

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hande GÜÇLÜ

RAGE HEDEFLİ AZELİRAGON TEDAVİSİNİN ER
STRES ARACILI DİYABETİK RETİNOPATİDE
TERAPÖTİK ETKİSİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Gizem KÖSE

EDİRNE-2025

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimde emeği geçen, tez sürecimde yardımlarını ve desteğini esirgemeyen başta çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hande GÜÇLÜ' ye, asistanı olmaktan gurur duyduğum ve her daim örnek aldığım saygıdeğer hocalarım sayın Doç. Dr. Rüveyde GARİP' e, Dr. Öğretim üyesi Ahmet Kürşad SAKALLIOĞLU' na, Dr. Öğretim üyesi Ayça KÜPELİ ÇINAR ve Dr. Öğretim üyesi Abdulkadir Can ÇINAR' a, tez çalışmamın laboratuvar kısmını yöneten ve bana her zaman yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR' a, projemizi destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Başkanlığı'na (proje no: TÜBAP 2023/87), bu süreçte sabırla yanımda olan ve beni bu günlere getiren canım aileme, mesai arkadaşlarıma ve tüm göz hastalıkları çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
RETİNA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ	3
RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRESİ	5
DİYABETİK RETİNOPATİ	6
DİYABETİK RETİNOPATİDE PATOGENEZ	7
İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİ VE RESEPTÖRÜ	9
DİYABETİK RETİNOPATİDE KLİNİK	11
DİYABETİK RETİNOPATİDE SINIFLANDIRMA	13
GÜNCEL TEDAVİ YAKLAŞIMLARI	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
BULGULAR	22
TARTIŞMA	38
SONUÇLAR	47
ÖZET	49
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	53

SİMGE VE KISALTMALAR

AGE	: Advanced Glycation End Products (ileri glikasyon son ürünleri)
AKT	: Protein kinaz B
ARPE	: A human retina pigment epithelium cell line (insan retina pigment epiteli hücre hattı)
ATF4	: Activating transcription factor 4 (transkripsiyonu aktive edici faktör 4)
Bax	: Bcl-2-associated X protein (Bcl-2 ilişkili X proteini)
BSA	: Bovine serum albumin (sığır serum albümini)
Ca	: Kalsiyum
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
CHOP	: DNA damage-inducible transcript 3 (DNA hasarı ile indüklenen transkript 3)
CLP	: Cecal ligation and puncture (çekal ligasyon ve ponksiyon)
DM	: Diyabetes mellitus
DMÖ	: Diyabetik maküler ödem
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Diyabetik retinopati
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
eIF2-α	: Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 alfa)
ER	: Endoplazmik retikulum
ETDRS	: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (diyabetik retinopatide erken tedavi çalışması)
FAZ	: Foveal avasküler zon
FFA	: Fundus floresein anjiyografi

GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenez
HbA1c	: Glikolize hemoglobin
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1 α
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule 1 (interselüler adezyon molekülü 1)
IL	: İnterlökin
IRMA	: İntraretinal mikrovasküler anormaliler
İLM	: İnternal limitan membran
LPS	: Lipopolisakkarit
mg	: miligram
ml	: mililitre
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
Nm	: nanometre
Nox	: Azot oksitler
NPDR	: Non-proliferatif diyabetik retinopati
NV	: Neovaskülerizasyon
OCT	: Optik kohorens tomografi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDR	: Proliferatif diyabetik retinopati
PERK	: Eukaryotic translation-initiation factor 2 (EIF2) alpha kinase 3 (ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 alfa kinaz 3)
PKC	: Protein kinaz C
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PRFK	: Panretinal fotokoagülasyon
PVDF	: Poliviniliden diflorür
qRT-PCR	: Gerçek zamanlı revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
RAGE	: AGE reseptörü
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Serbest oksijen radikalleri (türleri).
RPE	: Retinal Pigment epiteli
TGF-β	: Transforming growth factor- β (Dönüştürücü büyüme faktörü- β)
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α

TRD	: Traksiyonel retina dekolmanı
UPR	: Katlanmamış protein tepkisi
VEGF	: Vascular endothelial growth factor (vasküler endotelyal büyüme faktörü)
XBP1	: X-box bağlayıcı protein 1
µg	: mikrogram
µL	: mikrolitre
µM	: mikromolar



GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabet hiperglisemi ile karakterize bir metabolik hastalıktır ve diyabetik hasta sayısı 600 milyona yükselmiştir. 2045 yılında dünya genelinde 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1). Diyabetik retinopati diyabetik hastalarda önemli bir komplikasyondur. Hem tip 1 hem de tip 2 diyabet hastalarında görülür (2). Diyabet başlangıcından 20 yıl sonra, tüm tip 1 diyabet hastaları ve tip 2 diyabet hastalarının %60' ı diyabetik retinopatiye (DR) ilerler (3). Bu nedenle dünya genelinde 95 milyon diyabet hastası diyabetik retinopatiye sahiptir (4) ve diyabet hastalarının %10' u diyabetik makula ödemi ve proliferatif diyabetik retinopatinin görme kaybını tehdit eden evrelerine ilerlemiştir (5).

Diyabetik retinopati (DR) retinanın hiperglisemiye kronik olarak maruz kalması sonucunda çeşitli patojenik yollarla meydana gelen çok faktörlü bir hastalıktır ve görme kaybına kadar giden komplikasyonları vardır. Retinal hücrelerde ileri glikasyon son ürünleri (AGE) birikimi ve AGE reseptörü (RAGE) pro-oksidan/pro-inflamatuar sinyalleşmesinin diyabetik retinopatide önemli bir moleküler sinyalizasyon olduğu göze çarpmaktadır. AGE' ler enzimatik olmayan glikasyon ile üretilirler ve retinanın uzun süre bu bileşiklere maruz kalması bağışıklık tepkileri, oksidatif stres ve neovaskülarizasyon dahil inflamasyonu tetikleyebilir. Diyabetik hastaların retina hücrelerinde AGE reseptörü (RAGE) yüksek miktarda eksprese olur. Bu AGE-RAGE ekseninin, diyabetik retinopati sırasında ortaya çıkan sürekli inflamasyon, nörodejenerasyon ve retinal mikrovasküler disfonksiyonda merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (6). Diyabetik retinopatideki (DR) patolojik durum, reaktif oksijen türleri (ROS) aracılı inflamatuvar süreçlerle de ilişkilidir. ROS' un aşırı üretiminden kaynaklanan insülin direnci ve oksidatif stres pro-inflamatuar sinyalleşme üzerinden etki gösterir. Oksidatif hasar, esas olarak mitokondridedir; endoplazmik retikulumdaki (ER) protein homeostazını

dolaylı olarak bozarak yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimi ile sonuçlanır. Bu proteinlerin endoplazmik retikulum lümeninde birikmesi, daha sonra protein katlanma kapasitesini ve hücrel fizyolojiyi geri kazandırmak için katlanmamış protein tepkisini (UPR) tetikleyen ER stresine neden olur (7).

Bu nedenle AGE/RAGE/Nox ile indüklenen ER stres eksenine ile ilgili sinyal moleküllerinin hedeflemenin diyabetik retinopati tedavisiyle ilgili umut vaat eden potansiyel bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

Azeliragon (TTP488) oral olarak alınabilen bir RAGE inhibitörüdür (8). Bu molekülün özellikle RAGE reseptörlerinin yoğun olarak arttığı DR oluşan retinal dokularda hastalık şiddetini ve özellikle ER stres bağımlı pro-inflamatuar ve pro-oksidan sinyalleri inhibe edeceğini değerlendirmektedir.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında bu çalışmada; in vitro diyabet modeli oluşturulan insan retinal pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) RAGE inhibitörü olan azeliragonun ER stres aracılı diyabetik retinopatideki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Böylece retina pigment hücrelerinde diyabet/inflamasyon modelinde RAGE inhibitörü azeliragonun terapötik etkisi sırasıyla RAGE, AGE, Nox eksenine ve aşağı akış yönünde yer alan oksidatif stres ve apoptoz sinyalleri ile araştırılmış ve RAGE hedefli tedavinin diyabetik retinopatideki etkinliği ortaya konmaya çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

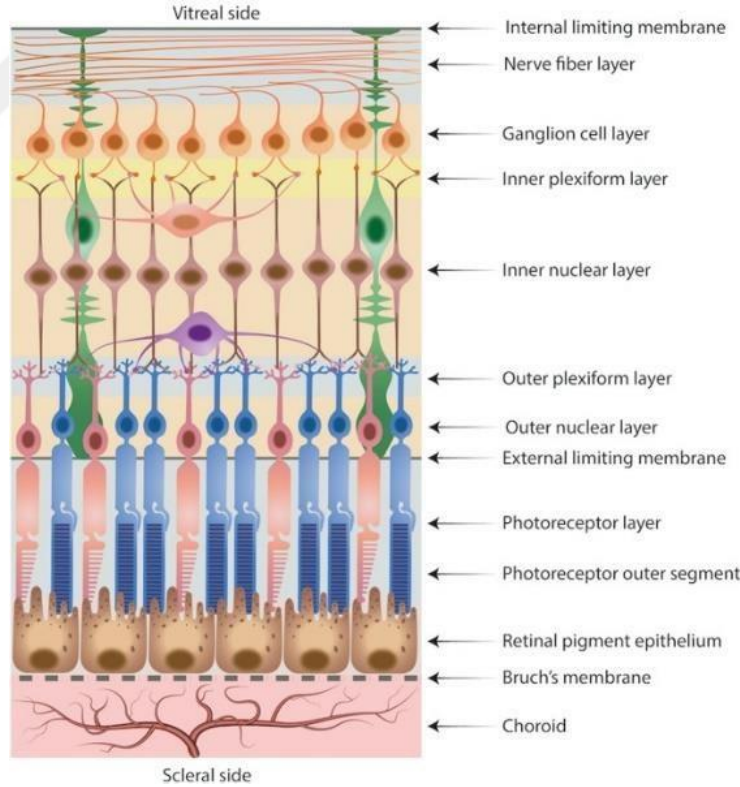
RETİNA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Göz küresi; üç ana tabakadan oluşmaktadır. En dışta göze şeklini veren fibröz yapıdaki sklera tabakası, ortada gözün beslenmesini sağlayan damarlı ve pigmente koroid tabakası, en içte ise görmeyi sağlayan retina tabakası bulunur. Retina nöral ektodermden köken alır. Yaklaşık 0,5 mm kalınlığındadır. Retinanın merkezinde yaklaşık 2 x 1,5 mm çaplı oval sarı-beyaz renkli gözüken, optik sinirin göz küresine bağlandığı alanda optik disk bulunur. Optik sinirin merkezinden retinanın ana damarları yayılır (9). Santral retinal arter bir end arter olup göz küresinin yaklaşık 1cm arkasından optik disk içine girer ve retina içinde retinal arteriolleri oluşturur. Retinal arteriollerin devamında kapiller damarlar bulunur. Retina kapillerleri retinanın 2/3' lük iç kısmını beslerken, dış 1/3' lük kısmı ise koryokapillaris tarafından beslenir. Kapiller damarların iç kısmında tek sıra halinde endotel hücreleri bulunur. Endotel hücrelerinin altında ise bazal membran bulunmaktadır. Kapiller damarlarda kas doku bulunmaz. Bu damarların etrafında perisit denen psödopodlara sahip hücreler bulunur. Perisitler kontraktıl özellikleri sayesinde mikrovasküler otheregölasyonda rol alır. Kapillerlerin devamında venüller ve retinal venler bulur. Santral retinal vene doğru genişleyerek devam ederler (10). Optik diskin yaklaşık 4,5-5 mm temporalinde, süperior ve inferior temporal arklar arasında makula olarak bilinen ksantofil pigmenti ve birden çok gangliyon hücre tabakası içeren retina bölgesi bulunur. Bu alanın merkezinde ise vasküler yapı bulundurmıyan oval şekilli kırmızımsı çukur alan olan fovea bulunmaktadır (9).

Retina nörosensöriyel retina ve retinal pigment epiteli (RPE) olmak üzere iki bölümden oluşur. Bu iki bölüm arasında subretinal alan bulunur. Optik disk ve ora serrata dışında iki bölüm arasında anatomik bağlantı bulunmamaktadır (11).

Retina histolojik olarak dıştan içe doğru 10 tabakadan oluşur (Şekil 1) (12):

- 1) Retina pigment epiteli
- 2) Fotoreseptör tabaka (koni ve basiller) (13)
- 3) Dış limitan membran
- 4) Dış nükleer tabaka
- 5) Dış pleksiform tabaka
- 6) İç nükleer tabaka
- 7) İç pleksiform tabaka
- 8) Gangliyon hücre tabakası
- 9) Sinir lifi tabakası
- 10) İç limitan membran



Şekil 1. Retinanın histolojik yapısı.

Görme işlevi, dış retinada bulunan fotoreseptör hücrelerin dış segmentlerinde bulunan kimyasal maddelerin (rodopsin, opsin) ışık etkisiyle yapılarının değişmesi ve bu hücrelerin

hiperpolarizasyonu ile başlar. Oluşan stimulus 1.nöron olan bipolar hücelere ve ardından 2. nöron olan ganglion hücelerine iletilir. Ganglion hücelerinin aksonları optik siniri meydana getirir ve oluşan bu elektrokimyasal uyarı beyin ilgili merkezlerine iletilir (14). Burada iki gözden gelen bu uyarıların birleştirilmesi ve işlenmesiyle görme işlevi gerçekleşir (15).

RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRESİ

Retina pigment epiteli, nöroektoderm kaynaklı, fotoreseptör hüceleri ve koryopakillaris arasında yer alan ve özelleşmiş tek sıra küboidal hücelerden oluşmuştur. Retinal homeostazın sürdürülmesinde ve fotoreseptör metabolizmasında önemli rol oynar. Her bir retinal pigment epitel (rpe) hücresi yaklaşık 30-45 arası fotoreseptör hücresi ile temas halindedir (16) . Bu hücelerin apikal yüzünde çok sayıda mikrovillus denen çıkıntılar bulunur. Bitişik RPE hücelerinin lateral duvarlarında ise zonula okludens denilen sıkı bağlantılar bulunur ve bu bağlantılar kan-retina bariyerini oluştururlar. Bazal kısmı ise brunch membranının yapısına katılır (16, 17). Makulada rpe hüceleri daha uzun ve ince iken perifer retinada ise daha geniş ve kısadır. Ayrıca bu hüceler içindeki melanin granülleri nedeni ile kahverengi görülür ve en yoğun pigment konsantrasyonu perifer retinada bulunurken, makula bölgesi ise en düşük melanin pigmenti konsantrasyonuna sahiptir (18).

Rpe hücelerinin retina metabolizmasında önemli fonksiyonları vardır. Başlıca fonksiyonları (16);

- 1) Dış kan-retina bariyerinin devamı,
- 2) Su, iyon, besin ve oksijen transportu,
- 3) Subretinal boşluktan aktif sıvı transportu yaparak subretinal ödem oluşumunu önlemek,
- 4) Işığın emilimi ve ışığın oluşturduğu oksidasyona karşı korunma,
- 5) Fotoreseptör dış segmentlerinin fagositozu,
- 6) Görme işlevi için gerekli A vitaminin metabolizması,
- 7) Retinanın yapısal bütünlüğü için çok sayıda sitokin ve büyüme faktörünü salınması,
- 8) Lokal immün yanıtın düzenlenmesidir.

Retina ve retinal pigment epitel hüceleri kronik oksidatif strese maruz kalmaktadır. Işık maruziyeti yüksek oksijen tüketimine, yağ asitlerinin oksidasyonuna ve günlük yüksek seviyelerde serbest radikallerin oluşumuna neden olan fotoreseptör dış segmentlerinin yıkımına yol açar (19). Rpe hücresinde oksidatif hasarı önlemek için glutatyon peroksidaz, katalaz,

süperoksit dismutaz gibi enzimatik antioksidanlar ve lütein, zeaksantin, askorbik asit, karotenoidler, alfa tokoferol, beta karoten gibi enzimatik olmayan antioksidanlar bulunur (17).

Oksidatif stres, inflamasyon, yaşlanma ve diğer faktörler rpe disfonksiyonuna ve atrofisine yol açabilir. Bu durum yaşa bağlı makula dejenerasyonu, proliferatif vitreoretinopati, Stargardt hastalığı, retinitis pigmentosa ve diyabetik retinopati gibi birçok göz hastalığının tetiklenmesi veya şiddetlenmesinde rol oynar (20).

DİYABETİK RETİNOPATİ

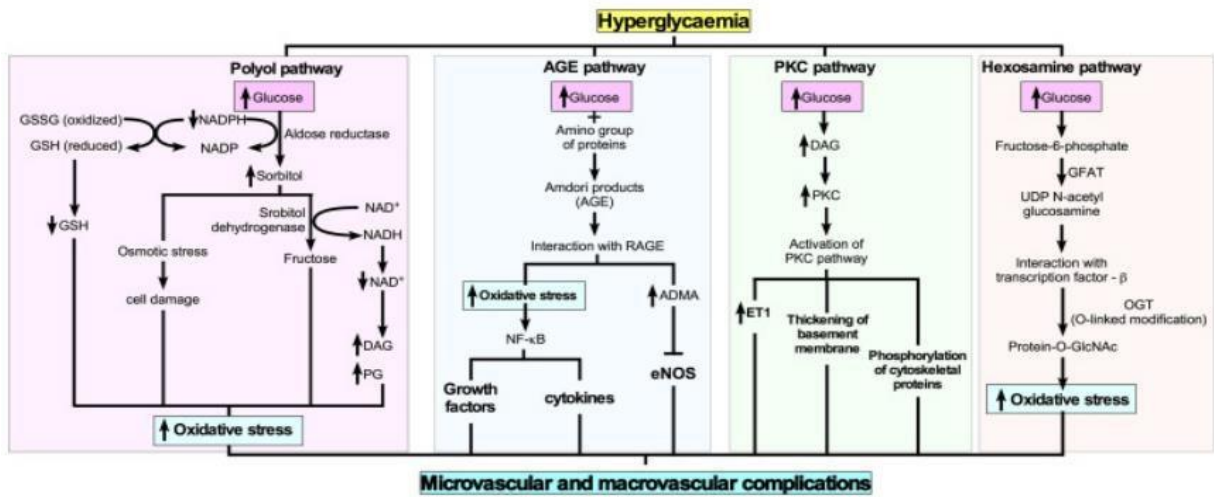
Diyabetes mellitus (DM); rölatif veya mutlak insülin eksikliği veya periferik dokularda insülinin etkisine karşı gelişmiş olan insülin direnci nedeniyle ortaya çıkan, çok sayıda organı etkileyerek multisistemik bir tutuluma neden olan kronik hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat metabolizma bozukluğudur (21). Diyabet, binlerce yıldır insanlık için önemli bir sorun olmuştur. Bilinen en eski tarihi MÖ 1500' lü yıllarda eski Mısır ve Hintlilere ait belgelere dayanmaktadır (22). Dünya çapında görülme insidansı artarak devam etmektedir. Ayrıca kişi başı sağlık giderlerinde de ciddi bir yer tutmaktadır (23). Diyabet insidansındaki artışın küresel yaşlanma, obezite, kötü beslenme, fiziksel hareketsizlik, ekonomik büyüme ve hızlı kentleşme gibi faktörlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (24). Diyabetin makrovasküler ve mikrovasküler olarak çok sayıda komplikasyonları vardır. Diyabetik retinopati (DR), nefropati ve nöropati ile diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarını oluşturur. Günümüzde körlük nedenlerinin başında gelen diyabetik retinopati, retinanın prekapiller arteriollerini, kapillerlerini ve venüllerini tutan bir mikroanjiopati tablosudur (25). Diyabetin süresi, yüksek HbgA1c düzeyleri, hipertansiyon, nefropati, sigara, dislipidemi ve yüksek vücut kitle indeksi diyabetik retinopati için risk faktörleri arasında sayılabilir (26). Tip 1 diyabet hastaları, tip 2 diyabet hastalarından daha yüksek DR insidansına sahiptir (5). Diyabetik retinopatinin ilerlemesi retinal iskemi, diyabetik maküler ödem (DMÖ), neovasküler glokom (NVG), vitre içi hemoraji (VİH), traksiyonel retina dekolmanı (TRD) gibi ciddi görme kaybı ile sonuçlanan patolojilere yol açar. Bu nedenle diyabetik hastalara gözünün durumu, diyabet tipi ve süresine bağlı belli aralıklarla göz dibi muayenesi yapılması önerilir. Diyabette erken tanı ve tedavi komplikasyonları önlenmesi veya geciktirilmesi açısından oldukça önemlidir (27). Gelişen teknoloji ve yapay zeka teknikleri ile diyabetik retinopatinin daha erken tespiti, daha geniş ölçekli taranması, hastalığın ilerlemesine yönelik hedefli tedavi stratejileri ve yönetimi açısından araştırmalar devam etmektedir (28).

DİYABETİK RETİNOPATİDE PATOGENEZ

Diyabetik retinopati oldukça karmaşık bir etiyolojiye sahip önemli bir diyabetik komplikasyondur. Kronik hiperglisemi atakları vasküler endotel hücrelerinde serbest radikallerin aşırı üretimine neden olur. Artmış serbest oksijen radikalleri (ROS) ve çeşitli biyokimyasal yollar diyabetik retinopatinin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rolü olan inflamasyonu tetikler. İnflamasyonun devamında nörodejenerasyon, mikrovasküler hasar ve fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Bu durum birbirini tetikleyen bir damar hasarı döngüsü oluşturarak diyabetik maküler ödem dahil olmak üzere diyabetik retinopati tablosunun oluşmasına yol açar (29). Günümüzde diyabetik retinopatinin patogenezi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hastalık seyri sırasında meydana gelen biyokimyasal değişimler ve buna bağlı hücrel değişimler sonucu vasküler yatakta iki farklı klinik yanıt gelişir (25). Bunlardan bir tanesi kapiller endotel hücrelerinin ve etrafında destek sağlayan perisit hücrelerinin sayılarında azalmaya bağlı vasküler permeabilite artışıdır. Bu duruma bağlı oluşan sızıntılar sonucu intraretinal hemorajiler, sert eksuda ve retinal ödem tablosu oluşur. İkincisi ise kapiller bazal membranının kalınlaşması, endotel hasarı ve hasara cevap olarak gelişen inflamasyon ve trombosit agregasyonuna bağlı kapillerlerin arteriöl kısmında tıkanma ve sonucunda meydana gelen retinal iskemidir. Bu durum sonucu ise arteriyo-venöz şantlar, neovaskülarizasyon, yumuşak eksüdasyon tabloları oluşur (25). Özetle diyabetik retinopatinin patogenezinde kronik hiperglisemi esas neden olmakla beraber inflamasyon, serbest oksijen radikalleri, retinal nörodejenerasyon ve hücrelerin bu durumlara verdiği yanıtlar önemli rol oynar.

Kronik hiperglisemi DR etiyolojisinin esas nedenidir. Önceki çalışmalar hipergliseminin, genetik ve çevresel etmenlerle birlikte biyokimyasal değişiklikleri başlattığı ve oluşan metabolik yollar ve yıkım ürünlerinin dokularda hasar oluşturduğunu göstermektedir (30). Poliol yolu, ileri glikasyon son ürünleri (AGE) birikimi, protein kinaz C (PKC) yolu ve heksozamin yolağı dahil olmak üzere hiperglisemiye bağlı vasküler bozukluklarda çoklu metabolik yollar söz konusudur (31). Bu süreçlerin hücrel metabolizma, sinyalleme ve büyüme faktörleri üzerinden hastalık sürecini başlattığı ve düzenlediği düşünülmektedir (32). Yüksek glukoz, aldoz redüktaz enzimini aktive ederek hücre içinde sorbitol birikimine neden olur ve hücrelerde ozmotik hasara yol açar. Ayrıca bu yolda kullanılan antioksidan özelliğe sahip NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) nedeniyle de serbest oksijen radikalleri artar (33). Hiperglisemi durumunda dokularda ileri glikasyon son ürünleri artar ve ileri glikasyon son ürünleri reseptörüne (RAGE) bağlanarak diyabetik komplikasyonun oluşmasında önemli rol alır (34). AGE-RAGE ekseni hücrelerde oksidatif stresi artırır ve böylece nükleer

faktör- κ B (NF- κ B) aktive olur. Böylece inflamasyonu uyaran çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanması tetiklenir (35). Protein kinaz C (PKC) yolunun aktivasyonunda ise ROS ve diaçilgliserol üretimi olur. Çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salınmasına yol açarak vasküler hasara katkı sağlar (36, 37). Hekzosamin yolunun aktivasyonu da bazı gen ekspresyonlarının artışına neden olarak ROS üretimine yol açar. Ayrıca AGE oluşumunu indükler (38, 39). Şekil 2' de hiperglisemi kaynaklı biyokimyasal yolların aktivasyonu gösterilmiştir (33).



Şekil 2. Hiperglisemi kaynaklı biyokimyasal yolların aktivasyonunu ve ilgili sonuçları gösteren şematik şekil.

İnflamasyon da DR patogenezinde önemli bir etmendir. Kronik hafif seyirli bir inflamasyon hem diyabetik hayvan modellerinde hem de diyabet hastalarında yaygın olarak tespit edilmiştir (40, 41). Yapılan bazı çalışmalar diyabet hastalarının retina ve vitreus örneklerinde proinflamatuvar sitokinlerin arttığını göstermiştir. Ayrıca IL-12 gibi bazı inflamatuvar sitokinlerin DR gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Üretilen çeşitli inflamatuvar moleküllerin (IL-2, IL-8, TNF- α , VEGF vb.) DR progresyonu ile ilişkili olduğu ve anjiyogenez oluşumunu tetiklediği ifade edilmiştir (42). Retinadaki müller hücresi, astrosit gibi glial hücrelerin disfonksiyonunun, inflamasyon sürecinin başlaması ve ilerlemesinde katkıda bulunduğu iddia edilmektedir (43, 44).

Diyabetik retinopatideki patolojik durumlar ROS aracılı inflamatuvar süreçlerle de ilişkilidir. ROS aşırı üretiminden kaynaklanan artan insülin direnci ve oksidatif stres, pro-inflamatuvar sinyalleşme üzerinden etki gösterir. Oksidatif hasar esas olarak mitokondridedir; endoplazmik retikulumdaki protein homeostazını dolaylı olarak bozarak yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerle sonuçlanır (45). Bu proteinlerin ER lümeninde birikmesi, daha sonra

protein katlanma kapasitesini ve hücrel fizyolojiyi geri kazanmak için katlanmamış protein tepkisini tetikleyen ER stresine neden olur (46). ER stres de inflamasyonu tetikler (47).

Diyabetik hastalardaki bu süreçler aynı zamanda retina nöronlarını etkileyerek artmış apoptozise ve buna bağlı sinir lifi tabakasında incelmeye neden olur. Bu durum geri dönüşümsüz görme kaybına yol açar (48). Yapılan çalışmalar diyabete bağlı retinal nöropatinin vasküler komplikasyonlardan önce geliştiğini ve kişinin yaşı, cinsiyeti ve HgA1c değerinden bağımsız olarak ilerleyici olduğunu göstermektedir (49).

Bazı genetik faktörlerin diyabet oluşumuna yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir. Hiperglisemik koşullarda endotel hücrelerinin gen ifadelerinin değişmesi diyabetik retinopati ve ateroskleroz gibi diyabetik mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır (50, 51).

İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİ VE RESEPTÖRÜ

Fazla miktardaki glukozun bir kısmı proteinlerin amino grubuyla enzimatik olmayan bir reaksiyona girerek kararsız amadori denilen ara ürünleri oluşturur. Daha sonra glikolize proteinler birbirleri ile çapraz bağlar oluşturarak ileri glikasyon son ürünlerini oluşturur (52, 53). Diyabetik retinopati etiyolojisinde ilgili birçok yol olmasına rağmen retinanın hiperglisemiye kronik maruz kalmasının, retinopatide önemli rol oynayan ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE' ler) birikmesine yol açtığı tespit edilmiştir. Ek olarak AGE reseptörü (RAGE) çeşitli retinal hücrelerde her zaman, her yerde eksprese edilir ve diyabetik hastaların retinalarında yukarı regüle edilir. Bu da pro-oksidan ve pro-inflamatuar sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu AGE-RAGE ekseninin, DR sırasında ortaya çıkan sürekli inflamasyon, nörodejenerasyon ve retinal mikrovasküler disfonksiyonda merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. AGE oluşumunun doğası ve RAGE sinyali terapötik müdahale için olasılıkları öne çıkarır. AGE-RAGE ekseninin; sinyal iletimi, ligandların oluşumu ve son nokta efektörleri dahil olmak üzere çoklu bileşenleri diyabetik retinopatiyi tedavi etme stratejileri için ümit verici hedefler olarak önerilmektedir (6).

Septisemi, romatoid artrit, osteoartrit, ateroskleroz, kronik böbrek hastalığı, inflammatuar bağırsak hastalığı, vaskülit ve geç diyabetik komplikasyonlar gibi çeşitli akut ve kronik inflammatuar hastalıklarda RAGE ifadesinin arttığı bildirilmiştir (54). RAGE ifadesi, monosit/makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, T ve B lenfositleri gibi bağışıklık yanıtıyla bütünleşen ana hücre tiplerinin çoğunda bulunmuştur (55, 56). RAGE, endotelial hücrelerde ifade edilir ve $\beta 2$ integrin Mac-1 ile fiziksel etkileşim yoluyla lökositlerin adezyon reseptörü

olarak işlev görür. RAGE-Mac-1 etkileşimi, in vitro inflamatuvar RAGE ligandları tarafından uyarılır ve fare inflamasyon modellerinde lökosit rekrütasyonunu teşvik eder (57, 58). RAGE sinyali tetikleyen ekstrasellüler ligandların geniş spektrumu arasında birçoğu akut ve kronik bağışıklık yanıtları ile fonksiyonel olarak ilişkilendirilmiştir (59-61). RAGE' nin aktivasyonu, adaptif ve doğal bağışıklık sisteminin iyi bilinen düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü NF- κ B ve bazı alt hedef genin aktivasyonunu tetikler (62). RAGE ayrıca, yakın promotorunda fonksiyonel bir NF- κ B bağlama bölgesi sergiler ve NF- κ B sinyalleşmesinin doğrudan bir hedef geni olduğu gösterilmiştir (63). Bu, en azından kısmen RAGE ifadesinin normal yetişkin dokularda, akciğer hariç, yok veya çok düşük olduğunu ve stres ve patolojik durumlarda arttığını açıklayabilir (64). Dahası RAGE ligandları, doku hasarının ve inflamasyonun olduğu bölgelerde birikir ve intraselüler NF- κ B aktivasyonunu tetikler (65). Bu birbirine bağlı sinyalleşme, kronik doku değişikliklerinin oluşumunu destekleyen uzun süreli hücresel yanıtın bir döngüsünü mümkün kılar (62). Ayrıca, RAGE aktivasyonuna yanıt olarak sürekli NF- κ B sinyali de novo RelA (p65) mRNA sentezi aracılığıyla da iletilir ve bu, transkripsiyonel olarak aktif NF- κ B' nin artan bir havuzuna neden olur, endojen negatif geribildirim mekanizmalarını geçersiz kılar (66).

RAGE' nin patolojik durumlarda, özellikle doğuştan ve uyarlanmış bağışıklık yanıtlarıyla etkilenen özel işlevi ile ilgili önemli görüşler, RAGE sinyalleşmesi engellendiği fare modellerinden elde edilmiştir. Bu başarı;

1. Bloke edici antikorların veya ligandlar için etkili bir çöktürücü reseptör olarak hareket eden kesilmiş bir form olan rekombinant çözünür RAGE (sRAGE) uygulaması,
2. Genetik olarak değiştirilmiş farelerde baskın-negatif RAGE (DN-RAGE) transgeninin ifadesi ve
3. RAGE' in tam veya dokuya özgü silinmesi (RAGE-/-) ile elde edilmiştir.

sRAGE tedavisi ve DN-RAGE ifadesinin, inflamasyon koşullarını engellediği ve diyabetik ateroskleroz, gecikmiş tip hipersensitivite, nöroinflamatuvar bozukluk, kolit, periodontitis ve diğer fare hastalık modellerinde terapötik etkiler sağladığı bildirilmiştir (67). Ancak sRAGE, işlevsel RAGE yokluğunda bile bağışıklık yanıtlarını etkiler ve fare hastalık modellerindeki faydalı etkilerinin yalnızca RAGE ligandlarının bağlanmasıyla önlenmesiyle değil, aynı zamanda diğer reseptörlerin bağlanması da önlenmesiyle kaynaklandığı varsayılmaktadır (68). RAGE eksik farelerle yapılan çalışmalar, RAGE' nin bağışıklık yanıtlarının başlatılması ve sürdürülmesinde merkezi bir rol oynadığına dair daha fazla in vivo

kanıt sağlamıştır. RAGE-/- fareleri hafif pro-inflamatuar bir fenotipe sahip olsalar da, ılımlı bir şekilde artmış bazal NF- κ B aktivasyonu ve sitokin ifadesi gösterirler ve cecal ligasyon ve puncture (CLP) modelinde ölümcül septik şoktan korunurlar ve *Listeria monocytogenes* enfeksiyon modelinde hayatta kalırlar (68). RAGE sinyalizasyonunun önemli bir işlevi, öncelikle doğuştan bağışıklık yanıtını etkileyen miyeloid hücrelerde yaygın olarak kabul edilirken, adaptif bağışıklık yanıtı bağlamında karşıt veriler yayınlanmıştır.

Yüksek miktarda ileri glikasyon son ürünlerine maruz kalan göz retinası, AGE aracılı hücre hasar için önemli bir bölgedir. Bu bölgelerde uzun süreli AGE birikimi nedeniyle diyabetik retinopati dahil olmak üzere çeşitli diyabetik komplikasyonlarda bağışıklık tepkileri, oksidatif stres ve neovaskülarizasyon dahil inflamasyonu tetikleyebilir. Bu bölgelerde ileri glikasyon son ürünlerinin klerensi azalmaktadır ve bu da dolaşımdaki AGE içeriğinin artmasına neden olabilir. AGE oluşumu, yaşlanmada kademeli olarak birikir ve diyabette hızlanma oranını önemli ölçüde artırır. AGE' ler, kalsiyum (Ca) kanalının aktivasyonu ve Ca²⁺ ATPaz' ın inhibisyonu yoluyla hücre içi kalsiyum seviyesini yükselterek ER stresine ve retina apoptozuna yol açar (69-72).

Diyabetik hayvan modellerinde ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE) inhibitörü uygulamasının Müller glia disfonksiyonunu (73) ve diyabet sırasında kan-retina bariyer disfonksiyonunu ve normal hayvanlara AGE albümin enjekte edildiğinde retinal kapiller lökostazını önlediği bildirilmiştir (74). Ayrıca, azeliragon olarak bilinen TTP488 ve PF-04494700 gibi RAGE' ın birkaç oral olarak verilen küçük molekülleri Alzheimer hastalığı olan hastalarda test edilmiştir (75, 76). RAGE ifadesi, siklooksijenaz-2 inhibitörü etodolak (77), doğal olarak oluşan polifenolik bileşik üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi ve anjiyotensin II tip 1 reseptör blokeri olmesartan gibi antioksidan ajanlar tarafından da inhibe edilebilir (78). İleri glikasyon son ürünleri reseptörü ekspresyonu ayrıca, tiyazolidindionlar (glitazonlar) ve kalsiyum kanal blokerleri de dahil olmak üzere bazı yaygın olarak kullanılan sistemik diyabet ilaçları tarafından azaltılabilir, ancak bunların terapötik etkisi henüz kanıtlanmamıştır (79, 80).

DIYABETİK RETİNOPATİDE KLİNİK

DM olan hastalarda, diyabetin tipik retinal mikrovasküler belirtilerinin varlığı klinik olarak DR olarak tanımlanır (81). Bu belirtiler mikroanevrizmalar, eksudalar, intraretinal hemorajiler, neovaskülarizasyon, intraretinal mikrovasküler anormaliler (IRMA), venöz değişiklikler olarak sayılabilir. Tanıda fundoskopik muayene, optik koherens tomografi (OCT),

fundus florosein anjiografi (FFA) yaygın olarak kullanılmaktadır. İlerleyen teknolojiyle beraber yeni görüntüleme yöntemleri de klinikte yerini alacaktır.

Mikroanevrizmalar

Kapiller damarlarda perisit kaybına bağlı veya kapiller halkanın iki tarafının birleşmesi sonucu oluşan vasküler çıkıntılardır. Fundusta genellikle küçük kırmızı noktalar şeklinde görülürler. FFA’ da hiperfloresans noktalar olarak izlenir (10). DR‘ de muayenede ve FFA’ da ilk görülen bulgudur (82).

Eksudalar

Sert eksudalar, retinal ödeme bağlı gelişen lipoprotein ve köpük hücrelerinden (lipit yüklü makrofajlar) oluşur. Yumuşak eksudalar ise iskemi sonucu oluşan sinir lifi debrisleridir. Fundusta atılmış pamuk manzarası şeklinde görülür. FFA’ da sadece yoğun ve büyük olanları hipofloresans gösterir (10).

İntraretinal Hemorajiler

Retinadaki küçük damarların yırtılması sonucu oluşurlar. Fundusta nokta/leke şeklinde görülürler. FFA’ da ise floresans blokajı yaparlar (25). Genelde 4 hafta-6 ay aralığında rezorbe olurlar (83).

Neovaskülarizasyon (NV)

İskemiye bağlı gelişen yeni damar oluşumudur. Eğer optik disk üzerinde veya 1 disk mesafesi uzaklığında ise NVD olarak, daha uzak alanlarda gelişmişse NVE olarak tanımlanır. FFA’ da geç fazda artan hiperfloresan şeklinde görülür (10).

İntraretinal Mikrovasküler Anormaliler (IRMA)

Var olan arteriol ve venüller arasındaki genişlemiş, kıvrımlı ve telenjektazik kanallardır. FFA’ da sızıntı göstermeyen, iskemik alanlara komşu fokal hiperfloresans şeklinde görülür (10).

Venöz Değişiklikler

İskemiye bağlı venöz damarlarda boncuklanma, kıvrım artışı ve segmentasyon benzeri değişiklikler meydana gelir (10). Diyabet hastalarında diyabetik retinopati haricinde, santral

retina damar tıkanıklıkları ve dal tıkanıklıkları da sağlıklı bireylere göre daha sık görülmektedir (84).

DIYABETİK RETİNOPATİDE SINIFLANDIRMA

DR hastalığının takibi ve tedavisi için ve çeşitli disiplinler arasında ortak bir dil oluşması için Early Treatment Diabetic Retinopathy çalışmasının (ETDRS) sınıflandırması klinik pratikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Teknolojideki ilerlemeyle birlikte yardımcı muayene yöntemlerine ilişkin sınıflandırmalar da geliştirilmiştir. Fakat günümüzde altın standart olarak ETDRS sınıflandırılması kabul görmektedir (85). Bu sınıflandırmada DR non-proliferatif ve proliferatif olmak üzere iki ana bölüme ayrılmıştır. Bulguların şiddetine göre ise alt gruplara ayrılmıştır. Progressif hastalık tablosu her zaman aynı hızla ilerlemez, arada remisyonlar gösterir. Retinanın bir bölgesinde remisyon olurken başka bölgelerde progresyon görülebilir. Spontan regresyon görülse dahi bu oran genelde %10' u geçmez (86). Proliferatif süreçlerin komplikasyonları sonucu gelişen ileri diyabetik göz hastalığı görmeyi ciddi anlamda tehdit etmektedir. Bunlar arasında kalıcı vitreus hemorajileri, traksiyonel retina dekolmanı (TRD), şiddetli fibrovasküler proliferasyonlar ve rubeozis iridis - neovasküler glokom sayılır (25). Sınıflandırma şekli aşağıda Şekil 3 (10)' de gösterilmiştir;

Category/description	Management
Non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR)	
No DR	Review in 12 months
Very mild NPDR	Review most patients in 12 months
Microaneurysms only	
Mild NPDR	Review range 6–12 months, depending on severity of signs, stability, systemic factors and patient's personal circumstances
Any or all of: microaneurysms, retinal haemorrhages, exudates, cotton-wool spots, up to the level of moderate NPDR. No intraretinal microvascular anomalies (IRMA) or significant beading	
Moderate NPDR	Review in approximately 6 months
• Severe retinal haemorrhages (more than ETDRS standard photograph 2A: about 20 medium-large per quadrant) in 1–3 quadrants or mild IRMA	Proliferative diabetic retinopathy (PDR) in up to 26%, high-risk PDR in up to 8% within a year
• Significant venous beading can be present in no more than 1 quadrant	
• Cotton-wool spots commonly present	
Severe NPDR	Review in 4 months
The 4–2–1 rule; one or more of:	PDR in up to 50%, high-risk PDR in up to 15% within a year
• Severe haemorrhages in all 4 quadrants	
• Significant venous beading in 2 or more quadrants	
• Moderate IRMA in 1 or more quadrants	
Very severe NPDR	Review in 2–3 months
Two or more of the criteria for severe NPDR	High-risk PDR in up to 45% within a year
PDR	
Mild-moderate PDR	Treatment considered according to severity of signs, stability, systemic factors and patient's personal circumstances such as reliability of attendance for review. If not treated, review in up to 2 months
New vessels on the disc (NVD) or new vessels elsewhere (NVE), but extent insufficient to meet the high-risk criteria	
High-risk PDR	Treatment advised – see text
• NVD greater than ETDRS standard photograph 10A (about $\frac{1}{3}$ disc area)	Should be performed immediately when possible and certainly same day if symptomatic presentation with good retinal view
• Any NVD with vitreous haemorrhage	
• NVE greater than $\frac{1}{2}$ disc area with vitreous haemorrhage	
Advanced diabetic eye disease	See text

Şekil 3. Diyabetik retinopatide ETDRS sınıflandırması

Diyabetik maküler ödem (DMÖ) diyabetik retinopatisi olan hastalarda görme kaybının en sık nedenidir. DR her evresinde gelişebilir fakat diyabet süresi arttıkça ve diyabetik retinopatinin evresi ilerledikçe oluşma sıklığı artmaktadır (87). Maküler alanda; hücre yoğunluğu ve metabolik aktivitenin fazla olması, henle sinir liflerinin foveadan periferde doğru yatay uzanması, dış pleksiform tabakadaki bağların zayıf olması nedeniyle hücre dışı sıvı toplanması için rezervuar görevi görmesi ve foveal avasküler zon (FAZ) alanında sıvı emiliminin az olması nedeniyle retinal ödem daha sık görülmektedir (82). DMÖ' in diffüz, fokal ve mikst tip olmak üzere üç tip klinikte görülme şekli vardır (25). DMÖ' in tipi tedavi kararını değiştirebilmektedir (88).

GÜNCEL TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Diyabetik hastalarda diyabetik maküler ödem ve proliferatif diyabetik retinopati (PDR) görme kaybının en önemli nedenidir. Günümüzde PDR için standart tedavi panretinal lazer fotokoagülasyon (PRFK) iken, DMÖ için güncel tedavi ise intravitreal anti-VEGF ajanlar ve kortikosteroidlerdir. Bu tedavileri uygularken de hastanın mevcut durumu, diğer risk faktörleri ve kar-zarar oranını gözeterek karar vermek gerekmektedir (89). İleri diyabetik göz hastalığında vitreoretinal cerrahi tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat bu tedaviler DR hastalığını tamamen iyileştirmede ve önlemede yetersiz kalmaktadır ve yeni tedavi arayışları devam etmektedir.

Sistemik risk faktörlerinin kontrol altına alınması; DM ve DR patofizyolojisinde önemli yer tutan başta hiperglisemi olmak üzere hipertansiyon, hiperlipidemi ve bozulmuş böbrek fonksiyonlarının kontrol altına alınmasının, yapılan pek çok çalışmada DR tedavisinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (32).

Lazer; DR' de sıklıkla 2 tip lazer uygulaması kullanılır. PDR ve şiddetli NPDR de tercih edilen PRFK' da amaç makulayı koruyacak şekilde perifer retinada lazer yanıkları oluşturarak iskemik alanların azaltılması ve bu sayede VEGF salınımında azalma ve neovaskülarizasyon gelişiminin önlenmesidir. DMÖ de ise eğer ödem klinik olarak anlamlı ise fovea dışı maküler alana fokal veya grid lazer fotokoagülasyon uygulanmaktadır (90). İlerleyen lazer teknolojileri ile kullanıma giren eşik altı mikropulse diod lazer ise geleneksel lazerlerin aksine daha az hasar oluşturarak etki gösterir (91). Ayrıca son zamanlarda desen tarama ve navigasyonlu lazer sistemleri geliştirilmektedir (92).

Anti-VEGF; yapılan büyük randomize çalışmalar sonucu DR' de etkinliği kanıtlanan ve son 10 yıldır hayatımızda önemli yer edinen intravitreal bevacizumab, ranibizumab, aflibercept

gibi anti-VEGF ajanlar maküler ödem tedavisinde standart haline gelmiştir. Uygulamada genellikle birçok hastada başlangıçta yükleme tedavisi yapılır ve sonrasında remisyonun sağlanması için amacıyla daha az sıklıkta enjeksiyona devam edilir (93).

Kortikosteroidler; diyabetik retinopatili hastalarda ödem gelişmesinde inflamatuvar süreçler de önemli rol oynamaktadır. Pek çok klinik randomize çalışmada intravitreal deksametazon uygulanmasının maküler ödemi azalttığı ve görme keskinliğini arttırdığı gösterilmiştir (94).

İntravitreal yavaş salınlı deksametazon implantları, daha uzun süre vitreusta kalarak enjeksiyon sıklığını azaltmaktadır fakat katarakt, göz içi basınç artışı ve enfeksiyona yatkınlık gibi riskleri bulunmaktadır. Bu nedenle anti-VEGF ajanlara kıyasla genelde sadece psödo-fakik, vitrektomize veya yakın zamanlı tromboembolik olay geçiren hastalarda ilk basamak olarak öne çıkmaktadır (95).

Vitrektomi; Diyabetik hastalarda AGE'lerin birikimi vitreus korteksinde kollajen, laminin ve fibronektin gibi moleküllerin artışına yol açarak internal limitan membran (İLM) ile yapışıklığın artmasına neden olur. Yapışıklığa bağlı oluşan çekintiler traksiyona ve dirençli maküler ödeme yol açar. Yapılan çalışmalar vitrektomi yapılmasının DMÖ' in gerilemesine katkı sağladığını göstermiştir.(96, 97). Vitrektomi komplikasyonları düşünüldüğünde, dirençli vitre içi hemoraji ve traksiyonel retina dekolmanında öncelikli tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

Diğer ajanlar; topikal non-steroid anti-inflamatuvar bir ajan olan nepafenak, hafif diyabetik retinopatisi olan gözlerde retinal ödemi azaltmaktadır (98, 99). Brolucizumab (anti-VEGF) (100) ülkemizde bulunmamaktadır. Yeni bir anjiyopoyetin-2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü-A bispesifik antikoru olan faricimab, klinik çalışmaları devam etmektedir (101). Gen tedavileri ve retinal kök hücre nakli ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (102, 103).

Azeliragon (TTP488); oral olarak alınabilen bir RAGE inhibitörüdür (8). RAGE immün ve endotel hücrelerin de hücre fonksiyon bozukluğunu promote ederken, inflamatuvar marker genlerinin aktivasyonunu gerçekleştirir. Bu nedenle RAGE miktarının artış gösterdiği hastalıklarda tedavi için kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Fare Alzheimer modelinde azeliragon uygulamasının A β plak birikimini azalttığı ve plazma A β seviyesini artırdığı bildirilmiştir. Buna ilaveten farelerde inflamatuvar sitokinlerin azaldığı bildirilmiştir (104). Ayrıca meme üçlü negatif meme kanserinde metastazı baskıladığı bildirilmiştir (105). Bu molekülün özellikle RAGE reseptörlerinin yoğun olarak arttığı DR oluşan retinal dokularda

hastalık şiddetini ve özellikle ER stres bağımlı proinflamatuvar ve pro-oksidan sinyalleri inhibe edeceğini değerlendirmekteyiz.



GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü, Moleküler Genetik ve Görüntüleme laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Proje kapsamında insan göz retinal pigment epitel ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) hücre hattı kullanıldı. ARPE-19 hücreleri DMEM/HAMS F12 + %10 FBS, %1 pen/strep ile steril inkübatörlerde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarda kültüre edildi. Çalışma kapsamında kullanılan cihazların adı, markası ve menşeleri Tablo 1’ de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma kapsamında kullanılan cihazların adı, markası ve menşei

Cihaz	Markası Modeli ve Ülkesi
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus, Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Centurion Scientific, İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon- Eclipse Ts100, Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson, ABD
Dijital Pipetör	Thermo Scientific, ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific-Multiskan™ GO, ABD
Soğutmalı santrifüj	Hettich- Micro 200R, Almanya
Santrifüj	Hettich-Micro 200R, Almanya
Nanodrop	OPTİZEN-NanoQ, Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems-ProFlex, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-StepOnePlus, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-7500, ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WİSD-WiseMix, İngiltere
Analitik Terazî	AND-HR 250 AZ
Doku Homojenizatörü	QIAGEN, Almanya
Karıştırıcı Blok	Bioer Technology, Çin
4°C Buzdolabı	VESTEL, Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	VESTEL, Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	WİSD, İngiltere
Ultra Saf Su Cihazı	TKA, Almanya
Distile Su Cihazı	TKA, Almanya
Tali Görüntü Tabanlı Sitometre	İnvitrogen, ABD
Trinoküler Floresan Işık Mikroskobu	Carl Zeiss-AXİO, Almanya

DİYABETİK RETİNOPATİ MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Çalışmada diyabetik retinopati modeli, gerçek ortamı en iyi modelleyebilmek için diyabetik retinopatinin patofizyolojisinde kanıtlar ile ortaya konulan hiperglisemi, buna bağlı olarak yüksek glikasyon metabolizması son ürünleri ve ayrıca güçlü bir inflamasyon ortamının tümü projemizde modellenmeye çalışıldı. Bu kapsamda projede diyabetik retinopati modelinde kullanılacak olan ilk ajan ileri glikasyon son ürünleri (AGE) AGEs-BSA, Lin ve ark. (106) tarafından açıklanan protokol izlenerek hazırlandı. Kısaca, 50 mg·mL⁻¹ BSA (bovine serum albümin) ve 0,5 M glikoz, 0,2 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,4) çözöldü. Sırasıyla bir BSA kontrolü ve bir glukoz kontrolü, tek başına BSA (50 mg·mL⁻¹) veya tek başına glukozun (0,5 M) sodyum fosfat tamponunda (pH 7,4) (0,2 M) çözölmesiyle hazırlandı, şırınga filtreleri ile sterilizasyondan sonra solüsyonlar karanlıkta 37°C' de 60 gün inkübe edildi. Bağlanmayan materyaller, PBS' ye karşı kapsamlı diyaliz yoluyla çıkarıldı, AGE' lerin konsantrasyonu, daha önce açıklandığı gibi, 360 nm' de uyarma ve 440 nm' de emisyonlarla AGE' lere özgü floresan ölçölerek belirlendi. BSA kontrolünün floresansı bir taban çizgisi olarak kullanıldı ve kullanılan nitelikli AGE's-BSA' nın floresansı, BSA kontrolünden en az 70 kat daha yüksek olacak şekilde materyal hazırlığı tamamlandı (106). Projede diyabet amaçlı glukoz ve pro-inflamatuar ajan olarak LPS daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan dozlar referans alınarak kullanıldı. Bunun için yüksek glukoz (25 mM) ve 10 ug/ml Lipopolisakkarit (LPS) içeren besiyerinde hücreler kültüre alındı (107).

Hücreler bu dozlarda her 24 saat arayla yukarıdaki ajanlara maruz kaldı ve sonrasında 48 saat arayla fresh besiyerinde kaldılar. Bu şekilde her 72 saatin sonunda hücreler yeni flasklara pasajlandı ve her seferinde 16 saat yapışma süresi beklendikten sonra yine 24 saat arayla AGEs+ Glukoz+ LPS uygulandı ve tekrar fresh besiyerine konularak 48 saat beklendi. Bu döngü 10 pasaj devam ettirildi ve hücrelerin diyabetik retinopati karakteri kazanması sağlandı. On pasaj sonunda hücreler 75' lik flasklara pasajlandı ve bundan sonra DR model hücreleri olarak kullanıldı.

DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE RAGE İNHİBİTÖR UYGULAMASININ YAPILMASI

Projede bu aşamadan sonra RAGE hedefli terapinin etkinliği test edildi ve etkinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasına başlandı. Bu kapsamda deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

1- Kontrol grubu (N=6): Bu grupta Diyabetik retinopati modeli oluşturulan gruptaki kadar pasajlanmış, ancak yalnız su uygulanmış ARPE-19 hücreleri mevcuttur. Bu hücreler Azeliragon uygulamasının miktar ve süresince taşıt madde olarak kullanılan %0,1 DMSO ile muamele edildi.

2- Diyabetik Retinopati (DR) grubu (N=6): Birinci maddede belirtilen şekilde DR modeli oluşturulan hücreler kullanıldı. Bu hücreler Azeliragon uygulamasının miktar ve süresince taşıt madde olarak kullanılan %0,1 DMSO ile muamele edildi.

3- DR+IR grubu 100 nM (N=6): Birinci maddede belirtilen şekilde DR modeli oluşturulan hücreler kullanıldı. Bu hücrelere 100 nM Azeliragon 72 saat boyunca uygulandı. Süre sonunda hücreler toplandı.

4- DR+IR grubu 300 nM (N=6): Birinci maddede belirtilen şekilde DR modeli oluşturulan hücreler kullanıldı. Bu hücrelere 300 nM Azeliragon 72 saat boyunca uygulandı. Süre sonunda hücreler toplandı.

5- DR+IR grubu 500 nM (N=6): Birinci maddede belirtilen şekilde DR modeli oluşturulan hücreler kullanıldı. Bu hücrelere 500 nM Azeliragon 72 saat boyunca uygulandı. Süre sonunda hücreler toplandı.

MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

RAGE, ER Stres, İnflamasyon Ve Apoptoz Yolağı Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Gen ekspresyonlarının belirlenmesi çalışmaları kapsamında ilk olarak yukarıdaki kontrol ve deney gruplarından elde edilen hücrelerden toplam RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu için Trizol bazlı bir izolasyon kiti, sonrasında kolonlu sitemle çalışan bir saflaştırma kiti kullanıldı ve RNA izolasyonları kit protokolü takip edilerek yapıldı. Bu yöntemde kısaca izolasyon için ilk olarak trizol içeren tampon hazırlandı ve hücrelerin bulunduğu flasklara konularak hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Sonrasında kloroform ile karıştırılarak santrifüj edildi ve üst faz alınarak isopropanol ile çöktüldü. En son %70' lik alkol fazına alındı, bu aşamadan sonra elde edilen homojenat kolondan geçirilerek birkaç aşamada yıkandı ve saf RNA elde edildi. Elde edilen toplam RNA örneklerinden miktar ve saflık belirleme için Qubit® Fluorometer (Invitrogen, USA) kullanıldı. DNA, RNA free ultra saf su (Sigma, USA) ile eşitlenen RNA örneklerinden cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

(Applied Biosystems) ile gerçekleştirildi (PCR şartları Step 1: 25°C, 10 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk) ve daha sonra kullanılmak üzere - 20 C’de saklandı.

Bu aşamadan sonra gen ekspresyonlarının belirlenmesi için qRT-PCR çalışmalarına başlandı. qRT-PCR çalışmalarında primer problemler custom array şeklinde ticari firmalara dizayn ettirildi ve 384 well pleytlere gömülü şekilde valide edilerek çalıştığı ispatlanacak şekilde temin edildi. Projede custom array aşağıdaki spesifik ve valide primer problemlerden oluşturuldu.

RAGE (Age reseptörü), **S100** (S100 proteini), **NF-KB** (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), **TGF-β** (Transforming growth factor beta), **IL-1β** (Interleukin 1 Beta), **IL-6** (Interleukin 6) **TNF-α** (Tumor Necrosis Factor alpha), **LMNB1** (Lamin B1), **ICAM-1** (Intercellular Adhesion Molecule 1), **PAI** (Plasminogen Activator Inhibitor, Type I), **HIF-1α** (Hypoxia-inducible factors-1α), **VEGF** (Vascular endothelial growth factor), **EGF-R** (Epidermal growth factor receptor), **MMP3** (Matrix metalloproteinase 3), **MMP9** (Matrix metalloproteinase 9) **eIF2-α** (Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha), **ATF4** (Activating transcription factor 4), **PERK** (Pancreatic EIF2-Alpha Kinase), **IRE1α** (Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), **EDEM** (ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1), **CHOP** (DNA damage inducible transcript 3), **XPB1** (X-box binding protein 1), **sXPB1** (spliced (s) X-box binding protein 1), **PI3 kinase** (Phosphoinositide 3-kinase), **AKT** (AKT Serine/threonine kinase), **P53** (tumour supresor protein 53), **BAX** (BCL2 associated X), **BCL2** (B-cell lymphoma), **BCL-XL** (B-cell lymphoma-XL), **Cyt-C** (Cytochrome C), **Casp-3** (Caspase 3), Homobox: **GAPDH** (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), **FBXO7** (F-Box Protein 7) ve **β-Actin** (Actin beta)

Yukarıda verilen genlerin amplifikasyonunda bir önceki bölümde yapılan çalışmalardan elde edilen cDNA’ ler kullanıldı, bu cDNA’ ler spesifik primer problemleri 384 well pleytlere gömülü olarak satın alınan custom arrayde sağlanan qRT-PCR master miks kullanılarak Quant Studio 5 real time PCR cihazında custom array protokolüne uygun olarak amplifiye edildi. qRT-PCR analizi sonrasında elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanıldı ve gen ekspresyon değerleri relatif kat değişim olarak kontrole kıyasla belirlendi ve 2-ΔΔCt metodu ile hesaplandı.

Western Blot Protein Analizleri

Projede kontrol ve uygulama gruplarında taşıt ve RAGE inhibitör tedavisinden sonra, her kopyadaki 75 cm² lik şişelerden alınan tam hücre peletleri, buz koşullarında 2 µL PMSF (Fenilmetilsülfonil florür) çözeltisi, 2 µL sodyum ortovanadat solüsyonu ve 2 µL proteaz

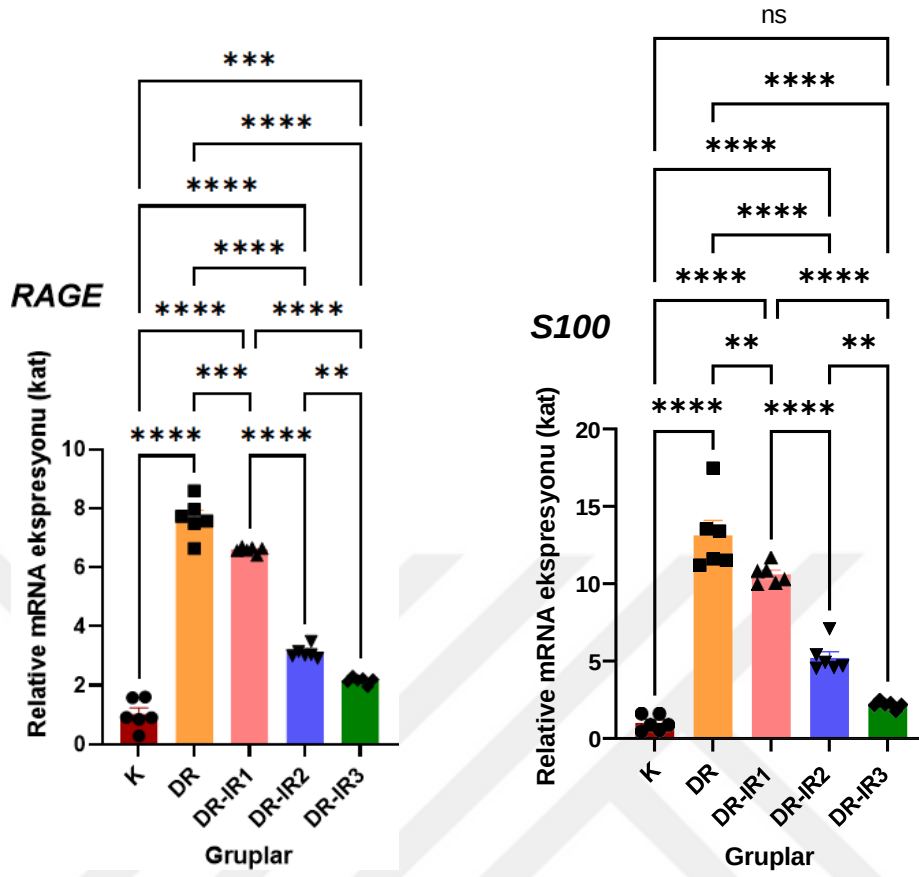
inhibitörü ile birleştirilmiş 500 uL RIPA lizis kokteyl solüsyonunda Daihan 15D yüksek hızlı homojenizatör (27.000 rpm) ile 1 dakikalık aralıklarla 3 kez homojenizasyona tabi tutuldu. Homojenat, 20 dakika boyunca 14.000x g' de santrifüjlendi ve santrifüj işleminden sonra bir mikro hacim spektrofotometrede (Optizen Nano Q, Mecasys, Kore) Protein A280 yöntemiyle protein miktarları belirlendi. Daha sonra ultra saf su ile eşitlenerek denatüre edildi. Denatürasyondan sonra, proteinler bir NuPAGE® Bis-Tris poliakrilamid jeline (%10) yüklendi, elektroforeze tabi tutuldu ve PVDF membrana aktarıldı. Membranlar, TBS tamponunda %5 süt içinde inkübe edildi, RAGE, NOX2, phospho PERK, eIF2- α , phospho-eIF2- α , CHOP ve ATF4 antikorları ile, karanlık bir odada (+ 4 °C) gece boyunca antikor bağlama tamponunda bant yoğunluğuna göre seyreltilerek inkübe edildi. İnkubasyon ardından antikorlar toplandı, yıkanan membranlar antikorların hostuna uygun olarak anti-fare IgG-HRP ve anti-tavşan IgG-HRP içeren ikincil bir antikor solüsyonunda 1 saat inkübe edildi. Yıkanmış ve güçlendirilmiş immünooblottarda protein bantları, bir kemilüminesans Micro ChemiDoc (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, ABD) jel görüntüleme sistemi ile analiz edildi. Bant yoğunluğu GelQuant yazılımı ile belirlendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda Western-Blot ile belirlenen protein ekspresyon değerleri ve qRT-PCR array çalışmalarında $\Delta\Delta C_t$ metodu ile elde edilen relative ekspresyon değerlerinin ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile belirlenmiş ve ortalamaların girdiği gruplar çalışma verilerin homojenlik durumuna göre (Levene testi yapılarak belirlenmiştir) homojen ise Tukey ya da Duncan testi eğer homojen değilse Tamhane's testi ile saptanmıştır. Parametrelerin birbiriyle ilişkileri Pearson korelasyon testi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler üniversitemizde lisanslı SPSS 20 yazılımı ile yapılmış, grafikler Graphpad ile çizilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda ilk basamakta hedefimiz RAGE inhibitörü olan azeliragonun AGE-RAGE ekseninde diyabetik retinopatide retina pigment epitel hücreleri üzerindeki etkisini belirlemektir. Bu amaçla oluşturulan gruplara sırasıyla 100nM, 300nM ve 500nM azeliragon uygulandı. 72 saat maruziyet sonucu hücrelerdeki relatif RAGE gen ekspresyonları kat değişim oranları belirlendi. Aşağıda gruplar arası gen ekspresyon oranları şekil 4’ te gösterilmiştir.



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 4. Göz retinal pigment epitel (ARPE19) hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT- PCR analizi ile belirlenen RAGE ve S100 gen ekspresyon değerleri

RAGE için gruplar arasında yapılan tek yönlü ANOVA analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Gen ekspresyonunun en düşük olduğu grup kontrol grubu olmuştur. Kontrol grubuna göre DR grubunda RAGE ekspresyonu ortalama 7,6 kat, DR-IR1 grubunda ortalama 6,5 kat, DR-IR2 grubunda ortalama 3 kat, DR-IR3 grubunda ise ortalama 2,1 kat artış göstermiştir. Tukey analizinde ise DR grubu ile DR-IR2 ve DR-IR3 arasında RAGE ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.0001$).

S100 geni için gruplar arasında yapılan tek yönlü ANOVA analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). DR grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 13 kat artış

olmuştur. Azeliragon uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttur. En fazla azalış DR-IR3 grubunda olmuş ve kontrole benzer gen ekspresyonu izlenmiştir.

Çalışmamız kapsamında akut ve kronik inflamasyonda görev alan IL-1 β , IL-6, TGF- β , ICAM-1, PAI, LMNB1, TNF- α ve NF- κ B gen ekspresyonlarına ait relatif değişimler incelenmiştir. Şekil 5,6 ve 7’ de ilgili grafikler gösterilmiştir.

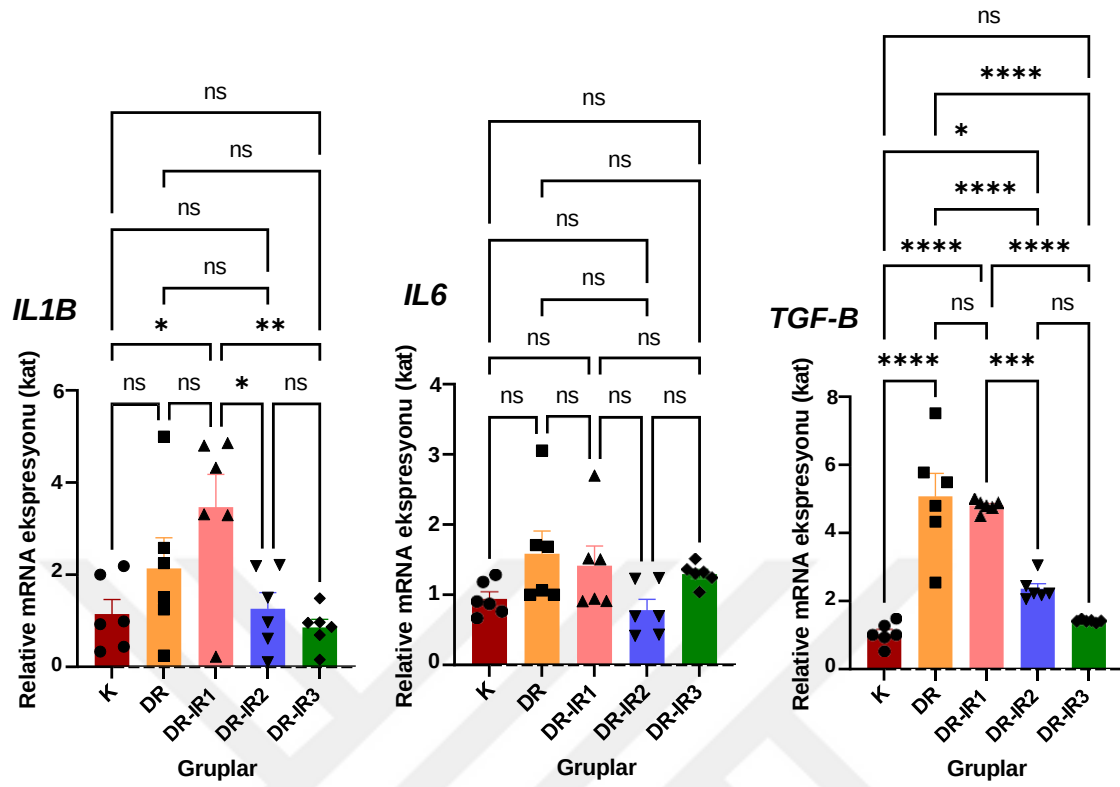
Her bir gen için ayrı ayrı yapılan tek yönlü ANOVA analizi, IL-6 hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. IL-1 β ve IL-6 gen ifadeleri kontrol grubuna göre diyabetik retinopati modelinde daha fazla eksprese olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli değildir. Diğer gen ifadelerinde kontrol grubuna göre DR grubunda belirgin artış vardır ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$).

NF- κ B gen ifadesi analiz edildiğinde K grubuna göre DR grubunda yaklaşık 7,1 kat artış mevcuttur. DR-IR1, DR-IR2 ve DR-IR3 gruplarında sırasıyla yaklaşık 3,9, 2,6 ve 2,5 kat artış olmuştur. Fakat kontrol grubu ile azeliragon uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

TNF- α gen ekspresyonu incelendiğinde DR grubunda K grubuna kıyasla yaklaşık 10,3 kat artış mevcuttur. DR grubu ile DR-IR1 grubu birbirine benzerdir. DR-IR1 grubunda 9,9 kat artış mevcuttur. DR-IR2 ve DR-IR3 gruplarında ise DR grubuna kıyasla gen ekspresyonunda belirgin azalma mevcuttur. Sırasıyla 4,2 ve 1,1 kat artış olmuştur. K grubu ile DR-IR3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

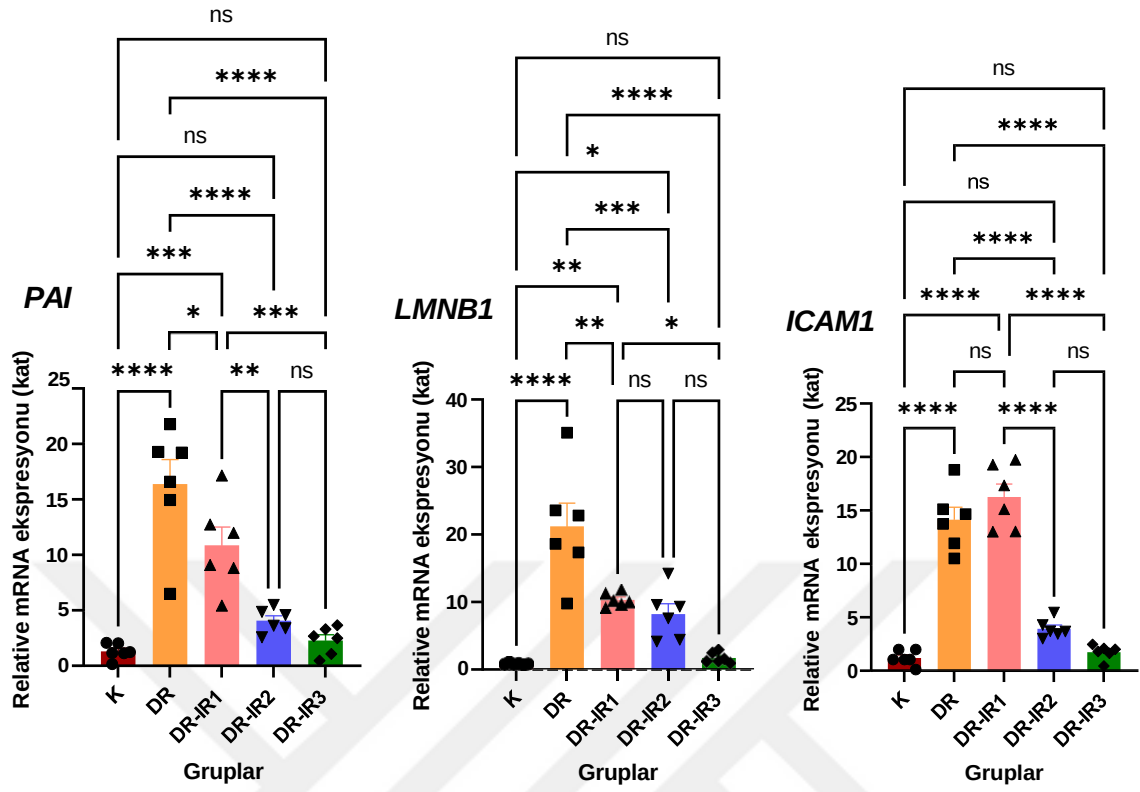
TGF- β gen ifadesi incelendiğinde DR grubunda 5 kat artış olduğu gözlenmiştir. K grubuna en yakın DR-IR3 grubu iken DR-IR2 ile DR-IR3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. DR ve DR-IR1 grupları birbirine benzerdir ($p = 0,9$).

PAI, LMNB1, ICAM-1 gen ekspresyonları DR grubunda kontrole göre belirgin artış göstermiştir ($p < 0.0001$). Sırasıyla yaklaşık 16,3, 21,2 ve 14,1 kat artış mevcuttur. Bu 3 gen için de DR-IR2 ve DR-IR3 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. ICAM-1 için bakıldığında ise DR ile DR-IR1 grupları birbirine benzerdir.



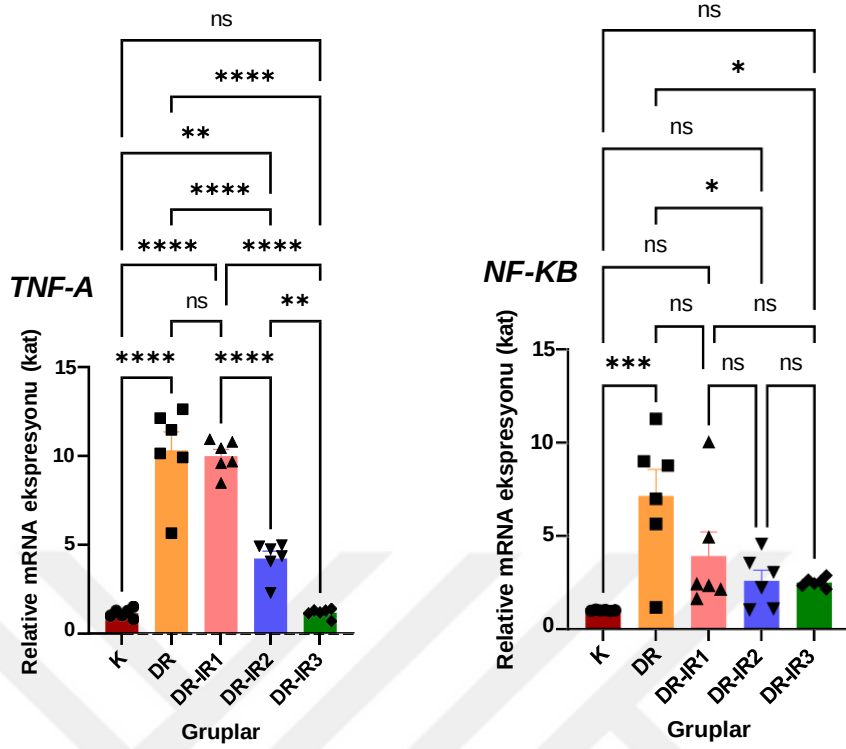
(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 5. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen IL-1 β , IL-6 VE TGF- β genlerinin ekspresyon değerleri



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

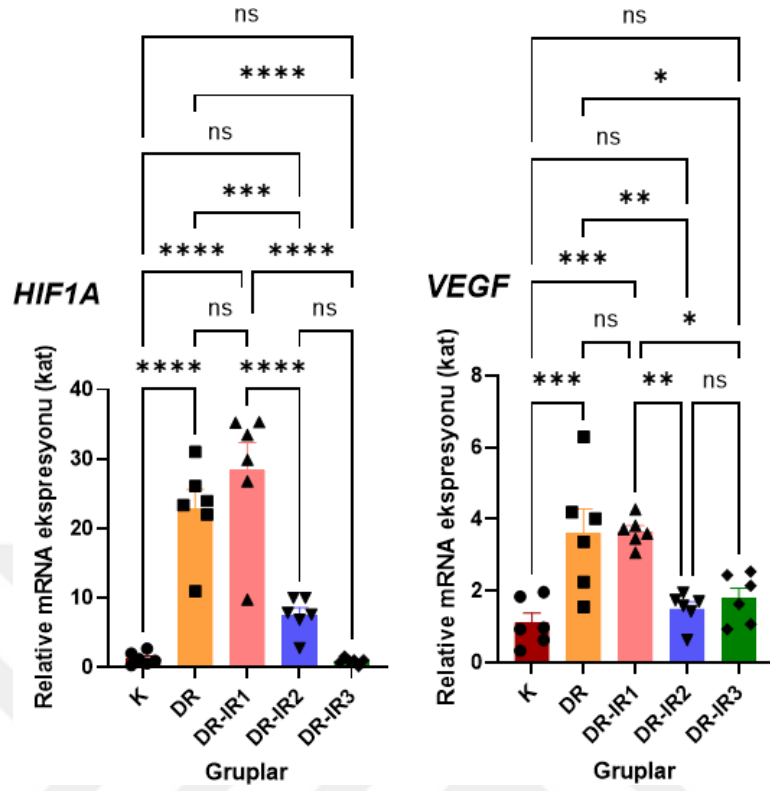
Şekil 6. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen PAI, LMNB1 ve ICAM-1 genlerinin ekspresyon değerleri



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 7. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen TNF- α ve NF- κ B genlerinin ekspresyon değerleri

Çalışmamızda anjiyogenezden sorumlu HIF-1 α , VEGF başta olmak üzere EGFR, MMP3, MMP9, PI3K VE AKT genleri de çalışılmıştır. Gruplar arasındaki relatif gen ekspresyon değerleri Şekil 8 ve Şekil 9’de verilmiştir.

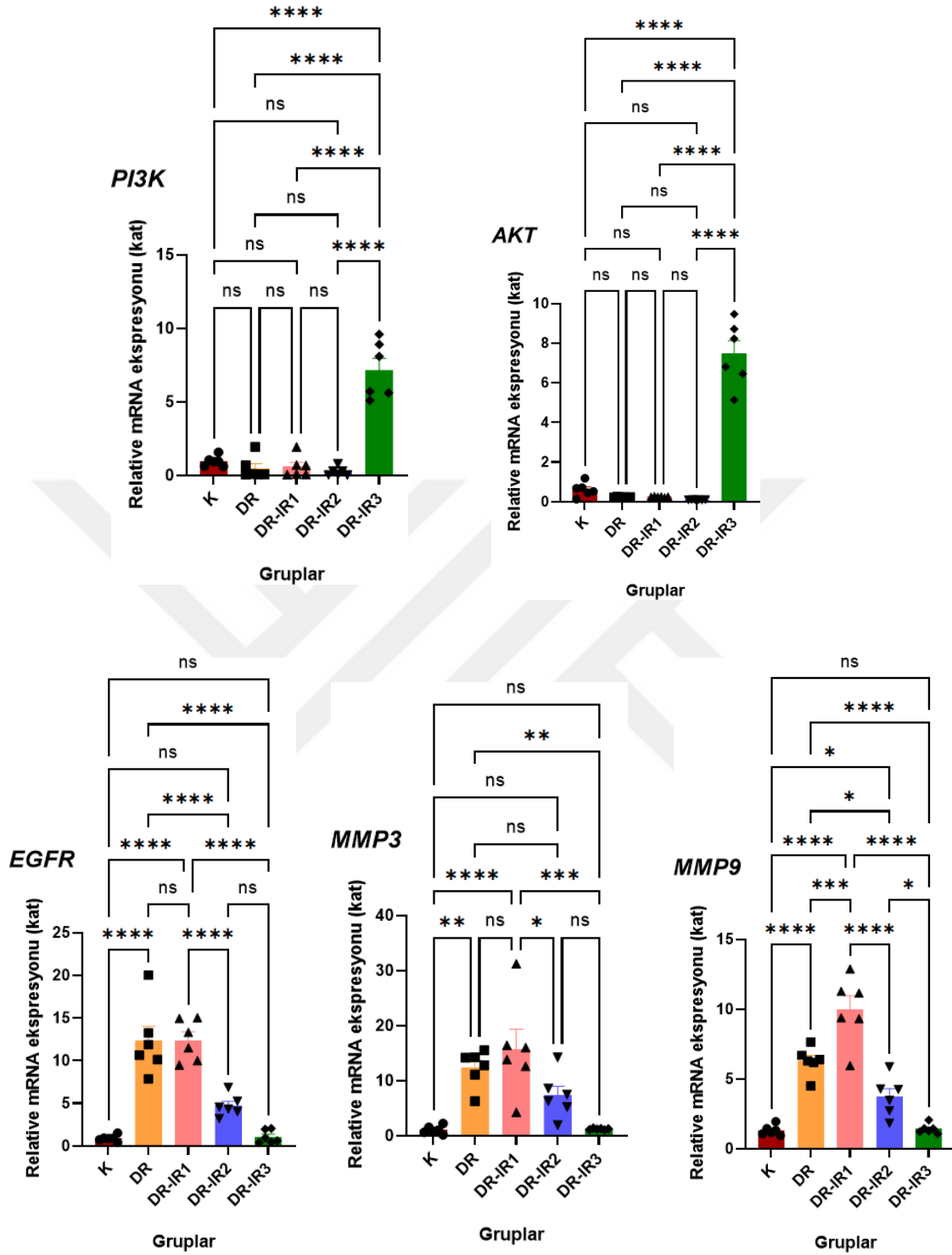


(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 8. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen HIF-1 α ve VEGF gen ekspresyon değerleri

HIF-1 α geni için gruplar arasında yapılan tek yönlü ANOVA analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). DR grubunda 22,8 kat artış mevcuttur. Grafik incelendiğinde K grubu ile DR-IR2 ve DR-IR3 grupları arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Sırasıyla 7,4 ve 0,9 kat artış olduğu belirlenmiştir. En çok artış 28,4 kat ile DR-IR1 grubunda görülmüştür.

VEGF geni için gruplar arasında yapılan tek yönlü ANOVA analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). DR grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 3,6 kat artış olmuştur. DR-IR1, DR-IR2 ve DR-IR3 gruplarında sırasıyla yaklaşık 3,6, 1,5 ve 1,7 kat artış mevcuttur. K grubu ile DR-IR2 ve DR-IR3 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 9. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen anjiyogenez yolağında rol alan diğer genlerin ekspresyon değerleri

Çalışmamızda EGFR, MMP3, MMP9, PI3K VE AKT genleri incelendiğinde her biri için ayrı ayrı tek yönlü ANOVA analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$).

PI3K ve AKT genleri için, en fazla artış DR-IR3 grubunda görülmüş olup kontrol grubuna göre DR-IR3 grubunda yaklaşık 7 kat fazla mRNA ekspresyonu olmuştur. Kontrol ve DR grupları arasında anlamlı bir fark olmamıştır. Fakat DR grubunda kontrole göre gen ekspresyon kat artışında anlamı düzeyde olmasa da azalma görülmüştür.

EGFR, MMP3, MMP9 genleri incelendiğinde, K ve DR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0.05$). DR gruplarında sırasıyla yaklaşık 12,3, 12,3 ve 6,2 kat artış mevcuttur. EGFR, MMP3 gen ekspresyonları incelendiğinde DR-IR2 ve DR-IR3 gruplarının kontrol grubuna benzediği gözlenmiştir. MMP9’ da ise DR-IR3 grubunun kontrol grubuna benzediği gözlenmiştir.

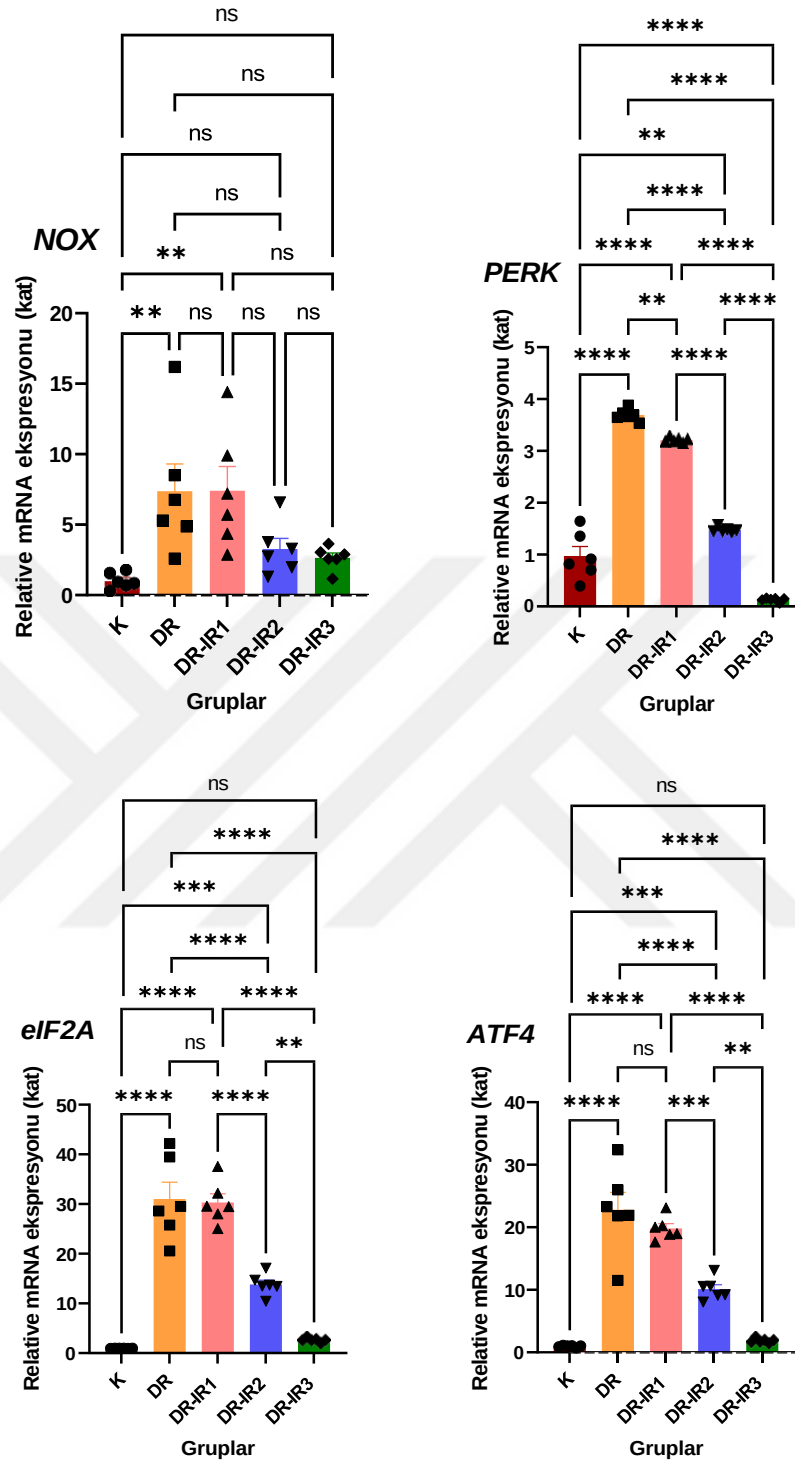
Çalışmamız kapsamında oksidatif stres, katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve ER strese rol alan PERK, eIF2- α , ATF4, CHOP, Nox2, IRE1 α , XBP1, EDEM gen ekspresyonları incelenmiştir. Bu genlere ait relatif gen ekspresyon değişimlerini gösteren grafikler Şekil 9, 10 ve 11’de gösterilmiştir. Her bir gen için ayrı ayrı tek yönlü ANOVA analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PERK hariç diğer genlerde DR grubu ile DR-IR1 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. CHOP ve Nox genleri hariç diğerlerinde DR-IR2 ile DR-IR3 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır.

Nox2 gen ifadesi için bakıldığında K grubuna göre DR grubunda yaklaşık 7,3 kat artış gözlenirken, DR-IR1 grubunda ise 7,4 kat ile en fazla artış izlenmektedir. K grubu ve kalan gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır.

PERK gen ifadesi incelendiğinde 3,6 kat artışla DR grubu en yüksek, 0,13 kat ile DR-IR3 grubu en az artışa sahiptir. Kontrol grubunda ise 0,9 kat artış görülmüştür. Kontrol grubuna en yakın yaklaşık 1,4 kat ile DR-IR2 grubudur.

Çalışmamızda eIF2- α geninde ise kontrol grubuna en yakın DR-IR3 grubu olmuştur. En fazla artış sırasıyla 31 ve 30,3 kat artışla DR ve DR-IR1 gruplarında olmuştur. DR-IR2 grubunda ise 13,7 kat artış olmuştur. DR ile DR-IR1 grupları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır.

ATF4 gen ekspresyonu analiz edildiğinde 22,8 kat ile en fazla DR grubunda artış bulunmaktadır. Kontrole en yakın yaklaşık 1,9 kat artışla DR-IR3 grubudur ve aralarında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p=0.9$). Ayrıca DR ve DR-IR1 grupları birbirine benzerdir.



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

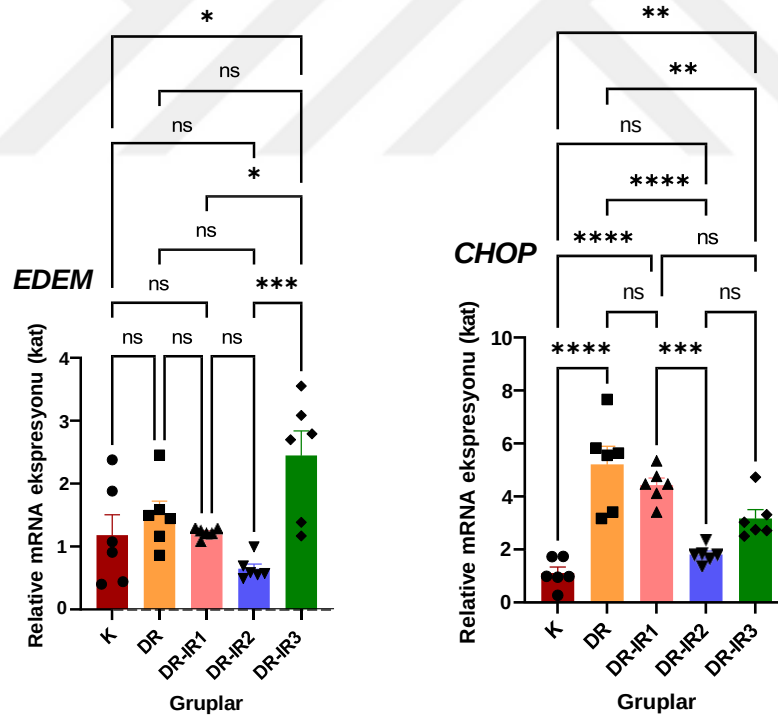
Şekil 10. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen Nox, PERK, eIF2- α , ATF4 genlerinin ekspresyon değerleri

CHOP gen ifadesi incelendiğinde en fazla artış 5,2 kat ile DR grubundadır. K grubu ile DR-IR2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. DR-IR2 grubunda yaklaşık 1,8 kat artış olmuştur. DR-IR2 ve DR-IR3 grupları arasında anlamlı fark yoktur.

IRE1 α için bakıldığında en fazla gen ekspresyonu DR-IR3 grubunda iken en az DR-IR2 grubundadır. Kontrol grubu ile DR grubu arasında fark bulunmamaktadır ($p=0.12$). Ek olarak DR, DR-IR1 ve DR-IR2 gruplarında kontrol grubuna göre gen ekspresyonunda azalma olmuştur. Fakat istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir.

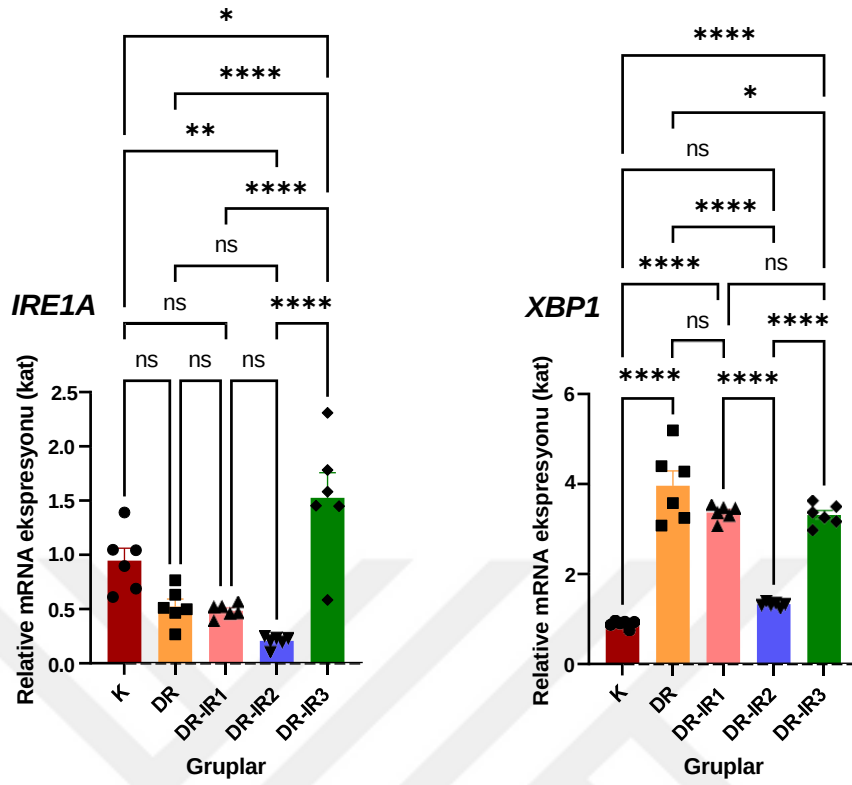
XBP1 geni incelendiğinde kontrol grubuna en yakın 1,3 kat artış ile DR-IR2 grubudur ve aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır. En fazla artış 3,9 kat ile DR grubudur. DR-IR1 ile DR-IR3 arasında da anlamlı fark bulunmamaktadır. Aynı şekilde DR ile DR-IR1 grupları arasında da anlamlı fark yoktur.

EDEM gen ekspresyonu için gruplar arası bakıldığında en çok artış DR-IR3 iken K ve DR grupları arası anlamlı fark bulunmamaktadır. DR-IR2 grubu ise 0,6 kat ile kontrol grubundan az artış göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir.



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) $n=6$, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 11. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen EDEM ve CHOP genlerinin ekspresyon değerleri



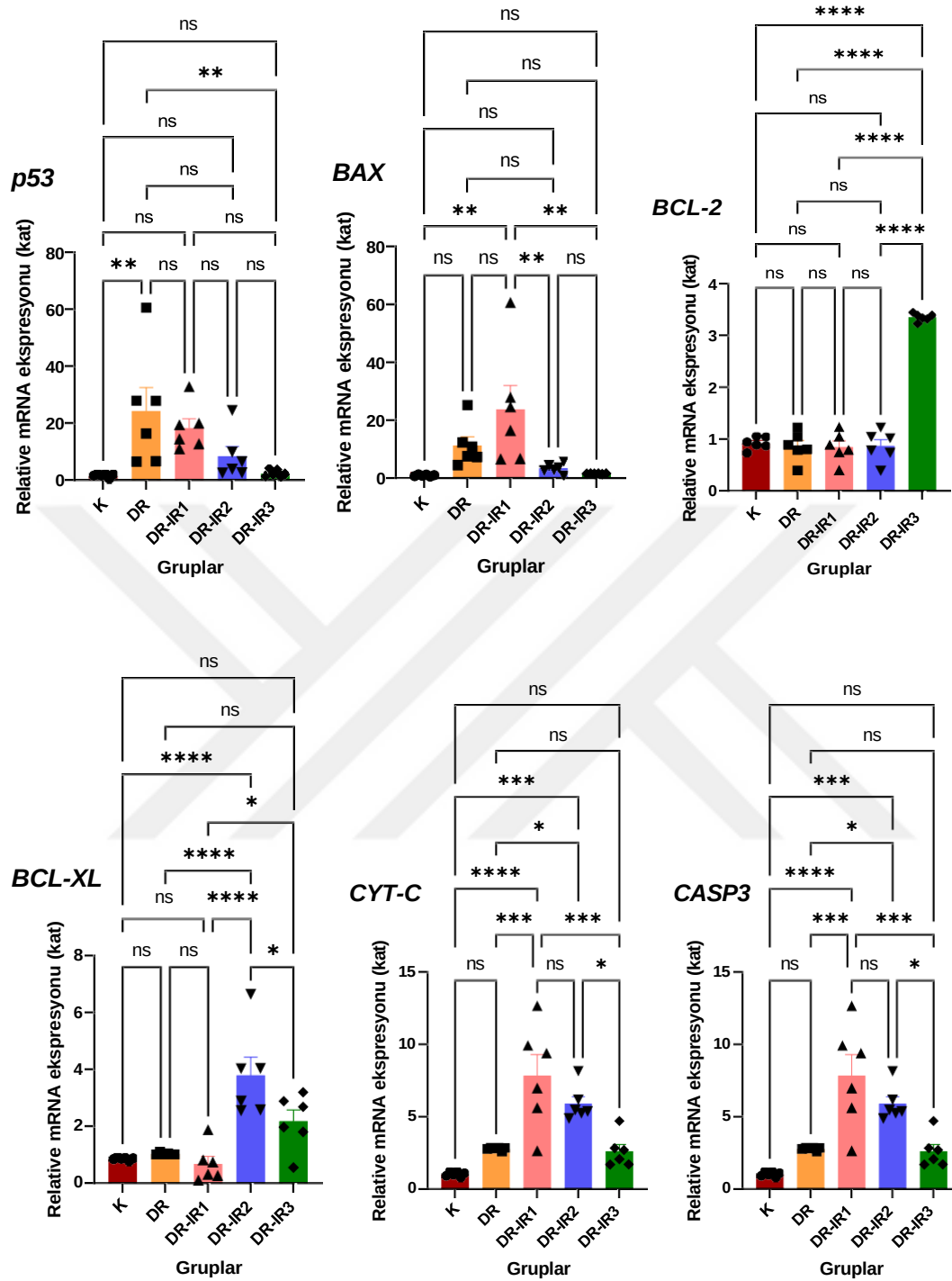
(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 12. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen XBP1 ve IRE1 α genlerinin ekspresyon değerleri

Son olarak çalışmamız kapsamında ekstrinsik ve intrinsik apoptozis yolağı genleri de çalışılmıştır. Çalışılan genler arasında p53, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Casp 3, Cyt-c genleri bulunmaktadır. Bu genler için gruplar arası mRNA gen ekspresyon değişimleri şekil 12’de gösterilmiştir. Bu genlerden Bcl-2 ve Bcl-xL anti-apoptotik özellik gösterirken p53, Bax, Casp 3 ve Cyt-c apoptozisi indüklemektedir (108).

Bcl-2 incelendiğinde K ve DR grupları arasında anlamlı fark izlenmedi. azeliragon uygulanan gruplarda sırasıyla 0,8, 0,8 ve 3,3 kat artış olduğu görülmüştür. DR-IR3 grubunda diğer gruplarda farklı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış mevcuttur.

Bcl-xL geni incelendiğinde ise yine K ve DR grupları arasında anlamlı fark izlenmedi. DR-IR2 grubunda yaklaşık 3,7 kat ile en fazla artış görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla sadece DR-IR3 grubunda anlamlı fark izlenmiştir.

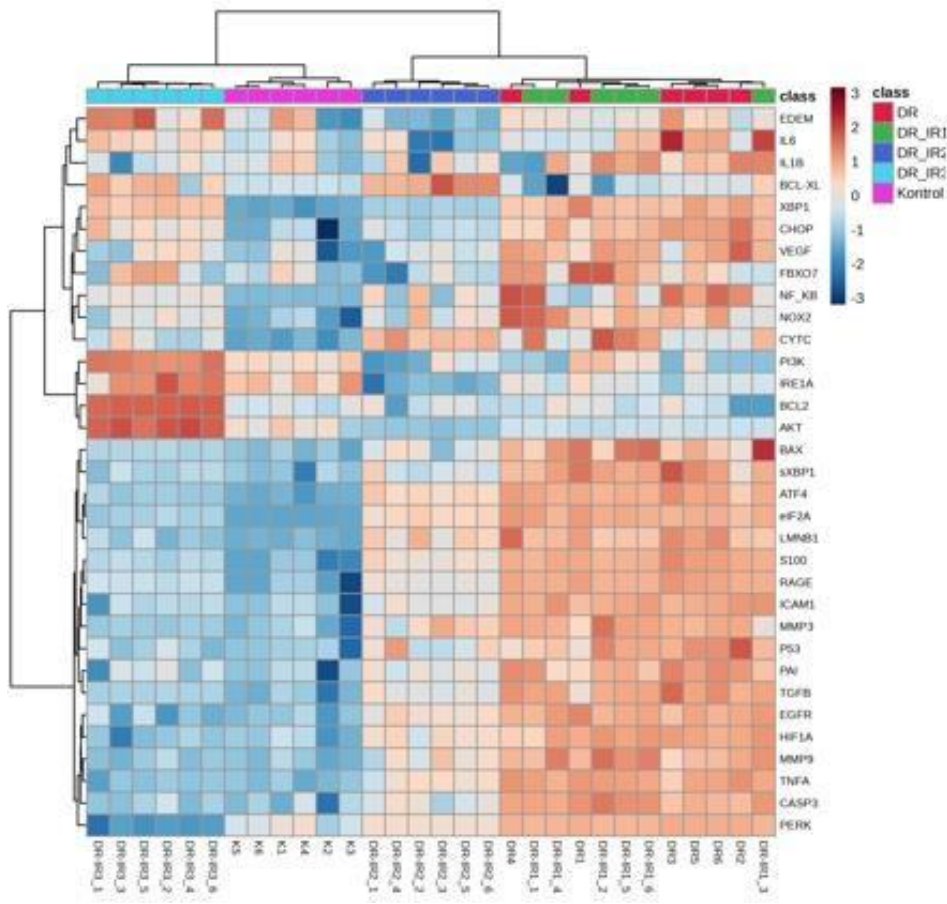


(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 13. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında qRT-PCR analizi ile belirlenen apoptozis yolağı genlerinin ekspresyon değerleri

Kontrol ve DR grupları karşılaştırıldığında p53 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark izlenirken Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3 ve Cyt-c genlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. P53 geni için DR grubunda yaklaşık 24,3 kat artış olmuştur. Ayrıca p53 gen ekspresyonunda DR grubuna göre DR-IR1, DR-IR2 ve DR-IR3 gruplarında gen ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Fakat istatistiksel olarak sadece DR-IR3 grubundaki azalma anlamlıdır.

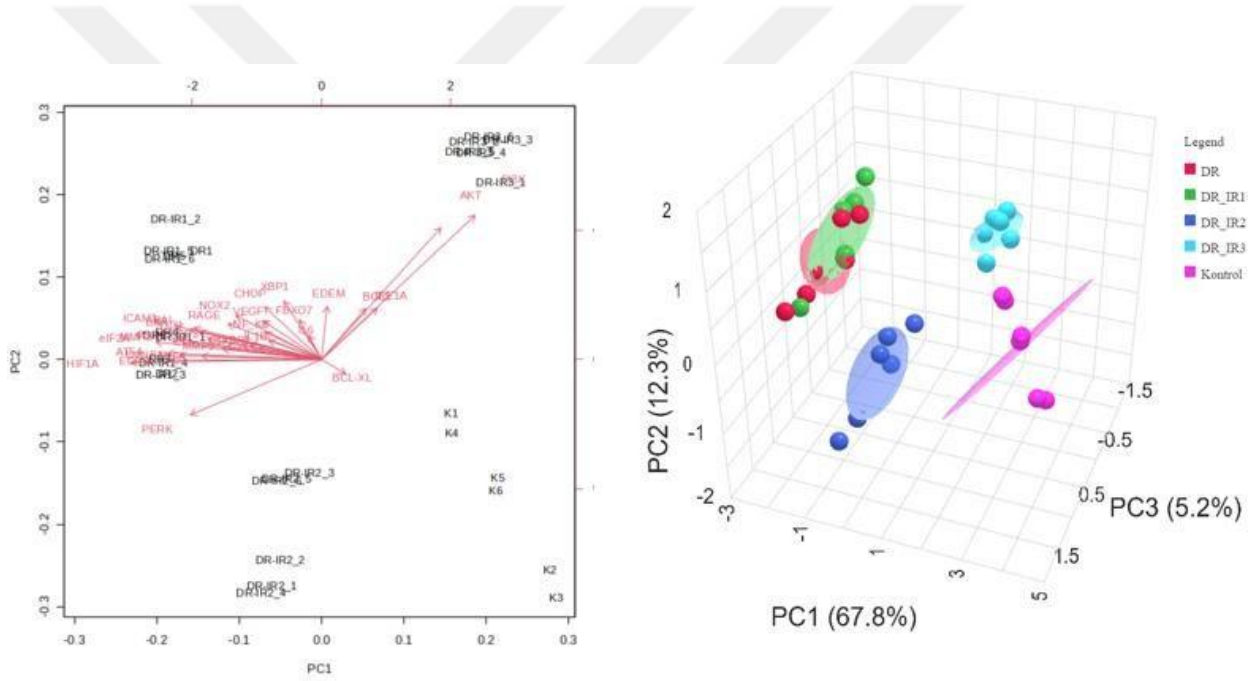
Casp-3 ve Cyt-c genleri analiz edildiğinde en fazla artış yaklaşık 7,8 kat artış ile DR-IR1 grubunda olmuştur. Kontrol grubuna en yakın DR-IR3 grubu olduğu görüldü. DR ve K grupları arasında da anlamlı fark oluşmamıştır.



(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$

Şekil 14. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında Hierarchical Cluster yöntemiyle ayrılan grupların, Principal Component analizi ve Heatmap gen ekspresyon analizi kullanılarak oluşturulan Heatmap haritası

Çalışmamızda ayrıca bütün genler tümsel olarak da analiz edilmiştir. Şekil 13’ de gösterilen Heatmap gen ekspresyon analiz haritası incelendiğinde, özellikle kontrol grubunun diğer uygulama ve diyabetik retinopati gruplarından tamamen farklı bir bölgede gruplandığı ve kontrol grubuna en yakın grubun en yüksek doz azeliragon ile tedavi edilen grup olduğu görülmüştür. En uzak noktada ise DR ve DR-IR1 grupları yer almaktadır. Bu gruplarda özellikle ER stres genleri, XBP1, VEGF ve CHOP genlerinin çok güçlü bir şekilde aktive olduğu görülmüştür. Aynı şekilde apoptoz, inflamasyon ve hipoksiyle ilgili genlerinde aktive olduğu görülmüştür. Bunun tam tersi olarak K ve DR-IR3 gruplarında tüm ER stres genlerinin önemli miktarda azaldığı hipoksi, MMP9 ve Casp3 eksenini olan bölgede de genlerin önemli düzeyde düştüğü ve kontrole yaklaştığı görülmektedir.

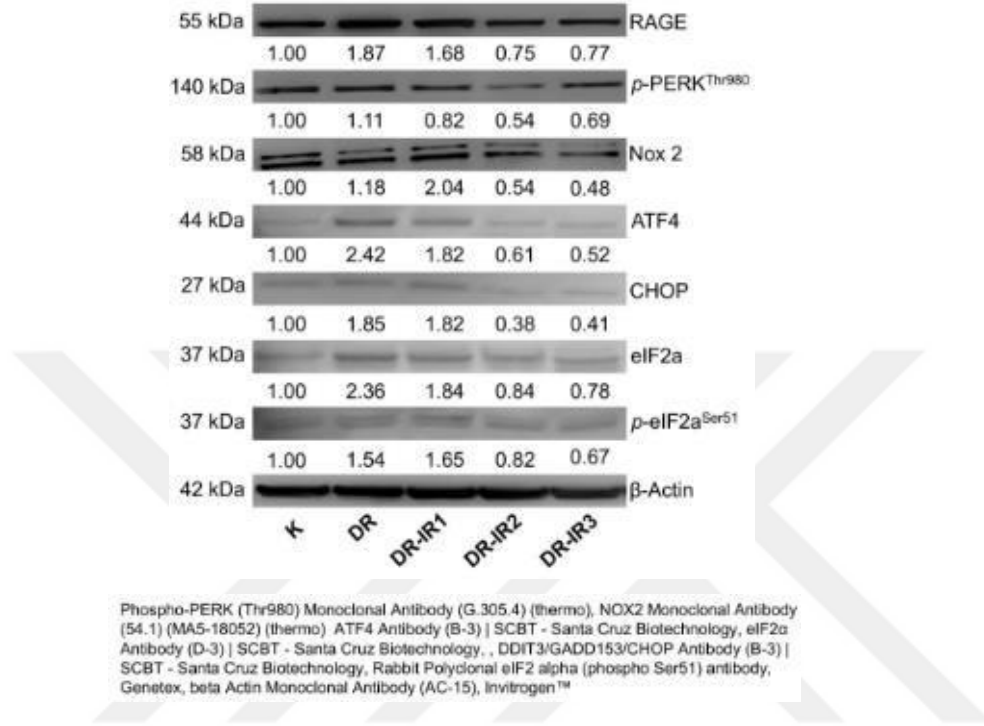


(Tüm veriler GAPDH, FBX07 ve β -aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.) n= 6, veriler $\text{ort} \pm \text{SH}$ * veriler istatistiksel olarak farklıdır. Tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 15. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında çeşitli genlerin temel bileşen analizi kullanılarak oluşturulan grafiği ve grupların 3 boyutlu haritası

Yapılan temel bileşen analizinde en etkili faktörlerin AKT, PI3K, HIF-1 α ve PERK gruplarının oluşturduğu ve bu genlerin etkisi altında grupların birbirinden çok net ayrıştığı görülmektedir. 3 boyutlu haritaya bakıldığında ayrıışmayan tek grubun özellikle DR ve DR-IR1

gruplarında olduğu görülmüştür. Bu gruplar birbirleri ile iç içe geçmiş durumdadır. DR-IR3 grubunun 3 boyutlu temel bileşen düzleminde görüldüğü gibi kontrol grubu ile bire bir eşleşme bile en yakın noktaya örnekleri getirdiği görülmektedir (Şekil 14).



(Tüm veriler β-aktin mRNA ekspresyonları kullanılarak multiple kontrol yöntemi ile normalize edilmiş ve kontrole kıyasla kat artış olarak verilmiştir.)

Şekil 16. ARPE19 hücre serilerinde kontrol (K), diyabetik retinopati (DR), sırasıyla 100, 300 ve 500 nM azeliragon uygulanmış (DR-IR1, 2 ve 3) deney gruplarında RAGE, Nox2, PERK, ATF4, CHOP, eIF2α, p- eIF2α genlerine ait Western-Blot analizi

Western-Blot protein analizi incelendiğinde sırasıyla RAGE, Nox2, PERK, ATF4, CHOP ve eIF2α ve p-eIF2α proteinleri çalışılmıştır. Kontrol grupları kat artışı 1 kabul edilmiş olup, diyabetik retinopati grubunda sırasıyla 1,87, 1,11, 1,18, 2,42, 1,85, 2,36 ve 1,54 kat artış izlenmiştir. Ayrıca çalışma sonuçlarımızı destekler şekilde DR-IR2 grubunda sırasıyla 0,75, 0,54, 0,54, 0,61, 0,38, 0,84, 0,82 kat ve DR-IR3 grubunda sırasıyla 0,77, 0,69, 0,48, 0,52, 0,41, 0,78, 0,67 kat protein ekspresyonunda azalma olmuştur. DR-IR1 grubunda ise çalışma bulgularımıza paralel şekilde DR grubuna yakın protein ekspresyon kat artışları olduğu görülmüştür (Şekil 15).

TARTIŞMA

Diyabetik retinopati, çeşitli patolojik yollardan oluşan çok faktörlü bir hastalıktır ve RAGE-AGE eksenini yalnızca bunlardan biridir. Bununla birlikte son 20 yılda diyabetik retinopatinin başlatılması ve gelişmesinden sorumlu moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmak için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Retinal hücrelerde AGE birikimi ve RAGE pro-oksidan/pro-inflamatuar sinyalleşmesi, diyabetik retinopatide şüphesiz önemlidir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda hiperglisemi ile tetiklenen ER stresin diyabetik retinopatide vasküler ve nöronal hasarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (109). Bu çalışmamızda in vitro diyabet modeli oluşturulan insan retinal pigment epitel hücrelerinde RAGE inhibitörü azeliragonun endoplazmik retikulum stres aracılı diyabetik retinopatideki etkilerini belirlemek amacıyla ER stres merkezli çeşitli gen ekspresyonları incelenmiştir. Böylece retina pigment epitel hücrelerinde diyabet/inflamasyon modelinde RAGE inhibitörü azeliragonun terapötik etkisi sırasıyla RAGE, AGE, Nox eksenini ve aşağı akış yönünde yer alan oksidatif stres ve apoptoz sinyalleri ve ayrıca DRP patogenezinde ER stres ile tetiklenen çeşitli yollar ve bunlardan sorumlu genler araştırılmıştır ve RAGE hedefli terapinin diyabetik retinopatide etkinliği ortaya konmaya çalışılmıştır.

RAGE, ileri glikasyon son ürünleri (AGEs), amiloidojenik peptitler/poliipeptitler, amfoterinler ve S100/kalgranülinler gibi çeşitli ligandlarla etkileşime girebilen hücre yüzeyinde bulunan bir reseptördür. Kronik reseptör-ligand etkileşimi durumunda hücresel yıkımı başlatan süreçleri tetiklemektedir (110). Daha önce yayınlanan pek çok çalışmada diyabetik hastalarda RAGE ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Örneğin, Barile ve ark. (111) yaptıkları çalışmada diyabetik retinopatili fare modelleri kullanmış ve RAGE up-regülasyonunu göstermişlerdir.

RAGE eksenini bloke edildiğinde ise nörovasküler disfonksiyonun azaldığını göstermişlerdir. Ceriello (112) yaptığı çalışmada RAGE-AGE etkileşiminin ‘metabolik hafıza’ olarak adlandırılan normal glisemik koşullarda bile diyabetik hasar mekanizmalarının devam etmesine neden olan bir süreci tetiklediğini iddia etmektedir. Yakın zamanlı Khalid ve ark. (113) yaptıkları çalışmada da RAGE-AGE ekseninin bloke edilmesinin diyabetin kronik komplikasyonlarının önlenmesinde önemli bir tedavi stratejisi olabileceğini savunmaktadırlar. Benzer şekilde çalışmamızda da diyabetik hücrelerde RAGE ekspresyonunun kontrol grubuna göre ortalama 7,6 kat arttığı görülmüştür. Böylece bu artış, çalışmamızla da desteklenmiş ve RAGE/AGE ekseninin önemi bir kere daha vurgulanmıştır. Ayrıca Western-Blot analizi sonuçlarımızda bizim ve önceki çalışmaların bulgularıyla uyumlu olarak diyabetik retinopatideki RAGE artışını desteklemektedir.

RAGE/AGE aksı diyabet dışında, Alzheimer, travmatik beyin hasarı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. RAGE-AGE ekseninin öneminin anlaşılması glikasyon yoluna müdahale eden tedavilerin araştırılmasına yol açmıştır. AGE oluşumunu önleyen ve RAGE inhibitörü moleküller araştırılmıştır. Olası yan etkiler nedeniyle bunların bir kısmının çalışması durdurulmuştur (114). Fakat çeşitli alanlarda RAGE-AGE ekseninin hedef alan tedavi araştırmaları halen devam etmektedir. Bunlardan biri de azeliragon ve FPS-ZM1 gibi RAGE inhibitörleri ile ilgili klinik araştırmalardır. Henüz RAGE inhibitörleri arasında FDA onayı alan bileşik yoktur (115).

Literatüre bakıldığında RAGE inhibitörü olan azeliragonun diyabetik retinopatideki etkinliğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Azeliragon molekülü için Alzheimer hastalığı ve diğer diyabetik komplikasyonlar başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda çalışmalar devam etmektedir (116). Ma ve ark. (117)’ları diyabetik fare modelinde yaptıkları çalışmada azeliragonun diyabetik nöropatide etkili olduğunu ve pregabalin’e benzer antinosiseptif etkisinin bulunduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda, ilk defa azeliragon molekülünün diyabetik retinopatideki etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen veriler ise diyabetik retinopati açısından umut vericidir.

İnflamasyon, canlının bağışıklık sisteminin bir parçası olup, canlıları her türlü yıkıcı ve zararlı etkenlere karşı koruyan bir savunma sistemidir. Fakat kişinin kendi dokularına karşı geliştiği, kontrol edilemediği ve kronikleştiği zaman diyabet, obezite ve kanserin de içinde olduğu çeşitli patolojilere neden olmaktadır (118). Vücuttaki pek çok metabolik yolak da inflamasyon ile ilişkilidir. Bunlardan biri de ER stresidir. İnflamasyon ER stresi tetiklemektedir

ve UPR yanıtındaki kusurlar veya yetersizlik diyabet gibi birçok hastalığının gelişimine katkı sağlamaktadır (119).

Diyabetik retinopatide kronik düşük dereceli inflamasyonun varlığı yapılan pek çok hayvan modelinde ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Hatta günümüzde tedavide yaygın kullanılan ve 2014 yılında FDA tarafından onay alan deksametazon implant tedavisinin etki mekanizması da inflamasyonun baskılanması üzerinedir ve DR tedavisinde anti-inflamatuar ajanlarla ilgili yeni araştırmalar devam etmektedir (120). İnflamatuar sitokinler, adezyon molekülleri ve kemokinler inflammatuar sürecin başlıca bileşenleri ve birbirlerinin tamamlayıcısıdır. Diyabetik retinopatideki inflamasyon varlığını gösteren çalışmalardan biri de Yuuki ve ark. (41) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada DR tanılı hastaların vitreus sıvısında proinflammatuar sitokinlerin (IL-6, IL-8 ve TNF- α) arttığını göstermiştir. Başka bir çalışmada ise tip 2 DM hastalarının serum ve vitreusları incelenmiş. Sonuç olarak proliferatif diyabetik retinopatisi olan hastalarda ICAM, VCAM, IL-6 ve TNF- α düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (121). Zhang ve ark. (122) yayınladıkları makalede hipergliseminin AGE ve ROS oluşumu ve nitrik oksit sentaz (NOS) düzensizliğine yol açtığını, bu durumun ise NF- κ B' yi aktive ettiğini belirtmişler. NF- κ B' nin ise aşağı akış yolunda sitokin ve kemokinlerin salınımında görev aldığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da inflamasyonda görev alan TNF- α , TGF- β , PAI, LMNB1, ICAM-1 ve NF- κ B moleküllerinin gen ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla diyabetik retinopati grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. Bu artış önceki çalışmalarla uyumludur. Fakat çalışmamızda farklı olarak IL-1 β ve IL-6 diyabetik gruplarda artmakla beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diyabetik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada da yüksek glikoz seviyesinin ER stresi tetiklediği, ER stres ile aktive olan ATF4 yolağının TNF- α , ICAM-1, NF- κ B ve VEGF salınımını arttırarak inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir (123). Bu çalışmanın sonuçları da bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Literatürdeki pek çok çalışmada diyabet ve inflamasyon birlikteliğinden bahsedilmiştir. Örneğin bir çalışmada diyabetik retinopatide mikrogliya hücrelerinin inflamasyonda rol aldığı ve oluşan inflammatuar sürecin nörodejenerasyona yol açtığı savunulmaktadır (124). Ek olarak birçok çalışmada da inflamasyonu baskılamanın DR tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olabileceğinden bahsedilmiştir (124-126).

Çalışmamızda azeliragon tedavisinin, orta ve yüksek doz uygulandığı in vitro diyabetik retinopati gruplarında (DR-IR2 ve DR-IR3) inflamasyonda görevli bu genler üzerindeki inhibitör etkisi açıkça görülmüştür. Bu durum AGE/RAGE ekseninin inflammatuar süreçteki

önemini ve azeliragon tedavisinin ER stres üzerinden inflamasyonu baskılamada etkili olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca çalışmamızda S100 proteinleri de çalışılmıştır. S100 protein ailesi birbirine benzeyen bilinen 25-30 üyeden oluşmaktadır. Hücrelerde çoğalma, farklılaşma, inflamasyon, göç ve/veya metastaz, apoptoz, Ca^{2+} dengesi ve enerji metabolizması dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonda görev almaktadırlar (127). S100 proteinleri, RAGE için bir ligand olup, pro-inflamatuar kaskadları aktive eder (128). S100 proteinleri, ek olarak normal şartlarda nöral hücreleri destekler (129). Bir çalışmada S100 proteinlerindeki değişimin glokomda nöral hücre kaybı ile ilişki olduğu belirtilmiştir (130). Ayrıca Kuehn ve ark. (131) çalışmalarında S100 artışının apoptozisi uyardığını bildirmişlerdir. Önceki çalışmalardan diyabet hastalığında S100 proteinlerinin arttığı bilinmektedir (132, 133). Çalışma bulgularımız önceki bilgileri desteklemektedir. DR grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 13 kat artış olmuştur. DR-IR3 grubu ise kontrol grubuna benzemektedir. Bu sonuçlar da azeliragonun inflamasyonu ve apoptozisi baskılamadaki etkisini destekler niteliktedir.

Dokularda oksijenin azalması durumunda HIF-1 α (hipoksiye duyarlı faktör-1 α) artar. HIF-1 α , hipoksi durumunda eritropoetin, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), glikolitik enzimler gibi hücresel homeostazı yeniden sağlamak için gerekli ürünlerin kodlanmasında görevli bir transkripsiyon faktörüdür (134). Çalışmamızda oluşturulan diyabetli hücre modellerinde de HIF-1 α gen ekspresyonunun belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda VEGF' in de arttığını görmekteyiz. Bu durum diyabetin hipoksiye neden olduğunu doğrular niteliktedir. Yapılan bir hayvan deneyi çalışmasında HIF-1 α ' dan yoksun diyabetik farelerde neovaskülarizasyon ve ödemin azaldığı görülmüştür (135). Yine başka bir çalışmada ise HIF-1 α inhibisyonunu olası terapötik etkisinden bahsedilmektedir (136). Çalışmamızda da orta ve yüksek doz azeliragon uygulanan gruplarda HIF-1 α gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır.

Ayrıca HIF-1 α dışında ileri glikasyon son ürünlerinin, hipergliseminin, TNF- α gibi pek çok molekülünde VEGF molekülünü uyardığı bilinmektedir (137). Ayrıca ER stres ile aktive olan UPR yanıtının da VEGF üretimini arttırdığı bilinmektedir (138). ARPE-19 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, ER stres ve UPR' de rol alan ATF4 (transkripsiyonu aktive edici faktör 4) aktivasyonunun VEGF ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (139). Li ve ark. (140) yaptıkları hayvan modelinde kimyasal şaparon 4-fenil bütirik asit tarafından ER stresinin inhibisyonun VEGF salınımını azalttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da önceki çalışmaları destekler nitelikte diyabetik grupta hem ATF4 hem de VEGF ekspresyonu artmıştır. Azeliragon

uygulanan gruplarda VEGF, HIF1- α ve ATF4 azalmıştır. ATF4 için Western-Blot analizimiz de çalışmamızı desteklemektedir. Ayrıca VEGF ekspresyonunun HIF-1 α ile eşit oranda azalmaması VEGF salınımında RAGE/AGE eksenini dışında bağımsız başka yollarında etkili olduğunu düşündürmektedir.

PI3K/AKT yolu hücre çoğalması, apoptozu, hücre farklılaşması ve göçünde önemli rol oynar. VEGF gibi çeşitli büyüme faktörleri ve hipoksi durumunda PI3K/AKT/mTOR yoluyla aktif hale gelir ve hücrenin sağkalım ve anjiyogenez ve protein sentezinde rol alır (141). Ayrıca PI3K/AKT yolunun aktivasyonu mitokondriyal apoptozda görevli sitokrom c'yi azaltıp anti-apoptotik Bcl-2'yi arttırmaktadır (142). İlginç şekilde yüksek doz (500 nM) azeliragon uygulanan grupta PI3K ve AKT gen ekspresyonları diğer anti-anjiyogenezde görev alan genlere kıyasla çok belirgin olarak artmıştır. Bu durum azeliragonun apoptozu baskılayıcı etkisinin anti-anjiyogenez etkisinden daha fazla olması ile açıklanabilir. Fakat bu teoriyi desteklemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmamızda yüksek doz azeliragon uygulanan grupta PI3K/AKT ekseninin artışına uygun olarak sitokrom c azalmış ve Bcl-2 artmıştır. Bu durum da önceki çalışmaları doğrulamaktadır.

Hiperglisemi PI3K/AKT eksenini inhibe eder (143, 144). Örneğin 2020'de yayınlanan bir çalışmada streptozotisin ile diyabetik sıçan modeli oluşturulmuş ve bir kısmına doğal bir molekül olan kurkumin uygulanmış. Çalışma sonuçlarında bizim çalışmamıza benzer şekilde diyabetik hayvanlarda PI3K ekspresyonu ve AKT fosforilasyonunun azaldığı, kurkumin uygulananlarda ise kontrol grubuna yakın artış olduğu gösterilmiş ve bu yolun artışının kalp kası hücrelerinde oksidatif stresi ve apoptozu azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (145). Başka bir yakın zamanlı çalışmada ise yine diyabetik farelerde PI3K ve AKT fosforilasyonunun azaldığı ama finerenon tedavisinin diyabetik nefropatide PI3K/AKT/eNOS yoluyla üzerinden mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği ifade edilmiştir (146). Bu sonuçlarda bizim çalışmamızı desteklemektedir. Kesin olmamakla birlikte PI3K/AKT yolunun inhibisyonunun ROS üzerinden ER stresi tetiklediği düşünülmektedir (147). Fakat bizim çalışmamız bu teoriyi doğrulayamamaktadır. Bu nedenle ER stres ve PI3K/AKT ilişkisiyle ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Literatür tarandığında daha önce yapılan çalışmalarda diyabetik hücrelerde oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Örneğin Allen ve ark. (148) yaptığı çalışmada proksimal tübüler epitel hücrelerinde hiperglisemi durumunda reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) arttığı ve oluşan oksidatif stresin kaspazlar aracılığıyla apoptozu tetiklediği belirtilmiştir. Çetiner ve ark. (149)'nın çalışmasında da diyabet ve oksidatif stres birlikteliğinden bahsedilmiştir.

Fazladan elektron içeren oksijen molekülü olan süperoksit ve türevleri toplu olarak reaktif oksijen ürünleri (ROS) olarak adlandırılır (150, 151). ER stres sonucu açığa çıkan ROS, aynı zamanda ER stresi de tetiklemektedir ve kısır döngü meydana gelmektedir (152). ER stres de katlanmamış protein yanıtını (UPR) tetikler (153). UPR yanıtında rol alan XBP1 ekspresyonunun artması antioksidan olan katalaz ve süperoksit dismutaz üzerinden ROS üretimini azaltmaktadır (154). Fakat çalışmamızda bu antioksidan enzimlere bakılmamıştır. Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla hem diyabetik retinopati modeli grubunda hem de azeliragon uygulanan DR-IR1, 2 ve 3 gruplarında XBP1 düzeyi artmıştır. Bu durum azeliragonun oksidatif stresi azaltıcı yönde etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

NAPH oksidaz (Nox) enzim ailesi ise ROS üretiminde görev alır (151). Çalışmamızda da önceki çalışmalara paralel şekilde Nox gen ekspresyonunun diyabetik ARPE-19 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Western-Blot analizimizde de Nox2 artışı desteklenmektedir. Hatta Reutens ve ark. (155) diyabetik nefropatide Nox inhibitörü GKT137831 molekülünün etkinliği ile ilgili faz 2 aşamasında klinik çalışmalarını sürdürmektedir. Çalışmamızda orta ve yüksek doz azeliragon uygulanan gruplarda Nox ekspresyonunda azalma olduğu görülmektedir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum RAGE/AGE eksenini bloke etmenin Nox enzimi üzerinden tek başına oksidatif stresi azaltmada yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Fakat çalışmamızda hücrelerdeki oksidatif stres doğrudan değerlendirilmemiştir. Azeliragonun oksidatif stres üzerine etkisini değerlendirmek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Hücrelerin açlık, hipoksi, kronik hiperglisemi, ROS gibi faktörlere maruz kalınca hayatta kalmak için metabolik aktivitelerinde değişiklikler olur. Bu değişiklikler, proteinlerin katlanma kapasitesinin aşılması, endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinlerin birikmesine ve ER strese neden olur. ER stresin artmasının ve retina hücrelerinde katlanmamış protein yanıtı (UPR) aktivasyonunun, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, vasküler sızıntı ve anjiyogenez gibi diyabetik retinopatideki ana patofizyolojik olaylarda görev aldığı bilinmektedir (152). Hafif ve geçici ER stresi adaptif UPR ile aşılabılırken, kronik ER stresi pro-inflamatuar ve pro-apoptotik sinyal yollarını uyarak apoptozise, inflamasyona, artmış VEGF üretimine ve sonuçta kan-retina bariyerinin yıkımına yol açar. Bu durum retinal neovaskülarizasyon ve nöronal dejenerasyon gibi görmeyi olumsuz etkileyen komplikasyonlara yol açar (152, 153, 156).

Katlanmamış protein yanıtı (UPR) oluşmasında ER zarında bulunan PERK, IRE1 ve ATF6 reseptörleri sorumludur. PERK/ATF4/CHOP yolağı, IRE1 α /XBP1 yolağı ve ATF6 yolu

aktive olarak apoptozisi tetikler. PERK reseptörünün uyarılması ile eIF-2 α fosforile olur ve protein sentezini azaltır. PERK ayrıca antioksidan sistemi de uyarır. ATF4 ve ATF6 ile uyarılan CHOP ayrıca pro-apoptotik olan puma, Noxa, Bim ve Bax gibi molekülleri uyarırken, Bcl2, Bcl-xL, MCL-1 gibi anti-apoptotik molekülleri inhibe ederek mitokondriyal apoptozisi de tetikler (157). Yapılan literatür çalışmalarında ER stres ile indüklenen apoptozisin, diyabetik retinopatide vasküler ve nöronal hücre ölümleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (152, 158). Oshitari ve ark. (159) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma, retinal nöronlardaki PERK ve CHOP düzeylerindeki artışının diyabetik sıçanların retinal gangliyon hücrelerinin apoptozu ile ilişkili olduğu ve diyabetik olmayan retinalarda yüksek glikoza maruziyetten sonra bile benzer sonuçlar olduğu gözlenmiştir. Başka bir çalışmada in vitro retinal endotel hücrelerinde, hipergliseminin ER stresini uyardığı ve PERK-UPR alt akış transkripsiyon faktörü ATF4' ü aktive ettiği ve ER stresi baskılamanın veya ATF4 aktivitesini inhibe etmenin, diyabetik hücrelerde ICAM-1, TNF- α ve VEGF üretimini azalttığı gösterilmiştir (123). Ayrıca artmış ER stres, insan retinal endotel hücrelerinde VEGF üretimini artırır (138). Zhong ve ark. (160) yaptıkları çalışmada kimyasal şaperon 4-fenobütirol uygulamasının ATF4 üzerinden ER stresi inhibe ettiğini ve diyabetik retina Müller hücrelerinde inflamatuvar sitokinler ve VEGF salınımını azalttığını ifade etmişlerdir. Bulgularımız önceki çalışmaları desteklemektedir. DR grubunda kontrol grubuna göre PERK/ATF4/CHOP aksında artış olmuştur. Azeliragon uygulanmasıyla bu genlerin mRNA gen ekspresyonları azalmıştır. Bu sonuçlar azeliragonun diyabetik retinopatide PERK/ATF4/CHOP eksenini üzerinden inflamasyon, anjiyogenez ve apoptoziste etkili olduğunu göstermektedir.

IRE1 α (inozitol gerektiren enzim 1 α) uyarana ve şiddetine bağlı pro-apoptotik veya anti-apoptotik özellik gösterebilir. ER stres durumunda XBP1 üzerinden hücrenin hayatta kalmasını sağlar (161). Diyabetik modelde azalan IRE1 α ekspresyonunun, özellikle yüksek doz azeliragon uygulanan grupta belirgin artmış olması azeliragonun hücreyel sağkalımı artırıcı etkisi olduğu ve ER strese karşı koruyucu olduğunu gösterir.

Western-Blot analizimizde diyabetik retinopati gruplarında ER strese rol alan PERK, ATF4, CHOP ve eIF2- α bantlarında kontrol grubuna kıyasla genişleme olduğu görülmektedir. Ayrıca orta ve yüksek doz azeliragon tedavisi uygulanan gruplarda bu proteinlerde azalma olmuştur. Bu veriler de çalışmamızı desteklemektedir. Azeliragon tedavisi ER stresi azaltmaktadır. Farklı olarak kontrol grubuna kıyasla DR-IR2 ve DR-IR3 gruplarında daha az protein ekspresyonu olmuştur. Bu farkın protein miktarındaki yetersizlikten kaynaklandığını düşünmekteyiz.

P53 proteini hücre döngüsünde rol alan, mutasyonu durumunda çeşitli kanser hastalıklarına neden olan önemli bir tümör supressördür. Aktivasyonu ile apoptozisi uyarır (162). Ayrıca ER stres altında p53' ün apoptozu tetiklediği bilinmekte fakat mekanizması bilinmemektedir (157). Çalışmamızda DR grubunda p53 gen ekspresyon oranı artmıştır. Literatüre bakıldığında yakın zamanlı Al-Ani ve ark. (163)' nın fareler üzerinde yaptıkları çalışmada da hiperglisemi ve p53 arasında korelasyon olduğu ifade edilmiştir. Metformin ile tedavi edilen farelerde p53 ve ROS seviyelerini azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda da yüksek doz azeliragon uygulanan grupta p53 gen ekspresyonunun azaldığını gözlemlenmiştir.

ER stres ile apoptozis ilişkisi literatürde pek çok yayında bahsedilmiştir (164, 165). Fan ve ark. (166) transgenik fare modellerinde yaptıkları çalışmada likokalkon A' nın PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP sinyallemesini inhibe ederek ER stres kaynaklı nöronal apoptozu iyileştirdiğini göstermiştir. Başka bir çalışmada ise ER stresin baskılanmasının Bcl-2/bax oranının arttırdığı ve Casp3 aktivitesini zayıflattığı belirtilmiştir (167). Fakat bizim çalışmamızda apoptoziste rol alan Casp3, Cyt-c ve Bax ekspresyonlarının diyabetik modelde kontrole kıyasla anlamlı artış göstermediği görülmüştür. İlginç şekilde K ve DR-IR3 grupları arasında da anlamlı fark oluşmamışken, düşük doz (100 nM) azeliragon uygulanan gruplarda artış olduğu görülmüştür. Bu da bize azeliragonun doza bağımlı etki gösterdiğini düşündürdü. Anti-apoptotik özellikteki Bcl-2, Bcl-xL genleri içinde benzer şekilde DR grubunda anlamlı artış görülmemiştir. Fakat yüksek doz azeliragon tedavisinin bu genlerin ekspresyonlarını belirgin şekilde arttırdığı görülmüştür. Ayrıca diyabetik koşullarda artan PERK/eIF-2 α /ATF4/CHOP sinyallemesini de inhibe ettiği görülmüştür. Yine de azeliragon ve apoptozis ilişkisinin açıklanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmamızda in vitro ortamda oral alınabilen bir RAGE inhibitörü olan azeliragon molekülünün diyabetik retina pigment epiteli üzerindeki etkilerini ortaya koymaya çalıştık. Literatüre bakıldığında azeliragon molekülüyle ilgili farklı alanlarda çalışmalar yapılmıştır. Kong ve ark. (168) pankreas kanseri ksenograft modelinde yaptıkları çalışmada azeliragonun PAK1 (p21 aktivi kinaz1) inhibisyonu yaparak tümör büyümesini engellediğini bildirmişlerdir. Yang ve ark.(169) ise azeliragon molekülünün JAK/STAT eksenini üzerinden Alzheimer hastalığını hafifletmede terapötik potansiyelinin olduğunu savunmuşlardır. Joshi ve ark. (170) yaptıkları hayvan modeli çalışmasında azeliragon uygulanan farelerde, azeliragonun inflamasyonu baskılayarak doku grefti reddini azalttığını bildirmişlerdir. Günümüzde Alzheimer ve onkolojik hastalıklarda azeliragonla ilgili laboratuvar ve/veya klinik çalışmalar devam etmektedir. Henüz FDA onayı alan bir çalışma olmamıştır.

Çalışma bulgularımızın olumlu olmasına rağmen azeliragon molekülünün biyoyararlanımı ve farmakokinetiği henüz net olarak bilinmemektedir. Ayrıca gözde yeterli konsantrasyona ulaşması için hangi uygulama yolunun kullanılacağı ve olası yan etkiler bakımından daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda 100nM uygulanan azeliragonun diyabetik retinopati modeliyle benzer gen ekspresyonlarına sahip olduğu ve tedavi açısından anlamlı yanıt oluşturamadığı gösterilmiştir. Fakat orta (300 nM) ve özellikle yüksek doz (500 nM) uygulanan azeliragonun diyabetik hücreleri kontrol grubuna yaklaştırdığı ve tedavi açısından anlamlı olabileceği gösterilmiştir. Bu durumda, azeliragonun molekülünün etkili olabilmesi için gözde belirli bir konsantrasyonun üzerinde olması gerekliliği sonucuna varılabilir. Çalışmamızda düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere 3 grupta azeliragonun etkinliği incelenmiş ama net sınır belirlenmemiştir.

SONUÇLAR

İleri glikasyon normal koşullarda neredeyse hiç gözlenmezken özellikle hiperglisemi başta olmak üzere hipoksi ve oksidatif stres halinde artan ROS üretimine bağlı gelişebilmektedir. Oksidatif stres ve hipoksi ayrıca ER strese ve dolayısıyla katlanmamış protein tepkisine yol açmaktadır (171). Tip 2 Diyabetes Mellitus' daki ER stresi, AGE reseptörü (RAGE) aracılığıyla gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE' ler) tarafından tetiklenir (171-173). AGE/RAGE, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz (Nox) aracılı ROS üretimini aktive eder, ardından oksidatif strese, ER stresine ve UPR birikimine yol açar (171, 172, 174, 175). PKR benzeri ökaryotik başlatma faktörü 2 α kinaz (PERK), enzim 1 (IRE1) gerektiren inositol nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve ayrıca ER fonksiyonlarını modüle eden diğer ER stresle indüklenabilir transkripsiyon faktörleri (176-178) ve aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) dahil olmak üzere UPR dönüştürücü proteinler, enflamatuar sinyal kaskadları oluşturur ve pro-inflamatuar gen ürünlerinin ekspresyonunu düzenler. Bu nedenle AGE/RAGE/Nox ile indüklenen ER stres eksenini ile ilgili sinyal moleküllerini hedeflemenin, DR tedavisi için umut vaat eden potansiyel yaklaşım olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu amaçla ARPE-19 hücreleri kullanılarak ve Doğanlar ve ark. (107) çalışması referans alınarak diyabetik model oluşturulmuştur. Oluşturulan diyabetik hücrelere 72 saat RAGE inhibitörü olan azeliragon molekülü uygulanmıştır. Yine bu amaçla çeşitli gen ekspresyonları qRT-PCR analizi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmamız neticesinde elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

1. Azeliragon tedavisi tüm gruplarda, diyabetik modelde artan RAGE gen ekspresyonunu azaltmıştır. Yani RAGE/AGE aksını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe etmiştir.
2. Azeliragon molekülünün, orta ve yüksek doz uygulandığı gruplarda inflamasyonda görevli TNF- α , TGF- β , PAI, LMNB1, ICAM-1, NF- κ B gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Böylece diyabetik modelde artan inflamasyonu baskılamıştır.
3. Azeliragon uygulanması anjiyogenezde başlıca sorumlu olan HIF-1 α ve VEGF düzeyini, HIF-1 α üzerindeki etkisi daha belirgin olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır. Ayrıca anjiyogenezde görevli EGFR, MMP3 ve MMP9 genlerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür.
4. Yüksek doz azeliragon tedavisi ile PI3K ve AKT gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Dolayısıyla PI3K/AKT/mTOR eksenini anlamlı düzeyde arttırmıştır.
5. Azeliragon tedavisi alan grupla diyabetik model karşılaştırıldığında Nox gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.
6. ER streste görevli PERK, eIF-2 α , ATF4 ve CHOP gen ekspresyonları orta ve yüksek doz azeliragon tedavisiyle diyabetik modele kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Ayrıca yüksek doz azeliragon tedavisi, ER stres durumunda hücreyi koruyucu özellikteki IRE1 α /XBP1 gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırmıştır.
7. Özellikle yüksek doz azeliragon uygulaması apoptoziste rol alan p53 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaltırken anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 ve Bcl-xL gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırmıştır.
8. Çalışmamız neticesinde azeliragon molekülünün ER stres aracılı diyabetik retinopatide yüksek dozlarda faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Diyabetes Mellitus günümüzde önemli bir sağlık sorunudur. Diyabetik retinopati ise diyabetin mikrovasküler bir komplikasyonudur. Dünyadaki körlüğün başlıca nedenlerindendir. Diyabette kronik hiperglisemi, inflamasyon ve reaktif oksijen radikallerinin birikimi sonucu oluşan oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi gibi çeşitli faktörler hücrelerde iskemi ve apoptozisi tetiklemektedir. Bu durum gözde hafif dereceli retinopati bulgularından, görmeyi tehdit eden ciddi klinik bulgulara kadar değişen tablolara yol açmaktadır. Günümüzde uygulanan tedaviler ise yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle diyabetik retinopati tedavisi ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Diyabetik retinopati patogenezinin sorumlu birçok metabolik yolak tanımlanmıştır. Bunlardan biri de ileri glikasyon son ürünleridir. Hiperglisemiye nedeniyle oluşan bu ürünler, reseptörlerine bağlanarak retinopati patogenezinde görev almaktadır. Çalışmamızda, insan retinal pigment hücre hattı, önceki çalışmalar baz alınarak uygun miktarlarda ileri glikasyon son ürünleri+ glukoz+ lipopolisakkarit' e maruz bırakılarak diyabetik retinopati modeli oluşturulmuştur. İleri glikasyon son ürünleri reseptör inhibitörü olan azeliragon molekülü, 72 saat boyunca 100nM, 300nM ve 500nM dozlarında diyabetik hücrelere uygulanmıştır. Sonrasında yapılan analizlerde, diyabetik retinopati patogenezinde görevli çeşitli hedef genlerin mesajcı ribonükleik asit ekspresyonları ve değişimleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubu, diyabetik retinopati grubu ve azeliragon uygulanan diyabetik gruplar tek yönlü varyans analizi ve Tukey testleri kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Böylece azeliragonun diyabetik retinopatideki etkinliği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda anjiyogenez, inflamasyon, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres ve apoptoziste görevli başlıca genler analiz edilmiştir. Özellikle azeliragon molekülünün yüksek doz uygulandığı gruplarda inflamasyon, anjiyogenez ve apoptozisin baskılandığı görülmüştür. Ayrıca endoplazmik retikulum stresinde ve katlanmamış protein yanıtında görevli genlerin ekspresyonlarının azaldığı, protein katlanma kapasitesini artırılmasından sorumlu olan genlerin ise arttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak in vitro yapılan çalışmamızdan elde edilen veriler neticesinde azeliragon molekülü, endoplazmik retikulum stresi aracılı diyabetik retinopati tedavisinde potansiyel bir ajan olabilir.

Anahtar kelimeler: Diyabetik retinopati, endoplazmik retikulum (ER) stres, Azeliragon, ileri glikasyon son ürünleri (AGE), AGE reseptörü (RAGE), ARPE-19

THERAPEUTIC EFFECT OF RAGE-TARGETED AZELIRAGON THERAPY IN ER STRESS-MEDIATED DIABETIC RETINOPATHY

SUMMARY

Diabetes Mellitus represents a significant health concern in contemporary society. Diabetic retinopathy is a significant microvascular complication of diabetes, representing one of the leading causes of blindness worldwide. Various factors, including chronic hyperglycemia, inflammation, oxidative stress from reactive oxygen radicals and endoplasmic reticulum stress, contribute to cellular ischemia and trigger apoptosis, resulting in manifestations that range from mild retinopathy to severe vision-threatening conditions. Existing treatments for diabetic retinopathy are often inadequate, prompting ongoing research into more effective therapeutic options.

Numerous metabolic pathways have been implicated in the pathogenesis of diabetic retinopathy, one of which involves advanced glycation end products. These products, which accumulate due to hyperglycemia, contribute to diabetic retinopathy by interacting with their receptors. In this study, a diabetic retinopathy model was established using a human retina pigment epithelium cell line exposed to advanced glycation end products +glucose+lipopolysaccharide based on previous research. Azeliragon, an advanced glycation end products receptor inhibitor was applied to diabetic cells in doses of 100 nM, 300 nM and 500 nM for 72 hours. Subsequently, we analyzed the messenger ribonucleic acid expressions of various target genes involved in diabetic retinopathy pathogenesis. The experimental groups included a control group, a diabetic retinopathy group and groups treated with Azeliragon. Statistical comparisons were carried out using one way analysis of variance and Tukey tests to evaluate the effects of Azeliragon on diabetic retinopathy.

Our analysis focused on key genes associated with angiogenesis, inflammation, endoplasmic reticulum stress, oxidative stress and apoptosis. Notably, the high-dose azeliragon treatment group exhibited suppressed inflammation, angiogenesis and apoptosis in diabetic cells. Additionally, we observed a decrease in the messenger ribonucleic acid expression of genes associated with endoplasmic reticulum stress and the increase in the messenger ribonucleic acid expression which was associated with improved protein folding capacity.

In conclusion, our in vitro findings suggest that Azeliragon may serve as a potential therapeutic agent in the treatment of endoplasmic reticulum stress-mediated diabetic retinopathy.

Keywords: Diabetic retinopathy, endoplasmic reticulum (ER) stress, Azeliragon, advanced glycation end products (AGE), AGE receptor (RAGE), ARPE-19

KAYNAKÇA

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138:271-81.
2. Solomon SD, Chew E, Duh EJ, Sobrin L, Sun JK, VanderBeek BL, et al. Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017;40(3):412-8.
3. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2003;26 Suppl 1:S99-s102.
4. Leasher JL, Bourne RR, Flaxman SR, Jonas JB, Keeffe J, Naidoo K, et al. Global Estimates on the Number of People Blind or Visually Impaired by Diabetic Retinopathy: A Meta-analysis From 1990 to 2010. *Diabetes Care* 2016;39(9):1643-9.
5. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2012;35(3):556-64.
6. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2011;11(4):244-52.
7. Miao Wang RJK. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 2016;529:326-35.
8. Hunt NJ, Wahl D, Westwood LJ, Lockwood GP, Le Couteur DG, Cogger VC. Targeting the liver in dementia and cognitive impairment: Dietary macronutrients and diabetic therapeutics. *Adv Drug Delivery Rev* 2022;190:114537.
9. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center Copyright: © 2024 Webvision . 1995.
10. F SJ. Retinal vasküler hastalıklar. In: Akova A. Yonca DO, editor. *Klinik oftalmoloji*. 9 ed: Elsevier; 2020. s. 496-514.

11. Yanoff M, Duker JS. Ophthalmology, E-Book: Elsevier Health Sciences; 2022.
12. Ferrara M, Lugano G, Sandinha MT, Kearns VR, Geraghty B, Steel DHW. Biomechanical properties of retina and choroid: a comprehensive review of techniques and translational relevance. *Eye (Lond)* 2021;35(7):1818-32.
13. Snell RS, Lemp MA. Clinical Anatomy of the Eye: Wiley; 2013.
14. Pınar Aydın O'dwyer YAA. Retina fizyolojisi. Temel göz hastalıkları. Ankara: güneş tıp kitabevleri; 2015. s. 638-41.
15. GÜVEN D. Retina ve Optik Sinirin Anatomisi ve Fizyolojisi. *Türkiye Klinikleri Ophthalmology-Special Topics* 2009;2(3):6-12.
16. İNAN Ümit Übeyt ÖN. Retina pigment epitel fizyolojisi. *J Retina Vitreus* 2011;19(1):6-15.
17. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005;85(3):845-81.
18. Schmidt SY, Peisch RD. Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27(7):1063-7.
19. Nishimura Y, Hara H, Kondo M, Hong S, Matsugi T. Oxidative Stress in Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:4076518.
20. Wang S, Li W, Chen M, Cao Y, Lu W, Li X. The retinal pigment epithelium: Functions and roles in ocular diseases. *Fundam Res* 2023;4(6):1710-8.
21. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. 2024;16.
22. Lakhtakia R. The history of diabetes mellitus. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2013;13(3):368-70.
23. Parker ED, Lin J, Mahoney T, Ume N, Yang G, Gabbay RA, et al. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2022. *Diabetes Care* 2024;47(1):26-43.
24. Liu J, Ren Z-H, Qiang H, Wu J, Shen M, Zhang L, et al. Trends in the incidence of diabetes mellitus: results from the Global Burden of Disease Study 2017 and implications for diabetes mellitus prevention. *BMC Public Health* 2020;20:1-12.
25. Pınar Aydın O'dwyer YAA. retinanın vasküler hastalıkları. temel göz hastalıkları. Ankara: Güneş tıp kitabevleri; 2015. s. 655-63.
26. Lin KY, Hsih WH, Lin YB, Wen CY, Chang TJ. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig* 2021;12(8):1322-5.
27. Eroğlu M, Barışık V. Birinci basamakta diyabetes mellitusa yaklaşım Approach to diabetes mellitus in primary care. *Smyrna Tıp Dergisi* 2012:54-61.

28. Zhang Z, Deng C, Paulus YM. Advances in Structural and Functional Retinal Imaging and Biomarkers for Early Detection of Diabetic Retinopathy. *Biomedicines* 2024;12(7):1405.
29. Çıtırık M BF. Diyabetik retinopati ve diyabetik makula ödeminde güncel patogenezi. *Türkiye Klinikleri* 2021;1:14-22.
30. S İ. Diyabetik Retinopati ve Etiyopatogenezi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2014 ağustos;15(2):207-17.
31. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*.2005;54(6):1615-25.
32. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, 3rd, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004;27(10):2540-53.
33. Paul S, Ali A, Katara R. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus - A comprehensive review. *J Diabetes Complications* 2020;34(8):107613.
34. Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 2008;57(9):2461-9.
35. Naka Y, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Rong LL, Ramasamy R, et al. RAGE axis: animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biol* 2004;24(8):1342-9.
36. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 2001;44(6):659-73.
37. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(22):11059-63.
38. Wu MY, Yiang GT, Lai TT, Li CJ. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:3420187.
39. Wu M-Y, Yiang G-T, Lai T-T, Li C-J. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018(1):3420187.
40. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(19):10836-41.
41. Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tamura J, Kobayashi I, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *J Diabetes Complications* 2001;15(5):257-9.

42. Capitão M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem* 2016;117(11):2443-53.
43. Abcouwer SF. Müller Cell-Microglia Cross Talk Drives Neuroinflammation in Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 2017;66(2):261-3.
44. Sorrentino FS, Allkabet M, Salsini G, Bonifazzi C, Perri P. The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci* 2016;162:54-9.
45. Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, et al. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J Clin Med* 2019;8(9).
46. Plaisance V, Brajkovic S, Tenenbaum M, Favre D, Ezanno H, Bonnefond A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL. *PLoS One* 2016;11(9):e0163046.
47. Chen Y, Zhao Q, Sun Y, Jin Y, Zhang J, Wu J. Melatonin induces anti-inflammatory effects via endoplasmic reticulum stress in RAW264.7 macrophages. *Mol Med Rep* 2018;17(4):6122-9.
48. Altmann C, Schmidt MHH. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2018;19(1).
49. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, Kok PH, Jeong W, Demirkaya N, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(19):E2655-64.
50. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 2008;205(10):2409-17.
51. Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovasc Res* 2011;90(3):421-9.
52. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67(1):3-21.
53. Brownlee M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994;43(6):836-41.
54. Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7(11):985-91.
55. Nagaraj RH, Monnier VM. Protein modification by the degradation products of ascorbate: formation of a novel pyrrole from the Maillard reaction of L-threose with proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure Mol Enzymol* 1995;1253(1):75-84.

56. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys* 1997;344(1):29-36.
57. Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, Yamaguchi M, Yoshimori K, Fukui M, et al. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(1):37-41.
58. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986;261(11):4889-94.
59. Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 1997;324 (Pt 2)(Pt 2):565-70.
60. Nagaraj RH, Shipanova IN, Faust FM. Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J Biol Chem* 1996;271(32):19338-45.
61. Zawada A, Machowiak A, Rychter AM, Ratajczak AE, Szymczak-Tomczak A, Dobrowolska A, et al. Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Body and Dietary Habits. *Nutrients* 2022;14(19).
62. Donato L, Scimone C, Alibrandi S, Scalinci SZ, Rinaldi C, D'Angelo R, et al. Epitranscriptome analysis of oxidative stressed retinal epithelial cells depicted a possible RNA editing landscape of retinal degeneration. *Antioxidants* 2022;11(10):1967.
63. Luo X, Wu J, Jing S, Yan LJ. Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. *Aging Dis* 2016;7(1):90-110.
64. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol* 2020;37:101799.
65. Rinaldi C, Donato L, Alibrandi S, Scimone C, D'Angelo R, Sidoti A. Oxidative stress and the neurovascular unit. *Life*. 2021;11(8):767.
66. Wong A, Lüth H-J, Deuther-Conrad W, Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Arendt T, et al. Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2001;920(1-2):32-40.
67. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. *Oxidative Med Cell Longevity* 2020;2020(1):3818196.
68. Takeuchi M, Watai T, Sasaki N, Choei H, Iwaki M, Ashizawa T, et al. Neurotoxicity of acetaldehyde-derived advanced glycation end products for cultured cortical neurons. *J Neuropathol Experimental Neurol* 2003;62(5):486-96.
69. Unoki H, Yamagishi S-i. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Current Pharmaceutical Design* 2008;14(10):987-9.

70. Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metabol* 2012;97(7):2231-42.
71. Soulis T, Thallas V, Youssef S, Gilbert RE, McWilliam B, Murray-McIntosh R, et al. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 1997;40:619-28.
72. Hallam KM, Li Q, Ananthakrishnan R, Kalea A, Zou YS, Vedantham S, et al. Aldose reductase and AGE-RAGE pathways: central roles in the pathogenesis of vascular dysfunction in aging rats. *Aging Cell* 2010;9(5):776-84.
73. Barile GR, Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Donmoyer CM, Ma W, et al. The RAGE axis in early diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmol Visual Sci* 2005;46(8):2916-24.
74. Moore TC, Moore JE, Kaji Y, Frizzell N, Usui T, Poulaki V, et al. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Investigative Ophthalmol Visual Sci* 2003;44(10):4457-64.
75. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, et al. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol* 2008;181(6):4272-8.
76. Sabbagh MN, Agro A, Bell J, Aisen PS, Schweizer E, Galasko D. PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Associated Disord* 2011;25(3):206-12.
77. Yamamoto K, Kitayama W, Denda A, Sasahira T, Kuniyasu H, Kirita T. Expression of receptor for advanced glycation end products during rat tongue carcinogenesis by 4-nitroquinoline 1-oxide and effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac. *Pathobiol* 2007;73(6):317-24.
78. Yamagishi S-i, Matsui T, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M, Ueda S, et al. Olmesartan blocks inflammatory reactions in endothelial cells evoked by advanced glycation end products by suppressing generation of reactive oxygen species. *Ophthalmic Res* 2007;40(1):10-5.
79. Yamagishi S, Takeuchi M. Nifedipine inhibits gene expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in endothelial cells by suppressing reactive oxygen species generation. *Drugs Under Experimental Clin Res* 2004;30(4):169-75.
80. Marx N, Walcher D, Ivanova N, Rautzenberg K, Jung A, Friedl R, et al. Thiazolidinediones reduce endothelial expression of receptors for advanced glycation end products. *Diabetes*. 2004;53(10):2662-8.
81. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010;376(9735):124-36.
82. Şatırtav G. Diabetik maküler ödemin patofizyolojisi. retinavitreus.dergisi.org.
83. Friedenwald JS. Diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1950;33(8):1187-99.

84. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1961;66:366-78.
85. Cebeci Z, Kır N. Diyabetik Retinopati Tanım ve Klinik Sınıflama. *Türkiye Klinikleri Ophthalmology-Special Topics* 2014;7(2):21-4.
86. İnan S. Diyabetik retinopati ve etiyopatogenezi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2014;15(2):207-17.
87. Ferris FL, 3rd, Patz A. Macular edema. A complication of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* 1984;28:452-61.
88. Bhatnagar A, Ting DSW, Weng CY. Treatment options for diabetic macular edema. *Int Ophthalmol Clinics* 2024;64(1):57-69.
89. KADAYIFÇILAR S. Diyabetik Retinopati ve Makulopati Tedavi Yönetimi: Ne Zaman, Hangi Tedavi? *Türkiye Klinikleri Ophthalmology-Special Topics* 2021;14(2):100-7.
90. Aiello LP. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005;353(8):839-41.
91. Vujosevic S, Martini F, Convento E, Longhin E, Kotsafti O, Parrozzani R, et al. Subthreshold laser therapy for diabetic macular edema: metabolic and safety issues. *Current Med Chem* 2013;20(26):3267-71.
92. Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1077669.
93. Wong TY, Sun J, Kawasaki R, Ruamviboonsuk P, Gupta N, Lansingh VC, et al. Guidelines on diabetic eye care: the international council of ophthalmology recommendations for screening, follow-up, referral, and treatment based on resource settings. *Ophthalmology* 2018;125(10):1608-22.
94. Pacella F, Romano MR, Turchetti P, Tarquini G, Carnovale A, Mollicone A, et al. An eighteen-month follow-up study on the effects of Intravitreal Dexamethasone Implant in diabetic macular edema refractory to anti-VEGF therapy. *Int J Ophthalmol* 2016;9(10):1427.
95. Mehta H, Gillies M, Fraser-Bell S. Perspective on the role of Ozurdex (dexamethasone intravitreal implant) in the management of diabetic macular oedema. *Ther Adv Chronic Dis* 2015;6(5):234-45.
96. Harbour JW, Smiddy WE, Flynn HW, Jr., Rubsamen PE. Vitrectomy for diabetic macular edema associated with a thickened and taut posterior hyaloid membrane. *Am J Ophthalmol* 1996;121(4):405-13.
97. Nasrallah FP, Jalkh AE, Van Coppenolle F, Kado M, Trempe CL, McMeel JW, et al. The role of the vitreous in diabetic macular edema. *Ophthalmology* 1988;95(10):1335-9.
98. Evliyaoğlu F, Akpolat Ç, Kurt MM, Çekiç O, Nuri Elçiöğlu M. Retinal Vascular Caliber Changes After Topical Nepafenac Treatment for Diabetic Macular Edema. *Curr Eye Res* 2018;43(3):357-61.

99. Kern TS, Miller CM, Du Y, Zheng L, Mohr S, Ball SL, et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes* 2007;56(2):373-9.
100. Singh RP, Barakat MR, Ip MS, Wykoff CC, Eichenbaum DA, Joshi S, et al. Efficacy and Safety of Brolucizumab for Diabetic Macular Edema: The Kíngfisher Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol* 2023;141(12):1152-60.
101. Wong TY, Haskova Z, Asik K, Bauml CR, Csaky KG, Eter N, et al. Faricimab Treat-and-Extend for Diabetic Macular Edema: Two-Year Results from the Randomized Phase 3 YOSEMITE and RHINE Trials. *Ophthalmology* 2024;131(6):708-23.
102. Xu D, Khan MA, Ho AC. Creating an ocular biofactory: surgical approaches in gene therapy for acquired retinal diseases. *Asia-Pacific J Ophthalmol* 2021;10(1):5-11.
103. Singh MS, Park SS, Albini TA, Canto-Soler MV, Klassen H, MacLaren RE, et al. Retinal stem cell transplantation: Balancing safety and potential. *Progress Retinal Eye Res* 2020;75:100779.
104. Burstein A, Sabbagh M, Andrews R, Valcarce C, Dunn I, Altstiel L. Development of Azeliragon, an oral small molecule antagonist of the receptor for advanced glycation endproducts, for the potential slowing of loss of cognition in mild Alzheimer's disease. *J Prevention Alzheimer's Dis* 2018;5:149-54.
105. Magna M, Hwang GH, McIntosh A, Drews-Elger K, Takabatake M, Ikeda A, et al. RAGE inhibitor TTP488 (Azeliragon) suppresses metastasis in triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2023;9(1):59.
106. Lin J, Tang Y, Kang Q, Feng Y, Chen A. Curcumin inhibits gene expression of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in hepatic stellate cells in vitro by elevating PPAR γ activity and attenuating oxidative stress. *British J Pharmacol* 2012;166(8):2212-27.
107. Doğanlar ZB, Doğanlar O, Kurtdere K, Güçlü H, Chasan T, Turgut E. Melatonin prevents blood-retinal barrier breakdown and mitochondrial dysfunction in high glucose and hypoxia-induced in vitro diabetic macular edema model. *Toxicology In Vitro* 2021;75:105191.
108. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157(5):1415-30.
109. Oshitari T, Hata N, Yamamoto S. Endoplasmic reticulum stress and diabetic retinopathy. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(1):115-22.
110. Schmidt AM, Hofmann M, Taguchi A, Yan SD, Stern DM. RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(5):485-93.
111. Barile GR, Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Donmoyer CM, Ma W, et al. The RAGE axis in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(8):2916-24.

112. Ceriello A. The emerging challenge in diabetes: the "metabolic memory". *Vascul Pharmacol* 2012;57(5-6):133-8.
113. Khalid M, Petroianu G, Adem A. Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. *Biomolecules*. 2022;12(4):542.
114. Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids* 2012;42(4):1193-204.
115. Reddy VP, Aryal P, Soni P. RAGE Inhibitors in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2023;11(4):1131.
116. Rojas M, Chávez-Castillo M, Bautista J, Ortega Á, Nava M, Salazar J, et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: Pathophysiologic and pharmacotherapeutics links. *World J Diabetes* 2021;12(6):745-66.
117. Ma S, Nakamura Y, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N. Blockade of receptor for advanced glycation end-products with azeliragon ameliorates streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Neurochem Int* 2023;163:105470.
118. Özbayer C, Yağcı E, Kurt H. Obezite, tip 2 diyabet ve insülin direnci arasındaki bağlantı: İnflamasyon. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi* 2018;1(2):27-36.
119. Li A, Song NJ, Riesenberger BP, Li Z. The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Front Immunol* 2019;10:3154.
120. Yue T, Shi Y, Luo S, Weng J, Wu Y, Zheng X. The role of inflammation in immune system of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Front Immunol* 2022;13:1055087.
121. Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Młyńczak J. Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with type 2 diabetes-role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(12):1665-70.
122. Zhang W, Liu H, Al-Shabrawey M, Caldwell RW, Caldwell RB. Inflammation and diabetic retinal microvascular complications. *J Cardiovasc Dis Res* 2011;2(2):96-103.
123. Chen Y, Wang JJ, Li J, Hosoya KI, Ratan R, Townes T, et al. Activating transcription factor 4 mediates hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and retinal vascular leakage through activation of STAT3 in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2012;55(9):2533-45.
124. Altmann C, Schmidt MHH. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2018;19(1):110.
125. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Faseb J* 2004;18(12):1450-2.
126. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 2011;30(5):343-58.

127. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020;1867(6):118677.
128. Singh P, Ali SA. Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells*. 2022;11(15):2274.
129. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(7):637-68.
130. Noristani R, Kuehn S, Stute G, Reinehr S, Stellbogen M, Dick HB, et al. Retinal and Optic Nerve Damage is Associated with Early Glial Responses in an Experimental Autoimmune Glaucoma Model. *J Mol Neurosci* 2016;58(4):470-82.
131. Kuehn S, Meißner W, Grotegut P, Theiss C, Dick HB, Joachim SC. Intravitreal S100B Injection Leads to Progressive Glaucoma Like Damage in Retina and Optic Nerve. *Front Cell Neurosci* 2018;12:312.
132. Van Hove I, De Groef L, Boeckx B, Modave E, Hu TT, Beets K, et al. Single-cell transcriptome analysis of the Akimba mouse retina reveals cell-type-specific insights into the pathobiology of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2020;63(10):2235-48.
133. Ferak N. STZ ile uyarılmış diyabetik sıçanlardaki nöropatolojik değişiklikler üzerine atorvastatinin etkileri: Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 2014.
134. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biological Chem* 1999;274(10):6519-25.
135. Lin M, Chen Y, Jin J, Hu Y, Zhou KK, Zhu M, et al. Ischaemia-induced retinal neovascularisation and diabetic retinopathy in mice with conditional knockout of hypoxia-inducible factor-1 in retinal Müller cells. *Diabetologia* 2011;54(6):1554-66.
136. Vadlapatla RK, Vadlapudi AD, Mitra AK. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases. *Curr Drug Targets* 2013;14(8):919-35.
137. İnan ÜÜ. Retinal hastalıkların patogeneğinde hipoksi ve enflamasyon. [internet] <https://retinavitreus.dergisi.org/pdf.php?l=en&id=1216>. Erişim Tarihi:
138. Li B, Li D, Li GG, Wang HW, Yu AX. P58(IPK) inhibition of endoplasmic reticulum stress in human retinal capillary endothelial cells in vitro. *Mol Vis*. 2008;14:1122-8.
139. Roybal CN, Yang S, Sun CW, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM, et al. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem*. 2004;279(15):14844-52.
140. Li J, Wang JJ, Yu Q, Wang M, Zhang SX. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Lett*. 2009;583(9):1521-7.

141. Samakova A, Gazova A, Sabova N, Valaskova S, Jurikova M, Kyselovic J. The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia. *Physiol Res*. 2019;68(Suppl 2):S131-s8.
142. Walkowski B, Kleibert M, Majka M, Wojciechowska M. Insight into the Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Injury and Post-Infarct Left Ventricular Remodeling in Normal and Diabetic Heart. *Cells*. 2022;11(9).
143. Chen K, Li Y, Zhang X, Ullah R, Tong J, Shen Y. The role of the PI3K/AKT signalling pathway in the corneal epithelium: recent updates. *Cell Death Dis*. 2022;13(5):513.
144. Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, Yu FS. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes*. 2009;58(5):1077-85.
145. Ren BC, Zhang YF, Liu SS, Cheng XJ, Yang X, Cui XG, et al. Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways. *J Cell Mol Med*. 2020;24(21):12355-67.
146. Yao L, Liang X, Liu Y, Li B, Hong M, Wang X, et al. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone ameliorates mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in diabetic tubulopathy. *Redox Biol*. 2023;68:102946.
147. Zhang Y, Xiao F, Liu X, Liu K, Zhou X, Zhong C. Cr(VI) induces cytotoxicity in vitro through activation of ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction via the PI3K/Akt signaling pathway. *Toxicol In Vitro*. 2017;41:232-44.
148. Allen DA, Harwood S, Varagunam M, Raftery MJ, Yaqoob MM. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *Faseb j*. 2003;17(8):908-10.
149. Çetiner Ö, Rakıcıoğlu N. Hiperglisemi, oksidatif stres ve tip 2 diyabette oksidatif stres belirteçlerinin tanımlanması. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*. 2020;4(1):60-8.
150. Breitenbach M, Rinnerthaler M, Weber M, Breitenbach-Koller H, Karl T, Cullen P, et al. The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells : Review. *Wien Med Wochenschr*. 2018;168(11-12):286-99.
151. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
152. Ma JH, Wang JJ, Zhang SX. The unfolded protein response and diabetic retinopathy. *J Diabetes Res*. 2014;2014:160140.
153. Fu XL, Gao DS. Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response: the regulative mechanism of organisms against stress injuries. *Biofactors*. 2014;40(6):569-85.
154. Liu Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, et al. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ*. 2009;16(6):847-57.

155. Reutens AT, Jandeleit-Dahm K, Thomas M, Salim A, De Livera AM, Bach LA, et al. A physician-initiated double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 study evaluating the efficacy and safety of inhibition of NADPH oxidase with the first-in-class Nox-1/4 inhibitor, GKT137831, in adults with type 1 diabetes and persistently elevated urinary albumin excretion: Protocol and statistical considerations. *Contemp Clin Trials*. 2020;90:105892.
156. Merighi A, Lossi L. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and Neuronal Cell Death. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23).
157. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *Febs j*. 2016;283(14):2640-52.
158. Jing G, Wang JJ, Zhang SX. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:589589.
159. Oshitari T, Yoshida-Hata N, Yamamoto S. Effect of neurotrophin-4 on endoplasmic reticulum stress-related neuronal apoptosis in diabetic and high glucose exposed rat retinas. *Neurosci Lett*. 2011;501(2):102-6.
160. Zhong Y, Li J, Chen Y, Wang JJ, Ratan R, Zhang SX. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Müller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes*. 2012;61(2):492-504.
161. Ghosh R, Wang L, Wang ES, Perera BG, Igarria A, Morita S, et al. Allosteric inhibition of the IRE1 α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*. 2014;158(3):534-48.
162. Liu Y, Su Z, Tavana O, Gu W. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression. *Cancer Cell*. 2024;42(6):946-67.
163. Al-Ani B, Alzamil NM, Hewett PW, Al-Hashem F, Bin-Jaliah I, Shatoor AS, et al. Metformin ameliorates ROS-p53-collagen axis of fibrosis and dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus-induced left ventricular injury. *Arch Physiol Biochem*. 2023;129(3):734-40.
164. Rozpędek W, Markiewicz Ł, Diehl JA, Pytel D, Majsterek I. [The role of the adaptive stress response in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, cancer and diabetes mellitus type 2]. *Pol Merkur Lekarski*. 2015;39(234):393-7.
165. Jäger R, Bertrand MJ, Gorman AM, Vandenabeele P, Samali A. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell*. 2012;104(5):259-70.
166. Fan Y, Ling Y, Zhou X, Li K, Zhou C. Licochalcone A Ameliorates Cognitive Dysfunction in an Alzheimer's Disease Model by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2024:8919887241295730.
167. He Y, Ruganzu JB, Lin C, Ding B, Zheng Q, Wu X, et al. Tanshinone IIA ameliorates cognitive deficits by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in APP/PS1 transgenic mice. *Neurochem Int*. 2020;133:104610.

168. Kong W, Zhu L, Li T, Chen J, Fan B, Ji W, et al. Azeliragon inhibits PAK1 and enhances the therapeutic efficacy of AKT inhibitors in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol.* 2023;948:175703.
169. Yang L, Liu Y, Wang Y, Li J, Liu N. Azeliragon ameliorates Alzheimer's disease via the Janus tyrosine kinase and signal transducer and activator of transcription signaling pathway. *Clinics (Sao Paulo).* 2021;76:e2348.
170. Joshi AA, Wu Y, Deng S, Preston-Hurlburt P, Forbes JM, Herold KC. RAGE antagonism with azeliragon improves xenograft rejection by T cells in humanized mice. *Clin Immunol.* 2022;245:109165.
171. Inagi R. Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol.* 2011;491:361-80.
172. Chen Y, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Lu YB, Fang L, et al. Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *American journal of nephrology.* 2008;28(6):1014-22.
173. Liu J, Huang K, Cai G-Y, Chen X-M, Yang J-R, Lin L-R, et al. Receptor for advanced glycation end-products promotes premature senescence of proximal tubular epithelial cells via activation of endoplasmic reticulum stress-dependent p21 signaling. *Cellular signalling.* 2014;26(1):110-21.
174. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes.* 2008;57(2):460-9.
175. Santos CX, Nabeebaccus AA, Shah AM, Camargo LL, Filho SV, Lopes LR. Endoplasmic reticulum stress and Nox-mediated reactive oxygen species signaling in the peripheral vasculature: potential role in hypertension. *Antioxidants & redox signaling.* 2014;20(1):121-34.
176. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Fougelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2012;23(8):381-90.
177. Phillips MJ, Voeltz GK. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2016;17(2):69-82.
178. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* 2016;529(7586):326-35.