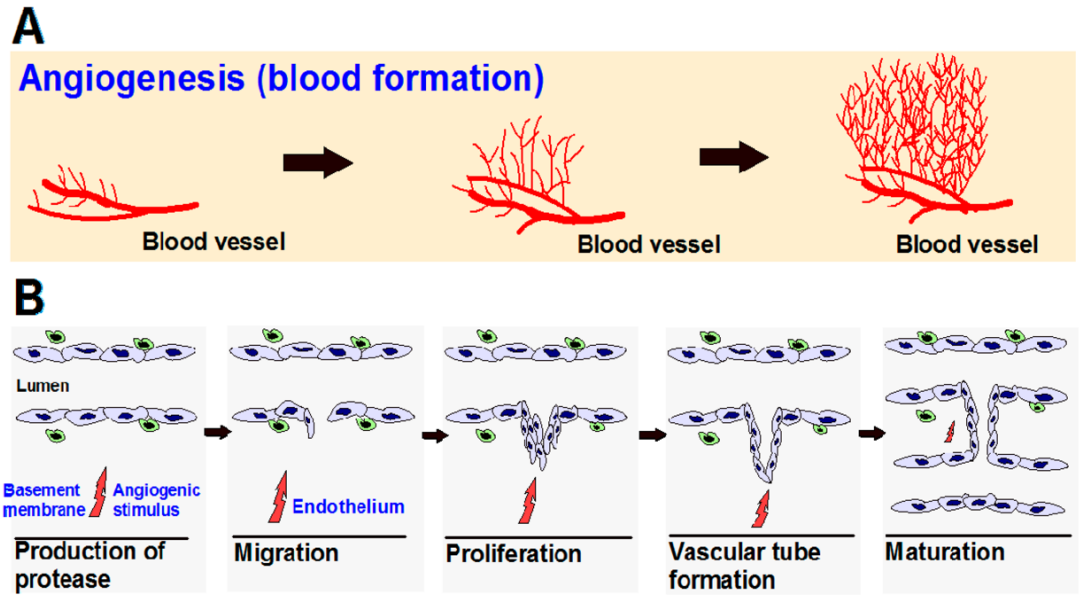
Yukarıda bahsedilen biyokimyasal değişikler ile oksidatif stres, inflamasyon, mikrovasküler disfonksiyon ve mitokondriyal hasar oluşmaktadır. Bu durum proinflamatuar aracı molekülleri, transkripsiyon faktörlerini, kemokinleri ve adhezyon moleküllerinin anormal oluşumuna neden olur. Bu faktörler daha sonra kan-retina bariyerinin bozulmasına sebep olur ve PDR'ye sebep olan pro-anjiyojenik büyüme faktörlerinin ve hormonların yukarı ekspresyonuna yol açmaktadır (39).

Diyabetik Retinopati Patogenezinde Anjiyogenez

Anjiyogenez, mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşması olarak tanımlanmaktadır (47). Var olan damarlardan endotel hücreleri filizlenerek yeni kan damarlarını meydana getirir (48). Şekil 1'de de gösterildiği gibi anjiyogenez, endotel hücre aktivasyonu, kılcal bazal membranın enzimatik olarak bozunması, endotel hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu, tübülogenesis, damar füzyonu, perisit stabilizasyonu ve son olarak kılcal ağ oluşumu gibi birkaç adımdan meydana gelen bir süreçtir (49).

Olgun kan damarlarında genellikle fizyolojik koşullar altında anjiyogenez oluşmamaktadır Bununla birlikte, kronik hipoksi, yüksek glukoz seviyeleri ve inflamasyon gibi dokularda anjiyogenik farktörlerin üretimini indükleyerek vaasküler büyümeyi teşvik eden ve neovaskülarizasyonu tetikleyen patolojik durumlar bulunmaktadır (48).

Anjiyogenez süreci, VEGF, Ang-1 ve Ang-2 gibi uyarıcı faktörler damarı geçirgen hale getirmeye başladığında gerçekleşmektedir (49). Retina dokusunun yüksek glikoz seviyesinden kaynaklanan metabolik gereksinimi, anjiyojenik sinyallerin salınmasıyla birlikte neovaskülarizasyon ihtiyacına neden olmaktadır (4). Bu aşamada retina neovaskülarizasyonunun ortaya çıkması, DR'nin ilerlemesinde kritik bir değişikliğin habercisidir. Fibrovasküler proliferasyon, ilerlemiş proliferatif hastalığın bir özelliğidir ve iskemik retina yüzeyinden çıkıntı yapan yeni kan damarları meydana gelmektedir (50). PDR hastalarının yaklaşık %8'inde, kontraktil fibrovasküler membranların oluşumu anormal neoanjiyogeneze eşlik ederek traksiyonel retina dekolmanını indükler. İlerleyici fibrozisten traksiyonel retina dekolmanı nedeniyle aniden görme kaybı meydana gelebilir (28,50).



Şekil 1: Anjiyogenez basamakları (51)

Anjiyopoietin/Tie-2 Sinyal Yolağı ve Proliferatif Diyabetik Retinopati

Anjiyopoietin-Tie (Ang/Tie) sinyal yolağı, vasküler gelişimde rol oynayan vasküler spesifik bir reseptör tirozin kinaz yolağıdır. Bu sinyal yolağı, tirozin kinaz reseptörleri Tie1 ve Tie2'ye bağlanarak etki gösteren anjiyopoietin 1-4'ten (Ang1-4) oluşmaktadır (52). Bu yolun bir diğer önemli bileşeni vasküler endotelyal protein tirozin fosfataz (VE-PTP)'dır (53).

Son zamanlarda, Ang-Tie2 sinyal yolu, vasküler hastalıklarda ilgi çekici bir sinyal yolağı olarak görülmektedir. Ang–Tie2 sinyal yolu, embiryonik dönemde lenfatik sistem ve kan damarı gelişimi için gerekli olduğu ve aynı şekilde yetişkin dokularda vasküler geçirgenliği, inflamasyonu ve patolojik anjiyojenik tepkileri kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu

sinyal yolağındaki değişimler, diyabetik vasküler komplikasyonlar gibi neovaskülerizasyon sepsis, organ transplantasyonu ve ateroskleroz gibi vasküler stabilizasyonun çok önemli olduğu durumlarda faydalı olabileceği bildirilmiştir. Ang-Tie2 yolunu hedefleyen ilaç moleküllerinin, gelecekte kanser ve neovasküler göz hastalıklarının tedavisinde mevcut anti-anjiyogenik stratejilere ek olarak kullanılabilecağı düşünülmektedir (54).

Tie1 ve Tie2, tirozin kinaz reseptör ailesi üyesi olup, ilk kez 1993 yılında spesifik endotelyal reseptör olarak keşfedilmiş olmasına rağmen, Tie reseptörleri endotelyal olmayan dokularda da ve ayrıca hem patolojik hem de normal dokuda ekspresse edilmektedir. Tie reseptörlerinin bulunduğu hücrelere karsinom hücreleri, fibroblast, keratinositler, düz kas hücreleri, nötrofiller, monositler, eozinofiller, ganglion hücreleri, nöronlar ve glial hücreleri örnek olarak verilmektedir (55).

Anjiopoetin ailesi ise Ang-1, Ang-2, Ang-3 ve Ang-4 gibi bir grup anjiyojenik faktörden oluşmaktadır. Bu ailenin tüm üyeleri, endotel hücrelerinde Tie2'ye bağlanmaktadır. Ang-1 ve Ang-2 bu anjiyojenik faktörlerin arasında en çok çalışılmış olanlardır. Ang-1 veya Ang-2'nin endotel hücreleri üzerindeki Tie2 reseptörüne bağlanması, fizyolojik ve patolojik vaskülarizasyonu düzenleyen Ang/Tie sinyal yolağının fosforilasyonunu indüklemektedir (56).

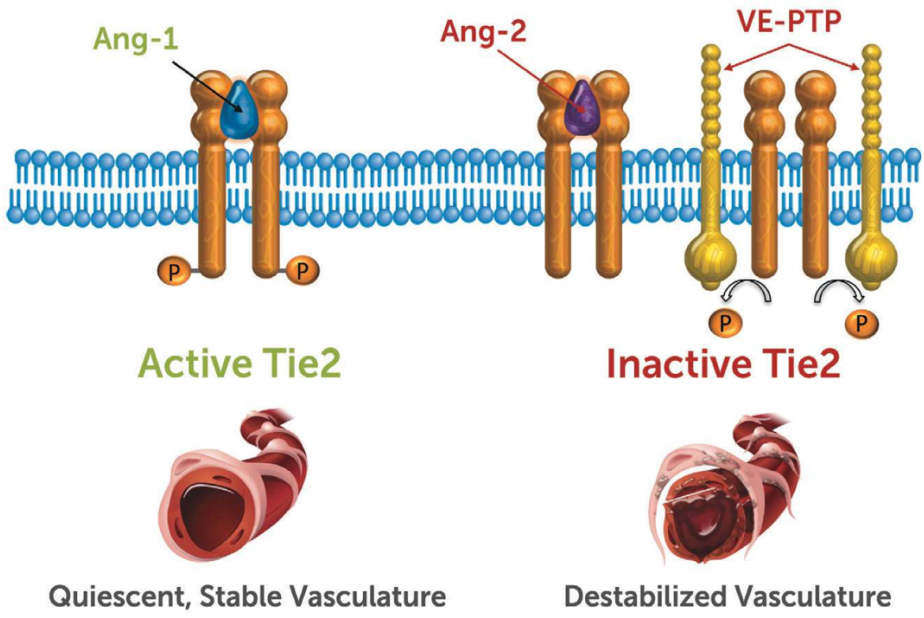
Perivasküler hücreler tarafından üretilen Ang-1, Tie2'ye bağlanarak aktivasyonuna, bu da Tie2'de aşağı akış sinyaline yol açmaktadır. Şekil 2'de gösterildiği gibi aktive olan Tie2, endotel hücrelerinin hayatta kalmasını, hücreler arası adezyonu ve stabilitesini arttırarak vasküler stabilizasyon sağlamaktadır. Bu şekilde Ang-1'in, patolojik anjiyogenezde koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir (5). Ang-1 ve VEGF-A'yı birlikte eksprese eden çift transgenik farelerle yapılan çalışmada VEGF-A'nın neden olduğu neovaskülarizasyonu baskıladığı gösterilmiştir (57). Ang-1, damar olgunlaşmasını desteklerken, endotel hücreler tarafından üretilen ve Tie2 reseptörü için antagonistik aktiviteye sahip olduğu bildirilen Ang-2, endotel hücrelerin ve perisitlerin destabilizasyonunda rol oynamaktadır (58).

Diyabetik hastalarda yaygın olan hipoksi, hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında Ang-2 ekspresyonu artmaktadır. Retinadaki hipoksi ve anjiyogenez koşulları, Ang-2 ile birlikte VEGF ekspresyonunu da artırmaktadır. Ang-2 ve VEGF birlikte çalışması, anjiyogenez sürecini kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, VEGF yolu anjiyogenezin başlamasını indüklerken, Tie2 sinyal yolu vasküler sağlığın korunmasında daha aktif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Tie2 sinyal yolağı endotel hücre hayatta kalması, olgunlaşması ve stabilitesinden de sorumlu olduğu belirlenmiştir (59).

Retina içine sıvı sızması, birçok retina damar hastalığının ayırt edici özelliklerindendir. VEGF ve Tie2 yollarının kombine aktivitesi ile vasküler geçirgenlik arttırdığı ve Ang-2,

VEGF'in etkisini güçlendirdiği bildirilmiştir. Ang-2 ekspresyonu arttığında VEGF'in neden olduğu vasküler geçirgenlik üç katına çıkmaktadır. Sıçan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, diyabetik sıçanların retinalarında diyabetik olmayan sıçanların retinalarına göre Ang-2'de 30 kat artış gözlemlenmiştir. Diyabetik retina çalışmalarınun sonucunda, Ang-2 seviyesindeki artış, anjiyogeneze ve bunun sonucunda neovaskülarizasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (6).

Ayrıca Tie2, VE-PTP tarafından da düzenlenmekte ve VE-PTP, Tie2'yi defosforile edererek Tie2 aktivasyonunu azaltmaktadır. Hem Ang-2 hem de VE-PTP seviyeleri hipoksi ile arttığı ve VEGF kaynaklı oküler neovaskülarizasyon ve vasküler sızıntının belirginleşmesine yol açtığı saptanmıştır. Preklinik çalışmalar, yüksek Ang-2 varlığında bile VE-PTP inhibisyonunun Tie2 aktivasyonu gerçekleştirdiğini göstermiştir. Böylece VE-PTP'yi inhibe ederek Tie2'yi aktive etmek, retina ve koroid vasküler hastalıklarında VEGF blokajının etkilerini arttırmanın bir yolunu sağlayabileceği düşünülmektedir (60).



Şekil 2: Ang-1, Ang-2 ve VE-PTP'nin Tie2 reseptörlerine bağlanması (61)

Proliferatif Diyabetik Retinopati Tedavisi

Diyabetik retinopati tedavisi sistemik tedaviler ve lokal oküler tedaviler olarak 2 ana başlık altında sınıflandırılmaktadır. Sistemik tedavi olarak kan şekeri ve tansiyon kontrolü ana tedavi yöntemlerini oluşturmaktadır. DR'nin mevcut lokal tedavisinde, lazer fotokoagülasyon, intravitreal anti-VEGF ajanları ve intravitreal steroid implantları kullanılmaktadır. Ek olarak, nanotıp, kök hücre ve diğer sistematik tedaviler yeni yöntemler olarak yer almaktadır (62).

Anti-VEGF ilaçlar ve intravitreal steroidler: DR sırasında hipoksiye bağlı vasküler değişiklikler, retina endotel hücreleri, perisitler ve retina pigment epiteli tarafından VEGF salınımına neden olur. Artan VEGF seviyesi, anjiyogenezi uyarır ve bu, yapısal olarak zayıf yeni damar oluşumuna neden olur. Zayıf karakterde olan bu yeni kılcal ağ, oldukça geçirgendir ve retina dokusuna sıvı yani eksüda sızmasına neden olmaktadır. Bu mekanizmayı bloke etmek için anti-VEGF ajanlar geliştirilmiştir (62).

Şu anda, DR tedavisi için klinik deneylerde test edilen anti-VEGF ilaçlarının arasında pegaptanib, ranibizumab (Lucentis, Genentech, Inc.), aflibercept (EYLEA; Regeneron, Tarrytown, NY, USA) ve bevacizumab (Avastin, Genentech) ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından (FDA) onaylanmıştır (63).

2004 yılında ilk olarak bevacizumab (Avastin), metastatik kolorektal kanserin tedavisi için ranibizumab ise, rekombinant yüksek afiniteli monoklonal IgG1 fragmanı olarak piyasaya sürülmüştür. Her iki ilaç da VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize etmektedir(64).

Yeni nesil anti-VEGF molekülü olarak geliştirilen aflibercept, VEGF Reseptörü-I ve II antagonistleri için yüksek afinite gösteren 115-kDa'lık bir füzyon proteinidirve VEGF kapanı olarak adlandırılmaktadır. Faz III klinik çalışmalarında, kolorektal kanser hastalarında neovaskülarizasyonu azaltan güçlü anti-tümör özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Bu bulgu, retinal ven tıkanıklığının neden olduğu DMÖ için faz III denemelerindeki etkinlik raporlarıyla da desteklenmiştir (64).

Ancak, anti-VEGF tedavisinin sınırlamaları ve yan etkileri de bulunmaktadır. Anti-VEGF ajanları, yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle, etkinliği sağlamak için aylık veya iki ayda bir enjeksiyon gerekmektedir (63).

Diyabetik retinopatide görme kaybının en sık nedeni olan inflamasyon ana mekanizma olarak önemli bir rol oynamaktadır. Bu mekanizmayı bloke etmek için intravitreal kortikosteroid enjeksiyonu kullanılmaktadır. Burada hedef, inflamasyon sırasında proinflamatuar hücreleri bloke ederek prostaglandin, proinflamatuar sitokinler ve VEGF salınımını engellemesini sağlamaktır (62). Kortikosteroidler, sitoplazmik membranın

geçirgenliği azaltarak ve aynı zamanda vazokonstriksiyonu indükleyerek göz damarlarını doğrudan etkilemektedir. Kortikosteroidler ayrıca kan-oküler bariyer fonksiyonlarını stabilize ederek sıkı bağlantı bütünlüğünü geri kazandırmaktadır (65). Günümüzde intravitreal kortikosteroid tedavisi için triamsinolon asetonid sıklıkla tercih edilse de yavaş salınımlı deksametazon ve fluosinolon asetonid implantları da güncel olarak kullanılmaktadır (62). Kortikosteroidlerin sürekli salınımı, intraoküler enjeksiyon sıklığının az olması, daha düşük maliyet ve daha iyi hasta uyumu sunması tedavide avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, yan etkileri göz önüne alındığında, kortikosteroidler genellikle diğer terapötik tedavilere yetersiz yanıt veren hastalar için ikinci seçenek olarak kabul edilir. Ek olarak, hastada PDR'nin ilerleme riski yüksek olduğu düşünüldüğünde, anti-VEGF ajanları birinci basamak tedavi olarak kullanılmalıdır (63).

Ang/Tie2 sinyal yolağını hedefleyen klinik çalışmalar: Mevcut tedavi yükünü ve etkinliğini iyileştirmek için sinyal yolaklarını anlamak ve gen tedavilerinin geliştirilmesi gerekir. Araştırılan ilaçlar ve mekanizmalar şu anda mevcut ajanların dozaj gereksinimlerini azaltmayı veya ortadan kaldırmayı amaçlar. Bu atılımlar, anti-VEGF ile birlikte diğer yolakları kullanmayı düşündürmektedir. Gelecekte Ang-2/Tie-2 kompleksini veya sadece anjiyopoietinleri kullanarak geliştirilen yeni ilaçlar tedavide yer alacağı düşünülmektedir (6).

Razurotafib diğer adıyla AKB-9778, VE-PTP'nin küçük moleküllü bir inhibitörüdür. İnhibisyonu, Tie2 yollarının aktivasyonuna yol açar ve Tie2 fosforilasyonunu indüklemektedir (59). VE-PTP hedefli ilaçlar, iskemik retinopati oluşturulan farelerde, retinal neovaskülarizasyonu azalttığı retina dekolmanını önlediği bulunmuştur (66). VE-PTP'nin inhibisyonunun, iskeminin neden olduğu retinal neovaskülarizasyonu ve koroid neovaskülarizasyonunu önlediği gösterilmiştir. Anti-VEGF ajanı Aflibercept ile kombinasyon halinde kullanıldığında, VEGF'yi aşırı eksprese eden transgenik fare modellerinde vasküler sızıntının azalmasında ilave bir etki görülmüştür (66). Faz 2b TIME klinik çalışmasında, NPDR hastalarında plaseboya karşı günde bir veya iki kez AKB-9778 uygulanmıştır. Mart 2019'da tamamlanan bu çalışma, DR şiddetinin skorunda önemli değişiklik yaratmamış olsa da, 48 hafta boyunca günde iki kez tedavi edilen hastalarda iyileşme kaydettiği belirtilmiştir (52).

Faricimab, hem VEGF'yi hem de Ang-2'yi hedef almak için geliştirilmiş biyolojik bir tedavidir. Faricimab, Ang-1 inhibisyonu olmadan hem VEGF-A hem de Ang-2'ye bağlanan bispesifik bir antikordur. Her iki ligandın inhibisyonu yoluyla, faricimab'ın DMÖ, yaşa bağlı makula dejenerasyon ve DR hastalarda retinal sonuçların iyileşmesine ve tedavi sıklığının azalmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (67). Faricimab'ın tamamlanan Faz 2 klinik

denemeleri, AVENUE, BOULEVARD ve STAIRWAY klinik denemeleri olmak üzere üç çalışmadan oluşmaktadır. Bu çalışmalar, bu tedavilerin etkinliğini bir anti-VEGF tedavisi olan ranibizumab ile karşılaştırmaktadır (68).

STAIRWAY çalışmasında yaşa bağlı makula dejenerasyonu bulunan hastalar katılmıştır. Bu randomize faz 2 çalışmasında hastaların görme kazanımları ölçülmüştür. 4 haftada bir ranizumab alan hastalarda 9.6, 12 haftada bir faricimab alanlarda 10.1, 16 haftada bir faricimab alan hastalarda görme kazanımı 11.4 derece arttığı bulunmuştur. STAIRWAY çalışmasıyla daha az enjeksiyonla anatomik yapıdaki olumlu değişiklikler ayrıca görme fonksiyonlarında iyileşmeler gösteren faricimab, kontrollü salım sistemleri yoluyla sürekli etkinlik sağlama ve tedavi yükünü azaltma potansiyeli gösterdiği için faz 3 denemelerinin sürdürülmesi kararı alınmıştır (69).

Diğer bir faz 2 çalışması olan AVENUE'da faricimabın ranibizumab üzerindeki üstünlüğüne ilişkin bir sonuç bulunamamıştır. Bu çalışmada ranibizumaba göre, faricimab ile kaydedilen genel ve anatomik kazanımlar, anti-VEGF tedavisine potansiyel bir alternatif için faz 3 denemelerinin izlenmesini desteklenmesi gerektiği savunulmuş ve bu alanda çalışmalar devam ettirilmiştir. (70).

BOULEVARD faz 2 çalışması DMÖ bulunan hastalarla gerçekleştirilmiştir ve bu hastalarda başlangıca göre ETDRS skorunda iyileşmeler görülmüştür. Görme keskinliğinde gözlenen bu iyileşme ile DMÖ bulunan hastalarda faricimab ile Ang-2 ve VEGF-A'nın eşzamanlı inhibisyonunun terapötik olarak yararlı olacağı düşünülmektedir (71).

AVENUE, BOULEVARD ve STAIRWAY denemelerinin başarısı nedeniyle faricimab, daha fazla araştırmayı hak eden bir aday olarak belirlenmiştir. Faricimab'ın makula dejenerasyonu, DMÖ ve PDR tedavileri kapsamında uzun vadeli güvenlik, dayanıklılık ve etkinliğini değerlendirmek için küresel ölçekte Faz III çalışmaları başlatılmıştır (67).

mikroRNA

1990'dan 2003'e kadar olan İnsan Genom Projesi, ilk kez, insan genom dizileri hakkında eksiksiz kapsamlı bilgiler sağlamıştır. Post-genomik çağ olarak adlandırılan bu dönem proteinleri kodlamayan fakat yine de insan genom transkriptlerinin %98,5'inden fazlasını oluşturan kodlanmayan RNA'lar üzerine yapılan çalışmalarla devam etmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kodlanmayan RNA'ların çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynadığı keşfedilmiş, bu nedenle insan hastalıkların belirlenmesinde ve tedavisinde önemli hedefler haline gelmişlerdir (72). Kodlanmayan RNA'lar arasında olan

miRNA'lar tüm insan genlerinin yaklaşık %1-5'ini oluşturmaktadır. Ayrıca memeli miRNA'larının tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği belirtilmiştir (7). miRNA'lar, transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen, yüksek oranda korunmuş 19 ila 25 nükleotid uzunluğundaki küçük kodlanmayan RNA'lardır (73). Hedef mRNA'nın 3′-UTR (translasyon olmayan bölge) bölgesindeki tamamlayıcı dizilere bağlanırlar ve hedef mRNA'ların translasyonel baskılanmasına aracılık etmektedirler (73,74).

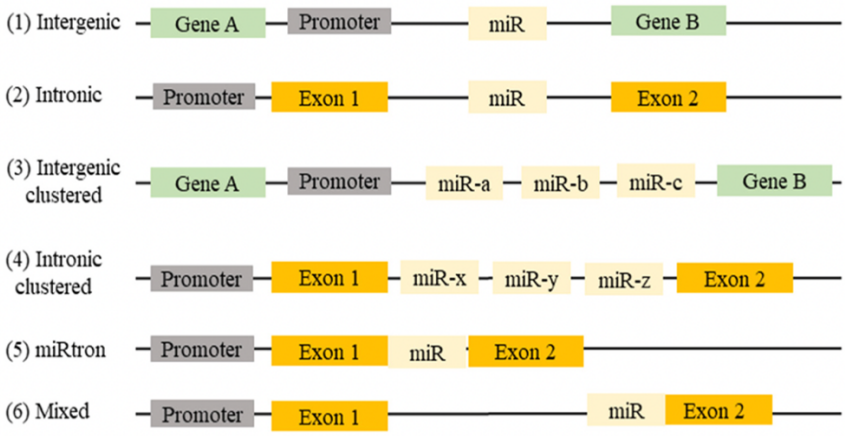
İlk miRNA 1993 yılında, *Caenorhabditis elegans'ta* lin4 olarak keşfedilmiştir. Yaklaşık 7 yıl sonra let-7 tanımlanmış ve *C. elegans* larvalarının gelişim zamanlamasını düzenlediği saptanmıştır (75). Bu çalışmalar, *C. elegans*, Drosophila melanogaster ve insan genomlarında çok daha fazla miRNA bulunmasına öncülük etmiştir (76).

mikroRNA'lar vasküler anjiyogenez, hücre büyümesi, doku farklılaşması, hücre proliferasyonu, embriyonik gelişim ve apoptoz gibi birçok anahtar süreçte kritik roller oynamaktadır. Bu nedenle miRNA'ların azalması veya işlevsizliği ya da miRNA hedeflerinin düzensizliği, çeşitli hastalıklara sebep olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların transkripsiyonel regülasyonunun birçok göz hastalığında ve retinal neovaskülarizasyondaki işlevi konusunda çalışmalar devam etmektedir (77).

Başlangıçta serum ve plazmada bulunan miRNA'lar daha sonra oküler sıvılar olan aköz ve vitreus sıvıları da dahil olmak üzere tükürük, gözyaşı, idrar, anne sütü gibi tüm vücut sıvılarında bulunmuştur (78,79).

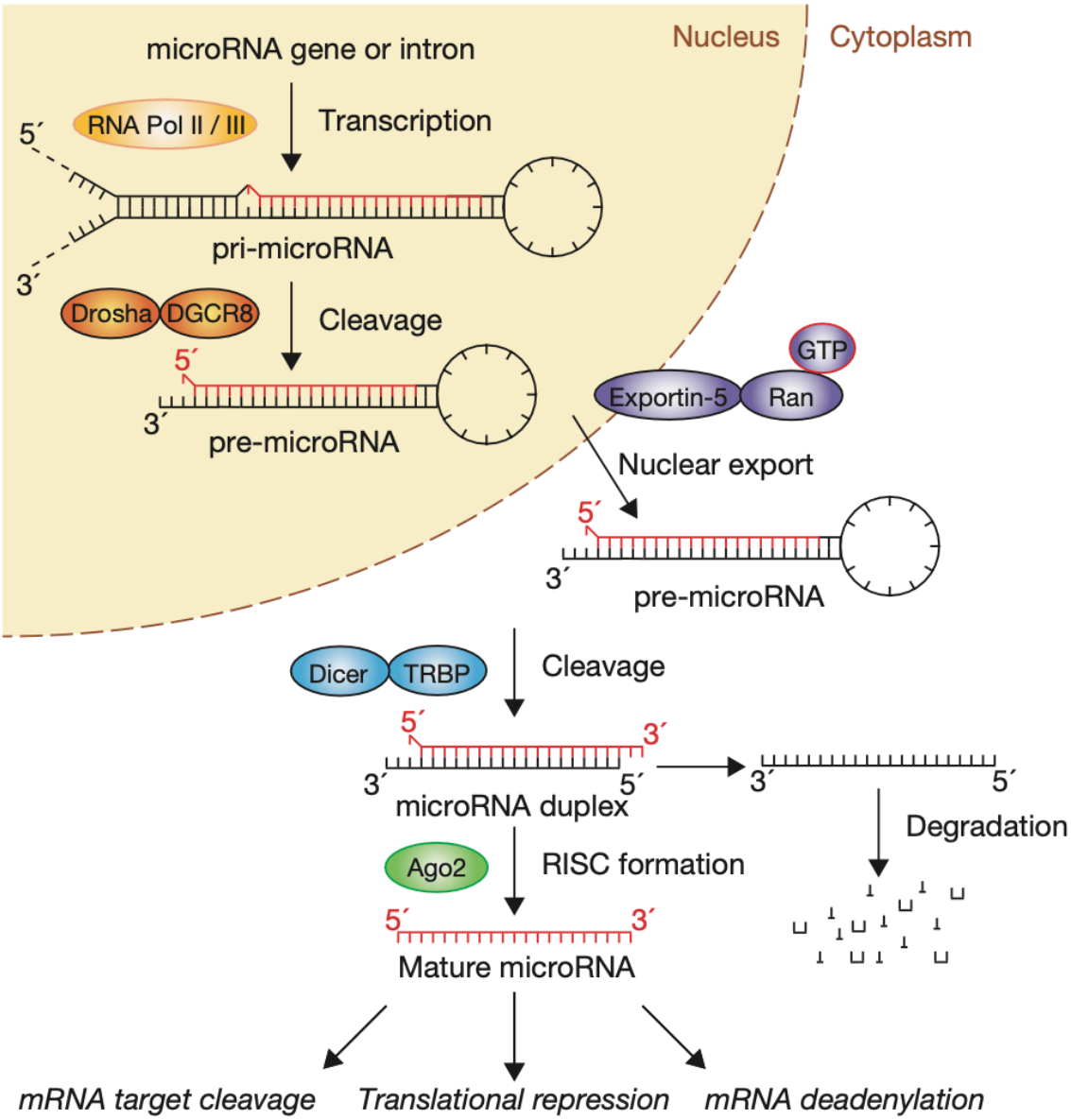
mikroRNA Biyogenezi

mikroRNA genleri, genomdaki konumlarına göre büyük ölçüde değişebilir. Daha önceki çalışmalar farklı miRNA sınıflarını ortaya çıkarmıştır (80). Bilinen miRNA genlerinin birçoğu intergenik bölgelerde bulunmaktadır. Şekil 3'te gösterildiği gibi intronik miRNA'lar, hem kodlayan hem de kodlamayan genler dahil olmak üzere bu genlerin intronlarında bulunmaktadır. İntergenik ve intronik miRNA genleri, kendi promotörlerinin kontrolü altında tek bir gen veya bir gen kümesi olabilmektedir. Karışık miRNA, kodlamayan genlerin bir ekzonu ve bir intronu arasında üst üste binmiş olarak bulunmaktadır (81). Bazen miRNA'lar, kümeler adı verilen, benzer bölgelere sahip olduğu için aile olarak kabul edilen uzun bir transkript olarak kopyalanmaktadır (82). Mevcut bilgilere dayanarak, olgun fonksiyonel miRNA'lar üretebilen genomik bölgelerin, genom içinde çeşitli yerlerde mevcut olabileceği belirtilmektedir (80).



Şekil 3: miRNA bölgeleri (79)

Konanik miRNA sentezi: miRNA transkripleri öncelikle, 5'guanozin başlıklı ve 3'poliA kuyruğu olan yüzlerce nükleotid uzunluğunda pri-miRNA olarak RNA polimeraz II tarafından kopyalanmaktadır. Bunlar yukarıda belirtildiği gibi kodlamayan veya kodlayıcı bir genin intronundaki bölgeler olabilir (80). pri-miRNA'lar, RNA bağlayıcı protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8'den (DGCR8) ve bir ribonükleaz III enzimi Drosha'dan oluşan kompleks ile pre-miRNA'lara çevrilir. DGCR8, pri-miRNA içindeki bir N6-metiladenile edilmiş GGAC'yi ve diğer motifleri tanırken, Drosha, pri-miRNA'nın karakteristik saç tokası yapısındaki pri-miRNA dupleksini ayırır (82). Bu işlemle birlikte yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda pre-miRNA oluşmaktadır. Daha sonra pre-miRNA, Şekil 4'te de gösterildiği gibi Ran-guanozin-5'-trifosfat GTP bağımlı nükleer taşıma reseptörü exportin-5 tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmada, pre- miRNA 'lar dsRNA bağlayıcı proteinler, protein kinaz RNA aktivatörü ve transaktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein yardımıyla başka bir RNAZ III enzimi olan Dicer tarafından işlenerek yaklaşık 18-23 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA:miRNA* kompleksi (dubleks) oluşmaktadır (7).Tek-iplikli olgun miRNA, mRNA'nın 3' UTR'sine bağlanarak eşleşme düzeyine göre mRNA'nın yıkımına ya da translasyonun engellenmesine neden olmaktadır Protein translasyonunun baskılanması veya mRNA degredasyonu miRNA'nın mRNA'ya olan komplementerliğine göre değişmektedir. miRNA'lar hedef mRNA'ların kodlama dizilerine (CDS) veya UTR bölgesine komplementer olarak bağlanarak transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonel) düzenlemelerini gerçekleştirmektedir. RISC/miRNA kompleksi tarafından mRNA'nın tanınması genelde miRNA'nın 5' ucundaki 2-8 nükleotidin bulunduğu bir "tohum dizisi (seed sequence)" bölgesi sayesinde olmaktadır (83).



Şekil 4: miRNA biyogenezi (84)

miRNA'ların Biyobelirteç Olarak Kullanımı

Biyobelirteçler, tıbbi laboratuvarlarda belirli araçlar yoluyla insan vücudunun çeşitli sıvılarında tespit edilen belirli moleküller olarak tanımlanmaktadır (85).

mikroRNA'ların hücre döngüsü, apoptoz, çoğalma, farklılaşma vb. dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. miRNA ekspresyonunun düzensizliğinin çeşitli tümörler ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bulunmuştur Ayrıca, spesifik miRNA'larda oluşan bu düzensizlikler terapötik hedefler için de kullanılabilir. miRNA terapötikleri, tümörler ve kardiyovasküler hastalıklar

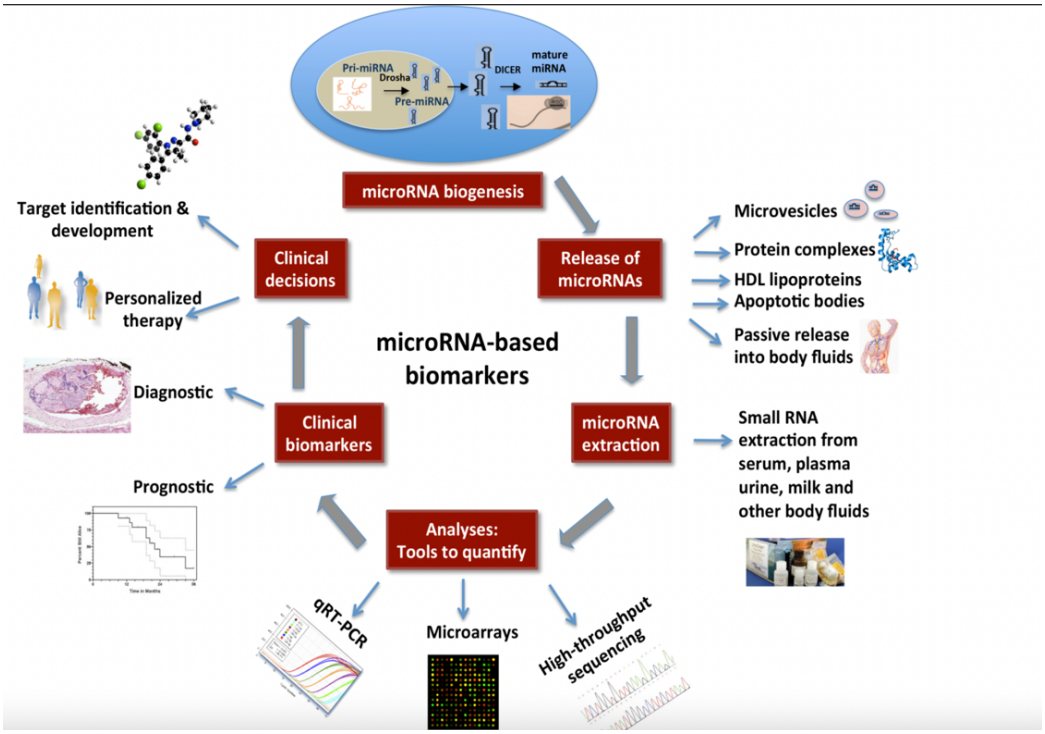
dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için mevcut tedavi seçeneklerinde muhtemelen en heyecan verici adımlardan biridir (86).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, serum, plazma, idrar, tükürük ve diğer vücut sıvılarında önemli sayıda miRNA bulunduğunu göstermiştir. Bu miRNA'lar geleneksel RNA moleküllerinin aksine, RNaz aktivitesine ve aşırı pH ve sıcaklıklara karşı oldukça kararlı ve dirençlidirler (80).

mikroRNA'lar, mikropartiküller içinde yer aldıkları veya onları endojen RNazlardan koruyan kompleksler halinde bir araya geldikleri için de biyolojik sıvılarda çok kararlıdır. Hücreler, sıkı bir şekilde düzenlenmiş aktif bir süreç yoluyla hücreler tarafından salınan küçük veziküller olan eksozomlara paketlenmiş miRNA'ları aktif olarak salgılamaktadır. Alternatif olarak, miRNA'lar, apoptotik gövdelerde veya mikroveziküller tarafından pasif olarak da salınabilmektedir (87).

mikroRNA'lar çeşitli hastalıklar için biyobelirteç olarak ideal adaylara dönüştürebilecek bir dizi avantaja sahiptir. İdeal biyobelirteç, kan, idrar ve diğer vücut sıvılarından ekstrakte edilip, kolay erişilebilir olmalıdır. miRNA'lar bu özellikleri ile ideal biyobelirteçler olarak düşünülmektedir. Ayrıca, doku ve hücre için yüksek bir özgüllüğe sahiptir. Hastalığın ilerlemesine göre değişiklik göstermesi sebebiyle hassas olarak kabul edilmektedir. Kanser evrelerinin belirlenmesinde ve hatta tedaviye verilen cevap gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır (85). Ayrıca, nükleik asitlerin saptanması için Şekil 5'te gösterilen teknolojiler zaten mevcuttur ve yeni tahlillerin geliştirilmesi, protein biyobelirteçleri için yeni antikorlar üretmeye kıyasla daha az zaman ve daha düşük maliyet gerektirmektedir (88). Ayrıca, birçok protein markerlarını çalıştırmak hem pahalı hem de zaman alıcı olabilirken, çok sayıda miRNA'dan oluşan multimarker panellerin kullanılması, hastalığın ilerlemesinin teşhisi ve tahmini için invazif olmayan bir yöntem sağlayabileceği düşünülmektedir (85).

mikroRNA'lar, izole edilebilme kolaylığı ve farklı numune işleme ve izolasyon koşulları altında yapısal stabiliteleri göz önüne alındığında, umut verici bir biyobelirteç olarak giderek daha fazla tanınmaktadır. Dolaşımda bulunan miRNA'ların profillenmesi ile hastalıklara ait moleküler yolakların aydınlatılması, miRNA'ların değerli bir klinik biyobelirteç olabileceği hipotezini desteklemektedir (87).



Şekil 5: miRNA biyomarker olarak kullanımı (85)

mikroRNA'ların Tedavide Kullanımı

mikroRNA'lar, gözdeki patolojik sinyal yolaklarında görev alabilen, bu yolaklardaki genlerin ekspresyonlarında değişik yaratan yeni ve etkili bir terapötik ajan olarak düşünülmektedir. Bu nedenle miRNA'lar, DR tedavisinde yeni ve potansiyel olarak güçlü bir yaklaşım sağlamaktadır (79).

mikroRNA bazlı terapötiklerin iki ana yaklaşımı bulunmaktadır. İlk yaklaşım hastalıklı dokularda patojenik bir işlev kazanımı gösteren endojen olarak mevcut miRNA'ları inhibe etmek için antagonistlerini kullanmaktır. Diğer yaklaşım ise patolojik durumlarda ekspresyonu azalmış olan faydalı miRNA'ları geri kazanmak için kullanılan replasman tedavi olarak adlandırılan miRNA mimikleridir (49). Bununla birlikte, miRNA'nın belirli bir dokuya verilmesi, hedef dışı etkilerden kaçınılması ve dozun optimize edilmesi gibi klinik deneylerde engel teşkil eden durumlar bulunmaktadır (89). Bu durumda, stabiliteyi arttırmak ve anti-miR'lerin, miRNA mimiklerinin in vivo verilebilmesi için, kimyasal modifikasyonlara ihtiyaç duyulabilir. Örneğin endojen miRNA'ların in vivo susturulması, locked nükleik asitler (LNA) veya peptit nükleik asitleri (PNA) entegre edilerek geliştirilmiştir. Kimyasal modifikasyona alternatif olarak, anti-miR'ler ve miR mimikleri nanopartiküller ile kapsüllenmiştir. Uygun taşıma özelliklerinden dolayı, nanopartiküllerin miRNA ajanlarının in vivo iletimini

iyileştirdiği rapor edilmiştir. Ayrıca nanopartiküller hedef özgüllüğünü arttırmaktadır ve yan etkileri sınırlayarak terapötik olarak fayda sağlar (90).

miRNA mimikleri: miRNA mimik teknolojisi, gen susturmaya dayalı bir yaklaşımdır. Hücrelere transfekte edildikten sonra olgun endojen miRNA'lar gibi davranırlar. miRNA mimikleri, kimyasal olarak sentezlenmiş, çift sarmallı RNA'lardır. Bu RNA fragmanlarının 5' ucundaki dizi, hedef genin 3'UTR dizisine kısmen tamamlayıcı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde down regüle bir miRNA aktivitesi, miRNA mimikleri kullanılarak yerine konabilmektedir (91). Uygulamadan önce miRNA mimikleri, lipozomal formülasyon, viral partiküller ve katyonik polimerler gibi uygun dağıtım aracı içinde kapsüllenmektedir (49).

miR-34a'nın lipozamal formu olan MRX34, klinik testlere giren ilk miRNA mimiği olarak üretilmiştir. Farklı kanser türlerine sahip hastalarda miR-34a, sıklıkla p53 fonksiyonunun kaybıyla ilişkili olarak düşük seviyelerde eksprese edilmektedir (92). Akciğer, karaciğer, meme ve kolon karsinomu dahil olmak üzere birçok tümör tipinde ekspresyon kaybı bulunmuştur. Çalışmalar, eksojen miR-34 mimetiklerinin tümör büyümesini ve ilerlemesini engellediği gösterilmiştir (93).

Antisense miRNA: Anti-miRNA'lar, olgun bir miRNA'nın tam veya kısmi tamamlayıcı ters sekansını barındıran, miRNA'nın endojen seviyelerini azaltabilen ve mRNA hedeflerinin ekspresyonunu artırabilen modifiye antisens oligonükleotidlerdir (ASO) (94). ASO'lar, baz çifti tamamlayıcılığına dayalı olarak miRNA hedeflerini inhibe etmektedirler. Geliştirilen üç ana ASO sınıfı bulunmaktadır Bunlar, LNA'lar, anti-miRNA oligonükleotitleri (AMO'lar) ve stabilite ve etkinliği artırmak için farklı kimyasal modifikasyonları içeren antagomirlerdir.

Memelilerde çalıştığı gösterilen ilk ASO, aynı zamanda 'antagomiR' olarak da adlandırılan 2'-OMe idi. AntagomiR'ler, hedeflenen miRNA'yı tamamen tamamlayıcı olan kolesterol ile konjuge sentetik yaklaşık 23 nükleotit uzunluğunda oligonükleotitlerdir. AntagomiR'ler, bağlanma afinitesini iyileştirmek için 2'-OMe ve mRNA'nın stabilitesini artırmak için kısmi bir fosforotiyoat omurgası içerir. LNA ile modifiye edilmiş oligonükleotitler ise ekstra bir metilen köprüsünün riboz parçasını 3′-endo konformasyonunda sabitlediği bir veya daha fazla nükleotit içerir. Bu modifikasyon, yüksek afinite ile birlikte LNA kalıntısı başına erime sıcaklığında birkaç derece artış sağlamaktadır. Yüksek erime sıcaklığı, daha kısa antimiR uzunluğu (15-16 nükleotit), miRNA inhibisyonu daha verimli olmaktadır.

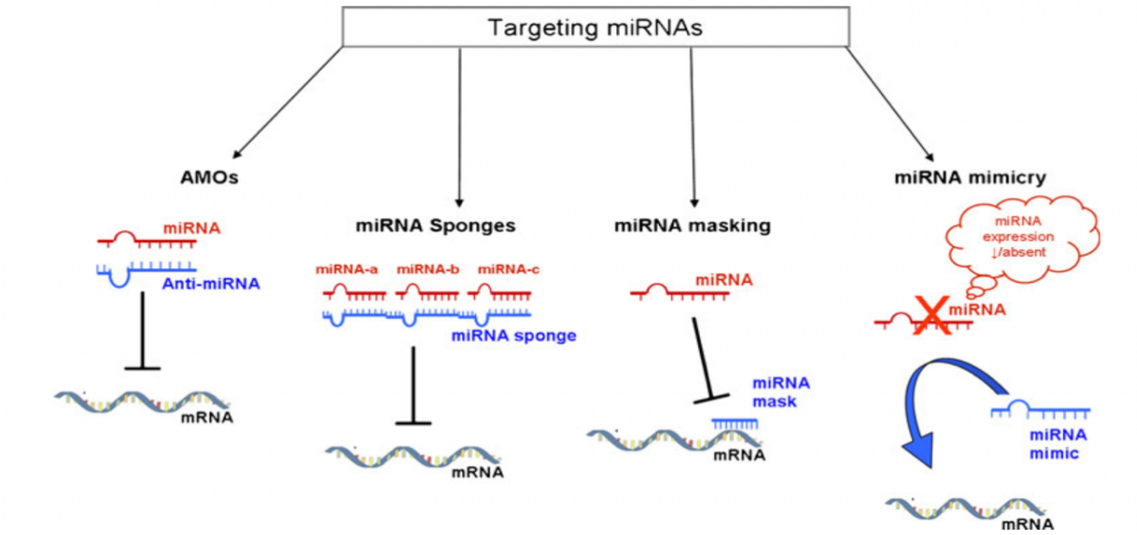
Farelerde ve insan dışı primatlarda yapılan çalışmalarla, LNA teknolojisinin terapötik potansiyelini destekleyen önemli miRNA inhibisyon sonuçları bildirilmiştir (95).

Wang ve ark, (96) yaptığı çalışmada, miR-23/24 kümesinin miRNA'larına karşı LNA-antimiR kullanılmıştır ve bu miRNA kümesinin anjiyogenez ve koroid neovaskülarizasyonunu düzenlenlediği gösterilmiştir

Ayrıca Miravirsen, Roche tarafından geliştirilen miR-122'yi inhibe etmek için tasarlanmış LNA ile modifiye edilmiş bir oligonükleotittir. Sağlıklı farelerde ve insan olmayan primatlarda LNA-antimiR kullanan miR-122 antagonizmi, olgun miR-122 seviyelerinde azalma göstermektedir. Kronik HCV enfeksiyonu olan insan dışı primatlarda LNA-antimiR-122'nin uygulanması, HCV virüsünün uzun süreli baskılanmasını sağlamış ve yan etki oluşturmamıştır. Miravirsen'in kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda translasyonel etkinliği ve güvenliği, Faz IIa klinik çalışmalarında gösterilmiştir (97). Bu nedenle, miRNA'ların seviyesini kontrol etmeye yönelik yapılan çalışmalar, terapötik olarak bu yeni ilaç sınıfının daha da geliştirilmesini öngörmektedir (98).

miRNA Süngerleri: miRNA süngerleri, miRNA bağlanması için inhibitör olarak işlev gören çok sayıda miRNA bağlama bölgesi içermektedir. miRNA süngerleri, ilgilenilen miRNA hedefini tamamen veya kısmen tamamlayan miRNA'ları inhibe etmek için 4 ila 10 çoklu bağlanma bölgesi içerecek şekilde tasarlanmıştır. miRNA süngerleri, Şekil 6'da gösterildiği gibi aynı anda birden fazla miRNA ailesini hedefleyecek sünger yapıları oluşturmak için modifiye edilebilir. Bu, farklı ASO moleküllerinin kullanımına kıyasla yalnızca tek bir miRNA süngeri kullanıldığı için ASO'lara göre avantajlıdır (95).

miRNA süngerleri, ilgilenilen bir gene değil, bir miRNA hedefine özgüdür. Bir miRNA'yı veya bir miRNA tohum ailesini yıkmak için bir miRNA süngeri kullanmak, hedeflenen miRNA'larının tüm hedef genlerini etkileyerek istenmeyen etkilere yol açabilir (99).

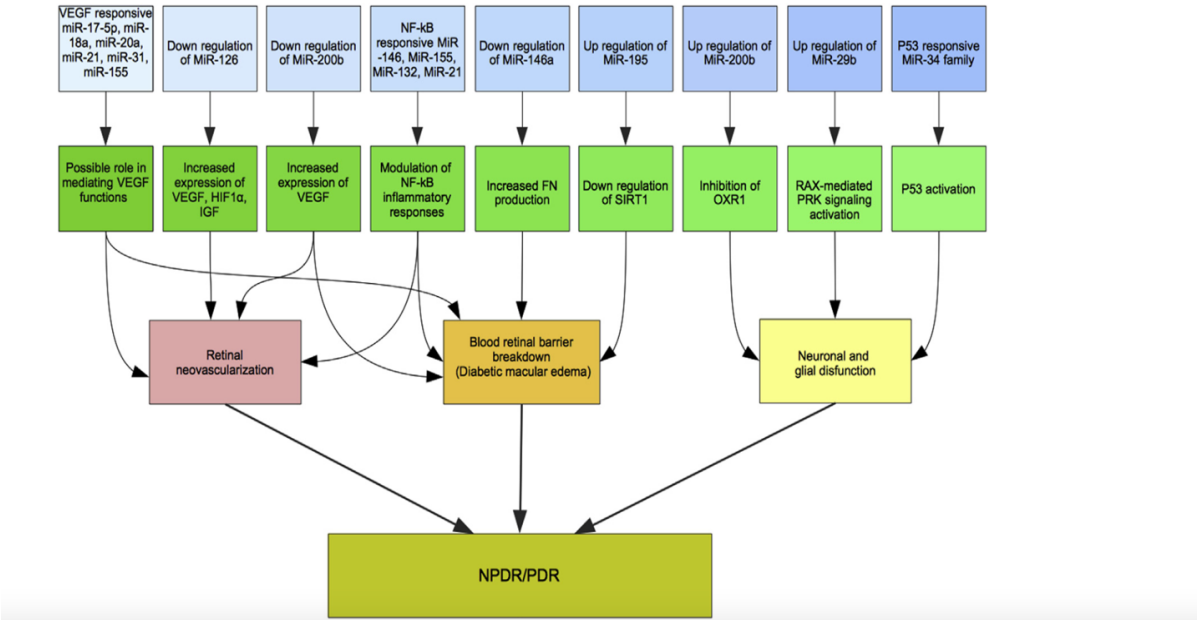


Şekil 6: miRNA temelli terapötikler (100)

PROLİFERATİF DİYABETİK RETİNOPATİ VE miRNA İLİŞKİSİ

Proliferatif diyabetik retinopati tedavisi için DR ile ilişkili yeni epigenetik değişiklikleri tanımlamak ve bu spesifik miRNA'ları hedeflemek yeni bir yaklaşım olarak sunulmaktadır. DR dahil birçok hastalıkta miRNA değişiklikleri gözlenmiştir. DM ve ilişkili mikrovasküler komplikasyonlarındaki miRNA değişikliklerinin birçoğu, vasküler değişikliklerle ilişkilidir, fakat bazıları da inflamasyonla da ilişkilendirilmiştir (72). miRNA düzeylerinin değişmesi, belirtilen hastalıkların teşhisinde biyobelirteç olarak sıklıkla bahsedilmektedir (101).

Proliferatif retinopatinin erken evresinde, kan retina bariyerinin bileşenleri olan insan retinal endotel hücreleri (HREC), retina pigment epitel hücreleri, yüksek glikoz seviyelerinden etkilenmektedir. Bu durum kan retina bariyerinde işlev bozukluğuna sebep olur ve PDR'nin ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada streptozosin ile indüklenen diyabetik retinalarda in vivo olarak veya retinal endotel hücreleri retinal pigment epitel hücrelerinde in vitro modeller kullanarak DR'deki miRNA'ların rolü araştırılmıştır (102). Şekil 7'de gösterildiği gibi pek çok miRNA PDR'nin temel patofizyolojisinde yer almaktadır (103).



Şekil 7: PDR patogenezinde rol oynayan miRNA'lar (103)

Bir grup miRNA, DR'nin kontrolüne ve ilerlemesine katkıda bulunan spesifik yolları hedeflemektedir. Örneğin miR-126, miR-200b ve miR-31, DR'de anjiyogenezin baskılanmasında çok önemli bir role sahip iken, miR-132, miR-146, miR-155 ve miR-21, DR gelişiminde rol oynayan hayati faktörlerden biri olan kronik inflamasyon sürecinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (93).

Büyüme faktörleri ve etkiledikleri sinyal yolakları haricinde anjiyogenez, genlerin epigenetik durumları ve miRNA'ların ekspresyonu ve işlevi tarafından da düzenlenir. Bu miRNA'lara anjiyomiR'ler denilmektedir (105). AnjiomiR'lar, anjiyogenez sinyal yollarının negatif düzenleyicilerini hedefleyerek anjiyogenezi desteklerken, anti-anjiyomiR'ler, anjiyogenezin pozitif düzenleyicilerini hedefleyerek anjiyojenezi inhibe etmektedirler. Temsili anjiyomiR'ler miR-126, miR 221/222, miR-23/27, miR-17-5p, miR-20a, miR-92a ve miR-17-92 kümesidir (103).

PDR'de önemli bir patolojik değişiklik olan retinal neoanjiyogenez, VEGF ve Hipoksi indükleyeci faktör-1α (HIF-lα) dahil olmak üzere çeşitli anjiyojenik faktörlerin aracılık ettiği önemli görme kaybı ile ilişkili olduğu bildrilmiştir. Guan ve ark. (106) yaptığı bir çalışmada, miR-18a-5p'nin embriyonik retinalarda yüksek oranda eksprese edildiği ve gelişim sırasında önemli ölçüde aşağı regüle olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda oksijenle indüklenmiş retinapati (OIR) oluşturulmuş farelerde de miR-18a-5p'nin ekspresyon seviyesi normal retinalardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı miR-18a-5p'nin anjiyogenezin başlatılmasında ve ilerlemesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (106).

Bir anti-anjiyogenik miRNA olan miR-221, serum düzeyleri T2DM ve PDR'li hastalarda bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır. Ang-2 ve VEGF ile birlikte serumda yüksek oranda ekspresse edildiği belirlenmiştir (74).

Ayrıca, Hirota ve ark. (102) 2015'te yaptıkları küçük ölçekli bir çalışmada PDR'li ve makular delik bulunan dört hastanın serum ve vitreus sıvısındaki miR-15a, miR-320a, miR-320b, miR-93, miR-29a ve miR-423-5p'nin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile belirlenmiştir. Belirtilen miRNA'ların PDR'de, makular delik bulunan kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla exprese olduğu gözlenmiştir. Vitreus miR-23a, miR-320a ve miR-320b'nin ekspresyon seviyeleri serum göre anlamlı olarak artış olduğu bulunmuştur (107).

Gomaa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PDR'li 29 hasta ve makular delik hastalığı bulunan diyabetik olmayan 30 kişi kontrol grubu olarak seçilmiştir. miR-200b, PDR grubunda makular delik bulunan kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olarak ekspresse olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada VEGF düzeyinin de PDR grubunda kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Çok değişkenli regresyon analizi kullanılarak ve yaş, cinsiyet ve VEGF düzeyi için düzenlemeler yapıldıktan sonra, miR-200b ile PDR arasındaki ilişki hala anlamlı olarak bulunmuştur (9).

Dolaşımdaki miRNA'ların, serum ve plazma çalışmalarında, idrarda ve diğer birçok vücut sıvısında DM'li kişilerde farklı şekilde eksprese edildiği gösterilmiş olup, bu, miRNA'ların DM'nin genel ilerlemesini saptamada veya tahmin etmede yeni biyobelirteçler olarak hizmet edebileceğini gösterilmiştir (79). Bunun için birçok miRNA'nın tespit edilebildiği miRNA array veya PCR gibi hibridizasyon ve amplifikasyon teknolojileri kullanılabilmektedir. Ayrıca araştırmacıların milyonlarca miRNA dizisi elde etmesine ve miRNA'ları tanımlamasına ve ayrıca biyolojik örneklerdeki miRNA'ları tahmin etmesine olanak tanıyan yeni nesil dizileme yöntemler kullanılarak oküler sıvılardaki miRNA profilini saptanabilmketedir(108). Bu şekilde dolaşımdaki miRNA seviyeleri, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile DR'nin erken tahmini için kullanılabilir ve değişen dolaşımdaki miRNA seviyeleri, DR'nin erken tespiti için yeni minimal, non-invaziv biyobelirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir(109).

Birçok araştırma, lentiviral vektör, adeno-ilişkili virüs vektörü ve miRNA antagomirlerinin aracılık ettiği gen terapisinin hayvan modellerinde DR'yi etkili bir şekilde hafifletebileceğini gösterilmiştir (110). Wang ve ark. (111) bir çalışmada yüksek konsantrasyonda glukoz ile indüklenen farelerin retinal dokularında, retinal mikrovasküler endotel hücrelerinde ve PDR hastalarının vitreus sıvısında miR-409-5p ekspresyonunu araştırmışlardır. Ayrıca miR-409-5p ve peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-α

(PPAR-α) arasındaki ilişki incelenmiştir. Retinal dokularda, vitreus sıvısında ve in vitro olarak miR-409-5p ekspresyonunu arttığını bulmuşlardır. Çalışmanın devamında, antagomiR-409-5p intravitreal olarak farelere enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra retina dokusunda miR-409-5p'nin ekspresyonu azaldığı gösterilmiştir. miR-409-5p'nin PPAR-α ekspresyonunu inhibe ederek retinal neovaskülarizasyonu desteklediği ve patogeneze katkı sağladığı gösterilmiştir. Böylece Anti-miR-409-5p tedavisi, gelecekte DR için yeni bir terapötik strateji olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (111).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu 10.08.2020 tarihli ve TÜTF-BAEK 2020/273 nolu kurul kararınca onaylanmış, çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onanmaları alınmıştır. Çalışma Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışma kapsamında kullanılan, kit ve cihazların adı, markası ve menşeileri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: Kullanılan cihazların adları, marka ve menşei

Cihaz	**Marka**
StepOne Real Time PCR cihazı	Applied biosystems, Amerika
Vorteks	Daihan Scientific, Kore
Masaüstü tipi Santrifüj	Daihan Scientific, Kore
Soğutmalı santrifüj	Hettich mikro 200 R, Almanya
-80°C Derin dondurucu	Scancoll, Hindistan
-20°C Derin dondurucu	Vestel, Türkiye
+4°C Buzdolabı	Vestel, Türkiye
8 Kanallı mikropipet seti	Eppendorf, Almanya
Nanodrop	Thermo Scientific, Amerika

ÇALIŞMAYA ALINACAK HASTA VE KONTROL GRUBU

Çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz hastalıkları Anabilim Dalına göz hastalıkları polikliniğine başvuran diabetik retinopatiye sekonder gelişen vitre içi hemoraji ile traksiyonel retina dekolman nedeniyle pars plana vitrektomi operasyonu olmuş 25 hasta, kontrol grubu olarak ise regmatojen retina dekolmanı, makuler hole, epiretinal membran nedeniyle pars plana vitrektomi (PPV) operasyonu yapılan 25 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil etme dışlama kriteleri aşağıdaki gibidir;

Kontrol grubu için, diyabetik hastalığıa, retinal vasküler hastalığa, yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan, komplike katarakt cerrahisi geçirmiş olanlar ve üveit hastalığına sahip olan bireyler çalışma dışı bırakılmıştır.

Hasta grubunda daha önce retina dekolmanı, epiretinal membran, makuler delik cerrahisi geçirmiş olan hastalar, yaşa bağlı makula dejenerasyon hastalığın bulunanlar, son üç aydır intravitreal enjeksiyon alanlar, komplike katarakt cerrahisi geçirmiş olanlar ve üveit hastalığın olanlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

ÇALIŞMA GRUPLARINDAN VİTREUS ÖRNEĞİ ALINMASI

Vitreus, gözün hacminin 4/5'ini oluşturan, yaklaşık olarak 4 ml hacminde ve 4 gr ağırlığında olan şeffaf ve jel kıvamında bir maddedir. Vitrektomi ameliyatı vitreusun kısmen veya tamamen çıkarılmasıdır. Gözün pars plana alanından 25 gauge trokarlar yardımıyla çok küçük delikler açılarak cerrahi işlem uygulanmaktadır. PPV ameliyatı, vitre içi kanamalarda, traksiyonel retina dekolmanlarında, yırtıklı retina dekolmanlarında, göz içi yabancı cisimlerde, epiretinal membran ve makula deliklerinin tedavisinde yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Tüm PPV ameliyatları ameliyathane koşullarında aynı cerrah tarafından yapıldı. Yaklaşık 0.3 ml vitreus örneği cihazın haznesi içerisinden alındı ve analiz için Eczacılık Fakültesi Biyokimya laboratuarına getirildi. Vitreus örnekleri +4 °C'de 15000 rpm 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant DNaz ve RNaz free tüplere alınarak -80 °C 'de çalışma anına kadar saklandı.

VİTREUS ÖRNEKLERİNDEN miRNA İZOLASYONU

Vitreus örneklerinden miRNA izolasyonu High Pure miRNA İsolation Kit (Cat. No. 05080576001, Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. Vitreus örnekleri -80°C'den çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözüldü. Vitreus örneklerinden 150 µL DNaz/RNAz free temiz eppendorf tüpüne alındıktan sonra üzerine 312 µL Binding Buffer ve 200 µL Binding Enhancer eklendi. Karışım vorteklendikten sonra High Pure Filter tüplere aktarıldı. 13,000x g de 60

saniye santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpü ile değiştirildi. High Pure Filter tüpe üzerine 500 µL Wash Buffer eklendi. 13,000x g de 30 saniye santrifüj edildi. Altaki toplama tüpü değiştirildikten sonra 300 µL Wash Buffer eklendi. 13,000x g de 30 saniye santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atıldı ve High Pure Filter tüp DNaz/RNAz free eppendorf tüpleri yerleştirildi. Üzerine 50 µL Elution Buffer eklendi ve oda ısında 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 13,000x g de 60 saniye santrifüj edildikten sonra miRNA izolasyonu tamamlandı.

Elde edilen miRNA'ların saflığı ve miktarı nano-drop cihazında ölçüldü. İzole edilen miRNA'lar -80 °C'lik derin dondurucuda çalışma anına kadar saklandı.

miRNA'LARDAN cDNA ELDESİ

cDNA eldesi için miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit (Cat. G899, abmGood) kullanıldı. cDNA kitin çalışma protokolüne uygun olarak çalışıldı. Tablo 4'te belirtilen miktarlarda hazırlandı ve son hacim 20 µl olacak şekilde su ile tamamlandı.

Tablo 4: cDNA mix'in içeriği

Bileşenler	**Tepkime hacmi**
İzole miRNA	5 µL
2X miRNA cDNA Sentez Süper Mix	10 µL
Enzim Mix	2 µL
RNase-Free su	3 µL
Toplam	20 µL

Bu miks örnekleri de 96 kuyucuklu plate pipetlendi. Plate film ile kaplandı, plate karıştırıcıda elle bastırılarak 10 saniye karıştırıldıktan sonra, 1 dk. boyunca santrifüj edildikten sonra ve Thermal Cycler'a konularak Tablo 5'te belirtilen program ile çalıştırıldı.

Tablo 5: cDNA protokolü

Sıcaklık	**Reaksiyon süresi**
37º C	30 dakika
42º C	15 dakika
70º C	10 dakika

Uygulanan protokol sonrasında cDNA'lar elde edildi. Elde edilen cDNA lar PCR aşaması öncesi nanodrop ile ölçümleri yapıldı. Çalışma anına kadar -80 °C de saklandı.

miRNA'LARIN GEN EKSPRESYONLARININ REAL TİME PCR İLE BELİRLENMESİ

Çalışma gruplarına ait miRNAların (miR-145-5p miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p ve miR-204-5p) ekspresyon düzeyleri RT- PCR cihazı ile analiz edildi. Referans gen olarak olan housekeeping gen olan RNU6B kullanıldı. cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla Bright Green miRNA qPCR Master Mix-No Dye (Cat. MasterMix-Ms, abm Good)) ve miRNA PCR Primer Mix'leri (abm Good) üretici firmanın tavsiyelerine uyularak Tablo 6'da belirtilen hacimlere göre hazırlandı. Ayrıca çalışmamızda analiz edilen miRNA'lara ait kullanılan primer dizileri Tablo 7'de verildi.

Tablo 6: miRNA qPCR master içeriği

Bileşenler	Hacim
Bright Green miRNA qPCR Master Mix	10 µL
miRNA Forward Primer	1 µL
miRNA Reverse Primer	1 µL
cDNA	2 µL
RNase-Free su	6 µL
Toplam	20 µL

Tablo 7: miRNA primer dizileri

Primer adı	Baz dizisi
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU
hsa-miR-542-3p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA
hsa-miR-5195-3p	AUCCAGUUCUCUGAGGGGGCU
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
hsa-miR-211-3p	GCAGGGACAGCAAAGGGGUGC
hsa-miR-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
RNU6B	AACGCTTCACGAATTTGCGT

Hazırlanan referans gen master karışımları ve hedef gen için master mix'leri uygun cDNA'lar ile 96 kuyucuklu plate'ler üzerinde bir araya getirildikten sonra Tablo 8' de belirtilen miRNA ekspresyon ısı protokolü uygulanarak Real Time PCR işlemine alındı.

Tablo 8: miRNA ekspresyonu için real time PCR ısı protokolü

Denatürasyon	95°C de 10 dk.
Amplifikasyon Bu döngü 40 kez sağlanır. (40 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C de 10 sn. 60°C de 15sn 72 °C de 30sn Okuma
Melting Curve	95°C de 15sn. 60 °C de 1 dk. 90 °C de 15 sn
Cooling	40°C de 10 dk

Cihazdaki yazılım yardımıyla Ct (threshold cycle) hesaplandıktan sonra "baseline" değerleri ve "Threshold" değeri cihaz tarafından saptandı. Elde edilen Ct verileri deltadelta Ct (ΔΔCT) yöntemine ile miRNA ekpresyonu değerlendirildi.

ENZIM -LINKED IMMUNSORBENT ASSAY (ELISA) ile Ang-1, Ang-2 ve Tie-2 DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Vitreus örnekleri -80°C'den çıkarılarak oda ısında çözüldükten sonra, vitreus örneklerinde Ang-1, Ang-2 ve Tie2 düzeyleri sırası ile Ang-1 (ANG-1 ELISA kit, Cat.No. E1222Hu BTLAB), Ang-2 (ANGPTL-2 ELISA kit, Cat.No E1222Hu BTLAB), Tie-2 (TEK ELISA kit, SEA126Hu USCN) elisa kitleri kullanılarak ölçüldü. Çalışmada ölçümler Microplaka okuyucu (Thermo Multiscan Go, Amerika) ile yapıldı.

Ang-1 Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu kitte bulunan elisa mikroplate'i insan Ang-1 antikoru ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler plate üzerine kaplanmış antikorlara bağlanır. Daha sonra vitreus örnekleri üzerine biyotinlenmiş insan Ang-1 antikoru eklendi ve örneklerdeki Ang-1' ye bağlandı. Daha sonra streptavidin-HRP eklendi ve biyotinlenmiş Ang-1 antikoruna bağlandı. Plate 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra, bağlanmamış streptavidin-HRP, yıkama

aşamasında yıkanarak uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra substrat solüsyonu eklendi ve oluşan mavi renk insan Ang-1 miktarı ile orantılı olarak gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma (stop) çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırıldı ve köre karşı 450 nm'de mikroplaka okuyucuda okunarak çalışma grupların ait absorbanslar elde edildi. Örneklerdeki Ang-1 konsantrasyonları standart eğri den faydalanarak belirlendi. Çalışma örneklerindeki Ang-1 konsantrasyonları pg/mL olarak hesaplandı.

Ang-2 Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu kitte bulunan elisa microplate'i İnsan Ang-2 antikoru ile önceden kaplanmıştır. 25 PDR, 25 kontrol vitreus örnekleri ve standartlar eklendi. Standartlar ve örnekler plate üzerine kaplanmış antikorlara bağlanır. Daha sonra vitreus örnekleri üzerine biyotinlenmiş insan Ang-2 Antikoru eklenir ve örneklerdeki Ang-2' ye bağlanır. Daha sonra streptavidin-HRP eklenir ve Biyotinlenmiş Ang-2 antikoruna bağlanır. 1 saat 37°C'de plate inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış streptavidin-HRP, yıkama adımı sırasında yıkanır. Yıkama işleminden sonra substrat solüsyonu eklenir ve oluşan mavi renk insan Ang-2 miktarı ile orantılı olarak gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma (stop) çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırıldı ve köre karşı 450 nm'de mikroplaka okuyucuda okunarak çalışma grupların ait absorbanslar elde edildi. Örneklerdeki Ang-2 konsantrasyonları standart eğri den faydalanarak belirlendi. Çalışma örneklerindeki Ang-2 konsantrasyonları ng/mL olarak hesaplandı.

Tie2 Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu kitte uygulanan test prensibi Sandwich enzim immunoassay'dir. Bu kitte bulunan elisa microplate'i Tie2'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler daha sonra Tie2'ye özgü biotin-konjuge antikor ile mikroplate kuyucuklarına eklenir. Daha sonra, HRP'a konjuge Avidin, her mikroplate kuyusuna eklenir ve inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi yapılır. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, yalnızca Tie2 biyotinle konjuge antikor ve enzimle konjuge Avidin içeren kuyucukların renginde değişiklik gözlenir. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirilir ve oluşan renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür ve çalışma gruplarına ait absorbanslar elde edildi. Örneklerdeki Tie2 konsantrasyonları standart eğriden faydalanarak belirlendi. Çalışma örneklerindeki Tie2 konsantrasyonları ng/mL olarak hesaplandı.

İSTATİKSEL ANALİZLER

Çalışmanın örnek genişliği PASS power programının istatiksel analiz sonucuna göre, 0.05 yanılma payı ve %80 güç ile değerlendiridi. Her bir gruptan toplam en az 25 denek yeterli olacağını belirledikten sonra çalışma dizayn edildi. İstatistiksel analizler SPSS 17 (Stastistical Package for Social Sciences version) paket programı ile yapılmıştır. HbA1c, Ang-1, Ang-2, Tie2 ve yaş değerlerinin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Test sonucuna göre HbA1c, Ang-1, Ang-2 ve yaş değerlerinin normal dağılım gösterdikleri, Tie2 değerlerinin ise normal dağılım göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlara HbA1c, Ang-1, Ang-2 ve yaş değerleri bakımından PDR ve kontrol grubunun karşılaştırılması için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Independent sample t testi, Tie2 değerleri için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. PDR ve kontrol grupların HbA1c, Ang-1, Ang-2, Tie2 ve yaş değerleri ortalama±standart sapma cinsinden verilmiştir. Çalışma gruplarına ait miRNA ekspresyonu, housekeeping gen olan RNU6B ile normalize edilecek ve deltadelta Ct (ΔΔCT) yöntemi ile miRNA ekpresyonu değerlendirilmiştir.

BULGULAR

GRUPLARIN DEMOGRAFİK, KLİNİK VE LABORATUVAR VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışma gruplarımız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz hastalıkları Anabilim Dalına göz hastalıkları polikliniğine 2020-2022 yıları arasında başvurmuş 25 kontrol ve 25 çalışma (PDR) grubu olmak üzere toplamda 50 kişiden oluşmaktadır. PDR grubundaki 25 kişiden 19'u erkek (%76), 6'sı kadın (%24) hastadır. Kontrol grubunda ise 18 erkek (%72) 7 kadın (%28) bulunmaktadır. PDR grubunda Tip 1 DM olan 10 hasta (%40), Tip 2 DM olan 15 hasta (%60) bulunmaktadır. Tip 1 DM tanılı hastalarda ortalama DM süresi 12±5.8 (7-17) yıl, Tip 2 DM süresi 20±9.5 (9-22) yıl olarak hesaplandı. Başka ek bir hastalık çalışma ve kontrol grubunda bulunmamaktadır. Ayrıntılı demografik özellikler Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9: Demografik veriler ve laboratuvar özellikleri

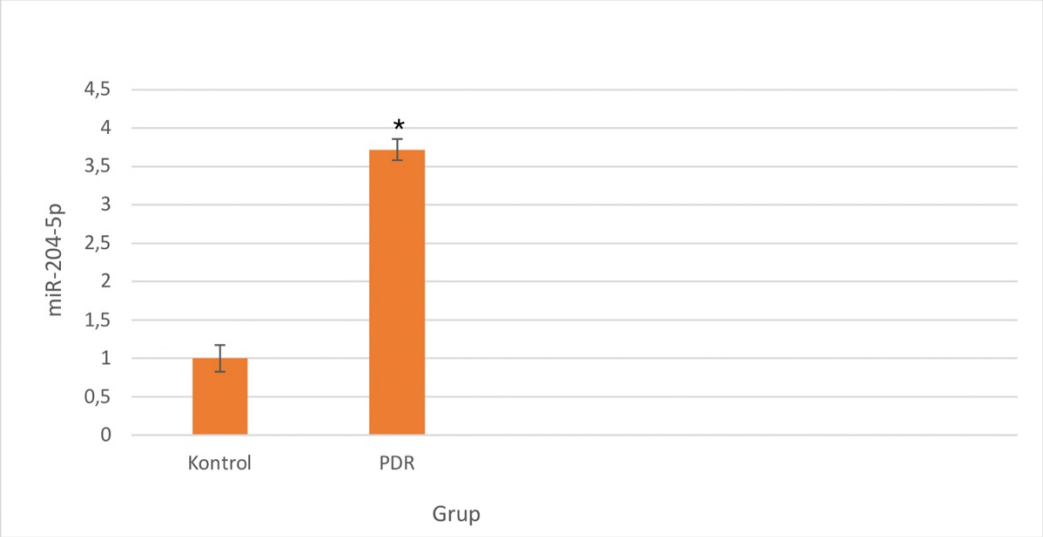
	Kontrol (25)	**PDR (25)**	**P değeri**
Yaş	58.64±12.15	56.76±8.83	0.72
HbA1c	5,40±0.58	9,56±1.4	<0.001*

HbA1c; Hemoglobin A1c

*** P <0.05**

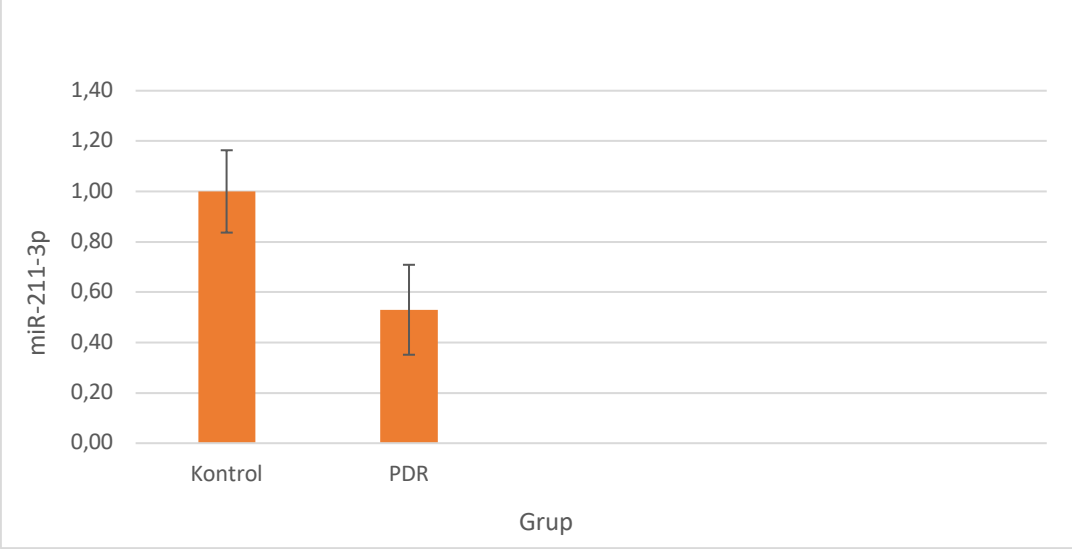
miRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİ

Çalışmamızda, PDR grubunu kontrol grubuna göre karşılaştırdığımızda miR-204-5p'nin ekspresyonunun anlamlı olarak up regüle olduğunu bulduk (p=0,02). Kontrol grubuna göre miR-204-5p'nin ekspresyonunun yaklaşık 3,72 kat bir artığını saptadık (Şekil 8).



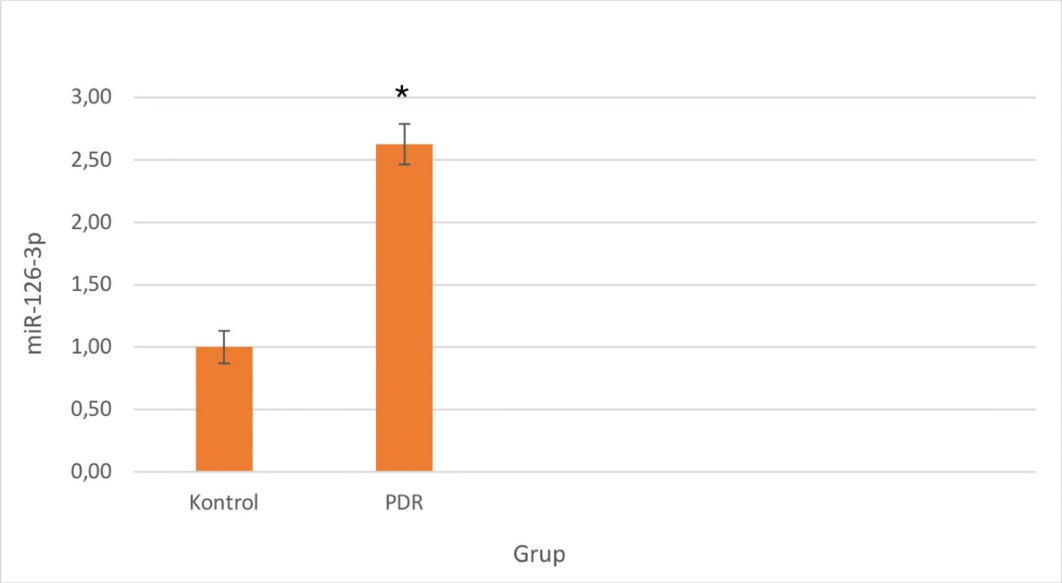
Şekil 8: miR-204-5p ekspresyon değişimi

miR-211-3p ekpresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre PDR grubunda down regüle olduğunu, ancak bu regülasyonun istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını belirledik (p=0.450). Ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Şekil 9'da görüldüğü gibi çalışma grubunda kontrol grubuna oranla 0,53 kat bir azalış olduğu saptanmıştır.



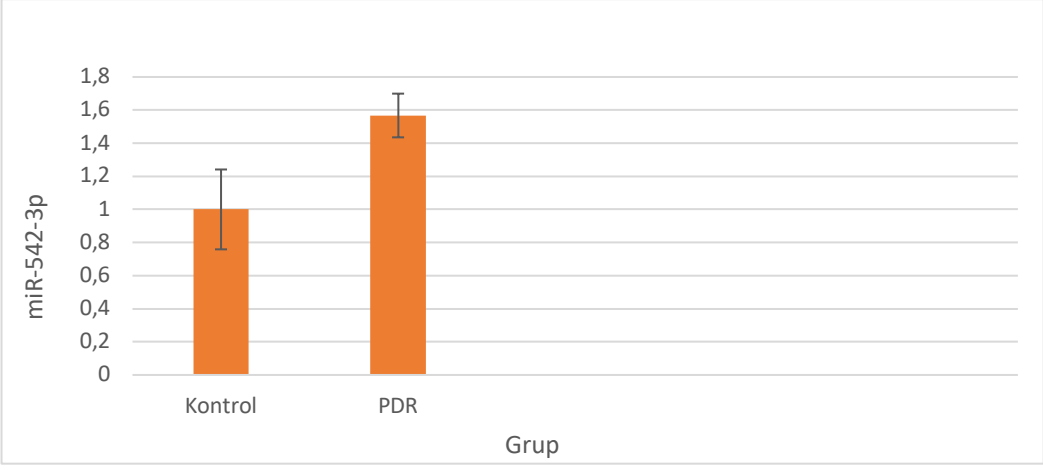
Şekil 9: miR-211 ekspresyon değişimi

Yaptığımız çalışmada PDR grubunda miR-126-3p kontrol grubuna göre up-regüle edildiği saptadık (p=0.022). Ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Şekil 10'da görüldüğü gibi çalışma grubunda kontrol grubuna oranla 2,63 kat bir artış olduğu saptanmıştır.



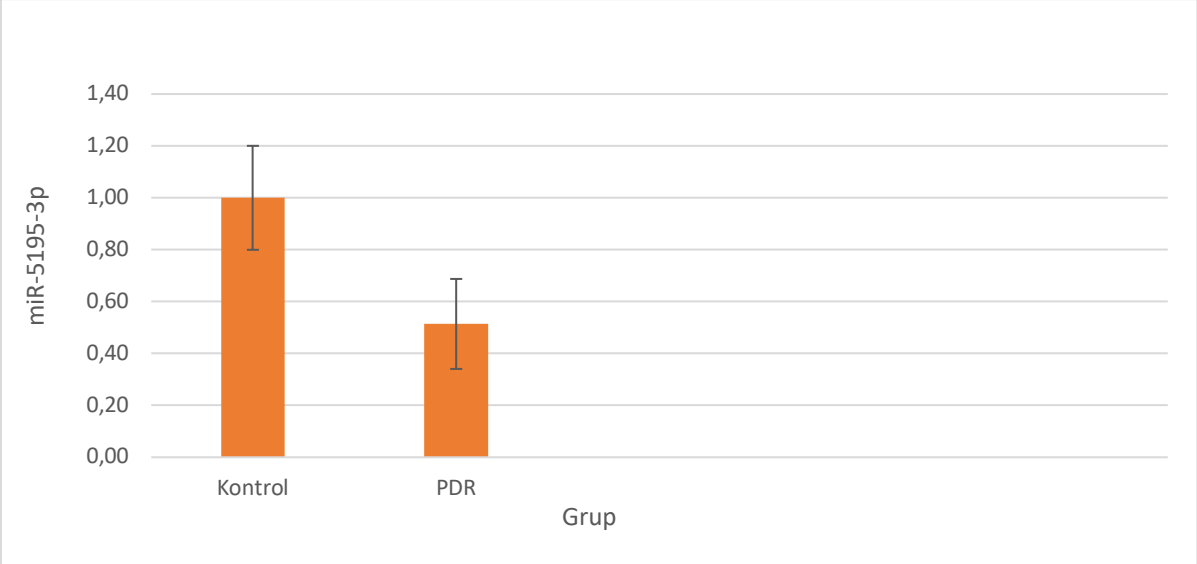
Şekil 10: miR-126-3p ekspresyon değişimi

miR-542-3p, kontrol grubuna kıyasla PDR grubunda arttığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p= 0.17). Ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Şekil 11'da görüldüğü gibi PDR grubunda kontrol grubuna oranla 1,57 kat bir artış olduğu saptanmıştır.



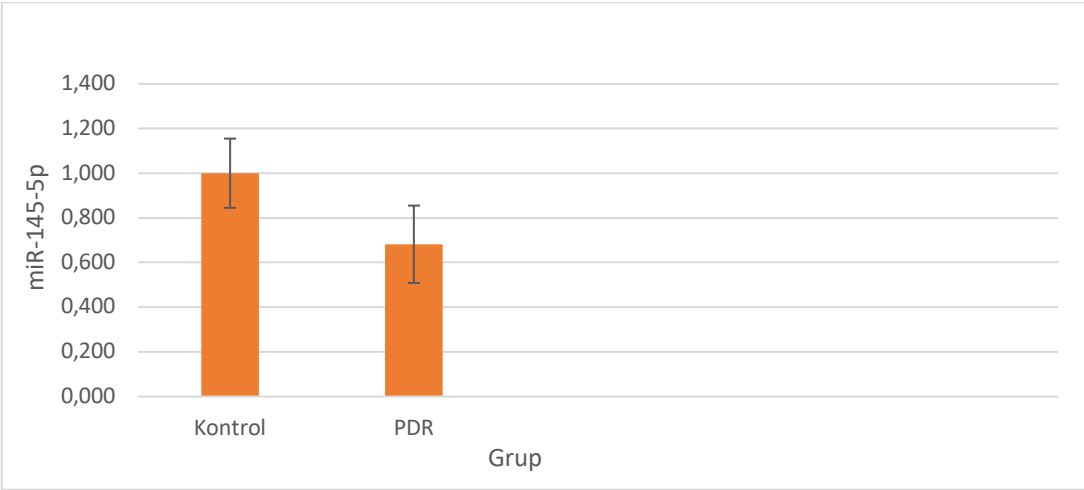
Şekil 11: miR-542-3p ekspresyon değişimi

Çalışmamızda miR-5195-3p, kontrol grubuna kıyasla PDR grubunda azaldığı belirlenmiştir. Ekspresyon seviyelerindeki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p=0.21). Şekil 12'de belirtildiği gibi kontrol grubu ile PDR grubu arasındaki ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında PDR grubu -1,95 kat azaldığı görülmektedir



Şekil 12: miR-5195-3p ekspresyon değişimi

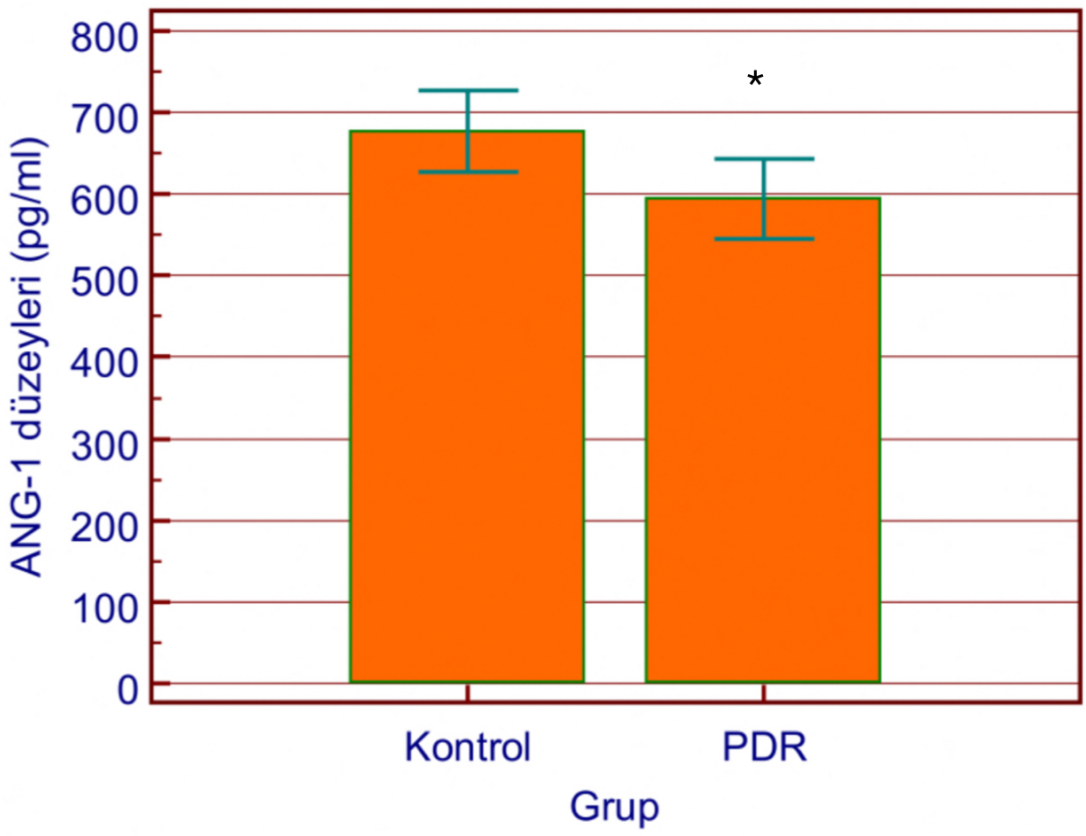
Yaptığımız çalışmada miR-145-5p kontrol grubuna kıyasla PDR grubunda azaldığı bulunmuş fakat bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır (p=0.689). Bu iki grup arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında PDR grubunda Şekil 13'te görüldüğü gibi miR-145-5p'nin 0.71 kat azaldığı belirlenmiştir.



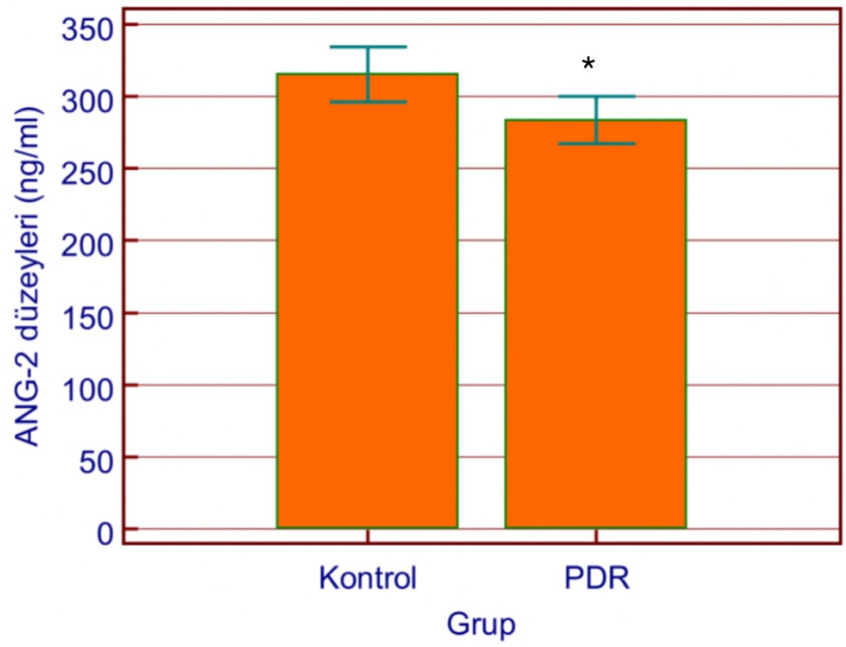
Şekil 13: miR-145-5p ekspresyon değişimi

Ang-1 VE Ang-2 DÜZEYLERİ

Proliferatif retinopati bulunan hastalarda Ang-1 ve Ang-2 düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığını ve istatiksel olarak anlamlı olduğunu bulduk (p=0.019 ve p=0.013, sırasıyla). Ayrıca vitreus Ang-1/Ang-2 oranını belirledik. Ang-1/Ang-2 oranının kontrol grubunda 2.198±0.58 ve PDR grubunda 2.077±0.43 olduğunu hesapladık ve bu oranın kontrol grubuna kıyasla PDR grubunda azaldığını gözlemledik. Fakat Ang-1/Ang-2 oranındaki bu azalışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. (p=0.412)



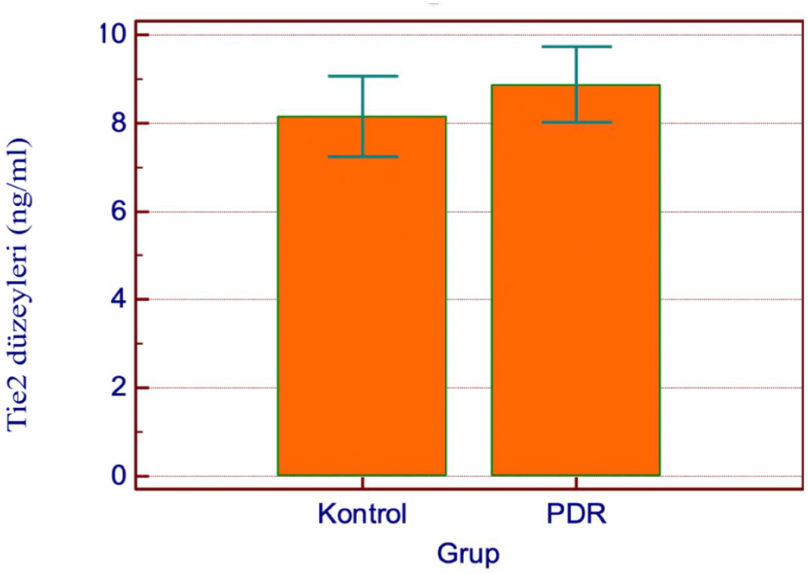
Şekil 14: Kontrol ve PDR gruplarının Ang-1 düzeyleri



Şekil 15: Kontrol ve PDR gruplarının Ang-2 düzeyleri

Tie2 DÜZEYLERİ

Çalışmamızda, PDR grubundaki Tie2 düzeyinin kontrol grubuna göre arttığını fakat bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk (p=0.248).



Şekil 16: Kontrol ve PDR gruplarının Tie2 düzeyleri

TARTIŞMA

Diyabetik retinopati, diyabetik hastalarda en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur. T1DM kişilerde T2DM bulunan kişilere göre daha yüksek bir insidansı bulunmaktadır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde küresel olarak artan diyabet prevalansı ile uyumlu olarak DR, çalışan orta yaşlı yetişkinlerde önde gelen görme kaybı nedeni olarak düşünülmektedir (50). PDR ise, neovaskülarizasyonun gelişimi ile karakterizedir ve DR'nin son aşamasını temsil etmektedir (112). Anjiyogenez, önceden var olan bir vasküler pleksustan yeni kan damarlarının büyümesi olarak tanımlanır ve kanser patogenezi ile birlikte, yaşa bağlı makula dejenerasyon ve PDR gibi körlüğe sebep olabilen hastalıkların ilerlemesini karakterize eden önemli bir süreçtir. Bu süreç, anjiyojenik büyüme faktörlerine yanıt olarak damar genişlemesine, bazal membranın bozulmasına ve endotelyal hücre proliferasyonuna yol açmaktadır (113). Anjiyogenez, damarların filizlenmesi, olgunlaşması ve yeniden şekillenmesini içeren birkaç önemli adımdan oluşmaktadır (114). Ang/Tie2 sinyal ekseni, anjiyogenezin önemli düzenleyicilerden birisidir. VEGF yolunun endotelyal hücre filizlenmesini ve primer damar ağ oluşumunu indüklediği, Ang/Tie2 yolağının ise, anjiyojenik sürecin son aşamalarında kan damarı yeniden şekillenmesini ve olgunlaşmasını düzenlediği düşünülmektedir (115). Ang-1, Ang-2 gibi anjiyojenik faktörler de Tie2 ile etkileşime girerek vasküler geçirgenliğin ve anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (63). Çalışmamız da PDR hastalarının vitreus sıvılarında Ang-1, Ang-2 ve Tie2 seviyelerini belirleyerek patolojik süreçlerde Ang/Tie2 yolağının rolünü aydınlatmaya yöneliktir.

Khalaf ve ark. (5) yaptıkları bir çalışmada, hasta grubu PDR ve NPDR, kontrol grubu ise retinopatisi bulunmayan diyabetik (NDR) kişilerden oluşmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarının serum Ang-1, Ang-2, Tie2 reseptör ve VEGF düzeyleri değerlendirilmiş Ang-2 ve VEGF seviyelerinin, NPDR ve NDR grubuna göre PDR'de anlamlı olarak arttığını buldular. Ancak serum Tie2 düzeyleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptamadılar. Serum Ang-1 düzeyinin, NDR grubuna kıyasla PDR'de önemli ölçüde değişmediğini, NPDR'de ise anlamlı olarak arttığını gözlemlediler. Ayrıca çalışmada serum Ang-1/Ang-2 oranının PDR hastalarında NPDR ve NDR grubuna göre azaldığını belirlediler (5).

Anjiopoetin/Tie2 yolağının PDR üzerindeki etkisinin incelendiği benzer bir çalışmada, T2DM, NPDR ve PDR hastalarının serum Ang-1, Ang-2, Tie2 ve VEGF seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışmada, serum Ang-2 ve VEGF düzeylerinin PDR veya NPDR'li hastalarda, DR bulunmayan T2DM hastalarına göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. Bu düzeyler ayrıca PDR grubunda NPDR grubuna göre daha yüksek olduğu belirtilmiş ve serum Ang-2 ve VEGF seviyelerinin DR şiddeti ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Çalışmada ilginç olarak, Ang-1 seviyesi çalışılan 3 grup arasında NPDR'li hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Ang-1'in ekspresyon seviyesinin DR'nin ilk aşamasında anlamlı olarak değişmesi, Ang-1'in erken dönemde biyobelirteç olarak kullanımını düşündürmektedir. Ayrıca Ang-1/Ang-2 oranı PDR grubunda NDR ve NPDR grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır. Tie2 seviyeleri, üç hasta grubu arasında veya lazer fotokoagülasyon öncesi ve sonrası arasında istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (56). Çalışmamızda Tie2 seviyelerinde bir artışın olduğu fakat bunun istatiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Bulgumuzun literatürdeki bu çalışma ile uyumlu olduğunu gözlemledik. Tie2 reseptör düzeyinin değişmemesi, Tie2 seviyelerinin PDR'nin ilerlemesi ile ilişkili olmayabileceği fikrini düşündürtmektedir.

Vitreus Ang-1 ve Ang-2 düzeylerini ölçen diğer bir çalışmada, 10 PDR'li hasta çalışma grubu ve diyabeti bulunmayan 9 hasta ise kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Çalışmada, PDR vitreus Ang-1 ve Ang-2 ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 2,02 ve 5,44 kat arttığını buldular. Ayrıca Ang-1/Ang-2 oranının kontrol grubuna kıyasla PDR'de azaldığını belirlemişlerdir (116).

Patel ve ark. (117) tarafından vitreus sıvısında Ang-1 ve Ang-2 seviyelerini belirledikleri diğer bir çalışmada, bu anjiogenik faktörlerin düzeylerinin kontrol grubuna göre PDR'de azaldığını bulmuşlardır. Ayrıca vitreus Ang-1 düzeyinin NPDR grubunda, PDR ve kontrol gruplarına göre ise arttığını buldular (117). Yaptığımız çalışmada vitreus Ang-1 ve Ang-2 düzeylerini PDR'de kontrollere göre anlamlı olarak azaldığını saptadık ve elde ettiğimiz bulguların literatürdeki vitreus seviyesini ölçen bu çalışmayla benzer olduğunu gözlemledik.

Ang-1 ve Ang-2'nin Tie2 reseptörü için birbirleriyle yarışmalı olarak çalıştığı ve neovaskülarizasyonla ilgili zıt fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (54,118). Anjiyogenez sürecindeki dengeyi daha iyi değerlendirebilmek için sadece bir anjiyopoietin düzeyini ölçmenin yeterli olmadığını belirten çalışmalar mevcuttur. (5,56,116). Bu nedenle, çalışmamızda Ang-1/Ang-2 oranını belirledik ve literatür çalışmaları ile uyumlu olarak bu oranının azaldığını saptadık. Bulgularımız Ang-1 ve Ang-2 seviyesindeki değişikliklerin dengeyi neovaskülarizasyona doğru kaydırdığını ve PDR patogenezini etkilediğini desteklemektedir. PDR'li hastalardaki Ang-1/Ang-2 oranındaki bu azalışın endotel damar bütünlüğü ile ilişkili olduğu ve bu oranda artışın sağlanmasının terapötik bir hedef olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

mikroRNA'lar, mRNA'ya bağlanabilen ve çoklu hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyebilen, yaklaşık 20-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan RNA'lardır (119). miRNA'ların tüm insan hücre tiplerinde eksprese olduğu ve hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz gibi başlıca biyolojik süreçlerde yer aldığı bulunmuştur. Son yıllarda, böbrek, retina ve periferik nöronları etkileyen diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarında yer alan potansiyel oyuncular olarak miRNA'lar büyük ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalar, anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların oksidatif stres, apoptoz, inflamasyon ve anjiyogenez gibi diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının temel patojenik süreçlerinde önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte çalışmalar, miRNA'ların DR, yaşa bağlı makula dejenerasyon, DMÖ gibi neovasküler göz hastalıklarında ekspresyonlarının değiştiğini göstermektedir (87).

Çalışmamızda miRWalk2.0 ve Targetscan veritabanlarının taranması sonucunda PDR patogenezinde önemli rol oynayan Ang-1 genini hedefleyen miR-126-3p, miR-204-5p ve miR-211-3p'i, Ang-2 genini hedefleyen, miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p'nin vitreus sıvısında ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

miR-126-3p, endotel hücrelerinde anjiyojenik sinyalleşmenin ve in vivo vasküler bütünlüğün önemli bir düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (120). Farelerde miR-126-3p'nin ek olarak silinmesinin, damar bütünlüğünün bozulmasının bir sonucu olarak kanamaya neden olduğu gösterilmiştir (121). miR-126-3p'nin vitreus ve plazma sıvısında ekspresyonunu araştıran bir çalışmada gruplar NPDR ve NDR olarak ikiye ayrılmıştır. Vitreus ve plazmada miR-126-3p ekspresyonu NDR grubuna göre NPDR grubunda azaldığı bulunmuştur (122). Yaptığımız çalışmada ise, miR-126-3p'nin PDR bulunan hastaların vitreus sıvısında kontrollere oranla ekspresyon seviyesinin upregüle olduğunu belirledik.

İskeminin neden olduğu retinal neovaskülarizasyonda miR-126-3p'nin rolünü araştıran bir çalışmasında retinal neovaskülarizasyon modelini oluşturmak için OIR fareler kullanılmıştır. Bu çalışmada, miR-126-3p ekspresyon seviyelerinin OIR farelerinin retinasında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Çalışmanın devamında farelere plazmit miR-126-3p/lipozom karışımının intravitreal enjeksiyonu ile tedavi edilmiştir ve miR-126-3p intravitreal enjeksiyon sonrası OIR modelinde retinal neovaskülarizasyonu azalttığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar, miR-126-3p'nin diyabetik retinopati patogenezinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (77).

Ayrıca, miR-126-3p'nin vasküler hücre adezyon molekülü-1, VEGF ve Ang-1 ekspresyonunu düzenleyerek DR patogenezinde rol alabileceği düşünülmüştür. Çalışmada streptozosin ile indüklü diyabetik rat modelinde diyabetik sıçanların retinalarında kontrol grubuna göre miR-126-3p seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ang-1 ve Tie2 düzeylerinin, kontrol grubu ile diyabetik grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak miR-126 ile tedavi edilen sıçanlarda ise Ang-1 ve Tie2 ekspresyonunda önemli ölçüde artış gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca miR-126-3p ekspresyonu *in vitro* olarak da değerlendirilmiştir. Bunun için HREC hücre hattı kullanılmıştır. HREC hücrelerinde niaspan ve miR-126-3p inhibitörü ile tedavi sonrası VEGF ekspresyonu azalırken Ang-1 ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır (123). Çalışma niaspan ile DR tedavisinin Ang-1/Tie2 sinyal yolağını düzenlediğini ve bu düzenlemenin miR-126-3p ekspresyonunda değişikliğe sebep olduğunu göstermiştir. Yaptığımız çalışmada ise PDR hastalarının vitröz sıvısında miR-126-3p ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığını ve Ang-1 seviyelerinin azaldığını bulduk. Elde ettiğimiz bu bulgulara göre miR-126-3p'nin Ang-1 düzeyini azaltarak vasküler stabilizasyonu inhibe ettiğini ve PDR patogenezinde anjiyogenez oluşumuna sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Retinada en bol bulunan miRNA'lardan biri olan miR-204-5p'nin oküler hastalıkların patogenezinde birçok role sahip olduğu bildirilmiştir. miR-204-5p'nin inhibisyonunun anormal lens oluşumuna, retina pigment epitelinin farklılaşmasına neden olduğu gösterilmiştir (124). Retina pigment epitel hücreleri, fotoreseptör dış segmentlerinin işlevlerine ve özellikle büyüme faktörlerinin salgılanmasına katılır. miR-204-5p'nin ekspresse olduğu retinal pigment epitel hücrelerinin disfonksiyonu, fotoreseptör dejenerasyonu ile sonuçlanmaktadır (125).

Retina hastalıklarında önemli bir rol oynayan miR-204-5p, inflamasyon, apoptoz ve çalışmamızda odaklandığımız neovaskülarizayon gibi çeşitli yolakları etkilemektedir. Neovaskülarizasyon araştırmalarında VEGF'ten bağımsız yeni bir yolak belirlemek isteyen Kather ve ark. (126), çalışmalarında Kelch benzeri Ect2 etkileşimli proteini KLEIP-/- fareleri kullandılar. KLEIP-/- fareler kornea distrofisi ve korneadaki neovaskülarizasyonun agenetik

modeli olarak kullanılmaktadır. Çalışmada Ang-1'in son evre distrofik korneada önemli ölçüde upregüle olduğu bulundu. Ayrıca KLEIP farelerinin korneasında miR-204-5p ekspresyonunun downregüle olduğu gösterilmiştir. KLEIP farelerinde mir-204-5p'nin kornea fenotip gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda miR-204-5p'nin azalmasının Ang-1 ekspresyonunun artmasına yol açtığı ve bu durumun korneal neovaskülarizasyonunu arttırdığı çalışmada belirtilmiştir (126).

Diyabetik retinopati modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir başka çalışma, miR-204-5p'nin, anti-apoptotik ve anti-inflamasyon faktörleri olarak işlev gören SIRT1 ve Bcl-2'nin ekspresyonlarını düzenlemedeki rolünü ortaya koymuştur. Bu sıçanlarda, miR-204-5p aşırı ekspresyonu SIRT1/Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde bir azalmaya sebep olmaktadır. Aynı zamanda inflamatuar faktörler olan interlökin-6, interlökin-18, ve tümör nekroz faktörü-α arttırdığı çalışmada belirtilmiştir. Bu bulgular, miR-204'ün gözdeki apoptoz ve inflamasyonu düzenlemedeki önemli rollerini vurgulamaktadır (127).

Yaptığımız çalışmada PDR hastalarının vitreus miR-204-5p'nin ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre 3,72 kat artığını bulduk. Yapılan literatür araştırmalarında da miR-204-5p'nin Ang-1'in eskpresyonunu düzenlediği belirtilmektedir (124). Çalışmamız PDR grubunda miR-204-5p ekspresyonundaki artış ile birlikte, vitreus Ang-1 seviyelerinde azalmanın eşlik ettiğini gözlemledik. Retinadaki miR-204-5p etkisinin işlevini ve kesin mekanizmasını değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olsa da elde ettiğimiz bu bulgular, miR-204-5p'nin Ang-1 aracılığıyla PDR'deki anjiyogenezden sorumlu olduğu ve anormal ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesinin terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

miR-204/211 alt ailesinin bir başka üyesi olan miR-211, sekansı, hedef genleri ve ekspresyon bakımından miR-204'e oldukça benzerdir (72). Memelilerde miR-204, yalnızca bir veya iki nükleotit ile farklılık gösterdiği için miR-211 adlı yakından ilişkili bir paraloga sahiptir. Bu iki miRNA aynı seed- region dizisini paylaşır ve bu nedenle benzer bir gen grubunu hedef aldığı tahmin edilmektedir. (128).

miR-211'in retinadaki işlevini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, miR-211'den yoksun farelerde, görsel fonksiyonda önemli değişikliklerin eşlik ettiği ilerleyici bir koni distrofisi sergilemişlerdir. Bu çalışma koni fotoreseptörlerinin fonksiyonunun ve ilişki hücrelerin hayatta kalmasının miR-211 düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (128). Bununla birlikte koni disfonksiyonu veya bu hücrelerin kaybı, DR ve makula dejenerasyonuna sebep olabilen yaygın bir patolojik süreçlerden biridir. (129)

Liu ve ark. (130) yaptıkları bir çalışmada NDR ve DR grubundaki serum miR-211 ekspresyonunun sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde up-regüle olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, DR grubundaki serum miR-211 ekspresyonu NDR grubuna göre yüksek olduğu gösterilmiştir (130).

Ragusa ve ark. (131) yaptığı bir çalışmada makular delik hastalığı olan kişilerden alınan vitröz ve serumdaki 745 miRNA'nın ekspresyon profilini belirlemişlerdir ve vitreus sıvısında miR-211 ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede arttığı bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada ise PDR'si bulunan hastalardaki vitreus örneklerinde miR-211 ekpresyonunun kontrol grubuna oranla 0,53(-1,88) kat azaldığını bulduk. Fakat bu azalış istatiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca yapılan literatür araştırmasında Ang-1 ile miR-211'in ilişkilendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bulgularımıza göre vitreus sıvısında miR-211 ekspresyonundaki azalışın Ang-1'i baskıladığını ve bu sayede PDR patogenezinde neovaskülarizasyon sürecini etkileyebileceğini düşünmekteyiz. PDR patogenezinde vitreus miR-211 düzeylerinin belirlenerek ve Ang-Tie2 yolağındaki rolünü araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

miR-542-3p'nin retinal pigment epitel hücrelerde ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir çalışmada NDR grubunda kontrol grubuna göre ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Çalışmada miR-542-3p'nin ekspresyonu DM+NDR'nin birlikte bulunduğu hasta gruplarında kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir (132). Yaptığımız çalışmada vitreus sıvısında PDR miR-542-3p ekspresyon düzeyleri kontrole göre 1.57 kat artış göstermesine rağmen bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yapılan literatür araştırmasında daha önce vitreus sıvısında miR-542 ekspresyonu ölçülmediği de görülmektedir. miR-542-3p'nin Ang-2 ekspresyonunu düzenlediği ve bu sayede tümör anjiogenezini azalttığı Ting ve ark. (133) tarafından kanıtlanmıştır. Bu konu ile ilgili farklı bir çalışmada endotelyal progenitör hücrelerde miR-542'nin anjiyogenezdeki rolü araştırılmıştır. Çalışmada Ang-2'nin miR-542-3p'nin doğrudan hedefi olduğunu ve miR-542-3p'nin inhibisyonunun, endotelyal progenitör hücrelerde anjiyogenezise katkıda bulunduğu gösterilmiştir (134). Fakat miR-542'nin PDR patogenezinde neovaskülarizasyondaki rolünü araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışma ile mir-542-3p'nin Ang-2 düzenlenmesindeki rolünü araştırmamıza rağmen bu konuda daha fazla veriye ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

miR-5195-3p'nin retinal pigment epitelyal hücre hasarındaki rolünü araştıran bir çalışmada, miR-5195-3p'nin ekspresyonunun kontrollere göre yüksek glukoz ile indüklenen retinal epitelyal hücrelerinde ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. miR-5195-3p'nin aşırı ekspresyonu, retinal pigment epitel hücrelerinde bozulmuş hücre canlılığını, artan apoptozu ve

proinflamatuar sitokinlerin salgılanmasını azaltığı belirtilmiştir (135). Çalışmamızda miR-5195-3p'in vitreus sıvısındaki ekspresyonunu 1,95 kat azaldığını fakat bunun istatiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. Yaptığımız literatür araştırmasında miR-5195-3p ekspresyonunu vitreus sıvısında belirleyen bir çalışma olmadığını gördük. Çalışmamız bu konuda ilk olmaktadır. Ayrıca miR-5195-3p'in Ang/Tie2 sinyal yolağı ile ilişkilendiren herhangi bir çalışma da literatüde bulunmamaktadır. mirWalk'a göre miR-5195-3p'nin hedefleri arasında Ang-2 bulunmaktadır. Çalışmamızda PDR'de ekspresyonunun azalması sonucu anjiyogenezde rol alan Ang-2 artışına yol açarak PDR patogenezine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Tümör dokularında, miRNA-145-5p'nin metastazı inhibe etmek için HIF-2α ve VEGF gibi pro-anjiyogenik genleri hedeflediği gösterilmiştir. Ek olarak, miR-145-5p'nin B hücreli lenfoma, meme kanseri, kolon kanseri ve anti-anjiyogenik özelliklere aracılık ettiği düşünülen çok sayıda tümörün patogenezinde yer aldığı bildirilmektedir (136). Wang ve ark. (137) miR-145-5p ve Ang-2 arasındaki ilişkiyi belirleyen ilk çalışmalarında, miR-145-5p'nin pankreas kanseri hücrelerinde Ang-2 ekspresyonunu doğrudan düzenleyerek hücre invazyonunu baskıladığını ve miR-145-5p'nin ekspresyonunun in vivo olarak tümör büyümesini ve anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (137). Başka bir çalışmada ise, miR-145-5p'nin ekspresyonu, gastrik kanser hücrelerinde önemli ölçüde down regüle edilirken, Ang-2'nin belirgin şekilde up regüle edildiği bulunmuştur. miR-145-5p'nin doğrudan Ang-2'yi hedeflediğini ve miR-145-5p'nin aşırı ekspresyonu Ang-2'yi baskılayarak gastrik kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazsyonunu inhibe ederek patogenezi etkilediği düşünülmektedir (138).

miR-145-5p'nin tümör hücreleri haricinde retinal ganglion hücrelerinde de ekspresse olduğu gösterilmiştir. miR-145-5p, yüksek glikoz ile indüklenen retinal ganglion hücre hattında upregüle edildiği bulunmuştur. Çalışmanın devamında miR-145-5p'nin retinal gangliyon hücre büyümesi ve proliferasyonu üzerindeki etkileri in vitro olarak değerlendirilmiştir ve miR-145-5p ekspresyonunun, yüksek glukozla muamele edilmiş retinal ganglion hücrelerinde, inflamatuar faktörler olan IL-6 ve TNF-α üretimi ile birlikte önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (139). Yapılan diğer bir çalışma ise, miR-145-5p'nin yüksek glukoz konsantrasyonu ile muamele edilmiş retinal endotelyal hücrelerde de downregüle edildiği doğrulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, miR-145-5p'nin aşırı ekspresyonunun, artan oksidatif stresi ve yüksek glukoz konsantrasyonu ile indüklenen inflamasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, miR-145-5p'nin DR'de anti-inflamatuar ve antioksidatif role sahip olduğunu bildirmişlerdir (140). İnflamasyon haricinde miR-145-5p'nin oküler anjiyogenez patogenezi ile ilişkilendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır. OIR fare modeli ile yapılan bir çalışmada, miR-

145-5p'nin vasküler endotelyal hücre fonksiyonunu ve patolojik oküler anjiyogenezi spesifik rolü araştırılmıştır. Kontrollere göre OIR fare retinalarında miR-145-5p ekspresyonunun anlamlı bir şekilde up-regüle olduğu bulunmuştur. Çalışmada ayrıca miR-145-5p inhibitörleri OIR farelere enjekte edilmiş ve bu tedavinin OIR farelerinde gerçekleşen patolojik neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (141). Bu bulgulara göre miR-145-5p'in DR patogenezinde inflamasyon, anjiyogenez gibi önemli süreçlerde rol aldığı kanıtlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarla miR-145-5p'nin ekspresyonunun up ya da down regüle olduğu gösterilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında miR-145-5p'in vitreus sıvısındaki ekspresyonu ile ilgili bir çalışma bulunamamıştır. Yaptığımız çalışma, vitreus sıvısında miR-145-5p'nin ekspresyonunu belirleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonunda miR-145-5p'nin kontrollere göre PDR hastalarının vitreusunda 0,71 (-1,4) kat azaldığını fakat bu azalmanın istatiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Ayrıca miR-145-5p'nin DR patogenezide Ang/Tie2 sinyal yolağındaki rolü araştırılmamıştır. Yaptığımız çalışmada, PDR hastalarının vitreus sıvısında miR-145-5p ekspresyonundaki azalışın anjiyogenezin hedefi olan Ang-2 düzeylerinin artışına yol açarak PDR'de anjiyogenez patogenezini etkileyeceği düşünülmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonucunda PDR hastalığı patogenezinde önemli rol oynayan Ang-1, Ang-2 ve Tie2 genlerini hedefleyen, miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p, miR-204-5p'nin ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

- Yaptığımız çalışmada vitreus Ang-1 ve Ang-2 düzeylerini PDR'de kontrollere göre anlamlı olarak azaldığını saptadık. Ayrıca, Ang-1/Ang-2 oranını belirledik ve literatür çalışmaları ile uyumlu olarak bu oranının azaldığını saptadık. Ang-1 ve Ang-2 seviyesindeki değişikliklerin neovaskülarizasyona neden olarak ve PDR patogenezini etkilediği sonucuna vardık.
- Çalışmamızda Tie2 seviyelerinde bir artışın olduğu fakat bunun istatiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Bulgumuzun literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu gözlemledik.
- PDR patogenezinde önemli rol oynayan Ang-1 genini hedefleyen miR-126-3p, miR-204-5p ve miR-211-3p'nin ekspresyon profilleri ortaya konmuştur.
- PDR hastalarının vitreus miR-204-5p ve miR-126-3p'nin ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 3,72 ve 2,63 kat anlamlı olarak arttığını belirledik. miR-204-5p ve miR-126-3p'nin Ang-1 düzeyini azaltarak vasküler stabilizasyonu inhibe ettiğini ve PDR patogenezinde anjiyogenez oluşumuna katkı sağladığını düşünmekteyiz.
- Yaptığımız çalışmada ise PDR'si bulunan hastalardaki vitreus örneklerinde miR-211 ekpresyonun kontrol grubuna oranla 0,53(-1,88) kat azaldığını fakat bu azalışın istatiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk.

- Çalışmamızda ayrıca, Ang-2 genini hedefleyen, miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p'nin vitreus sıvısında ekspresyon profilleri belirlenmiştir. miR-145-5p ve miR-5195'in vitreus sıvısındaki ekspresyonunu sırasıyla -1,4 ve -1,95 kat azaldığını fakat bu azalışların istatiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. Yaptığımız çalışmada ayrıca PDR vitreus sıvısında miR-542-3p ekspresyon düzeyinin kontrole göre 1.57 kat artış göstermesine rağmen bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Literatürde miR-145-5p, miR-5195 ve miR-542-3p ekspresyonunu vitreus sıvısında belirleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu miRNA'ların vitreus sıvısındaki ekspresyonunu belirleyerek literatüre bir katkı sağladık.

ÖZET

Çalışmamızın amacı PDR patogenezinde önemli rol oynayan Ang-1, Ang-2 ve Tie2 vitreus sıvısındaki düzeylerini belirlemek ve bu genleri hedefleyen miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p ve miR-204-5p'nin ekspresyon profillerini ortaya çıkarmaktır.

PDR tanısı almış 25 hasta ve kontrol grubu olarak ise diyabetik hastalığı olmayan 25 kişi çalışmaya dahil edildi. Kontrol ve hasta gruplarının vitreus Ang-1, Ang-2 ve Tie2 seviyeleri ticari ELISA kiti ile belirledik. miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p ve miR-204-5p ekspresyonları RT-PCR kullanılarak değerlendirildi.

Çalışmamızda PDR grubunda Ang-1 ve Ang-2 düzeylerinin kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı azaldığını bulduk. Ayrıca vitreus Ang-1/Ang-2 oranını hesapladık ve bu oranın kontrol grubuna göre PDR grubunda azaldığını belirledik. Vitreus Tie2 seviyelerinin ise PDR grubunda arttığını fakat bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. Çalışmamızda, miR-204-5p, mir-126-3p ve miR-542-3p'nin ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre PDR grubunda up regüle olduğunu gözlemledik. miR-204-5p ve miR-126-3p'nin ekspresyonundaki artışın ise istatiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. miR-211-3p, miR-5195-3p ve miR-145-5p ekspresyonlarının ise kontrol grubuna göre PDR'de down regüle olduğu belirledik.

Sonuç olarak, miR-204-5p ve miR-126-3p'nin up regülasyonun Ang-1 düzeylerini azaltarak PDR patogenezinde anjiyogenez oluşumuna katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. miR-204-5p ve miR-126-3p PDR'nin erken tanısına katkı sağlayabilir. Ayrıca miR-204-5p ve miR-126-3p'nin anormal ekspresyon seviyeleri düzenlenerek ileride PDR tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Proliferatif diyabetik retinopati, mikroRNA, Anjiyopoetin-1, Anjiyopoetin-2, Reseptör Tirozin Kinaz 2

DETERMINATION OF VITREOUS ANG-1, ANG-2 AND TİE2 LEVELS IN THE PATHOGENESIS OF PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY

SUMMARY

The aim of our study is to determine the levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in vitreous fluid, which play an important role in the pathogenesis of PDR. Targeting these genes is to reveal the expression profiles of miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p and miR-204-5p and

Twenty-five patients diagnosed with PDR and 25 people without diabetes as the control group were included in the study. We determined the vitreous Ang-1, Ang-2 and Tie-2 levels of the control and patient groups with a commercial ELISA kit. Expressions of miR-145-5p, miR-542-3p, miR-5195-3p, miR-126-3p, miR-211-3p and miR-204-5p were evaluated using RT-PCR.

In our study, we found that Ang-1 and Ang-2 levels were statistically significantly decreased in the PDR group compared to the control group. We also calculated the vitreous Ang-1/Ang-2 ratio and determined that this ratio decreased in the PDR group compared to the control group. We found that vitreous Tie2 levels increased in the PDR group, but this increase was not statistically significant.

In our study, we observed that the expression levels of miR-204-5p, mir-126-3p and miR-542-3p were up-regulated in the PDR group compared to the control group. We found that the increase in the expression of miR-204-5p and miR-126-3p was statistically significant.

We determined that miR-211-3p, miR-5195-3p and miR-145-5p expressions were down-regulated in PDR compared to the control group.

In conclusion, we think that upregulation of miR-204-5p and miR-126-3p may contribute to angiogenesis in PDR pathogenesis by reducing Ang-1 levels. miR-204-5p and miR-126-3p may
contribute to the early diagnosis of PDR. In addition, abnormal expression levels of miR-204-5p and miR-126-3p can be regulated and used as a therapeutic agent in the treatment of PDR in the future.

Key words: Proliferative diabetic retinopathy, microRNA, Angiopoetin-1, Angiopoetin-2, Receptor tyrosine kinase 2

KAYNAKLAR

1. Lin KY, Hsih WH, Lin YB, Wen CY, Chang TJ. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. J Diabetes Investig 2021;12(8):1322-25. Doi: 10.1111/jdi.13480.

2. M. Mounirou B, Adam N, H. Yakoura A, M. Aminou M, Liu Y, Tan L. Diabetic retinopathy: An overview of treatments. Indian J Endocrinol Metab. 2022;26(2):111-18. Doi:10.4103/ijem.ijem_48021

3. Lazzara F. Diabetic retinopathy: New pharmacological targets. Pharmadvances 2022;4(2):143-162. Doi: 10.36118/pharmadvances.2022.27

4. Mahajan N, Arora P, Sandhir R. Perturbed biochemical pathways and associated oxidative stress lead to vascular dysfunctions in diabetic retinopathy. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:1-16. Doi.org/10.1155/2019/8458472

5. Khalaf N, Jafari RM, Haghnia S. Role of Angiopoietins and Tie-2 in diabetic retinopathy. Electron Physician. 2017;9(8):5031–5. DOI: 10.19082/5031

6. Khan M, Aziz AA, Shafi NA, Abbas T, Khanani AM. Targeting angiopoietin in retinal vascular diseases: A literature review and summary of clinical trials involving faricimab. Cells 2020;9(1869):1-14. doi:10.3390/cells9081869

7. Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. Sweta Rani (Eds.). Methods in Molecular Biology. New York: Springer Science+Business Media; 2017; ch 1,1-10.

8. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Gen 2010;11:597-610.

9. Gomaa AR, Elsayed ET, Moftah RF. MicroRNA-200b expression in the vitreous humor of patients with proliferative diabetic retinopathy. Ophthalmic Res. 2017;58(3):168–75

10. Satari M, Aghadavod E, Mobini M, Asemi Z. Association between miRNAs expression and signaling pathways of oxidative stress in diabetic retinopathy. J Cell Physiol 2019;234:8522-32.

11. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. Nat Rev Nephrol 2020;16:377–90 Doi:10.1038/s41581-020-0278-5.

12. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2014;37:581–90.

13. Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease. Curr Cardiol Rep. 2019;21(21).

14. Burki T. Country in Focus: Diabetes prevalence on the rise in Turkey. Lancet Diabetes Endocrinol 2016;4(5):391–2. Doi: 10.1016/S2213-8587(16)00090-5.

15. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. Diabetes Care 2021;44:15–33.

16. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nat Rev Endocrinol 2018;14(2):88–98. Doi:10.1038/nrendo.2017.151

17. Gedebjerg A, Peter T, Berencsi K, Rungby J, Steen J, Witte DR, et al. Prevalence of micro- and macrovascular diabetes complications at time of type 2 diabetes diagnosis and associated clinical characteristics: A cross-sectional baseline study of 6958 patients in the Danish DD2 cohort. J Diabetes Complications 2018;32:34–40. Doi:10.1016/j.jdiacomp.2017.09.010

18. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. Clin Diabetes 2008;26(2):77–82.

19. Rao V, Rao ALBV, Hong S, Candasamy M, Kumar S. Diabetic nephropathy: An update on pathogenesis and drug development. Diabetes Metab Syndr 2019;13:754–62. Doi: 10.1016/j.dsx.2018.11.054

20. Qi C, Mao X, Zhang Z, Wu H. Classification and differential diagnosis of diabetic nephropathy. J Diabetes Res. 2017;2017:1–7.

21. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. Nat Rev Dis Primers 2019;5(41):1–18. Doi: 10.1038/s41572-019-0092-1.

22. Khdour MR. Treatment of diabetic peripheral neuropathy. Pharm Pharmacol 2020;72:863–72.

23. Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. Nat Rev Endocrinol 2021;17(4):195–206. Doi:10.1038/s41574-020-00451-4

24. Whitehead M, Wickremasinghe S, Osborne A, van Wijngaarden P, Martin KR. Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies. Expert Opin Biol Ther 2018;18(12):1257–70. Doi: 10.1080/14712598.2018.1545836

25. Rodríguez ML, Pérez S, Mena-Mollá S, Desco MC, Ortega ÁL. Oxidative stress and microvascular alterations in diabetic retinopathy: Future therapies. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:1-18.

26. Sabanayagam C, Banu R, Chee ML, Lee R, Wang YX, Tan G, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review. Lancet Diabetes Endocrinol 2019;7(2):140–9. Doi:10.1016/S2213-8587(18)30128-1.

27. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. Redox Biol 2020;37:1-17. Doi:10.1016/j.redox.2020.101799

28. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. Lancet 2010;376(9735):124–36. Doi:10.1016/S0140-6736(09)62124-3

29. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. Diabetes Care 2012;35(3):556–64.

30. Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy. Curr Diab Rep 2011;11(4):253–64.

31. Koçak N. Diyabetik retinopati ve diyabetik maküla ödeminde epidemiyoloji ve risk faktörleri. Güncel Retina 2018;2(2):89–93.

32. Heng LZ, Comyn O, Peto T, Tadros C, Ng E, Sivaprasad S, et al. Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. Diabet Med 2013;30:640–50.

33. Shrote AP, Diagavane S. Clinical evaluation of correlation between diabetic retinopathy with modifiable, non-modifiable and other independent risk factors in tertiary set-up in central rural India. J Clin Diagn Res 2015;9(10):14–8.

34. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes. Ophthalmic Res 2019;62(4):211–7.

35. Dhir M, Fredrikson M. Impact of HbA 1c, followed from onset of type 1 diabetes, on the development of severe retinopathy and nephropathy: The VISS study (Vascular Diabetic Complications in Southeast). Diabetes Care 2015;38:308–31.

36. Wong RLM, Wong IYH. Associations between diabetic retinopathy and systemic risk factors. Hong Kong Med J 2016;22(6):589–99.

37. Shu D, Ting W, Ophth M, Chui G, Cheung M. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review. Clin Exp Ophthalmol 2016;(44):260–77.

38. Skrivarhaug T, Fosmark DS, Stene LC. Low cumulative incidence of proliferative retinopathy in childhood-onset type 1 diabetes: a 24-year follow-up study. Diabetologia. 2006;49:2281–90.

39. Wang, Ling D, Tu L, Wijngaarden P, Dusting GJ, Liu G. Gene therapy for diabetic retinopathy: Are we ready to make the leap from bench to bedside ? Pharmacol Ther 2017;173:1–18. Doi:10.1016/j.pharmthera.2017.01.003

40. Chen L, Cui Y, Li B, Weng J, Wang W, Zhang S, et al. Advanced glycation end products induce immature angiogenesis in in vivo and ex vivo mouse models. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2020;318:519–33.

41. ValdezGuerrero AS, Quintana-Pérez JC, Arellano-Mendoza MG, Castañeda-Ibarra FJ, Tamay-Cach F, Alemán-González-Duhart D. Diabetic retinopathy: Important biochemical alterations and the main treatment strategies. Can J Diabetes 2021;45:504-11.

42. Kim J, Kim KM, Kim CS, Sohn E, Lee YM, Jo K, et al. Puerarin inhibits the retinal pericyte apoptosis induced by advanced glycation end products in vitro and in vivo by inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2012;53(2):357–65.

43. Xu J, Chen LJ, Yu J, Wang HJ, Zhang F, Liu Q, et al. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Cell Physiol Biochem 2018;48:705-17.

44. Li W, Chen S, Mei Z, Zhao F, Xiang Y. Polymorphisms in sorbitol-aldose reductase (Polyol) pathway genes and their influence on risk of diabetic retinopathy among Han Chinese. Med Sci Monit 2019;20(25):7073–8.

45. Kerimoğlu H, Türk HB. Diyabetik retinopati ve diyabetik maküla ödeminde patogenez. Güncel Retina 2018;2(2):94–101.

46. Sarıkaya M, Yazıhan N, Evcimen Daş N. Relationship between aldose reductase enzyme and the signaling pathway of protein kinase C in an in vitro diabetic retinopathy model. Can J Physiol Pharmacol 2019;2-29.

47. Zheng Q, Hou W. Regulation of angiogenesis by microRNAs in cancer. Mol Med Rep 2021:1;24(2)1-13.

48. Terao R, Kaneko H. Lipid signaling in ocular neovascularization. Int J Mol Sci q 2020;21:1–22.

49. Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: MiRNA biology and therapy. Curr Cancer Drug Targets 2017;18(3):266–77.

50. Kusuhara S, Fukushima Y, Ogura S, Inoue N, Uemura A. Pathophysiology of diabetic retinopathy: The old and the new. Diabetes Metab J. 2018;42:364–76.

51. Rajabi M, Mousa SA. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. Biomedicines. 2017;5(2):1-12.

52. Akwii RG, Mikelis CM. Targeting the Angiopoietin/Tie pathway: Prospects for treatment of retinal and respiratory disorders. Drugs 2021;81:1731–49.

53. Jones N, Master Z, Jones J, Bouchard D, Gunji Y, Sasaki H, et al. Identification of Tek/Tie2 binding partners. J Biol Chem 1999;274(43):30896-30905.

54. Saharinen P, Eklund L, Alitalo K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. Nat Rev Drug Discov 2017;16(9):635–61. Doi: 10.1038/nrd.2016.278.

55. Makinde T, Agrawal DK. Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease: Molecular Medicine. J Cell Mol Med 2008;12(3):810–28.

56. You QY, Zhuge FY, Zhu QQ, Si XW. Effects of laser photocoagulation on serum angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio, and soluble angiopoietin receptor Tie-2 levels in type 2 diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy. Int J Ophthalmol 2014;7(4):648–53.

57. Hussain RM, Neiweem AE, Kansara V, Harris A, Ciulla TA. Tie-2/Angiopoietin pathway modulation as a therapeutic strategy for retinal disease. Expert Opin Investig Drugs 2019;28(10):861–9. Doi:10.1080/13543784.2019.1667333

58. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. Angiogenesis 2017;20:409–26.

59. Nguyen QD, Heier JS, Do D v., Mirando AC, Pandey NB, Sheng H, et al. The Tie2 signaling pathway in retinal vascular diseases: a novel therapeutic target in the eye. Int J Retina Vitreous. 2020;6(48)1-11.

60. Campochiaro PA, Khanani A, Singer M, Patel S, Boyer D, Dugel P, et al. Enhanced benefit in diabetic macular edema from AKB-9778 tie2 activation combined with vascular endothelial growth factor suppression. Ophthalmology 2016;123(8):1722–30. Doi:10.1016/j.ophtha.2016.04.025

61. The Tie2 Pathway: What Retina Specialists Need to Know. Retinal Physician 2017;1-16

62. Karagöz IK, Allahverdiyev A, Bağlrova M, Abamor ES, Dinparvar S. Current approaches in treatment of diabetic retinopathy and future perspectives. J Ocul Pharmacol Ther 2020;36:487–96.

63. Wang W, Lo ACY. Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments. Int J Mol Sci. 2018;19(1816):1–14.

64. Zhang X, Bao S, Hambly BD, Gillies MC. Vascular endothelial growth factor-A: A multifunctional molecular player in diabetic retinopathy. Int J Biochem Cell Bio. 2009;41:2368–71.

65. Semeraro F, Morescalchi F, Cancarini A, Russo A, Rezzola S, Costagliola C. Diabetic retinopathy, a vascular and inflammatory disease: Therapeutic implications. Diabetes Metab 2019;45:17–27.

66. Shen J, Frye M, Lee BL, Reinardy JL, McClung JM, Ding K, et al. Targeting VE-PTP activates Tie2 and stabilizes the ocular vasculature. J Clin Invest. 2014;124(10):4564–76.

67. Khanani AM, Russell MW, Aziz AA, Danzig CJ, Weng CY, Eichenbaum DA, et al. Angiopoietins as potential targets in management of retinal disease. Clin Ophthalmol 2021;15:3747–55.

68. Chong V. Ranibizumab for the treatment of wet AMD: A summary of real-world studies. Eye 2016;30:270–86.

69. Khanani AM, Patel SS, Ferrone PJ, Osborne A, Sahni J, Grzeschik S, et al. Efficacy of every four monthly and quarterly dosing of faricimab vs ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: The STAIRWAY Phase 2 randomized clinical trial. JAMA Ophthalmol 2020;138(9):964-972.

70. Sahni J, Dugel PU, Patel SS, Chittum ME, Berger B, del Valle Rubido M, et al. Safety and efficacy of different doses and regimens of faricimab vs ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: The AVENUE Phase 2 randomized clinical trial. JAMA Ophthalmol 2020;138(9):955-963.

71. Sahni J, Patel SS, Dugel PU, Khanani AM, Jhaveri CD, Wykoff CC, et al. Simultaneous inhibition of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor-A with faricimab in diabetic macular edema: BOULEVARD Phase 2 randomized trial. Ophthalmol 2019;126(8):1155–70.

72. Liu CH, Huang S, Britton WR, Chen J. MicroRNAs in vascular eye diseases. Int J Mol Sci 2020;649(21):1-21

73. Wu J, Gao Y, Ren A, Zhao S. Altered MicroRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy. Ophtalmic Res 2012;47:195–201.

74. Martinez B, Peplow P. MicroRNAs as biomarkers of diabetic retinopathy and disease progression. Neural Regen Res 2019;14(11):1858–69.

75. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. J Cell Physiol 2019;234:5451–65.

76. Sweta RE. MicroRNA profiling methods and protocols methods in molecular biology. 2017;1509:1-13

77. Bai Y, Bai X, Wang Z, Zhang X, Ruan C, Miao J. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. Exp Mol Pathol 2011;91(1):471–7. Doi:10.1016/j.yexmp.2011.04.016

78. Usui-ouchi A, Ouchi Y, Kiyokawa M, Sakuma T, Ito R. Upregulation of mir-21 levels in the vitreous humor Is associated with development of proliferative vitreoretinal disease. PLoS ONE 2016;(26861469):1–17.

79. Smit-McBride Z, Morse LS. MicroRNA and diabetic retinopathy biomarkers and novel therapeutics. Ann Transl Med 2021;9(15):1280–1280.

80. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. Vet Pathol 2014;51(4):759–74.

81. Bardin P, Sonneville F, Corvol H, Tabary O. Emerging microRNA therapeutic approaches for cystic fibrosis. Front Pharmacol 2018;1113(21)1-21.

82. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. Front Endocrinol 2018;402(9);1-12**.**

83. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. MiRNA nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. Trends Genet 2015;31:613–26.

84. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009 ;11(3):228-34.

85. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their Role in diagnosis and prognosis. Cells 2020;276(9):1-32.

86. Gareev I, Beylerli O, Yang G, Sun J, Pavlov V, Izmailov A, et al. The current state of MiRNAs as biomarkers and therapeutic tools. Clin Exper Med 2020;20:349–59.

87. Barutta F, Bellini S, Mastrocola R, Bruno G, Gruden G. MicroRNA and microvascular complications of diabetes. Int J Endocrinol 2018;2018:1-21.

88. Sundarbose K, Kartha R v., Subramanian S. MicroRNA's as biomarkers in cancer. Diagnostics 2013;3:84–104.

89. Caporali A, Emanueli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. Vascul Pharmacol. 2011;55:79–86.

90. Lee SWL, Paoletti C, Campisi M, Osaki T, Adriani G, Kamm RD, et al. MicroRNA delivery through nanoparticles. J Controlled Release 2019;313:80–95.

91. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. Cancer Res 2010;70:7027–30.

92. Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs 2017;35(2):180–8.

93. Bader AG. MiR-34-a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. Front Genet 2012;3(120)1-9.

94. Stenvang J, Kauppinen S. MicroRNAs as targets for antisense-based therapeutics. Expert Opin Biol Ther 2008;8:59–81.

95. Bernardo BC, Ooi JYY, Lin RCY, Mcmullen JR. miRNA therapeutics: A new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart. Future Med Chem 2015;7(13):1771–92.

96. Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN, Wang S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. Proc Natl Acad Sci 2011;108(20):8287–92.

97. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting MicroRNA. N J Med 2013;368(18):1685–94.

98. Dávalos A, Chroni A. Antisense oligonucleotides, micrornas, and antibodies. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Springer New York LLC; 2015. p. 649–89.

99. Lima JF, Cerqueira L, Figueiredo C, Oliveira C, Azevedo NF. Anti-miRNA oligonucleotides: A comprehensive guide for design. RNA Biol 2018;15:338–52.

100. McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. The therapeutic potential of microRNAs: Disease modulators and drug targets. Pharm Res. 2011;28(12):3016–29.

101. Wang C, Lin Y, Fu Y, Zhang D, Xin Y. MiR-221-3p regulates the microvascular dysfunction in diabetic retinopathy by targeting TIMP3. Pflugers Archiv 2020;1-12.

102. Gong Q, Su G. Roles of miRNAs and long noncoding RNAs in the progression of diabetic retinopathy. Biosci Rep 2017;37:1-18.

103. Mastropasqua R, Toto L, Cipollone F, Santovito D, Carpineto P, Mastropasqua L. Progress in retinal and eye research role of microRNAs in the modulation of diabetic retinopathy. Prog Retin Eye Res 2014;43:92–107. Doi:10.1016/j.preteyeres.2014.07.003.

104. Xiong F, Du X, Hu J, Li T, Du S, Wu Q. Altered retinal MicroRNA expression profiles in early diabetic retinopathy: An in silico analysis. Curr Eye Res 2014;39(7):720–9.

105. Annese T, Tamma R, de Giorgis M, Ribatti D. microRNAs biogenesis, functions and role in tumor angiogenesis. Front Oncol 2020;10:1-21.

106. Guan JT, Li XX, Peng DW, Zhang WM, Qu J, Lu F, et al. MicroRNA-18a-5p administration suppresses retinal neovascularization by targeting FGF1 and HIF1A. Front Pharmacol 2020;276(11)1-11.

107. Hirota K, Keino H, Inoue M, Ishida H, Hirakata A. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2015;253(3):335-42.

108. Guo J, Zhou P, Pan M, Liu Z, An G, Han J, et al. Relationship between elevated microRNAs and growth factors levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. J Diabetes 2021;35(11)1-8.

109. Ma J, Wang J, Liu Y, Wang C, Duan D, Lu N, et al. Comparisons of serum miRNA expression profiles in patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus. Clinics 2017;72(2):111–5.

110. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. Diabetes 2011;60(4):1314–23.

111. Wang Y, Lin W, Ju J. MicroRNA-409-5p promotes retinal neovascularization in diabetic retinopathy. Cell Cycle 2020;19(11):1314–25.

112. Arrigo A, Aragona E, Bandello F. VEGF-targeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy. Ann Med 2022;54(1):1089–111. Doi: 10.1080/07853890.2022.2064541

113. Mukwaya A, Jensen L, Lagali N. Relapse of pathological angiogenesis: functional role of the basement membrane and potential treatment strategies. Exp Mol Med 2021;53:189–201.

114. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 2011;473:298–307.

115. Whitehead M, Osborne A, Widdowson PS, Yu-Wai-Man P, Martin KR. Angiopoietins in Diabetic Retinopathy: Current Understanding and Therapeutic Potential. J Diabetes Res. 2019;2019:1-9.

116. Yu Y, Zhang J, Zhu R, Zhao R, Chen J, Jin J, et al. The Profile of Angiogenic Factors in Vitreous Humor of the Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. Curr Mol Med. 2017;17(4)28-286.

117. Patel JI, Hykin PG, Gregor ZJ, Boulton M, Cree IA. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol 2005;89(4):480–3.

118. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. Dev Cell 2002;3(3):411–23.

119. Chen A, Wang H, Su Y, Zhang C, Qiu Y, Zhou Y, et al. Exosomes: Biomarkers and therapeutic targets of diabetic vascular complications. Front Endocrinol 2021;12:1-15.

120. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. Sci 2007;318(5858):1931–4.

121. Kordkheyli VA, Mishan MA, Tarsi AK, Mahrooz A, Kanavi MR, Hafezi-Moghadam A, et al. MicroRNAs may provide new strategies in the treatment and diagnosis of diabetic retinopathy: Importance of VEGF. Iran J Basic Med Sci 2021;24(4):267–79.

122. Pramanik S, Saha C, Chowdhury S, Bose C, Bhattacharyya NP, Mondal LK. Decreased levels of miR-126 and miR-132 in plasma and vitreous humor of non-proliferative diabetic retinopathy among subjects with type-2 diabetes mellitus. Diabetes Metab Syndr Obes 2022;15:345–58.

123. Wang Y, Yan H. MicroRNA-126 contributes to Niaspan treatment induced vascular restoration after diabetic retinopathy. Sci Rep. 2016;6:1-12.

124. Conte I, Carrella S, Avellino R, Karali M, Marco-Ferreres R, Bovolenta P, et al. MiR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting. Proc Natl Acad Sci 2010;107(35):15491–6.

125. Bereimipour A, Najafi H, Mirsane ES, Moradi S, Satarian L. Roles of miR-204 in retinal development and maintenance. Exp Cell Res 2021;46:1-8.

126. Kather JN, Friedrich J, Woik N, Sticht C, Gretz N, Hammes HP, et al. Angiopoietin-1 is regulated by miR-204 and contributes to corneal neovascularization in KLEIP-deficient mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55(7):4295–303.

127. Jiang X. Tong T. MiR-204 inhibits inflammation and cell apoptosis in retinopathy rats with diabetic retinopathy by regulating Bcl-2 and SIRT1 expressions. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2020;24:6486-6493.

128. Barbato S, Marrocco E, Intartaglia D, Pizzo M, Asteriti S, Naso F, et al. MiR-211 is essential for adult cone photoreceptor maintenance and visual function. Sci Rep. 2017;7(1)1-13.

129. Roosing S, Thiadens AAHJ, Hoyng CB, Klaver CCW, den Hollander AI, Cremers FPM. Causes and consequences of inherited cone disorders. Prog Retin Eye Res 2014;42:1–26.

130. Liu H nan, Cao N jue, Li X, Qian W, Chen X long. Serum microRNA-211 as a biomarker for diabetic retinopathy via modulating Sirtuin 1. Biochem Biophys Res Commun 2018;505(4):1236–43. Doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.052

131. Marco R, Rosario C, Andrea R, Lidia P, Teresio A, Antonio L, et al. MicroRNAs in vitreus humor from patients with ocular diseases. Mol Vis 2013;19:430-44.

132. Guo N, Nulahou A, Bu Q, Liu M, Wang Y, Zhao Y, et al. MiR-542-5p regulates the progression of diabetic retinopathy by targeting CARM1. Acta Biochim Pol 2020;67(3):373–8.

133. He T, Qi F, Jia L, Wang S, Song N, Guo L, et al. MicroRNA-542-3p inhibits tumour angiogenesis by targeting Angiopoietin-2. J Pathol 2014;232(5):499–508.

134. Lu Z, Wang S, Zhu X, Yuan X, Zhan Y, Li Y, et al. Resveratrol induces endothelial progenitor cells angiogenesis via miR-542-3p by targeting angiopoietin-2 and involves in recanalization of venous thrombosis. Med Sci Monit 2019;25:7675–83.

135. Liu J, Hou Y, Lin L, Yu N, Zhang Y. MicroRNA-5195-3p alleviates high glucose-induced injury in human ARPE-19 cells by targeting GMFB. PLoS One. 2021;16(11)1-11.

136. Mukwaya A, Jensen L, Peebo B, Lagali N. MicroRNAs in the cornea: Role and implications for treatment of corneal neovascularization. Ocul Surf 2019;17:400–11.

137. Wang H, Hang C, Ou XL, Nie JS, Ding YT, Xue SG, et al. MiR-145 functions as a tumor suppressor via regulating angiopoietin-2 in pancreatic cancer cells. Cancer Cell Int. 2016;16(1)1-9.

138. Zhou K, Song B, Wei M, Fang J, Xu Y. MiR-145-5p suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer epithelial cells via the ANGPT2/Nod like receptor axis. Cancer Cell Int. 2020;20(1)1-11.

139. Zhang J, Cui C, Xu H. Downregulation of miR-145-5p elevates retinal ganglion cell survival to delay diabetic retinopathy progress by targeting FGF5. Biosci Biotechnol Biochem 2019;83(9):1655–62.

140. Hui Y, Yin Y. MicroRNA-145 attenuates high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal endothelial cells through regulating TLR4/NF-κB signaling. Life Sci 2018;207:212–8.

141. Liu CH, Wang Z, Huang S, Sun Y, Chen J. MicroRNA-145 Regulates pathological retinal angiogenesis by suppression of TMOD3. Mol Ther Nucleic Acids 2019;16:335–47.

ŞEKİLLER LİSTESİ

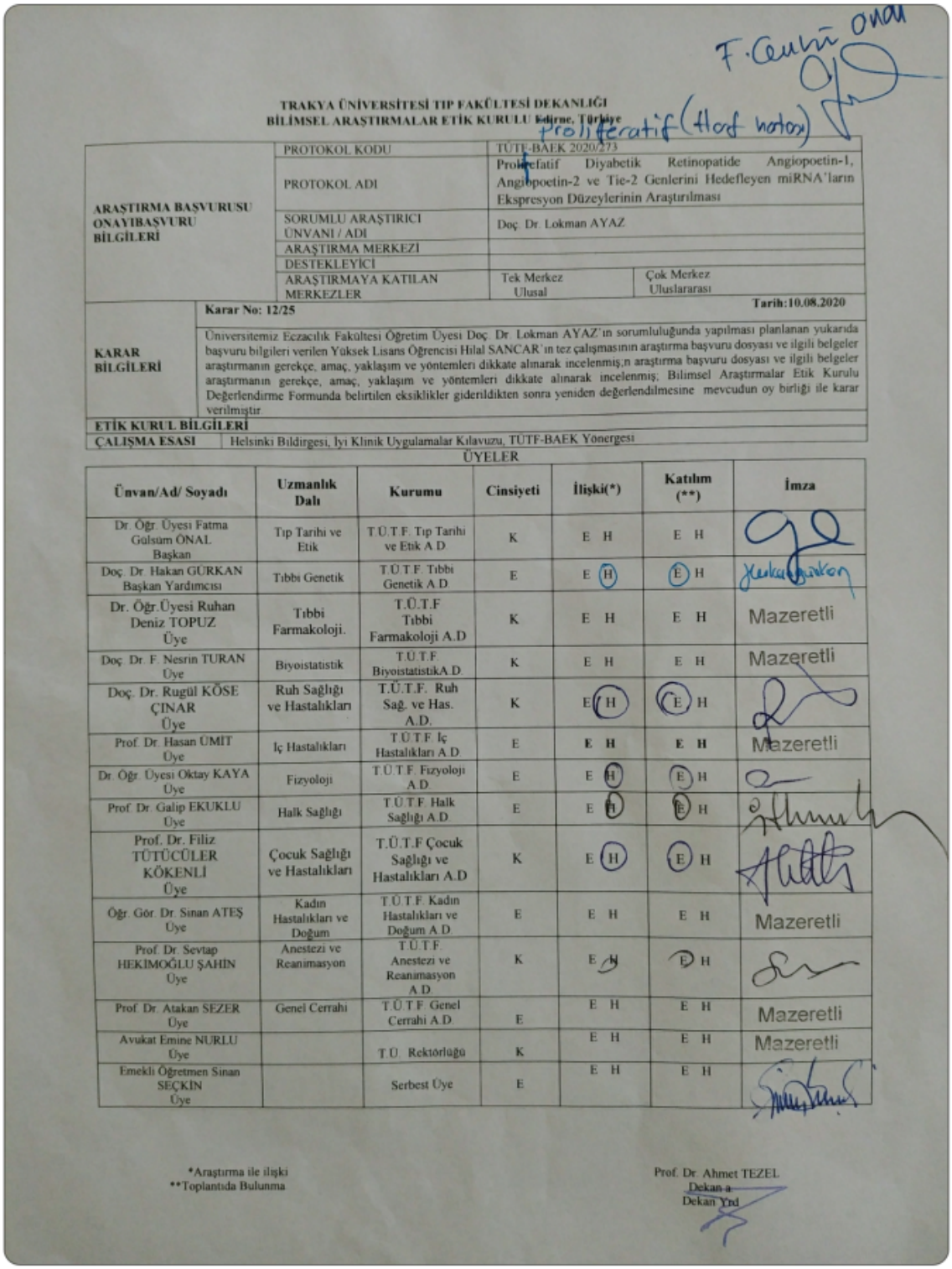
Şekil 1. Anjiyogenezin basamakları……14
Şekil 2. Ang-1, Ang-2 ve VE-PTP'nin Tie2 reseptörlerine bağlanması……16
Şekil 3. miRNA bölgeleri……21
Şekil 4. miRNA biyogenezi……22
Şekil 5. miRNA'ların biyomarker olarak kullanımı……24
Şekil 6. miRNA temelli terapötikler……27
Şekil 7. PDR patogenezinde rol oynayan miRNA'lar……28
Şekil 8. miR-204-5p'nin ekspresyon değişimi……39
Şekil 9. miR-211'ün ekspresyon değişimi……39
Şekil 10. miR-126-3p'nin ekspresyon değişimi……40
Şekil 11. miR-542-3p'nin ekspresyon değişimi……40
Şekil 12. miR-5195'in ekspresyon değişimi……41
Şekil 13. miR-145-3p'nin ekspresyon değişimi……41
Şekil 14. Kontrol ve PDR gruplarının Ang-1 düzeyleri……42
Şekil 15. Kontrol ve PDR gruplarının Ang-2 düzeyleri……43
Şekil 16. Kontrol ve PDR gruplarının Tie2 düzeyleri……..43

ÖZGEÇMİŞ

1995 yılı temmuz ayında Tekirdağ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Tekirdağ'da tamamladıktan sonra, 2013 yılında Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimine başladım. 2018 yılında Eczacılık fakültesinden mezun oldum. 2019 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temek Eczacılık Bilimleri Yüksek Lisans programına başladım. 2020 yılında Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım ve halen devam etmekteyim.

EKLER

Ek-1



TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2020/273	
	PROTOKOL ADI	Proliferatif Diyabetik Retinopatide Angiopoetin-1, Angiopoetin-2 ve Tie-2 Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Lokman AYAZ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 12/25** **Tarih:10.08.2020**
	Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Lokman AYAZ'ın sorumluluğunda yapılması planlanan yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Hilal SANCAR'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş;n araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Değerlendirme Formunda belirtilen eksiklikler giderildikten sonra yeniden değerlendilmesine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan UMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	Mazeretli
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a
Dekan Yrd.

Ek-2

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun …… tarih ve …….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Ü. Bilimsel Araştırma Birimi) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Proliferatif diyabetik retinopatide Angiopoetin-1, Angiopoetin-2 ve Tie-2 Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Proliferatif diyabetik retinopati hastalığında küçük RNA'ların araştırılması
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Doç. Dr Lokman AYAZ, T.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya AD
- **Araştırmanın amacı:** Bu çalışmada ile miRWalk2.0 ve Targetscan veritabanlarının taranması sonucunda diyabetik retinopati hastalığı patogenezinde önemli rol oynayan Ang1, Ang2, Tie-2 genlerini hedefleyen, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-542-3p, hsa-5195-3p hsa-miR-126-3p, hsa-miR-211-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-144-3p'nin ekspresyon profilleri belirlenerek hastalıkla olan ilişkisi ortaya konulacaktır.
- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** TEZ
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 15.09.2020 18 AY
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 50
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Çalışmamızda iki grup hasta yer alacaktır. Birinci grupta yer alan hastalarda, proliferatif diyabetik retinopati'nin komplikasyonları olan vitreus içi hemoraji ve traksiyonel retina dekolmanı tedavisi için uygulayacağımız pars plana vitrektomi (PPV) ameliyatı esnasında alınacak vitreus materyalinde Ang1,Ang2 Tie-2 genlerini hedefleyen, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-542-3p, hsa-5195-3p hsa-miR-126-3p, hsa-miR-211-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-144-3p düzeyleri araştırılacaktır. İkinci grupta ise, regmatojen retina dekolmanı ,makula deliği ve epiretinal membran tedavisi için uygulayacağımız PPV ameliyatı esnasında çıkarılan vitreus materyali

kullanılacaktır. Her iki grup arasında Ang1,Ang2 Tie-2 genlerini hedefleyen, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-542-3p, hsa-5195-3p hsa-miR-126-3p, hsa-miR-211-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-144-3p düzeyleri araştırılacaktır.

- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Bu çalışmaya katılan gönüllü üzerinde farklı bir tedavi uygulanmayacaktır.
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Yok
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Bu çalışmada, mevcut göz hastalığınızın tedavisi için uygulanmasına onay verdiğiniz PPV ameliyatı esnasında çıkarılan ve normalde atılan vitreus materyalini bağışlamanız ve analiz yapılmasına onay vermeniz istenmektedir.
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Eğer bu mikroRNA ile hastalık arasında bir ilişki bulunursa, yeni terapötik hedef olabilir ve biyomarker olma olasılığı bulunabilir.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Herhangi bir sorumluğu bulunmamaktadır
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Bu hastalar çalışmaya dahil edilmeyecektir.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Vitreus örneğinin analizi hasta için ek bir risk oluşturmayacaktır. Bu işlem için hastanın gözüne herhangi bir ilave müdahalede bulunulmayacaktır. Normal prosedürlerde pars plana vitrektomi ameliyatında yaklaşık 4cc vitreus çıkarılmakta, çıkarılan vitreus vitrektomi cihazının haznesi içerisine birikmekte ve atılmaktadır. Araştırmamız için yaklaşık 0.5 cc vitreus materyali, vitrektomi cihazının haznesi içerisinden alınacak ve analiz için Tıbbi Biyoloji laboratuvarına gönderilecektir.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Vitreus materyali analizi bir tedavi yöntemi olmayıp, hastalığınızla ilgili bir yarar veya zarar sağlamıyacaktır. Bu araştırma sonuçlarının, ilerleyen yıllarda diyabetik retinopatide yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine imkan sağlaması hedeflenmektedir.
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Araştırmamızda yapmayı planlanladığımız vitreus analizi, araştırmaya katılanlar için herhangi bir risk taşımamaktadır.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacak ve siz de talep edemeyeceksiniz
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Hastalar ameliyat esnasında çıkarılan vitreus materyalinde analiz yapılmasına onay vermedikleri durumda araştırmaya katılımları sona erdirilecektir
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** İsteyen gönüllülere araştırma sonuçları verilebilir.

- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Dr İrfan AKARAY TEL:05457120852
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Ang1, Ang2,Tie-2 düzeyi ve mikroRNA gen ekspresyon analizi için kullanılacaktır.

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- ***Gönüllünün; (El yazısı ile)***

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)***

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Açıklamaları yapan araştırmacının***

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih: