

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PREMATÜRE RETİNOPATİLİ BEBEKLERDE
LRP5, FZD4, TSPAN12, NORRIE İLİŞKİLİ
GEN VARYANTLARI İLE VEGF NOKTA
MUTASYONLARININ TESPİTİ VE PROGNOZA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Oğuzhan ÖZÇELİK

İZMİR-2024

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PREMATÜRE RETİNOPATİLİ BEBEKLERDE
LRP5, FZD4, TSPAN12, NORRIE İLİŞKİLİ
GEN VARYANTLARI İLE VEGF NOKTA
MUTASYONLARININ TESPİTİ VE PROGNOZA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Oğuzhan ÖZÇELİK

(0000-0001-9862-7247)

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Doç. Dr. Ziya AYHAN

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri
tarafından desteklenmiştir (Proje no: TTU-2024-3479).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLolar LİSTESİ	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
TÜRKÇE ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epidemiyoloji	3
2.2. Prematüre Retinopatisi Patogenezi	4
2.3.1. Doğum Ağırlığı ve Doğum Haftası	5
2.3.2. Oksijen kullanım süresi ve miktarı	6
2.3.3. Transfüzyon	7
2.3.4. Steroid tedavisi	7
2.3.5. Sürfaktan Tedavisi	7
2.3.6. Bronkopulmoner Displazi ve Respiratuvar Distres Sendromu	8
2.3.7. Sepsis	8
2.3.8. İntrakraniyel Kanama	8
2.3.9. Apgar skoru	9
2.4. Prematüre Retinopatisi Sınıflaması	9
2.5. Klinik Seyir	16
2.6. Prematüre Retinopatisi Taraması	16
2.7. İzlem	17
2.8. Tarama Muayenelerinin Sonlandırılması	19
2.9. Prematüre Retinopatisi Tedavisi	20
2.9.1. Lazer Fotokoagülasyon	21

2.9.2. Anti-VEGF Ajanlar	22
2.9.3. Cerrahi Girişim	25
2.10. Tedavi Sonrası Takip	25
2.11. Prognoz	26
2.12. NDP, FZD4, LRP5, TSPAN12 Gen Varyantları	27
2.12.1. Norrie Hastalığı Proteini (NDP)	27
2.12.2. Frizzled 4 (FZD4)	29
2.12.3. LDL Reseptör İlişkili Protein 5 (LRP5)	29
2.12.4. Tetraspanin 12 (TSPAN12)	30
2.13. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1.Genetik Analizler için Uygulanacak Yöntemler	35
3.1.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	35
3.1.2. Genomik DNA'nın saflığının ve miktarının ölçülmesi	37
3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanması ve Dizi Analizi	37
3.1.4. Yürütülen Örneklerin Analizi	39
3.2. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Mutasyon Analizi	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR	58
8.EKLER	75
8.1. Ek 1. Etik Kurul	75

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve uygulanmasında yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini paylaşan tez danışman hocalarım Prof. Dr. Arif Taylan Öztürk ve Doç. Dr. Ziya Ayhan başta olmak üzere desteğini her zaman arkamda hissettiğim, tıbbi bilgisini hiçbir zaman benden esirgemeyen, ilk ve daha nice katarakt ameliyatımı yaptıran, bende büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanı'mız sayın hocam Prof. Dr. Gül Arıkan'a;

Asistanlık hayatım boyunca mesleki bilgi, beceri ve tecrübelerini iyi bir oftalmolog olarak yetişmem için benimle paylaşmaktan çekinmeyen Dokuz Eylül Göz ailesinden değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Osman SAATÇİ'ye, Prof. Dr. İsmet DURAK'a, Prof. Dr. Meltem SÖYLEV BAJİN'e, Prof. Dr. Aylin YAMAN'a, Prof. Dr. Nilüfer KOÇAK'a, Prof. Dr. Canan Aslı YILDIRIM'a, eğitim gördüğüm dönemde kurumdan ayrılan/emekli olan saygıdeğer Prof. Dr. Tülin BERK'e, Prof. Dr. Üzeyir GÜNENÇ'e, Prof. Dr. Aylin YAMAN'a, Prof. Dr. Zeynep ÖZBEK'e, Doç. Dr. Mahmut KAYA'ya ve ailemize yeni katılan Doç. Dr. Ömer KARTI'ya, Doç. Dr. Meryem Altın EKİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Özlem Ural FATİHOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Ali DEVEBACAK'a;

Tezimin Tıbbi Biyoloji ve Genetik kısmını ilgilendiren her alanında yardımlarını hiç esirgemeyen Prof. Dr. Asude DURMAZ'a;

Asistanlık dönemim sırasında büyük özveri ile çalışan iş birlikleri ve her zaman verdikleri destekleriyle yanımda olan yol arkadaşlarım tüm asistan ve uzman olmuş doktor arkadaşlarıma, hemşire, sekreter ve personel ekibine;

Her zaman karşılıksız destek ve fedakârlıklarıyla yanımda olan, zorlandığımda devam etmemi sağlayan bu ailenin bir ferdi olduğum için gurur duyduğum canım annem Medine ÖZÇELİK, canım babam Ergun ÖZÇELİK ve canım kardeşim Selin ÖZÇELİK'e;

Hayatımın her alanında sevgisi ve sonsuz desteği ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Dilara Feray ÖZÇELİK'e;

Yürekten ve içten teşekkürlerimle...

Dr. Oğuzhan ÖZÇELİK

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Ülkemiz İçin “Önerilen” PR Tarama Kriterleri	16
Tablo 2. Gebelik Yaşına Göre İlk PR Muayenesi Zamanı	17
Tablo 3. DNA izolasyon basamakları kit içeriği	36
Tablo 4. Hastaların PR evrelerine göre gruplandırılması	41
Tablo 5. Prematüre bebeklerin dağılımı ve demografik özellikleri	45
Tablo 6. Hastaların risk faktörlerine göre gruplandırılması	46
Tablo 7. Hastaların tedavi yöntemlerine göre gruplandırılması	47
Tablo 8. FZD4, LRP5, TSPAN12, NDP ve VEGF gen varyantlarının genetik mutasyonel analizi	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hastalığın yerleşim durumu	9
Şekil 2. Evre 1 PR (Demarkasyon hattı)	11
Şekil 3. Evre 2 PR (Ridge)	11
Şekil 4. Evre 3 PR (Ekstraretinal Fibrovasküler Proliferasyon)	12
Şekil 5. Evre 4A PR (Parsiyel Retina Dekolmanı, Makula tutulumu yok)	12
Şekil 6. Evre 4B PR (Parsiyel Retina Dekolmanı, Makula tutulumu var)	13
Şekil 7. Evre 5A PR [Arka kutbun görülebildiği total Traksiyonel Retina Dekolmanı (TRD)]	13
Şekil 8. Prematüre retinopatisi izlem algoritması	19
Şekil 9. Prematüre retinopatisi tedavi algoritması	21
Şekil 10. LRP5: c.3357G>A varyantlarına ait dizi analizi görüntüsü	38
Şekil 11. VEGFA: +405C>G varyantlarına ait dizi analizi görüntüsü	39
Şekil 12. Hastaların gruplara göre dağılımı	42
Şekil 13. Grupların cinsiyet dağılımı	42
Şekil 14. Grupların doğum ağırlıklarının dağılımı	43
Şekil 15. Grupların doğum haftalarının dağılımı	44
Şekil 16. Hastaların tedavi yöntemlerinin dağılımı	47

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BPD: Bronkopulmoner Displazi

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

FEVR: Familyal Eksudatif Vitreoretinopati

FFA: Fundus Fluoresein Anjiyografisi

FLT: Fms-like tyrosine kinase / Fms benzeri tirozin kinaz

FZD4: Frizzled 4

GY: Gestasyonel Yaş

HbF: Hemoglobin F

HIF1a: Hipoksi ile indüklenen faktör 1a

iBRB: inner Blood-Retinal Barrier / İç Kan Retina Bariyeri

LRP5: LDL receptor-related protein / LDL reseptör ilişkili protein

MGP: MagNA Pure Magnetic Glass particle

NDP: Norrie disease protein / Norrie hastalığı proteini

NSVY: Normal spontan vajinal yol

OD: Optik dansite

OSB: Optik sinir başı

PAR: Persistan Avasküler Retina

PCR: Polymerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFVS: Persistan Fetal Vasküler Sendrom

PLVAP: Plazmalemma Vezikül İlişkili Protein

PM: Post Menstrüel

PR: Prematüre Retinopati

RBC: Red Blood Cell / Kırmızı Kan Hücresi

RNA: Ribonükleik Asid

RPE: Retina Pigment Epiteli

TKR: Tirozin Kinaz Reseptörü

TRD: Traksiyonel Retina Dekolmanı

TSPAN12: Tetraspanin 12

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor / Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Amaç: Prematüre retinopatili (PR) bebeklerde *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve *VEGF* nokta mutasyonlarının tespitinin raporlanması ve prognoza etkisinin değerlendirilmesi.

Materyal-Metot: Çalışmaya Ocak-Ağustos 2024 tarihleri arasında kliniğimize başvuran 67 hasta dahil edildi (Grup 1= 27, Grup 2= 19, Grup 3= 21). Hastaların alınan periferik venöz kanlarındaki *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantları *VEGF* nokta mutasyonları, hastaların demografik ve klinik bilgileri karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmadaki hastaların %50,7'si erkek %49,3'ü kadındı. Bebeklerin gestasyonel yaş ortalaması $29,8 \pm 3,0$ hafta olup Grup 1'teki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşları Grup 2 ve Grup 3'tekilere göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.01$). Doğum ağırlıkları ortalaması $1412,5 \pm 681,2$ gramdı ve Grup 1'deki bebeklerin ortalama doğum ağırlıkları da Grup 2 ve Grup 3'e göre anlamlı yüksek saptandı ($p < 0.01$). Grupların cinsiyetleri ve doğum şekilleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,20$). Risk faktörleri açısından bakıldığında gruplar arasında fototerapi ihtiyacı, oksijen ihtiyacı, kan transfüzyonu, sepsis öyküsü ve sürfaktan ihtiyacı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p = 0,01$, $p = 0,02$, $p = 0,03$, $p = 0,01$, $p < 0,01$). Gruplar arasında *LRP5* varyantı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($p = 0,018$), diğer genetik varyantlar açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Grup 2 ve 3'teki hastalarda Grup 1'dekilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha çok hastada *LRP5* gen varyantları saptandı ($p = 0,02$, $p = 0,03$). *VEGF*: +405C>G (*dbSNP*: rs2010963) varyantının GG varyantı ise PR olan grupta daha yüksek hastada saptandı ($p = 0,022$).

Sonuç: *TSPAN12*, *LRP5*, *NDP*, *FZD4* ve *VEGF* genlerindeki polimorfizmler, retinal vaskülarizasyon sürecini etkileyerek PR patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Bunun yanında oksijen tedavisi, sepsis ve kan transfüzyonları gibi diğer risk faktörleri, hastalığın klinik seyrini etkileyerek PR'nin şiddetini artırmaktadır.

Anahtar kelimeler: FZD4, LRP5, NDP, Prematüre retinopatisi, TSPAN12, VEGF

ABSTRACT

Aim: To report the detection of *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie-related gene variants, and *VEGF* point mutations in infants with premature retinopathy (PR) and to evaluate their effect on prognosis.

Material-Method: Between January and August 2024 who applied to our clinic, 67 patients were included in the study (Group 1= 27, Group 2= 19, Group 3= 21). *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie-related gene variants, and *VEGF* point mutations in the peripheral venous blood samples of the patients were compared with the demographic and clinical information of the patients.

Results: In the study, 50,7% of the patients were male, and 49,3% were female. The mean gestational age of the babies was $29,8 \pm 3,0$ weeks, and the mean gestational age of the babies in Group 1 was significantly higher than in Group 2 and Group 3 ($p < 0,01$). The mean birth weight was $1412,5 \pm 681,2$ grams, and the mean birth weight of the babies in Group 1 was also significantly higher than in Group 2 and Group 3 ($p < 0,01$). No statistically significant difference was found between the groups regarding gender and delivery method ($p = 0,20$). When examined in terms of risk factors, statistically significant differences were found between the groups in terms of phototherapy need, oxygen need, blood transfusion, sepsis history, and surfactant need ($p = 0,01$, $p = 0,02$, $p = 0,03$, $p = 0,01$, $p < 0,01$). While a statistically significant difference was found between the groups in terms of the *LRP5* variant ($p = 0,018$), no statistically significant difference was found in other genetic variants. In Groups 2 and 3, *LRP5* gene variants were detected in a statistically significantly higher number of patients than in Group 1 ($p = 0,02$, $p = 0,03$). The GG variant of the *VEGF*:+405C>G (*dbSNP*: rs2010963) variant was detected in more patients in the PR group ($p = 0,022$).

Conclusion: Polymorphisms in *TSPAN12*, *LRP5*, *NDP*, *FZD4*, and *VEGF* genes play a critical role in the pathogenesis of PR by affecting the retinal vascularization process. In addition, other risk factors, such as oxygen therapy, sepsis, and blood transfusions, increase the severity of PR by affecting the clinical course of the disease.

Keywords: FZD4, LRP5, NDP, Retinopathy of prematurity, TSPAN12, VEGF

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağındaki körlüğün başlıca nedenlerinden biri, prematüre doğan yenidoğanlarda retinal vaskülogenezin durması ve anormal neovaskülarizasyon oluşması sonucu ortaya çıkan prematüre retinopatisidir (PR). Multifaktöryel patogeneze sahip olan PR'de çevresel faktörlerin genetik yatkınlıkla birleşimi hastalığın şiddetini belirler (1,2). Retinal vasküler homeostaz, retinal vasküler gelişim sırasında prematüre doğum ve çevresel değişkenler (oksijen tedavisi, hipoksi) tarafından bozulabilir (3).

Literatürde, Frizzled 4 (*FZD4*), (LDL reseptör ilişkili protein 5) *LRP5*, Tetraspanin 12 (*TSPAN12*) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (*VEGF*) dahil olmak üzere genetik varyantların güncel genetik araştırmalar sonucunda PR'yi nasıl şiddetlendirebileceğini gösteren örnekler bulunmaktadır. Özellikle, *VEGF* geninin rs833061 ve rs2010963 polimorfizmleri retinal neovaskülarizasyon süreçlerini etkiler ve şiddetli PR'nin ortaya çıkmasında rol oynar (4). Ayrıca, *FZD4* mutasyonlarının, retinal vaskülogenezi engellediği ve retinal vasküler gelişimi önemli ölçüde bozduğu gösterildiği için progresif PR ile ilişkilendirilmiştir (5). Bu genetik değişkenler, çevresel risk faktörleriyle eşleştirildiğinde tedaviye yanıtı etkileyebilir ve hastalığın seyrini hızlandırabilir (3)

Avasküler periferik retina ve yetersiz retinal vaskülarizasyon, genetik olarak aynı durumlar olan hem familyal eksüdatif vitreoretinopati (FEVR) hem de PR'nin ayırt edici özellikleridir. FEVR genetik mutasyonlarla bağlantılı olsa da PR genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerden de etkilenir. Bu iki bozukluk arasındaki ortak bir patofizyolojik mekanizma, *FZD4*, *LRP5* ve *TSPAN12* gibi genetik anormalliklerin tanımlanmasıyla gösterilmiştir (6,7).

Prematüre retinopatisinin gelişiminde kritik öneme sahip olan *TSPAN12*, *LRP5*, *NDP*, *FZD4* ve *VEGF* genlerindeki mutasyonlar, retinal vaskülarizasyonun uygun gelişimini engelleyebilir ve dolayısıyla durumun ciddiyetini artırabilir. Retinal vasküler gelişimi bozan ve belirli genlerin aşırı ekspresyonuna yol açan polimorfizmlerin bir sonucu olarak PR ortaya çıkabilir. Son araştırmalara göre, *VEGF* ve diğer genetik varyantlar hastalığın ciddiyetini ve seyrini önemli ölçüde etkiler. Güncel yaklaşımda anti-*VEGF* tedavi, klinik uygulamada giderek daha büyük bir rol oynamaktadır (3,8).

Tetraspanin12 (TSPAN12), LRP5, NDP, FZD4 ve VEGF genlerindeki polimorfizmler, retinal vaskularizasyon sürecini etkileyerek PR'nin patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır. Bunun yanında, düşük doğum ağırlığı, postnatal ağırlık kazanımı, oksijen tedavisi, sepsis ve kan transfüzyonları gibi diğer risk faktörleri, hastalığın klinik seyrini etkileyerek PR'nin şiddetini artırmaktadır. Hem genetik hem de çevresel faktörlerin PR'nin tanı ve tedavisinde dikkate alınması gerektiği açıktır. Erken tanı, genetik testler ve klinik risk değerlendirmeleri ile prematüre bebeklerde görme kaybının önlenmesi mümkün olabilir. Literatürde, PR'li bebeklerde *LRP5, FZD4, TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve *VEGF* nokta mutasyonları ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Bu gen varyantlarının ve polimorfizmlerinin tespitinin raporlanması ve prognoza etkisinin değerlendirilmesiyle literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Prematüre retinopatisi ilk olarak 1942 yılında Jerry ve ark. tarafından primer değişikliğin embriyonik hyaloid sistem proliferasyonu ile ilişkili olduğu izlenimi edinildiğinden “Retrolental Fibroplazi” olarak tanımlanmıştır.(9,10). Prematüre retinopatisi düşük doğum ağırlıklı, prematüre doğan bebeklerde görülen anormal retinal damar oluşumuna bağlı gelişen vazoproliferatif bir retinopatidir. Yenidoğanlarda oksijen kullanımının kontrolsüz olduğu 1950’li yıllarda PR sıklığı artmış ve Ashton ve ark. çalışmasında hiperoksiye bağlı damar kaybı (Faz 1) ve hipoksiye bağlı vazoproliferasyon (Faz 2) mekanizmasını ortaya koymuştur. Faz 1 teorisinde hiperoksi durumu retinada hipoksinin indüklediği büyüme faktörlerinin (*VEGF*, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), eritropoetin) salınımını azaltıp anjiyogenezi engelleyerek fizyolojik retina gelişiminde duraksamaya neden olmaktadır. Faz 2 teorisinde ise avasküler retinanın gelişimi için gerekli metabolik ihtiyacın karşılanamaması ve vasküler gelişimin durmasıyla ortaya çıkan hipoksi sonucunda anjiyogenik faktörlerin anormal salınımı söz konusudur (11). Kontrolsüz oksijen tedavisinin bu etkisinin saptanmasıyla yenidoğan ünitelerindeki sınırsız oksijen tüketimi kısıtlanmıştır.

Pulse oksimetre ve transkutan parsiyel oksijen basınç elektrodunun bulunmasıyla 1970’li yıllarda verilen oksijen konsantrasyonun miktarı ayarlanabilmiştir. İndirekt oftalmoskopun da kullanıma girmesi ile PR’nin hafif formları tanınmaya başlanmış, 1980 ve 1990’larda yoğun bakım üniteleri oksijen tedavisi, E vitamini desteği, ışık düzeyi, kriyoterapi, lazer fotokoagülasyon ile ilgili çok sayıda çalışma yapılarak yeni tedavi stratejileri geliştirilmiş ve PR’ye bağlı komplikasyonlarda azalma görülmüştür. Kriyoterapinin uzun dönemde miyopi riskini ciddi derecede artırdığı gözlenerek lazer fotokoagülasyon altın standart tedavi olmuştur (12).

Anti-*VEGF* tedavi 2000’li yıllarda ön plana çıkmaya başlamış olup anti-*VEGF* ajanlar ile ilgili çalışma sayıları giderek artmaktadır. Bu çalışmalardan en önemlisi 2011 yılında yapılan lazer fotokoagülasyon ile anti-*VEGF* tedavisinin karşılaştırıldığı çalışmadır. Bu çalışmada anti-*VEGF* tedavisiyle hastalığın tekrarlama riskinin %22’den yüzde dörtlere kadar düştüğü gösterilmiştir (13).

Prematüre retinopatisi sıklığı ülkelerin gelişmişlik seviyelerine, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin koşullarına göre farklılık göstermektedir. Prematüre retinopatisi gelişmiş ülkelerde 28 hafta altında doğan yenidoğanların hastalığı iken gelişmekte olan ülkelerde 34 haftaya kadar olan yenidoğanlarda ileri evre PR geliştiği bildirilmektedir. İlk PR epidemisi 1950’li yıllarda Amerika’da saptanmış olup 7000 bebeğin bu nedenle kör olduğu bildirilmiştir (14). *Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity* (CRYO-ROP) çalışmasında doğum ağırlığı 1251 gramın altında 4099 yenidoğan incelenmiş ve bir veya iki gözde PR sıklığı %65,8 olarak saptanmıştır (15) “*Early Treatment for Retinopathy of Prematurity* (ETROP)” (Prematüre retinopatisinin erken tedavisi) çalışmasında, doğum ağırlığı 750 gramdan düşük olan yenidoğanların %92,7’sinde, doğum ağırlığı 750-999 gram olanların %75,8’inde ve doğum ağırlığı 1000-1250 gram olan yenidoğanların ise %43,7’sinde PR geliştiği saptanmıştır (16).

Türk Neonatoloji Derneği’nin 2014 yılında ülkemizde yaptığı çok merkezli çalışmada çok düşük doğum ağırlıklı preterm bebeklerde PR sıklığı %42, ileri evre PR sıklığı %8,2 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada gestasyonel yaşı 32 haftanın üzerindeki bebeklerde PR sıklığı %13,3, ileri evre PR binde dört olarak saptanmıştır. Gebelik yaşı 32 hafta üzerinde olan 20 bebekte, doğum ağırlığı 1500 gram üzerinde olan 41 bebekte ve doğum ağırlığı 2000 gram üzerinde olan üç bebekte ileri evre PR saptanmıştır (17).

2.2. Prematüre Retinopatisi Patogenezi

Gestasyonun 16. haftasına kadar fetüsün retinası avaskülerdir ve altıncı gestasyonel haftada oluşmuş olan koroid damarları tarafından beslenir. Retina kan damar gelişimi 16. haftada başlamakta olup nazal retina 36. temporal retina ise 40-42. gestasyonel haftalarda tamamlanır. Bu nedenle prematüre doğan bebeklerin retina damarları tam olarak gelişim göstermemiştir ve gestasyonel haftaya bağlı olarak perifer retinada avasküler alanlar mevcuttur (18).

Prematüre retinopatisinin patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte hipotez olarak bifazik bir süreçte geliştiği düşünülmektedir. Prematüre doğan bebekte intrauterin ortamda başlamış olan ancak tamamlanmamış olan retinal vaskülarizasyon herhangi bir hasarlandırıcı etkiyle duraklar. Uzamış hiperoksi,

hipotermi, asfiksi, asidoz ve E vitamini eksikliği gibi faktörler hasarlanmanın olası sebepleri arasında gösterilmektedir (19).

Prematüre retinopatisinin başlangıç evresi ‘Faz I: Hiperoksik Faz’ olarak tanımlanmaktadır. Bu fazda normal retinal vaskülarizasyon için gerekli olan *VEGF* salınımı hiperoksi sonucu baskılanıp normal vasküler büyümenin durması ve takiben mevcut damarların regresyonu meydana gelir. PR’nin ikinci fazı ise hipoksi tarafından sürdürülür ve bu evre ‘Faz II: Hipoksik Faz’ olarak tanımlanmaktadır.

Oksijenin neden olduğu şiddetli vazospazm ve sonucunda hipoksiyi takiben retinada *VEGF* salınımı artar. Hipoksiye yol açan tekrarlayan apneler, bronkopulmoner displazi, anemi gibi çeşitli faktörlerin varlığında retinanın metabolik aktivitesinin artışı, *VEGF* salınımını daha da artırır. Faz 2’de, retina gelişimine devam eder fakat vaskülarizasyon yeterli olmadığı için oksijen ihtiyacını karşılayamaz ve hipoksik hale gelir (20). Hipoksinin indüklediği büyüme faktörlerinin [angiopontin, hipoksi ile indüklenen faktör 1a (HIF-1 α) / HIF-2 α , fibroblast büyüme faktörü (FGF), *VEGF*, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), EPO(Eritropoetin)] aşırı salınımına neden olur (21). Bu mediyatörlerin düzeylerindeki artış yeni damar oluşumunu tetikler. Permeabilitesi artmış anormal yeni damarlar gelişir. *VEGF*’deki bu artış retinada sıklıkla anormal vaskülarizasyonun başlamasına yol açar. Vaskülarizasyon normal bir şekilde olursa PR geriler. Anormal vaskülarizasyon sonucu progresif retinopati meydana gelir. Yeni oluşan damarlar retina içinde kümelenme yapabilir ve hızla kalınlaşan ridge (sırt) dokusu oluşabilir. Neovaskülarizasyon, genellikle vasküler avasküler retina sınırında oluşur ve neovaskülarizasyon çevresinde gelişen anormal fibrovasküler doku (ridge) zamanla traksiyona yol açarak retina dekolmanına neden olabilir (22,23).

2.3. Risk Faktörleri

2.3.1. Doğum Ağırlığı ve Doğum Haftası

Prematüre retinopatisi için doğum haftasına göre düşük doğum ağırlığı ana risk faktörleri arasında yer almaktadır (24). Doğum ağırlığı ve gebelik yaşının düşük olmasının birçok çalışmada RP için bağımsız risk faktörü olduğu bulunmuştur (24,25). CRYO-ROP çalışmasında 1250 gramın altında doğan

bebeklerde PR sıklığı %65,8, 1000 gramın altında doğan bebeklerde PR sıklığı %81,6, 750 gram altındaki yenidoğanlarda %90 iken, gestasyonel yaşı 27 haftadan küçük bebeklerde %83 oranında PR geliştiği bildirilmiştir (26).

Yenidoğan ne kadar prematüre olursa retinada avasküler alan o kadar fazla olmakta, zararlı olabilecek ekstrauterin ortama daha uzun süre maruz kalmaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise 104 prematüre yenidoğan doğum ağırlıklarına göre incelendiğinde; 1250 gram ve altında doğum ağırlığına sahip yenidoğanların %13,6'sında ve 1251-1500 gram arası doğan bebeklerin %8,39'unda eşik hastalık geliştiği, 1500 gramın üstündeki yenidoğanların ise hiçbirinde eşik hastalık gelişmediği görülmüştür (27).

2.3.2. Oksijen kullanım süresi ve miktarı

Prematüre retinopatisi gelişiminde risk faktörleri içinde bulunan ve PR patogenezinin de temelinde prematüre yenidoğanlara yoğun bakım ünitelerinde verilen oksijenin kullanım süresi ve miktarı yer almaktadır (28,29). Ek oksijen uygulama süresi, tekrarlayan oksijen değişimleri ve oksijen konsantrasyonunun, gestasyonel yaş ve doğum ağırlığından bağımsız bir şekilde PR gelişiminde etkili bir faktör olduğu ileri sürülmektedir (30,31). Daha düşük konsantrasyonlarda, kontrollü bir şekilde verilen ve daha kısa süreli yapılan oksijen uygulamalarının yüksek riskli hasta gruplarında PR sıklığında belirgin bir şekilde azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (32).

Günümüzde PR gelişiminde kabul gören en yaygın teori arteriyel oksijen düzeyindeki dalgalanmalar olarak gösterilmektedir. Hipoksi ve hiperoksi arasında değişkenlik gösteren tekrarlayan oksijen değişiklikleri, retinada vaskülarizasyon anomalilerine sebep olur. Hiperoksi retina damarlarında vazokonstriksiyon yaparak 48-72 saat içinde retina damarlarında geri dönüşümsüz hasara neden olur (30). Hiperoksi lipid peroksidasyonunda artışa sebep olarak hücre organellerinin lizisine, membran hasarına, hücre membran fonksiyonu kaybına yol açar. Ciddi hipoksi ve iskemide ise retinada hücresel bütünlüğün hasarlanması ve enerji kaybına yol açıp PR gelişimini kolaylaştırır (31). Doğumla beraber monitörizasyona başlama, tekrarlayan hipoksi – hiperoksi dönemlerinden kaçınma, verilen oksijen düzeyinin ölçülmesi ve kısıtlı düzeyde tutulması, PR gelişimi ve sıklığının azaltılması için en

önemli korucu faktörlerdir (33). Amerikan Pediatri Akademisi'nin yayınladığı rehberlerde, parsiyel arteriyel oksijen basıncının (PaO₂) gestasyonel yaşı 32 haftanın altında olan yenidoğan bebekler için oksijen saturasyonunun %85-93 sınırlarında tutulması önerilmektedir (34).

2.3.3. Transfüzyon

Kan değişimi ve transfüzyonu sırasında kullanılan kanların erişkin tipi hemoglobin içermesi nedeniyle dokulara daha yüksek oranda oksijen gitmekte ve bu durum retina damarlarında zedeleyici etki yaparak PR gelişimini kolaylaştırmaktadır (35). Donör kanındaki eritrositler kısa ömürlüdür ve dolaşımdan çekildiklerinde demir depolanır. Bu demir birikimine yol açarak PR gelişiminde rol oynayabilir. Serbest demirden korunma transferin ile sağlanır, fakat prematürelde bu proteinin düzeyi de çok düşük bulunmuştur (36).

Kan transfüzyonu ve kan değişimi yapılırken kullanılan erişkin tip hemoglobin fetal hemoglobine kıyasla dokulara daha yüksek oranda oksijen taşımaktadır. Buna bağlı olarak dokularda serbest radikal düzeyini artırarak hasara yol açtığı ve PR gelişimini hızlandırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur (35–37). Stutchfield ve ark. yaptığı çalışmada kan transfüzyonuyla Hemoglobin F (HbF) düzeyinde azalma gözlemlendiği, PR saptanan yenidoğanlarda ise HbF düzeyinin daha düşük olduğu ve de yüksek HbF düzeylerinin PR için koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (38).

2.3.4. Steroid tedavisi

Prenatal dönemde steroid kullanımı hem PR'nin sıklığını ve hem de PR'nin şiddetini belirgin şekilde azaltmaktadır. Postnatal dönemde bronkopulmoner displazi (BPD) nedeniyle steroid kullanan PR hastalarında kriyoterapi ve lazer fotokoagulasyona giden vaka sayısında azalma olduğu ileri sürülmüştür (39,40).

2.3.5. Sürfaktan Tedavisi

Sürfaktan tedavisi ile çok düşük doğum ağırlıklı prematüre bebeklerde yaşam oranlarında belirgin artış görülmüştür. Doğum ağırlığı 750-1000 gram

arasında olan bebeklerin %70'i, 1000-1250 gram arasında olanların yaklaşık %90'ı yaşamaktadır (41). Ancak yapılan sürfaktan tedavisinin PR sıklığını arttırmadığı öne sürülmektedir (42). Sıklık oranı değişmemiş olsa da yaşama oranını artırması nedeni ile PR'dan etkilenen hasta sayısında artış gözlenmektedir (39-41).

2.3.6. Bronkopulmoner Displazi ve Respiratuvar Distres Sendromu

Bronkopulmoner Displazi ve hyalin membran hastalığı, Küçükevcilioğlu ve ark. Port ve ark. tarafından yapılan sırasıyla 119 ve 1354 preterm yenidoğan ile yapılan çalışmalarda BPD olan ve sürfaktan tedavisi alan yenidoğanlarda daha fazla sayıda PR olduğu saptanmıştır (43,44).

2.3.7. Sepsis

Doğum ağırlığı ve gebelik yaşı azaldıkça prematüre bebeklerde enfeksiyon riski artmaktadır. Postnatal enfeksiyon; yenidoğan komplikasyonları, uzun süreli hastanede yatış, morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (45). Yenidoğanların enfeksiyona ve inflamatuvar mediyatörlere maruziyeti PR riskinde artış ile ilişkilidir. Bir kohort çalışmasında, erken başlangıçlı sepsis gelişen bebeklerde ileri evre PR riskinin arttığı bulunmuştur (46). Yenidoğan sepsisi, ileri evre PR'de önemli bir risk faktörüdür (47-50). Sistemik mantar enfeksiyonu da koryoretinit ve PR ile ilişkili bulunmuştur (51,52)

2.3.8. İntrakraniyel Kanama

Çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere intraventriküler hemoraji insidansının yaklaşık %43 olduğu saptanmıştır. İntraventriküler hemorajinin şiddeti ile ciddi PR arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (53). Bu birlikteliğin olası mekanizması; retinanın, santral sinir sisteminin bir uzantısı olması nedeniyle nöral doku yapısında olması ve benzer anatomik vasküler dağılım göstermesi bilgisine dayandırılmaktadır (54). Ng ve arkadaşları, periventriküler lökomalazi ile birlikteliği olan evre 3 PR ve daha ileri evre PR olan bebeklerde, ortak etiyolojik faktörün hipoksi olduğunu göstermişlerdir (55).

2.3.9. Apgar skoru

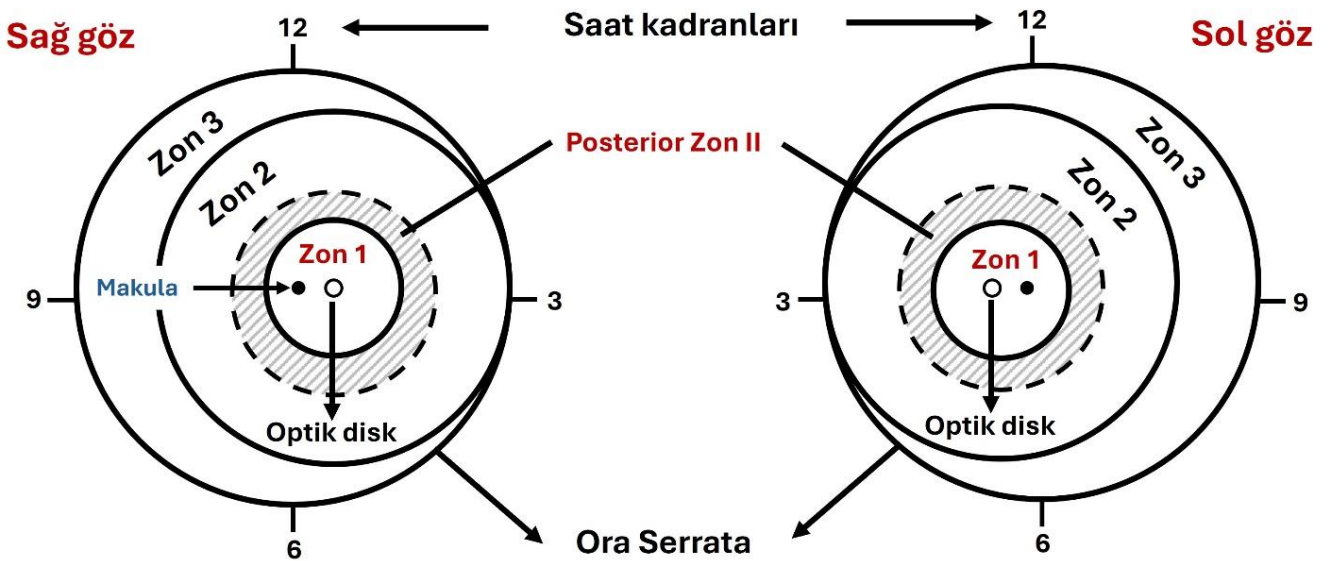
Doğumdan sonra ölçülen Apgar skorlarındaki düşüşün artmış PR riski ile bağlantılı olduğunu gösteren bazı çalışmalar mevcuttur(56,57). Marinov ve ark. 132 prematüre yenidoğan ile yaptıkları çalışmada beşinci dakika Apgar skoru altıdan küçük olan yenidoğanlarda tedavi gerektiren PR sıklığının anlamlı derece yüksek olduğu ve bu skorun bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir (58).

2.4. Prematüre Retinopatisi Sınıflaması

Prematüre retinopatisinin sınıflandırılması 1984'te kabul edilen ve 1987 yılında geliştirilen Uluslararası Prematüre Retinopatisi Komitesi (ICROP) tarafınca belirlenmiş kriterlere göre yapılmaktadır (15). 2005 yılında ICROP, uluslararası sınıflandırmada revizyon yapmış ve preplus hastalık, agresif posterior PR (APROP) ve de Zon I in sınırlarına açıklık kazandırmıştır (59,60). Son olarak 2021 yılında güncellenen sınıflama ile PR sınıflaması günümüzde kullanılan güncel son halini almıştır (61).

PR hastalığının sınıflandırılması ICROP-3'e göre aşağıdaki gibi açıklanmaktadır (24).

Yerleşim durumu (Zonlar): Hastalığın yerleşim yerini göstermek için optik sinirin merkez olarak baz alınıp retina üç bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Hastalığın yerleşim durumu

Zon I: Optik sinir ve makulada yer alan fovea arası mesafenin iki katı yarıçaplı dairesel alandır. Bu zonun merkezi optik sinir başıdır (OSB). 28D/25D lens ile OSB görüntünün kenarında kalacak şekilde ayarlandığında görüntülenen alan Zon I'dir.

Zon II: Optik sinir başından nazal ora serrataya kadar yarıçaplı dairenin Zon I dışında kalan dairesel alandır.

Zon III: Zon II dışındaki temporaldeki hilal şekilli alandır.

2021 yılında yayınlanan ICROP-3 çalışması ile posterior Zon II tanımı daha da netleşmiştir. Buna göre Zon I'in "iki" disk çapı anteriorundaki alan posterior Zon II'dir.

Evre (Vasküler proliferasyon derecesi): Hastalık vasküler proliferasyon derecesine göre beş evreye ayrılmaktadır. Henüz PR gelişmemiş bir hastada avasküler retinanın hangi zonda olduğu belirtilmelidir.

Evre 1: Avasküler ve vasküler retina arasındaki çizgi şekilli demarkasyon hattı (Şekil 2)

Evre 2: Sırt (Ridge); yüzeyden hafif kabarık neovasküler proliferasyon (üç boyut kazanmış) (Şekil 3)

Evre 3: Sırtta ekstraretinal fibrovasküler proliferasyon başlaması (ICROP-3 sınıflandırmasında agresif PR'de görülen düz neovaskülarizasyonlar da evre 3'e dahil edilmiştir) (Şekil 4).

Evre 4A: Parsiyel retinal ayrılma (Makula tutulumu yok) (Şekil 5)

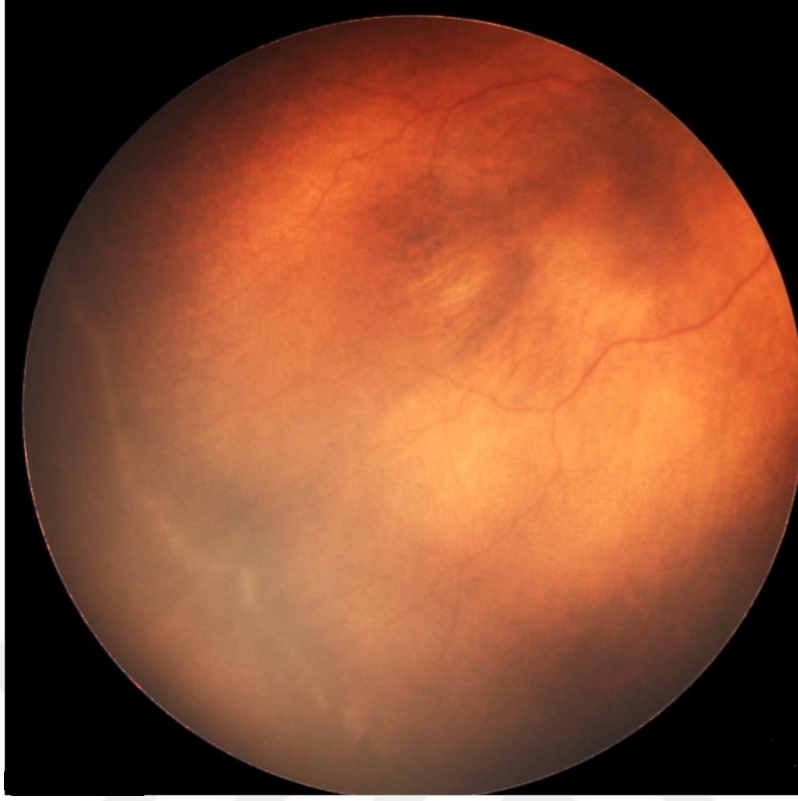
Evre 4B: Parsiyel retinal ayrılma (Makula tutulumu var) (Şekil 6)

Evre 5: Total retina dekolmanı, ICROP-3'te Evre 5'in ileri evrelemesi yapılmıştır:

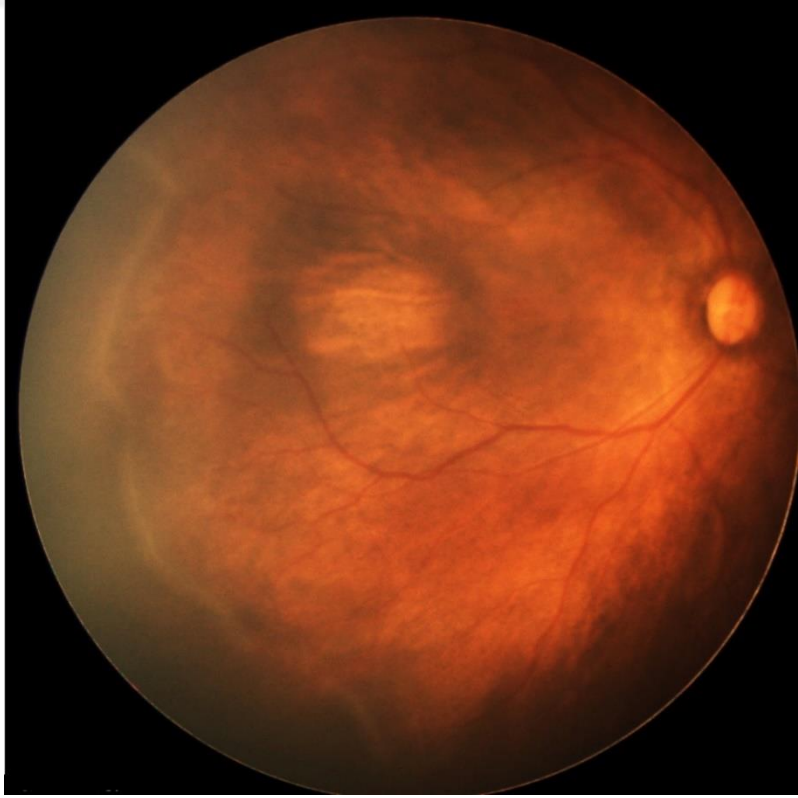
Evre 5A: Arka kutbun oftalmoskopik olarak görülebildiği total Traksiyonel Retina Dekolmanı (TRD) (Şekil 7)

Evre 5B: Retinanın tamamen lens arkasında toplandığı, lökokori şeklinde görülen ve sıklıkla kapalı huni retina dekolmanının eşlik ettiği total TRD

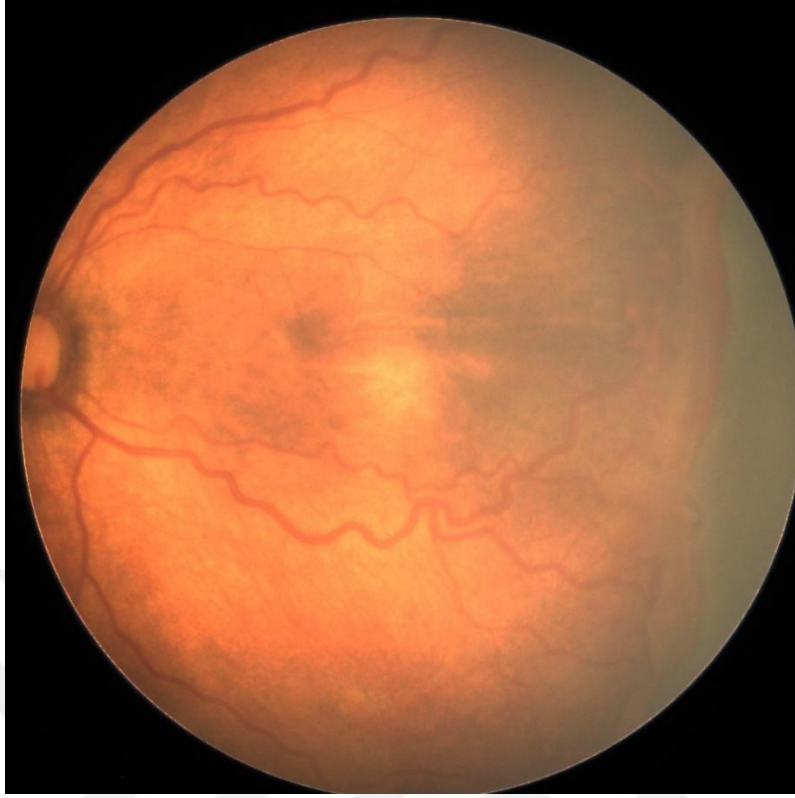
Evre 5C: Ön kamaranın daralıp irido-korneo-lentiküler sineşilerin oluştuğu ve zamanla korneal opasifikasyona giden lökokori



Şekil 2. Evre 1 PR (Demarkasyon hattı)



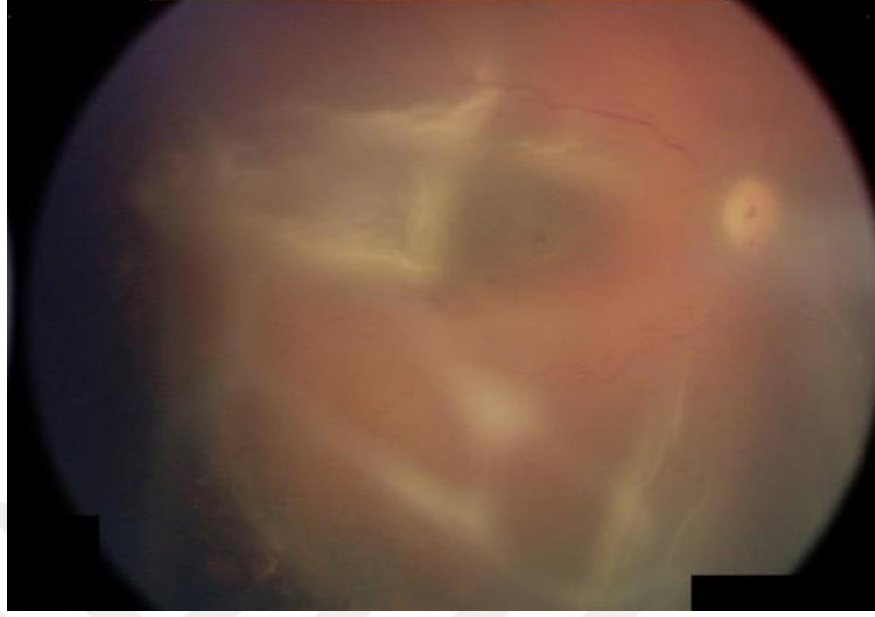
Şekil 3. Evre 2 PR (Ridge)



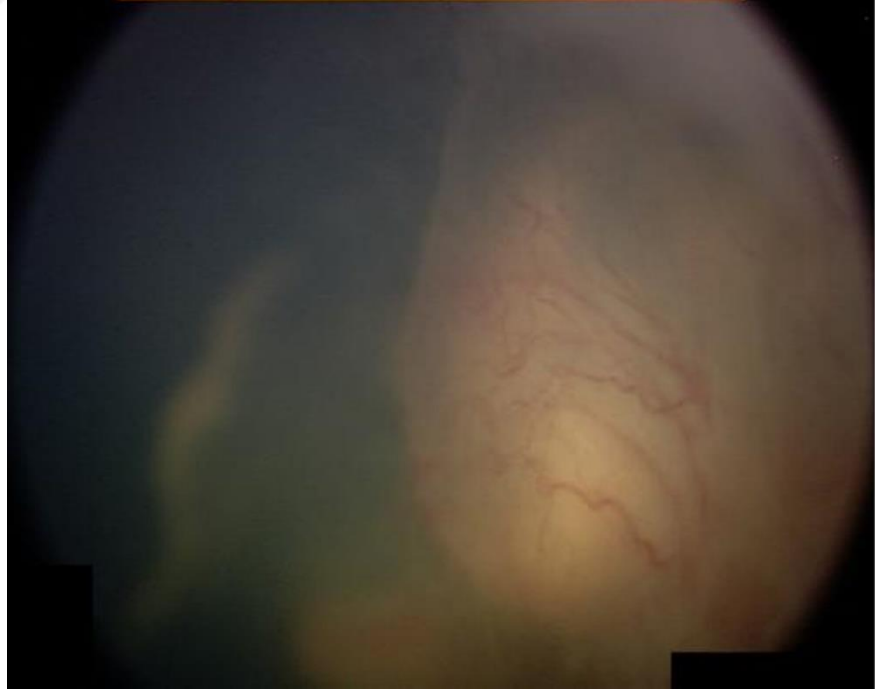
Şekil 4. Evre 3 PR (Ekstraretinal Fibrovasküler Proliferasyon)



Şekil 5. Evre 4A PR (Parsiyel Retina Dekolmanı, Makula tutulumu yok)



Şekil 6. Evre 4B PR (Parsiyel Retina Dekolmanı, Makula tutulumu var)



Şekil 7. Evre 5A PR [Arka kutbun görülebildiği total Traksiyonel Retina Dekolmanı (TRD)]

Yayılm derecesi: Retinal yüzey saat kadranına benzer şekilde 30°'lik sektörlere ayrılır. Bu sayede hastalığın kaç saat kadranı boyunca yayıldığı belirlenebilir. Sektörler arasında hastalığın evreleri birbiri arasında değişiklik gösterebilir.

“Plus” veya “artı” hastalık: Retina arka kutupta arteriollerde kıvrımlanma artışı ve venüllerde dilatasyon olarak tanımlanmaktadır. “Artı” hastalık varlığı PR'nin şiddetinin bir göstergesidir ve iris damarlarında genişleme, vitreusta bulanıklık ve pupil reaksiyonlarında azalma ile beraberlik gösterebilir. Optik sinir başı etrafında en az iki kadrandaki damarlarda dilatasyon ve tortuositede artış plus hastalık olarak değerlendirilir.

Preplus hastalık: “Artı” hastalığı tanımlamak için yetersiz düzeyde dilate ve kıvrılmış damar yapısı olması durumudur. ICROP-3'te plus hastalık ve preplus hastalık birbirinin devamı olan bir spektrum olarak tanımlanmıştır. Bu bulgular bir araya getirilerek hastanın her bir gözü için Tip 1, Tip 2 veya A-ROP tanımlarından biri yapılır (19,61).

Eşik hastalık (Threshold): Zon I veya Zon II'de evre 3 ve “artı” hastalık varlığında, beş ardışık saat kadranı veya ardışık olmayan sekiz saat kadranında tutulum olarak tanımlanır.

Eşik öncesi hastalık (Pretreshold)

- Zon I'de eşik hastalık olmayan herhangi bir evrede PR
- Zon II'de evre 2 PR ve “artı” hastalık
- Zon II'de evre 3 PR
- Zon II'de eşik hastalıktan daha az sektör tutulumlu evre 3 PR ve “artı” hastalık

Tip 2 PR: Düşük riskli eşik öncesi hastalık

- Zon I'de evre 1 veya evre 2 PR (“Artı” hastalık yok)
- Zon II'de evre 3 PR (“Artı” hastalık yok)

Tip 1 PR: Yüksek riskli eşik öncesi hastalık

- Zon I'de herhangi bir evrede “artı” hastalık
- Zon I'de evre 3 PR
- Zon II'de evre 2 veya evre 3 PR ve “artı” hastalık

Agresif PR (A-ROP): Hızlı ilerleyen şiddetli bir PR formudur ve tedavisiz kalırsa hızla evre 5'e ilerleyiş göstermektedir. İlk olarak “*Rush Disease*” olarak

tanımlanıp daha sonra da “APROP” ve son olarak 2021’de A-ROP olarak tekrar tanımlanmış tablodur. Yüksek oksijene sekonder “oksijenle indüklenmiş PR” tablolarının daha anteriorda da yerleşebildiği göz önüne alındığında APROP yerine daha anteriorda gelişebilen bu agresif PR tablolarını da bu grubun içine alabilmek için A-ROP adı verilmiştir. Bu gözlerde, “artı” hastalık, OSB etrafında periferik alanda ve dört kadrandaki hastalık ile orantısız düzeyde belirgin olmaktadır. Zon I veya posterior Zon II’de hastalık olmakla birlikte avasküler alan sınırları net bir hat ile ayırt edilemeyebilir ve evresini tespit etmek zor olabilir. Avasküler ve vasküler alan arasındaki **sırtta düz neovaskülarizasyon** görülmektedir. Tipik beyaz fibrozis ile ridge burada görülmez. Sırtın posteriorunda da kapiller nonperfüzyon alanları bulunabilmektedir. Fundus Flöresein Anjiyografi (FFA) tanıda çok yol göstericidir.

Avasküler alanın sınırındaki düz neovaskülarizasyon yüzeyden kabarması nedeniyle A-ROP hastalarında tanı atlanabilmektedir. Bu hastalığın bir başka özelliği de standart olarak izlenen evre 1’den 3’e ilerleme yolunu takip etmeden evre 4-5’e ilerleme gösterebilmesidir. A-ROP tanısı konulduğunda vasküler proliferasyon evreleri açısından bir sınıflamaya tabi tutulmadan hemen tıbbi girişimlere başlanılmalıdır (61,62).

Regresyon: Aktif PR bulgularının kendiliğinden veya tedavi sonrası gerilemesidir. Tam veya kısmi olabilir. Kısmi olduğunda periferde hala damarlanması tamamlanmamış retina alanları “Persistan avasküler retina” (PAR) ve periferik damar anastomozları gibi diğer bazı vasküler patolojiler sıklıkla görülebilmektedir.

Reaktivasyon: Tedavi sonrası regrese olmuş olan aktif PR bulgularının ve vasküler değişikliklerin tekrar ortaya çıkmasıdır. Bu reaktivasyon mevcut avasküler alan sınırında veya primer ridge bölgesinde ortaya çıkabilir.

Uzun dönem sekeli veya geç sekel: Epiretinal membranlar, lokalize traksiyonel retina dekolmanı, vitreoretinal arayüz sorunları, glokom, ektopik makula, periferik retinal dejenerasyonlar/delikler/yırtıklar, yırtıklı retina dekolmanı, PAR, periferik retinal vasküler anastomozlar/loplar gözlenebilir.

2.5. Klinik Seyir

Prematüre retinopatisinin seyri postnatal yaştan ziyade postmenstrüel (PM) yaş ve hastalığın lokalizasyonu ile yakından ilişkilidir. Tipik olarak PM 34. haftada başlasa da daha erken 30-32. haftada da başlayabilir. Düzensiz olarak 40–45. gebelik haftalarına kadar ilerler ve çoğunlukla spontan düzelir. Doğum ağırlığı (DA) ≤ 1250 gram olan bebeklerin üçte ikisinde PR gelişirken, bunların %6'sında ciddi hastalık nedeniyle tıbbi girişim gerekmektedir (15,63–65).

2.6. Prematüre Retinopatisi Taraması

Amerikan Oftalmoloji Akademisi ve Amerikan Pediatri Akademisinin 2018 önerilerine göre gestasyonel yaş (GY) ≤ 30 hafta veya DA ≤ 1500 gram doğan tüm bebekler ile GY 30 haftadan büyük DA 1500–2000 gram arasında ve klinik olarak problemleri olan, kardiyopulmoner destek gerektiren bebeklerin taranması önerilmektedir (66).

Ülkemizden yapılan TR-ROP çalışması sonuçları değerlendirildiğinde daha büyük ve daha matür bebeklerde de ciddi PR vakaları saptanmıştır (67). Bu çalışmada DA 1700 gram ve GY 34 haftaya kadar olan bebeklerde tedavi gerektiren ciddi PR vakalarının olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar ışığında ülkemiz için Tablo 1'deki tarama kriterleri önerisi uygundur.

Tablo 1. Ülkemiz İçin “Önerilen” PR Tarama Kriterleri

- DA ≤ 1700 gram veya gebelik yaşı < 34 hafta olan tüm bebeklerin prematüre retinopatisi açısından taranması önerilir.
- DA > 1700 gram veya gebelik yaşı ≥ 34 hafta olup kardiyopulmoner destek tedavisi uygulanmış veya “bebeği takip eden klinisyenin PR gelişimi açısından riskli gördüğü” preterm bebeklerin taranması uygundur*.

Hastaların ilk oftalmolojik muayenesi GY 27 haftadan küçük olan bebeklerde PM 30-31. haftada, ≥ 27 haftada doğan bebeklerde ise postnatal dördüncü haftada yapılmalıdır (Tablo 2). Prematüre retinopatisi muayene takviminde PM yaş (gestasyonel yaş + kronolojik yaş) kullanılır (66).

Tablo 2. Gebelik Yaşına Göre İlk PR Muayenesi Zamanı

GY (hafta)	İlk Muayene Zamanı (hafta)	
	Postmenstrüel	Kronolojik
22*	31	9
23*	31	8
24*	31	7
25	31	6
26	31	5
27	31	4
28	32	4
29	33	4
30	34	4
31	35	4
32**	36	4

*GY 25 hafta altında bebeklerde PM 31 hafta beklenmeden postnatal 6 hafta tamamlandığında ilk muayene yapılabilir.

**GY 32 hafta üzerinde olan bebeklerde ilk muayene postnatal 4 hafta tamamlandığında yapılır.

2.7. İzlem

Prematüre bebeğin PR izlem şeması ilk muayenedeki bulgulara göre belirlenir. İlk muayenede retinopati gelişimi saptanır ise hastalığın şiddetine ve ilerleme hızına göre izlem takvimi oluşturulur.

Retinal vaskülarizasyon Zon III'de ise iki-üç haftada bir, Zon II'de ise en az iki haftada bir muayene tekrarlanır. Zon I'de ise ilerleme gösterip göstermediğine göre haftada en az bir kez muayene ile izlenir ve bulgulara kötüleşme saptanırsa veya preplus hastalık saptanırsa muayeneler izleyen hekimin gerek gördüğü şekilde sıklaştırılır (68,69). Prematüre retinopatisi izlem algoritması Şekil 8'de verilmiştir.

- İlk muayene neonatolog/pediatristin sorumluluğundadır. İzlemin aralığı, süresi ve de tedavi kararını oftalmolog verir.

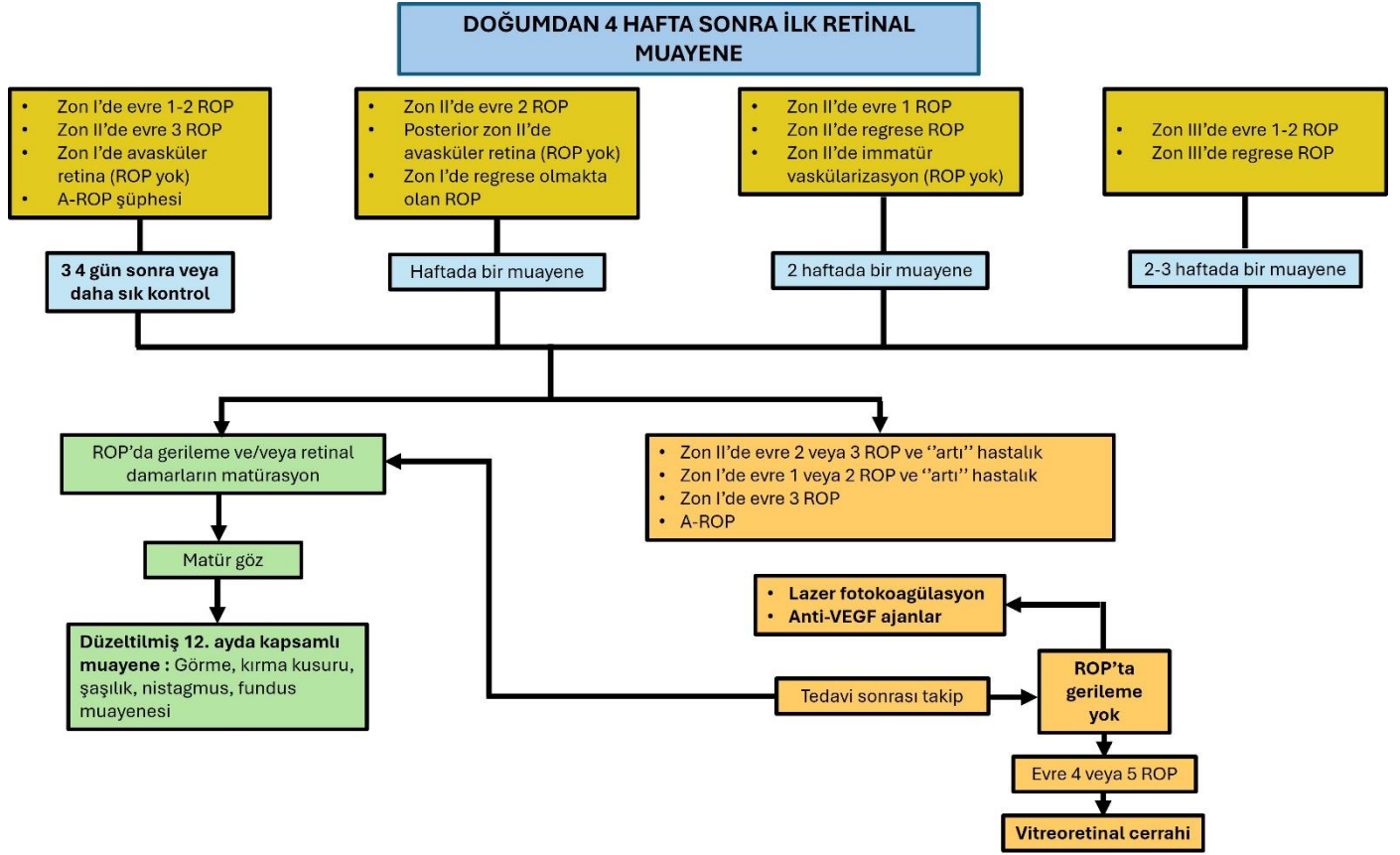
- Tarama muayeneleri PR gerileyene kadar veya tam retinal vaskülarizasyon tamamlanıncaya kadar devam eder.

- İleri takip ve tedavi gerektiren vakalarda ilgili hekime/ kliniğe yönlendirilmeyi ise göz hekimi yapar.

Günümüzde dijital ortamda retina görüntüleri çekebilen cihazlar kullanıma girmiştir. Bu yöntemler retina bulgularının bilgisayar ortamında kayıt altına alınmasına, bir önceki muayene ile kıyas yapılmasına ve PR eğitiminde ve uzaktan konsültasyonda kullanmaya olanak sağlar. **Ancak izlem, izlemin sonlandırılması ve tedavi kararı mutlaka binoküler oftalmoskop ile muayene sonucuna göre alınmalıdır.**

Çok merkezli bir e-ROP çalışmasında dijital kamera ile çekilen görüntülerde sensitivite %90, spesifite %87 olarak bildirilmiştir (70). Dijital fotoğraf görüntüsü alan ve kaydeden cihazların sensitivitesi, avantajları ve kullanıma girmesinin değerlendirilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (66) Tanı ve takip için indirekt oftalmoskopinin yeterli olmasının yanında, bu cihazlar takiplerde karşılaştırma imkânı sağlaması ve medikolegal açıdan kanıt olabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca FFA çekimini de yapabilen bu cihazlar, FEVR ve incontinentia pigmenti gibi hastalıkların PR ile ayırıcı tanısını yapmaya da yardımcı olabilmektedir.

Son dönemlerde postnatal büyüme hızına göre ciddi PR gelişimini öngörebilmek ve takiplerde muayene sayılarını azaltmaya yönelik algoritmalar geliştirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde GY <32 hafta bebeklerde bu algoritmaların sensitivitesi %100 olarak bulunmuştur (71–73). Gelişmekte olan ülkelerde ise daha matür bebeklerde ciddi PR görülmektedir ve “*Weight, Insülin-Like Growth Factor, Neonatal Retinopathy of Prematurity*” (WINROP) çalışmalarında sensitivite düşük bulunmuştur. Bu nedenle kullanımı ve validasyonu için uluslararası bir öneri verilememektedir (74,75).



Şekil 8. Prematüre retinopati izlem algoritması

2.8. Tarama Muayenelerinin Sonlandırılması

Retinal damarlar PR saptanmayan bebeklerde Zon III'e ulaşıktan sonra görmeyi tehdit edici bir PR gelişme riski çok azdır. Ancak retinal damarların Zon III'e ulaştığını tespit etmenin kolay olmamasının yanında retinal vaskülarizasyon tamamlandığında izlem muayenesi sonlandırılmalıdır.

Tedavi endikasyonu bulunmayan ve PR gelişen bebeklerde ise hastalığın ilerlemesinin durduğu ve gerilemenin başladığı açıkça tespit edildikten sonra izlem muayeneleri daha seyrek hale getirilebilir. Tarama muayenelerinin sonlandırılabilceği durumlar aşağıdadır (66,76)

- Tam retinal vaskülarizasyon (Bu kriter özellikle anti-*VEGF* ajan alan hastalarda daha da önemlidir.)

- Daha önceki tarama muayenelerinde Zon I/II PR saptanmamış ve retinal damarlanmanın Zon III'e ulaşmış olması (Eğer oftalmolog Zon konusunda şüpheli ise veya bebek PM 35 haftadan küçük ise tekrar muayeneleri yapılabilir.)
- Daha önceki tarama muayenelerinde eşik öncesi veya daha kötü bir PR saptanmamış ve PM 45 haftaya ulaşmış bebekler
- **Regrese olan PR;** reaktivasyon veya progresyon gösterme riski taşıyabilecek anormal vasküler doku olmaması
- Anti-*VEGF* tedavisi almış hastalarda reaktivasyonun en yüksek olduğu PM 44-55. haftalar arasında yakın takip önerilir.
- Anti-*VEGF* tedavisi almış hastalarda en az PM 60. haftaya kadar takip sonlandırılması önerilmez. Bu hastalarda çok geç proliferatif PR rekürrensleri bildirilmiştir. Bu vakaların takibinin sonlandırılmasında dikkatli ve hastaya özgü kararlar alınmalıdır. Bu hastaların PM 60. haftada mümkünse FFA'larının çekilip hala avasküler alan var ise lazer fotokoagülasyon uygulanması giderek daha fazla kabul gören bir yaklaşım olmaktadır. Bu sayede komplikasyonlar ve geç nükslerden kaçınılabileceği gibi, büyüyen bebeğin periferik retina muayenesinin yapılmasının da giderek güçleştiği düşünüldüğünde daha pratik bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

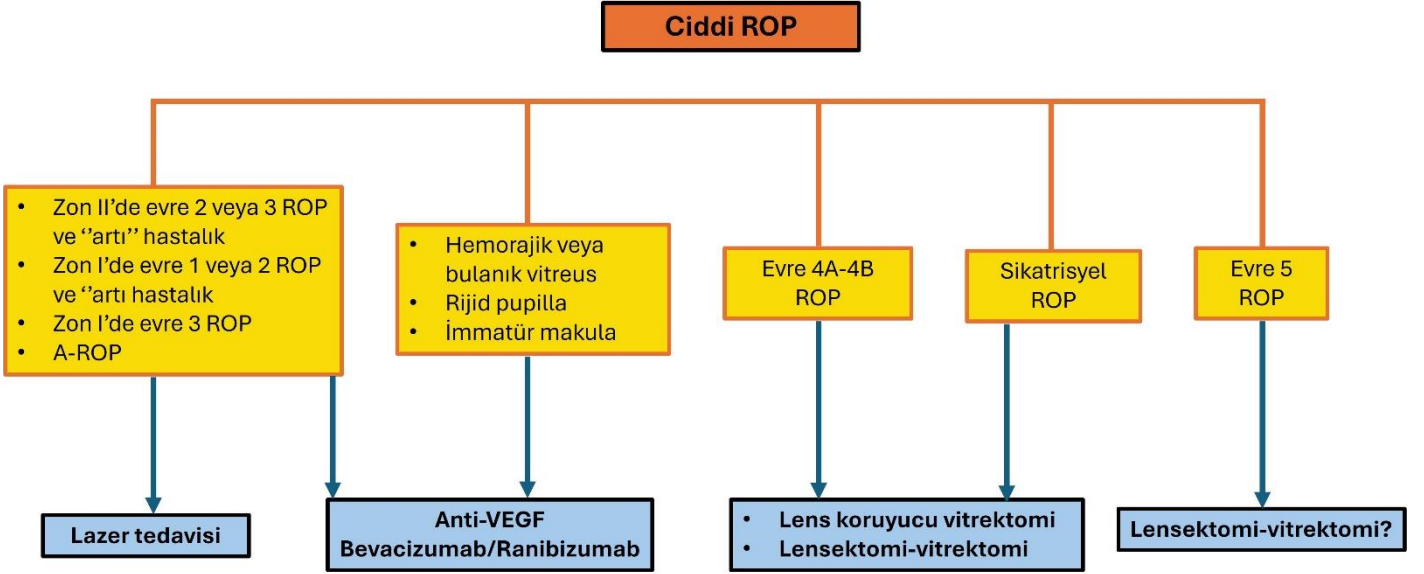
2.9. Prematüre Retinopatisi Tedavisi

Çok merkezli ETROP (*Early Treatment for Retinopathy of Prematurity*) çalışma grubu tarafından Prematüre retinopatisinde lazer fotokoagülasyon kriterleri belirlenmiştir. Bu kriterlerde yüksek risk taşıyan eşik öncesi PR bulguları (Tip 1 PR) da dikkate alınmıştır (77). Erken tedavi yapılmasının görme keskinliğini artırdığı ve olumsuz yapısal sonuçları azalttığı bildiren çalışmalar mevcuttur (78). Buna göre tedavi gerektiren durumlar şunlardır (Şekil 9):

- Zon I'de evre 1 veya evre 2 PR ve “artı” hastalık
- Zon I'de evre 3 PR
- Zon II'de evre 2 veya evre 3 PR ve “artı” hastalık

→ Mümkün olan en kısa süre içerisinde A-ROP olgularında, agresif olmayan durumlarda ise 48-72 saat içerisinde tedaviye başlanmalıdır.

PREMATÜRE RETİNOPATİ TEDAVİ ALGORİTMASI



Şekil 9. Prematüre retinopatisi tedavi algoritması

2.9.1. Lazer Fotokoagülasyon

Standart tedavi yöntemi lazer fotokoagülasyondur. Avasküler retina anormal vaskülarizasyona neden olan anjiyogenik faktörleri üretir. Tedavideki amaç avasküler periferik retina alanlarının ablasyonudur. Bu işlem Argon Lazer fotokoagülasyon veya Diod Lazer ile gerçekleştirilir. Lazer tedavisi, PR gelişen damarların üzerine değil, bu damarların önündeki tüm avasküler alanlara uygulanır. Retinal ablasyon tedavisi yüksek riskli “eşik öncesi” hastalık ve “eşik hastalıkta” endikedir (77,78).

Lazer tedavisi sonrası kemozis, vitreus içi hemoraji, enfeksiyon, iris ve lens yanıkları, katarakt, posterior sineşi, glokom, görme keskinliğinde ve sıklıkla görme alanında azalma, ağrı, apne, bradikardi, görülebilir. Katarakt, diod lazer tedavisi uygulanan vakalarda argon lazer tedavisi uygulananlara göre daha az görülür. Özellikle A-ROP vakalarında uygulanan yoğun lazere sekonder ender de olsa hipotoni ile seyreden ön segment iskemisi gelişebilir. Bu komplikasyon gözün kaybına yol açabilecek ciddi bir sorundur (79). Bu nedenle lazer tedavisi A-PR veya Zon I hastalıkta genellikle ilk tercih olmamaktadır.

Lazer tedavisine rağmen bazı hastalarda retina dekolmanı gelişip evre 4'e ilerleyebilir. Vitreus hemorajisi veya vitreus içinde beyaz fibröz yapıların olduğu durumlarda retina dekolmanı riski artmaktadır (80). Bu hastalarda vitreoretinal cerrahi gündeme gelebilmektedir.

2.9.2. Anti-VEGF Ajanlar

Bevacizumab, ranibizumab, aflibercept; anti-*VEGF* monoklonal antikorlar olarak adlandırılıp vasküler endotelyal büyüme faktörünü bloke edip etki gösteren ajanlardır. **Bebek uygun şekilde tutulup stabilize edildikten sonra topikal anestezi altında, batikon ile oküler yüzey sterilizasyonu sağlanır ve limbustan 1 mm geriden pars plikatadan mümkünse kısa uçlu (4mm) 30G iğne kullanılarak intravitreal enjeksiyon uygulanır.** Anti-*VEGF* ajanlar erişkinlerde birçok retinal vasküler patolojide kullanılmasının yanında en sık diyabetik retinopati, makula dejenerasyonu, retina ven tıkanıklıkları ve PR tedavisinde kullanılmaktadır (81,82).

Lazer fotokoagülasyon PR tedavisinde altın standart olmakla birlikte, anti-*VEGF* ajanların uygulamasının daha kolay olması, hızlı cevap alınması, korneanın/lensin opak, vitreusun bulanık olduğu ve pupillanın iyi dilate olmadığı durumlarda da kullanılabilmesi, görme alanında daralma yapmaması avantajlarıdır (13,83,84).

Olası riskler arasında ise serum VEGF düzeylerinde geçici düşme, akciğer, böbrek ve beyin hasarı olma ihtimali bulunmaktadır (85). Tedavi sonrası plus hastalıkta ertesi günden itibaren görülebilen hızlı regresyon dikkat çekicidir. Avasküler retinanın vaskülarizasyonu ise uzun zamanda ve yavaş olur. Bazı gözlerde ise bu vaskülarizasyon hiç tamamlanamayabilir. Şiddetli evre 3 veya evre 4'e ilerlemiş vakalarda anti-VEGF enjeksiyonu uygulandığında, fibrotik komponentin kontraksiyonuna bağlı "**crunch fenomeni**" olarak adlandırılan, retina dekolmanında hızlı progresyon ile evre 5'e geçmesine sebep olabileceğinden uygulamanın zamanlaması çok önemlidir. Bu durumun sebebi PM 36-40 hafta arasında artan ve doğal bir VEGF antagonisti olan transforme edici büyüme faktörü (TGF) beta etkisinin, anti-VEGF enjeksiyonu sonrası daha da rakipsiz kalması ve artmasıdır.

Bevacizumab ile lazer fotokoagülasyonun karşılaştırıldığı çok merkezli “*Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat for Retinopathy of Prematurity*” (BEAT-ROP) çalışmasında Zon I evre 3 PR veya posterior Zon II PR’lerin tedavisinde bevacizumab kullanımı sonrası yapısal anormallikler (retinal ayrılma, maküler ektopi) ve rekürrenslerin daha az olduğu bildirilmiştir (13).

Minimum etkin dozu bilinmemekle birlikte genellikle yetişkinde kullanılan dozun yarısı olarak uygulanmaktadır (**Bevacizumab: 0,675mg/0,025 mL, Ranibizumab: 0,25mg/0,025 mL**). İntravitreal düşük doz ranibizumab (0,1 mg.), yüksek doz ranibizumab (0,2 mg.) ve lazer fotokoagülasyonun karşılaştırıldığı, çok merkezli “*Ranibizumab versus Laser Therapy for the Treatment of Very Low Birthweight Infants with Retinopathy Of Prematurity*” (RAINBOW) çalışmasında intravitreal ranibizumab sonrasında ikinci ve dördüncü haftalarda sistemik plazma VEGF düzeylerinde azalma olmadığı gösterilmiştir (86).

Aynı çalışmada aktif PR ve olumsuz oküler yapısal sonuçların olmaması veya yeniden tedavi gerekmemesi ise “tedavi başarısı” olarak kabul edilmiştir. Tedavi başarısı intravitreal yüksek doz ranibizumab, düşük doz intravitreal ranibizumab ve lazer fotokoagülasyonda sırasıyla %80, %75 ve %66 olarak bulunmuştur (86).

Çok merkezli “*Comparing Alternative Ranibizumab Dosages for Safety and Efficacy in Retinopathy of Prematurity*” (Care ROP) çalışmasında ise 0,12 mg ve 0,2 mg ranibizumab dozları karşılaştırılmış ve etkinlikleri benzer bulunmuştur (87).

Lazer tedavisi sonrası yanıtızlık ortalama olarak iki-üç hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Bevacizumab tedavisi sonrası ise bildirilen geç rekürrensler mevcuttur ve bu nedenle bevacizumab tedavisi sonrası takiplerin daha uzun süreli yapılması gerektiği bildirilmiştir (88,89). Anti-VEGF uygulanmış bebeklerde periferik retinal vaskülarizasyon çok yavaş olmakta hatta çoğunlukla hiç tamamlanamamaktadır. Bu bebeklerde periferik vaskülarizasyon tamamlanana kadar izlemek önemlidir ve bu iki-üç yaşına kadar sürebilir. Geç dönemde olası aktivasyonlar da bildirildiğinden takipler ihmal edilmemelidir. Büyümüş bir bebeğin periferik retina muayenesi zor olabileceğinden genel anestezi altında muayene gerekebilir ve bu nedenle vaskülarizasyon anterior Zon 2’ye ulaşınca ya da PM 60. haftada FFA çekilip kalan avasküler alanlara lazer uygulanmak suretiyle bu uzayan takiplere son vermek uygun bir yaklaşım olabilir (90).

Anti-VEGF tedavisi uygulanan bebeklerde lazer tedavisi yapılan bebeklere göre nörogelişimsel problemlerin arttığı konusunda yayınlar literatürde mevcuttur (91,92). Bir meta-analizde, intravitreal bevacizumab tedavisi sonrası Bayley III bilişsel ve dil skorlarının lazer fotokoagülasyon tedavisi alanlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (93). Bu konuda uzun dönem değerlendirmelerini de içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anti-VEGF’lerle ilgili tüm bu bilinmeyenlere rağmen bu ajanların kullanımının ön planda tutulabileceği klinik durumlar aşağıda sıralanmıştır:

- A-ROP varlığı
- Zon I veya posterior Zon II’de PR
- Makulanın halen vaskülarize olmadığı posterior hastalık: Makulanın lazer tedavisinden kaçınmak için
- Retinanın görülmesini zorlaştıracak durumların varlığı: Pupil dilatasyonunun yetersiz (rijit pupilla) olduğu gözler, kornea veya lens opasitesi, vitreusun hemorajik veya bulanık olduğu durumlar
- Genel durumu genel anestezi ile lazer tedavisini kaldıramayacak kadar sorunlu olan bebekler

Amerikan Pediatri Akademisi, bevacizumabın Zon I evre 3 PR + “artı” hastalıkta düşünülebileceğini ancak dozu, optimal zamanlaması, güvenliği ve etkinliği konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır (66). Ayrıca, PR tedavisinde kullanımı için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration: FDA*) ve TC Sağlık Bakanlığı tarafından verilmiş endikasyon onayları yoktur ve endikasyon dışı (Off-label) kullanılmaktadır. **Tedavi öncesi ailelerden mutlaka yazılı onam alınmalıdır.**

Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicines Agency: EMA*); ranibizumabın “Zon I (Evre 1+, 2+, 3 veya 3+) PR, Zon II (evre 3+) PR veya A-ROP” tedavisinde kullanılabilmesini Eylül 2019 tarihinde onaylamıştır.

- Lazer veya anti-VEGF ajanlar retina dekolmanını her zaman önleyemeyebilir. Total ya da subtotal retina dekolmanı gelişen vakalarda vitreoretinal cerrahi tedaviler uygulanmaktadır.

2.9.3. Cerrahi Girişim

Prematüre retinopatisi subtotal veya total dekolmana (evre 4, evre 5) ilerleme gösterirse retinal ayrılmayı önlemek ve görmeyi korumak için acil vitreoretinal cerrahi girişimler yapılır. Bu tedavi yöntemlerinin hastaların %72'sinde "ışığın algılanmasını" ve yaklaşık %15'inde 20/300 veya üzeri görme keskinliği sağladığı bildirilmiştir (94–96).

Vitrektomi, vitreusun cerrahi olarak uzaklaştırılmasını takiben retina üzerindeki traksiyona sebep olan fibrovasküler dokunun eksize edilmesidir. Retinanın rahatlatılması ve tekrar yatışmasını sağlayan bir tekniktir. Retinanın çok anteriora sürüklendiği durumlarda, retinal yatışmayı sağlamak amacı ile bazen lens feda edilebilir. Tedavi başarılı olsa dahi birçok hastada zayıf görme veya körlük gelişebilir. Evre 4A'da gerek anatomik gerek görme fonksiyonu açısından daha iyi sonuçlar alınabilirken, evre 4B veya evre 5 de başarı oranları çok düşüktür (94–96).

Özellikle evre 5'te çoğunlukla cerrahi önerilmez. Ancak bilateral ve çok yeni evre 5 vakalarda hastaya bir şans verilebilir. Bu şekilde öncelikle anatomik olarak göz küresinin deformasyonunun (fitizis bulbi, korneal opasifikasyon vb gelişimi) engellenmesi ve mümkünse ışık hissi veya el hareketi düzeyinde görme sağlanması hedeflenebilir. Işık hissi vücudun diurnal ritminin ayarlanması ve yön bulma konusunda önemli bir görmedir. Ancak çok az sayıda evre 5 hastada da ambulator görmeye de ulaşmak mümkün olabilmektedir (94–96).

2.10. Tedavi Sonrası Takip

Lazer tedavisi sonrasındaki takip muayeneleri birinci ve yedinci gün yapılmalı ve hastalık regrese olana kadar haftada bir tekrarlanmalıdır. Lazer fotokoagülasyon sonrası hastalıkta gerileme genellikle bir-iki hafta sonra olmaktadır. Eğer bu sürede PR'de regresyon yoksa veya progresyon görülür ise lazerin tam olarak uygulanamadığı eksik kalmış alanların olduğundan şüphelenilebilir veya düz neovaskülarizasyonların gerilemesi sonucunda avasküler yeni alanlar açığa çıkmış olabilir. Bu alanlara ikinci bir lazer tedavisi göz hekiminin karar vereceği kısa bir sürede tekrarlanmalıdır. Anti-VEGF sonrası iyileşme ise çok daha hızlıdır ve bir-üç günde vasküler bulgularda belirgin regresyon olması beklenir, plus hastalık geriler, neovaskülarizasyon geriler ve ridge düzleşir. Fakat

avasküler alanların vaskülarizasyonu yavaşdır ve haftalarca takibe rağmen tamamlanamayabileceği unutulmamalıdır. Enjeksiyon sonrası ikinci-üçüncü gün regresyon görülmeli, beklenen regresyon olmuşsa birinci hafta değerlendirilmeli ve "regrese PR" olarak şekil 8'deki izlem algoritmasına göre vaskülarizasyon tamamlanana kadar, tamamlanamaz ise profilaktik lazer yapılana kadar takibi yapılmalıdır (82).

Tedavi gerektiren ciddi PR gelişme bile, tüm PR hastaları akut PR tablosu regrese olduktan sonra da altı ay-bir yıl içinde detaylı oftalmolojik muayeneleri yapılmak üzere tekrar görülmelidir. Ailelere ambliyopi, yüksek miyopi, astigmatizma, şaşılık, anizometri, katarakt, retina dekolmanı, glokom gibi potansiyel oftalmolojik problemlerin bu bireylerde daha sık görüldüğü bilgisi verilmeli, bu konuda dikkatli olmaları sağlanmalı ve hastalar okul çağına kadar yılda bir değerlendirilmelidir (66,76,97).

• **Ciddi PR gelişmiş veya tedavi uygulanmış hastalarda ise ömür boyu takip özellikle adolesan ve yetişkin dönemde görülebilen oftalmolojik sorunların taranması açısından çok önemlidir (97).**

2.11. Prognoz

Hastalığın seyri değişken olup; Zon I başlangıçlı, hızlı seyirli hastalık, "artı" hastalık ve retina dekolmanı kötü prognoz belirtileri arasındadır. Zon II başlangıçlı ve yavaş seyirli hastalık ise genellikle tam iyileşme veya parsiyel retinal skar ile sonuçlanır. Bu süreç bir yıl kadar sürebilmektedir. Zon III başlangıçlı olanlar da en iyi prognoz gözlenir ve tam iyileşme görülür (26). Zon III'te başlayan vakaların hiçbirinde parsiyel veya total retinal dekolman bildirilmemiştir. Hastaların %90'ında PR regresyonunun ortalama PM 38- 44. haftalarda olduğu saptanmıştır. Zon II'den Zon III'e gerileyen hastaların %99'unda ise prognozun çok iyi olduğu ve Zon III'e sınırlı durumlarda parsiyel veya total retinal dekolmanın olmadığı bildirilmiştir (64).

Prematüre retinopatisine bağlı körlük ve ciddi görme bozukluğunun sıklığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak regresyon gözlenen hastaların %55'inde 10 yıl içinde oftalmolojik problemler gelişmektedir. Hafif PR gelişen (Evre 1 veya "artı" hastalığın eşlik etmediği evre 2) ve retinada skar dokusu olmayan bebeklerde

şaşılık, ambliyopi, miyopi ve nistagmus term bebeklerle kıyaslandığında daha fazla görülmektedir (63). “Artı” hastalık bulunan veya evre 3 ve üstü PR gelişen ciddi PR vakalarında ise uzun dönemde %7-15 oranında görme problemleri olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (98–101). Ciddi PR gelişen ve/veya tedavi gören hastalarda retina dekolmanı, katarakt, glokom, nistagmus, maküler problemler, optik atrofi, mikrokornea, fitizis bulbi, kırma kusurları gibi oftalmolojik morbiditeler gelişebilir (74). Ciddi PR nörogelişimsel morbiditeler açısından da erken haberci olabilir. Bilişsel, motor ve işitme problemleri ciddi PR gelişen vakalarda üç-dört kat daha fazla bulunmuştur (102).

2.12. NDP, FZD4, LRP5, TSPAN12 Gen Varyantları

Retina gelişimi sürecinde anjiyopoezden sorumlu *NDP*, *FZD4*, *LRP5* ve *TSPAN12* gen varyantları, Norrin veya Wnt/ β -katenin sinyal yollarını bozabilir (103). Wnt/ β -katenin yolunda, FZD4 ve LRP5 bir koreseptör olarak üçlü bir kompleks oluşturur; Wnt koreseptöre bağlanır ve aşağı akış β -katenin sinyalini aktive eder (104). Devamında Norrin/ β -katenin yolunda, NDP koreseptöre bağlanır ve TSPAN12 yardımcı bileşeni ile β -katenin sinyalini aktive eder (105). Bu sinyal yolları aktive edildiğinde, β -katenin çekirdeğe translokasyon yapar ve transkripsiyon faktörlerinin T-hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör ailesi ile etkileşime girer, böylece ribonükleik asid (RNA) transkripsiyonu ve uzamasını başlatır (106,107).

2.12.1. Norrie Hastalığı Proteini (NDP)

Norrin Wnt sinyal yolunun ligandı olarak görev yapan NDP, sistein açısından zengin bir proteindir. Norrinin anjiyojenik bir faktör ve nöroprotektif bir büyüme faktörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (108). Norrin, kısmen insülin benzeri büyüme faktörü-1'in indüksiyonu yoluyla anjiyogeneze aracılık eder (109). Norrie hastalığı proteini geni Chr-X üzerinde bulunur ve Norrie hastalığı ile ilişkili olsa da *NDP*'deki missense varyantlar hem X'e bağlı hem de sporadik FEVR ile de ilişkilidir (110). *NDP*'deki patolojik varyantlar, Norrie hastalığı, FEVR, persistan fetal vasküler sendrom (PFVS), prematüre retinopatisi (PR) ve Coats hastalığı dahil olmak üzere çeşitli vasküler retinopatilerle ilişkilendirilmiştir. Bu retinopatiler

büyük ölçüde retina damar yapısıyla sınırlıyken, Norrie hastalığı retinal disgenezi ile en şiddetli belirtileri gösterir ve zihinsel engellilik, nöbetler, periferik damar yapısında değişiklikler ve kademeli işitme kaybı dahil olmak üzere birkaç ek semptomla birlikteliği mevcuttur (7).

Norrin proteini retinal Müller glial hücreleri tarafından salgılanır ve Norrin homodimeri, retina ve iç kulakta anjiyogenezi yöneten kanonik Wnt sinyallemesini tetikleyen FZD4'e bağlanır (111,112). Bu bağlanmayı artıran TSPAN12 ve LRP5, temel yardımcı reseptörlerdir. Çalışmalar, Norrin ile FZD4 veya LRP5 arasındaki belirli etkileşim bölgelerini tanımlamıştır ve bu yapıları değiştiren varyantların bu temel yol aracılığıyla sinyal aktivitesinin azalmasına neden olduğunu doğrulamıştır (111)

Yapısal olarak, NDP iki ana alandan oluşur: bunlar proteinin hücre dışı transportunu kolaylaştırmada rol oynayan bir N-terminal sinyal peptidi ve proteinin büyük kısmını oluşturan oldukça korunmuş bir sistein düğümü motifidir. Sistein düğümü doğrulamasını değiştiren protein varyantları, retina displazisi veya disgenezisi (örn; Norrie hastalığı) gibi daha zararlı sonuçlarla ilişkilendirilirken, motifin dışında bulunan varyantlar FEVR hastalarında daha sık görülür (113).

Literatürdeki çalışmalarda FEVR ile ilişkili genetik değişiklikler arasında, etnik olarak çeşitli popülasyonlarda yapılan çok sayıda çalışma ile tanımlanan p.R121Q ve hem FEVR hem de Norrie hastalığı vakalarında ise p.S57X ve p.K104Q bulunmuştur (114). Bu durum, iki durumun altında yatan mekanizmaların birbirine bağlantısını vurgular.

Bu sinyal yolu, retina endotel hücresindeki ligand/reseptör kompleksinin dört üyesinin de benzersiz kombinasyonu sayesinde retina endotel hücresine özgüdür: Norrin, FZD4, LRP5 ve TSPAN12. Farelerde yapılan genetik fonksiyon kaybı deneylerinde, retina ve beyinde Norrin ve Wnt7a/Wnt7b sinyal yollarının bir miktar örtüşmesi olsa da Norrinin iç kan retina bariyeri (iBRB) için daha önemli olduğunu ve Wnt7a/7b'nin kan-beyin bariyerinin gelişiminde daha büyük bir role sahip olduğunu göstermektedir (115). Daha sonra, bu dört proteinin herhangi birinin yapısındaki değişiklikler, FEVR veya PR gibi benzer retinal vasküler patolojilerle ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, FEVR'in sunumu bireyler arasında büyük ölçüde farklılık gösterebilirken, fareler üzerinde yapılan çalışmalar, Norrin, FZD4

veya LRP5'teki fonksiyon kaybının genellikle benzer klinik fenotiplere yol açabileceğini göstermiştir (116).

Norrin'in iBRB gelişimindeki merkezi rolü ve çeşitli retinopatilerin patogenezindeki rolü nedeniyle, son araştırmalar Norrin'in VEGF kaynaklı kılcal sızıntının etkileriyle mücadele etme kapasitesine odaklanmıştır. Diyabetik retinopati fare modeli kullanılarak yapılan bu çalışmalar, ekzojen Norrin'in kanonik Norrin Wnt sinyal yolu aracılığıyla retinal endotel hücre bağlantılarını onarmaya yardımcı olabileceğini göstermektedir (117).

2.12.2. Frizzled 4 (FZD4)

Gözdeki kan-retina bariyerinin korunmasından ve gelişmekte olan retinadaki retina anjiyogenez sürecini yönetmekten sorumlu olan yolak FZD4, Wnt sinyal yoludur. Chr-11 üzerindeki *FZD4* geni, Frizzled gen ailesinin bir üyesi olan Frizzled sınıf-4 reseptörünü kodlar ve bunlar yedi transmembran alanlı proteinlerdir. FZD4, Norrin'e bağlanmak için merkezi soydaş reseptördür ve retina anjiyogenezisi ve iBRB oluşumu için gereklidir (118,119). Norrin, FZD4 ve yardımcı reseptörler LRP5 ve TSPAN12'ye bağlanır ve daha sonra bu dört proteinden herhangi birinin yapısındaki değişiklikler FEVR'e neden olabilir. (116).

Literatürdeki çalışmalarda FEVR ile bağlantılı olan *FZD4*'ün tekli anlamlı missense varyasyonlarına bazı örnekler arasında p.M105V, p.R417Q ve p.G488D yer alır (120). Familyal Eksudatif Vitreoretinopati, Norrie hastalığı, PFVS, Coats hastalığı ve PR'li deneklerin yapılan dizileme araştırmasında, çift varyant p.[P33S(;)P168S] ile PR arasında güçlü bir istatistiksel ilişki ve bebek doğum ağırlığı ile orta düzeyde istatistiksel ilişki bulunmuştur (121). Yeni FEVR deneklerinin dizilenmesinin yeni patojenik varyantları ortaya çıkarmaya devam etmesi umulmaktadır.

2.12.3. LDL Reseptör İlişkili Protein 5 (LRP5)

Retina endotel hücrelerinde eksprese edilen LRP5, Chr-11 üzerindeki *LRP5* geni tarafından kodlanır (122). Yukarıda belirtildiği gibi, TSPAN12 ile LRP5, Norrin'in FZD4 için bağlanma afinitesini artıran bir yardımcı reseptör görevi görür. LRP5, nöral retinanın derin pleksusunda vasküler gelişim için gereklidir (123,124).

Ayrıca LRP5 proteininin dört ekstraselüler *Beta-Propeller/Epidermal Growth Factor* (EGF) benzeri alan bölgesi, bir transmembran alan bölgesi ve C-terminusta iki hücre içi düzensiz alanı vardır.

Norrin ile pozitif ve negatif yüklü amino asit yan zincirleri kullanarak LRP5'in doğrudan etkileşimleri vardır. Ekstraselüler N-terminusa daha yakın olan Beta-Propeller alanları -1 ve -2, *FZD4*'ün Norrin dimerinin merkezi yüzeyiyle etkileşime girdiği yerden uzakta, Norrin dimerinin kenarıyla etkileşime girer. LRP5 ve FZD4 Norrin'e bağlandığında üçlü bir kompleks oluşur (111). Genel olarak, patojenik varyantların şu anda bilinen dağılımı proteinin bu bölgesinde daha fazladır.

Ek olarak, *LRP5*'teki patolojik mutasyonlar ailevi osteoporoz ve yüksek kemik yoğunluğu sendromlarıyla da ilişkilidir (122). Çalışmalar, FEVR ile ilişkili *LRP5*'teki birkaç mutasyonu tanımlamıştır. Birkaç örnek *p.L145F*, *p.R444C*, *p.A522T*, *p.T798A* ve *p.N1121D*'dir. Qin ve diğerleri (2005), bu beş missense mutasyonun LRP5 proteininin oldukça korunan Beta-Propeller alanlarına düştüğünü belirtmiştir (125).

2.12.4. Tetraspanin 12 (TSPAN12)

Hem C-terminusu hem de N-terminusu sitoplazmada bulunan dört transmembran alanıyla karakterize edilen TSPAN12, Tetraspanin protein ailesinin bir üyesidir. Bu dört transmembran alanı, bir küçük hücre dışı halka, bir küçük hücre içi halka ve bir büyük hücre dışı halka ile birbirine bağlıdır. Diğer proteinlerle etkileşimler ve farklı TSPAN proteinlerinin değişken rolleri, büyük hücre dışı halkadaki amino asit dizisi farklılıklarından güçlü bir şekilde etkilenir (126).

Tetraspanin12 varyantları otozomal dominant FEVR'e neden olabilir (127). İnsan TSPAN12 varyantları ayrıca PR, belirli kanser tipleri, TSPAN12 kullanan viral enfeksiyonlar ve zihinsel gerilikle ilişkilendirilmiştir (128–130). Familial Eksudatif Vitreoretinopati tanısı konulan probandlarda tanımlanan birçok varyantın kısaltılmış bir proteinle sonuçlanması öngörülmektedir, ancak çalışmalar kısaltılmış proteinlere sahip hastalar ile missense mutasyonlara sahip hastalar arasında klinik sunumda bir fark algılayamamıştır (127). En az beş FEVR'li ailede *p.A237P* varyantı gözlemlenmiştir (131).

Junge ve ark. tarafından yapılan çalışmada, farelerde transgenik ve nakavt kombinasyonları kullanılarak, nöral retinanın normal vaskülarizasyonunun FZD4, LRP5 ve TSPAN12'nin yanı sıra Norrin'in tam bir kombinasyonunu gerektirdiği gösterilmiştir (105). Nöral retinada *TSPAN12* veya *LRP5*'in bir alelinin kaybı, dikey filizlerde minimal azalmaya neden olmuştur. Her birinden birer alel kaybı, bu azalma üzerinde çok daha büyük bir etkiye sahiptir. Homozigot nakavtlarda TSPAN12 proteininin tamamen yokluğu, gelişen retinal vaskülarizasyonun yüzeysel pleksusundan dikey filizlerin oluşmamasına neden olmuştur. Hücre bazlı transfeksiyon analizlerinde, TSPAN12'nin Norrin/beta-katenin sinyallemesini artırma yeteneği hem FZD4 hem de LRP5'in eş-transfeksiyonuna dayanmaktadır.

Literatürde TSPAN12^(-/-) fareleri ile yapılan ek çalışmalarda ise, iBRB bütünlüğünü ve EC inaktivitesini düzenleyen VE-Kaderin'in yukarı regülasyonu ile birlikte büyük retinal damarlarda önemli bir artış ve anormal arteriyel-venöz geçişi doğrulanmıştır (130). Bu retinalar ayrıca, *NDP*, *FZD4* ve *LRP5*'in patojenik varyantlarında gözlenen kusurlara benzer intraretinal kılcal damarların eksikliğini ve glomeruloid damar malformasyonlarını da göstermiştir. Duvar hücreleri ayrıca TSPAN12^(-/-) farelerinin retinalarının bazı bölgelerinde azalmış veya yoktur. Ek özellikler arasında mikroanevrizmalar, bozulmuş hyaloid damar regresyonu, fokal kanamalar, retinal glial hücre aktivasyonu ve plazmalemma vezikül ilişkili proteinin (PLVAP) yukarı regülasyonu yer alıyordu. Sonraki etkinin muhtemelen Norrin sinyallemesinin bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir çünkü Norrin Wnt sinyalizasyonu, retina endotel hücrelerinde PLVAP ekspresyonunu baskılayan faktörlerden biridir ve bu, PLVAP'ın yüksek bariyer yapısını oluşturmak için gereklidir.

2.13. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler permeabilite arttırıcı faktör olarak da adlandırılan VEGF, normal epitel ve tümör hücreleri tarafından eksprese edilen, proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşumunu indükleyip yeni damar oluşumunu sağlar. 45 kilodalton ağırlığında olan VEGF, disülfit bağları ile bağlı heparin bağlayabilen dimerik bir glikoproteindir. Yarılanma ömrü 10 dakika-altı saat arasında değişmektedir. Müller hücreleri, retina pigment epiteli (RPE), perisitler ve ganglion hücreleri retinada, VEGF' in ana kaynağını oluşturur. Hipoksik/iskemik durumlar anjiyogenezin

başlıca aktivasyonunda yol alır. *VEGF* gen ekspresyonunda ana modülatör, HIF-1'dir. Birçok büyüme faktörü, nitrik oksit, hipofiz hormonları, inflamatuvar sitokinler ve onkojenik mutasyonlar da *VEGF* ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (20). Koryokapillaris ve RPE arasında parakrin sinyal oluşturan *VEGF*, endotelial fenestrasyonunu sağlar. Retina pigment epitelinin koryokapillaris ile komşu olan alt kısmındaki *VEGF* salgısı, fotoreseptörlerle komşu olan üst kısmına göre iki-yedi kat arasında daha fazla olmaktadır. Bu aradaki fark hipoksik durumlarda daha da artmaktadır (132). Reaktif oksijen ara ürünleri, ileri glikasyon son ürünleri ve hipoksi, RPE' den *VEGF* salınımını arttıran güçlü uyarıcılardır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü yedi farklı izoformdan oluşmaktadır. Bunlar; *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E*, *VEGF-F* ve plasental büyüme faktörüdür. *VEGF-A* dominant *VEGF* formu olup literatürde *VEGF* olarak bilinmektedir. İnsanda *VEGF-A* 6p21. kromozomunda kodlanır ve sekiz ekzon ve yedi introndan oluşur. En yüksek mRNA seviyesi erişkin akciğer, böbrek, kalp ve adrenallerinde sentezlenir. Aminoasit sayısına göre *VEGF-A*'nın, *VEGF121*, *VEGF145*, *VEGF148*, *VEGF162*, *VEGF165*, *VEGF165b/164*, *VEGF183*, *VEGF189*, *VEGF206* olmak üzere dokuz izoformu tanımlanmıştır. Vasküler gelişimi başlatmasının yanında *VEGF-A*, vasküler yapının matürasyonu ve korunmasında da rol oynar. Hipoksi gibi patolojik durumlarda sentezi artış göstermektedir. *VEGF-B* ise iskelet kası, pankreas ve kalpte yoğun olarak bulunup insanda 11. kromozomda kodlanır, yedi ekzondan oluşur, altıncı ekzonun alternatif uç birleştirmesi ile *VEGF-B167* ve *VEGF-B186* izoformlarını meydana getirir. Erişkinde *VEGF-C* en fazla kalp, over, ince barsak ve plasentada bulunur. İnsanda dördüncü kromozomda kodlanır ve yedinci ekzondan sentezlenir. İnsanda *VEGF-D* X kromozomunda kodlanır. Erişkinde kolon, ince barsak, iskelet kası ve akciğerde sentezlenir.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü'nün *VEGFR-1*, *VEGFR-2* ve *VEGFR-3* olmak üzere üç tane tirozin kinaz reseptörü (TKR) vardır. Bununla birlikte Nörofilin-1 ve nörofilin-2 olarak bilinen koreseptörleri bulunmaktadır. İlk tanımlanan TKR *VEGFR-1*'dir [Fms- benzeri tirozin kinaz 1 (FLT-1)], *VEGF-A* ve *VEGF-B*'ye yüksek afinite göstermektedir. Vasküler endotel hücreleri, osteoblast, hematopoetik kök hücreler ve plasental trofoblastlarda sentezlendiği gösterilmiştir. Embriyonik hayatta sentezi başlar ve embriyonik gelişim boyunca miktarı giderek

azalır. Ayrıca VEGFR-2 (kinase domain region (KDR), insan; fetal liver kinase-1) ise VEGF-A'ya yüksek afinite gösterir. Anjiyogenik, mitojenik ve permeabilite artışı etkilerden sorumlu olan reseptördür. Bununla birlikte VEGF-E, VEGF-C ve VEGF-D'ye de bağlanabilir. Osteoblast, nöron, megakaryosit, endotel hücresi ve hematopoetik kök hücreler tarafından sentezi yapılır, VEGFR-3 (Fms like tyrosine kinase-4 FLT-4, VEGFR-3/FLT-4) ise VEGF-C ve VEGF-D'ye yüksek afinite gösterir. Lenfatik endotel hücresinin apoptozisten korunmasında ve lenfanjiyogeneizde görev aldığı gösterilmiştir.

Literatürde *VEGF-A* geninin promoter, 5'-untranslate bölgesi (5'-UTR), 3'-untranslate bölgesi (3'UTR) ve intronik bölgelerinde farklı polimorfizmlerin varlığı bildirilmiştir (133). Günümüzde *VEGF* gen polimorfizmi kanserler, diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi, otoimmün ve metabolik hastalıklardan depresyona kadar geniş bir yelpazede araştırılmaktadır. Günümüzde prematüre retinopatisi patogenezinde genetik polimorfizm konusunda en sık incelenen gen anjiyogeneziste önemli rol oynayan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (*VEGF*)'dür. 2004 yılında Cooke ve arkadaşları *VEGFG634C* ve *VEGFC936T* polimorfizmlerini çalışmış ve *VEGFG634C* ile PR arasında anlamlı ilişki bulmuştur (134).

Banyasz ve ark. 2006 yılında, Shastry ve ark. 2009 yılında PR tanılı hastalarda *VEGFC2578A* polimorfizmini çalışmıştır. Banyasz ve ark'larının yaptığı çalışmada her iki grup arasında genotip dağılımı açısından anlamlı fark olmadığını ancak A allel sıklığını ileri evre PR'li erkek hastalarda daha düşük bulmuşlardır (135). Shastry ve ark'ları ise *VEGFC2578A* gen polimorfizmiyle PR arasında anlamlı ilişki bulamamıştır (136). Gismondi ve arkadaşları ise PR tanılı hastalarda *VEGFC702T*, *C936T*, *G1612A* gen polimorfizmlerini çalışmış olup prematüre retinopatisi için anlamlı ilişki bulamamıştır (137). Farklı etnik kökende farklı sayıda hasta grubunda *VEGF* gen polimorfizmiyle ilgili birçok çalışma yapılmaya devam edilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız tek merkezli, prospektif, girişimsel olup araştırmada, 01/01/2024 – 01/08/2024 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, prematüre retinopatisi nedeni yoğun bakımdan konsülte edilen ya da tarama amaçlı gelen ve dahil edilme kriterlerine uygun olan hastaların alınan kanlarındaki *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve *VEGF* nokta mutasyonlarının tespitinin raporlanması ve prognoza etkisinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Bebeklerin verileri retrospektif olarak dosyalardan ve epikrizlerden taranarak elde edildi.

Etik kurul onayı, Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (592-SBKAEK). Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri tarafından desteklendi (Proje no: TTU-2024-3479).

Çalışmaya alınan bebeklerin aileleri çalışmanın amacı ve konusu hakkında bilgilendirildi ve 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' okutularak izin verdiklerine dair imzaları alındı.

Çalışmaya 67 hasta alınarak hastalar aşağıdaki kriterlere göre üç gruba ayrıldı:

- 1) Prematüre doğum öyküsü olup herhangi bir retinal patolojisi bulunmayan bebekler
- 2) Prematüre retinopatisi tanısı nedeni takipli olan ancak fotokoagülasyon, intravitreal enjeksiyon veya vitreoretinal cerrahi uygulanması gerekmeyen bebekler (Evre 1-2 PR)
- 3) Prematüre retinopatisi nedeni laser fotokoagülasyon, intravitreal enjeksiyon veya vitreoretinal cerrahi endikasyonu olan bebekler (Evre 3-4-5 PR)

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, prematüre retinopatisi tarama amaçlı kontrol muayenesine gelen hastalar
2. Prematüre retinopatisi risk faktörlerinden birine sahip olmak
3. Sıfır-bir yaş arası olmak
4. Çalışmaya dahil olmak için ailenin/yasal vasinin sözlü ve yazılı onam vermesi

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

1. Ek korneal, glokomatöz, nöropatik hastalık eşlik etmesi
2. Ek genetik hastalığa sahip olma
3. Bir yaşından büyük olmak

Hastalarda periferik venden alınan kanlar +4 °C dolaplarda saklandı ve *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve *VEGF* nokta mutasyonlarının tespiti ve değerlendirilmesi yapıldı. Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) eldesi gruplarda periferik kandan yapıldı. Hastalardan bir adet bir Etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüpe periferik kan alınarak temin edilen periferik kanlardan DNA elde edildi.

Çalışmamızda kan örneklerini kayıt altına alırken onlara sırasıyla kodlar verilerek numuneler kayıt altına alındı. Grup 1 için A kodu, grup 2 için B, grup 3 için C kodu ile başlayan numaralandırma yapıldı. Çalışmaya dahil olan hastalar, adı soyadı, cinsiyeti, yaşı, hastane kurumu, grubu ve aldığı çalışma kodu ile kaydedildi. Hastaların kanlarından elde edilen DNA dokularında genetik polimorfizm çalışması uygulandı. Uygulanacak prosedür aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanmıştır.

3.1.Genetik Analizler için Uygulanacak Yöntemler

Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin kan örnekleri -20 °C saklandığı için, çalışmaya başlamadan önce kanlar iyice çözüldü ve birkaç defa alt üst edilerek homojenize edildikten sonra analize hazır hale getirildi.

3.1.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Kandan 200 µl kullanılarak DNA izolasyonu *MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit* kullanılarak *MagNA Pure 96* cihazında otomatize olarak gerçekleştirildi.

Cihaz tarafından *MagNA Pure Magnetic Glass particle* (MGP) teknolojisi kullanılarak otomatize olarak gerçekleştirilen DNA izolasyonu basamakları kabaca aşağıda belirtilmiştir:

1. Örnek materyal lizis yapıldı, nükleik asitler serbestleştirildi, nükleazlar denatüre edildi.
2. Nükleik asitler MGP'lerin silika zeminine bağlandı.
3. Nükleik asitlerle bağlı MGP'ler manyetik olarak ayrıldı.
4. Bağlanmamış protein, hücre artıkları ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) inhibitörü gibi maddeler tekrarlanan yıkama basamakları ile uzaklaştırıldı.
5. Pürifiye edilen nükleik asitler MGP'lerden uzaklaştırıldı.

Belirtilen basamaklar aşağıda içerikleri belirtilen kit içeriği kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3).

Tablo 3. DNA izolasyon basamakları kit içeriği

Kit	Etiket	İçerik/Fonksiyon
Kartuş 1	Sarf kartuşu 1	
Kuyucuk 1	Yıkama solüsyonu I	160 ml <6 M Guanidine hidroklorid, <50% EtOH, <30 mM Tris HCl, Kalıntıları uzaklaştırmak için
Kuyucuk 2	Yıkama solüsyonu II	80 ml <6 M Guanidine hidroklorid, <50% EtOH, <30 mM Tris HCl, Kalıntıları uzaklaştırmak için
Kuyucuk 3	Lizis/binding buffer	80 ml <6M Guanidine thiosiyanat, <30% Triton X-100, <60 mM Tris HCl Hücre lizisi ve nükleik asit bağlanması için
Kartuş 2	Sarf kartuşu 2	
Kuyucuk 1		Boş
Kuyucuk 2	Proteinaz K	15 ml 2% Proteinaz K, 50% Gliseerol Proteinlerin yıkımı için

Tablo 3. devamı

Kuyucuk 3	Elüsyon buffer	80 ml <60 mM Tris HCl Nükleik asitlerin elüsyonu için
Kuyucuk 4	Yıkama solüsyonu III	160 ml <20 mM Na-asetat buffer Kalıntıları uzaklaştırmak için
Şişe 1	Magnetic Glass Particles (MGP)	6 şişe, her biri 18 ml İzopropanol içeren MGP süspansiyonu Nükleik asitleri bağlamak için

3.1.2. Genomik DNA'nın saflığının ve miktarının ölçülmesi

İzole edilecek genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik dansitenin okunması DNA miktarını, 260/280 nm dalga boyundaki okumalar ise DNA'nın saflığını verdi. Spektrofotometrede 260 nm' de okunan bir Optik Dansite (OD) solüsyonda 50 µg/ml DNA konsantrasyonunda çift iplikli DNA molekülü olduğunu söylemektedir. Buradan hareketle, genomik DNA 1/100 seyreltilmiş ve konsantrasyonunun belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanıldı. "DNA konsantrasyonu (µg/ml) = (OD)₂₆₀ x 100 (sulandırma katsayısı) x 50 µg/ml (çift zincirli DNA'lar için OD değeri)" Spektrofotometredeki 260/280 nm optik dansite oranı 1,8 ile 2,0 arasında olan örnekler uygun seyreltmeler yapılarak kullanılmak üzere stoklandı.

3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanması ve Dizi Analizi

İnsan *FZD4*, *LRP5*, *TSPAN12*, *NDP*, *VEGF* genlerinde belirlenen polimorfizmlerin incelenmesi amacıyla gen dizisine ulaşabilmek için internet temelli veri tabanları [NCBI ve Ensembl] kullanıldı. Bu gen dizisi üzerinde uygulanacak olan PCR reaksiyonu için Primer 3 programı kullanılarak tasarlanan forward ve reverse primer dizileri tespit edildi. Tasarımı gerçekleştirilen forward

ve reverse primer dizilerinin genom üzerindeki bağlanma bölgelerini görmek ve spesifitesini belirlemek için internet tabanlı olup tüm genomu tarayabilen bir program (Primer-BLAST) kullanılarak insan genomundaki olası eşleşmeler ortaya çıkartıldı. Projemizde kullanılması planlanan aşağıda belirtilen hedef gen bölgelerine spesifik primerler ile konvansiyonel PCR gerçekleştirildi. (Şekil 10,11)

FZD4: c.502C>T, chr11-86663296 G>A, p.Pro168Ser, NM_012193.4, bSNP:rs61735303

LRP5: c.3357G>A, chr11-68192690 G>A, p.Val1119Val, NM_002335.4, dbSNP:rs556442

TSPAN12: c.765G>T, chr7-120428799 C>A, p.Pro255Pro, NM_012338.4, bSNP:rs41623

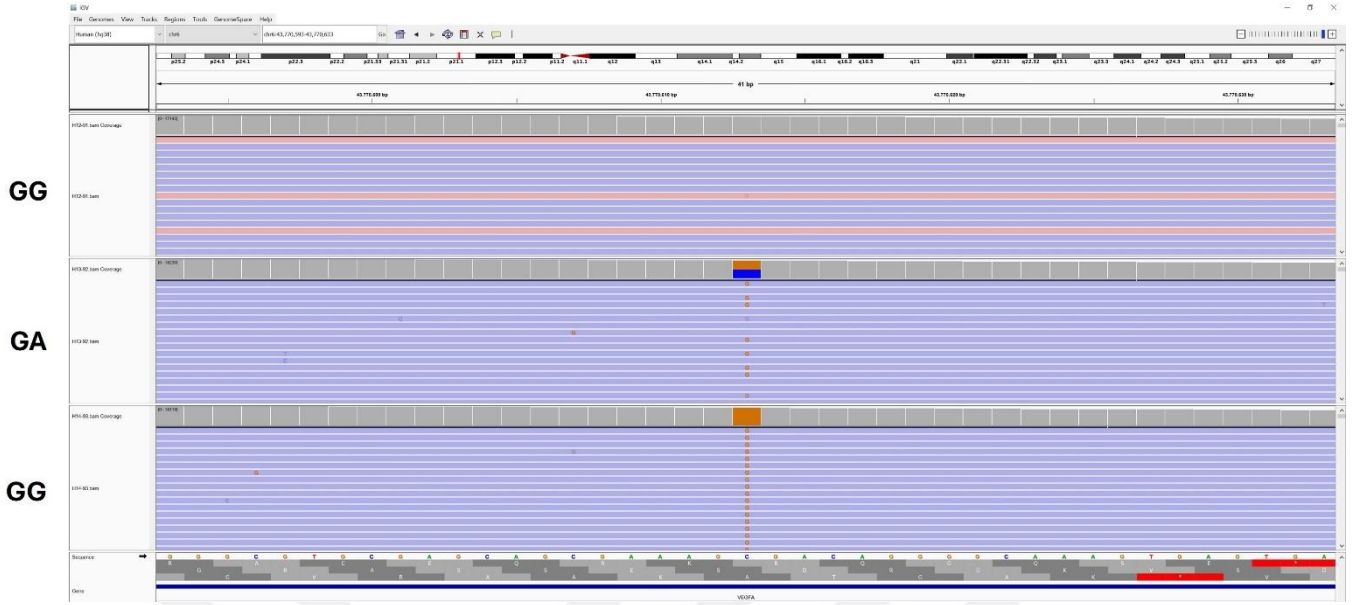
NDP: NM_000266.4, üç ekzonun tamamı

VEGF: +405C>G [dbSNP: rs2010963],

-460T>C [dbSNP: rs833061]

+936 C/T [rs3025039]





Şekil 11. *VEGFA*: +405C>G varyantlarına ait dizi analizi görüntüsü

Liyofilize halde gelen forward ve reverse primerler gerekli hesaplamalar sonucunda son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde; DNase ve RNase içermeyen steril distile su eklendi. Primer stokları alikotlandıktan sonra PCR çalışmasında kullanılmak üzere distile su ile 1:10 oranında seyreltilti. PCR reaksiyonu hazırlanırken bütün işlemler soğuk blok üzerinde yapıldı. Saflığı ve miktarı belirlenen genomik DNA'nın hizmet alımı kapsamında firma tarafından temin edilen sarf malzemeler ile PCR reaksiyonu için *FZD4*, *LRP5*, *TSPAN12*, *NDP* ve *VEGF* genlerine özgü primer çiftlerini içeren karışım kullanıldı. İzole edilen DNA'lara PCR master karışımı eklenip optimizasyon amacıyla her polimorfizm için farklı PCR koşulları denendikten sonra uygun PCR karışımı ve PCR cihaz programı belirlenip termal siklus cihazına yerleştirildi.

Cihazda PCR program bilgileri belirlendikten sonra elde edilen PCR ürünleri jel elektroforez yöntemi ile kontrol edildi, ardından elde edilen PCR ürünleri ile MGI G400 yeni nesil cihazında sekans analizi yapıldı.

3.1.4. Yürütülen Örneklerin Analizi

Yeni nesil dizi analizi cihazından elde edilen .bam dosyaları IGV programı ile görüntülenerek her örneğe ait PCR ürünleri analiz edilmiş olup ilgili SNP

bölgelerine ait genotipler belirlendi. Bu bölgelerdeki tek nükleotid değişikliklerinin patojenik etkisinin belirlenmesi amacıyla *NDP* genine ait tüm ekzonik bölgeler analiz edileceğinden Franklin veritabanı kullanıldı.

3.2.İstatistiksel Analiz

Projemizin istatistiksel verileri için 'IBM SPSS Statistics V25' programı kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümler ise ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum-maksimum) olarak özetlendi. Kontrol ve hasta gruplar arasındaki farklılıklar çapraz tablo Ki-kare testi ile belirlendi, polimorfizmler için haplotip analizi uygulandı. Numerik değişkenler için iki grup arasında karşılaştırmalı T testi, üç grup için tek yönlü varyans analizi uygulandı. ANOVA sonrası önemlilik durumunda post-hoc test olarak Bonferoni testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

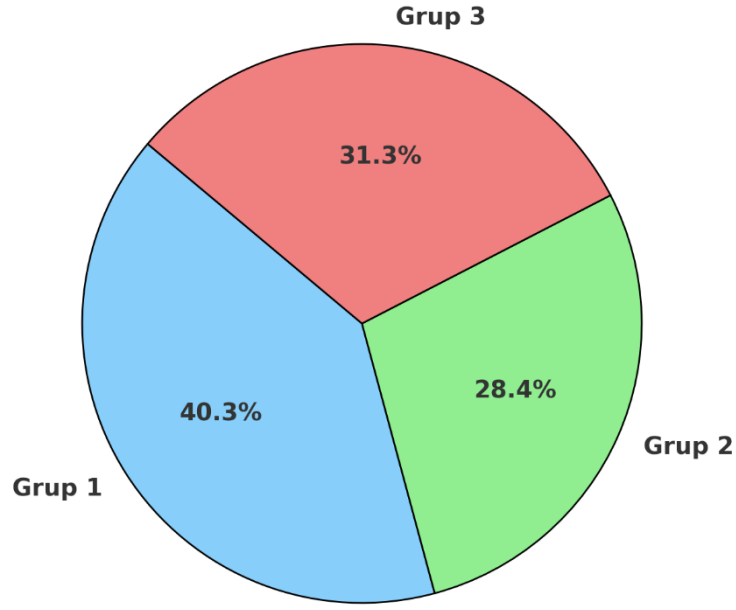
Prematüre retinopatisi olan bebeklerde *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve *VEGF* nokta mutasyonlarının tespiti ve prognoza etkisinin değerlendirilmesi amacı ile yapılan çalışmamızda çalışmaya prematüre doğmuş olan 67 bebek dahil edildi. Toplam 67 bebeğin dağılımı PR evrelerine göre bakıldığında Evre 0 PR 27 hasta (%40,3), Evre 1 PR 15 hasta (%22,4), Evre 2 PR dört hasta (%6,0), Evre 3 PR 13 hasta (%19,4), Evre 4 PR altı hasta (%9,0) ve Evre 5 PR iki hasta (%3,0) idi (Tablo 4).

Tablo 4. Hastaların PR evrelerine göre gruplandırılması

PR evresi	Hasta sayısı
Evre 0	27 (%40,3)
Evre 1	15 (%22,4)
Evre 2	4 (%6,0)
Evre 3	13 (%19,4)
Evre 4	6 (%9,0)
Evre 5	2 (%3,0)

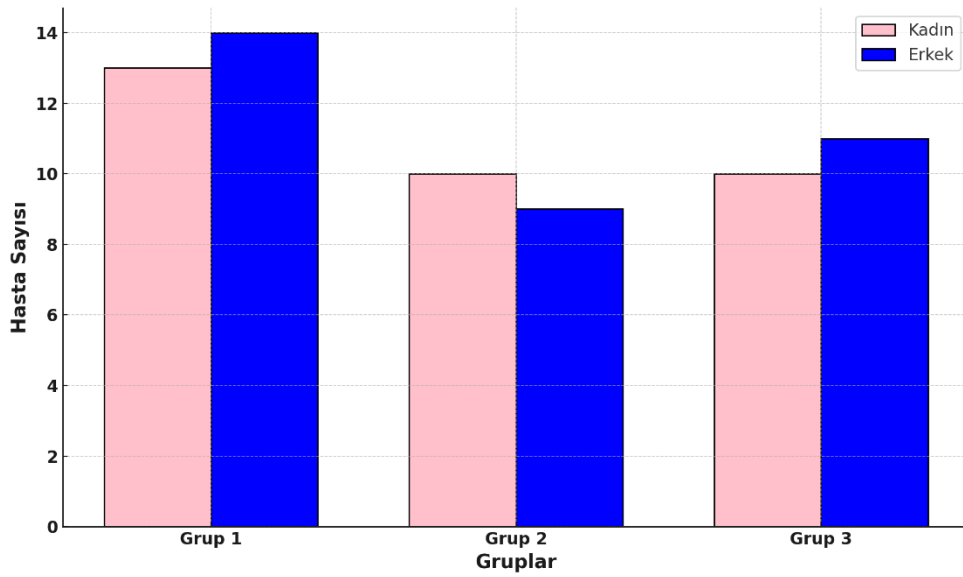
PR: Prematüre Retinopatisi

Gruplar; 27 olgu (%40,3) Grup 1 (Evre 0), 19 olgu (%28,4) Grup 2 (Evre 1-2), 21 olgu (%31,3) Grup 3 (Evre 3-4-5) şeklinde idi (Şekil 12). Plus hastalık 21 hastada (%31,3) bulunmaktaydı.



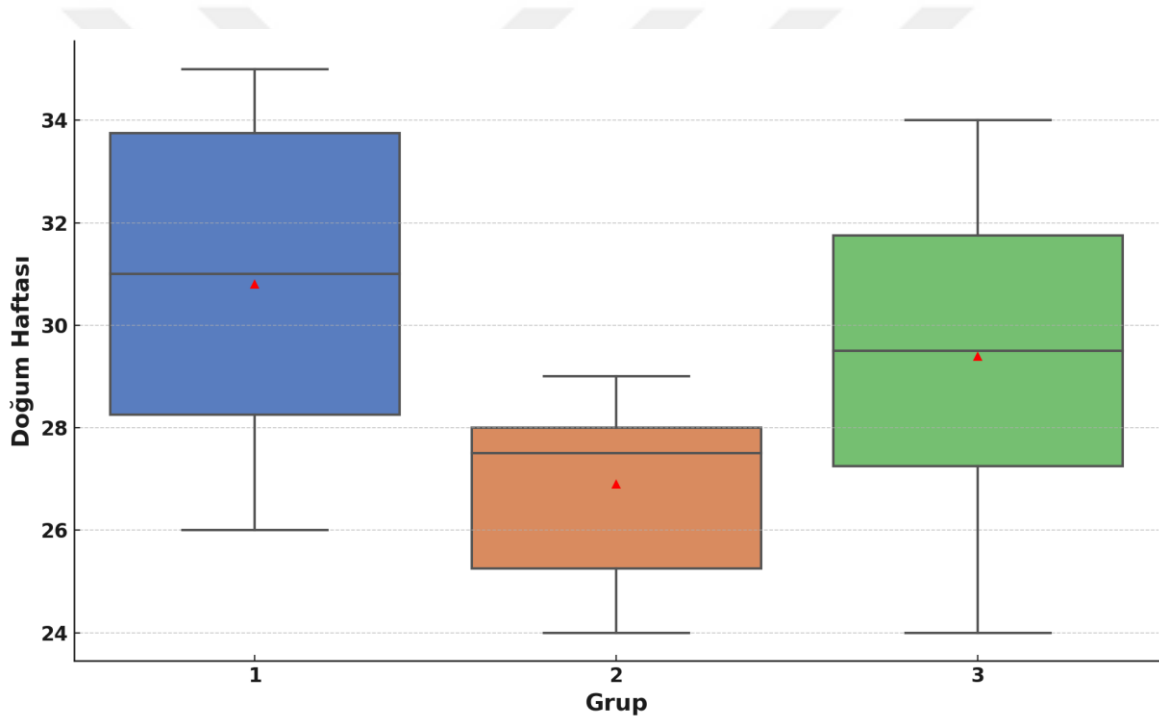
Şekil 12. Hastaların gruplara göre dağılımı

Çalışmaya alınan bebeklerin cinsiyet dağılımına baktığımızda 34'ü (%50,8) erkek, 33'ü (%49,2) kadındı. Grup dağılımı açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,94$) (Tablo 4). Grupların cinsiyet dağılımı aşağıda gösterilmektedir (Şekil 13).

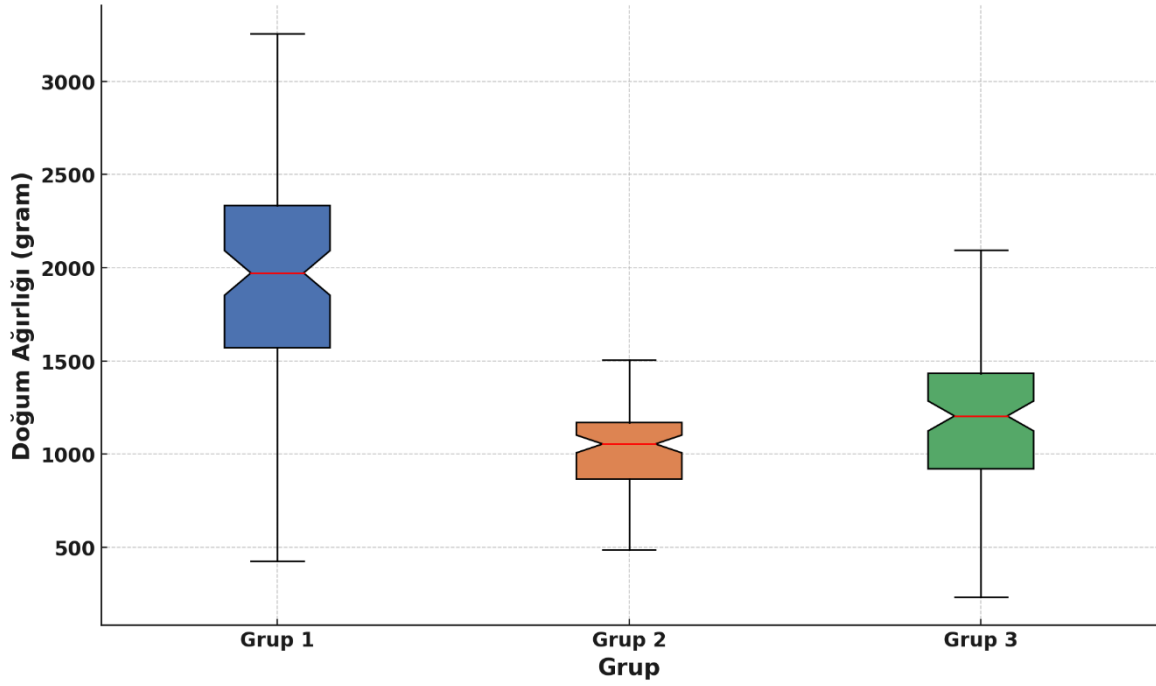


Şekil 13. Grupların cinsiyet dağılımı

Tüm bebeklerin gestasyonel yaşları 24-34 hafta arasında olup, gestasyonel yaş ortalaması $29,8 \pm 3,0$ haftaydı. Doğum ağırlıkları ise 534 ile 3300 gram arasında olup, ortalama $1412,5 \pm 681,2$ gramdı. Grup 1 bebeklerin doğumda ortalama gestasyonel yaşları $32,0 \pm 2,5$ hafta, ortalama doğum ağırlığı ise $1882,1 \pm 618,8$ gram olarak bulundu. Grup 2 bebeklerin doğumda ortalama gestasyonel yaşları $28,1 \pm 2,0$ hafta ve ortalama doğum ağırlığı ise $1080,8 \pm 602,8$ gr olarak saptandı. Grup 3'te ise doğumda ortalama gestasyonel yaşları $28,4 \pm 2,7$ hafta ve ortalama doğum ağırlığı ise $1108,9 \pm 455,6$ gram olarak saptandı (Şekil 14 ve 15).



Şekil 14. Grupların doğum ağırlıklarının dağılımı



Şekil 15. Grupların doğum haftalarının dağılımı

Grup 1'deki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşları Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklere göre anlamlı derecede yüksekti. Doğumda ortalama gestasyonel yaş açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0,01$). Grup 1'deki bebeklerin ortalama doğum ağırlıkları da Grup 2 ve Grup 3'e göre anlamlı yüksek saptandı. Doğumda ortalama gestasyonel ağırlıkları açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0,01$). Grup 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,42$). Prematüre retinopatisi gelişim riski ile düşük gestasyonel yaş ve düşük doğum ağırlığı arasında korelasyon bulunmaktadır. Gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı düştükçe PR gelişim riski artmaktadır. Olguların doğum şekline baktığımızda gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,20$). Prematüre bebeklerin demografik özellikleri Tablo 5'te verildi.

Tablo 5. Prematüre bebeklerin dağılımı ve demografik özellikleri

		Grup 1	Grup 2	Grup 3	P değeri
Cinsiyet	Kadın	13 (%19,4)	10 (%14,9)	10 (%14,9)	0,94*
	Erkek	14 (%20,9)	9 (%13,4)	11 (%16,4)	
Doğum şekli	NSVY	5 (%7,5)	1 (%1,5)	1 (%1,5)	0,20*
	Sezeryan	22 (%32,8)	18 (%26,9)	20 (%29,9)	
Gestasyonel hafta (hafta)		32 ± 2,5 (26 - 34)	28,1 ± 2,0 (24 - 33)	28,4 ± 2,7 (24 - 33)	<0,01*
Gestasyonel ağırlık (gram)		1882,1 ± 618,8 (756 - 3200)	1080,9 ± 602,8 (660 - 3300)	1108,9 ± 455,6 (534 - 2100)	<0,01*

NSVY: Normal Spontan Vajinal Yol

*Ki-kare testi

Risk faktörleri açısından bakıldığında; ikiz eşi olan hasta sayısı 17 (%25,4), sarılık gelişen hasta sayısı 25 (%37,3), fototerapi ihtiyacı gelişen hasta sayısı 19 (%28,4), doğum sonrası herhangi bir zamanda entübasyon gerekliliği olan hasta sayısı 18 (%26,9), herhangi bir zamanda oksijen ihtiyacı olan hasta sayısı 50 (%74,6), kan transfüzyonu yapılan hasta sayısı 12 (%17,9), sepsis öyküsü olan hasta sayısı 19 (%28,4), sürfaktan gerekliliği doğan hasta sayısı 36 (%53,7) idi. Gruplar arasında fototerapi ihtiyacı, oksijen ihtiyacı, kan transfüzyonu, sepsis öyküsü ve sürfaktan ihtiyacı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,01$, $p=0,02$, $p=0,03$, $p=0,01$, $p<0,01$). Gruplar arasında ikiz eşi, sarılık, entübasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,98$, $p=0,22$, $p=0,13$) (Tablo 6).

Tablo 6. Hastaların risk faktörlerine göre gruplandırılması

		Grup 1	Grup 2	Grup 3	P değeri
İkiz	Var	7 (%10,4)	5 (%7,5)	5 (%7,5)	0,98
	Yok	20 (%29,9)	14 (%20,9)	16 (%23,9)	
Sarılık	Var	8 (%11,9)	6 (%9,0)	11 (%16,4)	0,22
	Yok	19 (%28,4)	13 (%19,4)	10 (%14,9)	
Fototerapi	Var	4 (%6,0)	4 (%6,0)	11 (%16,4)	0,01*
	Yok	23 (%24,3)	15 (%22,4)	10 (%14,9)	
Entübasyon öyküsü	Var	5 (%7,5)	4 (%6,0)	9 (%13,4)	0,13
	Yok	22 (%32,8)	15 (%22,4)	12 (%17,9)	
Oksijen ihtiyacı	Var	16 (%23,9)	14 (%20,9)	20 (%29,9)	0,02*
	Yok	11 (%16,4)	5 (%7,5)	1 (%1,5)	
Kan Transfüzyonu	Var	0 (%0,0)	4 (%6,0)	8 (%11,9)	0,03*
	Yok	27 (%100)	15 (%22,4)	13 (%19,4)	
Sepsis	Var	2 (%3,0)	5 (%7,5)	12 (%17,9)	0,01*
	Yok	25 (%37,3)	14 (%20,9)	9 (%13,4)	
Sürfaktan ihtiyacı	Var	6 (%9,0)	13 (%19,4)	17 (%25,4)	<0,01*
	Yok	21 (%31,3)	6 (%9,0)	4 (%6,0)	

*Ki-kare testi

Grup 3'teki bebeklerin fototerapi ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,04$). Grup 3'teki bebeklerin herhangi bir zamanda oksijen ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,04$). Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklerin kan transfüzyonu ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derece yüksek bulundu ($p=0,014$, $p=0,01$). Grup 3'teki bebeklerin sepsis öyküsü Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$). Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklerin sürfaktan ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,02$, $p<0,01$) (Mann-Whitney-U testi).

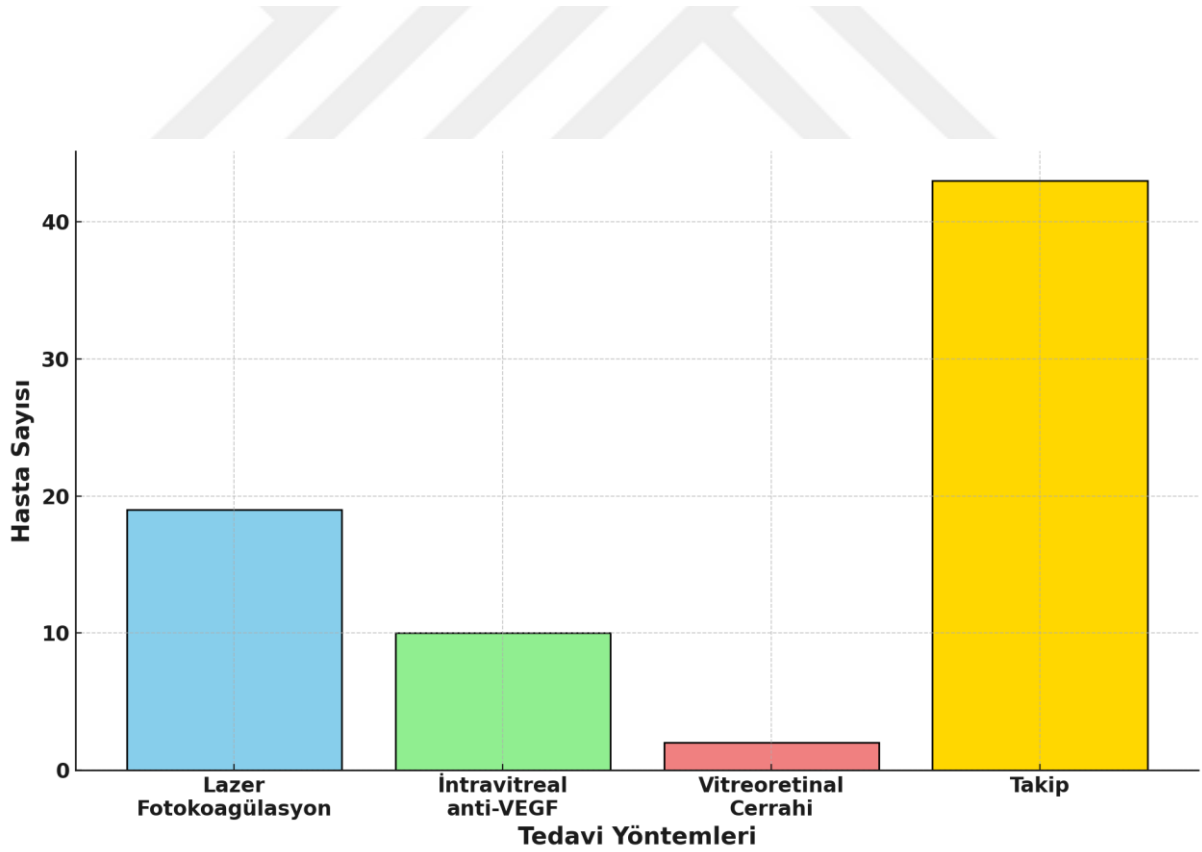
Hastalara uygulanan tedavi yöntemlerine baktığımızda 43 hastaya (%64,2) takip, 19 hastaya (%28,4) lazer fotokoagülasyon, 10 hastaya (%14,9) intravitreal anti-VEGF enjeksiyonu, iki hastaya (%3,0) vitreoretinal cerrahi uygulandı. Hastaların dağılımı aşağıdaki tablo ve grafikte gösterilmektedir (Tablo 7) (Şekil

16). Lazer fotokoagülasyon yapılan hastalar ortalama postnatal $13,3 \pm 8,3$ haftada idi (açıklık = 6-43).

Tablo 7. Hastaların tedavi yöntemlerine göre gruplandırılması

Tedavi Yöntemleri	Hasta sayısı
Lazer fotokoagülasyon	19 hasta (%28,4)
İntravitreal anti-VEGF enjeksiyonu	10 hasta (%14,9)
Vitreoretinal cerrahi	2 hasta (%3,0)
Takip	43 hasta (%64,2)

VEGF: Vasküler Endotelyal Growth Faktör



Şekil 16. Hastaların tedavi yöntemlerinin dağılımı

4.1.Mutasyon Analizi

Toplam 67 prematüre bebek, FEVR'e neden olan genlerdeki (*LRP5*, *TSPAN12*, *FZD4*, *NDP*) ve *VEGF* genetik varyantları açısından tarandı. Hastalarda *LRP5*, *TSPAN12* ve *VEGF* için gen varyantları tarama sırasında bulundu. Bu çalışmada hiçbir hastada *NDP* ve *FZD4* gen varyantı saptanmadı.

67 hastanın tamamında (%100,0) *TSPAN12* geni için *c.765G>T* (*p.Pro255Pro*) genotipi tespit edilirken bunların 52'si (%77,6) TT genotipi, 15'i (%22,4) GT genotipi idi. *LRP5* gen analizinde ise beş hastada (%7,4) herhangi bir mutasyon saptanmazken 62 hastada (%92,5) *LRP5* genindeki *c.3357G>A* (*p.Pro168Ser*) varyantı saptandı ve bu varyantlar 30 hastada (%44,8) GA genotipi, 32 hastada (%47,8) GG genotipi idi. *VEGF* gen mutasyonlarında ise 13 hastada (%19,4) *+936 C/T (rs3025039)* varyantı, 50 hastada (%74,6) *-460T>C (dbSNP: rs833061)* varyantı, 59 hastada (%88,1) *+405C>G (dbSNP: rs2010963)* varyantı saptandı. *VEGFA936*'da 13 hastada (%19,4) CT genotipi, *VEGFA-460T>C* varyantı 38 hastada TC, 12 hastada CC genotipi, *VEGF+405C>G* varyantı 33 hastada (%49,3) CG, 26 hastada (%38,8) GG genotipinde saptandı.

Prematüre retinopatisi evreleri açısından ayrılan üç grupta bulunan genetik mutasyonlara bakıldığında *LRP5* açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklı saptanırken ($p=0,018$), *FZD4*, *TSPAN12*, *NDP*, *VEGF* açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Grup 2 ve 3'teki hastalarda Grup 1'deki hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha çok hastada *LRP5* gen varyantları saptandı ($p= 0,02$, $p=0,03$).

Hastalar PR ve non-PR olarak ayrılıp genetik mutasyonlar açısından incelendiğinde *LRP5* açısından iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklı saptandı ($p=0,005$). *VEGF: +405C>G (dbSNP: rs2010963)* varyantının GG genotipi ise PR olan grupta daha yüksek hastada saptandı ($p=0,022$). Gruplar arasında *FZD4*, *TSPAN12*, *NDP* genleri açısından ise istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (Tablo 8).

Tablo 8. FZD4, LRP5, TSPAN12, NDP ve VEGF gen varyantlarının genetik mutasyonel analizi

	PR (n=40)	Non-PR (n=27)	P değeri
FZD4 varyantları (n, %): Lokasyon: Ekzon 2 cDNA: c.502C>T Protein: p.P168Ser	0 (%0,00)	0 (%0,00)	1,00*
LRP5 varyantları (n, %): Lokasyon: Ekzon 15 cDNA: chr11-68192690 c.3357G>A Protein: p.V1119Val	40 (%100)	22 (%81,5)	0,005*
TSPAN12 varyantları (n, %) Location: Exon 8 cDNA: chr7-120428799 C>A Protein: p.Pro255Pro bSNP:rs41623	40 (%100)	27 (%100)	1,00*
NDP varyantları (n,%) Lokasyon: Ekzon 3	0 (%0,00)	0 (%0,00)	1,00*
VEGF : +405C>G [dbSNP: rs2010963]	35 (%87,5)	24 (%88,9)	0,863*
VEGF : -460T>C [dbSNP: rs833061]	33 (%82,5)	17 (%63,0)	0,071*
VEGF : +936 C/T [rs3025039]	7 (%17,5)	6 (%22,2)	0,632*

* Ki kare testi, PR: Prematüre Retinopatisi, cDNA: Complementary DNA, VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor

5. TARTIŞMA

Prematüre retinopatisi (PR), prematüre doğan bebeklerde retinal vaskülogenezin duraklaması ve anormal neovaskülarizasyon ile karakterize, çocukluk çağındaki körlüğün önde gelen nedenlerinden biridir. Multifaktöryel patogeneze sahip olan PR'de, çevresel faktörlerin genetik yatkınlıkla birleşimi hastalığın şiddetini belirler (1,2). Retinal damar gelişimi sırasında prematüre doğum ve çevresel faktörler (oksijen tedavisi, hipoksi) retinal vasküler homeostazın bozulmasına neden olabilir (138).

Son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucunda *FZD4*, *LRP5*, *TSPAN12* ve *VEGF* gibi genetik varyantların PR şiddetini artırabileceğini gösteren örnekler literatürde mevcuttur. Özellikle *VEGF* genindeki *rs833061* ve *rs2010963* polimorfizimleri, retinal neovaskülarizasyon süreçlerini etkileyerek ciddi PR gelişimine katkıda bulunmaktadır (4). Ayrıca, *FZD4* mutasyonlarının retinal vaskülogenezi bozarak retinal damar gelişimini ciddi şekilde engellediği ve bu durumun ileri evre PR ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (139). Bu genetik faktörler, çevresel risk faktörleriyle birleştiğinde hastalığın progresyonunu hızlandırabilir ve tedaviye yanıtı etkileyebilir (6).

Prematüre retinopatisi, FEVR ile genetik benzerlikler taşımakla birlikte her iki hastalık da tamamlanamamış retinal vaskülarizasyon ve avasküler periferik retina ile karakterizedir. Ancak FEVR, genetik mutasyonlarla ilişkilendirilirken, PR'de genetik faktörlerin yanında çevresel faktörler de önemli bir rol oynar. Bu iki hastalıkta *FZD4*, *LRP5* ve *TSPAN12* gibi genetik mutasyonların tespit edilmesi, ortak bir patofizyolojik mekanizma olduğuna dikkat çekmektedir (6,140).

Prematüre retinopatisinin gelişiminde önemli rol oynayan genlerden *TSPAN12*, *LRP5*, *NDP*, *FZD4* ve *VEGF*'deki polimorfizimler, retinal vaskülarizasyonun düzgün gelişimini engelleyebilir ve bu şekilde hastalığın şiddetini artırabilir. Bu genlerin fonksiyon kaybına veya aşırı ekspresyonuna neden olan polimorfizimler, retinal vasküler gelişimi etkileyerek PR'nin progresyonuna katkıda bulunabilir. Son çalışmalarda, *VEGF* ve diğer genetik varyasyonların, hastalığın progresyon ve şiddeti üzerinde belirgin etkiler gösterdiği ortaya koyulmuştur. Özellikle anti-VEGF tedavisinin klinik uygulamalardaki rolü giderek daha fazla önem kazanmaktadır (141–143).

Prematüre retinopatisinin gelişiminde çeşitli çevresel risk faktörleri belirlenmiştir. Ancak genetik yatkınlık, bu faktörlerin etkisini artırabilir ve hastalığın fenotipik çeşitliliğini açıklayabilir. Doğum ağırlığı ≤ 1500 gram olan bebeklerde PR insidansı %35-60 arasında değişmektedir (144,145). Palmer ve ark. çalışmasında, her 100 gramlık doğum ağırlığı artışında PR riskinin %30 azaldığı bildirilmiştir (146). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak PR saptanmayan grubun (Grup 1) doğum ağırlığı, Grup 2 ve 3'e göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır.

Gestasyon yaşının ise <28 hafta altında olması ciddi PR gelişim riskini %60'a kadar artırmaktadır (147). Shemesh R. ve arkadaşları, gestasyon yaşındaki her bir haftalık artışın ise PR riskini %18 oranında azalttığını göstermiştir (148). Özellikle 32 haftanın üzerinde doğan prematüre bebeklerde PR gelişim oranı önemli ölçüde düşmektedir. Bizim çalışmamızda da PR saptanmayan grubun (Grup 1) doğum haftasının, PR saptanan diğer gruplara göre anlamlı bir derecede yüksek bulunması literatürü desteklemektedir.

Tseng ve ark.'nın ikizler üzerinde yaptığı retrospektif analiz, PR riskinin ikizlerde tekillere göre 13,6 kat daha fazla olduğunu ve özellikle düşük doğum ağırlığı ve mekanik ventilasyonun riski artırdığını göstermiştir (149). Johari ve ekibi ise ikizlerin ve üçüzlerin, tekillere göre daha yüksek gestasyonel yaş ve doğum ağırlığına sahip olmalarına rağmen, PR için benzer veya daha yüksek risk taşıdığını bulmuş ve çoğul doğumlarda intrauterin çevre ve genetik faktörlerin rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Bu bulgular, PR tarama kriterlerinin, çoğul gebeliklere özgü risk profillerini içerecek şekilde yeniden değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bizim çalışmamızda ise PR varlığı ile ikiz doğum arasında gruplar arasında literatürden farklı olarak istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır. Hastanemizin üçüncü basamak bir hastane olması nedeniyle genellikle yoğun bakım hastalarının bize refere edilmesi nedeniyle PR olmayan hastaların da ciddi hastalar olması nedeniyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olabilir. Hasta sayısının artırılması ile literatürle uyumlu sonuçlar bulunabilir.

Alfaar ve ark., yenidoğan sarılığı ve fototerapinin, oksidatif stres yoluyla PR gelişimini artırabileceğini vurgulamış ve sarılığın PR ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hiperbilirubinemi ve fototerapinin PR üzerindeki etkisi üzerine iki

önemli çalışma mevcuttur: Almanya'daki bir ulusal kohort çalışması, PR insidansını 10.000 canlı doğumda 17,04 olarak belirlemiş ve yenidoğan sarılığının PR ile sık ilişkili olduğunu vurgulamıştır (150). Diğer bir çalışmada ise hiperbilirubinemiye maruz kalan bebeklerde PR insidansı %13,8 iken, maruz kalmayanlarda %7,8 olarak bulunmuş; fototerapi süresi arttıkça riskin yükseldiği belirtilmiştir. Ancak 27 haftadan küçük gestasyonel yaştaki bebeklerde bu ilişki gözlenmemiştir (151). Fototerapinin oksidatif stres yoluyla prematüre retinaya zarar verebileceği ve bu ilişkinin mekanizmalarının daha fazla araştırılması gerektiği ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda gruplar arasında sarılık açısından bir fark bulunamamıştır ancak ağır PR olan gruptaki hastalarda (Grup 3), PR gelişmeyen gruba (Grup 1) göre daha çok fototerapi ihtiyacı olduğu bulunmuştur. Ancak fototerapi sayısı ve sıklığı ile ilgili herhangi bir veri incelenmemiştir.

Yüksek oksijen saturasyonu retinal vaskülogenezi baskılayabilirken, hipoksi ise retinal neovaskülarizasyonu uyarabilir (152). STOP-ROP çalışmasında ise oksijen saturasyonu kontrolü için kullanılan algoritmaların PR progresyonunu azaltmada etkili olduğu ortaya koyulmuştur (153). Literatürde oksijen tedavisinin uzun süreli etkilerinin ve non-stabil oksijen seviyelerinin retinal damarlanma üstündeki bozulmaları artırabileceğini gösteren yayınlar mevcuttur (154). Bizim çalışmamızda da entübe olan hasta sayısı ağır PR görülen grupta (Grup 3) daha fazla gözükmüş olsa da gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Oksijen gerekliliği olan hasta sayısında ise PR saptanan gruplardaki hastaların (Grup 2 ve 3), PR saptanmayan gruplardaki hastalara (Grup 1) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla oksijen ihtiyacı olduğu bulunması literatürle uyumludur. Entübe hasta sayısının gruplar arasında anlamlı derecede farklı çıkmaması; yeni nesil gelişmiş solunum cihazlarının ortaya çıkması sonucu entübe hastalarda oksijen seviyesini ayarlayabilme olanağı sunarak, oksijen seviyesinin dalgalanmasının önüne geçip hiperoksiye maruziyetini önlediği ve yeni nesil solunum cihazları ile entübasyonun PR için bir risk faktörü ve PR şiddetini arttıran bir faktör olmadığı hipotezi ile açıklanabilir.

Wang ve ark., neonatal sepsis geçiren bebeklerde PR gelişim riskinde iki kata kadar artış olduğunu yaptıkları çalışma ile ortaya koymuştur (155). Bu durumun patogenetik mekanizması, inflamatuvar sitokinlerin retina damarlarında neden olduğu sekonder hasarla ilişkilendirilmiştir. Rao ve ark. ise, sepsis ve nekrotizan

enterokolit gibi sistemik enfeksiyonların, inflamatuvar süreçlerin aktivasyonu sonucu PR progresyonunu hızlandırdığını ortaya koymuştur (156). Literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da ağır PR olan grupta (Grup 3) PR saptanmayan gruba (Grup 1) göre anlamlı derecede daha yüksek sayıda hastada neonatal sepsis saptanmıştır.

Wang ve ark. prospektif çalışmasında, eritrosit transfüzyonu yapılan bebeklerde PR insidansı %47,3, transfüzyon yapılmayanlarda ise %17,7 olarak bulunmuştur. Ayrıca artan transfüzyon sayısı ile PR riski arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır. ($p < 0,001$) Tek bir transfüzyon PR riskini %79 artırırken, üç veya daha fazla transfüzyon bu riski yaklaşık üç kat artırmıştır.(157) Uberos ve arkadaşlarının çalışmasında, üçten fazla kırmızı kan hücresi (RBC) transfüzyonu alan bebeklerde PR riskinin 2,77 kat, ciddi PR riskinin ise 3,95 kat arttığı bulunmuştur. İlk RBC transfüzyonunun 32 haftalık düzeltilmiş gestasyonel yaştan önce yapılması, PR gelişme riskini 2,18 kat artırmıştır (158). Fetal hemoglobinin yerini yetişkin hemoglobine (HbA) bırakmasıyla retinal dokulara daha fazla oksijen taşındığı, bu durumun da hiperoksiye ve oksidatif stres yoluyla retinal hasara yol açtığı belirtilmiştir.

Trombosit ve taze donmuş plazma (FFP) transfüzyonları da PR gelişiminde etkili bulunmuştur. Platelet transfüzyonu yapılan bebeklerde PR riski 2,5 kat artmış, erken dönemde yapılan transfüzyonların daha yüksek risk taşıdığı görülmüştür (158,159). Trombosit transfüzyonlarının VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin salınımını artırarak retinal damar proliferasyonunu teşvik edebileceği öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda da Grup 2 ve 3'teki hastalara Grup 1'deki hastalara göre daha çok kan transfüzyonu yapıldığı tespit edilmiştir. Ancak kan ürünlerinin çeşidi, sayısı ve zamanlaması açısından hastalar incelenmemiştir.

Literatürde PR'nin genetik bileşenleri üzerine yapılan araştırmalar, hastalığın patogenezi anlamada önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle Wnt/ β -katenin sinyal yolunda yer alan genler ve *VEGF* polimorfizmleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Ciddi PR vakalarının %10'unda *FZD4* mutasyonları bulunmuştur. Özellikle *FZD4 p.P33S* ve *p.P168S* mutasyonlarının retinal vaskülogenezi etkilediği gösterilmiştir (160,161). Ancak bizim çalışmamızda hiçbir hastada *FZD4 p.P168S* mutasyonu saptanmamıştır. Çalışmamızda tek *FZD4* varyantına bakılması sebepli bir mutasyon bulunamamış olabilir. Daha farklı *FZD4* varyantların

çalışılması ya da hasta grubunun sayısının artırılması ile anlamlı sonuçlar çıkabileceğini düşünmekteyiz.

Mohd Khair ve arkadaşlarının yaptığı güncel çalışmada da *LRP5* genindeki *c.3357G>A* varyantı, retinal vasküler gelişim üzerinde etkili bir polimorfizm olarak tanımlanmıştır ancak gruplar arasında fark bulunmamıştır (162). Bizim çalışmamızda ise PR olan hastalarda non-PR hastalara göre anlamlı derecede yüksek *LRP5* genindeki *c.3357G>A* varyantı saptanmıştır ve bu sonuç *LRP5*'in retinal vasküler gelişim üzerinde etkili bir gen olduğunu doğrulamaktadır.

Yapılan çalışmalarda *TSPAN12* mutasyonları, retinal vaskülarizasyon bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada, bu mutasyonların yüzde üç oranında bulunduğu bildirilmiştir (163). Tao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise PR olan hastalarda %11,1 oranında *TSPAN12* mutasyonu saptanmıştır (164). Çalışmamızda PR ve non-PR olan tüm hastalarda *TSPAN12* varyantlarının gözükmemesi literatürle çelişmektedir.

Retinal vaskülarizasyon süreçleri *VEGF* genindeki *rs833061* ve *rs2010963* polimorfizmleri tarafından etkilenebilir. Cooke ve ark., *rs833061* polimorfizminin PR şiddetini artırdığını göstermiştir (165). Luoh ve arkadaşlarının yaptığı meta-analizde, *VEGF -460T/C* polimorfizminin PR gelişiminde koruyucu bir faktör olabileceği bulunmuştur (166). Gohari ve arkadaşlarının yaptığı meta-analizde ise PR gruplarında daha fazla sayıda hastada saptanan *VEGF-A -460T>C* polimorfizmlerinin, PR için bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da *VEGF* genindeki *rs833061* polimorfizmi PR olan hasta grubunda daha yüksek hastada saptanmıştır ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır, *VEGF* genindeki *rs833061* polimorfizmlerinin homojen mutasyonlarına bakıldığında ise PR olan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede daha çok hastada homojen mutasyon saptanması da bu polimorfizmlerin PR için bir biyobelirteç olabileceği hipotezini desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda kliniğimize başvuran ve konsülten edilen prematüre bebeklerde alınan periferik venöz kandan *LRP5*, *FZD4*, *TSPAN12*, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve *VEGF* nokta mutasyonlarının tespiti ve prognoza etkisinin değerlendirdik. Çalışmamıza prematüre doğmuş olan 67 bebek dahil edildi. Özetle;

-Cinsiyet dağılımına baktığımızda gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

-Olguların doğum şekline baktığımızda gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

-Grup 1'deki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşları Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklere göre anlamlı derecede yüksekti. Doğumda ortalama gestasyonel yaş açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı.

-Grup 1'deki bebeklerin ortalama doğum ağırlıkları da Grup 2 ve Grup 3'e göre anlamlı yüksek saptandı.

Risk faktörleri açısından bakıldığında;

-İkiz doğum: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-Sarılık: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-Fototerapi: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Grup 3'teki bebeklerin fototerapi ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

-Entübasyon: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-Oksijen ihtiyacı: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Grup 3'teki bebeklerin herhangi bir zamanda oksijen ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

-Kan transfüzyonu: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklerin kan transfüzyonu ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derece yüksek bulundu.

-Sepsis: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Grup 3'teki bebeklerin sepsis öyküsü Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

-Sümfaktan ihtiyacı: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklerin sümfaktan ihtiyacı Grup 1'deki bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

Çalışılan genlerdeki polimorfizm sonuçları:

-*FZD4*: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-*LRP5*: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Grup 2 ve 3'teki hastalarda Grup 1'deki hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha çok hastada *LRP5* gen varyantları saptandı.

-*TSPAN12*: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-*NDP*: İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-*VEGFA*: +405C>G (*dbSNP*: *rs2010963*): İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulundu. Bu genin GG varyantı PR olan grupta (Grup1-2) daha yüksek sayıda hastada saptandı.

-*VEGFA*: -460T>C (*dbSNP*: *rs833061*): İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

-*VEGFA*: +936 C/T (*dbSNP*: *rs3025039*): İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmadı.

Retinal vaskülarizasyon sürecini etkileyen *TSPAN12*, *LRP5*, *NDP*, *FZD4* ve *VEGF* genlerindeki polimorfizmler, PR'nin patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır. Bunun yanında, düşük doğum ağırlığı, postnatal ağırlık kazanımı, oksijen tedavisi, sepsis ve kan transfüzyonları gibi diğer risk faktörleri, hastalığın klinik seyrini etkileyerek PR'nin şiddetini artırmaktadır. PR'nin tanı ve tedavisinde hem genetik hem de çevresel faktörlerin dikkate alınması gerektiği açıktır. Erken tanı, genetik testler ve klinik risk değerlendirmeleri ile prematüre bebeklerde görme kaybının önlenmesi mümkün olabilir.

Bu çalışmanın en büyük kısıtlılığı, nispeten küçük örneklem büyüklüğü ve ileri/şiddetli evre vakalarının (evre dört ve beş) sınırlı sayıda olmasıdır; bu, tespit

edilen mutasyon oranını etkilemiş olabilir. Türkiye’de PR hastalarında FEVR’e neden olan gen mutasyonlarının taranmasını sağlamak için daha büyük bir örneklem büyüklüğü kullanılarak daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Özellikle preterm bebeklerden yeterli örnek almada gözlemlenen zorluklara rağmen, bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Mendelyen bir bozukluk olan FEVR’in aksine, PR’nin, çeşitli etki büyüklüklerine sahip çoklu aleli olan genetik olarak daha heterojen, karmaşık bir hastalık olarak görüldüğünü düşündürmektedir. Bununla birlikte Norrin β -katenin sinyal yolu genlerinin geri kalanının taranması, bu yolun PR patogenezindeki katılımına ilişkin bilgileri daha da genişletebilir. Prematüre retinopatisi, multifaktöriyel bir hastalık olduğundan, Norrin β -katenin sinyal genleri dışında bazı olası genlerin de patogeneze dahil olması göz ardı edilemez. Ekzom dizilemesi veya tüm genom dizilemesi, PR’de bu tür yeni genlerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Gelecekte yapılacak olan geniş ölçekli genetik çalışmalar, PR’nin daha iyi anlaşılmasına ve bireye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Bu, prematüre bebeklerin daha iyi yaşam kalitesine sahip olmalarını ve uzun vadeli görme sorunlarının önüne geçilmesini sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Smith LEH. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Hormone & IGF Research*. 2004 Jun;14:140–4.
2. Cakir B, Hellström W, Tomita Y, Fu Z, Liegl R, Winberg A, et al. IGF1, serum glucose, and retinopathy of prematurity in extremely preterm infants. *JCI Insight*. 2020 Oct 2;5(19).
3. Blazon MN, Rezar-Dreindl S, Wassermann L, Neumayer T, Berger A, Stifter E. Retinopathy of Prematurity: Incidence, Risk Factors, and Treatment Outcomes in a Tertiary Care Center. *J Clin Med*. 2024 Nov 17;13(22):6926.
4. Drenser KA. Wnt signaling pathway in retinal vascularization. Vol. 8, *Eye and Brain*. Dove Medical Press Ltd.; 2016. p. 141–6.
5. Lasabova Z, Stanclova A, Grendar M, Mikolajcikova S, Calkovska A, Lenhartova N, et al. Genetic association of single nucleotide polymorphisms of *FZD4* and *BDNF* genes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Genet*. 2018 May 4;39(3):332–7.
6. Gimenez LG, Gili JA, Elias DE, Sagula R, Comas B, Santos MR, et al. Genetic susceptibility for retinopathy of prematurity and its associated comorbidities. *Pediatr Res*. 2024 Oct 12;96(5):1325–31.
7. Scruggs BA, Reding MQ, Schimmenti LA. *NDP-Related Retinopathies*. 1993.
8. Rozsypalová M, Autrata R, Šenková K. Screening and Treatment of Retinopathy of Prematurity at The Department of Pediatric Ophthalmology at The Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno. *Cesk Slov Oftalmol*. 2024;80(6):308–16.
9. Gilbert C, Rahi J, Eckstein M, O’Sullivan J, Foster A. Retinopathy of prematurity in middle-income countries. *The Lancet*. 1997 Jul;350(9070):12–4.
10. Terry TL. Extreme Prematurity and Fibroblastic Overgrowth of Persistent Vascular Sheath Behind Each Crystalline Lens *. *Am J Ophthalmol*. 2018 Aug;192:xxviii.

11. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of Oxygen on Developing Retinal Vessels with Particular Reference to the Problem of Retrolental Fibroplasia. *British Journal of Ophthalmology*. 1954 Jul 1;38(7):397–432.
12. Connolly BP, Ng EYJ, McNamara JA, Regillo CD, Vander JF, Tasman W. A comparison of laser photocoagulation with cryotherapy for threshold retinopathy of prematurity at 10 years. *Ophthalmology*. 2002 May;109(5):936–41.
13. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ. Efficacy of Intravitreal Bevacizumab for Stage 3+ Retinopathy of Prematurity. *New England Journal of Medicine*. 2011 Feb 17;364(7):603–15.
14. Coats DK. Retinopathy of prematurity: involution, factors predisposing to retinal detachment, and expected utility of preemptive surgical reintervention. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2005;103:281–312.
15. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, Phelps DL, Phillips CL, Schaffer DB, et al. Incidence and Early Course of Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmology*. 1991 Nov;98(11):1628–40.
16. The Incidence and Course of Retinopathy of Prematurity: Findings From the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study. *Pediatrics*. 2005 Jul 1;116(1):15–23.
17. Bas AY, Koc E, Dilmen U. Incidence and severity of retinopathy of prematurity in Turkey. *British Journal of Ophthalmology*. 2015 Oct;99(10):1311–4.
18. Rosenblatt BJ, Wilson B. Retinopathy of prematurity. In *Ophthalmology*. Yanoff M, St Louis. 2004;
19. Sun Y H t. m. A, SLEH, SYH tr m ASL. Retinopathy of Prematurity. In: Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh WC, editors. *Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine* 2015. 10th ed. Elsevier Saunders; 2015.
20. Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: Role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res*. 2006 Sep;83(3):473–83.
21. Lukiw WJ, Ottlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, et al. Coordinate Activation of HIF-1 and NF-κB DNA Binding and COX-2

- and VEGF Expression in Retinal Cells by Hypoxia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003 Oct 1;44(10):4163.
22. Chen J, Smith LEH. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*. 2007 Jun 27;10(2):133–40.
 23. Löfqvist C. Longitudinal Postnatal Weight and Insulin-like Growth Factor I Measurements in the Prediction of Retinopathy of Prematurity. *Archives of Ophthalmology*. 2006 Dec 1;124(12):1711.
 24. Lundgren P, Kistner A, Andersson EM, Hansen Pupp I, Holmström G, Ley D, et al. Low Birth Weight Is a Risk Factor for Severe Retinopathy of Prematurity Depending on Gestational Age. *PLoS One*. 2014 Oct 15;9(10):e109460.
 25. Wang ZH, Gao PF, Bai H, Li YY. Postnatal weight gain in very low birth weight infants in Beijing and the risk of retinopathy of prematurity. *Int J Ophthalmol*. 2015 Dec 18;8(6):1207–10.
 26. Mills MD. Evaluating the Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Study (CRYO-ROP). *Archives of Ophthalmology*. 2007 Sep 1;125(9):1276.
 27. Yaman A, Kaynak S, Berk A.T. Prematürite retinopatisi gelişimindeki risk faktörlerinin incelenmesi. *MN Oftalmoloji*. 2005;
 28. Hartnett ME, Lane RH. Effects of oxygen on the development and severity of retinopathy of prematurity. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2013 Jun;17(3):229–34.
 29. Hartnett ME, Toth CA. Experimental Evidence Behind Clinical Trial Outcomes in Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2019 Apr;50(4):228–34.
 30. Askie LM, Henderson-Smart DJ, Irwig L, Simpson JM. Oxygen-Saturation Targets and Outcomes in Extremely Preterm Infants. *New England Journal of Medicine*. 2003 Sep 4;349(10):959–67.
 31. Kinsey VE, Arnold HJ, Kalina RE, Stern L, Stahlman M, Odell G, et al. PaO₂ levels and retrolental fibroplasia: a report of the cooperative study. *Pediatrics*. 1977 Nov;60(5):655–68.
 32. VanderVeen DK, Mansfield TA, Eichenwald EC. Lower Oxygen Saturation Alarm Limits Decrease the Severity of Retinopathy of Prematurity. *Journal*

- of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus. 2006 Oct;10(5):445–8.
33. Chow LC, Wright KW, Sola A. Can Changes in Clinical Practice Decrease the Incidence of Severe Retinopathy of Prematurity in Very Low Birth Weight Infants? *Pediatrics*. 2003 Feb 1;111(2):339–45.
 34. McGregor M Lou, Bremer DL, Cole C, McClead RE, Phelps DL, Fellows RR, et al. Retinopathy of Prematurity Outcome in Infants With Prethreshold Retinopathy of Prematurity and Oxygen Saturation $\geq 94\%$ in Room Air: The High Oxygen Percentage in Retinopathy of Prematurity Study. *Pediatrics*. 2002 Sep 1;110(3):540–4.
 35. Englert JA, Saunders RA, Purohit D, Hulsey TC, Ebeling M. The Effect of Anemia on Retinopathy of Prematurity in Extremely Low Birth Weight Infants. *Journal of Perinatology*. 2001 Feb 1;21(1):21–6.
 36. Inder TE, Clemett RS, Austin NC, Graham P, Darlow BA. High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. *J Pediatr*. 1997 Oct;131(4):541–4.
 37. Dutta S, Narang S, Narang A, Dogra M, Gupta A. Risk factors of threshold retinopathy of prematurity. *Indian Pediatr*. 2004 Jul;41(7):665–71.
 38. Stutchfield C, Jain A, Odd D, Williams C, Markham R. In response to: Teofili L, et al. Foetal haemoglobin, blood transfusion, and retinopathy of prematurity. *Eye*. 2018 Jun 8;32(6):1156–1156.
 39. Higgins RD. Antenatal Dexamethasone and Decreased Severity of Retinopathy of Prematurity. *Archives of Ophthalmology*. 1998 May 1;116(5):601.
 40. Sobel DB, Philip AG. Prolonged dexamethasone therapy reduces the incidence of cryotherapy for retinopathy of prematurity in infants of less than 1 kilogram birth weight with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*. 1992 Oct;90(4):529–33.
 41. Msall ME, Phelps DL, DiGaudio KM, Dobson V, Tung B, McClead RE, et al. Severity of Neonatal Retinopathy of Prematurity Is Predictive of Neurodevelopmental Functional Outcome at Age 5.5 Years. *Pediatrics*. 2000 Nov 1;106(5):998–1005.

42. Hussain N, Clive J, Bhandari V. Current Incidence of Retinopathy of Prematurity, 1989–1997. *Pediatrics*. 1999 Sep 1;104(3):e26–e26.
43. Port AD, Chan RVP, Ostmo S, Choi D, Chiang MF. Risk factors for retinopathy of prematurity: insights from outlier infants. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2014 Oct 23;252(10):1669–77.
44. Küçükevcilioğlu M, Mutlu FM, Sarıcı SÜ. Ocular morbidities of premature children with mild or no retinopathy of prematurity. *Turk J Pediatr*. 2015;57(2):129–35.
45. Stoll BJ. Neurodevelopmental and Growth Impairment Among Extremely Low-Birth-Weight Infants With Neonatal Infection. *JAMA*. 2004 Nov 17;292(19):2357.
46. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Lerner-Geva L, Reichman B. Outcome of Early-Onset Sepsis in a National Cohort of Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics*. 2010 Apr 1;125(4):e736–40.
47. Maheshwari R, Kumar H, Paul VK, Singh M, Deorari AK, Tiwari HK. Incidence and risk factors of retinopathy of prematurity in a tertiary care newborn unit in New Delhi. *Natl Med J India*. 1996;9(5):211–4.
48. Chye JK, Lim CT, Leong HL, Wong PK. Retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Ann Acad Med Singap*. 1999 Mar;28(2):193–8.
49. Shah VA, Yeo CL, Ling YLF, Ho LY. Incidence, risk factors of retinopathy of prematurity among very low birth weight infants in Singapore. *Ann Acad Med Singap*. 2005 Mar;34(2):169–78.
50. Liu PM, Fang PC, Huang CB, Kou HK, Chung MY, Yang YH, et al. Risk Factors of Retinopathy of Prematurity in Premature Infants Weighing Less Than 1600 g. *Am J Perinatol*. 2005 Feb;22(02):115–20.
51. Manzoni P, Maestri A, Leonessa M, Mostert M, Farina D, Gomirato G. Fungal and bacterial sepsis and threshold ROP in preterm very low birth weight neonates. *Journal of Perinatology*. 2006 Jan 1;26(1):23–30.
52. Mittal M, Dhanireddy R, Higgins RD. *Candida* Sepsis and Association With Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics*. 1998 Apr 1;101(4):654–7.

53. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978 Apr;92(4):529–34.
54. PROCIANOY RS, GARCIA-PRATS JA, HITTNER HM, ADAMS JM, RUDOLPH AJ. AN ASSOCIATION BETWEEN RETINOPATHY OF PREMATURITY AND INTRAVENTRICULAR HEMORRHAGE IN VERY LOW BIRTH WEIGHT INFANTS. *Acta Paediatr.* 1981 Jul;70(4):473–7.
55. Ng YK, Fielder AR, Levene MI, Trounce JQ, McLellan N. Are severe acute retinopathy of prematurity and severe periventricular leucomalacia both ischaemic insults? *British Journal of Ophthalmology.* 1989 Feb 1;73(2):111–4.
56. Yau GSK, Lee JWY, Tam VTY, Liu CCL, Yip S, Cheng E, et al. Incidence and Risk Factors of Retinopathy of Prematurity From 2 Neonatal Intensive Care Units in a Hong Kong Chinese Population. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology.* 2016 May;5(3):185–91.
57. Ertl T, Gyarmati J, Gaál V, Szabó I. Relationship between Hyperglycemia and Retinopathy of Prematurity in Very Low Birth Weight Infants. *Neonatology.* 2006;89(1):56–9.
58. Marinov VG, Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Krasteva MB. The 5-minute Apgar Score as a Prognostic Factor for Development and Progression of Retinopathy of Prematurity. *Folia Med (Plovdiv).* 2017 Mar 1;59(1):78–83.
59. An international classification of retinopathy of prematurity. *Pediatrics.* 1984 Jul;74(1):127–33.
60. The International Classification of Retinopathy of Prematurity Revisited. *Archives of Ophthalmology.* 2005 Jul 1;123(7):991.
61. Chiang MF, Quinn GE, Fielder AR, Ostmo SR, Paul Chan RV, Berrocal A, et al. International Classification of Retinopathy of Prematurity, Third Edition. *Ophthalmology.* 2021 Oct;128(10):e51–68.
62. Hellström A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *The Lancet.* 2013 Oct;382(9902):1445–57.

63. Cats BP, Tan KEWP. Prematures With and Without Regressed Retinopathy of Prematurity: Comparison of Long-Term (6-10 Years) Ophthalmological Morbidity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1989 Nov;26(6):271–5.
64. Repka MX. Involution of Retinopathy of Prematurity. *Archives of Ophthalmology*. 2000 May 1;118(5):645.
65. Schaffer DB, Palmer EA, Plotsky DF, Metz HS, Flynn JT, Tung B, et al. Prognostic Factors in the Natural Course of Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmology*. 1993 Feb;100(2):230–7.
66. Fierson WM, Chiang MF, Good W, Phelps D, Reynolds J, Robbins SL, et al. Screening Examination of Premature Infants for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics*. 2018 Dec 1;142(6).
67. Bas AY, Demirel N, Koc E, Ulubas Isik D, Hirfanoglu İM, Tunc T. Incidence, risk factors and severity of retinopathy of prematurity in Turkey (TR-ROP study): a prospective, multicentre study in 69 neonatal intensive care units. *British Journal of Ophthalmology*. 2018 Dec;102(12):1711–6.
68. Reynolds JD, Hardy RJ, Kennedy KA, Spencer R, van Heuven WAJ, Fielder AR. Lack of Efficacy of Light Reduction in Preventing Retinopathy of Prematurity. *New England Journal of Medicine*. 1998 May 28;338(22):1572–6.
69. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Three-month outcome. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Arch Ophthalmol*. 1990 Feb;108(2):195–204.
70. Quinn GE, Ying G shuang, Daniel E, Hildebrand PL, Ells A, Baumritter A, et al. Validity of a Telemedicine System for the Evaluation of Acute-Phase Retinopathy of Prematurity. *JAMA Ophthalmol*. 2014 Oct 1;132(10):1178.
71. Wu C. Longitudinal Postnatal Weight Measurements for the Prediction of Retinopathy of Prematurity. *Archives of Ophthalmology*. 2010 Apr 1;128(4):443.
72. Binenbaum G, Ying G shuang, Quinn GE, Huang J, Dreiseitl S, Antigua J, et al. The CHOP Postnatal Weight Gain, Birth Weight, and Gestational Age Retinopathy of Prematurity Risk Model. *Archives of Ophthalmology*. 2012 Dec 1;130(12):1560.

73. Cao JH, Wagner BD, Cerda A, McCourt EA, Palestine A, Enzenauer RW, et al. Colorado retinopathy of prematurity model: a multi-institutional validation study. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2016 Jun;20(3):220–5.
74. Hård AL. Predicting Proliferative Retinopathy in a Brazilian Population of Preterm Infants With the Screening Algorithm WINROP. *Archives of Ophthalmology*. 2010 Nov 8;128(11):1432.
75. Bai YC, Chen SZ, Wei SY, Chen HJ, Chen YC, Feng SF, et al. Efficacy of the WINROP algorithm for retinopathy of prematurity screening in Southern China. *Int J Ophthalmol*. 2021 Jan 18;14(1):127–32.
76. Wilkinson AR, Haines L, Head K, Fielder AR. UK retinopathy of prematurity guideline. *Eye*. 2009 Nov 3;23(11):2137–9.
77. Revised Indications for the Treatment of Retinopathy of Prematurity. *Archives of Ophthalmology*. 2003 Dec 1;121(12):1684.
78. Final Visual Acuity Results in the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study. *Archives of Ophthalmology*. 2010 Jun 1;128(6):663.
79. Paysse E. Acquired cataracts after diode laser photocoagulation for threshold retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 2002 Sep;109(9):1662–5.
80. Coats DK, Miller AM, Brady McCreery KM, Holz ER, Paysse EA. Involution of threshold retinopathy of prematurity after diode laser photocoagulation. *Ophthalmology*. 2004 Oct;111(10):1894–8.
81. Micieli JA, Surkont M, Smith AF. A Systematic Analysis of the Off-Label Use of Bevacizumab for Severe Retinopathy of Prematurity. *Am J Ophthalmol*. 2009 Oct;148(4):536-543.e2.
82. Beck KD, Rahman EZ, Ells A, Mireskandari K, Berrocal AM, Harper CA. SAFER-ROP: Updated Protocol for Anti-VEGF Injections for Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2020 Jul;51(7):402–6.
83. Menke MN, Framme C, Nelle M, Berger MR, Sturm V, Wolf S. Intravitreal ranibizumab monotherapy to treat retinopathy of prematurity zone II, stage 3 with plus disease. *BMC Ophthalmol*. 2015 Mar 8;15:20.
84. Reynolds JD. Bevacizumab for Retinopathy of Prematurity. *New England Journal of Medicine*. 2011 Feb 17;364(7):677–8.

85. Wu WC, Lien R, Liao PJ, Wang NK, Chen YP, Chao AN, et al. Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Related Factors After Intravitreal Bevacizumab Injection for Retinopathy of Prematurity. *JAMA Ophthalmol.* 2015 Apr 1;133(4):391.
86. Stahl A, Lepore D, Fielder A, Fleck B, Reynolds JD, Chiang MF, et al. Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial. *The Lancet.* 2019 Oct;394(10208):1551–9.
87. Stahl A, Krohne TU, Eter N, Oberacher-Velten I, Guthoff R, Meltendorf S, et al. Comparing Alternative Ranibizumab Dosages for Safety and Efficacy in Retinopathy of Prematurity. *JAMA Pediatr.* 2018 Mar 1;172(3):278.
88. Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ, Galasso JM, Kapur R. Reactivation of Retinopathy of Prematurity After Bevacizumab Injection. *Archives of Ophthalmology.* 2012 Aug 1;130(8):1000.
89. Jalali S, Balakrishnan D, Zeynalova Z, Padhi TR, Rani PK. Serious adverse events and visual outcomes of rescue therapy using adjunct bevacizumab to laser and surgery for retinopathy of prematurity. The Indian Twin Cities Retinopathy of Prematurity Screening database Report number 5. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013 Jul;98(4):F327–33.
90. Garcia Gonzalez JM, Snyder L, Blair M, Rohr A, Shapiro M, Greenwald M. PROPHYLACTIC PERIPHERAL LASER AND FLUORESCEIN ANGIOGRAPHY AFTER BEVACIZUMAB FOR RETINOPATHY OF PREMATURITY. *Retina.* 2018 Apr;38(4):764–72.
91. Morin J, Luu TM, Superstein R, Ospina LH, Lefebvre F, Simard MN, et al. Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics.* 2016 Apr 1;137(4).
92. Quinn GE, Darlow BA. Concerns for Development After Bevacizumab Treatment of ROP. *Pediatrics.* 2016 Apr 1;137(4).
93. Kaushal M, Razak A, Patel W, Pullattayil AK, Kaushal A. Neurodevelopmental outcomes following bevacizumab treatment for retinopathy of prematurity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Perinatology.* 2021 Jun 8;41(6):1225–35.

94. Repka MX. Outcome of Eyes Developing Retinal Detachment During the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study. *Archives of Ophthalmology*. 2011 Sep 1;129(9):1175.
95. Özsaygılı C, Ozdek S, Ozmen MC, Atalay HT, Yalinbas Yeter D. Parameters affecting postoperative success of surgery for stage 4A/4B ROP. *British Journal of Ophthalmology*. 2019 Nov;103(11):1624–32.
96. Ozsaygılı C, Ozdek S, Ozmen MC, Atalay HT, Yeter DY. PREOPERATIVE ANATOMICAL FEATURES ASSOCIATED WITH IMPROVED SURGICAL OUTCOMES FOR STAGE 5 RETINOPATHY OF PREMATURITY. *Retina*. 2021 Apr;41(4):718–25.
97. Tasman W, Patz A, McNamara JA, Kaiser RS, Trese MT, Smith BT. Retinopathy of Prematurity: The Life of a Lifetime Disease. *Am J Ophthalmol*. 2006 Jan;141(1):167–74.
98. Tan Z, Chong C, Darlow B, Dai S. Visual impairment due to retinopathy of prematurity (ROP) in New Zealand: a 22-year review. *British Journal of Ophthalmology*. 2015 Jun;99(6):801–6.
99. van Sorge AJ, Termote JUM, de Vries MJ, Boonstra FN, Stellingwerf C, Schalijs-Delfos NE. The incidence of visual impairment due to retinopathy of prematurity (ROP) and concomitant disabilities in the Netherlands: a 30 year overview. *British Journal of Ophthalmology*. 2011 Jul 1;95(7):937–41.
100. Schiariti V, Matsuba C, Houbé JS, Synnes AR. Severe retinopathy of prematurity and visual outcomes in British Columbia: a 10-year analysis. *Journal of Perinatology*. 2008 Aug 27;28(8):566–72.
101. Haines L. UK population based study of severe retinopathy of prematurity: screening, treatment, and outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005 May 1;90(3):F240-f244.
102. Schmidt B, Davis PG, Asztalos E V., Solimano A, Roberts RS. Association Between Severe Retinopathy of Prematurity and Nonvisual Disabilities at Age 5 Years. *JAMA*. 2014 Feb 5;311(5):523.
103. Zhu X, Sun K, Huang L, Ma S, Hao F, Yang Z, et al. Identification of Novel Mutations in the *FZD4* and *NDP* Genes in Patients with Familial Exudative Vitreoretinopathy in South India. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2020 Feb 1;24(2):92–8.

104. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell*. 2001 Nov;107(4):513–23.
105. Junge HJ, Yang S, Burton JB, Paes K, Shu X, French DM, et al. TSPAN12 Regulates Retinal Vascular Development by Promoting Norrin- but Not Wnt-Induced FZD4/ β -Catenin Signaling. *Cell*. 2009 Oct;139(2):299–311.
106. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017 Jun;169(6):985–99.
107. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*. 2012 Jun;149(6):1192–205.
108. Ohlmann A, Tamm ER. Norrin: Molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor. *Prog Retin Eye Res*. 2012 May;31(3):243–57.
109. Zeilbeck LF, Müller BB, Leopold SA, Senturk B, Langmann T, Tamm ER, et al. Norrin mediates angiogenic properties via the induction of insulin-like growth factor-1. *Exp Eye Res*. 2016 Apr;145:317–26.
110. Shastry BS, Hejtmancik JF, Trese MT. Identification of novel missense mutations in the Norrie disease gene associated with one X-linked and four sporadic cases of Familial Exudative Vitreoretinopathy. *Hum Mutat*. 1997;9(5):396–401.
111. Ke J, Harikumar KG, Erice C, Chen C, Gu X, Wang L, et al. Structure and function of Norrin in assembly and activation of a Frizzled 4–Lrp5/6 complex. *Genes Dev*. 2013 Nov 1;27(21):2305–19.
112. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, et al. Vascular Development in the Retina and Inner Ear. *Cell*. 2004 Mar;116(6):883–95.
113. Wu WC. Retinal Phenotype–Genotype Correlation of Pediatric Patients Expressing Mutations in the Norrie Disease Gene. *Archives of Ophthalmology*. 2007 Feb 1;125(2):225.
114. Xiao H, Tong Y, Zhu Y, Peng M. Familial Exudative Vitreoretinopathy-Related Disease-Causing Genes and Norrin/ β -Catenin Signal Pathway: Structure, Function, and Mutation Spectrums. *J Ophthalmol*. 2019 Nov 16;2019:1–24.

115. Wang Y, Cho C, Williams J, Smallwood PM, Zhang C, Junge HJ, et al. Interplay of the Norrin and Wnt7a/Wnt7b signaling systems in blood–brain barrier and blood–retina barrier development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Dec 11;115(50).
116. Ye X, Wang Y, Nathans J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med*. 2010 Sep;16(9):417–25.
117. Díaz-Coránguez M, Lin CM, Liebner S, Antonetti DA. Norrin restores blood-retinal barrier properties after vascular endothelial growth factor–induced permeability. *Journal of Biological Chemistry*. 2020 Apr;295(14):4647–60.
118. Bang I, Kim HR, Beaven AH, Kim J, Ko SB, Lee GR, et al. Biophysical and functional characterization of Norrin signaling through Frizzled4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 Aug 28;115(35):8787–92.
119. Paes KT, Wang E, Henze K, Vogel P, Read R, Suwanichkul A, et al. Frizzled 4 Is Required for Retinal Angiogenesis and Maintenance of the Blood-Retina Barrier. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Aug 16;52(9):6452.
120. Kondo H. Frizzled 4 gene (FZD4) mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy with variable expressivity. *British Journal of Ophthalmology*. 2003 Oct 1;87(10):1291–5.
121. Dailey WA, Gryc W, Garg PG, Dresner KA. Frizzled-4 Variations Associated with Retinopathy and Intrauterine Growth Retardation. *Ophthalmology*. 2015 Sep;122(9):1917–23.
122. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development*. 2004 Apr 15;131(8):1663–77.
123. Xia C hong, Yablonka-Reuveni Z, Gong X. LRP5 Is Required for Vascular Development in Deeper Layers of the Retina. *PLoS One*. 2010 Jul 20;5(7):e11676.

124. Huang W, Li Q, Amiry-Moghaddam M, Hokama M, Sardi SH, Nagao M, et al. Critical Endothelial Regulation by LRP5 during Retinal Vascular Development. *PLoS One*. 2016 Mar 31;11(3):e0152833.
125. Qin M, Hayashi H, Oshima K, Tahira T, Hayashi K, Kondo H. Complexity of the genotype-phenotype correlation in familial exudative vitreoretinopathy with mutations in the *LRP5* and/or *FZD4* genes. *Hum Mutat*. 2005 Aug;26(2):104–12.
126. Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H. Structure of the Tetraspanin Main Extracellular Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Oct;276(43):40055–64.
127. Poulter JA, Ali M, Gilmour DF, Rice A, Kondo H, Hayashi K, et al. Mutations in TSPAN12 Cause Autosomal-Dominant Familial Exudative Vitreoretinopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Feb;86(2):248–53.
128. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci*. 2014 Jan 1;
129. Mohd Khair SN, Ismail A, Embong Z, Mohamed Yusoff A. Detection of FZD4, LRP5 and TSPAN12 genes variants in Malay premature babies with retinopathy of prematurity. *J Ophthalmic Vis Res*. 2019;14(2):171.
130. Zhang C, Lai MB, Pedler MG, Johnson V, Adams RH, Petrash JM, et al. Endothelial Cell-Specific Inactivation of TSPAN12 (Tetraspanin 12) Reveals Pathological Consequences of Barrier Defects in an Otherwise Intact Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Nov;38(11):2691–705.
131. Nikopoulos K, Gilissen C, Hoischen A, Erik van Nouhuys C, Boonstra FN, Blokland EAW, et al. Next-Generation Sequencing of a 40 Mb Linkage Interval Reveals TSPAN12 Mutations in Patients with Familial Exudative Vitreoretinopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 Feb;86(2):240–7.
132. Blaauwgeers HGT, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, et al. Polarized Vascular Endothelial Growth Factor Secretion by Human Retinal Pigment Epithelium and Localization of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors on the Inner Choriocapillaris. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):421–8.

133. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun 1;9(6):669–76.
134. Cooke RWI, Drury JA, Mountford R, Clark D. Genetic Polymorphisms and Retinopathy of Prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2004 Jun 1;45(6):1712.
135. Bányász I, Bokodi G, Vannay Á, Szebeni B, Treszl A, Vásárhelyi B, et al. Genetic Polymorphisms of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin 2 in Retinopathy of Prematurity. *Curr Eye Res.* 2006 Jan 2;31(7–8):685–90.
136. Shastry BS. Lack of association of VEGF (–2578 C → A) and ANG 2 (–35 G → C) gene polymorphisms with the progression of retinopathy of prematurity. *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2009 Jun 19;247(6):859–60.
137. Gismondi D, Ndoja L, Qu X, Shastry BS. Lack of association of VEGF gene 3’- UTR polymorphisms (C702T, C936T and G1612A) and the risk of developing advanced retinopathy of prematurity (ROP). *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2013 Jan 7;251(1):413–5.
138. Ling XC, Kang EYC, Chen KJ, Wang NK, Liu L, Chen YP, et al. Associations of *VEGF* Polymorphisms With Retinopathy of Prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2023 Jun 5;64(7):11.
139. Hong EH, Shin YU, Cho H. Retinopathy of prematurity: a review of epidemiology and current treatment strategies. *Clin Exp Pediatr.* 2022 Mar 15;65(3):115–26.
140. Scruggs BA, Reding MQ, Schimmenti LA. NDP-Related Retinopathies. 1993.
141. Sjöbom U, Hellqvist T, Humayun J, Nilsson AK, Gyllensten H, Hellström A, et al. Circulating VEGF-A Levels in Relation to Retinopathy of Prematurity and Treatment Effects: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology Science.* 2024 Nov;4(6):100548.
142. Shastry BS. Genetic susceptibility to advanced retinopathy of prematurity (ROP). *J Biomed Sci.* 2010;17(1):69.

143. Swan R, Kim SJ, Campbell JP, Chan RVP, Sonmez K, Taylor KD, et al. The Genetics of Retinopathy of Prematurity: A Model for Neovascular Retinal Disease. *Ophthalmol Retina*. 2018 Sep;2(9):949–62.
144. Nikhil R, Rajendran K, Krishnan B. Prevalence and outcome of retinopathy of prematurity in preterm infants, with low birth weight at KMCH, Tamil Nadu, India. *Int J Contemp Pediatrics*. 2019 Feb 23;6(2):264.
145. Bas AY, Demirel N, Koc E, Ulubas Isik D, Hirfanoglu İM, Tunc T. Incidence, risk factors and severity of retinopathy of prematurity in Turkey (TR-ROP study): a prospective, multicentre study in 69 neonatal intensive care units. *British Journal of Ophthalmology*. 2018 Dec;102(12):1711–6.
146. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, Phelps DL, Phillips CL, Schaffer DB, et al. Incidence and Early Course of Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmology*. 1991;98(11):1628–40.
147. Prematüre Retinopatisinde Risk Faktörleri, Tarama ve Tedavi Sonuçları 447.
148. Shemesh R, Strauss T, Zaslavsky-Paltiel I, Lerner-Geva L, Reichman B, Wygnanski-Jaffe T, et al. Perinatal and neonatal risk factors for retinopathy of prematurity in very low birthweight, very preterm twins: a population-based study. *Eye*. 2024 Apr 4;38(5):902–9.
149. Tseng HC, Sung FC, Mou CH, Lin HY, Chiang CC, Hsia NY, et al. Population based retrospective cohort study on risk of retinopathy of prematurity in twins. *PLoS One*. 2020;15(3).
150. Alfaar AS, Parlak M, Hassanain O, Abdelmaksoud E, Wolf A. The incidence of retinopathy of prematurity in neonates in Germany in 2019; a nationwide epidemiological cohort study. *Eur J Pediatr*. 2024 Feb 1;183(2):827–34.
151. Gulden S, Cervellini G, Colombo M, Marangoni MB, Taccani V, Pesenti N, et al. Hyperbilirubinemia and retinopathy of prematurity: a retrospective cohort study. *Eur J Pediatr*. 2024 Jun 15;183(9):3809–18.
152. Hartnett ME, Lane RH. Effects of oxygen on the development and severity of retinopathy of prematurity. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2013 Jun;17(3):229–34.
153. Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy of Prematurity (STOP-ROP), A Randomized, Controlled Trial. I: Primary Outcomes. *Pediatrics*. 2000 Feb 1;105(2):295–310.

154. Rodriguez SH, Ells AL, Blair MP, Shah PK, Harper CA, Martinez-Castellanos MA, et al. Retinopathy of Prematurity in the 21st Century and the Complex Impact of Supplemental Oxygen. *J Clin Med*. 2023 Feb 3;12(3).
155. Wang X, Tang K, Chen L, Cheng S, Xu H. Association between sepsis and retinopathy of prematurity: A systematic review and meta-analysis. Vol. 9, *BMJ Open*. BMJ Publishing Group; 2019.
156. Wang ZL, An Y, He Y, Hu XY, Guo L, Li QY, et al. Risk factors of necrotizing enterocolitis in neonates with sepsis: A retrospective case-control study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2020;34.
157. Wang X, Rao R, Li H, Lei X, Dong W. Red Blood Cell Transfusion for Incidence of Retinopathy of Prematurity: Prospective Multicenter Cohort Study. *JMIR Pediatr Parent*. 2024 Sep 18;7:e60330–e60330.
158. Uberos J, Fernandez-Marin E, Campos-Martínez A, Ruiz-López A, García-Serrano JL. Blood products transfusion and retinopathy of prematurity: A cohort study. *Acta Ophthalmol*. 2023 May 11;101(3).
159. Zheng L, Gu X, Zhao P, Yang T, Zhang Q, Jiang S, et al. Characteristics of red blood cell transfusion among very preterm infants in China. *Vox Sang*. 2024 Jun 15;119(6):572–80.
160. Drenser KA. Wnt signaling pathway in retinal vascularization. Vol. 8, *Eye and Brain*. Dove Medical Press Ltd.; 2016. p. 141–6.
161. Ells A, Guernsey DL, Wallace K, Zheng B, Vincer M, Allen A, et al. Severe retinopathy of prematurity associated with *FZD4* mutations. *Ophthalmic Genet*. 2010 Mar 8;31(1):37–43.
162. Mohd Khair SN, Ismail A, Embong Z, Mohamed Yusoff A. Detection of *FZD4*, *LRP5* and *TSPAN12* genes variants in Malay premature babies with retinopathy of prematurity. *J Ophthalmic Vis Res*. 2019;14(2):171.
163. Kondo H, Kusaka S, Yoshinaga A, Uchio E, Tawara A, Hayashi K, et al. Mutations in the *TSPAN12* gene in Japanese patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2011;151(6).
164. Tao T, Meng X, Xu N, Li J, Cheng Y, Chen Y, et al. Ocular phenotype and genetical analysis in patients with retinopathy of prematurity. *BMC Ophthalmol*. 2022 Dec 1;22(1).

165. Cooke RWI, Drury JA, Mountford R, Clark D. Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Jun;45(6):1712–5.
166. Luo Y, Tan Y, Wang X. Influence of polymorphisms in VEGF, TNF- α , and GSTP1 genes on retinopathy of prematurity risk: a Meta-analysis. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2022;35(7):1248–57.



8.EKLER

8.1. Ek 1. Etik Kurul

2023 / 22-63

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prematüre retinopatisi olan bebeklerde LRP5, FZD4, TSPAN 12, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve VEGF nokta mutasyonlarının tespiti ve prognoza etkisinin değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	592-SBKAEK

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hülya Ellidokuz

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof.Dr.Hülya ELLIDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji A.D.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Erdem YAKA	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji A.D	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.M.Cenk ECEVİT	KBB	DEU Tıp Fakültesi KBB A.D	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ulaş YIŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Nöroloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayşe GELAL	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.İsmail SARI	İç Hastalıkları Romatoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D Romatoloji B.D	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Uğur Öncel TÜRK	Kardiyoloji	İzmir Ekonomi Üniversitesi Kardiyoloji A.D	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Yasemin ERAÇ	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.İlkay AKSU	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Cemal Hüseyin GÜVERCİN	Tıp Tarihi ve Etik	DEU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik A.D	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Bihter ŞENTÜRK	Kardiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Kardiyoloji A.D	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Av.Nevra ÖZBEK	Hukuk	Avukat	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hayat ALBAYRAK	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	Emekli	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hülya Ellidokuz
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmaktadır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prematüre retinopatisi olan bebeklerde LRP5, FZD4, TSPAN 12, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve VEGF nokta mutasyonlarının tespiti ve prognoza etkisinin değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	592-SBKAEK

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-	16.11.2023	Versiyon 03	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Sorumlu araştırmacı görevinin Doç.Dr.Arif Taylan Öztürk'ün kurundan ayrılması nedeniyle Doç.Dr.Ziya Ayhan'a devredilmesi -Protokol imza sayfası, 16.11.2023 tarihli -Dr.Ziya Ayhan özgeçmiş belgesi -Başvuru formu				
Karar No:2023/22-63		Tarih:07.12.2023				
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					

Etik Kurul Başkanının
 Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hülya Ellidokuz
 İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prematüre retinopatisi olan bebeklerde LRP5, FZD4, TSPAN 12, Norrie ilişkili gen varyantlarının ve VEGF nokta mutasyonlarının tespiti ve prognoza etkisinin değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	592-SBKAEK

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Dekanlık Binası Kat:2 İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
	TELEFON	0 232 4122254 - 0 232 4122258
	FAKS	0232 4122243
	E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Arif Taylan Öztürk		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Göz Sağlığı ve Hastalıkları A.D		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Sağlığı ve Hastalıkları A.D		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE ÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
	Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input checked="" type="checkbox"/>		
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>		
	İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hülya
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.