T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Rüveyde GARİP

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ TEDAVİSİNDE DOĞAL MOLEKÜL OLAN APİGENİN KULLANIMININ İN VİTRO MODELDE ARAŞTIRILMASI

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Özlem KAYA

EDİRNE-2024

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimde bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tez sürecimde büyük emekleri olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Rüveyde GARİP' e, asistanı olmaktan her zaman gurur duyduğum ve duyacağım hocam Prof. Dr. Hande GÜÇLÜ' ye, çalışmamın laboratuvar kısmını yöneten, her zaman yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Suat ERDOĞAN' a, Araştırma Görevlisi Rıza SERTTAŞ' a, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Başkanlığı'na (TÜBAP 2023/106), tüm desteğiyle yanımda olan canım aileme, asistan arkadaşlarıma ve Göz Hastalıkları Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……...1

GENEL BİLGİLER……...3

RETİNA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ…….…....3

RETİNA KAN DOLAŞIMI……8

VİTREUS ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ…….....9

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ…….....…10

PVR'NİN KLİNİK ÖNEMİ VE RİSK FAKTÖRLERİ…….....20

PVR'DE TEDAVİ…….....22

APİGENİN……28

GEREÇ VE YÖNTEMLER……..……30

BULGULAR……...37

TARTIŞMA…….....55

SONUÇLAR……..…….....64

ÖZET…….……...66

SUMMARY……...……...……..68

KAYNAKLAR……...70

SİMGE VE KISALTMALAR

ABB : Annexin binding buffer

ARPE : A human retina pigment epithelium cell line

ATCC : American type culture collection

ATR : All trans retinol

cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit

CHP : Cis-hidroksiprolin

DMAH : Düşük molekül ağırlıklı heparin

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

ECM : Ekstraselüler matriks

EDTA : Etilendiamin tetraasetikasit

EGF : Epidermal growth factor

ELM : External limiting membran

EMT : Epithelial mesenchymal transition

FAZ : Foveal avasküler zon

FGF : Fibroblast growth factor

FU : Fluorourasil

FUR : Fluouridine

GH : Growth hormone

IGF : İnsulin like growth factor

IL : İnterlökin

ILM : İnternal limitan membran

KRB : Kan-retina bariyeri

MAPK : Mitogen activated protein kinase

Mit-C : Mitomisin-C

MMP : Matriks metaloproteinaz

mRNA : Mesajcı ribonükleik asit

NF-κB : Nükleer faktör kappa B

Nm : Nanometre

µL : Mikrolitre

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polimeraz chain reaxion

PDGF : Plateled derived growth factor

PI : Propidium iyodür

PPV : Pars plana vitrektomi

PVR : Proliferatif vitreoretinopati

RD : Retina dekolmanı

RPE : Retina pigment epiteli

RRD : Regmatojen retina dekolmanı

SÇG : Silikon çalışma grubu

SD : Standart deviasyon

TA : Triamsinolon asetonid

TGF-β : Transforming growth factor-β

TNF-α : Tümor nekroz faktör-α

TRD : Traksiyonel retina dekolmanı

VEGF : Vascular endothelial growth factor

ZO-1 : Zonula occludens-1

α-SMA : Alpha-smooth muscle actin

GİRİŞ VE AMAÇ

Proliferatif vitreoretinopati (PVR), proliferasyon potansiyeli olan hücrelerin retina yüzeyi ve vitreusta çoğalarak, retinal traksiyon ve dekolmana yol açtıkları klinik bir sendromdur. Genellikle uzun süren retina dekolmanı (RD) veya dekolman cerrahisi sonrasında ve nadir olarak oküler travma sonrası, üveit, viral retinitler, proliferatif diabetik retinopati gibi kan retina bariyeri (KRB)'nin bozulduğu durumlarda da ortaya çıkabilir. Postoperatif dönemde nüks dekolmanların önde gelen sebebidir (1). PVR oluşumunda temel mekanizma hücre içi ve dışındaki uyarıcı faktörler arasındaki dengenin bozulması; enflamasyon, hücre proliferasyonu ve bunun sonucunda gelişen fibrozistir. Bu mekanizmayı asıl oluşturan retina pigment epitel hücresi (RPE) olsa da; makrofaj, fibroblast ve mikroglial hücreler ile transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-ß), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi moleküller rol oynar. TGF-β'nın β2 izoformu vitreusta bulunur. PVR'li gözlerde vitreusta 3 kat yüksek olduğu gösterilmiştir (2). RPE hücrelerinin mezenkimal fibroblastik hücrelere dönüşmesinde ve RPE hücrelerinde farklı yolaklar yoluyla tip I kollajen sentezini indükleyerek fibrozise neden olmada anahtar rol oynar (3, 4).

Retina dekolmanına cevap olarak hem RPE'nin, hem de glial hücrelerin değişime uğradığı, transfer ve prolifere oldukları gösterilmiştir (5). Vitreus içindeki bu transfer, proliferasyon ve farklılaşma büyük ölçüde vitreusta bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerden etkilenir (6). TGF-ß2 tarafından uyarılan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) bu süreçteki en önemli olaydır (3, 4). Alfa düz kas aktin (α-SMA), fibronektin, vimentin, N-kaderin, matriks metalloproteinazların (MMP) artan ekspresyonu ve transforme edilmiş RPE hücrelerinde E-kaderin, okludin ve klaudin ekspresyonunun azalması mezenkimal dönüşümün kanıtıdır (7).

Ek olarak, Snail, Twist ve ZEB-1 gibi mezenkimal transformasyona dahil olan transkripsiyon faktörlerinin TGF-β2 ile indüksiyonu bu kanıtı desteklemektedir (8).

Proliferatif vitreoretinopati tedavisi için günümüzde primer tedavi cerrahi olarak görülse de farklı tıbbi tedavi alternatifleri araştırılmaktadır ancak etkinliği kesin kanıtlanmış bir bilgi bulunmamaktadır. Anti-inflamatuar ajanlardan olan kortikosteroidler PVR tedavisinde ilk kullanılan ilaçlardır (9). Diğer deneysel tedavi çalışmalarında kullanılan ilaçlar; 5-fluorourasil (10), daunorubisin (11), retinoik asit (12), etoposid (12), takrolimus (12) ve çeşitli antioksidanları içerir. Flavonoidler, çeşitli yenilebilir bitkilerde yaygın olarak bulunan polifenollerdir ve hem in vivo hem de in vitro sistemlerde antioksidan, antiinflamatuar ve antitümör aktivitelerine sahip oldukları gösterilmiştir (13). Bu özellikler diğerlerinin yanı sıra, hücre döngüsünü inhibe etme, oksidatif stresi azaltma, apoptozu indükleme gibi etkilerinden kaynaklanır (14).

Tüm flavonoidler arasında apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon), bitkiler aleminde en yaygın olarak bulunanlardan ve en çok çalışılan fenoliklerden biridir. Asteraceae'ye ait bitkiler, bu bileşiğin ana kaynaklarıdır (14). Apigenin, farklı siklin bağımlı kinazların ekspresyonunu modüle ederek, G1/S-fazı veya G2/M fazı dahil olmak üzere farklı proliferasyon evrelerinde hücre döngüsünün durmasını indükler (15-17). Apigeninin, serbest radikal temizleme gibi oksidatif strese karşı savunma stratejisi olan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azalttığına inanılmaktadır (18). Rui Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, apigeninin insan retinal mikrovasküler endotel hücre kültüründe interlökin-1beta (IL-1β) kaynaklı oluşan E-kaderin membran geçirgenlik artışını bloke ettiği ortaya konulmuştur (19). EMT'de RPE morfolojik özelliklerini kaybeder ve mezenkimal benzeri şekil ve fenotip kazanır (20). Fenotipik değişiklikler zonula okludens-1 (ZO-1) ve E-kaderin gibi epitel belirteçlerinin azalmış ekspresyonu ve α-SMA, vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin artmış ekspresyonunu içerir (21). TGF-β2, PVR'li hastalarda vitreus, subretinal sıvı ve proliferatif membranlarda yoğun artış gösterir (22) ve skarlaşmada etkin bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu araştırmada TGF-β2 aracılı gelişen EMT'yi düzenleyen Snail, ZEB1, Twist ve NF-κB ile vimentin, fibronektin, E-kaderin, N-kaderin ve α-SMA ekspresyon düzeyleri Polymerase Chain Reaction (PCR) veya Western blot tekniği ile analiz edildi. Önerilen bu çalışmanın amacı, regmatojen retina dekolman (RRD) cerrahisi sonrası sık karşılaşılan PVR hastalığında apigenin uygulamasının EMT engelleyici etkinliğinin in vitro ortamda incelenmesi ve PVR tedavisinde kullanılabilirliğinin tespit edilmesidir.

GENEL BİLGİLER

RETİNA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Retina göz küresinin en iç tabakasını oluşturan ve nöroektodermden gelişen bir dokudur. Anatomik olarak santral retina (posterior) ve periferik retina (anterior) olarak iki kısımda incelenebilir. Anterior ve posterior retina ayrımı ekvatorun lokalizasyonuna göre veya vorteks venlerinin skleraya giriş yerine göre de yapılabilir. Ancak anatomik ekvator vorteks venlerinin skleraya girdiği bölgenin iki disk çapı önünde yer almaktadır.

Histolojik olarak retina, sensöriyal retina ve RPE olmak üzere iki bölüme ayrılır. Sensöriyal retina, altta RPE'ye optik sinir ve ora serrata (retinanın periferik kenarı) tarafından sıkıca bağlıdır. Ancak bu bağlantının dışında, sensöriyal retina ve RPE arasında genellikle subretinal adı verilen potansiyel bir boşluk bulunur. Retina dekolmanı, sensöriyal retinanın RPE tabakasından ayrılması durumunu ifade eder. Sensöriyal retina perifere doğru gidildikçe incelir. Ora serratada 0,1 mm, ekvatorda 0,2 mm, optik sinir yakında 0,56 mm'dir. Ayrıca makula merkezinde de incedir (0,1 mm). Sensoriyal retina ora serratada pigmentsiz siliyer cisim epiteli olarak, RPE ise pigmentli siliyer cisim epiteli olarak devam eder (23).

Histolojik olarak retina içten dışa 10 ayrı kat olarak incelenir (Şekil 1) (24).

1-İç limitan membran (retinayı vitreustan ayıran glial hücre lifleri)

2-Optik sinir lifleri katı (üçüncü nöron aksonları)

3-Ganglion hücreleri katı (üçüncü nöron ganglion hücrelerinin nükleusları)

4-İç pleksiform kat (Bipolar ve amakrin hücre aksonları ile ganglion hücrelerinin dendritlerini ve bunların sinapslarını içerir)

5-İç nükleer kat (bipolar hücreler, Müller hücreler, amakrin ve horizontal hücrelerin nükleusları)

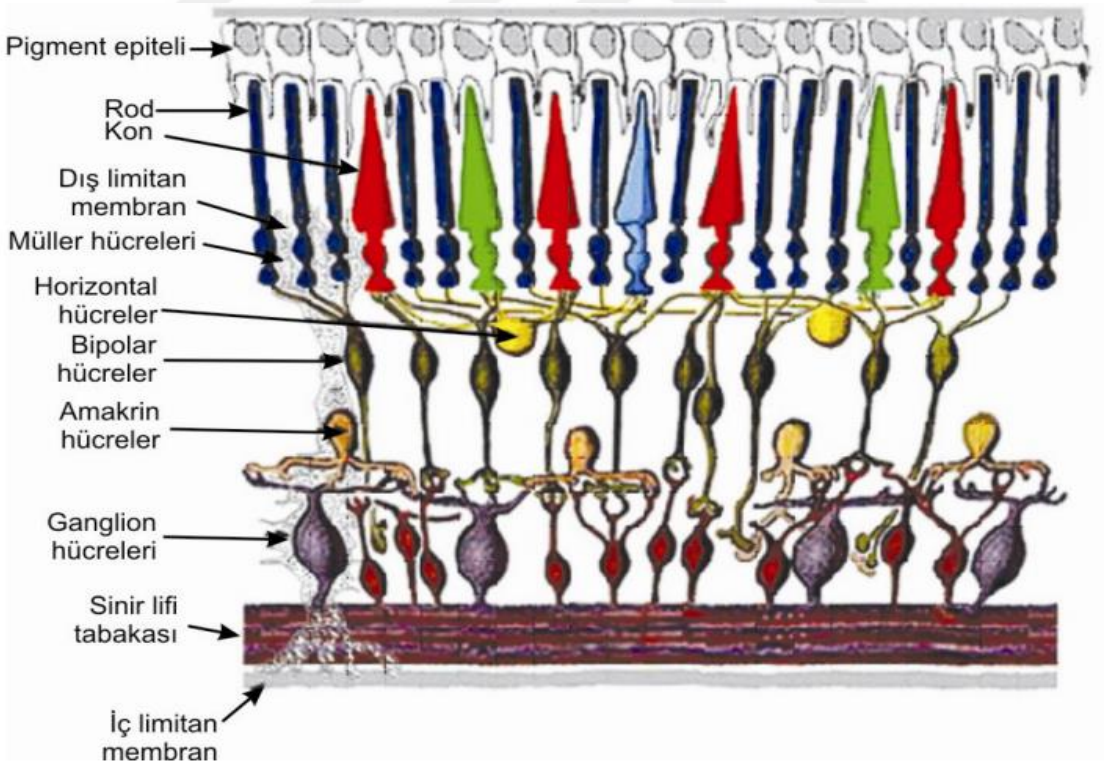
6-Dış pleksiform kat (Fotoreseptörlerin sinaptik cisimleri ile horizontal ve bipolar hücreler arası sinapsları içerir)

7-Dış nükleer kat (birinci nöronun yani koni ve basillerin hücre nükleusları)

8-Dış limitan membran (glial hücre uzantılarınca oluşturulan ve aralarından koni ve basillerin geçtiği tabaka)

9-Koni ve basiller (fotoreseptörler)

10-Retina pigment epiteli (Nöral retina ile koroid arasında bulunur)



Şekil 1. Retinanın histolojik kesiti (24)

Retina Pigment Epiteli

Hegzagonal hücrelerden oluşan tek katlı bir tabakadır ve periferde siliyer cismin pigmentli epitel tabakası olarak devam eder. RPE hücreleri tepe kısımlarında hem zonula okludens, hem de zonula adherens ile birbirlerine sıkıca bağlanmıştır ve dış KRB'yi oluşturur. Bununla birlikte fotoreseptörlerin dış segmentlerinin fagosite edilmesi, vitamin A metabolizması, ışık emilimi, su ve iyonları aktif bir şekilde subretinal boşluktan dışarıya pompalanarak subretinal bölgenin devamlı kuruluğunun sağlanması ve ısı değişiminin sağlanması RPE'nin diğer görevleridir (24).

Retina pigment epitel hücreleri, çeşitli sebeplerle KRB bozulduğunda vitreus boşluğuna geçerek patolojik bir şekilde çoğalır. Bu çoğalma sonucunda kontraktil membran yapıları oluşur. Bu yapılar, çekme kuvveti uygular ve retinada traksiyonel (fibrotik) retinal dekolmanın gelişmesine neden olabilir. Bu nedenle PVR patogenezinde önemli rol oynarlar (25).

Nörosensoryal Retina

1- Fotoreseptörler

2- Bipolar hücreler

3- Ganglion hücreleri

4- Amakrin ve horizontal hücreler

1-Fotoreseptörler:

Koni ve basiller sinir sisteminin son organı gibi olup, retinanın ışığa duyarlı hücreleridir. İç ve dış segmentleri bulunur. Dış segmentin etrafı mukopolisakkarit matriks ile çevrilidir ve RPE ile temas halindedir. Fotoreseptörlerin dış segmentleri ile RPE arasında hiçbir hücresel bağlantı bulunmaz (25). Basiller karanlık görmeden sorumludur; çapları 2–5 μm, boyları ise 100–120 μm'dir. Foveada hiç bulunmazlar ve sayıları perifere doğru hızla artar. Koniler ise renkli ve keskin görmeden sorumludur; boyları 65–75 μm, kalınlıkları 5–8 μm'dir (26).

2-Bipolar hücreler:

Bu hücreler radyal yerleşimli olup; dendritleri koni ve basiller ile dış pleksiform tabakada, aksonları ise amakrin ve ganglion hücreleri ile iç pleksiform tabakada sinaps yapar. Bipolar hücreler yatay veya fotoreseptör hücrelerinden gelen sinyalleri doğrudan veya dolaylı (amakrin hücreler ile) olarak ganglion hücrelerine iletir (26).

3-Ganglion hücreleri:

Görme yollarının 2.nöronlarıdır ve retinanın iç kısmında bulunurlar. Makulaya doğru gidildikçe ganglion tabaka sayısı artar, foveaya doğru tekrar azalır ve foveada ise tamamen kaybolur. Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir, dendritleri bipolar hücre aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar. Ganglion hücrelerinin aksonları sinir lifi tabakasını ve devamında optik siniri oluştururlar (26).

4-Amakrin ve horizontal hücreler:

Horizontal hücreler koni ve basillerin terminal genişlemelerinin yakınında bulunan multipolar hücrelerdir. Çok sayıda kısa ve bir adet uzun uzantıları bulunur ve bunlar retina yüzeyine paralel uzanır. Amakrin hücreler genellikle aksonsuzdur, yoğun sitoplazmaya ve parçalı nükleusa sahiptirler (26).

Nörosensöriyel tabaka ile RPE arasında anatomik olarak sadece ora serrata ve peripapiller bölgede yapışıklık vardır. Aralarındaki kalan boşluk subretinal alan olarak adlandırılır ve bu alan klinik olarak retina dekolmanına yol açması bakımından önemlidir (27).

Müller hücreleri retinanın destek yapısını oluşturmakta olup dış limitan membrandan (ELM) iç limitan membrana (ILM) uzanırlar (28). Diğer glial hücreler olan; astrositler, mikroglialar ve oligodendrositler ile birlikte retinanın destek ve beslenmesinde görev alırlar (25). PVR durumunda Müller hücreleri aşırı çoğalıp anormal davranarak dış ve iç limitan membranın içinden geçebilirler. Bu durum ise epiretinal ve subretinal membran oluşumuna sebep olabilir (28). ILM, optik disk dahil tüm retina yüzeyini kaplayan ve Müller hücrelerinin ayaksı çıkıntıları tarafından oluşturulan bir bazal membrandır. Yapısı optik disk ve fovea üzerinde, damarların yüzeyinde ve vitreus tabanında değişkenlik gösterir. Bu noktalarda ILM'nin vitreusa bakan yüzü genellikle düzdür, sinir liflerine bakan kısmı ise pürüzlüdür. Gunn noktaları ise ILM'nin bu noktalarda kalınlaştığı bölgelerdir. Bu noktalarda vitreus adezyonu sıktır (29).

Retina bölgeleri 3 bölümde incelenebilir;

Makula (Santral retina)

Makula, göz retinasının arka kutbunda üst ve alt temporal vasküler arklarla sınırlandırılmış ve optik sinirin temporal ve bir miktar inferiorunda bulunan kritik bir anatomik

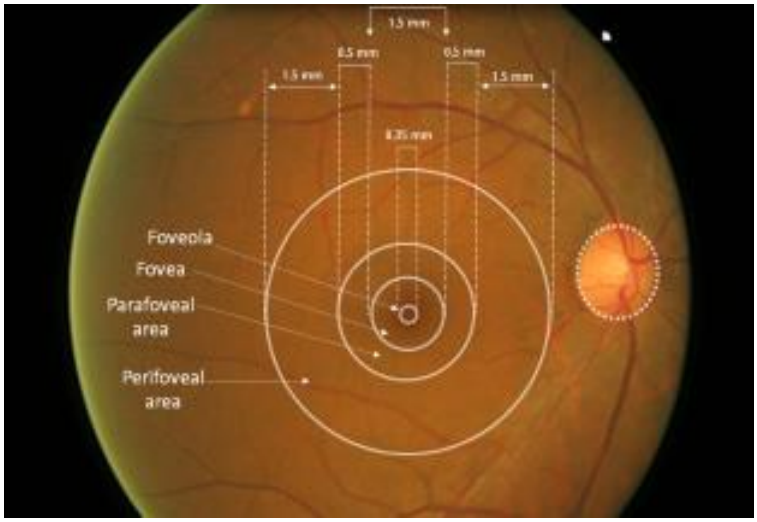
bölgedir. "Makula lutea" olarak bilinen sarı nokta, bu bölgede bulunan lutein ve zeaksantin adlı pigmentlerle belirginleşir. Bu pigmentler, makuladaki kromatik aberasyonları önleyerek renk doğruluğunu artırmanın yanı sıra antioksidan özelliklere sahiptir (30). Makula mikroskop altında incelendiğinde periferik retinadan ayırt edilmesini sağlayan iki katmanlı bir ganglion hücre tabakasına sahiptir. Ayrıca makulanın çapı, temporal vasküler arklar sınır olarak kabul edildiğinde 5,5 mm'dir (31). Umbo, foveola, fovea, parafovea ve perifovea makulayı oluşturmaktadır (25).

Fovea: Çapı yaklaşık 1,5 mm'dir ve iç nükleer tabakada bulunan ikinci ve üçüncü nöronlar dışa itilerek 22 derecelik konkavite oluşturulmuştur. Fovea bölgesinde iç pleksiform, gangliyon hücre tabakası ve sinir lifi tabakası bulunmamaktadır. Ayrıca, santral 0,57 mm'lik alandaki bölge sadece kon hücrelerinden oluşmaktadır. ILM kalınlığı ve vitreus yapışıklığına bağlı traksiyon, özellikle foveada en fazla hissedilmektedir (25).

Foveola: Fovea tabanı yalnızca konilerden oluşan bir alandır ve çapı 0,35 mm, kalınlığı ise 0,15 mm'dir. Bu bölge, kapiller yapı içermemektedir. İç nükleer tabakada bulunan kapillerler, 250-600 mm genişliğindeki avasküler zonu halka şeklinde çevreler (25).

Umbo: Foveolanın merkezi olup koni dansitesinin yüksek olması ile en keskin görmenin oluşturulduğu bölgedir. 0,15-0,20 mm çapındadır (25).

Parafovea: Fovea'yı çevreleyen bölge 0,5 mm genişliğindedir ve iç nükleer ile gangliyon hücre tabakalarında belirgin bir artış gösterir. Bu geniş zon içerisinde retina normal mimari yapısını sürdürür (25).



Şekil 2. Makulanın anatomik yapısı (32)

Ora Serrata

Ora serrata, retinanın ön ucunu oluşturan bir sınırdır ve periferik retina ile siliyer cisim arasında bulunur. Nazalde limbusa yaklaşık 5 mm, temporalde ise 7 mm mesafededir. Ora serrata, duyusal retinanın çok katlı yapısından aniden pigmentsiz siliyer epitele geçiş yaptığı bir bölgedir (33). Klinik açıdan önemi, vitreus tabanının ora serratanın 1,5 mm önüne ve 2-3 mm arkasına uzanmasıdır. Vitreus çekintisi genellikle vitreus tabanının arka kenarında meydana gelir ve bu bölgede retinal yırtılmalara neden olabilir (34).

Periferik Retina

Bu bölgede, temel olarak basil hücreleri olarak adlandırılan fotoreseptörler bulunur. Koniler, merkezi retinadakilere göre daha kalındır ve ganglion hücreleri de burada daha geniş ve tek katlı bir yapıya sahiptir (25).

RETİNA KAN DOLAŞIMI

Retinanın dış plexiform katına kadar uzanan kısmını koriokapillaris ile koroidal dolaşım, iç bölgesini ise santral retinal arter ve dalları besler. Santral retinal arter, oftalmik arterin ilk dalıdır ve lamina kribrozayı geçerken damar duvarı kalınlığının yarı yarıya azaldığı görülür. Retina içinde üst ve alt majör dallardan başlayarak temporal ve nazal dallanmalar gözlenir ve bunlar arterioldür. Retina kapillerleri çoklu arterioler bağlantı içerdiği için bir besleyici damarın

kapanması durumunda kapiller dolaşım kesilmez. Retina kapillerleri, sinir lifleri katında yüzeyel ağ ve iç nükleer katta intraretinal ağ oluşturarak birbiriyle ilişkilidir. Retina venleri genellikle arterleri takip eder ve santral retinal ven de arterin girdiği yerden optik siniri terk eder (35).

VİTREUS ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Vitreus glob hacminin büyük bir kısmını, yaklaşık olarak 4/5'ini kaplar. Vitreusun ağırlığı yaklaşık 4 gramdır. Refraktif indeksi ise 1,334'tür. Bu özellikleri sayesinde vitreus 300-1600 nm arasındaki dalga boylarındaki ışık demetlerini geçirir; bu aralık genellikle görünür ışığın %90'ını içerir (36). Vitreusun pH değeri 7,50'dir. Vitreusun büyük çoğunluğu (%99) su içerir; geri kalan kısım ise hyalüronik asit, kollajen ve iyonlardan oluşur. Gençlerde vitreusun %80'i jel, %20'si sıvı yapıdadır. Ancak yaşlandıkça vitreusun sıvı hacmi %50'ye kadar ulaşabilir (27).

Vitreus ile retina arasındaki sürekli bağlantılar genellikle vitre tabanı ve optik sinir başında son derece sağlamdır. Bununla birlikte bu bağlantılar göz içinde lensin arkasındaki hyaloid fossa periferinde, pars plana silier epiteli yüzeyinde, retina damarları ve makula düzleminde daha zayıf olma eğilimindedir (37).

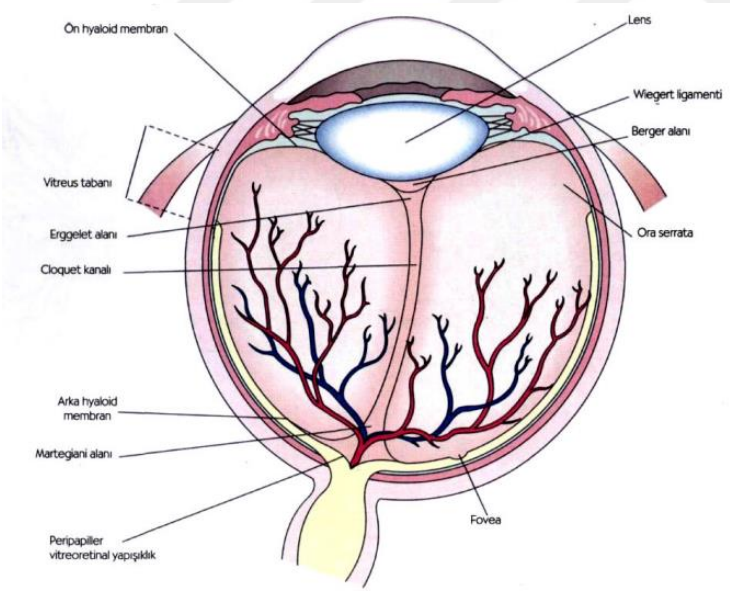
Vitreus cisminin dış kısmına kortikal vitreus adı verilmekte olup, bu katmanın kalınlığı yaklaşık 100 µm'dir (Şekil 3) (34). Kortikal vitreus, vitreusun lense ve retinaya komşu olan dış bölgesini ifade eder (25). Ön hyaloid yüz veya membran, kortikal vitreusun ora serrata önündeki kısmını temsil eder ve buradan ora serrataya doğru uzanır. Ön hyaloid arka periferik lens yüzeyine Wiegert ligamentleri aracılığıyla sıkıca yapışıktır. Lensin arka yüzeyi ile ön hyaloid yüzü arasındaki boşluğa Berger alanı denir. Arka kortikal vitreus, ILM ile birleşir ve arka hyaloid membranı oluşturur. Bu arka hyaloid, optik sinire yapışmaz ve aralarındaki potansiyel boşluk Martegiani alanı olarak adlandırılır (34). Zamanla ve yaşla, optik sinirin çevresindeki sıkı bağlantılar zayıflayabilir ve optik sinirden ayrılabilir. Bu duruma posterior vitreus dekolmanı (PVD) denir. Tamamen ayrılan bu halka şeklindeki vitreusa ise "Weiss halkası" adı verilir (36).

Vitreusun merkezi bölgesi santral vitreus olarak adlandırılır ve bu bölge daha düşük yoğunlukta yapıya sahiptir. İçinde daha az kolajen fibril bulunur. Fetal dönemde, lensten optik sinir başına doğru uzanan hyaloid kanal (Cloquet kanalı) içindeki hyaloid arter, doğumdan hemen sonra kaybolur ancak bu kanal yaşam boyunca varlığını sürdürür. Ara sıra, arterin lensin

arka yüzüne yapışık bir güdük ucu vitreusta dalgalanabilir. Bu yapışma noktasına "Mittendorf lekesi" denir ve oftalmoskopide siyah bir leke olarak gözlemlenebilir (25).

Vitreusun iki temel işlevi bulunmaktadır. Birincisi, göze gelen kuvvetleri emerek çevre dokulara dağıtmak; ikincisi ise göz için şeffaf bir ortam sağlamaktır. Vitreusun fiziksel yapısı, jel kıvamında olan hidrate hyalüronik asit molekülleri ve kollajenden oluşmaktadır (38).

Vitreus içindeki KRB ve kan-aköz bariyerin bozulması, çevreye fibrin ve mitojenlerin salınımına neden olarak patolojik olayların başlamasına sebep olabilir. Bu durum anormal yara iyileşmesi sürecine yol açabilir ve traksiyonel membranlar ile PVR gibi patolojik durumların gelişimine katkıda bulunabilir. Normal vitreus özellikleri membran oluşumunu genellikle engeller. Vitreus içinde bulunan inhibitör faktörlerin, endotel hücreleri, miyofibril hücreleri ve fibroblastların aşırı çoğalmasını önlediği bilinmektedir. Bunlardan biri olan FGF bağlayan protein, normal vitreusta FGF'yi antagonize ederek fonksiyon gördüğü gösterilmiştir. Kısacası PVR'nin gelişimi için normal vitreusun değişikliğe uğraması gerekir (38).



Şekil 3. Vitreus anatomisi (34)

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ (PVR)

Proliferatif vitreoretinopati subretinal boşluk, retina yüzeyi ve vitreus içine hücre göçü ve proliferasyonu ile karakterizedir. Bu durum retinanın her iki yüzeyinde membran oluşumuyla

sonuçlanan aşırı ve anormal bir yara iyileşmesini temsil eder. Genellikle uzun süren RD ve dekolman cerrahisi sonrasında ortaya çıkar. Kollajen üretimi ve kollajenöz membranlardaki hücre aracılı kontraksiyon, RD'nın ve buna bağlı görme kaybının nedenidir. Hücre proliferasyonu ise retinada oluşan hasar, KRB'deki bozulma ve düzenleyici büyüme faktörleri arasındaki etkileşimle ilişkilidir. PVR'nin etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için bu hastalığın oluşum sürecinin iyi anlaşılması gereklidir (39).

PVR patogenezi 5 evrede incelenebilir:

Evre 1: Vitreoretinal yapıların bütünlüğünün bozulması

Klinik olarak anlamlı bir PVR'nin oluşabilmesi için, tam kat bir retinal yırtık ve vitreus boşluğuna RPE hücrelerinin salınımı gerekmektedir (33). Zira ILM hücresel migrasyonu engeller. Ancak retinal yırtık meydana geldiğinde, retinanın bütünlüğü bozulduğu için çıplak kalan RPE hücreleri, hem aktif migrasyon hem de intraoküler sıvı migrasyonu yoluyla vitreus boşluğuna girer. Bu nedenle, ILM ve KRB üzerinde meydana gelen hasarın, PVR'nin patogenezinde kritik bir ilk adım olabileceği öne sürülmüştür (33, 40, 41). Ayrıca, ILM'nin tahrip olması, astrositlerin iç retinal yüzeyde birikmesine neden olur (42).

Evre 2: Hücre migrasyonu

Vitreoretinal yapıların bütünlüğü bozulduğunda ve dolayısıyla KRB zarar gördüğünde serumdaki fibronektin, platalet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), TGF-ß, IL–1, IL-6, IL-8, FGF gibi birçok sitokin vitreusa geçer. Bu faktörler arasında özellikle fibronektin, RPE hücreleri için kemotaktik etkiye sahip olup, RPE hücre migrasyonunu teşvik eder (43, 44). Ayrıca, fibronektin hücresel yapılanmada önemli rol oynayan bir faktördür (44).

Evre 3: Hücre proliferasyonu

Normal koşullarda, RPE hücreleri ve glial hücreler dinlenme fazında bulunur ve aktif olarak çoğalmazlar. Ancak termal veya mekanik bir hasara yanıt olarak, bu hücreler ve fibroblastik elemanlar hızla çoğalarak kontraktil ve opak membranların oluşumuna neden olurlar (40).

RPE hücreleri ve glial hücrelerin çoğalmasında önemli bir rol oynayan başlıca faktörler PDGF, TGF-ß (en önemli) ve FGF'dir. PDGF, bu bölgedeki bağ dokusu makrofajları ve KRB'nin bozulmasına bağlı olarak serumdan kaynaklanmaktadır (45). TGF-ß'nin kaynağı RPE hücreleridir. PVR'li gözlerden alınan vitreus sıvılarında, normal gözlerden alınan örneklerle

karşılaştırıldığında TGF-ß düzeyinin üç kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. TGF-ß'nin yara iyileşmesinde fibrozisi uyardığı, özellikle RPE hücreleri aracılığıyla kollajen ve fibronektin sentezini teşvik ettiği belirtilmektedir (46).

Evre 4: Hücre dönüşümü ve kontraksiyonu (membran kontraksiyonu)

RPE hücreleri çoğaldıktan sonra fibroblastlara dönüşürler. Bu dönüşümün sorumlusu, RPE hücrelerinin ekstrasellüler matriks bileşenleriyle (özellikle kollajen ve bazı durumlarda fibrin) temas etmesidir. RPE hücrelerinden türeyen bu fibroblastlar, ayak benzeri uzantılara sahiptir ve çevrelerindeki kollajene tutunarak kontraksiyona sebep olurlar.

Bu süreçte sınırlı sayıda RPE hücresi vitreus jelini kontrakte edebilir ve traksiyonel kuvvet uygulayabilir. RPE hücrelerinin kontraksiyonunun retinaya ve vitreusa etkisinin nedeni, ekstraselüler adeziv glikoprotein olan fibronektin varlığına bağlıdır. Bu protein, bağ doku ile hücreler arasında bir köprü görevi görerek bu etkiyi ortaya çıkarır (44).

Evre 5: PVR membranlarının stabilizasyonu

Retina pigment epitel hücrelerinden türeyen fibroblastlar ve bölgedeki bağ doku makrofajları, ekstrasellüler matriksi ve skar dokusunu sentezlerler. Bu skar dokusu yeni oluşan membranlar olarak belirginleşir ve vücudun diğer bölgelerindeki skar dokusu ile benzerlik gösterir. Kollajen gibi fibröz yapı proteinleri, laminin, fibronektin, vitronektin, tenaskin gibi adeziv glikoproteinler ve proteoglikanları içerir.

Preretinal membranların immünohistokimyasal incelemesinde, tip I, II, III ve IV kollajen tiplerine rastlanmıştır (47, 48). Kollajen PVR membranının temel yapı taşını oluşturur (43). Ayrıca, kollajen PVR membranlarının olgunlaşmasını, membran iskeletinin stabilizasyonunu ve gerilme direncini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda RPE hücre migrasyonu ve metaplazisini de teşvik edebilir (49).

Fibronektin hücresel yapışma, migrasyonu teşvik etme ve hücre iskelet proteinlerinin sentezini başlatma yeteneğine sahiptir. Bunun yanı sıra, fibronektin mekanik olarak hücreler arası matriksin stabilizasyonunda rol oynar (50).

PROLİFERATİF VİTREOPATİ'NİN SINIFLANDIRILMASI

Proliferatif vitreoretinopati sınıflandırmasında, temel rol oynayan en önemli faktörler lokalizasyon ve epiretinal veya subretinal proliferasyonun yaygınlığıdır. İlk PVR

sınıflandırması 1983 yılında Amerika Retina Birimi Terminoloji Komitesi tarafından yapılmıştır (Tablo 1) ve günümüzde bazı eksikliklere rağmen pratik olması nedeniyle geniş bir kullanıma sahiptir (51). Ancak sınıflandırmada retina yırtıklarının konumu ve sayısı, vitreoretinal traksiyonun lokalizasyonu, vitreus tabanının kontraksiyon derecesi gibi önemli faktörlerin göz ardı edildiği belirtilmiştir, özellikle ön PVR dikkate alınmamıştır. Bu yüzden sınıflandırma Silikon Çalışma Grubu (SÇG) tarafından PVR'nin anterior (ön) ve posterior (arka) formlarını içerecek şekilde revize edilmiştir. SÇG'nin sınıflandırmasında, retinal huni şekli göz ardı edilmiş ve bunun yerine üç farklı proliferasyon tipi olan yaygın, fokal ve subretinal proliferasyonlar tanımlanmıştır. Ayrıca orijinal sınıflandırmadaki A ve B evreleri değiştirilmemiştir (Tablo 2 ve 3) (52-55).

Evre A veya minimal PVR'de, vitreus içinde pigment birikimi nedeniyle karakterize edilen pigmentli hücre proliferasyonu mevcuttur. Bu durumu birçok hastada tanımak zordur. Evre B veya orta derecede PVR'de, retina yüzeyinde kırışıklıklar oluşur ve retina yırtıklarının kenarları bükülür veya düzensiz hale gelir (Şekil 4). Evre C'de, tam kalınlıkta sabit retinal katlantılar meydana gelirken; Evre D'de bu sabit retinal katlantılar dört kadranı da kaplar. İlerleyen aşamalarda, fundus görüntüsü kapalı huni şeklini alır ve optik sinir başı gözlemlenemez (54, 55).

Tablo 1. Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi'ne göre PVR sınıflandırması

PVR EVRESİ	BULGULAR
A	Vitreus bulanıklığı ve pigment kümelenmesi
B	Retina yüzeyinde kırışıklık, sertleşme Yırtık kenarının kıvrılması Retina damarlarında tortuosite
C	Tam kalınlıkta sabit retinal katlantı C1: bir kadranda C2: iki kadranda C3: üç kadranda
D	Dört kadranda sabit retinal katlantı D1: geniş huni D2: dar huni D3: kapalı huni (optik sinir başı görülemez)

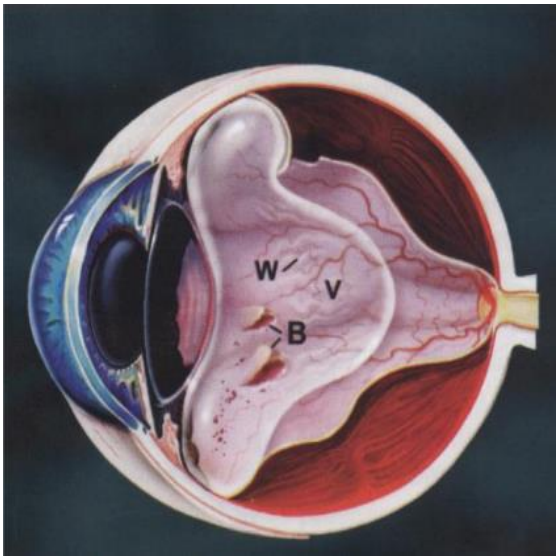
Tablo 2. Silikon Çalışma Grubu'na göre PVR sınıflandırması

Evre	Yayılım	Klinik Özellikler
A		Vitreus bulanıklığı (haze) Vitreusta pigment kümeleri (clump) İnferior retinada pigment grupları (cluster)
B		Dış retinal yüzeyde kırışıklık Retinal yırtık kenarında kıvrılma Retinada rijidite (stiffness) Damarlarda kıvrım artışı Vitreus hareketlerinde azalma
C		
CP*	P1: 1 kadran (1-3 saat) P2: 2 kadran (4-6 saat)	Ekvatorun gerisinde yerleşmiş; Fokal, diffüz ya da sirkümferensiyal tam kat katlantılar Subretinal bantlar
CA**	P3: 3 kadran (7-9 saat) P4: 4 kadran (10-12 saat)	Ekvatorun önünde yerleşmiş; Fokal, diffüz ya da sirkümferensiyal tam kat katlantılar Subretinal bantlar Bantlarla birlikte vitreus kondansasyonu

CP*: Evre C, Posterior, CA**: Evre C, Anterior

Tablo 3. Silikon Çalışma Grubu'na göre PVR evrelendirmesi

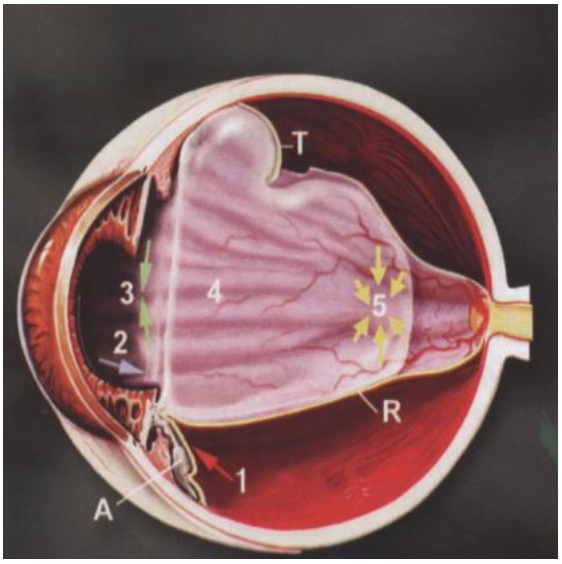
Tipi	Tutulum	Yerleşim	Klinik
Tip 1	Fokal	Posterior	Vitreus tabanının arkasında yıldız şeklinde Katlantılar
Tip 2	Diffüz	Posterior	Vitreus tabanının arkasında birbiriyle devamlılık gösteren yıldız şeklinde katlantılar
Tip 3	Subretinal	Posterior/ Anterior	Retina altında proliferasyon Disk yakınında halka şeklinde bantlar Güve yeniği görünümünde tabakalar
Tip 4	Çevresel	Anterior	Arka vitreus tabanı boyunca kontraksiyonla beraber retinanın santrale çekilmesi Periferal retinada gerginlik Arka retinada radyal katlantılar
Tip 5	Öne Çekilme	Anterior	Proliferatif doku nedeniyle vitreusun öne çekilmesi Silier prosesler gerilmiş yada membranla örtülmüş olabilir. İris retraksiyonu bulunabilir.



Şekil 4. Evre B PVR (W) iç retinal yüzeyde kırışıklık, (B) düzensiz kenarlarla birlikte retinal yırtıklar, (V) retinal damarlarda tortuosite (56).

Silikon Çalışma Grubu sınıflandırılmasında Evre D çıkarılmış, Evre C'ye ise PVR'nin yerleştiği yeri belirtmek üzere anterior ve posterior ayrımı eklenmiştir. Bunun dışında yaygınlığını belirtmek üzere de kadranlar yerine saatler (saat 1-12) kullanılmıştır (Tablo 2) (53). Evre C PVR sınıflaması içerdiği kontraksiyon, büzüşmenin tipine göre yapılabilir. Posterior PVR 3 tip kontraksiyonla karakterizedir. Tip 1 ya da fokal kontraksiyonda tek ya da birden fazla fokal retinal kontraksiyona neden olan odaklar mevcuttur. Her merkezden retinal katlantılar radyal tarzda uzanır (39, 54). Diffüz posterior kontraksiyon (tip 2) ise birbiriyle devamlılık gösteren retinal katlantılar ve bunların neden olduğu yaygın posterior retinal kontraksiyonla karakterizedir. Posterior sirkumferensiyal kontraksiyon radyal tarzda ora serrataya doğru uzanarak huni şeklinde bir yapıya neden olur (39).

Tip 3 veya subretinal kontraksiyon, anterior ya da posteriorda yerleşebilir ve subretinal PVR ile karakterize olup çeşitli formlara bürünebilir. Disk etrafında dairesel büzüşme yani 'napkin ring' veya 'peçete halkası' olarak adlandırılan bir görsel özellik ortaya çıkar. Bununla birlikte, subretinal dokuların neden olduğu bir başka belirgin özellik de 'clothes line' olarak bilinen çizgisel katlantılardır (39).



Şekil 5. PVR'nin anterior ve posterior komponentleri, (1) anteroposterior traksiyon; vitreus tabanının posterior kenarının anteriora yer değiştirmesi, (2) irisin posteriora retraksiyonu, (A) vitreus tabanının anteriora sirkumferensiyel traksiyonu, (3) vitreus tabanının posterior kenarının halka oluşturması, (4) retinanın radial foldları, (5) proliferatif vitreus membranlarının sebep olduğu anterior perpendiküler traksiyon, (R) huni şeklinde retina dekolmanı, (T) retinal yırtık (56).

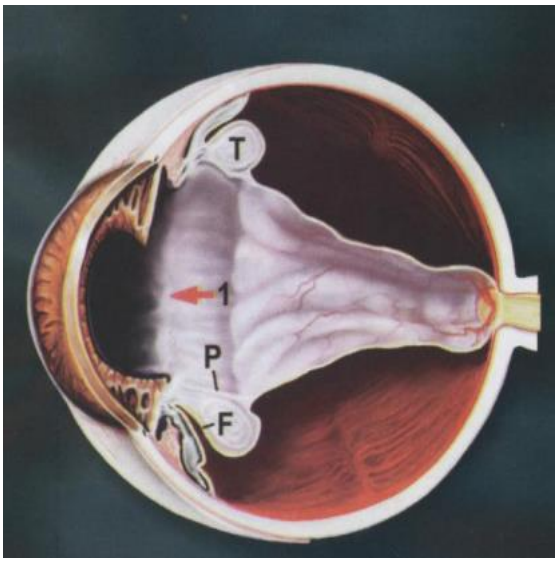
Retinanın ön kısmında meydana gelen çekme olayı tip 3, 4 ve 5 olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama kontraksiyonun vektöryel yönüne dayanmaktadır. Her tip primer vektöryel kuvvetin yanı sıra diğer vektörlerin kombinasyonuyla belirli karakteristik örnekleri içermektedir (39).

Tip 4 veya sirkumferansiyal kontraksiyon, retinanın ön kısmında diffüz bir çekme ile ortaya çıkar. Bu durumda retinada posterior hyaloidin yapışma yeri hizasında sirkumferansiyal tarzda düzensiz katlanmalar meydana gelir. Aynı zamanda membranın posterior kısmında optik diske doğru uzanan radyal retinal katlantılar bulunur. Ek olarak gelişen başka traksiyon, retina yüzeyine dik olarak başlar ve vitreusun merkezine doğru uzanarak anterior retinanın vitreus tabanına çekilmesine neden olur. Tip 4 PVR'de anterior retina genellikle düzleşmiş ve içe çekilmiş bir durumdayken, posterior retinada radyal katlantılar belirgin hale gelir. SÇG'nin yaptığı sınıflama içinde bulunan ve tip 4 kategorisine uyan bir diğer PVR türü "perpendiküler kontraksiyon" olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda arka hyaloidin vitreus tabanının arka kenarına uyguladığı çekinti nedeniyle retinada düz sirkümferensiyal bir katlanma meydana gelir. Bu tip PVR'de de anterior retina düzleşir ve içe çekilirken, posterior retinada radyal katlanmalar gözlemlenir. Bu PVR şekli vitrektomi ameliyatlarından sonra da ortaya çıkabilir.

Buradaki neden posterior hyaloidin tam olarak çıkarılmaması neticesinde periferik uçlarının halka şeklinde kontrakte olmasıdır (39, 54).

Vitreus tabanının arka kenarı yerleşim bakımından farklılık gösterebilir. Bu yerleşim yeri PVR durumundaki prognozu etkiler. Eğer posterior hyaloid ora serrataya yakın bir şekilde arka yerleşim gösteriyorsa bu durumda oluşan membranların temizlenmesi zor olabilir ve bu nedenle ameliyat sonrasında tekrarlamalara neden olabilir. Ayrıca posterior yerleşimden dolayı skleral çökertme ile yeterli gevşeme elde etmek zor olabilir (39).

Tip 5 kontraksiyon retinanın öne doğru yer değiştirmesi olarak adlandırılır. Bu durum genellikle vitrektomi sonrasında veya penetran yaralanmaların ardından ortaya çıkar, bazen uzun süreli retina dekolmanlarında da görülebilir. Retinanın öne doğru kayması vitreus tabanının kontraksiyonu ile meydana gelir. Bu durumun temelinde vitrektomi sırasında tam olarak temizlenememiş vitreus yüzeyinde yerleşen ve hücrelerin çoğalmasıyla oluşan bir kontraksiyon bulunur. Posterior vitreus tabanı anterior yapışma noktasına doğru dekole edilmiş retinayla birleşir. Proliferatif dokunun silyer cisim proseslerine yapışması ve arkaya doğru çekilmesi durumunda hipotoni gözlenebilir (39, 54).



Şekil 6. Evre C Tip 5 kontraksiyon (1) vitreus tabanının anteriora yer değiştirmesi, (P) proliferatif dokunun vitreus tabanının posterior kenarını anteriora çekmesi ve silyer cismin pars plikatası ve irisin posterior yüzeyi ile birleşmesi, (T) anterior fold, (F) sirkumferensiyal fold (56).

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ'NİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Proliferatif vitreoretinopati tespit edilen gözlerde, en sık rastlanan etiyolojik faktör genellikle geçmişte geçirilmiş RRD cerrahisidir. Bu cerrahi müdahale, prolifere olan hücrelerin vitreusa yayılmasına ve KRB'nin bozulmasına neden olarak PVR oluşumunu kolaylaştırabilir (57). Ayrıca postoperatif koroid dekolmanı, aşırı kriyopeksi ve lazer fotokoagülasyon gibi cerrahi prosedürler de benzer mekanizmalarla PVR gelişimine sebep olabilir (46).

Dekolman PVR oluşumunda kritik bir risk faktörüdür. Ameliyat öncesi risk faktörleri arasında dev yırtık, geniş veya çok sayıda yırtık, afaki, preoperatif koroid dekolmanının varlığı, vitreus hemorajisi gelişen RRD veya traksiyonel retina dekolmanı (TRD), tekrarlayan veya kronik posterior üveitli gözlerdeki RD'ler yer almaktadır (5, 52, 58). Postoperatif PVR oluşumunu etkileyen risk faktörleri arasında preoperatif PVR derecesi, ameliyat sırasında veya sonrasında vitreus hemorajisi, yoğun kriyoterapi, diatermi veya fotokoagülasyon uygulamaları, tekrarlayan cerrahi müdahaleler, subretinal sıvı drenajı sırasında sıvı kaybı, tespit edilemeyip kapatılamayan retinal yırtıklar, steril hava veya SF6 kullanımı ve postoperatif koroid dekolmanı yer almaktadır. PVR ile ilişkili intraoperatif faktörler arasında steril hava enjeksiyonu PVR riski açısından tartışmalıdır. Ayrıca tüm retinal yırtıkların cerrahi başarıyla kapatılmasına rağmen postoperatif PVR gelişiminin tamamen önlenebileceği garantisi olmadığı ve oluşum sürecinin devam edebileceği önemli bir noktadır (5, 52, 58).

Proliferatif vitreoretinopatinin risk faktörleri anlaşılmalı ve bu nedenle yüksek riskli hastaların preoperatif olarak tanımlanarak en uygun retinal dekolman cerrahisi seçilmelidir. Aynı zamanda, bu gözlerde postoperatif PVR'yi önlemeye yönelik etkisi kanıtlanmış farmakolojik tedavilerin kullanılması da büyük bir öneme sahiptir.

BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ

Büyüme faktörleri, hücresel işlevleri jukstakrin, parakrin ve otokrin mekanizmalarla düzenler. Bir hücreyi etkileyebilmek için büyüme faktörlerine reseptör sahip olup olmaları önemlidir. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde özgün bir tepki oluşturan bir dizi sinyal meydana gelir. Bu etki genellikle tirozin kinaz veya G proteini ile eşleşen transmembran glikoproteinlerin uyarılmasıyla sağlanır. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri

deoksiribonükleik asitin (DNA) sentez fazını uyarır ve ardından hücre çoğalması gerçekleşir (59).

Büyüme faktörlerinin PVR patogenezinde tüm aşamalarda düzenleyici rolleri olduğu düşünülmektedir. KRB bozulduktan sonra vitreus içeriği değişir ve serum komponentleri bu değişime eklenir. Serum ve PVR gelişen gözlerin vitreusu RPE hücreleri için çekici bir kemoatraktandır. PVR gelişen gözlerin vitreusunda TGF, FGF, EGF, Insülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) gibi büyüme faktörleri yüksek düzeyde bulunmaktadır. Ayrıca, PVR membranlarında PDGF, FGF, EGF, IGF-1 seviyeleri de yüksek düzeyde tespit edilmiştir (39).

Epidermal growth faktör (EGF): 53 amino asitten oluşan bir moleküldür. Bu molekül birçok dokuda yaygın olarak bulunur ve özellikle trombosit degranülasyonu sırasında salınır. EGF'ye ait reseptörler çoğu hücre tipinde bulunur. Bu reseptörlerin en yüksek yoğunluğu genellikle epitel hücrelerinde görülse de endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi diğer hücre tiplerinde de mevcuttur. EGF reseptörü, 175,000 dalton ağırlığında bir membran glikoproteini olup bu reseptörde EGF'nin yüksek ve düşük afinite ile bağlandığı bölgeler bulunmaktadır. EGF'nin reseptöre bağlanması, tirozin kinazın aktive olmasına neden olur. Bu aktivasyon, fibronektin, hyaluronik asit gibi ekstraselüler matriks moleküllerinin salgılanmasını tetikler ve kontakt inhibisyonunun olmadığı hücrelerde DNA sentezini uyararak çoğalmaya yol açar (60).

Fibroblast Growth Faktör (FGF): FGF ailesi ortalama 18 kilodalton ağırlığındadır ve 20'den fazla heparine bağlanabilen bir protein grubudur. Bu aile birçok dokuda çoğalma, farklılaşma, göç, ekstraselüler matriks (ECM) depolanması ve anjiogenez gibi olayları düzenleyen bir rol oynar. Bu proteinler parçalanmadan korunmak için düşük afiniteli heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanır. Yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörleri ile hücre yüzeyinde etkileşime girerler. Asidik ve bazik FGF epitel, endotel ve stroma hücrelerinde mitojenik etki gösterir. PVR patogenezinde diğer büyüme faktörleri ile birlikte özellikle b-FGF'nin önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (61, 62).

Transforming Growth Faktör-β (TGF-ß): Trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik, böbrek gibi farklı dokulardan izole edilen TGF-ß ailesi üyeleri olan TGF-ß1, TGF-ß2 ve TGF-ß3 yaklaşık 25 kilodalton ağırlığında polipeptidlerdir. Bu polipeptidler özellikle trombositlerin alfa granüllerinde yoğun miktarda bulunur ve hasar gören bölgelere degranülasyon yoluyla salınır. Aynı zamanda makrofajlar tarafından kendi üretimini otokrin yolla düzenleyerek etkileşime girerler. TGF-ß ayrıca monositleri uyararak büyüme faktörleri

olan FGF, PDGF, Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α), IL-1 gibi faktörlerin salınımını sağlar. Aynı zamanda TGF-ß makrofajlar için kemotaktiktir; fibroblast kemotaksisini ve proliferasyonunu teşvik eder. Bu molekül aynı zamanda kollajen sentezini en güçlü şekilde uyarıcı olarak bilinir ve kollajenazı aktive eden diğer faktörlerin etkisini azaltır. TGF-ß fibroblastlar aracılığıyla fibronektin ve proteoglikan sentezini uyarırken, keratinositlerde fibronektin sentezini teşvik eder (63-65).

Platelet Derived Growth Faktör (PDGF): 35,000 dalton ağırlığındaki bir glikoprotein olup iki disülfit bağıyla bağlanmış dimer yapısına sahiptir. A ve B olarak adlandırılan bu üniteler %56 oranında benzerlik gösterir. AA, AB ve BB olarak ifade edilen faktörün her üç formunun biyolojik aktiviteleri temelde benzerdir; ancak B ünitesi mitojenik aktivitesi biraz daha güçlü olabilir. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler gibi çeşitli hücreler PDGF benzeri büyüme faktörlerini salgılayabilirler. PDGF, endotel hücreleri ve fibroblastların göçünü uyarır ve aynı zamanda fibroblastların TGF-ß'ya verdiği çoğalma cevabını artırır. Fibronektin varlığında PDGF-AA ve -BB epitel hücrelerinin kemotaksisini teşvik eder (59, 63, 65, 66).

Insülin Like Growth Faktör-1 (IGF-1): IGF-1, 70 aminoasitten oluşan ve 7649 dalton ağırlığında bir polipeptid zinciridir. Bu polipeptid spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücre yüzeyinde etki gösterir. IGF-1'in salınımı büyüme hormonu (GH) tarafından karaciğer ve perifer dokulardan gerçekleştirilir. Ancak doku hasarına cevap olarak IGF-1'in lokal salınımı da mevcuttur. Bu lokal salınım doğrudan veya EGF, FGF, PDGF gibi diğer büyüme faktörlerinin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşebilir (67, 68).

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ'NİN CERRAHİ TEDAVİSİ

Proliferatif vitreoretinopatide cerrahi tedavinin hedefi retinal dekolman cerrahisiyle benzer şekilde retinal yırtıkların onarımı ve traksiyonların hafifletilmesidir. Skleral çökertme, epiretinal membranların soyulması, vitreus tabanının temizlenmesi ve subretinal membranların kesilmesi veya çıkarılması gibi cerrahi prosedürler uygulanır. İleri evre PVR'li gözlerde intravitreal gaz veya silikon yağı kullanılarak tamponad ve retinotomi veya retinektomiler gibi prosedürler de gerekebilir (69).

Genellikle hafif ve orta derecedeki PVR'li olgularda yırtığın bulunması ve skleral çökertme ile başarılı bir tedavi elde edilebilir. Grade B, C1 ve hatta C2 PVR'li gözlerde skleral

çökertme retinayı stabilize etmek için yeterli olabilir (70, 71). Ancak ciddi PVR'li (evre C ve üstü) gözlerde vitrektomi, membranektomi ve intraoküler tamponad gibi daha kapsamlı cerrahi prosedürlerin kullanılması gerekebilir. Bütün bu müdahalelere rağmen retina yatıştırılamazsa bu durumun temel nedeni ya membranların tam olarak temizlenememiş olması ya da retinada bir kısalmanın mevcut olması olabilir. Bu durumlarla başa çıkmak için gevşetici retinotomi ve retinektomiler gibi cerrahi yaklaşımlar uygulanabilir. Retina hala yatıştırılamıyorsa, daha az agresif diğer cerrahi tekniklere rağmen başarılı bir sonuç alınamamışsa, bu cerrahi tekniklere başvurulmalıdır (72).

Ağır PVR ile komplike RRD olgularının tedavisinde kullanılan retinotomi ve retinektomi işlemlerinden retinotomi; retinada küçük bir delik oluşturularak yapılan bir kesilme işlemi, retinektomi ise; retinanın kesilerek çıkarılmasıdır. Retinotomi, subretinal sıvı drenajı için retinada oluşturulan küçük bir delik aracılığıyla gerçekleştirilir ve amacı masif retinal traksiyonu rahatlatmaktır. Retinektomi ise, retinal flebin sınırlı eksizyonundan periferik fibrotik retinanın tamamen çıkarılmasına kadar değişebilen bir işlemdir. Son yıllarda, pars plana vitrektomi (PPV) prosedürü, RRD tedavisinde giderek artan sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak evre C PVR olguları ve anterior retinal kısaltma gerektiren durumlarda retinotomi ve retinektomi (R/R) işlemleri daha yaygın bir kullanım kazanmıştır (73).

Sonuç olarak, tüm bu tedavi yöntemleri dikkate alınsa ve uygulansa da PVR'li gözlerde en iyi şartlarda bile başarı oranları genellikle yüksek değildir. Başarıyı olumsuz etkileyen en öncelikli faktör, nüks PVR'dir. Yapılan çalışmalarda genellikle %60-80 arasında anatomik başarı oranları bildirilmiştir. Ancak görsel başarı oranları çok daha düşüktür (74). Dolayısıyla bu durumdaki olgularda PVR'yi tedavi etmenin yanı sıra PVR gelişimini önlemek de önemlidir. Bu konuda çalışılan farmakolojik ajanlar, henüz rutin klinik kullanıma geçmemiş olsa da, gelecekte umut vaat etmektedir.

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ'DE FARMOKOLOJİK TEDAVİ

A. Antienflamatuar Ajanlar

Kortikosteroidler: Kortikosteroidler, deneysel hayvan modellerinde vitreoretinal fibrozisi engelleyebilen ilk ajanlardır. Temel etkileri inflamatuar cevabı azaltmak ve bu sayede kronik retinal hastalıkları stabilize etmektir. Ayrıca kortikosteroidler enflamatuar mediatör geçişini azaltabilir. TNF-α ve IL-1 ekspresyonunu düşürebilir ve T-lenfosit proliferasyonunu

engelleyebilir. Erken dönemde PVR'ye uygulandığında kortikosteroidler retinal dekolman gelişimini önleyebilirler. Vitrektomi sonrasında yapılan triamsinolon enjeksiyonunun kontrol grubuyla kıyaslandığında postoperatif enflamasyonun azaltılması, görme keskinliğinin artırılması, daha net ve iyileştirilmiş bir fundus görüntüsünün sağlanması ve postoperatif KRB stabilizasyonunun desteklenmesinde etkin olduğu görülmüştür (75-79).

İntravitreal kortikosteroid uygulamalarının PVR oluşumunu engelleyebileceği düşünülse de, triamsinolon asetonid ve diğer kortikosteroidlerle yapılan klinik çalışmalarda beklenen sonuçlar elde edilememiştir. Bu durumun nedeni kortikosteroidlerin anti-enflamatuar etkilerini klinik hastalık başlamadan önce yani enflamasyonun erken dönemlerinde göstermeleri olarak belirtilmiştir.

Deneysel PVR modelinde triamsinolon ile bir antimetabolit olan daunomisinin intravitreal olarak bir arada kullanılması bu iki ilacın etkileşimiyle proliferatif ve enflamatuar süreçlerin bastırıldığını ve PVR'nin önlendiğini göstermiştir (80). Ayrıca tavşanlarda endodiatermi ile uyarılan PVR üzerinde 5-Fluorourasil (5-FU) ile kombine edilen triamsinolonun anlamlı bir şekilde azaltıcı etkisi olduğu da belirtilmiştir (81).

B. Antiproliferatif Ajanlar

5- Fluorourasil (5-FU): Proliferatif vitreoretinopatinin medikal tedavisi üzerine en çok çalışılan maddelerden biri olan 5-FU, bir pirimidin analogu olan antimetabolitler grubundadır. Hücre içinde aktif bir metaboliti 5-fluouridine (5-FUR) dönüşüp RNA ve DNA sentezini engelleyerek çalışmaktadır. Hayvan modellerinde 5-FU'nun PVR oranını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (82-84).

Ciddi PVR'li hastalarda, cerrahi sonrası tek doz 10 mg 5-FU'nun iyi bir şekilde tolere edildiği ve tek yan etkinin uzun süre devam eden kornea ödemi olduğu gözlemlenmiştir (85). Başka bir çalışmada, 5-FU'ya 30 dakika maruz kalan RPE hücrelerinde hücresel proliferasyonun kesintiye uğradığı görülmüştür (86). Ayrıca, ciddi PVR'li 22 hastada intravitreal ve subkonjonktival 5-FU'nun minimal yan etkilerle yaklaşık %60 oranında anatomik başarı sağladığı bildirilmiştir (87).

5-FU'nun yan etkileri, kullanımını sınırlayan önemli nedenlerden biridir. Yapılan çalışmalarda, bu yan etkilerin korneal ve elektroretinografik değişikliklere, retinada ultrastrüktürel düzeyde serbest veya endoplazmik retikulumla ilişkilendirilen ribozomların bir hafta sonra kaybolması şeklinde ortaya çıktığı gösterilmiştir (88).

Daunomisin (Daunorubisin): Bir antrasiklin antibiotik olarak bilinen kemoterapi ilacıdır ve özellikle akut lösemi gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılır. Bu ilaç hücre siklusundan bağımsız olarak etki gösterir; yani belirli bir hücre evresine özgü değildir. İn vitro deneylerde 10 dakikalık bir uygulama süresinde 7,5 µg/ml konsantrasyonunda fibroblast ve RPE hücrelerinin çoğalmasını engellediği görülmüştür (89).

Daunomisin deneysel PVR tedavisinde en yüksek potansiyele sahip olan ancak güvenli doz aralığı en dar olan ilaçlardan biridir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda, intravitreal (göz içine) 9 nmol daunomisinin RD insidansını %50 azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak bu dozda fotoreseptör dış segmentlerinde değişikliklerin ortaya çıktığı daha yüksek dozlarda (30 nmol ve üzeri) ise retinal toksisitenin meydana geldiği rapor edilmiştir (89, 90).

İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ilk vitrektomi operasyonunu takiben daunomisin infüzyonu uygulanan bireylerin %73'ünde retinanın 18 ay sonra stabil olduğu bildirilmiştir. Cerrahi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında cerrahiye ek olarak daunomisin infüzyonu yapılan bireylerde reoperasyon oranının bir yıl içinde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla %46'ya karşı %35) (11).

All- Trans- Retinol (atR): Vitamin A'nın lipofilik bir türevidir ve fotoreseptör yolunun bir metaboliti olan all-transretinoik asit (all-tRA) ile 13-cis-retinoik asit (cis-RA), hayvan modellerinde gözlemlenen bir çalışmada RPE hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe etmiş ve belirgin sitotoksisiteye neden olmamıştır (91).

Başka bir çalışmada, vitreoretinal cerrahi sonrasında dört ay boyunca günde 2 kez 40 mg oral 13-cis-RA verilen hastalarda, sadece cerrahi uygulananlara kıyasla daha yüksek başarı oranları rapor edilmiştir. Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, tavşanlara silikon yağı içinde verilen all-tRA, PVR gelişim riskini anlamlı bir şekilde azalttığı ve polimer kaplı mikrosferler içinde iki aya kadar RD önleyici etkisinin devam ettiği gösterilmiştir. Ancak, bu sonuçların PVR tedavisinde kullanılabilirliğini kesinleştirmek için geniş kapsamlı deneysel ve klinik çalışmaların yapılması gereklidir (92-94).

Mitomisin C (MMC): Mitomisin C DNA çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini engelleyen antiproliferatif bir ilaçtır. Bu ilaç hücre siklusunu S ve G2/M fazlarında durdurarak çalışır ve yüksek dozlarda apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilir. İnsan RPE hücrelerinde doza bağlı antiproliferatif etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Tavşanlarda 1 mg dozunda nontoksik

olmasına rağmen ilacın retinal toksisite riski yüksektir, çünkü daha yüksek dozlar hücre canlılığı üzerinde belirgin etkilere neden olabilir (95).

Taksol: Taksol mikrotübül stabilizatörü bir bileşik olup deneysel PVR modellerinde yapılan deneylerde TRD üzerinde azaltıcı etkiler göstermiştir. Ayrıca başka bir deneysel PVR modelinde intravitreal olarak fibroblastlarla aynı anda verildiğinde üç gün arayla yapılan enjeksiyona kıyasla PVR'yi daha etkili bir şekilde önleyebildiği tespit edilmiştir. Ancak yüksek dozlarda kullanılması optik nöropati riski taşıyan bir dezavantaj oluşturmaktadır (95, 96).

Diğer antimetabolitler: Tiotepa, vinkristin, bleomisin, metotreksat gibi ajanlar kanser tedavisinde denenmiş olmalarına rağmen geniş çaplı bir kullanım alanı bulamamışlardır. Bu durum, bu ilaçların ya etkinlik yetersizliği, toksisiteleri veya yetersiz veri bulunması gibi nedenlerle klinik başarı elde edememiş olmalarından kaynaklanmaktadır (97).

C. Ekstrasellüler Matriks Üretim ve Kontraksiyonunu Önleyen Ajanlar

Cis-hidroksiprolin (CHP): Cis-Hydroxyproline, bir prolin analoğu olarak PVR oluşumu sırasında migrasyon ve proliferasyonda rol oynayan hücre adezyon moleküllerini engelleyerek etki gösterir. Deneysel tavşan modelinde intravitreal CHP uygulamasının retinal RD oranında %48'lik bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (95, 98).

Kolşisin: Kolşisin, bitkisel bir alkaloid olarak bilinir ve antifibrotik ile antienflamatuar özelliklere sahiptir. İn vitro çalışmalarda kolşisinin hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve kontraksiyonunu engellediği gösterilmiştir. Deneysel PVR modelinde yapılan çalışmalarda oral kolşisinin tavşanlarda nüks oranını %74'ten %30'a indirdiği görülmüştür (99, 100).

Matriks metalloproteinazlar (MMP): MMP'ler ECM'nin yeniden şekillenmesinden sorumlu bir enzim grubunu temsil eder. İntravitreal MMP-2 ve MMP-9 seviyelerindeki artış postoperatif PVR gelişimiyle ilişkilidir (101). MMP'leri inhibe eden sentetik bir ajan olan prinomastat (AG3340), tavşanlarda dispaz modeli ve posterior penetran göz travması modelinde intravitreal enjeksiyonla PVR gelişimini önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak, bu etkinin insanlarda klinik çalışmalarla değerlendirilmediği belirtilmektedir (102, 103).

D. Hücrelerin Ekstraselüler Matrikse ve Kollajene Bağlanmasını Etkileyen İlaçlar

Hücreler ile ECM bileşenleri özellikle kollajenle olan etkileşimde hücre bazal membranları seviyesinde gerçekleşmektedir. Bu membranlar hücrelerin morfolojisi, tutunması, permeabilitesi, migratuvar ve kontraktil özelliklerini düzenleme konusunda kritik bir rol oynar.

Fibronektin özellikle hücre-kollajen bağlanmasında kilit bir rol oynar ve aynı zamanda heparin, laminin ve integrinlerle özelleşmiş bağlanma noktalarına sahiptir. Fibronektine karşı yapılan müdahaleler özellikle integrinlere bağlanmayı engelleyen veya diğer moleküllerle bağlanma bölgelerini bloke eden maddeler, hücre morfolojisi, migrasyon ve kollajen kontraksiyonunu etkileyebilir (97).

Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin (DMAH): Vitrektomi cerrahisi sonrasında KRB'nin yıkılması fibrin oluşumuna yol açar ve bu fibrin PVR için bir çatı görevi görür. Diklofenak sodyum (DMAH), hücre migrasyonu ve proliferasyonunu teşvik eden fibrin oluşumunu engeller. Yapılan bir klinik çalışma DMAH'nin hem hematolojik sorunlara neden olma olasılığını azalttığını hem de vitrektomi sonrası fibrin oluşumunu önlediğini göstermiştir. 5 IU/ml infüzyon dozunda heparinin toksik etki oluşturmadığı rapor edilmiştir (104). Postoperatif fibrin oluşumunu önlemek için intravitreal heparin infüzyonu kullanılabilir; ancak, bu uygulama intraoperatif hemoraji insidansını artırabilir. İnsanlarda yapılan bir çalışma 5-FU ile DMAH kombinasyonunun, kontrol grubuna kıyasla postoperatif PVR insidansını %26.4'ten %12.6'ya düşürebildiğini göstermiştir (105).

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ'DE GEN TEDAVİSİ

Yürütülen araştırmalar RPE hücrelerinde MYC geni tarafından tetiklenen mitojenik yolun aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca, MYC gen ekspresyonunu engellemek için C-MYC antisense oligonükleotidi (c-myc-AS-ODN) kullanmanın RPE hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde önleyebildiği ortaya konmuştur (106). Başka bir çalışmada ribonükleotid redüktaz enzimi olmayan bir HSV1 virüs klonu üretilmiş, bu klonla hücre kültüründeki proliferatif RPE hücreleri enfekte edilmiş ve 36 saat içinde enfekte RPE hücrelerinin %72'sinin öldüğü belirlenmiştir (107).

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ MEDİKAL TEDAVİSİNDE DENENMİŞ DİĞER AJANLAR

Proliferatif vitreoretinopati patogenezinin çeşitli aşamalarına etki eden yukarıda bahsedilen farmakolojik ajanların yanı sıra antidepresan özellik gösteren hiperisin, RPE hücrelerine doza bağlı etki gösteren askorbik asit, fibrinolitik etkili doku plazminojen aktivatörü, radyoterapi, kalsiyum antagonistlerinden nilvadipin, genleri ve proteinleri hasara

uğratarak proliferasyonu baskılayan hipertermi, IL-4 ve interferon gama ile mitojenik etkileri azalttığı gösterilen PDGF antagonisti trapidil, tripanosidial etkili suramin gibi çeşitli tedavi yöntemleri de araştırılmıştır. Ancak yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda denenen bu tedavilerin etkinliği henüz kesinleştirilememiştir (108, 109).

Proliferatif vitreoretinopati'nin medikal tedavisinde ana amaç reproliferasyonu önleyerek bir nevi profilaksi sağlayarak iyileşmeyi teşvik etmek ve fonksiyonları korumaktır (110). Ancak hastalığın medikal tedavisinde kullanılan ilaçların göz içine etkili doza ulaşma konusundaki zorluklar ve göz içi dokulara potansiyel toksisiteler gibi sorunlar henüz tam olarak çözümlenememiştir. Antiproliferatif ajanlar, bölünme yeteneğine sahip olmayan hücrelere, örneğin RPE, fotoreseptör ve ganglion hücreleri gibi hücrelere çok az etkili olabilirler. Ancak bu ilaçların PVR'de medikal tedavinin en önemli sorunlarından biri, retina ve diğer göz içi dokulara potansiyel toksisiteleridir (111).

Bu çalışmada bu bulgulardan hareketle PVR tedavisinde, doğal bir flavonoid olan ve daha önce antiproliferatif etkileri kanıtlanan apigenin uygulamasının etkilerinin in vitro olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

APİGENİN

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon), bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan ve en çok çalışılan flavonoidlerden biridir. Asteraceae'ye ait bitkiler örneğin Artemisia, Achillea, Matricaria ve Tanacetum cinsleri bu bileşiğin ana kaynaklarıdır (14). Antiproliferatif, anti-inflamatuar, antioksidan ve anti-tümör etkileri olup glikosile edilmiş olarak bulunur (112).

Apigenin farklı siklin bağımlı kinazların ve diğer bazı genlerin ekspresyonunu modüle ederek G1/S-fazı veya G2/M fazı dahil olmak üzere farklı proliferasyon evrelerinde hücre döngüsünün durmasını indükler (15, 16, 113). Apigenin ayrıca üç ana mitojenle; hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve insan hücre kültürü modellerinde p38 ile aktive olan, protein kinaz (MAPK) yolundaki sinyal molekülleri ile etkileşerek metastaz ve anjiyogenezin inhibisyonunu indüklediği rapor edilmiştir (114).

Sloley ve arkadaşları insan nöronlarında ve astrogliada bulunan amin-oksidoredüktazların bir enzim ailesi olan monoamin oksidazlarının (MAO'lar) apigenin tarafından in vitro inhibisyonunu bildirmişlerdir. Bu sonuca göre düzenlenmemiş MAO aktivitesi bir dizi psikiyatrik ve nörolojik bozukluktan ve bunların apigenin gibi inhibitörlerinin

yokluğundan kaynaklı olabilir, böylece apigenin kullanımı aydınlatılarak Alzheimer ve Parkinson hastalığı tedavi edebilir (115). Apigenin'in alloksanla tedavi edilen farelere uygulanması sonucu katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) gibi hücresel antioksidanların aktivitesini artırması bu nutrasötik bileşiğin hepatoprotektif rolünü de ortaya koymuştur (116).

Apigenin molekülünün antiproliferatif özelliklerini açığa çıkarmak için yapılan bir çalışmada, insan üveal melanom hücresinde subtoksik apigenin düzeylerinin ERK1/2 ve PI3K/Akt yollarının inhibe edilmesi yoluyla üveal melanom hücreleri tarafından VEGF'nin ekspresyonunu ve salgılanmasını önlediği belirlenmiştir (117). Chen ve arkadaşları apigeninin de içinde olduğu çeşitli flavanoidleri içeren bir çalışmada RPE hücrelerinde apigenin doz bağımlı olarak VEGF sekresyonunu, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azalttığını tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada, apigenin insan retinal mikrovasküler endotel hücre kültüründe IL-1β kaynaklı oluşan E-kaderin membran geçirgenlik artışını bloke ettiği de ortaya konulmuştur (19). ARPE-19 hücrelerinde tert-butil hidroperoksit (t-BHP) ile oluşturulan oksidatif hasarın apigenin tarafından Nrf2 siRNA yolağı inhibe edilerek önlendiği rapor edilmiştir (118).

PVR etiyopatogenezini oluşturan basamaklar ve PVR gelişiminde ana rol oynayan RPE hücre proliferasyonu düşüldüğünde, apigenin PVR gelişimini önlemede umut verici bir molekül olma özelliği taşımaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü, Moleküler Genetik ve Görüntüleme laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada insan göz retinal pigment epitel (ARPE-19) (ATCC® CRL-2302TM, Manassas, ABD) hücre hattı kullanılarak in vitro PVR modeli oluşturuldu.

HÜCRE KÜLTÜRÜ VE SAKLANMASI

ARPE-19 retina pigment epitel hücreleri %10 fötal sığır serumunda (GIBCO, Paisley, UK) ve antibiyotik (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) bulunduran DMEM/F12 (50/50 mix, 1x, Multicell, Kanada) komple sıvı besi ortamında tabana yapışarak steril ortamda çoğaltıldı. Hücreler, 37°C ısı, %5 CO_2 ve %95 hava bulunduran inkübatörlerde pasajlanıp analizler için kullanıldı. Tedavi uygulamaları için kullanılacak hücre sayısı, hemositometrede tripan mavisi ile boyanarak belirlendi. Hücreler, besi kabının yüzey alanına uygun bir şekilde ekildi. Hücre kültürü çalışmalarında, her bir örnek en az üç kez tekrarlandı ve toplamda üç tekrardan oluşan deneyler gerçekleştirildi. Sonuçların tutarlılığını sağlamak için hücrelerin 3-10 arası pasajları kullanıldı.

Tablo 4. Çalışma kapsamında kullanılan cihazların adı, modeli, markası ve menşei

CİHAZ	MARKASI VE MODELİ
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus, Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus, Almanya
Santrifüj Centurion Scientific	İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon- Eclipse TS100, Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson, ABD
Dijital Pipetör	Thermo Scientific, ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific-MultiskanTM GO, ABD
Soğutmalı santrifüj	Hettich- Micro 200R, Almanya
Santrifüj	Hettich- Micro 200R, Almanya
Nanodrop	OPTİZEN-NanoQ, Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems-ProFlex, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-StepOnePlus, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-7500, ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WISD-WiseMix, İngiltere
Analitik Terazi	AND-HR 250 AZ
Doku Homojenizatörü	QIAGEN, Almanya
Karıştırıcı Blok	Bioer Technology, Çin
4 °C Buzdolabı	VESTEL, Türkiye
-20 °C Derin Dondurucu	VESTEL, Türkiye
-80 °C Derin Dondurucu	WİSD, İngiltere
Ultra Saf Su Cihazı	TKA, Almanya
Distile Su Cihazı	TKA, Almanya
Trinoküler Floresan Işık Mikroskobu	Carl Zeiss-Axio, Almanya

HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Hücre pasajının ilk aşamasında, 75 cm²'lik flaskların tabanına tutunan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı, 6 ml PBS (phosphate buffered saline) içeren bu flasklarda yıkama yapıldı ve serolojik pipet yardımıyla geri çekildi. Sonrasında flasklara 6 ml Tripsin-EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) konuldu ve 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde yaklaşık 5 dakika bekletildi. Böylece hücrelerin tabandan kalkması sağlandı. Pipetle özenli bir şekilde, tripsinli hücreler toplandı ve 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. ARPE-19 hücreleri 150 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında süpernatan pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Hücre kültürü hazırlığı için önce falkon tüpündeki hücre peleti 10 ml besiyeri eklenerek süspanse edildi ve ardından bu süspanse edilmiş hücre besiyeri, steril bir pipet kullanılarak 75 cm²'lik kültür flasketine transfer edildi. Hücre yoğunluğu invert mikroskop altında kontrol edildikten sonra, uygun koşulları sağlamak üzere %5 CO_2 içeren 37°C'lik steril bir inkübatörde kültüre alındı.

HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

TGF-β2 ve apigeninin sitotoksisitesi MTT testi ile belirlendi. ARPE-19 hücresi, 96 kuyucuklu plakalarda (Sunub, Shangai, Çin) kuyucuk başına 20 x 10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve tabana tutunması için bir gece inkübasyonu sağlandı. Hücrelerin açlık koşullarına maruz bırakılması amacıyla besiyeri serumsuz bir ortamla değiştirildi ve inkübasyon süreci 24 saat daha devam etti. Tüm analizlerde homojen sonuçlar elde etmek için benzer uygulamalar yapıldı ve deneylerin güvenilirliğini artırmak amacıyla tüm çalışmalar üç kez tekrarlandı. Daha sonra hücreler, sırasıyla 2.5 ng/ml, 5 ng/ml ve 10 ng/ml TGF-β2 olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda TGF-β2 ile 48 saat inkübe edildi.

Devamında hücreler serum içermeyen ortamda 48 saat apigenin ile muamele edildi. Apigeninin sitotoksisitesinin belirlenmesi için konsantrasyonu 0,78 µM, 1,56 µM, 3,12 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM olarak çalışıldı. Hücre canlılığı değerlendirildi. İnkübasyondan sonra hücrelerin yer aldığı kuyucukların ortamı taze ortam ile değiştirildi ve üzerine 50 µl MTT çözeltisi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (Across Organics, New Jersey, ABD) eklendi. Üç saat inkübasyonun ardından ortam uzaklaştırılarak formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 100 µl DMSO eklendi. Absorbans 570 nm dalga boyunda bir mikroplaka okuyucu (Multiskan GO, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandiya) kullanılarak ölçüldü.

PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ MODELİNİN OLUŞTURULMASI VE UYGULAMALAR

Çalışmamızda, apigeninin PVR oluşum mekanizmalarına etkisini gösterebilmek için öncelikle deneysel PVR modeli oluşturulması hedeflendi. Bu amaçla ARPE-19 hücrelerinde EMT ve proliferasyon TGF-β2 ile indüklendi. Bu sebeple uygulanacak TGF-β2 dozu MTT testi ile belirlendi. Ardından ARPE-19 hücreleri 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2 ile muamele edildi. ARPE-19 hücrelerine yapılacak uygulamalar için PVR modeli 10 ng/ml TGF-β2 ile oluşturulurken MTT ile belirlenen tedavi yanıtı için izlenecek apigenin dozu ise sitotoksik etki yaratmayan en yüksek doz olan 1,56 µM olarak belirlendi. 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM apigenin ARPE-19 hücreleri üzerine olan etkisi değerlendirildi.

APOPTOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ

ARPE-19 hücreleri gece boyunca 1 x 10^6 hücre/25 cm^2'lik flasklarda (Nest, Jiangsu, Çin) plakalandı. Ardından 24 saat süresince serumsuz inkübasyona tabi tutularak hücreler serumdan arındırıldı. Daha sonra hücreler 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 µM apigenin ve 10 ng/ml TGF-β2 + 1,56 µM apigenin kombinasyonuna maruz bırakıldı. Devamında hücreler tripsinize edilip PBS ile yıkandı ve anneksin V bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi. 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 µM apigenin ve 10 ng/ml TGF-β2 + 1,56 µM apigenin kombinasyonuna maruz kalan hücreler daha sonra tekrar yıkandı, yeniden süspanse edildi. Tüm deneyler 3 tekrar halinde çalışıldı, ortalama değerler belirlenerek çalışmaya devam edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücreler Hoechst 33342 boya solüsyonu (Sigma Aldrich) ile boyandı ve ardından görüntüleri bir floresan mikroskobu (ZEISS, Axio Vert A.1, Almanya) ile 340 x 510 nm'de 40 x'de alındı.

RT-qPCR ile mRNA İFADESİNİN ANALİZİ

Doz yanıt deneylerinden elde edilen verilere dayanarak, hücre proliferasyonunda toksik olmayan apigenin (1,56 µM) ve en düşük TGF-β2 konsantrasyonu (10 ng/ml) ve bunların kombinasyonu seçildi. Hücreler, farmakolojik ajanlar ve/veya bunların kombinasyonları ile 48 saat boyunca serumdan yoksun ortamda inkübe edildi. Daha sonra ticari bir kit (Bio Basic, NY, ABD) kullanılarak toplam saf RNA örnekleri ekstrakte edildi. Tamamlayıcı DNA (cDNA), her biri bir ters transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, Vilnius, Litvanya) kullanılarak 1 µg

RNA'dan sentezlendi. EMT'yi göstermek için mezenkimal belirteçler olan fibronektin, vimentin ve N-kaderin, transkripsiyon faktörlerinden Snail, Twist ve ZEB1, metalloproteinazlardan MMP-1, MMP-2, MMP-7'nin mRNA ekspresyonunu belirlemek için yine RT-qPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanıldı (Tablo 5). PCR deneyinde, tipik bir reaksiyon döngüsü 95°C'de 5 dakikada 1 döngü, ardından 40 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 1 dakika primer eşleşme ve uzama içermekteydi. Hedeflerin kantifikasyonu, nispi kantifikasyon için 2ΔΔCt yöntemi kullanılarak hesaplandı. Amplifikasyon için kullanılan primerler PZR Biotech (Ankara, Türkiye) tarafından sentezlendi. Deneyler üç kez yapıldı ve tüm reaksiyonlar üç kopya halinde gerçekleştirildi. GAPDH ifade seviyeleri dahili referans olarak kullanıldı.

HÜCRE GÖÇÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

Apigenin uygulamasının, TGF-β2 ile oluşturulan hücre göçü aktivitesi üzerindeki etkisi, yara iyileştirme deneyi ile değerlendirildi. RPE hücreleri, yaklaşık % 80-90 oranında yüksek yoğunlukta 24 kuyulu bir plaka üzerine yerleştirildi. 16 saatlik inkübasyonun ardından hücreler, serumsuz ortamda yalnızca göçü değerlendirmek için 24 saat aç bırakıldı. Daha sonra kuyucuklarda 200 µl pipet uçlarıyla yara oluşturuldu ve PBS ile yıkandı. Bundan sonra hücreler, serumsuz ortamda 48 saat 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 µM apigenin ve her iki ajanın kombinasyonu ile işleme tabi tutuldu. Yara aralığı mikroskop altında özel bir program kullanılarak ölçüldü. (ZEISS, Axio Vert A.1, Almanya).

Tablo 5. qPCR analizlerinde kullanılan primerlerin dizileri

Genler	Primer sekansları
N-kaderin	F: 5’ GTTTGACTATGAAGGCAGTGG-3’ R: 5’ TCAGTCATCACCTCCACCAT-3’
E-kaderin	F: 5'-TTGACGCCGAGAGCTACAC-3' R: 5'-GTCGACCGGTGCAATCTT-3'
Vimentin	F: 5'-AATGACCGCTTCGCCAAC-3' R: 5'-CCGCATCTCCTCCTCGTAG-3'
Fibronektin	F: 5’-AAGACCATACCCGCCGAAT G-3’ R: 5’-GGCATTTGGATTGAGTCCC G-3’
MMP1	F:5’ACAGCCCAGTACTTATTCCCTTTG-3’ R: 5’-GGGCTTGAAGCTGCTTACGA-3’
MMP2	F 5’ TCTCCTGACATTGACCTTGGC-3’ R 5’ CAAGGTGCTGGCTGAGTAGATC-3’
MMP7	F: 5'-TGAGCTACAGTGGGAACAGG-3' R: 5'-TCATCGAAGTGAGCATCTCC-3'
Snail	F: 5’-CAACCCACTCAGATGTCAA-3’ R 5’-CATAGTTAGTCACACCTCGT-3’
Twist	F: 5’-GGGAGTCCGCAGTCTTAC-3’ R: 5’-CCTGTCTCGCTTTCTCTTT-3’
ZEB1	F: 5’-AGTGTTTGTGATTGTGTTTGA-3’ R: 5’-GATGAAGGCGGGTTAGAG-3’
α-SMA	F 5′-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3′ R 5-ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA-3′
GAPDH	F: 5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3' R: 5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3'

PROTEİN EKSPRESYON ANALİZİ

ARPE-19 hücreleri, hücre lizizi için kullanılan PMSF içeren tampon ve proteaz inhibitör kokteyli ile işlenerek homojenatlar elde edildi. Hücreler, 1,56 µM apigenin, 10 ng/ml TGF-β2 ve 10 ng/ml TGF-β2 ile 1,56 µM apigenin kombinasyonu ile 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra çıkarıldı. Poliakrilamid jel (NuPAGE® Bis-Tris) (Novex, CA, ABD) kullanılarak ayrılan 50 µg protein numunesi, PVDF membranlarına (Invitrogen, Kiryat, İsrail) transfer edildi. Bloke edici solüsyon (Novex, CA, ABD) ile bloke edilen membranlar, gece boyunca 4 °C'de E-kaderin, vimentin, α-SMA, NF-κB ve β-aktine karşı birincil antikorlarla inkübe edildi. Poliakrilamid jel üzerinden transfer edilen protein numuneleri, oda sıcaklığında anti-tavşan veya anti-fare IgG ile kemilüminesans Western blot substrat kiti (Novex, CA, ABD) kullanılarak inkübe edildi. Ardından görüntüleme sistemi (Bio-Rad ChemiDoc MP Sistemi, Carlsbad, CA) ile bantların kantifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, β-aktin'e karşı düzeltilerek yükleme kontrolü yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda elde edilen veriler, SPSS 19 programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için varyans analizi (ANOVA) uygulandı ve ardından Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ile detaylı inceleme yapıldı. Elde edilen sonuçlar, ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde ifade edildi. İstatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için $P < 0,05$ düzeyi kullanıldı ve bu değerin altında bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

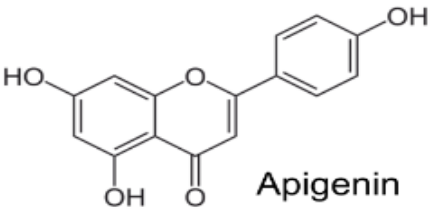
BULGULAR

TGF-β2 İLE İNDÜKLENEN RPE HÜCRESİNE APİGENİNİN ETKİSİ

İlk olarak, konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağlı olarak, apigeninin (4',5,7-trihidroksiflavon) (Şekil 7) RPE hücre sağkalımı üzerindeki etkisini belirledik. Şekil 8'de gösterildiği gibi 1,56 µM'ye kadar apigenin 48 saatlik uygulama sırasında hücre hayatta kalması üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye sahip değildi. Bu nedenle çalışmada, hücrelere toksik olmayan 1,56 µM konsantrasyonda apigeninin 48 saat uygulanmasına karar verilmiştir (Tablo 6).

TGF-β2 konsantrasyonu 10 ng/ml olarak uygulandığında, ARPE-19 hücrelerinde %24 oranında hücre proliferasyonuna sebep oldu. Aynı TGF-β2 dozunda hücre morfolojisinde de gözle görülür değişiklikler (Şekil 9) olduğu tespit edildi. Bu sebeple TGF-β2'nin konsantrasyonu 10 ng/ml olarak belirlenmiştir (Tablo 7).

Belirtilen 10 ng/ml TGF-β2 konsantrasyon uygulanmasının neden olduğu hücresel çoğalmanın ve morfolojik değişikliklerin, 1,56 µM apigeninin 48 saat inkübasyonu ile kontrol düzeyine düşürüldüğü görülmüştür (Şekil 10) (Tablo 8).



Şekil 7: Apigeninin moleküler formülü (4',5,7-trihidroksiflavon)

Tablo 6. Apigenin ARPE-19 hücrelerine sitotoksisitenin değerlendirilmesi

Apigenin	0 µM	0,78 µM	1,56 µM	3,12 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
48 saat	100	104	98	90	90	87	83	80	6

* P <0,05, tedavisiz kontrol grubuna göre.

Tablo 7. TGF-β2'nin ARPE-19 hücre toksisitesinin değerlendirilmesi

TGF-β2 dozu (ng/ml)	0,0 ng/ml	2,5 ng/ml	5,0 ng/ml	10,0 ng/ml
ARPE-19 hücre yoğunluğu	100	118,768	122,305	120,502*

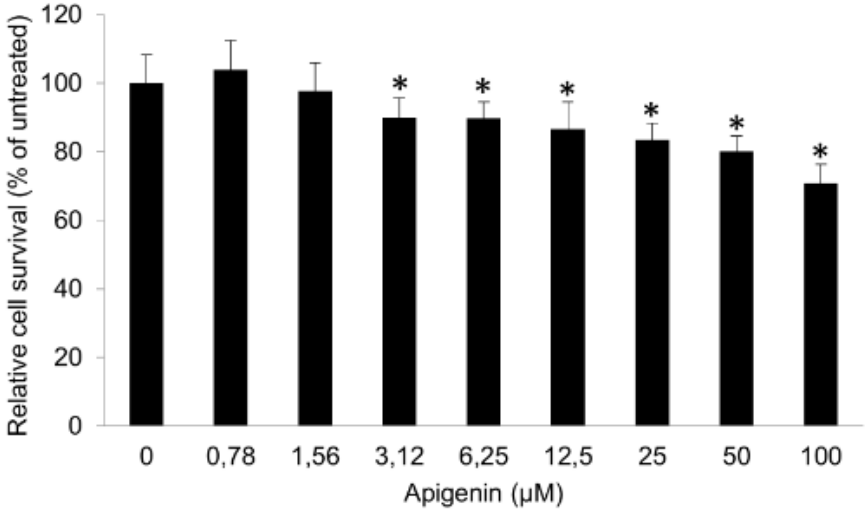
* P <0,05, tedavisiz kontrol grubuna göre.

Tablo 8. 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM apigeninin ARPE-19 hücrelerine etkisi

	Tedavisiz	10 ng/ml TGF-β2 (A)	1,56 µM Apigenin (B)	A+B*
ARPE-19 hücre yoğunluğu	100	124	97	99

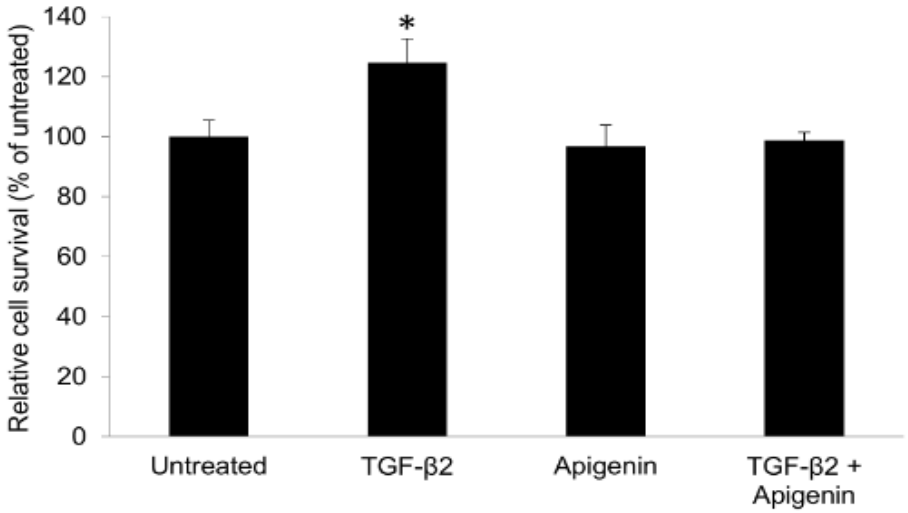
*A+B: 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM apigenin kombinasyonu

** P <0,05; apigenin + TGF-β2 kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı



Şekil 8. Apigenin tedavisinin 48. saatte farklı konsantrasyonlardaki hücre sağkalıma etkisi. Etkinlik, hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki apigenine 48 saat maruz kalmasını takiben yapılan MTT canlılık testi ile belirlendi. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalama değerleri ± SD olarak belirlendi.

*P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı.



Şekil 9. 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 μM apigenin ve bunların kombinasyonları hücrelere 48 saat boyunca uygulandı. Sonrasında her iki durumda da, hücrelerin canlılığı MTT deneyi kullanılarak belirlendi.

*P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı.

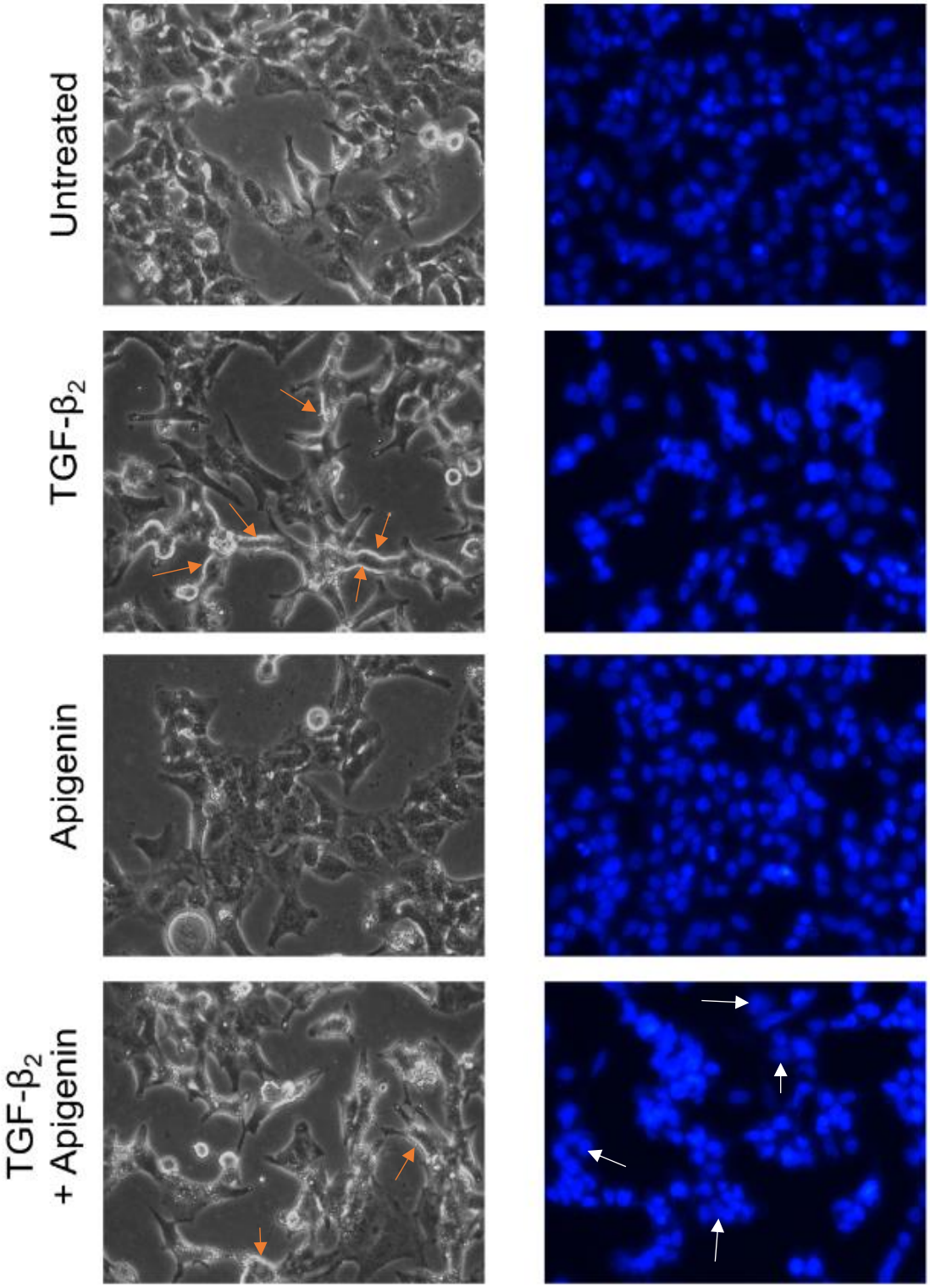
APİGENİN, TGF-β2 ARACILI HÜCRESEL MORFOLOJİ DEĞİŞİMİNİ ÖNLER

Proliferatif vitreoretinopati sırasında, RPE hücreleri fibroblast benzeri hücrelere dönüşür ve bu dönüşümde TGF-β2 önemli bir rol oynar. ARPE-19 hücreleri, TGF-β2 ile etkileşime girdiklerinde epitelyal-mezenkimal geçiş fenotipi gösteren bir dönüşüm geçirirler. Bu çalışmada, bu dönüşümün morfolojik değişikliklerle birlikte, iğsi hücrelerin ortaya çıkmasıyla karakterize edildiği bulunmuştur. Apigenin tedavisi, TGF-β2 ile tetiklenen fibrotik aktivitenin tersine çevrilebileceğini göstermektedir. Apigenin uygulaması sonrasında fibrotik fenotiplerin şiddetinde bir azalma olduğu ve tek tek iğsi bir yapı kazanan hücrelerin daha dairesel bir şekle geri döndüğü gözlemlenmiştir (Şekil 10).

APİGENİN İLE TETİKLENEN HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI

Apigenin tedavisinin antiproliferatif etkisinde apoptozun rolü olup olmadığı nükleer boyama ile araştırıldı.

Hoechst boyaması, belirli bir mikroskobik alandaki görüntüde TGF-β2 ile tedavi edilen hücrelerde çok az apoptotik hücre bulunduğunu gösterdi. Diğer taraftan, apigenin ile tedavi edilen hücrelerde apoptoz oranının TGF-β2 uygulanan gruba göre daha yüksek olduğunu belirledik (Şekil 10). Bu duruma ek olarak, apoptotik hücrelerin sayısı, TGF-β2 ile birlikte apigenin uygulanan hücrelerde açıkça diğer iki gruptan daha yüksekti (Şekil 10).



Şekil 10. Apigenin TGF-β2 uygulanan hücrelerde apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümüne neden olur. 24 saatlik serumsuz ortamda hücreler aç bırakıldıktan sonra, 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 µM apigenin ve bunların kombinasyonu ile muamele edildi. Benzer uygulamalar yapıldıktan sonra hücreler Hoechst DNA boyası ile boyandı ve floresan mikroskobu altında görüntülendi.

TGF-β2 İLE İNDÜKLENEN HÜCRE GÖÇÜNDE APİGENİN UYGULAMASININ MOLEKÜLER DÜZEYDE ETKİSİ VE MEKANİZMASI

Retina pigment epiteli hücrelerinde TGF-β2 ile indüklenen EMT, PVR'nin patogenezi sırasındaki en önemli olaydır. Bu nedenle bu çalışmada apigenin uygulamasının TGF-β2'ye maruz kalan RPE hücrelerinin göçü üzerindeki etkinliği değerlendirildi. Yara iyileşmesi deneyi için, hücreler serumdan 24 saat yoksun bırakıldı ve serumsuz ortamda 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 μM apigenin veya 10 ng/ml TGF-β2 + 1,56 μM apigenin olmak üzere her ikisine maruz bırakıldı (Tablo 9). TGF-β2, kontrol hücrelerine kıyasla önemli ölçüde hücre göçü gerçekleştirdi (Şekil 11A, 11B). Bununla birlikte, yara boşluğunu kapatmada tedavi edilmeyen ve apigenin ile tedavi edilen hücreler arasında hiçbir fark yoktu (Şekil 11A, 11B). Öte yandan, TGF-β2'nin apigenin ile kombine uygulanması, hücre göçünü kontrol seviyesi düzeyine kadar azalttı (Şekil 11A, 11B).

TGF-β2'nin aracılık ettiği EMT sırasında, RPE hücrelerinin morfolojisi değişir, göç ederler ve MMP seviyeleri artar. Bu nedenle, hücre dışı matris tarafından oluşturulan engelleri kırarak hücre göçünü destekleyen MMP'lerin mRNA ekspresyonu değerlendirildi. Çalışmada, TGF-β2'nin MMP-1, MMP-2 ve MMP-7'nin mRNA ekspresyonunu sırasıyla 36, 47 ve 1 kat olmak üzere önemli ölçüde uyarıldığı gösterildi (Şekil 12). Tersine, apigenin tedavisi ile MMP-1 ekspresyonu %30, MMP-2 ve MMP-7 mRNA ekspresyonu ise %50 oranında azaldı ve sonuçlar istatiksel olarak anlamlıydı (Şekil 12) (Tablo 10).

Tablo 9. TGF-β2 ve apigeninin uygulamasının yara iyileşme deneyi/hücre göçü üzerine etkisi

Yara iyileşmesi	Tedavisiz	10 ng/ml TGF-β2 (A)	1,56 µM Apigenin (B)	A+B*
0. saat hücre yoğunluğu	100	100	100	100
48. saat hücre yoğunluğu	65	14**	50	67***

*A+B: 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM apigenin kombinasyonu

** P<0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı

*** P <0,01; TGF-β2 + apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı

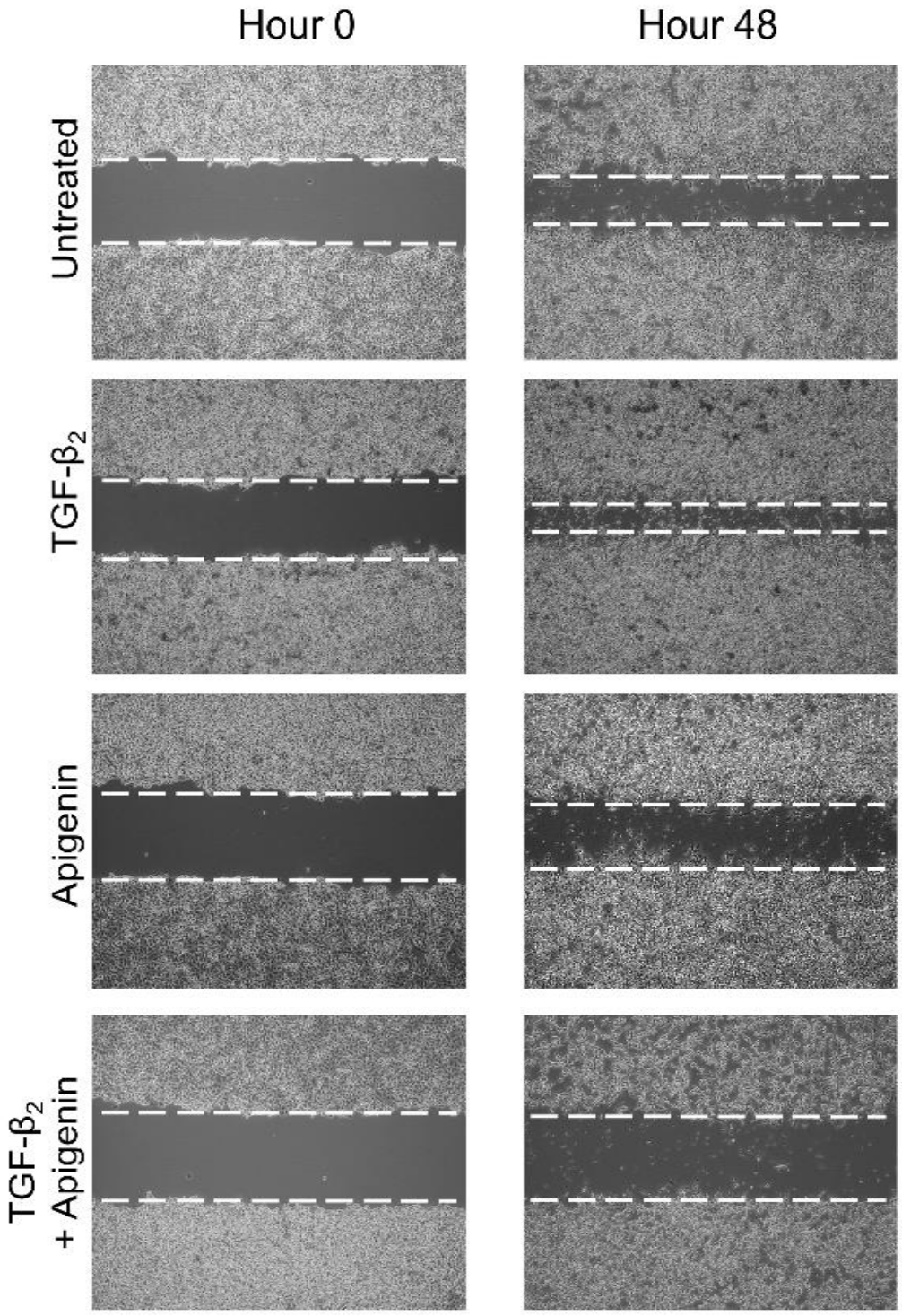
Tablo 10. TGF-β2 ve apigenin MMP'ler üzerine etkisinin qRT-qPCR ile belirlenmesi

	Tedavisiz	TGF-β2 (A)	Apigenin (B)	A+B*
MMP-1	1	36,6	0,8	24,6
MMP-2	1	47,4	1	21,6
MMP-7	1	1,1	1,2	0,6

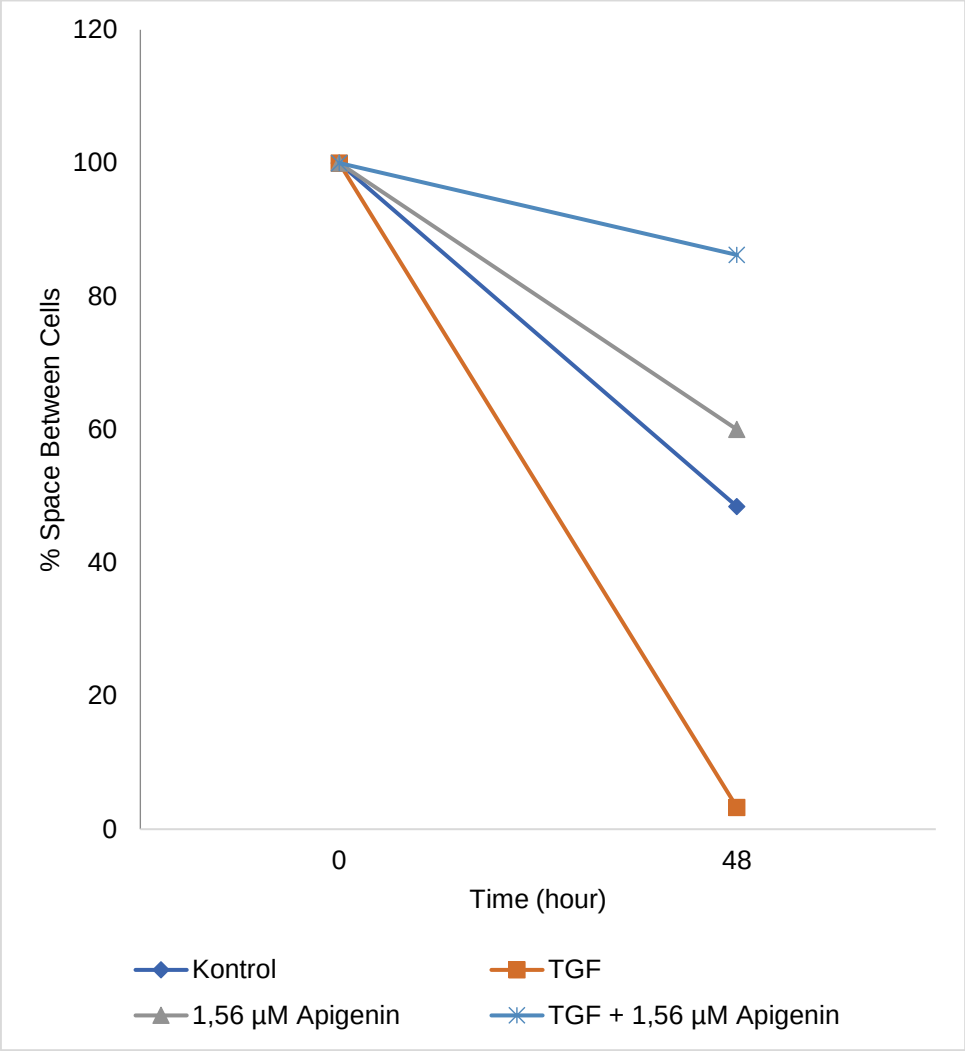
*A+B: 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM Apigenin kombinasyonu

** P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı

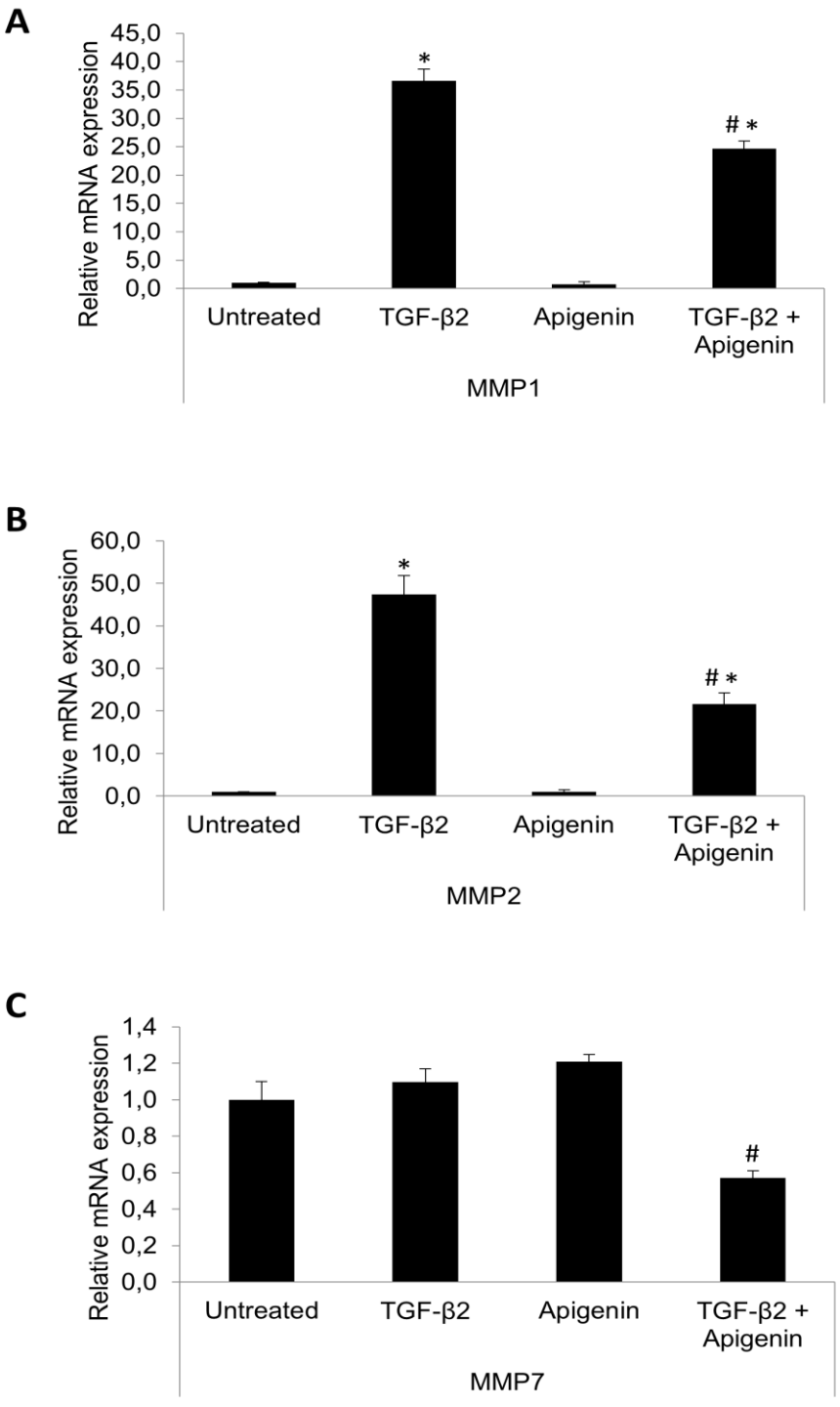
*** P <0,01; TGF-β2+apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı



Şekil 11A. Apigenin, TGF-β2 ile indüklenen hücre göçünü baskılar. İlk RPE hücreleri 24 saat seruma aç bırakıldı; daha sonra birleşen tek tabakalı hücreler 200 µl pipet ucu ile çizildi ve daha sonra 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 µM apigenin ve her ikisi ile muamele edildi.



Şekil 11B. Sonunda, yara arasındaki boşluk mikroskopi altında ölçüldü ve grafik çizildi.



Şekil 12 (A, B, C). Hücrelere benzer uygulamalar yapıldıktan sonra MMP-1, MMP-2 ve MMP-7 'nin mRNA ekspresyonunu belirlemek için RT-qPCR gerçekleştirildi.

* P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı.

# P <0,01, TGF-β2+apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı

APİGENİNİN TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNE VE HÜCRE YAPIŞMA MOLEKÜLLERİNE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Epitelyal mezenkimal geçiş; Snail, Twist ve ZEB1 dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından tetiklenir ve düzenlenir. Bu çalışmada, TGF-β2 Snail ve ZEB1'in mRNA ekspresyonunu sırasıyla 1,1 ve 2,6 kat arttırıldığı gösterildi. Bununla birlikte, apigenin tedavisi Snail ve ZEB1 ekspresyonlarını sırasıyla %64 ve %70 oranında baskıladığı gösterildi. TGF-β2 Twist'in mRNA ekspresyonunu değiştirmedi fakat apigenin ile tedavi edilmesi ekspresyonu %55 oranında inhibe etti.

Mezenkimal belirteçlerden fibronektin, N-kaderin ve vimentinin TGF-β2 uygulanan ARPE-19 hücrelerinde mRNA ekspresyonun sırasıyla 3,2, 4,1 ve 4,4 kat arttığı görüldü.

TGF-β2 ile birlikte apigenin uygulanması sonrasında mezenkimal belirteçlerden fibronektin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonu sırasıyla %35, %19 ve %25 oranında azaldığı gösterildi (Tablo 11).

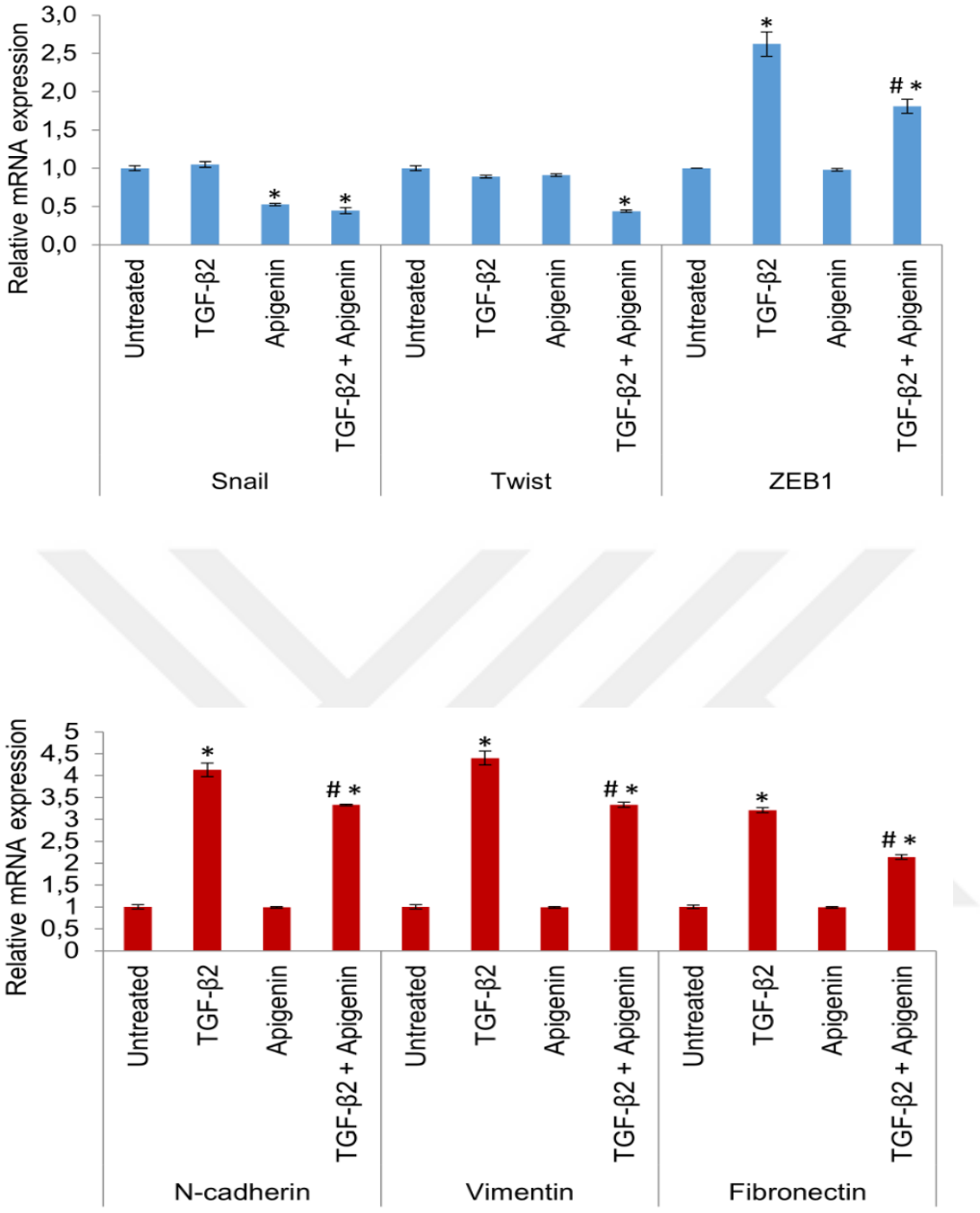
Tablo 11. TGF-β2 ve apigeninin transkripsiyon faktörleri ve hücre yapışma moleküllerine etkisinin RT-q-PCR ile belirlenmesi

	Tedavisiz	10 ng/ml TGF-β2 (A)	1,56 µM Apigenin (B)	A+B*
Snail	1	1,1**	0,5	0,4***
Twist	1	0,9**	0,9	0,4***
ZEB1	1	2,6**	1,0	1,8***
Fibronektin	1	3,2**	1,0	2,1***
Vimentin	1	4,4**	1,0	3,3***
N-kaderin	1	4,1**	1,0	3,3***

*A+B: 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM Apigenin kombinasyonu

** P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı

*** P <0,01; TGF-β2+apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı



Şekil 12. Apigenin, transkripsiyon faktörlerini ve epitelyal-mezenkimal transformasyon belirteçlerini düzenler. Serumdan yoksun retina pigment epitel hücreleri, 24 saat tedavi edilmeden bırakıldı. Sonrasında 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 µM apigenin ve her iki kombinasyon ile tedavi edildi. Daha sonra, transkripsiyon faktörlerinin mRNA ekspresyonu Snail, Twist ve ZEB1; fibronektin, vimentin ve N-kaderin RT- q-PCR yöntemi ile değerlendirildi.

* P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı.

# P <0,01, TGF-β2+apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı.

TGF-β2 UYGULANAN HÜCRELERİN APİGENİN İLE TEDAVİSİNDE PROTEİN EKSPRESYONUN ANALİZİ

Apigenin tedavisinin TGF-β2 ile indüklenen EMT'de önemli bir rol oynayıp oynamadığını belirlemek için ZEB1, E-kaderin, vimentin, α-SMA ve NF-κB'nin protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. Serumdan yoksun RPE hücreleri, 24 saat tedavi edilmeden bırakıldı. Sonrasında 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 μM apigenin ve her iki kombinasyon ile tedavi edildi. Daha sonra ZEB1, E-kaderin, vimentin, α-SMA ve NF-κB'nin protein ekspresyon seviyeleri Western blot yöntemi ile belirlendi.

TGF-β2 uygulaması sonrasında, ZEB1 (Şekil 13A), vimentin (Şekil 13B) ve α-SMA (Şekil 13C) protein ekspresyonunun, tedavi edilmeyen kontrollere kıyasla sırasıyla yaklaşık %60, %30 ve %340 oranında tetiklenirken, E-kaderin (Şekil 13D) ve NF-κB (Şekil 13E) ekspresyonunun sırasıyla yaklaşık %20 ve %40 oranında azaldığı görüldü. Apigenin uygulaması sonrasında ise, TGF-β2 ile up regüle edilmiş ZEB1, vimentin ve α-SMA ekspresyonunun sırasıyla %43, %41 ve %47 oranında inhibe olduğu saptandı. Apigenin ve TGF-β2 kombinasyon halinde NF-κB ekspresyonunu ise %10 oranında down regüle etti. E-kaderin protein ekspresyonu ise apigenin tedavisi ile %60 oranında artarak EMT'nin tersine çevrilebilirliğini gösterdi (Tablo 12).

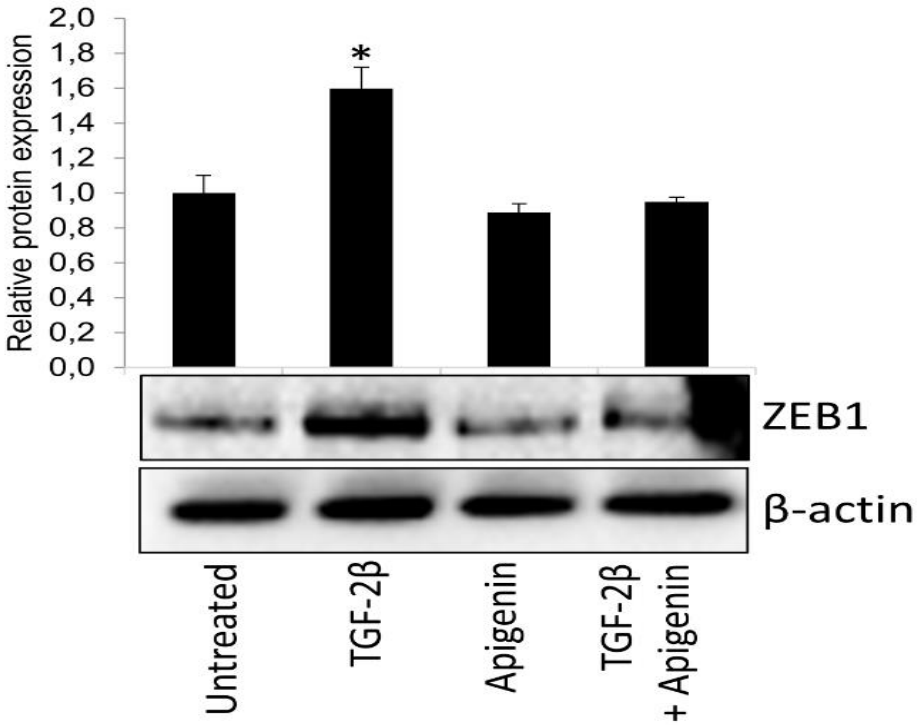
Tablo 12. TGF-β2 ve apigenin protein ekspresyona etkilerinin Western-blot ile gösterilmesi

	Tedavisiz	10 ng/ml TGF-β2 (A)	1,56 µM Apigenin (B)	A+B*
ZEB1	100	160**	130**	90***
E-kaderin	100	80**	60**	130***
Vimentin	100	130**	105**	55***
α-SMA	100	440**	140**	230***
NF-κB	100	60**	70	50***

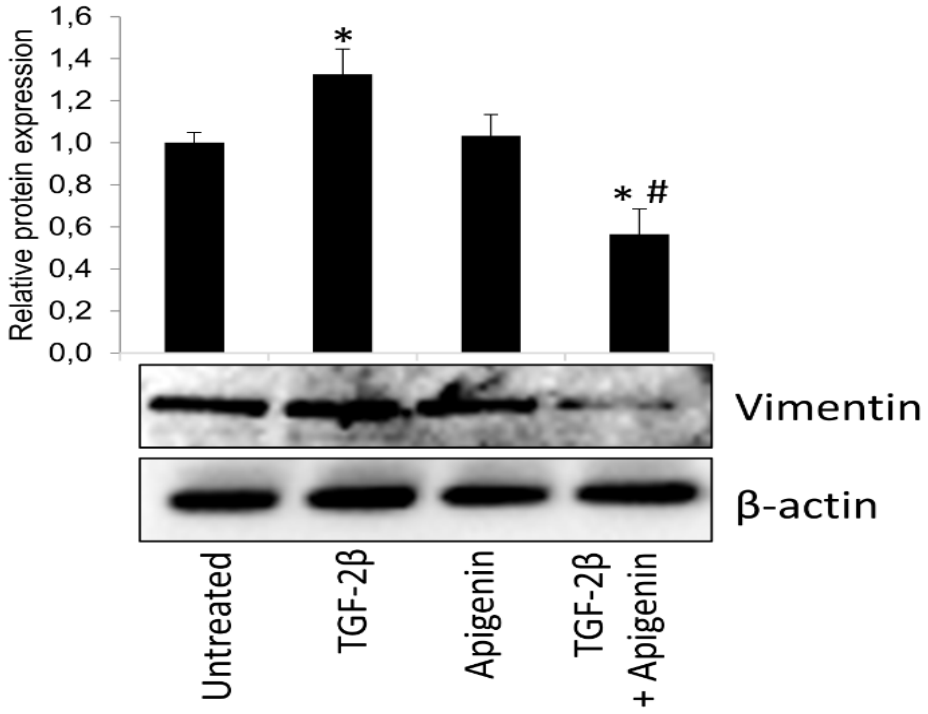
*A+B: 10 ng/ml TGF-β2 ve 1,56 µM Apigenin kombinasyonu

** P <0,05; TGF-β2, tedavisiz kontrol grubuna karşı

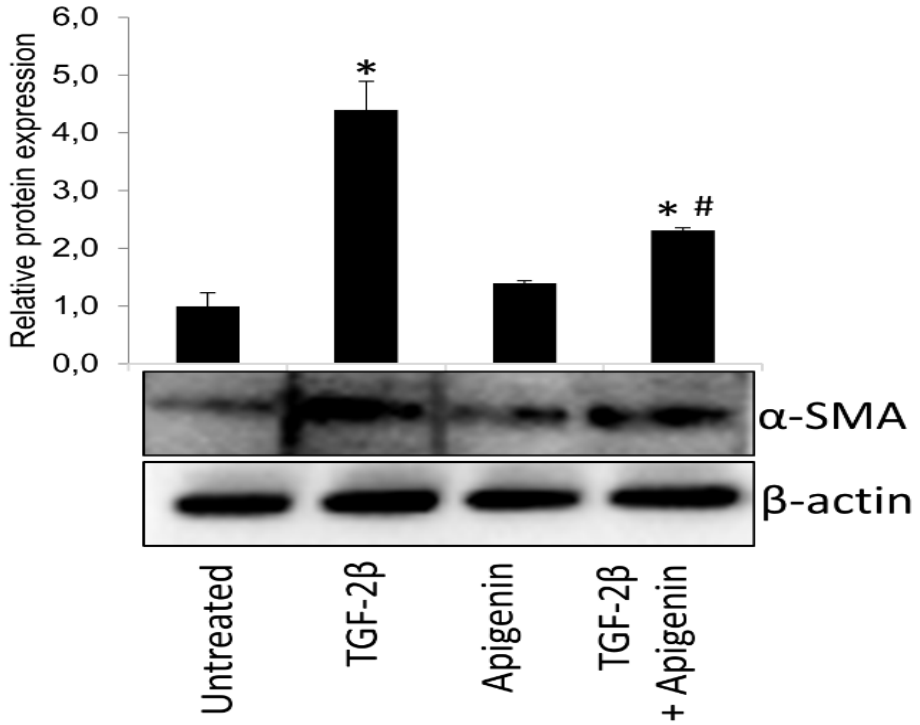
*** P <0,01; TGF-β2+apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı


Relative protein expression
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
ZEB1
β-actin
Untreated
TGF-2β
Apigenin
TGF-2β + Apigenin

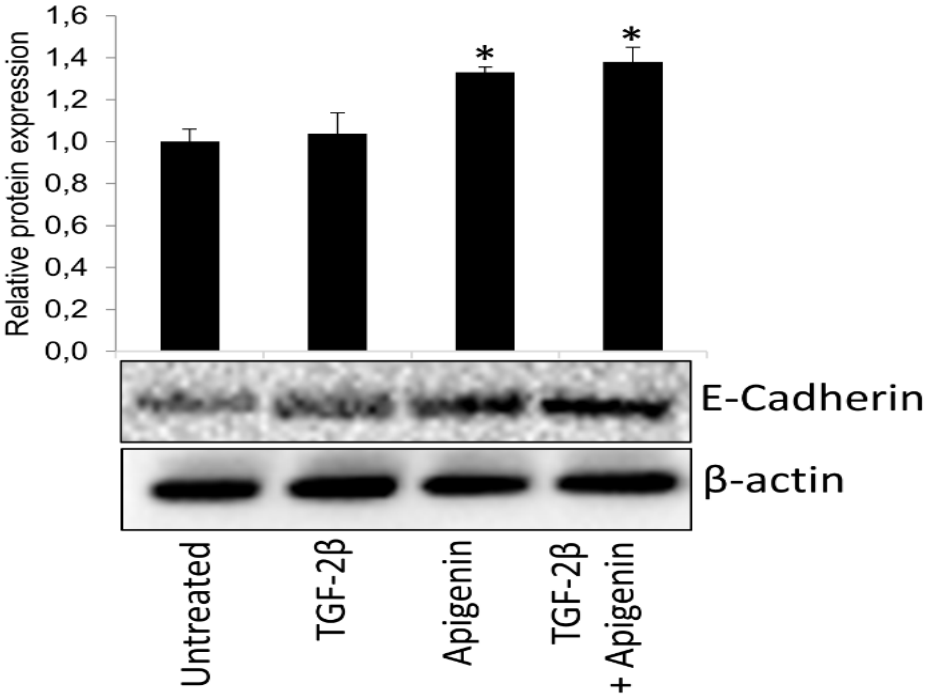
A.


Relative protein expression
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
* #
Vimentin
β-actin
Untreated
TGF-2β
Apigenin
TGF-2β + Apigenin

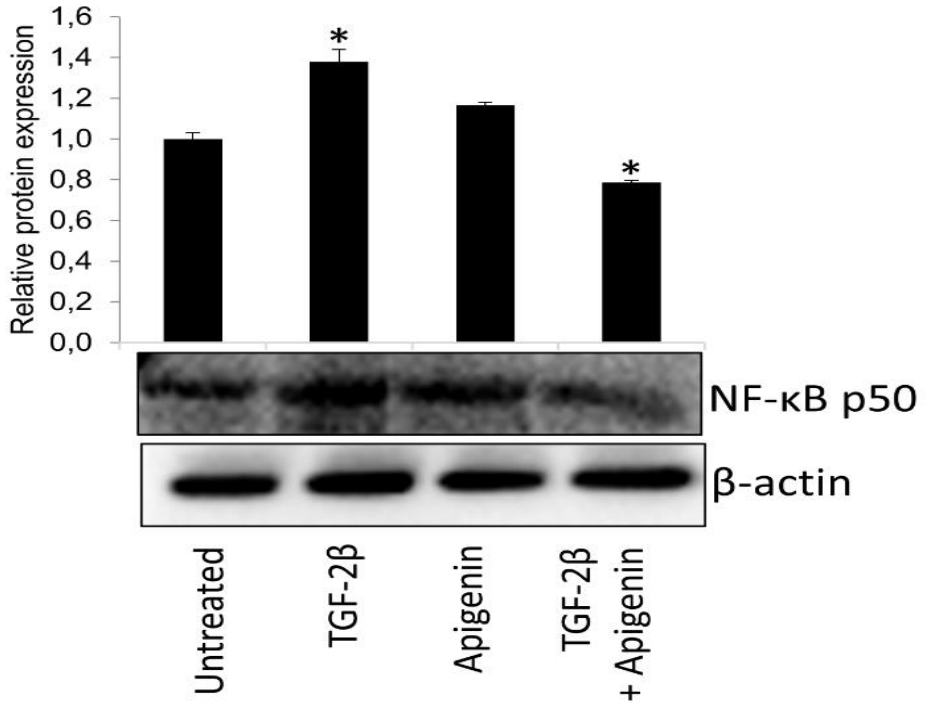
B.


Relative protein expression
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
*
* #
α-SMA
β-actin
Untreated
TGF-2β
Apigenin
TGF-2β
+ Apigenin

C.


Relative protein expression
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
*
E-Cadherin
β-actin
Untreated
TGF-2β
Apigenin
TGF-2β
+ Apigenin

D.



E.

Şekil 13 (A, B, C, D, E). Apigenin, TGF-β2 ile indüklenen EMT'de protein ekspresyonlarını düzenler. Serumdan yoksun retina pigment epitel hücreleri, 24 saat tedavi edilmeden bırakıldı. Sonrasında 48 saat boyunca 10 ng/ml TGF-β2, 1,56 μM apigenin ve her iki kombinasyon ile tedavi edildi. Daha sonra, ZEB1, E-kaderin, vimentin, α-SMA ve NF-κB'nin protein ekspresyon seviyeleri Western-blot ile belirlendi.

*P<0,05; tedavisiz kontrol grubuna karşı

#P<0,01, TGF-β2+apigenin kombinasyonu, TGF-β2'ye karşı

TARTIŞMA

Proliferatif vitreoretinopati, göz içinde retina ile vitreus arasındaki ilişkide ortaya çıkan bir hastalıktır. PVR, genellikle göz travması, retina dekolmanı veya göz cerrahisi gibi durumlar sonrasında gelişir. Bu durumda, göz içindeki hücresel aktivite anormal bir şekilde artar ve skar dokusu oluşur. PVR'nin temel patolojik süreci, vitreus kavitesinde bulunan çeşitli faktörlerin etkisi altında gerçekleşir. Bu faktörler arasında fibronektin gibi ekstraselüler matriks proteinleri ve çeşitli büyüme faktörleri bulunur. Büyüme faktörleri PVR'nin patogenezindeki hücrelerin kemotaksis, proliferasyon, kontraksiyon ve ekstraselüler matriks oluşumunda temel rol almaktadır. Retina yırtığından sonra KRB'nin yıkılmasıyla vitreusa serum komponentlerinden fibronektin, inflamatuar sitokinler, kompleman ve büyüme faktörleri sızmaktadır. PVR gelişen gözlerin vitreusundan ve subretinal sıvılarından aspire edilen hücrelerde TGF-ß, FGF, EGF ve IGF-1; PVR'de gelişen ERM'lerde ise PDGF, FGF, EGF ve IGF-1 seviyeleri yüksek olarak tespit edilmiştir (25, 39). Morfolojik değişiklikler ve göçten sorumlu en önemli büyüme faktörünün TGF-β2 olduğu bilinmektedir (119).

Vitreoretinal cerrahi teknolojilerindeki hızlı ilerlemelere rağmen PVR halen retinal dekolmanın nüksetmesine neden olan en önemli komplikasyondur. PVR'nin tedavisi için genellikle birden fazla cerrahi müdahale gerekebilir ve sonuçlar genellikle görsel keskinlik açısından tatmin edici olmayabilir. Primer RD cerrahi sonuçlarının açıklandığı son serilerde, PVR insidansı %5,1 ile %11,7 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar, PVR'nin cerrahi tedavisinde teknik açıdan ilerleme kaydedilmesine rağmen, görme fonksiyonunun daha iyi hale getirilmesi gerektiğini göstermektedir (120, 121).

Silikon çalışma grubunun ikinci raporunda, daha önce PPV geçirmiş ve silikon yağı kullanılan gözlerde %61 oranında anatomik başarı elde edildiği bildirilmiştir (122). Aynı şekilde, SÇG'nin üçüncü raporunda, daha önce gaz ile tamponlanmış vitrektomize edilmiş gözlerde %67 oranında total retinal yatışıklık elde edildiği belirtilmiştir (123). Bu nedenle, PVR ve dolayısıyla RRD'lerdeki nükslerin önlenmesinde, en modern cerrahi tekniklerin bile yetersiz kaldığı ve PVR'nin oluşumunu engellemek için ek ilaç tedavilerine ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir (124). Araştırmalar, cerrahi tekniklerin geliştirilmesi yanı sıra PVR gelişiminin engellenmesi üzerine odaklanmaktadır. Ancak şu anda etkili bir profilaktik tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bugüne kadar kullanılan farmakolojik ajanlardan bazıları PVR'yi önlemede başarılı olmuş olsa da, toksik etkileri nedeniyle kullanımları sınırlı kalmıştır (125).

Proliferatif vitreoretinopati üzerine yapılan araştırmaların çoğu, laboratuvar ortamında hücre kültürleri veya hayvan deneyleri şeklinde gerçekleştirilmiştir. Klinik çalışmaların sayısı oldukça azdır. Hayvan deneylerinde, bir ilacın etkinliğini değerlendirebilmek için öncelikle deneysel bir PVR modeli oluşturmak gerekmektedir. Bu çalışmalarda, ilacın PVR gelişimini engelleyip engellemediğini değerlendirmek için kontrol gruplarıyla karşılaştırmalar yapılmaktadır (125).

Hayvanlarda PVR oluşturmak için iki ana yöntem kullanılmaktadır. İlk yöntem, Ophir ve Blumenkarz tarafından tanımlanan ve kültüre edilmiş dermal fibroblastların vitreusa enjekte edilmesini içeren bir modeldir (84). Diğeri ise cerrahi müdahale gerektiren ve Iverson tarafından tanımlanan bir modeldir. Bu modelde, deneklere lensektomi ve kor vitrektomi yapılır ve ardından endodiatermi ile retinada hasar oluşturulur (126). Birçok araştırmacı genellikle insanlardaki PVR gelişimini daha iyi yansıtabilmek için bu modelleri modifiye ederek kullanmaktadırlar (125). Chandler ve ekibi ile Tano ve ekibi, tavşanlarda PVR modellerinde intravitreal triamsinolonun retinal dekolman oranını %77-90'dan %13-56'ya düşürdüğünü bildirmişlerdir (75, 77-79). Ayrıca tavşanlarda yapılan bir çalışmada, 5-FU enjeksiyonunun uygulandığı vakalarda intravitreal 5-FU'nun retinal dekolman insidansını %74'ten %32'ye düşürdüğü gösterilmiştir (87, 127).

Klinik olarak, Acar ve ekibinin, PVR C2 ile komplike psödofakik retinal dekolmanlarda intraoperatif triamsinolon asetonid (TA) kullanılan ve kullanılmayan gözlerde postoperatif başarıyı karşılaştırdıkları bir çalışma bulunmaktadır. İntraoperatif TA kullanılan grupta, kullanılmayan gruba kıyasla postoperatif rekürrens oranının istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermese de, daha düşük olduğu belirlenmiştir (%12,5'e karşılık %22, $p>0,05$) (97). Başka

bir klinik çalışmada, evre C ve üstü PVR'li gözlere uygulanan vitrektomi sırasında infüzyon sıvılarına DMAH ve 5-FU kombinasyonu eklenmiştir. Sonuçlar, 5-FU ve DMAH infüzyon sıvısı eklenmiş hastalarda rekürren retinal dekolman ve evre C PVR'li hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı etkileri olduğunu göstermişlerdir (%94'e karşılık %53, p=0,005) (128).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, RPE hücre kültürleri üzerinde gerçekleştirilmekte ve PVR patogenezinin çeşitli aşamalarındaki etkinliği değerlendirmektedir. Wang ve ekibi, crocetinin ARPE-19 hücre kültürlerinde yalnızca crocetin veya crocetin ve TGF-β2 ile kombine uygulandığında proliferasyon, migrasyon ve TGF-β2 bağımlı EMT üzerinde inhibe edici etkiler gözlemlemiştir (129). Lin ve ekibi, deneysel PVR modelinde fisetin molekülünün EGF tarafından indüklenen hücre migrasyonunu inhibe ettiğini bulmuştur (130). ARPE-19 hücre kültürleriyle yapılan bir başka çalışmada, resveratrolün TGF-β2 bağımlı EMT'yi inhibe ettiği ve bu nedenle PVR'yi önlemede kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (131). Ayrıca Kai Wang ve arkadaşları, demethoxycurcumin (DMC) adlı bir curcuminoidin ARPE-19 hücrelerinde STAT-3 yoluyla hücre migrasyonunu ve MMP-2 ekspresyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır (132).

Doğal bitki özleri veya küçük sentetik molekülleri günümüzde antitümör özellikleri bakımından odak noktasıdır. Flavonoidler, çeşitli yenilebilir bitkilerde yaygın olarak bulunan polifenollerdir ve hem in vivo hem de in vitro sistemlerde antioksidan, antiinflamatuar ve antitümör aktivitelerine sahip oldukları gösterilmiştir (13). Tüm flavonoidler arasında apigenin (4’5,7-trihidroksiflavon), bitkiler aleminde en yaygın olarak bulunanlardan ve en çok çalışılan fenoliklerden biridir. Asteraceae’ye ait bitkiler, örneğin Artemisia, Achillea, Matricaria ve Tanacetum cinsleri bu bileşiğin ana kaynaklarıdır (14). Genel olarak flavonoidler, antioksidan özellikleriyle bilinirler ve literatürdeki çok sayıda rapor apigeninin antioksidan özelliklerini bildirmiştir (133). Ek olarak antihiperglisemik (134), antienflamatuar (135) ve (miyokardiyal iskemide) antiapoptotik (136) etkiler bildirilmiştir. Tüm bunlar göz önüne alındığında biz de apigeninin, PVR patogenezine olan moleküler etkisini ve olası koruyuculuğunu araştırmak istedik.

Bu çalışmada, in vitro olarak ARPE-19 hücrelerinde TGF-β2 ile indüklenen bir deneysel PVR modeli oluşturulması ve apigeninin TGF-β2 ile indüklenen RPE hücrelerinde proliferasyon ve EMT üzerindeki moleküler etkilerin araştırılması amaçlanmıştır.

Hücre mitoz sırasında iki eş hücreye bölündüğünde, bir dizi evresel aşama gerçekleşir. İnterfaz adı verilen bu dönemde hücre G1, S ve G2 fazlarından oluşur. G1 evresinde hücre büyür ve organel sayısı artar. S evresinde kromozomlar ve sentrozomlar eşlenir. G2 evresinde ise bölünme için gerekli enzimler, proteinler ve enerji sentezlenir (137). Apigenin molekülünün oral squamöz hücreli karsinom kaynaklı hücre dizisi (SCC-25) üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, apigenin tedavisinin SCC-25 hücrelerinde hem G0/G1 hem de G2/M kontrol noktalarında hücre döngüsü durması sonucu apoptozu indüklediği saptanmıştır. Ayrıca yine aynı çalışmada apigenin siklin D1 ve siklin E ekspresyonlarını inhibe ettiği ve CDK1'in inaktivasyonuna neden olduğu ortaya çıkarılmıştır (16). Başka bir çalışmada apigenin insan kolon kanseri HT-29 hücrelerinin büyümesini doza bağlı olarak G2/M fazında indüklenen hücre döngüsünün durması sonucu inhibe ettiği saptanmış; G2/M fazının durması, CDK1 ve siklin B1'in down regülasyonu ve p21'in up regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (113). Apigeninin bir diğer önemli etkisi de normal hücrelerde tümör baskılayıcı p53 geninin stabilitesini artırmasıdır (138). Apigenin'in, p53 proteininin etkilerini değiştirerek kanserin önlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği tahmin edilmektedir. p53-mutant kanser hücrelerinin apigenine maruz bırakılması, iki p53-mutant kanser hücre hattında (HT-29 ve MG63) büyüme inhibisyonu ve G2/M fazının durmasıyla sonuçlandığı bir çalışmada gösterildiği gibi hücre büyümesinin inhibisyonu ve hücre döngüsünün değişmesiyle sonuçlanır (15).

Proliferatif vitreoretinopati tedavisinde RPE hücre proliferasyonunu önlemek için hücre döngüsünün baskılanmasının yanı sıra apoptozun indüksiyonuna da ihtiyaç vardır. Apoptozu indükleyen ajanların, PVR tedavisinde RPE hücrelerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Chen ve ekibi plumbaginin, PVR'de RPE hücrelerindeki döngüyü durdurma ve apoptoz oranını azaltmasını işlemlerini p38 MAPK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştirdiğini bulmuştur (139). Öte yandan, Zhou ve meslektaşları kurkuminin, in vitro RPE hücrelerindeki proliferasyonu ve EMT'yi önemli ölçüde engellediğini göstermiştir. Kurkuminin RPE hücrelerindeki AKT, MAPK ve TGF-β yollarını baskılayarak proliferasyonu ve EMT'yi etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, bu flavonoidin hücre döngüsünü durdurarak G2 kontrol noktasını aktive ettiği belirlenmiştir (140).

Apigenin tedavisinin farklı kanser hücrelerinde apoptozun farklı yolaklarını indükleyerek antiproliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (141). Bir çalışma, HeLa hücre çizgileri üzerindeki apigenin tedavisinin, p21/WAF1 proteininin aktivitesini önemli ölçüde artırabildiğini bildirmiştir. Bu proteinin transkripsiyonel düzenlenmesi p53'e bağlıdır. Apigenin ayrıca Fas/APO-1 ve kaspaz-3 proteinlerinin aktivitesini de arttırır ve her iki protein de

doğrudan apoptozla bağlantılıdır. Bu çalışmanın sonuçları apigeninin rahim ağzı kanserini önleyici bir ajan olarak görev yapabileceğini göstermiştir (142). Başka bir çalışmada, apigenin ile tedavi edilen insan akciğer kanseri H460 hücre dizileri, proapoptotik aktiviteyi kontrol etmek için farklı zamanlarda morfolojik olarak analiz edildi. Sonuçlar, apigeninin mitokondriyal bağımlı yolun membran potansiyelini azaltarak akciğer kanserinde ROS ekspresyonunu ve kalsiyum birikimini artırarak H460 hücrelerinde apoptozu destekleyebileceğini gösterdi (143). Apigenin tedavisinin, anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde apoptoza neden olan fosforile EGFR tirozin kinaz ve diğer MAPK ve bunların nükleer substratı c-myc düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (144). Çalışmamızda hücrelerde apoptozu değerlendirmek için Hoechst DNA boyası kullandık. Sonuçlar, apigenin + TGF-β2 ile tedavi edilen hücrelerde apoptotik hücrelerin diğer gruplardan belirgin şekilde daha yüksek olduğunu gösterdi. Bu bulgular, apigeninin RPE hücrelerinde apoptozu artırarak antiproliferatif etkilerini ortaya koyduğunu doğruladı.

Proliferatif vitreoretinopati gelişimindeki önemli bir adım, epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşüm süreci olan EMT'dir. Bu süreçte, normalde polarize epitel hücreleri çeşitli moleküler ve biyokimyasal değişikliklerle mezenkimal bir fenotipe geçer. TGF-β2 ise bu süreçte belirleyici bir rol oynar. TGF-β2'nin etkisi altında, hücreler arası bağlantılar ve hücre polaritesi değişir, bu da PVR'nin fibrotik ve çekme eğilimli bir duruma geçişine katkıda bulunabilir (131, 145). E-kaderin, epitel dokularda hücre-hücre yapışmasını düzenleyen ve kalsiyum bağımlı hücre yapışma moleküllerini kontrol eden bir moleküldür (146). Özellikle hücre-hücre temas bölgelerinde lokalize olan E-kaderin, hücre hareketliliğini azaltarak hücre-hücre bağlantısına etki eder (147). EMT süreci, apigenin tedavisi ile kayda değer tersine çevrilmiştir. Apigenin ile muamele edilen RPE hücrelerinde mezenkimal formasyonda kayıp tespit edilmiştir. Apigenin tedavisi ile E-kaderin gibi epitelyal belirteçleri arttığı ve N-kaderin, vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal belirteçleri azaldığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda RT-qPCR ile yapılan analizlerde TGF-β2 ile indüklenen ARPE-19 hücrelerinde mezenkimal belirteçlerden N-kaderin, fibronektin ve vimentinin mRNA ekspresyonunu sırasıyla 4,1, 3,2 ve 4,4 kat artarken, apigenin TGF-β2 ile birlikte uygulanması ise N-kaderin, fibronektin ve vimentin ekspresyonunu sırasıyla %19, %35 ve %25 oranında azaltmıştır. Western blot yöntemiyle baktığımız TGF-β2 ile muamele edilmiş ARPE-19 hücrelerinde ZEB1, vimentin ve α-SMA protein ekspresyonu ise tedavi edilmeyen kontrollere kıyasla sırasıyla yaklaşık %60, %30 ve %340 oranında tetiklenmiştir. NF-κB ve E-kaderin ekspresyonu ise sırasıyla %20 ve %40 oranında azalmıştır. Apigenin tedavisi ile, TGF-β2 ile uyarılan ZEB1, vimentin ve α-SMA

ekspresyonunun sırasıyla %43, %41 ve %47 oranında inhibe olduğu gösterildi. Apigenin ve TGF-β2 kombinasyon halinde NF-κB ekspresyonunu ise %10 oranında down regüle etti. E-kaderin ekspresyonu ise tedavi ile %60 oranında artarak EMT'nin tersine çevrilebilirliği yönünde aydınlatıcı olmuştur. TGF-β1 ile uyarılmış nazal fibroblastlarda a-SMA, fibronektin ve tip I kollajen ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığı fakat apigeninin α-SMA, fibronektin ve tip I kollajen ekspresyonlarını inhibe ettiği daha önce gösterilmiştir (148). Hepatik yıldızsı hücreler (HSCs) en güçlü fibrojenik efektör hücrelerdir ve aynı zamanda karaciğer fibrozu sırasında başlangıç süreci olarak kabul edilirler. CCl-4 ve BDL'nin indüklediği karaciğer fibrozis modellerinde apigenin uygulamasının karaciğer koruyucu etkisini göstermeyi amaçlayan bir çalışmada ECM birikiminin, α-SMA ve kollajen 1 gibi birçok fibrojenik faktörün salgılanmasını teşvik eden HSCs'lerin aktivasyonunun apigenin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (149). Apigenin epitel ve mezenkimal belirteç seviyeleri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla hepatosellüler karsinom hücre hatlarının (Bel-7402 ve PLC) kullanıldığı başka bir çalışmada 24 saat boyunca farklı dozlarda apigenin ile tedavi edilen hücrelerde yanıt olarak vimentin ve N-kaderin seviyeleri azalırken E-kaderin ve klaudin-3 seviyeleri artmıştır (150). Bu veriler açıkça, apigeninin EMT süreçlerini engelleyebileceğini göstermektedir. Yürüttüğümüz bu çalışmadaki veriler de geçmiş çalışmalar ile benzer yöndedir.

Kronik inflamasyon, tümör tarafından salgılanan inflamatuar sitokinler ve tümör mikro çevresindeki tümörle ilişkili hücreler tarafından oluşturulur. İnflamatuar sitokin sinyali, Smad'ler, STAT3 ve NF-κB gibi ana transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan sinyal yollarını başlatır. Dahası, aynı inflamatuar tepkiler Snail, Twist ve ZEB1 gibi EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktör ailelerini ve EMT'yi düzenlemek için karmaşık birbirine bağlı pozitif ve negatif geri besleme döngüleri yoluyla DNA ve histon değiştirici enzimler ve mikroRNA'lar dahil olmak üzere epigenetik düzenleyicileri de aktive eder (151). Smad, hücre gelişimi ve büyümesini düzenleyen önemli bir ailedir ve TGF-β süper ailesinin reseptörleri için ana sinyal dönüştürücüleridirler (152, 153). Twist, gelişimsel bir transkripsiyon faktörüdür ve yapılan araştırmalar Twist'in kanserin ilerlemesine ve kötü prognoza yol açabileceğini göstermektedir, çünkü embriyonik transkripsiyon faktörlerini yeniden aktive eder (154). ZEB1 ise IL2 gen ekspresyonunu baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür ve E-kaderini down-regüle ederek meme ve diğer karsinomlarda EMT'yi indükleyebilir (155). Ayrıca, ZEB1'in devre dışı bırakılması, heterojenliklerini ve plastisitelerini sınırlamak için hücreleri homojen bir epitelyal duruma kilitleyerek pankreas tümör hücrelerinin kök ve kolonizasyon yeteneğini önemli ölçüde azaltır (156). Bu faktörler, hücrelerin farklılaşması ve dönüşümü üzerinde önemli bir etkiye

sahiptir ve kanser gibi hastalıkların ilerlemesinde rol oynayabilirler. Tüm bunlara ek olarak, çalışmamızda, TGF-β2 Snail ve ZEB1'in mRNA ekspresyonunu sırasıyla 1,1 ve 2,6 kat up regule olmuştur. Bununla birlikte, apigenin ile kombine tedavi edilen grupta, Snail ve ZEB1 ekspresyonlarını sırasıyla %64 ve %70 oranında azaldığı gösterilmiştir. TGF-β2 Twist'in mRNA ekspresyonunu değiştirmedi fakat apigenin ile tedavi edilmesi ekspresyonu %55 oranında azalttı. Sonuçlarımız, eski çalışmalarla uyumludur ve apigenin transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek RPE hücrelerinin EMT'sini baskılayabildiğini göstermektedir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP), yapısındaki çeşitli proteinleri parçalayarak hücre dışı matrisin (ECM) parçalanmasından sorumlu olan çinkoya bağımlı endoproteazların bir ailesidir. MMP'ler, hücre proliferasyonu ve göçü de dahil olmak üzere geniş bir süreç yelpazesini teşvik eder ve hücre apoptozunda, anjiyogenezde, doku rejenerasyonunda ve immün yanıtta rol oynayabilir (157). Bazı kanserlerde MMP'ler, EMT sırasında değişiklikleri tetiklemek ve istila ve metastaz davranışları yoluyla EMT'yi kolaylaştırmaya yardımcı olmak için tümör mikro ortamı içinde işlev görür (158). Bir kurkuminoid olan demetoksi kurkumin (DMC), anti-inflamatuar ve anti-tümör özelliklere sahiptir. Bir çalışmada STAT-3 sinyal yolunun down regülasyonu yoluyla DMC'nin RPE hücre göçü ve MMP-2 ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkisi kanıtlanmıştır (132). Fisetin'in EGF'nin indüklediği RPE hücrelerinin göçüne yol açtığı moleküler mekanizmanın değerlendirildiği bir çalışmada MMP-9 proteinlerinin protein kinaz B (AKT) düzenlemesini modüle ederek ve Sp1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu azaltarak hücre göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir (130). Skutellarinin, bleomisinin neden olduğu pulmoner fibrozda hem in vitro hem de in vivo olarak NF-κB/NLRP3 yoluyla EMT sürecini düzenleyip düzenlemediğini araştırdık. Bleomisinin neden olduğu pulmoner fibrozda skutellarin adlı flavonaidin EMT üzerindeki düzenleyici rolünün incelendiği bir çalışmada skutellarinin fibronektin, vimentin, E-kaderin, N-kaderin, MMP-2, MMP-9 ve Snail gibi EMT ile ilişkili gen ekspresyonunu in vivo ve in vitro düzenlediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bleomisinin MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini arttırdığı, skutellarinin ise bu değişiklikleri doza bağlı olarak tersine çevirdiği gösterilmiştir (159). Hipoksi ile indüklenebilir faktör 2α (Hif-2α) transkripsiyon faktörü, osteoartrit patogenezinin bilinen bir ana düzenleyicisidir ve hipoksiye duyarlı elementlere (CGTG) spesifik bağlanma yoluyla MMP-3, MMP-13, COX-2 ve diğer katabolik faktörlerin ekspresyonunu arttırır. Cirsium japonicum var. maackii (CJM) ekstraktı ve bileşenlerinden biri olan apigeninin osteoartrite etkisinin incelendiği çalışmada up regülasyonu azalttığı tespit edilmiştir (160). MMP-9'un yumurtalık kanseri hücrelerinde PI3K-AKT yolakları yoluyla

fibronektin tarafından aktive edilebildiği rapor edilmiştir (161). İnsan yumurtalık kanseri hücrelerinde hem MMP-2 hem de MMP-9'un artan ekspresyonu metastaz potansiyeli ve hastalığın kötü prognozu ile ilişkilidir. Apigenin tedavisinin, tümör dokularındaki MMP-9 ve p-AKT ekspresyon seviyelerini büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (162). Bu sonuçlar, MMP'lerin inhibisyonunun, apigenin tarafından engellenen hücre göçünde bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda TGF-β2'nin MMP-1, MMP-2 ve MMP-7'un mRNA ekspresyonunu sırasıyla 36, 47 ve 1 kat olmak üzere önemli ölçüde indüklediği gösterildi. Tersine, apigenin tedavisi ile MMP-1 ekspresyonu %30, MMP-2 ve MMP-7 mRNA ekspresyonu ise %50 azalmıştır.

Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörleri ailesi, iltihaplanma, bağışıklık ve stres yanıtları, onkogenez, hücre göçü ve anjiyogenezde önemli bir rol oynar (163). Latent durumda, NF-κB'ler, inhibitör proteinleri tarafından sitozolde tutulur. Serbest NF-κB dimerleri daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve burada IL-8, MCP-1 ve IL-6 gibi bir dizi proinflamatuar hedef geni aktive ederler (164). NF-κB, hücrelerde invaziv bir fenotipi hem teşvik edecek hem de sürdürecek şekilde etki eder ve EMT'nin temel bir aracısı olarak işlev görür (165). Apigenin deneysel insan hepatoselüler karsinom (HCC) hücre hatlarında in vitro ve in vivo göç ve metastaz üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada PLC ve Bel-7402 insan HCC hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını doza bağlı olarak inhibe ettiği aynı zamanda Snai1 ve NF-κB ekspresyonunu azaltarak, EMT seviyelerindeki artışı tersine çevirdiği tespit edilmiştir (150). STAT ailesi proteinleri, özellikle STAT3 NF-κB sinyallemesi ile yakından ilişkilidir (166-168). Kanser hücrelerinde yapılan çalışmalar, STAT3 ve NF-κB arasındaki doğrudan etkileşimlerin inflamasyona katkıda bulunduğunu göstermiştir (169). Apigenin, kolit ile ilişkili kolon kanseri tümör dokularında STAT3 fosforilasyonunu azaltarak NF-κB aktivasyonunu inhibe etmiştir (170). Oleik asit (OA), iltihaplanma ve oksidasyonun ana tetikleyicisi olarak kabul edilir ve bu serbest yağ asidine duyarlılık, cilt hastalığının patogenezinde hayati bir rol oynar. OA ile cilt hasarı oluşturulan fare modelinde apigenin NF-κB ekspresyonunu azaltmış olup cilt hasarına karşı koruyucu takviye olabileceği yönünde katkı sağlamıştır (171). TGF-β1 ile uyarılmış nazal fibroblastlarda apigeninin MAPK'nin (p38, JNK) fosforilasyonunu inhibe ederek ve NF-κB'nin aktivasyonunu baskılayarak ECM üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (148). Bizim sonuçlarımızda da bunlara paralellik göstererek, apigenin ve TGF-β2 kombinasyon halinde NF-κB ekspresyonunu %10 oranında down regüle etmiştir. Apigenin NF-κB'nin aktivitesini down regüle ederek EMT'yi ve RPE hücrelerinin göçünü zayıflatabileceğini göstermiştir.

Proliferatif vitreoretinopati tedavisi için günümüzde primer tedavi cerrahi olarak görülse de en iyi şartlarda bile başarı oranları genellikle yüksek değildir. Başarıyı olumsuz etkileyen en öncelikli faktör, nüks PVR'dir. Bu yüzden PVR'nin gelişimini tersine çevirecek veya postoperatif PVR'yi önlemeye yönelik tıbbi ajanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Özellikle son yıllarda, PVR'nin moleküler gelişim aşamalarını hedefleyen birçok çeşitli ajanın etkileri araştırılmıştır. Çalışmalarda denenen ajanların çoğu, retinal toksisite ile ilgili endişeler ve intraoküler farmakokinetik hakkında bilgi eksikliği nedeniyle klinik uygulamada rutin olarak kullanılmamaktadır. Bununla birlikte, bu yönde araştırmalar devam etmektedir. Ciddi PVR'li hastalarda, cerrahi sonrası tek doz 10 mg 5-FU'nun iyi bir şekilde tolere edildiği ve tek yan etkinin uzun süre devam eden kornea ödemi olduğu gözlemlenmiştir (85). Daunomisin deneysel PVR tedavisinde en yüksek potansiyele sahip olan ancak güvenli doz aralığı en dar olan ilaçlardan biridir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda, intravitreal (göz içine) 9 nmol daunomisinin RD insidansını %50 azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak bu dozda fotoreseptör dış segmentlerinde değişikliklerin ortaya çıktığı daha yüksek dozlarda (30 nmol ve üzeri) ise retinal toksisitenin meydana geldiği rapor edilmiştir (89, 90). Bir deneysel PVR modelinde taksol'un intravitreal olarak fibroblastlarla aynı anda verildiğinde üç gün arayla yapılan enjeksiyona kıyasla PVR'yi daha etkili bir şekilde önleyebildiği tespit edilmiştir. Ancak yüksek dozlarda kullanılması optik nöropati riski taşıyan bir dezavantaj oluşturmaktadır (95, 96).

Proliferatif vitreoretinopati'nin patogenezi üzerinde belirleyici rol oynayan ana etmenler RPE hücrelerinin proliferasyonu ve EMT'dir. Dolayısıyla, PVR tedavisinde etkin olabilmesi için bir ajanın, RPE hücrelerinin aşırı çoğalmasını ve mezenkimal dönüşüm geçirmesini engellemesi gerekmektedir. Bu deneysel PVR modeli apigenin tedavisinin etkisini gösteren ilk çalışmadır. Sonuç olarak, düşük apigenin konsantrasyonunun hem RPE proliferasyonunu hem de mezenkimal dönüşümü azaltarak PVR tedavisinde umut verici bir ajan olabileceği düşünülebilir. Öte yandan, bu sonuçların in vivo deneysel bir ortamda test edilmesi gerekir. Gelecekte, RPE hücre göçü ve çoğalmasını engelleyen farmakolojik tedavilerin geliştirilmesi, PVR tedavisinde cerrahi müdahalelerin başarısını artırabilir ve hastaların görsel sonuçlarını iyileştirebilir.

SONUÇLAR

ARPE-19 hücre hattında deneysel olarak proliferatif vitreoretinopati modeli kurularak apigeninin tedavi edici etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla ARPE-19 hücreleri öncelikle TGF-β2 ile muamele edilerek proliferatif vitreoretinopatinin en önemli adımı olan epitelyal-mezenkimal transformasyon gelişimi oluşturulmuş ve ardından apigenin muamelesi ile olan değişiklikler gözlenmiştir. Bu amaçla, apoptoz, epitelyal belirteçlerden E-kaderin, mezenkimal belirteçlerden ise MMP-1, MMP-2, MMP-7, fibronektin, N-kaderin ve vimentin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile tespit edilmiştir. E-kaderin, ZEB1, vimentin, α-SMA ve NF-κB protein ekspresyon düzeyleri ise western blot ile belirlendi. Tüm bunların neticesinde çalışmamızda elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

1. ARPE-19 hücre serisiyle oluşturulan deneysel modelde, 10 ng/ml TGF-β2 ile indüklenme sonrasında hücre morfolojisinde önemli bir değişiklik olarak migrasyon daha ön planda olmak üzere %24 hücre proliferasyonu olduğu gösterilmiştir.

2. Apigenin tedavisinin, antiproliferatif etkisindeki mekanizmalar araştırıldığında apigeninin apoptotik ve nekrotik hücre ölümlerine neden olduğu ortaya konulmuştur. Apigenin + TGF-β2 ile muamele edilen hücrelerdeki apoptotik hücrelerin yüzdesinin diğer gruplardan istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu doğrulanmıştır.

3. Apigenin uygulaması, TGF-β2'ye maruz kalan RPE hücrelerinin göçünü inhibe etmektedir. Hücre göçü yara iyileşme deneyi ile değerlendirilmiş olup yara kapatmada, TGF-β2 ve apigenin birlikte uygulanması, hücre göçünü kontrol seviyesine indirmiştir.

4. TGF-β2'nin aracılık ettiği EMT sırasında RPE hücrelerinin morfolojisi değişir, migre olur ve bu süreçte MMP düzeyleri artmaktadır. mRNA ekspresyonu ile değerlendirilen MMP-1, MMP-2, MMP-7 seviyelerinin apigenin tedavisi sonrasında istatiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir.

5. EMT görülen ARPE-19 hücreleri apigenin ile tedavi edildiğinde transkripsiyon faktörlerinden Snail, Twist ve ZEB1'in ekspresyonunun azaldığı kanıtlanmıştır.

6. Mezenkimal belirteçlerden fibronektin, N-kaderin ve vimentinin TGF-β2 ile indüklenen ekspresyonunun apigenin tedavisi ile istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir.

7. Epitelyal belirteçlerden E-kaderinin TGF-β2 ile azalan ekspresyonunun apigenin tedavisi ile istatistiksel olarak arttığı; transkripsiyon faktörlerinden NF-κB ve fibrojenik faktörlerden α-SMA protein ekspresyonlarının ise apigenin tedavisi ile azaldığı Western-Blot ile gösterilmiştir. ZEB1 ve vimentin qt-PCR ekspresyon sonuçları Western-Blot ile desteklenerek apigenin tedavisi ile azaldığı tespit edilmiştir.

8. Apigenin uygulamasının TGF-β2 ile indüklenen EMT sürecini engelleyerek PVR gelişiminde koruyucu olabileceği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Proliferatif vitreoretinopati subretinal boşluk, retina yüzeyi ve vitreus içine hücre göçü ve proliferasyonu ile karakterizedir. Hücre proliferasyonu ise retinada oluşan hasar, kan-retina bariyerindeki bozulma ve düzenleyici büyüme faktörleri arasındaki etkileşimle ilişkilidir. Bu durum retinanın her iki yüzeyinde membran oluşumuyla sonuçlanan aşırı ve anormal bir yara iyileşmesini temsil eder. Genellikle uzun süren retina dekolmanı ve dekolman cerrahisi sonrasında ortaya çıkar. Şu anda proliferatif vitreoretinopatinin tek tedavisi cerrahidir ve gelişmesini önlemede veya hastalığın tedavisinde etkili bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır. Proliferatif vitreoretinopatinin etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için bu hastalığın oluşum sürecinin iyi anlaşılması gereklidir. Apigenin çeşitli bitkilerde bulunan antioksidatif, antiinflamatuar, antimutajenik, antiproliferatif ve antineoplastik özellikleri olan bir flavonoiddir. Transforming growth faktör-β2'nin neden olduğu hücre proliferasyonu ve göçü üzerindeki etkinliği bilinmemektedir.

Bu çalışmada, apigenin retina pigment epitel hücre çoğalması ve epitelyal-mezenkimal transformasyon üzerindeki potansiyel etkisi araştırıldı. Bu amaçla hücrelerin canlılık analizi MTT testi ile yapıldı. Kullanılacak uygun dozlar belirlendikten sonra serumdan aç bırakılmış ARPE-19 hücreleri, tek başına 10 ng/ml transforming growth faktör-β2 ile muamele edildi ve 48 saat 1,56 μM apigenin ile tedavi edildi. mRNA ve protein ekspresyonları, sırasıyla RT-qPCR ve Western blot ile değerlendirildi. Apoptoz, hoechst DNA boyama yöntemi ile tespit edildi. Tedavinin hücre göçü üzerindeki etkisi, yara iyileştirme deneyi ile değerlendirildi. Çalışmanın

istatiksel analizinde gruplar arasındaki farklılıklar için varyans analizi ve ardından çoklu karşılaştırmalar için de Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanıldı.

Çalışmamızda, apigenin apoptozu indükleyerek TGF-β2 ile indüklenen retina pigment epitel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterildi. Mezenkimal belirteçlerden fibronektin, N-kaderin ve vimentinin mRNA ekspresyonlarının TGF-β2 ile up regüle olduğu, apigenin tedavisiyle ise önemli ölçüde down regüle edildiği ortaya konuldu. Apigenin uygulaması, TGF-β2 tarafından indüklenen transkripsiyon faktörleri Twist, Snail ve ZEB1'in ekspresyonunu down regüle ederek TGF-β2'nin oluşturduğu etkileri önemli ölçüde baskıladı. Ayrıca, apigenin matriks metalloproteinaz 1, 2 ve 7'nin ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği sonucuna varıldı. Western blot ile gösterildiği üzere apigenin tedavisi NF-κB ve α-SMA sinyalini de baskılamıştır. Epitelyal belirteçlerden E-kaderin'in ekspresyonunun ise TGF-β2 ile down regüle edilirken, apigenin ile muamele edildikten sonra ekspresyonunun up regüle edildiği gösterildi.

Bu sonuçlar, apigenin, proliferasyonu ve retina pigment epitel hücrelerinin fibroblast benzeri hücrelerine dönüşmesini inhibe edebileceğini göstermektedir. Bu nedenle apigenin, proliferatif vitreoretinopatinin tedavisinde potansiyel bir terapötik değeri olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimler: Apigenin, Proliferatif vitreoretinopati, Epitelyal-mezenkimal transformasyon, Retina pigment epitel hücresi

INVESTIGATION OF THE USE OF APIGENIN, A NATURAL MOLECULE, IN THE TREATMENT OF PROLIFERATIVE VITREORETINOPATHY IN AN IN VITRO MODEL

SUMMARY

Proliferative vitreoretinopathy is characterized by cell migration and proliferation into the subretinal space, retinal surface and vitreous. Cell proliferation is associated with damage to the retina, disruption of the blood-retinal barrier, and the interaction between regulatory growth factors. This condition represents excessive and abnormal wound healing resulting in membrane formation on both surfaces of the retina. It usually occurs after prolonged retinal detachment and detachment surgery. Currently, the only treatment for proliferative vitreoretinopathy is surgery, and there are no pharmacological agents effective in preventing its development or treating the disease. In order to effectively treat proliferative vitreoretinopathy, it is necessary to understand the process of formation of this disease. Apigenin is a flavonoid with antioxidative, anti-inflammatory, antimutagenic, antiproliferative and antineoplastic properties found in various plants. Its effectiveness on cell proliferation and migration caused by transforming growth factor-β2 is unknown.

In this study, the potential effect of apigenin on retinal pigment epithelial cell proliferation and epithelial-mesenchymal transformation was investigated. For this purpose, viability analysis of the cells was performed with the MTT test. After determining the appropriate doses

to use, serum-starved ARPE-19 cells were treated with 10 ng / ml Transforming growth factor-β2 alone, then co-treated with 1,56 μM apigenin for 48 hours. mRNA and protein expressions were evaluated by RT-qPCR and Western blot, respectively. Apoptosis was detected by image-based cytometry. The effect of treatment on cell migration was evaluated by the wound healing experiment. In the statistical analysis of the study, analysis of variance was used for the differences between the groups, followed by Duncan's multiple comparison test for multiple comparisons.

In this study, it has been shown that apigenin inhibits transforming growth factor-β2-induced (TGF- β2) retinal pigment epithelial cell proliferation by inducing apoptosis. It has been revealed that the mRNA expressions of fibronectin, N-cadherin and vimentin, which are mesenchymal markers, are up-regulated by TGF-β2 and significantly down-regulated by apigenin treatment. Apigenin application significantly suppressed the effects of TGF-β2 by down-regulating the expression of the transcription factors Twist, Snail and ZEB1 induced by Transforming growth factor-β2. It was also concluded that apigenin significantly inhibited the expression of Matrix metalloproteinase1, 2 and 7. Apigenin treatment also suppressed NF-κB and α-SMA signaling, as shown by Western blotting. While the expressions of E-cadherin, which are epithelial markers, are down-regulated by TGF-β2, it has been shown that their expressions are up-regulated after treatment with apigenin.

These results indicate that apigenin may inhibit the proliferation and differentiation of retinal pigment epithelial cells into fibroblast-like cells. Therefore, we think that apigenin may have potential therapeutic value in the treatment of proliferative vitreoretinopathy.

Key words: Apigenin, Proliferative vitreoretinopathy, Epithelial-mesenchymal transformation, Retinal pigment epithelial cell

KAYNAKÇA

1. Charteris D.G: Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. The British journal of ophthalmology, 1995. 79(10): 953.

2. Wiedemann P: Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. Survey of ophthalmology, 1992. 36(5):373-384.

3. Kimoto K, Matsuo N, Nakatsuka K, Yoshioka H: p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF-beta 2 in human retinal pigment epithelium cells (ARPE-19) In: Investıgatıve Ophthalmology & Vısual Scıence, Assoc Research Vısıon Ophthalmology Inc 12300 Twınbrook Parkway, Rockwille 2004. 45(1):U312.

4. Yokoyama K, Kimoto K, Itoh Y, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H et al: The PI3K/Akt pathway mediates the expression of type I collagen induced by TGF-β2 in human retinal pigment epithelial cells. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 2012. 250(1):15-23.

5. Pastor JC, E.R.g de la Rúa, Martín F: Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. Progress in retinal and eye research, 2002. 21(1):127-44.

6. Lei H, Rheaume MA and Kazlauskas A: Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. Exp Eye Res, 2010. 90(3):376-81.

7. Lamouille S, Xu J, Derynck R: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(3):178-96.

8. Škovierová H, Okajčeková T, Strnádel J, Vidomanová E, Halašová E: Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review). Int J Mol Med, 2018. 41(3):1187-200.

9. Khan MA, Brady CJ and Kaiser RS: Clınıcal Management Of Proliferatıve Vıtreoretınopathy An Update. Retina-J Ret Vit Dis, 2015. 35(2):165-175.

10. Borhani H, Peyman GA, Rahimy MH and Thompson H: Suppression of Experimental Proliferative Vitreoretinopathy by Sustained Intraocular Delivery of 5-Fu. Int Ophthalmol, 1995. 19(1):43-49.

11. Wiedemann P, Hilgers RD, Bauer P, Heimann K and Grp DS: Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: Results of a multicenter clinical trial. American Journal of Ophthalmology, 1998. 126(4):550-559.

12. Chang YC, Hu DN and Wu WC: Effect of oral 13-cis-retinoic acid treatment on postoperative clinical outcome of eyes with proliferative vitreoretinopathy. American Journal of Ophthalmology, 2008. 146(3):440-446.

13. Wang X, Zhu Y, Zhu L, Chen X, Xu Y, Zhao Y et al: Eupatilin inhibits the proliferation of human esophageal cancer TE1 cells by targeting the Akt-GSK3β and MAPK/ERK signaling cascades. Oncol Rep, 2018. 39(6):2942-2950.

14. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A et al: The Therapeutic Potential of Apigenin. Int J Mol Sci, 2019. 20(6):1305.

15. Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T: Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. Int J Oncol, 2005. 26(1):185-189.

16. Maggioni D, Garavello W, Rigolio R, Pignataro L, Gaini R, Nicolini G: Apigenin impairs oral squamous cell carcinoma growth in vitro inducing cell cycle arrest and apoptosis. Int J Oncol, 2013. 43(5):1675-1682.

17. Iizumi Y, Oishi M, Taniguchi T, Goi W, Sowa Y, Sakai T: The flavonoid apigenin downregulates CDK1 by directly targeting ribosomal protein S9 PLoS One, 2013. 8(8):e73219.

18. Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ: Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. Free Radical Biology and Medicine, 2002. 32(5):386-393.

19. Chen R, Hollborn M, Grosche A, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A et al: Effects of the vegetable polyphenols epigallocatechin-3-gallate, luteolin, apigenin, myricetin, quercetin, and cyanidin in primary cultures of human retinal pigment epithelial cells. Mol Vis, 2014. 20(1):242-258.

20. Tamiya S, Liu LH, Kaplan HJ: Epithelial-Mesenchymal Transition and Proliferation of Retinal Pigment Epithelial Cells Initiated upon Loss of Cell-Cell Contact. Invest Ophth Vis Sci, 2010. 51(5):2755-2763.

21. Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C, Kane R: The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophth Vis Sci, 2007. 8(9):4291-4299.

22. Kimoto K, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H: p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF-beta 2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(7):2431-2437.

23. Ryan SJ: Traction retinal detachment. XLIX Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol, 1993. 115(1):1-20.

24. Newell FW: Ophthalmology: Principles and Concepts. 1992: Mosby Year Book.

25. Aydın P In: Temel Göz Hastalıkları. editors Aydın P and Akova Y. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2001. 339-366.

26. Snell RS and Lemp MA. In: Clinical Anatomy of the Eye, 2nd Edition. Oxford, UK.1998: 132-213.

27. Wilkinson CP: Evidence-based medicine regarding the prevention of retinal detachment. Trans Am Ophthalmol Soc, 1999. 97:397-404.

28. Marmor MF: Structure and function of the retinal pigment epithelium. Int Ophthalmol Clin, 1975. 15(1):115-130.

29. Federman J and Gouras P In: Retina and Vitreus.Textbook of Ophthalmology Chapter 2: Anatomy. Mosby, editors: Podos S, Yanoff M, 1994. 1-19.

30. Bone RA, Landrum JT, Dixon Z, Chen Y, Llerena CM: Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. Exp Eye Res, 2000. 71(3):239-245.

31. Kozart D In: Anatomic Corralates of the Retina (ch 1) Duane's foundations of Clinical Ophthalmology. editors: Tasman W and Jaeger E. USA: Lippincott-Raven: 1995. 445-449

32. Dinç B and Kaya Y: A Novel Hybrid Optic Disc Detection and Fovea Localization Method Integrating Region-Based Convnet and Mathematical Approach Wireless Pers Commun 2023.129:2727–2748

33. Wilkinson CP and Rice TA In: Michels's Retinal Detachment. Mosby: 1997.

34. Peyman A, Meffort A and Conway M In: Vitreoretinal Cerrahi Teknikleri, editors: Karaçorlu M, Karaçorlu S, Özdemir H, Şentürk F. 2008, İstanbul: Hayat Tıp Kitapçılık Yayınları.

35. Riordan-Eva P, Asbury T and Whitcher J In: Vaughan & Asbury's General Ophthalmology 19th 2003, Lange. 14-5

36. Sebag J In: Vitreous: the resplendent enigma. Br J Ophthalmol. 2009. 93(8):989-991.

37. Sobacı G In: Vitreusun Anatomi, Embriyoloji, Biyokimya, Histoloji, Fizyoloji ve Patofizyolojisi. Vitreoretinal Cerrahi editor: Özçetin H. İstanbul: Scala Basım Yayım 2005. 1-17

38. Hanneken A and Baird A: Soluble forms of the high-affinity fibroblast growth factor receptor in human vitreous fluid. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. 36(6):1192-6.

39. Sobacı G In: Vitreoretinal Cerrahi Proliferatif Vitreoretinopati (PVR). Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No:3, 2005:123-38.

40. Peyman G and Schulman J: Intravitreal Surgery Appleton and Lange. USA 1994, 13:587-629.

41. Campochiaro PA and Glaser BM: Mechanisms involved in retinal pigment epithelial cell chemotaxis. Arch Ophthalmol, 1986. 104(2):277-280.

42. Campochiaro PA, Jerdan JA and Glaser BM: Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells. Arch Ophthalmol, 1984. 102(12):1830-1833.

43. Campochiaro PA and Glaser BM: Platelet-derived growth factor is chemotactic for human retinal pigment epithelial cells. Arch Ophthalmol, 1985. 103(4):576-579.

44. Glaser BM, Cardin A and Biscoe B: Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction. Ophthalmology, 1987. 94(4):327-332.

45. Gilbert C, Hiscott P, Unger W, Grierson I and McLeod D: Inflammation and the formation of epiretinal membranes. Eye (Lond), 1988. 2 Suppl(1):140-56.

46. Lean S, Proliferative vitreoretinopathy In: Principles and practice of Ophthalmology, ed. R.S.a.W.C, eds. 1994: WB Saunders Company. 1110-1121

47. Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M et al: Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. Ophthalmology, 1989. 96(6):801-810.

48. Campochiaro PA, Jerdon JA and Glaser BM: The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. 27(11):1615-21.

49. Vidaurri-Leal J, Hohman R, Glaser BM: Effect of Vitreous on Morphologic Characteristics of Retinal Pigment Epithelial Cells: A New Approach to the Study of Proliferative Vitreoretinopathy. Archives of Ophthalmology, 1984. 102(8):1220-1223.

50. Schwartz D, de la Cruz ZC, Green WR and Michels RG: Proliferative vitreoretinopathy. Ultrastructural study of 20 retroretinal membranes removed by vitreous surgery, Retina. 1988. 8(4):275-281.

51. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy, Ophthalmology. 1983. 90(2):121-5.

52. Pastor JC: Proliferative vitreoretinopathy: an overview. Surv Ophthalmol, 1998. 43(1):3-18.

53. Proliferative vitreoretinopathy. The Silicone Study Group. Am J Ophthalmol, 1985. 99(5):593-595.

54. Lean JS, Stern WH, Irvine AR and Azen SP: Classification of proliferative vitreoretinopathy used in the silicone study. The Silicone Study Group. Ophthalmology, 1989. 96(6):765-771.

55. Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, Irvine AR, Lean JS, Michels RM: An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. Am J Ophthalmol, 1991. 112(2):159-165.

56. Retinal and vitreoretinal surgery. Highlights of ophthalmology, editors Boyd BF and Boyd S. 2002, Panama 459-476

57. Machemer R and Laqua H: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). Am J Ophthalmol, 1975. 80(1):1-23.

58. Campochiaro PA: Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. Arch Ophthalmol, 1997. 115(2):237-241.

59. Jones SM and Kazlauskas A: Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. Oncogene, 2000. 19(49):5558-5567.

60. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW and Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Exp Cell Res, 2003. 284(1):31-53.

61. Dinbergs ID, Brown L and Edelman ER: Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. J Biol Chem, 1996. 271(47):29822-9.

62. Ikuno Y and Kazlauskas A: An in vivo gene therapy approach for experimental proliferative vitreoretinopathy using the truncated platelet-derived growth factor alpha receptor. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(7):2406-11.

63. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S: Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. Prog Retin Eye Res, 2000. 19(1):113-129.

64. Honma Y, Nishida K, Sotozono C and Kinoshita S: Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. Exp Eye Res, 1997. 65(3):391-396.

65. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio R, Hong J, Lee J: The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma and inflammatory cells. Prog Retin Eye Res, 2001. 20(5):625-637.

66. Jester JV, Huang J, Petroll WM and Cavanagh HD: TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. Exp Eye Res, 2002. 75(6):645-657.

67. Wang HS and Chard T: The role of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the control of human fetal growth. J Endocrinol, 1992. 132(1):11-19.

68. Clemmons DR: Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(10):821-833.

69. Ryan SJ: The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in its management. Am J Ophthalmol, 1985. 100(1):188-193.

70. BM G In: Surgery for proliferative vitreretinopathy editor SJ R, 1989. 2265-80

71. Chang S, Lincoff H and Ozmert E: Management of retinal detachment with moderate PVR. editors Freeman H, Tolentino F and New York: Springer-Verlag; 1989. 54-59

72. Özmert E: Komplike retina dekolmanlarında vitreoretinal cerrahi. Oftalmoloji, 1993. 373-374

73. Kaynak S, Öztürk T and Kaya M: Retinotomi ve Retinektomi Turkiye Klinikleri J Ophthalmol-Special Topics 9, 2016.

74. Charteris DG, Sethi CS, Lewis GP and Fisher SK: Proliferative vitreoretinopathy-developments in adjunctive treatment and retinal pathology. Eye (Lond), 2002. 16(4):369-374.

75. Tano Y, Chandler DB, McCuen BW and Machemer R: Glucocorticosteroid inhibition of intraocular proliferation after injury. Am J Ophthalmol, 1981. 91(2):184-189.

76. McCuen BW, Bessler M, Tano Y, Chandler D and Machemer R: The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide. 2nd. Am J Ophthalmol, 1981. 91(6):785-788.

77. Chandler DB, Rozakis G, de Juan E and Machemer R: The effect of triamcinolone acetonide on a refined experimental model of proliferative vitreoretinopathy. Am J Ophthalmol, 1985. 99(6):686-690.

78. Tano Y, Chandler D and Machemer R: Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. Am J Ophthalmol, 1980. 90(6):810-816.

79. Chandler DB, Hida T, Sheta S, Proia AD and Machemer R: Improvement in efficacy of corticosteroid therapy in an animal model of proliferative vitreoretinopathy by pretreatment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1987. 225(4):259-265.

80. Hui YN, Hu D: Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with daunomycin and triamcinolone based on the time course of the disease. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1999. 237(7):601-605.

81. Berger AS, Cheng CK, Pearson PA, Ashton P, Crooks PA, Cynkowski T et al: Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluoruracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. 37(11):2318-2325.

82. Ward T, Hartzer M, Blumenkranz M and Lin LR: A comparison of 5-fluorouridine and 5-fluorouracil in an experimental model for the treatment of vitreoretinal scarring. Curr Eye Res, 1993. 12(5):397-401.

83. Binder S, Riss B, Skorpik C and Kulnig W: Inhibition of experimental intraocular proliferation with intravitreal 5-fluouracil. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1983. 221(3):126-129.

84. Ophir A, Blumenkranz MS and Claflin AJ: Experimental Intraocular Proliferation and Neovascularization. American Journal of Ophthalmology, 1982. 94(4):450-457.

85. Blankenship GW: Evaluation of a single intravitreal injection of 5-fluorouracil in vitrectomy cases. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol: 1989. 227(6):565-568.

86. Kon CH, Occleston NL, Foss A, Sheridan C, Aylward GW and Khaw PT: Effects of single, short-term exposures of human retinal pigment epithelial cells to thiotepa or 5-fluorouracil: implications for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. Br J Ophthalmol, 1998. 82(5):554-60.

87. Blumenkranz M, Hernandez E, Ophir A and Norton EW: 5-fluorouracil: new applications in complicated retinal detachment for an established antimetabolite. Ophthalmology, 1984. 91(2):122-130.

88. Stern WH, Guerin CJ, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH and Fisher SK: Ocular toxicity of fluorouracil after vitrectomy. Am J Ophthalmol, 1983. 96(1):43-51.

89. Wiedemann P, Sorgente N, Bekhor C, Patterson R, Tran T and Ryan SJ: Daunomycin in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Effective doses in vitro and in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985. 26(5):719-725.

90. Steinhorst UH, Hatchell DL, Chen EP and Machemer R: Ocular toxicity of daunomycin: effects of subdivided doses on the rabbit retina after vitreous gas compression. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993. 231(10):591-594.

91. Wu WC, Hu DN, Mehta S and Chang YC: Effects of retinoic acid on retinal pigment epithelium from excised membranes from proliferative vitreoretinopathy. J Ocul Pharmacol Ther, 2005. 21(1):44-54.

92. Fekrat S, de Juan E, Jr. and Campochiaro PA: The effect of oral 13-cis-retinoic acid on retinal redetachment after surgical repair in eyes with proliferative vitreoretinopathy. Ophthalmology, 1995. 102(3):412-418.

93. Nakagawa M, Refojo MF, Marin JF, Doi M and Tolentino FI: Retinoic acid in silicone and silicone-fluorosilicone copolymer oils in a rabbit model of proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. 36(12):2388-2395.

94. Veloso JAAS, Kadrmas EF, Larrosa JM, Sandberg MA, Tolentino FI and Refojo MF:13-cis-Retinoic Acid in Silicone-Fluorosilicone Copolymer Oil in a Rabbit Model of Proliferative Vitreoretinopathy. Experimental Eye Research, 1997. 65(3):425-434.

95. Bozan E and Gürelik G: Proliferatif Vitreoretinopati Tedavisinde Yeni Deneysel Ajanlar Retina Vitreus, 2004. 12: 214-223.

96. Daniels SA, Coonley KG and Yoshizumi MO: Taxol treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1990. 228(6):513-516.

97. Acar N: Proliferatif Vitreoretinopati Tedavisinde Farmakoterapi Etkili mi? Journal of Retina-Vitreus, 2013. 3:21

98. Yoo JS, Sakamoto T, Spee C, Kimura H, Harris MS, Hinton DR et al: cis-Hydroxyproline inhibits proliferation, collagen synthesis, attachment, and migration of cultured bovine retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. 38(2):520-528.

99. Lemor M, Yeo JH and Glaser BM: Oral colchicine for the treatment of experimental traction retinal detachment. Arch Ophthalmol, 1986.104(8):1226-9.

100. Berman DH and Gombos GM: Proliferative vitreoretinopathy: does oral low-dose colchicine have an inhibitory effect? A controlled study in humans. Ophthalmic Surg, 1989. 20(4):268-272.

101. Kon CH, Occleston NL, Charteris D, Daniels J, Aylward GW and Khaw PT: A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. 39(8):1524-1529.

102. Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Cheng L, Chaidhawangul S, Keefe K, McDermott CD et al: The effect of prinomastat (AG3340), a potent inhibitor of matrix metalloproteinases, on a subacute model of proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Re, 2000. 20(6):447-453.

103. Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Keefe K, Pham T, Soules K, Appelt K et al: The effect of prinomastat (AG3340), a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, on posttraumatic proliferative vitreoretinopathy. Ophthalmic Res, 2001. 33(1):20-23.

104. Iverson DA, Katsura H, Hartzer MK and Blumenkranz MS: Inhibition of intraocular fibrin formation following infusion of low-molecular-weight heparin during vitrectomy. Arch Ophthalmol, 1991. 109(3):405-409.

105. Asaria RH, Kon CH, Bunce C, Charteris DG, Wong D, Khaw PT et al: Adjuvant 5-fluorouracil and heparin prevents proliferative vitreoretinopathy : Results from a randomized, double-blind, controlled clinical trial. Ophthalmology, 2001. 108(7):1179-1183.

106. Capeáns C, Piñeiro A, Domínguez F, Loidi L, Buceta M, Carneiro C et al: A c-myc antisense oligonucleotide inhibits human retinal pigment epithelial cell proliferation. Exp Eye Res, 1998. 66(5):581-589.

107. Wong CA, Jia W and Matsubara JA: Experimental gene therapy for an in vitro model of proliferative vitreoretinopathy. Can J Ophthalmol, 1999. 34(7):379-384.

108. Gao Q, Hui Y and Wang Y: [Effects of hypericin on traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbits]. Yan Ke Xue Bao, 2002. 18(4):240-245.

109. de Souza OF, Sakamoto T, Kimura H, Koda RP, Gabrielian K, Spee C et al: Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits by suramin. Ophthalmologica, 1995. 209(4):212-216.

110. Davis P and Parrish R.: Antiproliferative agents in:Principles and practice of ophthalmology. editors: Albert D and Jacobiec F. Philadelphia WB Saunders Company, 1994. 1085- 1091.

111. Demircan N, Polat S, Yağmur M, Özbilgin M, Kaya M and Varinli D: İntravitreal 5-Flourourasil'in retinada neden olduğu ultrastrüktürel değişikler. T Klin Oftalmoloji, 1996. 5:221-226.

112. Hostetler GL, Ralston RA and Schwartz SJ: Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. Adv Nutr, 2017. 8(3):423- 435.

113. Lizumi Y, Oishi M, Taniguchi T, Goi W and Sowa Y: The Flavonoid Apigenin Downregulates CDK1 by Directly Targeting Ribosomal Protein S9. University of Hawaii Cancer Center, United States of America. 2013.8(8):e73219.

114. Peng Q, Deng Z, Pan H, Gu L, Liu O and Tang Z: Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer. Oncol Lett, 2018. 15(2):1379-1388.

115. Sloley BD, Urichuk LJ, Morley P, Durkin J, Shan JJ, Pang PK et al: Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential Neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves. J Pharm Pharmacol, 2000. 52(4):451-459.

116. Panda S and Kar A: Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. J Pharm Pharmacol, 2007. 59(11):1543-1548.

117. Chao SC, Huang SC, Hu DN and Lin HY: Subtoxic Levels of Apigenin Inhibit Expression and Secretion of VEGF by Uveal Melanoma Cells via Suppression of ERK1/2 and PI3K/Akt Pathways. Evid Based Complement Alternat Med, 2013(6):817674.

118. Xu X, Li M, Chen W, Yu H, Yang Y and Hang L: Apigenin Attenuates Oxidative Injury in ARPE-19 Cells thorough Activation of Nrf2 Pathway. Oxid Med Cell Longev, 2016(4):4378461.

119. Gonzalez DM and Medici D: Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Sci Signal, 2014. 7(344):re8.

120. Girard P, Mimoun G, Karpouzas I and Montefiore G: Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. Retina, 1994. 14(5):417-424.

121. Bonnet M, Fleury J, Guenoun S, Yaniali A, Dumas C and Hajjar C: Cryopexy in primary rhegmatogenous retinal detachment: a risk factor for postoperative proliferative vitreoretinopathy? Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1996. 234(12):739-743.

122. Vitrectomy with silicone oil or perfluoropropane gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: results of a randomized clinical trial. Silicone Study Report 2. Arch Ophthalmol, 1992. 110(6):780-792.

123. McCuen BW, Azen SP, Stern W, Lai MY, Lean JS, Linton KL et al: Vitrectomy with silicone oil or perfluoropropane gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy 2nd. Silicone Study Report 3. Retina, 1993. 13(4):279-284.

124. Uyar F: Deneysel Proliferatif Vitreoretinopati Modelinde Takrolimus'un Etkinliği Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2010.

125. Evren Ö: Deneysel Proliferatif Vitreoretinopati Modelinde Oktreotid'in Etkinliği. Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2010.

126. Iverson D, Dailey W and Hartzer M: Pars plana lensectomy, vitrectomy and transvitreous diathermy in the rabbit eye: a model of PVR Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. 32(1):856-857.

127. Blumenkranz MS, Ophir A, Claflin AJ and Hajek A: Fluorouracil for the treatment of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol, 1982. 94(4):458-467.

128. Karakaya M, Albayrak S, Pehlivanoglu S, Ozkaya A and Gocgil NA: 5-Fluorouracyl added infusion fluid in patients with recurrent rhegmatogeneous retinal detachment. Saudi J Ophthalmol, 2019. 33(1):56-60.

129. Wang HF, Ma JX, Shang QL, An JB and Chen HT: Crocetin inhibits the proliferation, migration and TGF-β(2)-induced epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. Eur J Pharmacol, 2017. 815(2):391-398.

130. Lin HY, Chen YS, Wang K, Chien HW, Hsieh YH and Yang SF: Fisetin inhibits epidermal growth factor-induced migration of ARPE-19 cells by suppression of AKT activation and Sp1-dependent MMP-9 expression. Mol Vis, 2017. 23(3):900-10.

131. Chen CL, Chen YH, Tai MC, Liang CM, Lu DW and Chen JT: Resveratrol inhibits transforming growth factor-β2-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelial cells by suppressing the Smad pathway. Drug Des Devel Ther, 2017. 11(2):163-173.

132. Wang K, Chen PN, Chien HW, Hsieh YH, Lee CY, Yu NY et al: Demethoxycurcumin inhibits the cell migration and MMP-2 expression in human retinal pigment epithelial cells by targeting the STAT-3 pathway. Exp Eye Res, 2021. 213(1):108843.

133. Fidelis QC, Faraone I, Russo D, Aragão Catunda-Jr FE, Vignola L, de Carvalho MG et al: Chemical and Biological insights of Ouratea hexasperma (A. St.-Hil.) Baill.: a source of bioactive compounds with multifunctional properties. Nat Prod Res, 2019. 33(10):1500-1503.

134. Villa-Rodriguez JA, Kerimi A, Abranko L, Tumova S, Ford L, Blackburn RS et al: Acute metabolic actions of the major polyphenols in chamomile: an in vitro mechanistic study on their potential to attenuate postprandial hyperglycaemia. Sci Rep, 2018. 8(1):5471.

135. Lim R, Barker G, Wall CA and Lappas M: Dietary phytophenols curcumin, naringenin and apigenin reduce infection-induced inflammatory and contractile pathways in human placenta, foetal membranes and myometrium. Mol Hum Reprod, 2013. 19(7):451-462.

136. Zhou Z, Zhang Y, Lin L and Zhou J: Apigenin suppresses the apoptosis of H9C2 rat cardiomyocytes subjected to myocardial ischemia-reperfusion injury via upregulation of the PI3K/Akt pathway. Mol Med Rep, 2018. 18(2):1560-1570.

137. Bertoli C, Skotheim JM and de Bruin RA: Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(8):518-528.

138. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Brandner G and Hess RD: Flavonoids activate wild-type p53. Oncogene, 1996.13(8):1605-1614.

139. Chen H, Wang H, An J, Shang Q and Ma J: Plumbagin induces RPE cell cycle arrest and apoptosis via p38 MARK and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in PVR. BMC Complement Altern Med, 2018. 18(1):89.

140. Zhou X, Kuang X, Long C, Liu W, Tang Y, Liu L et al: Curcumin Inhibits Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells Via Multiple Pathways. Curr Mol Med, 2017. 17(4):312-319.

141. Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Sak K, Garg VK, Buttar HS et al: Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. Journal of Functional Foods, 2018. 48(5):457-471.

142. Pugazhenthi S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE et al: Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. J Biol Chem, 2000. 275(15):10761-6.

143. Şirin N, Elmas L, Seçme M and Dodurga Y: Investigation of possible effects of apigenin, sorafenib and combined applications on apoptosis and cell cycle in hepatocellular cancer cells. Gene, 2020. 737(5):144428.

144. Yin F, Giuliano AE and Van Herle AJ: Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). Anticancer Res, 1999. 19(5b):4297-4303.

145. Iskender B, Izgi K, Hizar E, Jauch J, Arslanhan A, Yuksek EH et al: Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer cells via modulation of mTOR signalling. Tumour Biol, 2016. 37(6):8281-8291.

146. Gumbiner BM: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell, 1996. 84(3):345-357.

147. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I and Suyama K: Cadherin switch in tumor progression. Ann N Y Acad Sci, 2004.1014(1):155-163.

148. Yang HW, Kim HJ, Park JH, Shin JM and Lee HM: Apigenin alleviates TGF-β1-induced nasal mucosa remodeling by inhibiting MAPK / NF-kB signaling pathways in chronic rhinosinusitis. PLoS One, 2018. 13(8):e0201595.

149. Ji J, Yu Q, Dai W, Wu L, Feng J, Zheng Y et al: Apigenin Alleviates Liver Fibrosis by Inhibiting Hepatic Stellate Cell Activation and Autophagy via TGF-β1/Smad3 and p38/PPARα Pathways. PPAR Res, 2021. 2021(3):6651839.

150. Qin Y, Zhao D, Zhou HG, Wang XH, Zhong WL and Chen S: et al. Apigenin inhibits NF-κB and snail signaling, EMT and metastasis in human hepatocellular carcinoma. Oncotarget, 2016. 7(27):41421-31.

151. Markopoulos GS, Roupakia E, Marcu KB and Kolettas E: Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokine-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Cell Transition and Cancer Stem Cell Generation Cells, 2019;8(10).

152. Derynck R, Zhang Y, Feng XH: Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses Cell, 1998. 95(6):737-740.

153. Massagué J, Seoane J and Wotton D: Smad transcription factors. Genes Dev, 2005. 19(23):2783-2810.

154. Zeng J, Zhan P, Wu G, Yang W, Liang W, Lv T et al: Prognostic value of Twist in lung cancer: systematic review and meta-analysis. Transl Lung Cancer Res, 2015. 4(3):236-241.

155. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M et al: DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. Oncogene, 2005. 24(14):2375-2385.

156. Lu J, Fei F, Wu C, Mei J, Xu J and Lu P: ZEB1: Catalyst of immune escape during tumor metastasis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022. 153(5):113490.

157. Cui N, Hu M and Khalil RA: Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. 147(7):1-73.

158. Smith BN, Bhowmick NA: Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. J Clin Med, 2016. 5(2).

159. Peng L, Wen L, Shi QF, Gao F, Huang B, Meng J et al: Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF-κB/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation. Cell Death Dis, 2020. 11(11):978.

160. Cho C, Kang LJ, Jang D, Jeon J, Lee H, Choi S et al: Cirsium japonicum var. maackii and apigenin block Hif-2α-induced osteoarthritic cartilage destruction. J Cell Mol Med, 2019. 23(8):5369-5379.

161. Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, Sein TT et al: Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. Clin Exp Metastasis, 2000. 18(5):423-428.

162. He J, Xu Q, Wang M, Li C, Qian X, Shi Z et al: Oral administration of apigenin inhibits metastasis through AKT/P70S6K1/MMP-9 pathway in orthotopic ovarian tumor model. Int J Mol Sci, 2012. 13(6):7271-7282.

163. Feinman R, Siegel DS and Berenson J: Regulation of NF-kB in multiple myeloma: therapeutic implications. Clin Adv Hematol Oncol, 2004. 2(3):162-166.

164. Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. Oncogene, 1999. 18(49):6853-6866.

165. Huang T, Chen Z and Fang L: Curcumin inhibits LPS-induced EMT through downregulation of NF-κB-Snail signaling in breast cancer cells. Oncol Rep, 2013. 29(1):117-124.

166. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE and Stark GR: Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. Genes Dev, 2007. 21(11):1396-1408.

167. Yu H, Pardoll D, Jove R: STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nat Rev Cancer, 2009. 9(11):798-809.

168. He G, Karin M: NF-κB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. Cell Res, 2011. 21(1):159-68.

169. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z et al: Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. Cancer Cell, 2009. 15(4):283-293.

170. Ai XY, Qin Y, Liu HJ, Cui ZH, Li M, Yang JH et al: Apigenin inhibits colonic inflammation and tumorigenesis by suppressing STAT3-NF-κB signaling. Oncotarget, 2017. 8(59):100216-26.

171. Li J, Mao B, Tang X, Zhang Q, Zhao J, Zhang H et al: Protective Effects of Naringenin and Apigenin in Ameliorating Skin Damage via Mediating the Nrf2 and NF-κB Pathways in Mice. Foods, 2023. 12(11).