

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

VİTRÖZ HUMORDE RADYOTERAPİ İLE İNDÜKLENEN
DEĞİŞİKLİKLER

Dr. AYŞENUR ELMALI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

VİTRÖZ HUMORDE RADYOTERAPİ İLE İNDÜKLENEN
DEĞİŞİKLİKLER

Dr. AYŞENUR ELMALI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Gözde Yazıcı

ANKARA

2021

TEŞEKKÜR

Öncelikle, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda almış olduğum uzmanlık eğitimim süresince ve bu çalışmanın her aşamasında bir an olsun desteğini esirgemeyen tez danışmanım, saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Gözde Yazıcı'ya özel saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Başta anabilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Gökhan Özyiğit olmak üzere, teşekkürlerin az kalacağı değerli hocalarım, Prof. Dr. Fadıl Akyol, Prof. Dr. Faruk Zorlu, Prof. Dr. Murat Gürkaynak, Prof. Dr. Ferah Yıldız, Prof. Dr. Mustafa Cengiz, Dr. Melis Gültekin, Doç. Dr. Pervin Hürmüz ve Dr. Öğr. Üyesi Sezin Yüce Sarı'ya bana 5 yıllık asistanlık hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için, beni gelecekte iyi yerlere gelebilecek bilgilerle donattıkları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm zor zamanlarımda olduğu gibi, bu zorlu tez sürecinde de eksik etmediği moral, motivasyon desteği için değerli arkadaşım, dostum Dr. Melek Tuğçe Yılmaz'a kalbimin derinliklerinden sevgi ve teşekkürlerimi gönderiyorum.

Bölümümüzde birlikte çalıştığım için memnuniyet duyduğum başta asistan arkadaşlarım olmak üzere, fizik mühendisi, hemşire, tekniker, tıbbi sekreter tüm iş arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Son olarak beni sevgi ve saygı kelimelerinin anlamını bilerek yetiştirdikleri ve tüm eğitim hayatım boyunca bana duydukları güven ve destekleri için sevgili aileme en derin duygularla teşekkür ediyorum.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 18473

ÖZET

Ayşenur Elmalı, Vitroz Humorde Radyoterapi ile İndüklenen Değişiklikler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021. Vitroz humor (VH) radyoterapi sürecinde kritik bir yapı olarak kabul edilmemektedir. Bu çalışmada, radyoterapinin VH üzerindeki etkilerini incelemek için deneysel bir hayvan modellemesi yapılmıştır. On iki Yeni Zelanda tavşanının sağ gözleri 3 fraksiyonda 60 Gy ışınlanmış, karşı (sol) gözler kontrol olarak kabul edilmiştir. Işınlama sonrası haftalık oftalmolojik muayene yapılmış, üçüncü ayın sonunda enükleasyon ve vitrektomi yapılmıştır. Vitroz numuneler metabolomik analizlere, ELISA analizlerine, viskozite ölçümlerine ve elektron mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur. Kontrol ve deneysel numunelerde 275 farklı metabolit tanımlanmış ve 34'ünün gruplar arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiği bulunmuştur. Çok değişkenli analizlerde, kontrol ve ışınlanmış numuneler arasında net bir ayırım gözlemlenmiştir. Yolak analizinde, etkilenen yolakların temel olarak amino asit metabolizması ile ilgili olduğu görülmüştür. ELISA testinde, VH'nin fonksiyonel bütünlüğünü korumada sinerjistik etkiye sahip olan tip II, V ve XI kollajenlerde istatistiksel anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Tip IX kollajende azalma tespit edilmiştir ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Deney numunelerinde kontrol numunelerine göre viskozitede anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Elektron mikroskopik bulgular, kollajen fibrillerinin yapısının bozulduğunu ve deneysel vitrozde dağılmış kollajen fragmanları olduğunu göstermiştir. Sağlıklı bir göz için sağlam bir vitroz gereklidir. Bu çalışmada, radyasyonun vitrozde uzun vadeli sonuçları olabilecek değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: kollajen, hedeflenmemiş metabolomikler, radyoterapi, viskozite, vitroz humor

Bu çalışma için Kobay Deney Hayvanları A.Ş. Yerel Etik Kurulu'ndan 23 Eylül 2019 tarihinde 400 protokol numarası ile onay alınmıştır.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 18473

ABSTRACT

Aysenur Elmali, Radiotherapy-Induced Changes in Vitreous Humor, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Radiation Oncology, Ankara, 2021.

Vitreous humor (VH) is not considered as a critical structure in the radiotherapy process. In the present study, an experimental animal model was performed to examine the effects of radiotherapy on VH. The right eyes of twelve New Zealand rabbits were irradiated 60 Gy in 3 fractions, and the opposite (left) eyes were considered as control. Weekly ophthalmologic examination was performed after irradiation. At the end of the third month, enucleation and vitrectomy were conducted. The vitreous samples were subjected to metabolomic analyses, ELISA analyses, viscosity measurements, and electron microscopic examination. Two hundred seventy-five different metabolites were identified in control and experimental vitreous samples, and 34 were found to differ significantly between the groups. In multivariate analyses, a clear distinction was observed between control and irradiated vitreous samples. In the pathway analysis, affected pathways were mainly related to amino acid metabolism. A significant decrease was observed in type II, V, and XI collagens in the ELISA test. There was a non-significant decrease in type IX collagen. A non-significant decrease in viscosity was observed in experimental samples compared to control samples. Electron microscopy findings showed that the collagen fibrillar ultra-structure was disrupted, and there were collagen fragments dispersed in the experimental vitreous. An intact vitreous is essential for a healthy eye. In this study, it was observed that radiation caused changes on the vitreous that could have long-term consequences.

Key Words: collagen, untargeted metabolomics, radiotherapy, viscosity, vitreous humor
This research is approved by Kobay Deney Hayvanları A.Ş. Local Ethics Committee, with registration number 400 on September 23rd, 2019.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project Number: 18473

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Vitröz Humor	2
2.1.1 Anatomisi	2
2.1.2 Histolojisi	4
2.1.3 Biyo-sentezi ve Dönüşümü	6
2.1.4 Fizyolojisi	7
2.1.5 Makromoleküler Kompozisyonu	9
2.1.6 Vitröz Humorun Klinik Önemi	18
2.2 Radyoterapi	27
2.3 Metabolomikler	30
2.3.1 İyonizan Radyasyon ve Metabolomik Değişimler	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 Deney Modelinde Kullanılacak Hayvanlar ve Özellikleri	33
3.2 Radyoterapi Planlama ve Uygulama Süreci	33
3.3 Hayvanların Geç Dönem Toksisiteleri Gözlemleyebilecek Yeter Süre Yaşatılması, Bu Süreçte Barınma ve Beslenme Koşulları ve Rutin Muayene	38
3.4 Operasyon Süreci: Sakrifikasyon, Enükleasyon ve Diseksiyon İşlemlerinin Uygulanması	39
3.5 Laboratuvar DeneYlerinin Gerçekleştirilmesi	40

3.5.1 Metabolomik Analizler	40
3.5.2 Elisa Analizleri	44
3.5.3 Viskozite Ölçümleri	44
3.5.4 Elektron Mikroskopik İncelemeler	45
3.6 İstatistik	45
4. BULGULAR	46
4.1 Haftalık Muayene Bulguları ve Enükleasyon-Vitrektomi Sırasındaki İzlenimler	46
4.2 Metabolomik Analizler	50
4.3 Elisa Analizleri	56
4.4 Viskozite Ölçümleri	58
4.5 Elektron Mikroskopik İncelemeler	61
5. TARTIŞMA	64
5.1 Kısıtlılıklar	69
SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	74
EKLER	94
EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ	
EK 2. VİTRÖZ NUMUNELERDEKİ METABOLOMİKS ANALİZLER SONUCUNDA TANIMLANAN METABOLİTLER VE BAĞIL DEĞERLERİ	
EK 3. TÜM DENEKLERDE İZLENEN MUAYENE BULGULARI ÖZETİ VE ELDE EDİLEN ÖRNEKLERİN TABİ TUTULDUĞU TESTLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Askorbik Asit
APVD	: Anormal Posterior Vitroz Dekolman
cP	: centipoise
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GAG	: Glikozaminoglikan
GC- MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HA	: Hyaluronan
LC- MS (+)	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (pozitif iyon modu)
LC- MS (-)	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (negative iyon modu)
LC- MS/MS (+)	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi (pozitif iyon modu)
LC- MS/MS (-)	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi (negative iyon modu)
LET	: Lineer Enerji Transferi
OH°	: Hidroksil Radikali
Ort.	: Ortalama
PLS-DA	: En küçük kareler- Farklılaşma analizi (Partial Least-Squares Discriminant Analysis)
PVD	: Posterior Vitroz Dekolman
RAO	: Risk Altındaki Organ
RD	: Retina Dekolmanı
RRD	: Regmatojen Retina Dekolmanı
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RT	: Radyoterapi
SD	: Standart Deviasyon
VH	: Vitroz Humor

VIP	: Projeksiyondaki değişkenin önemi (Variable Imporance in Projection)
YAG	: Yttrium-Aluminium Garnet
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskop

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1- Kollajen fibriller ve aralarındaki çapraz bağlar.....	5
Şekil 2.2- Kollajen ve hyaluronan ilişkisi.....	5
Şekil 2.3- İnsan gözünde vitröz humor içerisindeki oksijen gradienti.....	8
Şekil 2.4- Omikler: DNA' dan Metabolomiklere akışın şematik görünümü.....	30
Şekil 3.1- Tedavi planlama tomografisi görüntüleri ve konturlar.....	34
Şekil 3.2- Tedavi planına ait izodoz eğrileri.....	35
Şekil 3.3- Tedavi masası üzerinde, tedavi pozisyonunda uzanmakta olan tavşan.....	36
Şekil 3.4- ExacTrac® portal görüntüleme sistemi ile set-up işlemi.....	36
Şekil 3.5- Tedavi sırasında alınmış kamera görüntüsü 1.....	37
Şekil 3.6- Tedavi sırasında alınmış kamera görüntüsü 2.....	37
Şekil 3.7- İndirekt oftalmoskopik muayene sırasında alınmış görüntü.....	38
Şekil 3.8- Enükleasyon uygulanan göze skleral insizyon yapılırken elde olunmuş fotoğraf.....	39
Şekil 4.1- Radyoterapi uygulaması sonrasında izlenen periorbital alopesi.....	46
Şekil 4.2- Periorbital alopeside azalma.....	47
Şekil 4.3- Fizik muayenede izlenen santral keratit odağı.....	48
Şekil 4.4- Haftalık muayene; fundus muayenesi, optik disk ve retinal damarlar.....	49
Şekil 4.5- Fundus muayenesinde izlenen periferik retinal damarlar.....	49
Şekil 4.6- Vitröz humor LC- q-TOF metabolomiks analizlerine ait ayrıştırılmış kromatogramlar.....	51
Şekil 4.7- Vitröz humor GC-MS metabolomiks analizlerine ait ayrıştırılmış kromatogram.....	52
Şekil 4.8- PLS-DA skor grafiği.....	53
Şekil 4.9- VIP skorları.....	54

Şekil 4.10- Vitroz humor örneklerinde tedavi ve kontrol grubu ile yapılan analizler sonucunda elde edilen ısı haritası olarak gösterilen kümeleme sonucu.	55
Şekil 4.11- Kollajen konsantrasyonları.	58
Şekil 4.12- Tüm tavşanlara ait VH'lerde yapılan viskozite ölçümlerine ait grafik.	61
Şekil 4.13- Tavşan 1-Sol: Uzun kollajen fibrillerinin ultra-strüktürel ağ yapısı; Sağ: Kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulması, dağılmış kollajen lif fragmanları.	62
Şekil 4.14- Tavşan 6-Sol: Uzun kollajen fibrillerinin ultra-strüktürel ağ yapısı; Sağ: Kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulması, dağılmış kollajen lif fragmanları.	62
Şekil 4.15- Tavşan 12-Sol: Uzun kollajen fibrillerinin ultra-strüktürel ağ yapısı, retinaya ait örneklerle beraber; Sağ: Kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulması, dağılmış kollajen lif fragmanları.....	63

TABLULAR

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1- VH'nin üç temel kollajenin α zincir yapıları.....	11
Tablo 3.1- Metabolomiks analizler için optimize edilmiş GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.	41
Tablo 3.2- Gradient elüsyon programı.	42
Tablo 3.3- LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.	42
Tablo 4.1- Metabolomik analizler sonucunda etkilendiği tespit edilen yolaklar.	56
Tablo 4.2- Kollajen konsantrasyonları.	57
Tablo 4.3- Farklı rpm'lerde yapılan viskozite ölçüm değerleri.	60

1. GİRİŞ

Vitröz Humor (vitröz, VH), gözün yaklaşık %80'lik bir hacmini kaplayan, gözün bütünlüğünün korunması ve göz sağlığının idame ettirilmesinde önemli rolleri olduğu düşünülen önemli bir yapıdır.

Göze ait hemen tüm yapıların radyoterapiyle ilişkisinin incelenmiş ve bu yapılar için, geç dönem yan etki görülme olasılığına göre tolerans dozları belirlenmiş iken radyoterapinin vitröz humor üzerindeki etkileri hakkında günümüze kadar çok az şey bildirildiği, vitröz humore olan etkilerinin daha önce değerlendirilmemiş olduğu izlenmektedir.

Onkolojik tedavilerdeki gelişmeler neticesinde artan sağ kalım oranları onkolojik kontrol kadar tedavi ile ilişkili toksisiteler ve hayat kalitesine dikkat etme gereksinimini de beraberinde getirmiştir. Görmenin hayat kalitesindeki önemi düşünüldüğünde radyoterapinin vitröz humor dahil göze ait yapılar üzerindeki etkilerinin bilinmesi gereklidir. Mevcut çalışmada radyoterapinin vitröz humor üzerindeki etkilerinin anlaşılması ve bu etkilerin potansiyel klinik öneminin değerlendirilebilmesi amaçlanarak bir hayvan deneyi modellenmesi gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Vitröz Humor

Vitröz Humor gözün arka kısmında bulunan, lens ve retina arasında kalan göz içi boşluğu dolduran jel kıvamında bir yapıdır. Hücre bakımından oldukça fakir olan VH, %98' den fazlası sudan oluşan, içerisinde hyaluronan ve kollajen gibi makromoleküller içeren, avasküler bir ekstraselüler matrikstir. Makromoleküller içermesine rağmen şeffaf, yoğun su hakimiyetine rağmen katı, visko-elastik jel bir yapıya sahiptir¹ ve normal hayat süresi boyunca giderek sıvılaşmaktadır. Dinamik bir üretim ve emilim döngüsüne sahip olan aköz humorden farklı olarak VH oldukça durağan bir sıvıdır.

Temel görevi optik iletimi sağlamak ve yapmış olduğu mekanik destek ile gözün küresel şeklini korumasına yardımcı olmaktır. Bunun dışında, göz içi oksijen basıncının düzenlenmesine ve göz içi basıncının korunmasına katkıda bulunmaktadır². Aynı zamanda VH, pigmente olmayan siliyer epitel ve retina pigment epitelinden aldığı besinler ve metabolitler için bir rezervuar görevi görmektedir³⁻⁶. Altında bulunan retina tabakasına yaptığı basınç etkisi ile retinanın pozisyonunu korumasına da yardımcı olmaktadır⁷. Lensin metabolik gereksinimlerinin sağlanmasına aracılık etmek, vitröz humorun şeffaflığını korumak için hücreleri ve büyük makromolekülleri vitröz boşluktan uzak tutmak⁸, göz gelişimini koordine etmek^{9,10}, mekanik travma sırasında gözü korumak⁷ ve anjiyogenezi inhibe etmek¹¹ gibi işlevleri de bildirilmiştir.

2.1.1 Anatomisi

İnsan vitrözü yaklaşık 4.5 ml'lik bir hacmi kaplayan, küresel ve saydam bir yapıdır. Etrafı retina, pars plana ve lens ile çevrilidir. VH içerisinde santral vitröz, bazal vitröz, vitröz korteks ve zonula gibi bir dizi anatomik bölge tanımlanmıştır. Bu bölgeler, kollajen fibrillerin konsantrasyonu ve yönelimindeki farklılıkların bir sonucu olarak farklı reolojik özelliklere sahiptir³.

VH'nin kendine ait kan damarı bulunmamakta, retina ve siler cisime ait damarlar tarafından metabolik ihtiyaçları sağlanmaktadır.

Santral vitröz, vitröz humorun asıl kısmını teşkil etmektedir. Embriyolojik hyaloid vasküler sistemin kalıntılarından biri olan ve optik diskten lensin posterior kutbu arasında

uzanan Cloquet kanalını içermektedir¹². Santral vitröz içerisinde kollajen fibriller düşük konsantrasyondadır ve anterior-posterior yönde uzanma eğilimindedir ve fibriller anterior vitröz base'in içine ve arkadan vitröz korteksin içine girmektedirler¹³.

Vitröz base, ora serrata üzerine oturan halka şeklinde bir bölgedir. Kortikal vitrözün bir kısmı olarak da düşünülebilir. İnsanlarda vitröz base, ora serratadan pars plana üzerine 1.5-2 mm ileriye ve retinada 3-4 mm arkaya kadar uzanmaktadır¹⁴. Vitröz base üzerinde yer alan bazal vitröz ise retinaya ve pars plananın pigmentli siliyer epiteline çok sıkı bir şekilde bağlı olan yoğun kollajen fibril demetleriyle doludur.

Vitröz Korteks, yani kortikal vitröz, santral vitrözü çevreleyen ince bir tabakadır. Gerçek bir membran olmayan bu kısım, kollajen fibrillerinin oryantasyonu ile merkezi jelden ayırt edilebilir ve santral vitröze göre daha yüksek kollajen konsantrasyonuna sahiptir. Anterior ve posterior olarak iki kısma ayrılır. Anterior vitröz korteks, lensin arka yüzeyinin orta kısmını kaplayacak şekilde pars planadan öne doğru uzanır. Pars plana ve lens arasında bulunan ve zonulaya bitişik olan vitröz korteks, aköz humor ile doğrudan temas halindedir ve bu nedenle moleküller VH'den aköz humor içine yayılabilir. Posterior korteks, bazal korteksin arka kenarından itibaren retina iç yüzeyini kaplar ve retina iç sınırlayıcı membranına yapışmaktadır. Posterior vitröz korteksin kollajen fibrilleri, retina yüzeyine paralel şekilde seyrederek ve doğrudan içerisine girmez^{12,15,16}. Vitreoretinal yapışmanın moleküler temeli tam olarak anlaşılammıştır, ancak kortikal vitröz kollajen fibrillerini membrana bağlayan 'moleküler yapıştırıcı' görevi gören ara moleküller olabileceği öne sürülmüştür¹⁷. Vitrözün posterior korteks kısmı retina yüzeyi ile yapışık olduğu için oldukça önemlidir. İkisi arasındaki yapışma vitröz kaynaklı retinal patolojilerin temelinde yer almaktadır. Vitröz korteks, optik disk üzerinde bulunmamakta ve maküla üzerinde ise diğer yerlerdekinden daha ince bir yapıya sahiptir.

VH içerisinde ince tabaka şeklindeki yoğunlaşmalar vitröz traktlar olarak adlandırılmaktadır. 2 ana optik trakt ve traktlar arasında yerleşmekte olan 3 adet de zon mevcuttur. Bunlar retrolental trakt, traktus preretinal trakt ve retrolental zon, preretinal zon, intermediate zondur. Klinik bir önemi saptanmamıştır.

Cloquet's kanalı hyaloid arterin embriyolojik kalıntısıdır. Lümeninde kollajen içermez. Duvarı gerçek bir membrandan değil vitröz kondensasyondan oluşan bu kanal

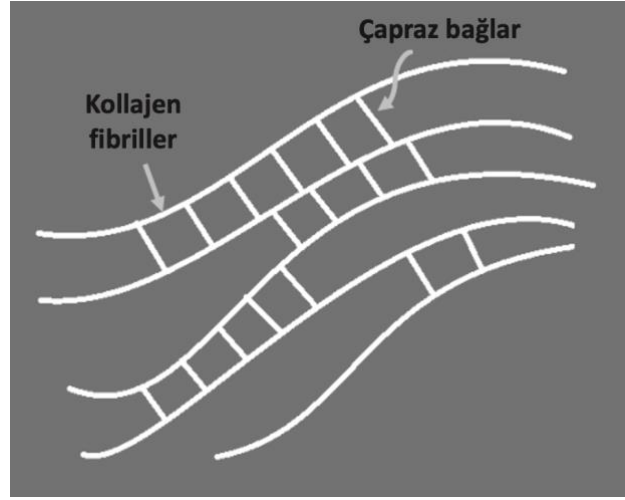
lens ile optik sinir arasında vitröz içerisinde seyretmektedir. Kanalın sonlandığı optik sinir üzerinde vitröz kortekste halkasal bir delik mevcuttur.

Zonular sistemin aslında vitrözün bir parçası olup olmadığı tartışmalıdır. Bununla birlikte, embriyolojik olarak üçüncül vitröz olarak sınıflandırılır. Zonullar, pars plana ve pars plicata'yı lensin bazal membranına bağlar, böylece siliyer kasın lensin eğriliğini değiştirebileceği bir suspensör sistemi görevi görür.

VH, retina iç yüzeyi ile temas halindedir ve bazı noktalarda daha sıkı olacak şekilde retinaya yapışmaktadır. İki yapı arasındaki sıkı yapışıklıklardan en güçlü bağlanma ora serrata ile vitröz base arasında iken Weigerin hyaloidokapsüler ligamanı aracılığı ile lensin posterioruna da sıkıca yapışmaktadır. 2. en sıkı bağlanma optik sinir kenarlarında bulunmaktadır. Bunlar haricinde makula/fovea üzerinde de sıkı yapışma bulunmaktadır. Ayrıca, en zayıf olarak da retinal damarlar üzerinde ve lattice dejenerasyon gibi patolojik durumlarda da vitröz retinaya sıkıca yapışmaktadır.

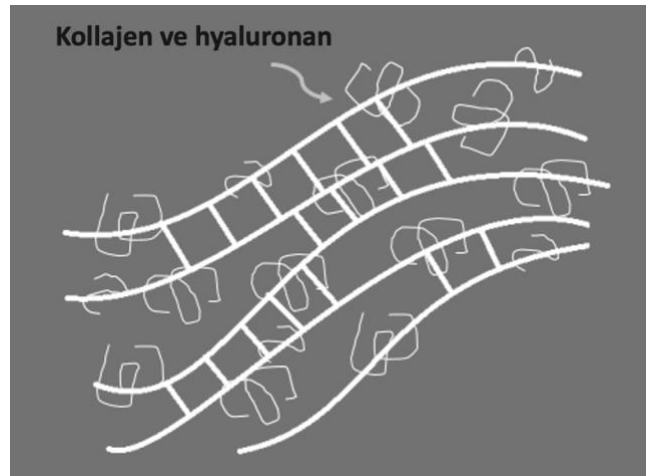
2.1.2 Histolojisi

Mikroskopik düzeydeki incelemelerde, vitröz humor içerisindeki dallanmamış kollajen fibrillerinin anterior- posterior uzanan demetler halinde düzenlendiği ve kendi aralarında çapraz bağlanmalar yaparak (Şekil 2.1) genişletilmiş bir ağ yapı oluşturdukları görülmektedir¹⁸. Çapraz bağlanmaların oluşturduğu ağ yapı spesifik ayrışma mesafesinin oluşmasını ve sürdürülmesini sağlamaktadır. Aralıklı yapının sağlanmasında çapraz bağlanmalara ek olarak VH'nin ana makromoleküllerinden olan tip IX kolajenin kondroitin sülfat zincirlerinin de katkısı olduğu bilinmektedir. Ayrışma hali ışığın geçmesi ve ağ yapının korunması için esansiyeldir.



Şekil 2.1- Kollajen fibriller ve aralarındaki çapraz bağlar.

Kollajen fibrillerin etrafında ve aralıklarında glikozaminoglikanlar başta olmak üzere başka makromoleküller de yer almaktadır. VH içerisindeki glikozaminoglikanlardan en bol bulunanı hyaluronandır. Şeker alt birimlerinden oluşan uzun bir molekül olan hyaluroanın suyla etkileşerek suyu bağladığı ve negatif yüklü olması sebebiyle birbirini iterek aralarda boşluklu yapının sürdürülmesinde (Şekil 2.2) önemli rol oynadığı düşünülmektedir.



Şekil 2.2- Kollajen ve hyaluronan ilişkisi.

Vitröz normal şartlarda %90'ı hyalositler ve az miktarda fibroblastlar olmak üzere az miktarda hücre ihtiva etmektedir¹⁹. Bu hücreler önde bazal vitrözde, arkada optik papilla çevresinde, iç retina yüzeyi yakınında yoğunlaşmaktadırlar^{20,21}.

Hyositlerin gerçek rolü net bilinmemekle beraber, intraokuler immun yanıtın modülasyonuna, embriyolojik gelişim sürecinde hyaloid vasküler sistemin regresyonuna ve ekstraselüler matiks sentezlenmesine katkıda bulduklarına dair kanıtlar mevcuttur. Embriyolojik gelişimin erken safhalarından itibaren vitrözde buldukları ve vitröz kollajen ve hyaluronan sekrete ettikleri bazı çalışmalarda rapor edilmiştir²²⁻²⁴. Kemik iliği kaynaklı doku makrofajları olduğu öne sürülen hyalositlerin yabancı organizmalara karşı fagositik bir savunma sağladığı da gösterilmiştir²⁵⁻²⁷. Aynı zamanda immun reaksiyonların inhibisyonunda ve vitrözün transparanlığını sürdürmek amacıyla enzimatik olarak fibrin ve ilişkili ürünlerin temizlenmesinde de rol aldıkları gösterilmiştir²⁸⁻³⁰.

2.1.3 Biyosentezi ve Dönüşümü

Vitröz humor, embriyolojik hayatta başlayan ve doğumdan sonra devam eden süregelen bir matiks modellenmesine sahiptir. Yapım- yıkım süregelen ancak özellikle yapım çok yavaştır. Bu nedenle vitröz humorde meydana gelen değişikliklerin büyük oranda kalıcı olması düşünüldüğünde radyasyona sekonder ortaya çıkan değişikliklere dikkat edilmesi gerekliliği anlaşılabilecektir.

Vitröz makromoleküllerin hücrel kökeni hala kesin bilinmemektedir. Tavuklarda radyoaktif işaretleme ile gerçekleştirilen erken deneyler sonucunda, vitröz tip II kollajen ve GAG'lerin başlangıçta fetal nöral retina ve daha sonra bizzat vitrözün kendisi tarafından sentezlendiği öne sürülmüştür^{31,32}. Sonraki araştırmalarda vitröz ekstraselüler sıvının mezenkimal hücreleri, retinal hücreler, hyaloid damar sistemi hücreleri, erken lens hücreleri ve muhtemelen siliyer cisim hücreleri tarafından sentezlendiğine dair görüşler ortaya atılmıştır^{3,19,22,33-37}.

Prenatal ve postnatal vitrözdeki dominant glikozaminoglikan (GAG) hyaluronandır. Postnatal vitröz boşluk hacminde bir artış gözlenmektedir. Bunun hyaluronan konsantrasyonunda ve toplam miktarındaki artışla ilişkili olduğu bulunmuştur³⁸.

Gelişimin erken safhalarında VH'nin dominant kollajeni tip III iken, gebeliğin 8. haftaları civarında dominant kollajen tip II haline gelmekte ve bu dönemde vitrözün yaklaşık %75'ini tip II kollajen temsil etmektedir³⁴. İnsan gözünde embriyogenez boyunca yüksek oranda tip II kollajen üretilir ve bu doğumdan sonraki iki yıl içinde azalır^{35,36}. Balazs ve Denlinger³⁹, toplam vitröz kollajen miktarının hayat boyu değişmediğini dolayısıyla göz büyüdükçe konsantrasyonunun azaldığını göstermiş ve doğum sonrası vitröz kollajen sentezi olmadığını öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, daha sonraki araştırmalarda yetişkin vitrözde pro-kollajenin tanımlanması, yetişkin sığır vitrözünde olgunlaşmamış çapraz bağların varlığı ve yetişkin insan gözünde periferik retina tarafından vitröz kollajen sentezinin morfolojik kanıtları, doğum sonrası muhtemelen düşük düzeyde de olsa kollajen sentezi olduğunu düşündürmüştür⁴⁰⁻⁴².

2.1.4 Fizyolojisi

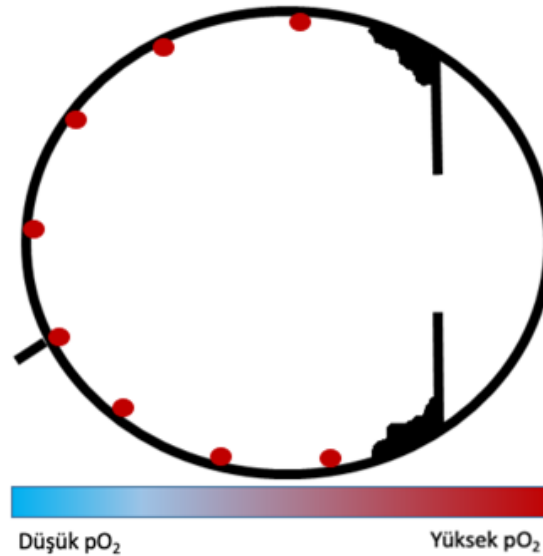
Vitröz humorun viskozitesi türlere ve ölçüm tekniklerine bağlı değişken olmakla birlikte, su, dengeli tuz çözeltisi veya aköz humorden çok daha fazladır. Vitrözün viskoelastisitesi, hyaluronan moleküllerinin konsantrasyonu ve moleküler boyutunun bir kombinasyonu ile üretilmektedir. Lee ve ark.⁵, suyun viskozitesini 1 cP iken insan vitröz jelinin viskozitesinin suyun viskozitesinden 300-2000 kat fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durum, VH'yi çevreleyen dokular için oldukça önemlidir.

VH, yüksek viskozitesi nedeniyle içerisindeki moleküler transport oranını görece düşük seviyelerde tutmakta ve böylece moleküllerin içerisinde taşınmasını modüle etmektedir. VH içerisindeki molekül transportu temelde iki mekanizma ile gerçekleşmektedir; difüzyon ve konveksiyon akımları. Her ikisi de vitrözün viskozitesi ile ters ilişki içerisinde. VH'nin farklı viskoziteye sahip maddelerle değiştirildiği vitrektomi operasyonu neticesinde, farmakolojik vitreoliz veya artan yaş ile VH'nin viskozitesi azalmakta ve bu durum VH transport oranının artmasına neden olmaktadır^{43,44}. Sonuç olarak oksijen başta olmak üzere, antioksidanlar, besinler, ilaçlar, büyüme faktörleri ve diğer sitokinler dahil olmak üzere hem yararlı hem de potansiyel zararlı moleküllerin taşınması etkilenmektedir. Bu değişikliğin farklı klinik sonuçları mevcut olup bazıları faydalı iken bazıları zararlı sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin, yaşla birlikte

değişen viskozite ve taşıma özellikleri lens ve retinadaki bazı yaşlanma hastalıklarının gelişiminde önemli rol almaktadır.

Göz, çeşitli nedenlerden dolayı yüksek seviyelerde oksidatif strese sahiptir. Yüksek UV radyasyon maruziyeti bulunması ve retinanın insan vücudundaki en metabolik aktif dokulardan biri olması bunun temel nedenlerindedir^{45,46}. Ayrıca, VH ve sistemik dolaşım arasındaki metabolik değişim oldukça yavaştır⁴⁷, bu da retinanın yüksek metabolik aktivitesinin bir sonucu olarak büyük miktarda oksidatif stresle baş etmesi gerektiği anlamına gelir.

Nükleer katarakt ve açık açılı glokom gibi oksidasyonla ilişkili oküler patolojileri önleyebilmek için göz içi oksijen düzeyleri sıkı şekilde düzenlenmekte ve oldukça düşük seviyelerde tutulmaktadır. Fizyolojik koşullar altında oksijen, koroid ve retina damar sisteminden VH'ye yayılmakta ve oksijen gradienti ile lens hipoksik koşullar altında tutulmaktadır⁴⁸⁻⁵². Bu gradient vitrözün yüksek viskozitesi ve vaskülarize yapılardan gelen büyük miktardaki moleküler oksijeni biyokimyasal olarak ortadan kaldırması ile sağlanır. Bu işlevinde VH'nin biyofiziksel özelliği kritik öneme sahiptir. Şekil 2.3'de VH içerisindeki oksijen gradienti temsil edilmektedir.



Şekil 2.1- İnsan gözünde vitröz humor içerisindeki oksijen gradienti.

VH'nin oksijen transportu üzerindeki etkisi haricinde, araştırmalar oksidasyona bağlı oküler hasardan kaçınmak için göz içerisinde esansiyel olan dşuk oksijen seviyelerini sağlamada VH'nin antioksidan molekülleri ile oksijen tkretimini önemi ortaya konulmuştur^{49,53}. Araştırmalar neticesinde normal VH'nin oksijeni metabolize ettiği ve oksijen seviyelerini %1 düzeylerinde tuttuğu gösterilmiştir. VH, gözü oksidatif stresten koruyabilen yüksek konsantrasyonda suda znr antioksidan moleküller iermektedir^{54,55}. Bu antioksidanların reaktif oksijen türlerini (ROT) temizlediği ve proteolitik enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği pek çok araştırmada gsterilmiştir^{56,57}. VH antioksidanları arasında yer alan askorbik asit (AA)'in vitrözdeki rolü birden çok araştırmada incelenmiřtir⁵⁸⁻⁶⁰. Shui ve arkadaşları, vitrözün AA bağımlı bir şekilde moleküler oksijeni metabolize ettiğini ve böylece göz içi oksijen basıncını düzenlemede etkin rolü olduğunu, ayrıca jel formda vitrözün daha yüksek bir AA konsantrasyonuna sahip olduğunu ve oksijeni sıvı vitrözden daha hızlı tükettiğini bulmuřlardır². Sağlam vitrözde AA konsantrasyonunun, plazma konsantrasyonundan 33-40 kata kadar daha fazla^{61,62} olduğu ve sıvılaşmış vitrözde ve proliferatif diyabetik retinopati hastalarının vitrözünde daha dşuk seviyelerde bulunduğu gsterilmiştir^{2,63}.

VH tarafından aktif şekilde korunan göz içi oksijen konsantrasyonu, VH'de meydana gelen değişikliklerden etkilenmektedir. Yaşlanma ile ilişkili dejenerasyon, vitrektomi veya farmakolojik vitreolizin bir sonucu olarak vitröz jel yapının bozulması, vitröz jelin oksijen tkete yeteneğinde azalmaya neden olarak, oksijen gradientinde azalmaya sebep olmaktadır⁶⁴. Neticede oküler yapılar aşırı oksijene maruz kalmaktadır. Bu olaylar zincirinin sonucunda yüksek oksijene maruz kalan lens proteinlerinin oksidasyonu sonucunda katarakt^{2,64,65} ve oksidatif stresin trabeküler ağ hücrelerine verdiği zarar nedeniyle glokom gelişim riskinde artışa neden olduğuna dair kanıtlar mevcuttur⁶⁶⁻⁶⁸.

2.1.5 Makromoleküler Kompozisyonu

VH, kollajen ve non-kollajen proteinler ve GAG gibi karbonhidrat moleküllerinden meydana gelen bir ekstraselüler matrikstir. Bu moleküllerin organizasyonu neticesinde mevcut jel yapı sağlanmaktadır.

Vitröz Humordeki Proteinler

İnsan VH'sindeki genel protein konsantrasyonu 0,5 ile 1 mg/ml arasındadır ve proteomik analizlerde VH'de 1000'den fazla protein tanımlamıştır⁶⁹. Protein içeriğinin yüksek bir kısmı plazmadan kaynaklanmaktadır; albümin ve immüoglobulinler insan vitrözündeki proteinlerin %80'inden fazlasını temsil etmektedir⁷⁰. Plazma proteinleri haricinde vitröz içerisinde pek çok hücre içi protein de tespit edilmiştir.

Araştırmamızın temel amacı gereğince burada odaklanılacak olan protein grubu vitrözün ekstraselüler matriks proteinleri olacaktır. Bunlar, kollajenler gibi VH'nin biyofiziksel özelliklerine katkıda bulunduğu bilinen veya katkıda bulunabilecek yapısal moleküllerdir. Bu proteinlerin çoğu karbonhidratlarla modifiye edilir ve kısa oligosakarit yan zincirleri varsa glikoproteinler ve bağlı bir veya daha fazla GAG zinciri varsa proteoglikanlar olarak anılacaktır.

A. Vitröz Humurun Kollajen Ekstra-Selüler Matriks Proteinleri

Vitrözdeki toplam kollajen konsantrasyonu düşüktür ve insan vitrözünde yaklaşık 300 µg/ml'dir ve vitrözün toplam protein içeriğinin %0,5'ini oluşturmaktadır⁷¹. Kollajen konsantrasyonu vitrözün her yerinde homojen değildir. En yüksek konsantrasyon bazal vitrözde iken, vitrözün santral ve arka kısmına doğru konsantrasyon azalmakta, periferik kortikal tabakasında ise yeniden artış göstermektedir⁷². Düşük konsantrasyonda kollajen içermesine rağmen VH'nin jel yapısını sağlayan temel şey kollajenlerin çatısını oluşturduğu fibriler ağdır. Kollajen fibrillerinin ortadan kaldırılması ile boşluklu ağ yapı bozulmakta ve bu durum vitröz jel yapının sıvılaşması ile sonuçlanmaktadır^{3,73}.

Yetişkin vitrözünde bulunan ana kollajen, kırık dokuda da bolca bulunan tip II kollajendir⁷⁴. Tip II kollajen molekülleri, heterotipik kollajen fibrillerinin ana kısmını oluşturmak üzere kovalent olarak çapraz bağlanır ve tip V/XI ve IX kollajenleri ile heterotipik kollajen fibrillerini oluştururlar. Kırık dokuda kollajen fibrilleri de benzer şekilde heterotipik II, IX ve XI kollajen tiplerini içermektedir¹⁷. Vitrözün jel formu, bu heterotipik kollajen fibrilleri tarafından oluşturulan ağ yapısı ve boşluklarda yer alan yoğun su tutma özelliği bulunan hyaluronan moleküllerinin varlığı ile sağlanmakta ve sürdürülmektedir.

A.1. Tip II Kollajen

Vitrözdeki baskın kollajen tipi, toplam kollajenin yaklaşık %60-75'ini oluşturan tip II kollajendir⁷⁵. Fibriler kollajen grubunun bir üyesi olan tip II kollajen molekülü, üç özdeş α zincirinden $[\alpha 1 (\text{II})]_3$ oluşmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1- VH'nin üç temel kollajenin α zincir yapıları.

Kollajen Tipi	VH kollajen α zincirleri	Kıkırdak Kollajen α zincirleri
II	$\alpha 1(\text{II})_3^a$	$\alpha 1(\text{II})_3$
V/XI	$\alpha 1(\text{XI})_2$	$\alpha 1(\text{XI})$
		$\alpha 2(\text{XI})$
		$\alpha 3(\text{XI})$
	$\alpha 2(\text{V})$	
IX	$\alpha 1(\text{IX})^b$	$\alpha 1(\text{IX})$
	$\alpha 2(\text{IX})$	$\alpha 2(\text{IX})$
	$\alpha 3(\text{IX})$	$\alpha 3(\text{IX})$

^a VH tip II kollajenin alternatif mRNA birleştirme ile üretilmiş uzun ve kısa formları

^b VH $\alpha 1(\text{IX})$ zincirinin alternatif birleştirme ile üretilmiş kısa formu

Kimyasal bileşimde bir miktar farklılık gösterse de VH tip II kollajenin, kıkırdak doku tip II kollajeni ile makromoleküler benzerliği, Marfan ve Ehlers-Danlos sendromları gibi kalıtsal kollajen bozukluklarında her iki dokunun da karakteristik klinik belirtiler göstermesinin temel nedenidir⁷⁶.

A.2. Tip V/XI Kollajen

Yapı ve fonksiyon bakımından çok benzer olan Tip V ve tip XI kollajenler başlangıçta farklı kollajen tipleri olarak tanımlanmışsa da daha sonra her iki kollajen türünden zincirler içeren hibrid kollajen moleküllerin varlığı ortaya konulmuş ve tip V/XI kollajen terimi ortaya çıkmıştır. Vitröz dahil bazı dokularda bu hibrid kollajenler

izlenmektedir. Bu nedenle, bu iki kollajenin artık ayrı antiteteler olarak görülmemesi gerektiği, hepsinin V/XI kollajen ailesinin bir parçası olarak kabul edilmesi gerektiği öne sürülmüştür⁷⁷.

Vitrözün heterotipik fibrillerinde kollajenin yaklaşık %10-25'ini oluşturan Tip V/XI kollajen, tip II kollajen ile heterotipik fibrillerin çekirdeğini oluşturmak için birleşen fibriler bir kollajendir⁷⁸. Yapılan çalışmalar, tip V/XI kollajenin, kollajen fibril formasyonunda ve kollajen fibril çapının düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir⁷⁹.

A.3. Tip IX Kollajen

Vitröz kollajenin yaklaşık %25'ini oluşturan, tip IX kollajen, heterotipik kollajen fibrillerin yüzeyinde bulunmasına rağmen fibriler bir kollajen değildir^{75,78}. Bunun yerine, aynı zamanda XII, XIV kollajenlerini de içeren FACIT (kesintili üçlü sarmallara sahip fibril ilişkili kollajenler) kollajen grubuna aittir. Góes ve arkadaşları, tavşan vitrözüne kondroitin ABC liyaz uygulandıktan sonra kollajen IX'un kondroitin sülfat zincirlerinde bozulma olduğunu bildirmişlerdir⁸⁰. Kollajen IX'da izlenen morfolojik değişimin, kollajen II'nin yüzeyinde yarattığı koruyucu etkiyi azaltarak, kollajen II fibrillerinin lateral füzyona, fibriler agregasyona ve sıvılaşmaya müsait hale getirdiği gösterilmiştir⁸¹.

A.4. Tip VI Kollajen

VH, tip II, V/XI ve IX kollajene ek olarak az miktarda tip VI kollajen de içermektedir⁸². Heterojen kollajen fibriller arasında bulunmayan tip VI kollajenin, fibriler kollajenleri ve hyaluronanı bağladığı gösterilmiştir, bu nedenle vitrözde heterotipik kollajen fibrilleri ve hyaluronanı birbirine bağlamada bir rolü olduğu, ayrıca tip VI kollajen mikrofibrillerinin vitreo-retinal adezyona katkı sağladıkları öne sürülmüştür¹⁷.

A.5. Vitrözün Heterotipik Kollajen Fibrilleri

Vitrözün heterotipik kollajen fibrilleri, türlere göre çap değişmekle beraber, aynı çapta ince, dallanmamış fibrillerdir^{83,84}. Bu fibriller üç farklı kollajen tipinden (II, V/XI ve IX) oluşan halat benzeri yapılardır.

Kollajen tip II ve V/XI uzun ince lifler oluşturmak için çapraz bağlanmış fibriler kollajenlerdir. Tip IX kollajen, tip II kollajene çapraz bağlanır ve bu fibrillerin yüzeyi boyunca düzenli olarak hizalanır.

Kıkırdak doku ve nukleus pulposusun kollajen fibrilleri de benzer şekilde kollajen tip II, V/XI ve IX içermektedir. Kıkırdak dokuda ince ve kalın fibriller karışık şekilde bulunmaktadır.

VH kollajen fibrillerinin çekirdeği, kollajen II ve kollajen V/XI'in bir kopolimeridir. Diğer dokularda, kollajen V/XI formlarının başlangıçta ilkel fibriller olarak biriktirildiğine ve daha sonra diğer fibriler kollajenlerin birikmesi için bir çekirdeklenme yeri sağladığına dair kanıtlar vardır, bu da VH için tip II kollajen olacaktır.

Tip IX kollajen, fibril yüzeyleri boyunca düzenli olarak dağılmakta ve çapraz bağlanmaktadır. Tip IX kollajen VH'de kondroitin sülfat içeren bir proteoglikandır. Bu kondroitin sülfat zincirleri fibrillerin yüzeyi boyunca düzenli olarak dağılmaktadır ve ileride tartışılacağı gibi bunların kollajen fibrillerini birbirine bağlamada ve birbirinden ayırmada önemli olduğu düşünülmektedir. Yaşlanma ile birlikte fibril yüzeyinden tip IX kollajen kaybı olduğu ve bu nedenle tip II kollajenlerin birbirleri ile temas etmesine neden olduğu öne sürülmüştür⁸¹.

B. Vitrözün Non-Kollajen Ekstraselüler Matriks Bileşenleri

B.1. Fibrillin

Vitröz, heterotipik kollajen fibrilleri ve tip VI kollajen mikrofibrilleri içermesinin yanı sıra, fibrilin içeren mikrofibriller isimli üçüncü tip bir fibril yapısı içerir³.

Fibrillin içeren mikrofibrillerin vitröz yapısına önemli bir katkı yapıp yapmadıkları bilinmemekle birlikte, fibrillin-1'i kodlayan gendeki mutasyon sonucu ortaya çıkan Marfan sendromunda izlenen artmış regmatojen retina dekolmanı riskinin, vitröz içindeki anormal fibrilin içeren mikrofibrillerin bir sonucu olarak vitröz jelin yapısal bütünlüğünün bozulmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir⁸⁵.

B.2. Fibulin

Fibulinler, hücre dışı matriks glikoprotein ailesidir. Bu moleküllerin hücre dışı matriks düzenlenmesinde bağlayıcı role sahip olduğu düşünülmektedir. Fibulin-1 ve 3 vitrözde tanımlanmıştır. Vitrözün jel yapısını sürdürmede rolü olup olmadığı bilinmemektedir.

B.3. Versikan ve Link Proteinleri

Versikan insan dokularının hücre dışı matriksinde yer alan bir hücre dışı matriks kondroitin sülfat proteoglikandır. Versikanın vitrözde bulunduğu ve hyaluronana bağlandığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir⁸⁶. Wagner sendromu/erozif vitreoretinopati, versikan genindeki mutasyonların neden olduğu vitröz anormalliklere sahip kalıtsal bir durumdur⁸⁷.

B.4. Agrin ve Tip XVIII Kollajen

Agrin ve tip XVIII kollajen iç sınırlayıcı membran dahil bazal membranların yapısında bulunan heparan sülfat proteoglikanlardır. Cıvciv vitrözünde tanımlanmışlardır, ancak memeli vitrözünde bulunup bulunmadıkları veya vitröz jelin yapısal stabilitesini korumada bir rol oynayıp oynamadıkları açık değildir.

B.5. Optisin, Trombospondin, Pigment epiteli kaynaklı faktör ve Lösinden zengin alfa-2- glikoprotein

Vitröz içerisinde yer alan antianjiyogenik protein/glikoproteinlerdir.

Vitröz Humordeki Glikozaminoglikanlar ve Proteoglikanlar

GAG'lar tekrarlayan disakkarit ünitelerden oluşan ekstraselüler matriks polisakkaritleridir. Hyaluronan hariç hepsi protein bir çekirdeğe bağlı olarak sentezlenirler. Sonuçta elde edilen makromolekül proteoglikan olarak adlandırılır.

Memeli vitrözünde baskın GAG türü hyaluronan iken kondroitin sülfat ve heparan sülfat gibi sülfatlanmış GAG'lar da düşük oranda bulunurlar^{88,89}.

Hyaluronan

Hyaluronan, ağ yapılar oluşturan ve ozmotik bir tampon veya kayganlaştırıcı olarak da işlev görebilen yüksek oranda hidratlanmış, negatif yüklü bir polianyondur. Bu doğrusal biyopolimer, VH, deri, sinoviyal sıvı ve göbek kordonu dahil olmak üzere bağ dokunun önemli bileşenidir.

VH'deki baskın GAG hyaluronandır⁹⁰. Memeli VH'sinde kollajen fibriler ağın arasını dolduran hyaluronan, vitrözün fiziksel özelliklerinde önemli rol oynamaktadır. Vitrözün yapısal özelliklerini sağlama ve sürdürmede kollajen ve diğer proteoglikanlarla sinerjistik bir rol oynar⁹¹.

Esas olarak tek ana yapısal polisakkarit olarak hyaluronan içeren sadece birkaç bağ dokusu bölgesi vardır. Bunlar; vitröz, umbilikal kord, horoz ibiği ve eklem boşluğu etrafındaki sinoviyal dokudur. Tüm bu dokularda hyaluronanın işlevlerinden en önemlisi kollajen fibriler ağı stabilize etmektir. Kollajen fibrilleri ve hyaluronan molekülleri arasındaki bu etkileşim, ağırlıklı olarak zayıf etkileşimlere bağlıdır, yani VH'nin bu iki bileşenin, denatüre olmadan filtrasyon veya santrifüj gibi mekanik kuvvetlerle ayrılabilmesi anlamına gelir.

Kondroitin Sülfat Proteoglikanlar

VH iki farklı yapıda kondroitin sülfat proteoglikan içermektedir. Bunlar yukarıda bahsedilmiş olan tip IX kollajen ve versikandır^{75,89}.

Heparan Sülfat Proteoglikanlar

Heparan sülfat proteoglikanları genellikle retinanın iç sınırlayıcı tabakası gibi bazal membranlarda ve hücre yüzeylerinde bulunmaktadır.

Vitröz Humorun Supramoleküler Organizasyonu, Morfolojisi ve Kollajenler Arası Mesafe

VH'nin yapısında yer alan makromoleküller supramoleküler organizasyon gösterdikleri için VH'nin jel kıvamına sahip olduğu bilinmektedir. Literatürde, stabil bir vitröz yapı oluşturmak ve bütünlüğünü sürdürmek için gerekli makromoleküler

organizasyon ile ilgili birtakım hipotezler öne sürülmüştür. VH'nin jel yapısının sürdürülmesinde heterotipik kollajen fibrillerinin önemli rolü mevcuttur. Bu durum kollajen fibrillerinin, kollajenaz sindirimi ile ortadan kaldırılması durumunda vitrözün jelden viskoz bir sıvıya dönüştürdüğünü gösteren deneylerle kanıtlanmıştır^{3,92}. Jel form doğrudan birbirine bağlanmayan, dallanmamış kollajen fibrillerinin seyreltik bir dağılımı ile korunmaktadır. Bununla birlikte, kollajen fibrillerin doğası gereği bir araya toplanma eğiliminde oldukları iyi bilinmektedir. Bu nedenle, vitröz jelin nasıl organize olduğunu ve stabilize edildiğini anlamak için, bir yandan stabil jel yapıyı muhafaza etmek için kollajen fibrillerin nasıl birbirine bağlandığını bir yandan da kollajen fibrillerinin toplanmasını neyin engellediğini anlamak gerekmektedir.

Doğası gereği agrege olma eğiliminde olan kollajen fibrillerin aralarındaki boşluğun nasıl korunduğuna yönelik çeşitli hipotezler bulunmaktadır.

Elektron mikroskobu incelemelerine dayanan kanıtlar, vitrözün kollajen fibrillerinin zaman zaman birbirine paralel ilerleyebildiğini ve agrege olmadan birbirine yakın konumlanabildiklerini göstermektedir. Bunda tip IX kollajen moleküllerinin kondroitin sülfat zincirlerinin rol aldığını işaret edecek şekilde, katyonik boyalarla boyandıktan sonra elektron mikroskobu ile görüntülendiğinde, GAG zincirlerinin komşu kollajenler arasında bağ kurarak merdiven benzeri bir konfigürasyonda onları birbirinden ayırdıkları izlenmiştir³.

Kondroitin sülfat zincirlerinin birbirleriyle zayıf etkileşimler yapabildikleri ve bu merdiven benzeri konfigürasyonların, birbirine bağlanan bitişik kollajen fibrillerinden türetilen GAG zincirlerinin bağ yapmasıyla üretildiği öne sürülmüştür^{93,94}. Bununla birlikte, katyonik boyalarla boyandığında görülen çökmüş GAG zincirleri, in-vivo koşullarda rastlanan yüksek oranda hidratlanmış formlara çok az benzerlik gösterdiğinden, bu görünümlerin esasen artefakta bağlı olabileceği, tip IX kollajen proteoglikanın kondroitin sülfat GAG zincirlerinin kısa menzilli fibriler aralığına katkı sağladığı düşünülse de vitröz jelde kondroitin sülfat zincirlerinin depolimerizasyonunun jel yapıyı bozmadığı gösterilmiştir⁹⁵. Bu nedenle, kondroitin sülfat zincirlerinin, en azından kısa menzilli jel hali korumak için gerekli olmadığı söylenebilir.

Hyaluronanın da kollajen fibril aralığının korunmasına katkıda bulunuyor olabileceği düşünülmektedir. Hyaluronan, yüksek oranda hidratlanmış halinden dolayı büyük hacimler kaplamakta ve kollajen fibriller arasındaki boşluğu doldurmaktadır. Fibriller arası aralığı korumada hyaluronanın rolü, günümüze kadar önemli tartışmalara konu olmuş ve aralığın korunmasında ve dolayısıyla jel yapının stabilize edilmesinde önemli bir rol oynadığı modeller önerilmiştir^{77,93}. Bununla birlikte, streptomycetes hyaluronan liyaz ile sindirilerek hyaluronan ağ örgüsünün vitröz jelden tamamen çıkarılmasının mümkün olduğu, ancak bu durumun, jelin ıslak ağırlığında bir miktar azalmaya neden olurken, jel yapısını bozmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, hyaluronan uzun menzilli aralığı ve dolayısıyla jel yapısını korumak için kesin gerekli olmadığı, ancak jelin mekanik stabilitesini artırması muhtemeldir. Hyaluronanın daha düşük konsantrasyonda Streptomycetes hyaluronan liyaz ile sindirilmesi, vitröz hyaluronanın %94'ünün depolimerize olması ile sonuçlanmış ancak enzimle sindirilmiş jelin ıslak ağırlıkları, kontrol jellerden farklı izlenmemiştir⁹⁵. Bu, toplam hyaluronanın küçük bir yüzdesinin (%6) vitrözünü tamamen şişmiş durumda tutmaya katıldığı anlamına gelmekte diye düşündürmektedir.

Scott tarafından önerilen olası bir diğer mekanizma, heterotopik fibriller üzerindeki tip IX kollajene bağlanan kondroitin sülfat zincirlerinin hyaluronanı bağlayıcı olabileceği ve böylece genişlemiş GAG ağının bir parçasını oluşturabileceğidir⁹³. Bununla birlikte, bugüne kadar, böyle bir bağlanmanın meydana gelebileceği fikrini destekleyecek ikna edici fiziksel veriler bulunmamaktadır.

Kollajen fibril aralığının sağlanmasında potansiyel bir role sahip olan bir başka molekül de optisindir. Diğer dokularda, kollajene bağlanan ekstraselüler matriks lösinden zengin tekrar proteinlerinin, fibril agregasyonunun önlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu rol, farelerde lumikan ve dekorin genlerinin yok edilmesi ile en açık şekilde gösterilmiştir. Lumikan yoksun farelerin opak kornealara sahip olduğu ve elektron mikroskobu ile kollajen fibrillerinin lateral topaklanması görüntülenmiştir. Dekorin yoksun fareler, yanal olarak topaklanmış daha ince kollajen fibrilleri temsil ettiği düşünülen kalın fibriller içeren kırılğan bir cilde sahip olarak izlenmiştir. Vitröz kollajen

fibrillerinin yüzeyinde bulunan baskın ekstraselüler matriks lösinden zengin tekrar proteini olan optisin kollajen fibrillerin kısa menzilli aralığına katkıda bulunuyor olabilir.

Tip IX kollajen kondroitin sülfat zincirlerinin, hyaluronan ve optisinin kollajen fibrillerin aralıktaki potansiyel rolleri tartışılmış olmakla beraber bu olaya kollajen fibrillerin yüzeyindeki versikan ve henüz tanımlanmamış diğer makromoleküller de katkı sağlıyor olabilirler. Vitrözün kollajen fibrillerinin, bir yandan kısa menzilli etkileşimine izin veren, ancak diğer yandan kapladıkları kollajen fibrillerin birbirleriyle kümelenmesini önleyen makromoleküllerle kaplanmış olduğu öne sürülen hipotezlerden bir diğeridir.

Tüm bu veriler, jel durumunun, kollajen fibriller ağ ve ağ ile ilişkili yüzey makromolekülleri tarafından oluşturulan çözelti içinde sürdürülebileceğini göstermektedir. Bu, kollajen fibriller ağının dolaylı etkileşimler yoluyla bitişik olduğunu ve kollajen fibriller ağın, çözelti içinde kendisini desteklemek için yeterli mekanik esnekliğe sahip olduğunu göstermektedir. Optisin veya tip IX kollajen (kondroitin sülfat zincirleri aracılığıyla) gibi kollajen fibrillerin yüzeyindeki makromoleküller, bitişik bir ağ sağlamak için kollajen fibrillerin dolaylı olarak birbirine bağlanmasında rol oynadığını söylemek mevcut veriler ışığında uygun olacaktır.

Fibriller aralık oluşumunu sağlayan mekanizmaların bozulması, doğal olarak yapışkan özelliği olan kollajen fibrillerinin birbiriyle temas etmesi ve kollajen fibrillerin topaklanması ile sonuçlanmaktadır.

Kollajen fibriller bir kez topaklandıktan sonra, bunları birbirlerinden ayırmak çok zordur ve en sonunda fibriller arasında çapraz bağların oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Zamanla bu kollajen topakları, ışık mikroskobu ile görülebilecek kadar büyük hale gelmektedir. Topaklanma, VH içerisinde kollajenin yeniden dağıtılmasına ve bazı alanların kollajenden yoksun bırakılmasına neden olacak ve bu alanlar, kollajen içermedikleri için sıvılaşacaktır.

2.1.6 Vitröz Humorun Klinik Önemi

Sağlam bir VH, sağlıklı bir gözün merkezinde yer almaktadır. VH'nin rolü incelendiğinde, VH'nin diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı, yaşa bağlı maküler

dejenerasyon, nükleer sklerotik katarakt ve primer açık açılı glokom dahil olmak üzere gözü etkileyen birçok hastalık sürecinde merkezi rol oynadığı görülmektedir. Sonuç olarak, VH'de meydana gelen değişikliklerin komşu göz yapılarında birçok patolojinin gelişiminde patolojik ilk adım olabileceği düşünülmektedir.

Vitröz Yaşlanma: Senil Sıvılaşma ve Posterior Vitröz Dekolman

İnsan vücudundaki hemen her doku gibi, vitröz humorde de yaşlanma ile birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Vitrözün tipik hayat seyrinde birbiriyle ilişkili iki temel değişiklik meydana gelmektedir. Bunlardan birincisi vitröz humorde sıvılaşma, diğeri ise vitreoretinal yapışmanın zayıflamasına bağlı olarak vitrözün progresif olarak retina posteriorundaki bağlantılarından ayrılmasıdır. Bu iki değişikliğin kombinasyonu posterior vitröz dekolman (PVD) ile sonuçlanmaktadır⁹⁶.

Vitröz Sıvılaşma

Gençlikte uniform bir yapıya sahip olan vitröz, yaşlanmayla beraber homojen yapısını bozan kollajen fibrillerde yanal topaklanma gibi birtakım fiziko-kimyasal değişikliklere uğramaktadır^{3,20}. Bu durum vitröz içerisinde kollajen kümelerinin oluşumuna ve kollajen fibrillerin yeniden dağıtılmasına haliyle bazı alanlarda fibril yokluğuna neden olmaktadır. Neticede, vitröz içerisinde sıvılaşan lokal alanlar oluşmaya başlamaktadır^{97,98}.

Sıvılaşma sürecinde ortaya çıkan kollajen fibriller topaklanma ve vitröz içerisindeki kümelenme ışığın transmisyonunu engelleyerek ve retinada gölgeli bir görüntü oluşumuna yani floaters'lara (göz önünde uçuşan camsı cisimler) neden olmaktadır. Yeni doğanda vitröz oldukça şeffaf iken doğumdan birkaç on yıl sonrası itibariyle kollajen kümelenmeler meydana gelmeye başlar ve sıvı alanlarında büyüme ve sayıca artış izlenir. Sonraki on yıllarda kümelenme miktarı ve haliyle floater miktarı artar. Bu değişim her bireyde aynı oranda gözlenmez ancak yapılan gözlemsel incelemelerde 70'li yaşlarda vitrözün yaklaşık %50'sinin sıvılaşmış olduğu rapor edilmiştir⁹⁹.

Yaşa bağı vitröz sıvılaşmanın, fibriler aralık oluşumunu sağlayan mekanizmaların bozulmasından dolayı, doğal olarak yapışkan kollajen fibrillerin topaklanması sonucunda olduğu düşünülmektedir.

Vitröz sıvılaşmanın ve vitreo-retinal yapışmanın zayıflamasının altında yatan neden olduğu öne sürülen birtakım hipotezler mevcuttur. Bunlardan üzerinde en çok durulanı, yaşlanma ile fibril yüzeyindeki tip IX kollajen ve kondroitin sülfat zincirlerinde meydana gelen eksponensiyal kayıp sonucunda tip II kollajen fibrillerinin açıkta kalarak birbirleriyle temas etmeye başlaması ile oluşan fibriler füzyon sebebiyle kollajen fibrillerinin topaklanması ve fibriler aralığın bozulmasıdır^{81,100}. Bu durum vitröz sıvılaşmaya yol açmaktadır. Bu sonuçlar, vitrözün, tip IX kollajenin kondroitin sülfat zincirlerini bozan bir enzim olan kondroitin ABC liyaz ile sindirilmesinin, kollajen fibrillerinin agregasyonu ile sonuçlandığını gösteren bir çalışma ile desteklenmektedir⁹⁵.

İkinci bir hipotez ise yaşla beraber hyaluronan miktarının azalmasıdır. Bishop ve arkadaşları araştırmasında, hyaluronanın vitrözden enzimatik olarak tümüyle çıkarılmasının jelin büzülmesine yol açtığı ancak tam çöküşle sonuçlanmadığı rapor edilmiş, bu nedenle hyaluronanın, yapı için bir ön koşul olmadığı öne sürülmüştür⁹⁵. Bununla birlikte, bu çalışma sadece hyaluronanın çıkarılmasının kısa vadeli etkilerine bakmıştır ve uzun vadede jelin stabilitesi için önemli olması muhtemeldir. Daha sonraki araştırmalarda hyaluronanın vitröz kollajen fibrilleri ile zayıf bir şekilde ilişkili olduğu ve hyaluronidaz sindirimi, kollajen ağının sönmesi ve gevşemesine neden olduğu için hyaluronanın kollajen ağı korumada önemli olduğu gösterilmiştir¹⁰⁰.

Bir diğer hipotez ise, yaşlanma ile kondroitin sülfat gibi diğer fibriler yüzey makro moleküllerinin azalması ve yapışkan tip II kollajen fibrillerin yüzeye çıkması neticesinde meydana gelen fibriler füzyona bağı fibriller arası boşluğun ortadan kalkmasıdır. Yaşlanma ile vitreo-retinal yapışmanın da giderek zayıflıyor oluşu diğer yüzey moleküllerinin ayrıca vitröz ve retina iç yüzeyi arasındaki yapışmayı da sağlıyor olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. Sonuç olarak, kollajen fibrillerin yüzeyindeki moleküler bileşenlerde meydana gelen değişiklikler hem vitrözün sıvılaşmasına hem de vitreo-retinal yapışmanın zayıflamasına neden olarak posterior vitröz dekolman gelişimi sürecinde rol oynuyor olabilir^{97,98,101}.

Son olarak vitröz sıvılaşma için öne sürülen bir diğer hipotez, sıvılaşmanın kollajen fibrillerin parçalanmasına bağlı da olabileceğidir¹⁰¹.

Vitröz sıvılaşmanın nedensel mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da vitröz sıvılaşma ile sonuçlanan süreçte vitrözde meydana gelen yapısal değişikliklerin oluşumundan sorumlu olduğu öne sürülen birkaç hipotez mevcuttur. Vitröz dejenerasyonun artmış oksidatif stres biyobelirteçleri ve proteolitik enzimlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir^{102,103}. Bu veriler ile vitröz bozulma süreci iki kategoriye ayrılabilir: oksidatif stres kaynaklı sıvılaşma ve enzimatik sıvılaşma^{103,104}.

Fotokimyasal reaksiyonlarla üretilen serbest oksijen radikallerin vitröz kollajen ve hyaluronanın moleküler değişimine katkıda bulunarak vitrözde sıvılaşmayla sonuçlandığına dair veriler mevcuttur¹⁰⁵⁻¹¹⁵. Fotosensitizer molekül olan riboflavin içeren vitrözün ömür boyu beyaz ışığa maruz kalması neticesinde giderek artan ROT miktarı ve yaşla birlikte vitrözün antioksidan kapasitesinde meydana gelen azalma ciddi ROT artışı ile sonuçlanmaktadır^{116,55}. Bu veriler ışığında yaşlanma ile vitrözde meydana gelen yapısal değişikliklerin ana nedeni olarak ROT öne sürülmüştür¹⁰⁸.

Vaughan ve ark. artan yaşla birlikte vitrözde kolajenin degradasyonuna ve sıvılaşmaya neden olan progelatinazı aktifleyen plazminojen seviyelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir¹⁰³.

Posterior Vitröz Dekolman

İlerleyen yaşla beraber, vitröz sıvılaşmayla eş zamanlı olarak vitröz korteks de giderek incelik ve posteriorda retinaya daha gevşek yapışmaya başlar. Gevşek yapışma, vitröz sıvılaşmaya neden olan yapısal değişikliklerden biri olduğu öne sürülen, vitrözün heterotipik kollajen fibrillerinin yüzeyindeki bileşenlerin zamanla azalması ya da ortadan kalkması hipotezi ile açıklanabilir. Yaşlanma sırasında kaplayıcı makromoleküler kaybolur veya azalır, fibriller daha az yapışkan hale gelir ve bu durum vitreo-retinal yapışmada zayıflama ile sonuçlanır¹¹⁷. Sonuç olarak, kollajen fibrillerin yüzeyindeki makromoleküler bileşenlerde meydana gelen değişiklikler hem vitrözün sıvılaşmasına hem de vitreoretinal yapışmanın zayıflamasına neden olarak posterior vitröz dekolman

gelişimi sürecinde rol oynayabilir. Vitroz kortekste meydana gelen incelme ise yaşla artan kollajen degradasyonu hipotezi ile açıklanabilir.

Vitröz sıvılaşma, korteksteki incelme ve vitreo-retinal gevşek bağlanma nihayetinde korteks ve retina arasına vitrozün sızmasına ve korteks ve retina arasında ayrılma oluşmasına neden olur. Bu ayrılma fovea çevresinde bulunan sıkı bağlanma bölgesi nedeniyle sıklıkla fovea çevresinden başlar. Çekilmeye bağlı öncelikle çadır benzeri bir görüntü oluşur. Foveal yapışıklık serbest kaldıktan sonra ise görüntü lens şeklini alır.

İlerleyen ayrılma optik sinir üzerinde bulunan yapışma bölgesini de çekmeye başlar. Sonunda vitroz optik sinirden de ayrılır.

Böylece, vitroz korteks sadece gözün ön kısmına yapışık halde kalarak vitroz tümüyle boşluğa açılmış olur. Zamanla kortikal vitroz bazal vitrozün posterior sınırına kadar retinadan ayrılır. Gelişen bu olayların tümüne posterior vitroz dekolman denmektedir^{118,119}. Vitroz korteksin ön kısmı güçlü yapışıklıkları nedeniyle bazal vitroz aracılığı ile retinaya ve siliyer cisime sıkıca yapışık kalmaya devam eder.

PVD genellikle görmeyi tehdit etmese de ışık çakmaları, uçuşan cisimler gibi bir takım görsel şikayetlere neden olmaktadır¹²⁰. Prognozu genellikle iyi olsa da retinal yırtık ve retina dekolmanı gibi kalıcı total görme kaybına kadar ilerleyebilecek önemli komplikasyonlara neden olabilmektedir^{121,122}. Vitreo-retinal yapışmanın güçlü olduğu alanlarda vitroz traksiyona bağlı olarak küçük retinal damarlarda kopmalar ve/veya tam kat retina yırtığı oluşabilmekte, kopan damarlar nedeniyle vitroz hemoraji izlenebilmektedir. Retinal yırtıklara bağlı olarak da görme alanı defektleri, retina dekolmanı gibi durumlar izlenebilir.

Yaşlanma haricinde, yüksek derece miyopi, menopoz ve Stickler sendromu, Ehlers-Danlos sendromu ve LAMA5 multisistem sendromu gibi kalıtsal hücre dışı matriks sendromları, PVD için bilinen diğer risk faktörleridir¹²³⁻¹²⁶. PVD, kısmen miyopik vitrozün erken sıvılaşması nedeniyle emmetroplara kıyasla miyoplarda daha erken ortaya çıkmaktadır¹²⁶.

Retinal Hastalıklarda Vitrözün Önemi

Cerrahi müdahale gerektiren retinal patolojik durumların temelinde sıklıkla kortikal vitröz yer almaktadır. Ciddi vitröz sıvılaşma ve kortikal vitrözün retina yüzeyinden çekilmesi neticesinde, sıkı yapışmaların devam etmesi durumunda anormal posterior vitröz dekolman (APVD) denilen tablo ortaya çıkmaktadır. APVD, vitreomaküler traksiyon, maküler büzüşme, epiretinal membran ve maküler hole gelişimi, retina yırtılması, retina dekolmanı ve retina neovaskülarizasyonu gibi retinal patolojileri ile sonuçlanabilen ciddi bir patolojidir¹²⁷. Tüm bu retina rahatsızlıklarının en sık görüldüğü yaş 50 yaşından sonradır ve bu da PVD'nin en yüksek insidans yaşına denk gelmektedir. Bu nedenle, bu retina bozukluklarının hemen hepsinin altında yatan temel neden olarak VH'nin sıvılaşması olasılığı bulunmaktadır¹²⁸.

Anormal posterior vitröz dekolmanın komplikasyonları: Gözün normal yaşlanma sürecinde tarif edilen, vitröz korteks ve retina arasına sızan vitröz humor zamanla foveadaki sıkı yapışma bölgesinden vitrözün ayrılması ile sonuçlanır. Bazen bu ayrılma gerçekleşmez ve VH foveayı çekmeye devam eder. Bu zorlanma neticesinde retinanın bir parçası alt tabakalarından ayrılır. Bu aşamadan sonra birkaç şey olabilir. Birincisi, vitröz korteks çekmeye devam ettiğinde makula iyice ayrılır ve santral retina üzerinde bir delik oluşur. Bu deliğe makular delik denir. Bu durum görme alanı santralinde küçük bir eksik alana neden olur.

Meydana gelen bir diğer olay ise vitröz korteksin ayrılması ve bir miktar korteksin retina üzerinde yapışık kalması olayıdır. Bu remnant, hyalosit hücreleri içerir ve epiretinal membran isimli bir membran oluşturmaya başlar. Bu hücreler kasılmaya meyillidir ve retina üzerinde kasılarak retinada kıvrımlara neden olur. Bu durum fovea üzerinde ise görmede azalma ile sonuçlanır. Eğer bu remnant doku foveanın sadece bir tarafında ise kasılma tek yönlü olur ve bu durum makular hole oluşumu ile sonuçlanır.

PVD sonrası vitröz, retinaya ve gözün diğer yapılarına sadece önden bağlı halde kalmaktadır. Göz hareket ettiğinde vitröz de hareket edecek ve her göz hareketinde vitröz retinayı çekmeye devam edecektir. Eğer vitröz sıkı bağlı ise ve yeterince sert çekim uygularsa retinayı çekerek alt tabakadan ayrılmasına sebep olabilir. Aslında bu durum

floater oluşumu dışında önemli bulgu vermez ancak çekme kuvveti arttığında retinal yırtık oluşumuna neden olabilir.

Oluşan retinal yırtık, vitrözün sıvı kısmının retina arkasına sızmasına imkân tanır. Sızıntı miktarı arttıkça retina alt tabakalarından ayrılmaya başlar ve ayrılma miktarı giderek artar. Tüm retina ayrılana kadar bu ayrılma devam edebilir. Retina ayrılmaya başlayınca görme alanında defekt oluşur ve ayrılma miktarı arttıkça bu defekt alanı giderek büyür. Bahsedilen bu durum retina dekolmanı (RD) olarak adlandırılmaktadır.

Retina dekolmanı, retinanın çok katlı nörosensör tabakasının temel metabolik ihtiyaçlarını karşılayan altındaki retina pigment epiteli ve koroidden ayrılması olayıdır. Retina, dekolman sonrası oksijen ve besin ihtiyacını karşılayamaz ve gelişen iskemi nedeniyle progresif fotoreseptör dejenerasyonu sonucunda fonksiyonunu kaybeder. Tedavi edilmezse dekolman retinanın tamamını içerecek şekilde ilerler ve kalıcı görme kaybına neden olur.

Gerçekleşme mekanizmasına göre regmatojen, traksiyonel, eksüdatif ve mikst tip olacak şekilde 4 farklı çeşidi olan RD'nin en sık görüleni, yukarıda da bahsedilmiş olan retinal yırtığa sekonder gelişen regmatojen retina dekolmanıdır. En sık, yaşlanmaya bağlı izlenen PVD komplikasyonu olarak izlenen retinal yırtıklar neticesinde oluşur. Retinada yırtık gelişimine neden olan yaşlanma dışında başka risk faktörleri de bulunmaktadır. Bunlar arasında geçirilmiş katarakt cerrahisi, travma, miyopi ve daha az sıklıkta görülen başka patolojiler bulunmaktadır. VH ile ilgili bir diğer retina dekolmanı çeşidi ise traksiyonel tip retina dekolmanıdır. En tipik örneği kontrolsüz diyabet hastalarında da izlenen vitröz skar dokusunun büyüyerek retinayı çekmesine bağlı oluşur. Yeni gelişen retinal damarlara yapışan vitröz çekilme sırasında bu damarlarda yırtılmalara ve vitröz içerisine kanamalara da neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, vitrözün yapısındaki bozulma ile retinal pek çok patoloji ilişkili görünmektedir. Günümüze kadar yapılmış olan araştırmalar, radyoterapi ile vitrözde meydana gelen değişikliklerin radyasyona sekonder retinal patolojilerin gelişimi ile ilişkisi olabileceği fikrini desteklemektedir. Deneysel olarak kanıtlanmamış olsa da radyasyonun vitröz kontraksiyona ve traksiyona neden olduğu, buna bağlı olarak vitröz

ve retinal dekolmana neden olabileceğini öne süren veriler mevcut olmakla beraber bu veriler vaka raporları şeklinde kanıt düzeyi tartışmalı çalışmalardan elde edilmiştir^{129,130}.

Katarakta Vitröz Humorun Önemi

Normal şartlarda lensteki oksijen basıncı oldukça düşüktür¹³¹. Lensin oksijen tüketimi ve oksijen basıncı arttıkça maruz kaldığı oksidatif stres artacaktır⁵³. Lensteki oksidatif strese izlenen artış nükleer sklerotik katarakt gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Lensin hipoksik durumunun sürdürülmesinde vitrözün önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Retinadan gelen oksijen seviyelerinin VH içerisinde öne doğru ilerledikçe azalması ile lens yüksek oksijen düzeylerinden korunmaktadır. Vitrözün ortadan kalkması veya yaşa bağlı veya farmakolojik vitreoliz farketmeksizin vitrözde izlenen sıvılaşma difüzyon oranında artışa ve oksijen tüketim kabiliyetinde azalamaya neden olmaktadır. Oksijen gradientinde azalma neticesinde lensin aşırı oksidasyona maruz kalması nedeniyle bu durum nükleer katarakt gelişimi ile sonuçlanacaktır².

Herhangi bir nedenle hiperbarik oksijen tedavisi alan bireylerin yaklaşık %50 sinde 1-3 yıl içerisinde nükleer katarakt geliştiği rapor edilmiştir¹³². 171 kadavra gözü üzerinde yapılan bir çalışmada Harocopos ve arkadaşları, yaşla ortaya çıkan vitröz sıvılaşmanın doğrusal olarak nükleer sklerotik katarakt ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir¹⁰⁴. Bu raporda sıvılaşma oranı ile katarakt skleroz derecesinin korele olduğu gösterilmiştir

Literatürdeki çalışmalarda, vitrözün cerrahi olarak çıkarıldığı vitrektomi operasyonu sonrasında, göz içerisinde askorbat düzeylerinde azalma ve oksijen difüzyonunda artma geliştiği ve nükleer katarakt gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir^{133,134,49,135-137}.

Vitröz sıvılaşma veya vitrektomi sonrasında değişen difüzyon kapasitesi oksijen difüzyonunda ortaya çıkacak artış kadar ROT gibi başka toksik ürünlerin de lense daha kolay ve daha fazla ulaşması ile sonuçlanacaktır¹³⁸. Örneğin, yağ asitleri bakımından zengin olan retina oksidatif bileşikler tarafından hasar gördüğünde, bu toksik lipid peroksidasyon ürünlerinin vitröz boyunca difüze olup lens posterioruna yayılarak, lenste

antioksidan glutasyon düzeylerini azaltabileceği ve katarakta neden olabileceği hayvan deneylerinden elde edilen veriler neticesinde öne sürülmüştür^{139,140}.

Prematüre vitröz dejenerasyon izlenen Stickler sendromu hastalarında prematüre nükleer sklerotik katarakt izlenmesi de bu bilgileri doğrulamaktadır^{141,142}. Buna ek olarak, erken vitröz sıvılaşma ile ilişkili bir durum olan aksenal miyopi, daha erken başlayan ve emmetropik kontrol gözlerine göre daha yoğun nükleer sklerotik katarakt oluşumu ile ilişkilendirilmiştir¹⁴³. Bu ilişki, hızlı ilerleyen post-vitrektomi nükleer katarakt gelişen hastalarda, lensin kalitesi, karakteri, rengi, sertliği ve opaklığı, Stickler sendromunda, yüksek miyopide ve yaşa bağlı tipik nükleer katarakta görülenlerle aynı olması ile desteklenmiştir.

Radyasyonla ilişkili kataraktogenezin incelendiği güncel bir araştırmada ise sinovyal sıvı modellerinden elde edilen veriler kullanılarak, hyaluronanın radyolitik depolimerizasyonunun vitröz oksijen difüzyonunu artıracığı ve düşük LET 1 Gy'lik ışınlama sonrası lens arkasındaki oksijen miktarında %20'den fazla artış olacağı tahmin edilmiştir. Bu durumun lenste yüksek oksijen basıncı düzeyleri ile sonuçlanması ve lensin hipoksik koşullarını bozacağı düşünülerek radyasyonun vitröz üzerindeki etkilerinin lens metabolizmasını etkileyeceği ve sonuç olarak katarakt oluşum riskini artıracığı öne sürülmüştür¹³⁸.

Sonuç olarak sağlam bir vitröz ve korunan düşük oksijen seviyeleri, lensi oksidatif strese karşı korumakta ve böylece lens şeffaflığının sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. Yaşlanmaya bağlı, cerrahiye bağlı veya genetik fark etmeksizin vitrözün yapısındaki bozulma ile katarakt ilişkili görünmektedir. Tüm bu çalışmalar radyoterapi ile vitrözde meydana gelen değişikliklerin radyasyona sekonder lens hasarı/katarakt gelişimi ile ilişkisi olabileceği fikrini desteklemektedir.

Glokomda Vitröz Humorun Önemi

Vitrektomi ile ilgili araştırmalar, sağlam bir VH'nin açık açılı glokoma karşı koruma sağladığına dair kanıtlar sunmuşlardır. VH cerrahi olarak çıkarıldığında, uzun süreli takipte gözlerin önemli bir yüzdesinde glokom izlenmektedir. Vitrektomi cerrahisinden sonra artmış glokom riskini gösteren ilk kişi olan Chang sonrasında yapılan

diğer araştırmalar vitrektomi ve vitröz sıvılaşmanın primer açık açılı glokom vakalarının yaklaşık %15 ila %20'sinden sorumlu olduğuna işaret etmiştir^{67,68}.

Sonuç olarak, vitrözün yapısındaki bozulma ile açık açılı glokom ilişkili görünmektedir. Günümüze kadar yapılmış olan araştırmalara ait bulgular, radyoterapi ile vitrözde meydana gelen değişikliklerin glokom gelişimi ile ilişkisi olabileceği fikrini desteklemektedir.

2.2 Radyoterapi

Radyoterapi (RT) kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan etkin bir tedavi modalitesidir. Dokulardaki etki mekanizması temel olarak direkt etki ve indirekt etki olarak ikiye ayrılmaktadır. Sonuçta her iki mekanizmanın da hedefinde Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'ler yer almaktadır. Direkt etkisi, radyasyonun bizzat kendi enerjisi ile hücre DNA'sında sebep olduğu baz hasarı, tek sarmal kırığı, çift sarmal kırığı benzeri hasarlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Oluşan hasar onarılamazsa hücre apoptoza giderek ortadan kaldırılmış olmaktadır. İndirekt hasarda ise, radyasyonun vücutta bol miktarda bulunan su molekülleri ile etkileşimi neticesinde ortaya çıkan hidroksil (OH^o) radikali gibi ROT'un neden olduğu DNA hasarı neticesinde tümör hücrelerinin ortadan kalkması sağlanmış olmaktadır.

Radyasyonun seçici olarak tümör hücrelerine etki etmemesi ve kat ettiği yol boyunca tüm hücrelerde benzer etkiler göstermesi nedeniyle, ışın demetleri vücut içerisinde seyrettiği sırada içerisinde geçtiği diğer dokularda da DNA hasarı meydana gelmektedir. Oluşan DNA hasarı, sağlam dokularda da hücre ölümüne neden olabilmekte, belirli bir miktar hücrenin ölümü sonrası organın fonksiyonunu kaybetmesine neden olabilmektedir. Haliyle diğer anti-kanser tedavilerde olabileceği gibi, RT uygulanan hastalarda da uzun dönemde birtakım toksisiteler izlenebilmektedir. Bu toksisiteler tedavi sırasında sağlam dokuların almış olduğu radyasyona bağlı meydana gelen hasar neticesinde ortaya çıkmaktadır. Radyasyona bağlı toksisitelerin, oluştuğu takdirde büyük ölçüde kalıcı olması ve tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle hasar gelişmeden önlenmesi önem arz etmektedir.

Geç toksisite beklenen organların maruz kalacağı radyasyon dozunun belirlenmiş tolerans limitlerinin altında tutulması alınabilecek temel önlemlerden birisidir. Geç toksisite beklenen, ışınlama sırasında korunması için dikkat edilen ve birtakım doz limitleri belirlenmiş olan bu dokulara radyasyon onkolojisi terminolojisinde 'Risk Altındaki Organ (RAO)' ismi verilmiştir. Baş ve boyun tümörlerinin, santral sinir sistemi tümörlerinin ve göz ve eklerine ait tümörlerin tedavisinde RT kullanıldığında hedef etrafında göz, beyin sapı, parotis bezi gibi pek çok radyosensitif RAO bulunmaktadır. Bu RAO'lardan biri olan göz ve göze ait (lens, optik sinir, retina gibi) alt yapılar günümüze kadar araştırmalarda incelenmiş, uzun dönem toksisite gelişme riski saptanmış ve bu yapılara ait doz limitleri belirlenmiştir.

Günümüze kadar gözün hemen tüm yapıları ile radyoterapi ilişkisi incelenmiş ve yukarıda bahsedildiği gibi organa özgü doz limitleri belirlenmiş olmasına rağmen, VH ve RT ilişkisini bu amaçla inceleyen, radyoterapinin vitröz humorde yaptığı değişiklikleri tespit edip, varsa bu değişikliklerin gelişimindeki doz yanıt ilişkisini değerlendiren bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Haliyle bu yapı RAO statüsünde değerlendirilmemekte ve herhangi bir doz limiti bulunmamaktadır.

Okülogenez sonrasında önemsiz bir yapı olarak değerlendirilen VH'nin son yıllarda önemli rolleri olduğunu işaret eden araştırmalar giderek artmaktadır. Radyasyon ile olan ilişkisinin incelenmemiş olması da vitröz humorde radyasyon maruziyetinin klinik öneminin henüz net bilinmemesi olabilir.

Günlük pratikte radyasyon tedavisi için en sık kullanılan radyasyon çeşidi lineer akseleratörlerde elektronların hızlandırılarak hedefe çarptırılması suretiyle elde edilen X-ışınlarıdır. X-ışınlarının maddeyle etkileştiğinde iyonizasyona yol açtığı bilinmektedir. Su moleküllerinde meydana getirdiği iyonizasyon ROT'un oluşmasına neden olmaktadır. VH'nin yüksek su içeriği düşünüldüğünde X-ışınlarının vitrözde ROT'da artışa ve böylece majör değişikliklere yol açabileceğini düşünülmektedir.

Göz oldukça radyosensitif bir organdır. Lens, retina gibi alt yapıların radyasyon hassasiyetinin farklı düzeylerde olması nedeniyle göz içerisindeki yapılar ayrı ayrı OAR olarak değerlendirilmektedir. Pek çoğunda radyasyon hasarı kalıcı görme kaybı ile sonuçlanabileceği için tolerans limit dozlarına yüksek önem gösterilmez.

Orbita ve çevresindeki dokuların radyasyon maruziyetine bağlı izlenebilecek uzun dönem toksisiteler; kirpiklerde dökülme, göz kuruluğu, konjunktivit, konjunktival telenjektazi, korneada skar formasyonu, korneal ülserasyon, keratit, irit, katarakt, retinopati, makulopati, papillopati, optik nöropatidir. Bu yan etkilerin görülme insidansı ve şiddeti hedef alanın lokasyonu, hedefin boyutu, radyoterapi toplam dozu, radyoterapi fraksiyon dozu gibi birtakım faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

Radyasyonun lenste yaptığı hasar katarakta, optik sinirde yaptığı hasar optik nöropatiye, retinada yaptığı hasar ise radyasyon retinopatisine neden olmaktadır. Bunların tümü görme bozukluğundan kalıcı görme kaybına kadar ciddi durumlara neden olmaktadır. Bu komplikasyonlar arasında en ciddi olanı, yüksek görme kaybı riski bulunan radyasyon retinopatisidir ve vitröz hemoraji, neovasküler glokom, retina dekolmanı gibi ciddi komplikasyon riski bulunmaktadır. Radyasyon retinopatisi, retina kan damarlarında meydana gelen iskemik hasardan kaynaklanan radyoterapiye bağlı geç bir komplikasyondur¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Semptomların başlangıcı sıklıkla radyoterapiden yaklaşık 6 ay- 3 yıl sonrasında görülmektedir^{144,147}. Daha geç gelişen vakalar da bildirilmiş. Radyasyon dozu arttıkça görülme insidansı artmakta ve >50 Gy den sonra daha fazla görülmektedir¹⁴⁷. Radyasyon retinopatisinde sık izlenen lezyonlar; mikroanevrizma, intraretinal ödem, eksüdasyon, hemorajidir^{144,145,147}.

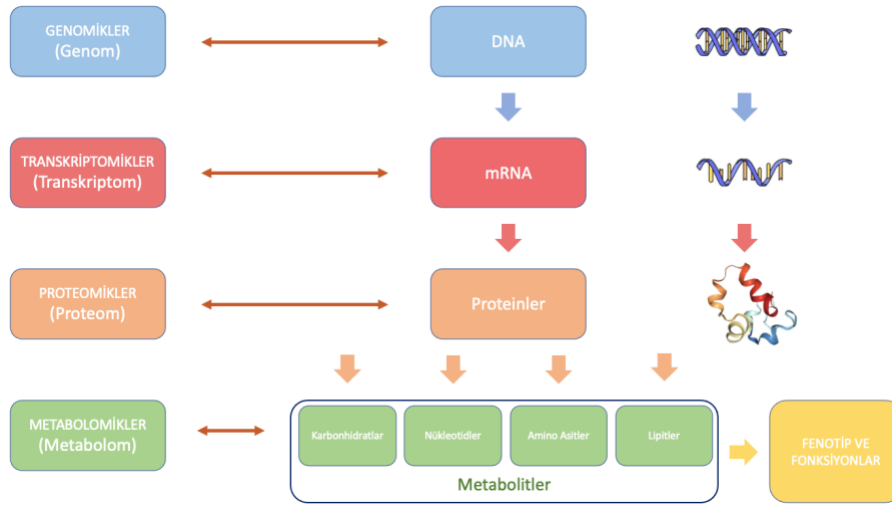
Radyoterapiye bağlı vitröz dekolman günümüze kadar araştırma konusu olmamakla beraber, aynı zamanda vitröz dekolmanın bir komplikasyonu olan retina dekolmanı görülmesi sıklığının radyoterapi sonrası %20'lere varabileceği öne sürülmüştür¹⁴⁸. Buna rağmen RD oküler radyasyon maruziyetinin bir komplikasyonu olarak anılmamaktadır. Radyoterapi sonrası bazı vakalar bildirilmiş olmakla beraber radyasyon ve RD arasında bir korelasyon olasılığı sistematik olarak ele alınmamıştır¹⁴⁹.

Teorik olarak, radyoterapi, vitröz sıvılaşma ve kontraksiyona neden olabilir, vitreoretinal arayüzü değiştirebilir, posterior vitreal korteks ve retinanın iç sınırlayıcı membran arasındaki yapışmayı indükleyerek veya güçlendirerek, retina yırtılma riskini arttırabilir¹⁵⁰. Koroidal maling melanom tanılı hastaların radyoterapi ile tedavi edildiği prospektif bir klinik çalışmada %2 oranında RRD izlendiği rapor edilmiş¹⁵¹, son

zamanlarda retinoblastomalar için regmatojen RD ile radyoterapi arasında şüpheli bir ilişki olduğu bildirilmiştir¹⁵².

2.3 Metabolomikler

Omikler, bir organizmanın yapısına ve işlevine dönüşen biyolojik moleküllerinin toplu karakterizasyonuna ve ölçülmesine imkân tanıyan bir biyoloji bilim dalıdır. Metabolomiks, proteomiks, transkriptomiks, genomiks gibi alt dalları bulunmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.2- Omikler: DNA' dan Metabolomiklere akışın şematik görünümü.

Genomik ve proteomiklerle karşılaştırıldığında, nispeten yeni bir alan olan, ancak tıpta giderek daha önemli bir araç haline gelen metabolomikler, metabolomu inceleyen multidisipliner bir alandır¹⁵³. Bir doku, hücre, biyolojik sıvı gibi bir biyo-örnekte belirli bir zaman diliminde meydana gelen kimyasal süreçler neticesinde, lipid, karbonhidrat, vitamin, hormonlar gibi diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin global olarak saptanması, tanımlanması, miktarının belirlenmesi ve yorumlanması neticesinde bir kanaate varılması olarak tanımlanabilir¹⁵⁴. Metabolomik incelemelerin en önemli avantajlarından birisi patolojik durumların moleküler düzeyde

patofizyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlaması ve çevresel maruziyetlerin etkisinin yorumlanmasına imkân tanınmasıdır¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Tüm genetik transkripsiyon ve translasyon süreçlerinin akışı, biyolojik moleküler aşamaların ve çevre, beslenme, mikrobiyaya gibi eksternal faktörlerin etkisini yansıtan düşük moleküler ağırlıklı moleküller (<1-1.5 kDa) olan metabolitlerdir¹⁵⁸. Metabolitlerle ilgili çalışmalar aslında oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda bilinen belirli bileşiklerin veya biyokimyasal yolların değerlendirilmesi ile sınırlı, yani hedeflenmiş belirli metabolomikler araştırılmaktaydı¹⁵⁹. Diyabet tanısında kullanılan kan şekeri ölçümleri, fenilketonüri taramasında kullanılan fenilalanin ölçümleri ve dislipidemi takibinde kullanılan lipoprotein düzey ölçümleri hedeflenmiş metabolomik ölçümlere örnek olarak verilebilir.

Hedeflenmemiş veya global bir yaklaşım ile gerçekleştirilen metabolomik ölçümler ise, mümkün olduğu kadar çok metabolitin ölçülmesi ve numunelerin karşılaştırılması prensibine dayanmaktadır. Bu tür analizler ile iyi karakterize edilmiş metabolit profilleri içeren "metabolit kitaplıkları" geliştirilmesine olanak tanınmaktadır. Bu kütüphane verileri, tanımlama için numune metabolitlerinin profillerinin karşılaştırılabileceği standartlar olarak kullanılmaktadır. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmaları, yeni keşiflere yol açmış, hücresel yolları biyolojik mekanizmalara bağlayarak ve fizyoloji ve tıp anlayışımızı yeniden şekillendirmiştir¹⁵⁸.

Mevcut metabolomik teknolojik imkanlar, standart laboratuvar tekniklerinin kapsadığından çok daha fazla sayıda, yüzlerce hatta binlerce metabolitin hassas analizini yapabilmeyi mümkün kılmaktadır. İnsan vücudundaki toplam metabolit sayısı, farklı biyolojik örnekler arasında değişiklik göstermekte ve hala toplam miktar kesin olarak bilinmemekle beraber dünya çapındaki en büyük metabolit veri tabanlarından biri olan İnsan Metabolom Veritabanına (<https://hmdb.ca/statistics#metabolite-statistics>, 27.12.2020) göre, insanlarda 92.308'ü endojen olmak üzere en az 114.100 metabolit mevcuttur.

Her vücut kompartmanının kendi ait metabolomu bulunmaktadır, ancak bunlar vasküler ve lenfatik bağlantılar yoluyla birbiriyle ilintilidir¹⁵⁵. Bir ömür boyunca nispeten stabil kalan genotipin aksine, metabolomik zamanla değişmekte ve belirli bir biyo-örneğin

her metabolomik karakterizasyonu, belirli durum ve zamanın o anlık durumunu temsil etmektedir¹⁶⁰. Bu nedenle Omikler arasında, metabolom, fenotipe belki de en yakın olanıdır ve bu nedenle normal ve patolojik durumların yanı sıra dış uyaranların etkisi ve dış uyaranlara tepkisi hakkında bilgi sağlayabilme potansiyeline sahiptir.

2.3.1 İyonizan Radyasyon ve Metabolomik Değişimler

İyonizan radyasyona maruz kalma, nihayetinde endojen metabolizmayı etkileyen bir dizi moleküler olayı tetiklemektedir. Geçmiş metabolomik araştırmalar, radyasyon maruziyetinin dokuya özgü metabolik yanıtlara yol açtığını göstermektedir¹⁶¹⁻¹⁶³. Bu araştırmalara vitröze özgü odaklanıldığında, pek çok araştırmada vitrözdeki metabolomik değişikliklerin konu edildiği görülmekteyken, radyoterapi maruziyeti sonrası vitrözün metabolomik profilinin değerlendirdiği bir çalışma literatürde yer almadığı görülmektedir. Dış uyaranların etkisi ve dış uyaranlara tepkisi hakkında bilgi sağlayabilme potansiyeli nedeniyle, vitrözün metabolomik içeriğinin radyasyon maruziyeti sonucunda neden olacağı değişiklikleri ve bu değişikliklerin düzeyini saptamada önemli veri sağlayabileceği öngörülerek araştırmamıza metabolomik analizler dahil edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Modelinde Kullanılacak Hayvanlar ve Özellikleri

Gerçekleştirmiş olduğumuz deney modelinde, oküler yapılarının anatomik ve fizyolojik özelliklerinin insan ile oldukça benzer özellikler göstermesi nedeniyle tavşan tercih edilmiştir. Ayrıca, literatüre bakıldığında, vitröz ile ilgili oftalmolojik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen tür olması ve ihtiyaç duyulacak örnek miktarı da hesaba katılarak, tavşan gözünün vücuduna oranla büyüklüğü nedeniyle en uygun türün tavşan olduğu saptanmıştır¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

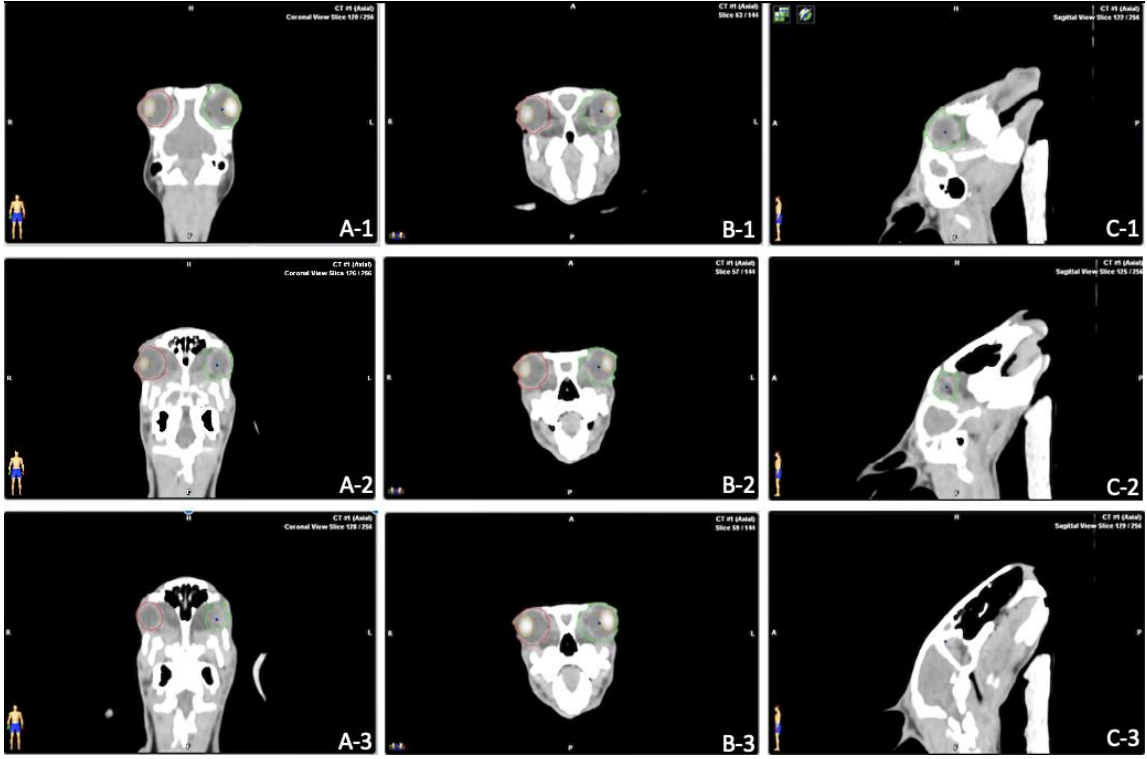
Deneyler 6-8 aylık, 12 adet, erkek cinsiyette Yeni Zelanda beyaz tavşanı üzerinde gerçekleştirilmiş ve araştırma 01.2020- 06.2020 tarihleri arasında tamamlanmıştır.

Bu deneyde kullanılan tüm prosedürler, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. yerel etik kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik onay numarası: Protokol Numarası 400, onay tarihi: 23.09.2019). Etik kurul onay belgesi için Bkz. Ek. 1.

3.2 Radyoterapi Planlama ve Uygulama Süreci

Deney protokolüne dahil edilen tüm tavşanlara GE™ Brightspeed BT Simülatör ile tedavi planlama amacıyla, prone pozisyonda bilgisayarlı tomografi çekilmiştir. Planlama tomografisi çekim işlemi ağrısız olmasına rağmen işlem süresince hareketsiz kalabilmeleri için tavşanlara işlem öncesinde genel anestezi uygulanmıştır. Bu amaçla tavşanlara %2 ksilazin 5mg/kg ve %10 ketamin 35 mg/kg intra-musküler olarak enjekte edilmiştir. Çekim sırasında, ayrıca, baş ve boyunu sabitlemek ve tedavi tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla tavşanların boyun altı bölgesine yerleştirilen şekil alabilir materyal ile her tavşana özel kalıp alınmıştır.

Planlama tomografilerinde tüm hayvanların sağ orbitası hedef, sol orbitası ise kritik yapı olarak konturlanmıştır (Şekil 3.1).



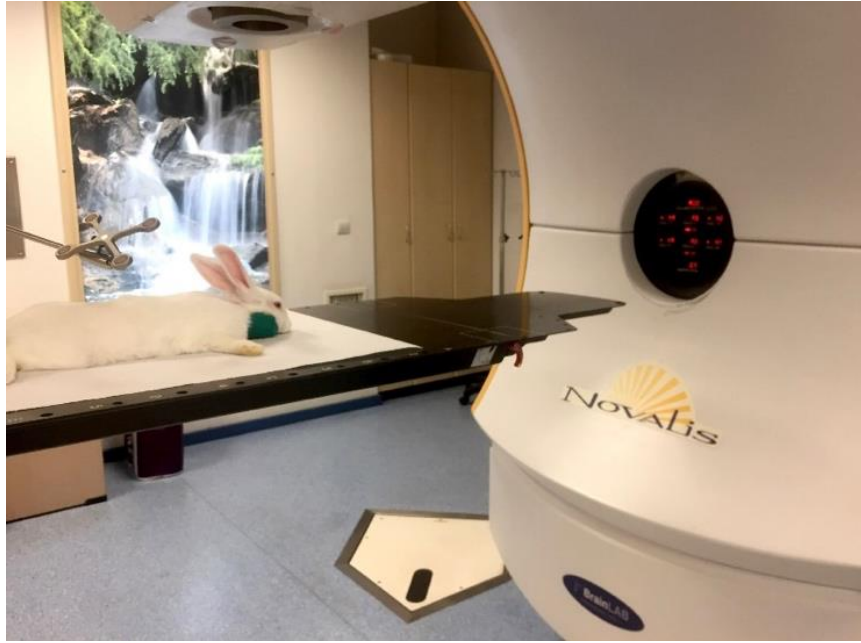
Şekil 3.1- Tedavi planlama tomografisi görüntüleri ve konturlar; A: koronal kesitler; B: aksiyal kesitler; C: sagittal kesitler. Kırmızı çizgi; kontrol orbita, Yeşil çizgi; deneysel orbita- hedef, Turuncu çizgi; lens.

Hedef olarak tanımlanan sağ orbitaya yönelik, 3 fraksiyonda 60 Gy doz reçetelendirilmiştir. Sol orbita kontrol olarak belirlenmiş ve radyasyondan korunacak şekilde BrainLab® iPlan® tedavi planlama sisteminde (TPS) optimizasyon yapılmıştır (Şekil 3.2). Reçetelendirilen doz insan gözünde sık görülen koroidal malign melanom için merkezimizde reçetelendirdiğimiz tedavi doz/ fraksinyasyon şemasına aittir. Optimizasyon neticesinde kontrol gözün aldığı maksimum doz 1.22 Gy, ortalama doz 0.26 Gy olarak izlenmiştir.



Şekil 3.2- Tedavi planına ait izodoz eğrileri (pembe daire %95'lik izodoza ait).

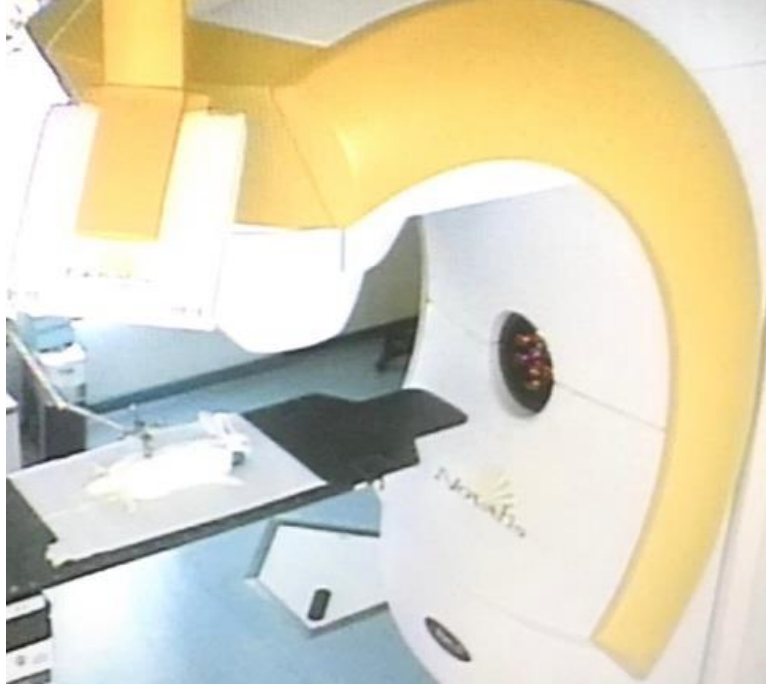
BrainLab Novalis® Linear Hızlandırıcı kullanılarak tavşanların gözlerine 6 MV foton enerjisi ile, 400 MU/dk doz hızında, gün aşırı 3 fraksiyonda, 60 Gy (640 MU) stereotaktik yöntemle radyoterapi uygulanmıştır. Tedavi uygulanması işlemi ağrısız olmasına rağmen işlem süresince hareketsiz kalabilmeleri için tavşanlar işlem öncesi genel anestezi uygulanmıştır. Bu amaçla tavşanlara %2 ksilazin 5mg/kg ve %10 ketamin 35 mg/kg intra-musküler olarak enjekte edilmiştir. Set-up işlemi ve radyoterapi uygulaması sırasında elde olunan görüntüler şekil 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6'da görülmektedir.



Şekil 3.3- Tedavi masası üzerinde, tedavi pozisyonunda uzanmakta olan tavşan.



Şekil 3.4- ExacTrac® portal görüntüleme sistemi ile set-up işlemi.



Şekil 3.5- Tedavi sırasında alınmış kamera görüntüsü 1.

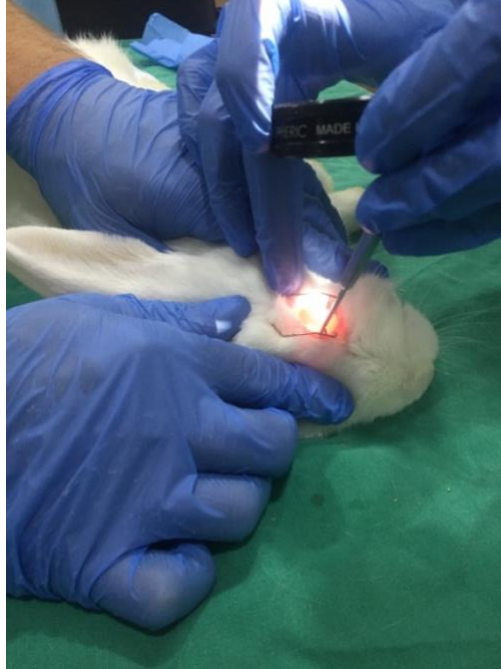


Şekil 3.6- Tedavi sırasında alınmış kamera görüntüsü 2.

3.3 Hayvanların Geç Dönem Toksisiteleri Gözlemleyebilecek Yeter Süre Yaşatılması, Bu Süreçte Barınma ve Beslenme Koşulları ve Rutin Muayene

Radyoterapi uygulamasından sonra, insan gözünde kronik toksisitelerin başlamasının beklendiği 3-4 aylık süre baz alınarak, tüm tavşanlar 3 ay süreyle yaşatıldı. Bu süreçte, 12 tavşan 22-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat gece 12 saat gündüz (ışıklar sabah 08:00'de açılmak üzere) döngüsünde tutulan odalarda, kafeslerde iki tavşan olacak şekilde barındırıldı ve bütün tavşanların deney süresince yem ve suya erişimleri ad-libitum olarak sağlandı.

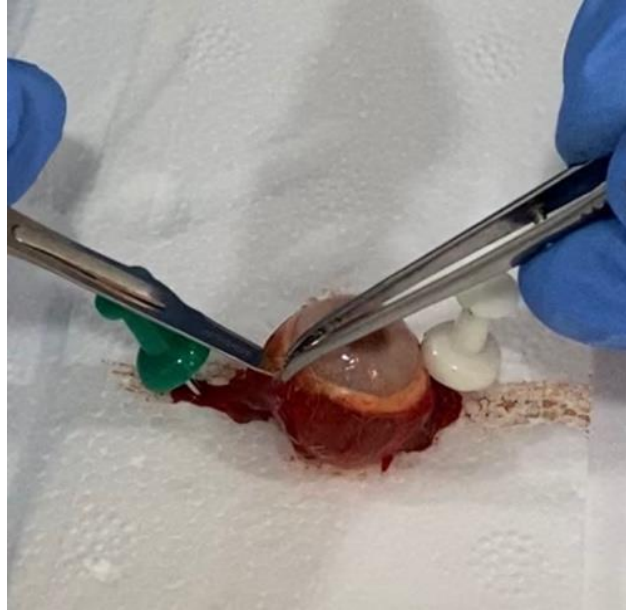
Haftalık genel fizik muayene, genel oftalmik muayene, indirekt oftalmoskop ile fundus muayenesi yapıldı (Şekil 3.7). İndirekt oftalmoskopik muayene süresince tavşanlar %2 ksilazin 5mg/kg ve %10 ketamin 35 mg/kg intramusküler olarak uygulanarak uyutuldu. Göz dibi muayenesinden önce pupil dilatasyonu sağlamak için topikal olarak her iki göze %1.0 siklopentolat hidroklorür (Sikloplejin) ve %0.5 tropikamid (Tropamid) uygulandı. 12 haftalık süreçte izlenen tüm bulgular dökümante edildi.



Şekil 3.7- İndirekt oftalmoskopik muayene sırasında alınmış görüntü.

3.4 Operasyon Süreci: Sakrifikasyon, Enükleasyon ve Diseksiyon İşlemlerinin Uygulanması

3. ayın sonunda, tüm tavşanların her iki gözü optik sinir proksimalinden genel anestezi eşliğinde enükle edildi. Enükleasyon sonrası vitröz humorun aköz humor ile kontaminasyonunu engellemek için korneadan enjektör ile girilerek aköz humor aspire edildi. Sonrasında sklerotomi uygulanarak vitröze ulaşıldı (şekil 3.8). Manuel olarak 2.5 cc enjektör yardımı ile vitröz aspire edildi. Göz başına ortalama 1-1.5mL kadar vitröz örnek elde edilebildi. Göz içi tüm yapılar ve vitröz makroskopik olarak değerlendirildi. Bu süreçler her aşamada görüntülendi ve patolojik bulgular, farklılıklar dökümante edildi. Postmortem vitröz değişiklikleri en aza indirmek için tavşanlar enükleasyon sonrasında sakrifiye edildi.



Şekil 3.8- Enükleasyon uygulanan göze skleral insizyon yapılırken elde olunmuş fotoğraf.

Vitrözler göz içerisinden alındıktan sonra taşıma ve muhafaza etmeye uygun numune kaplarına bölüştürüldü. Numuneler tavşan numarası ve örnek alınan tarafa göre 1L, 2L, ..., 12L ve 1R, 2R, ..., 12 R olacak şekilde isimlendirildi.

3.5 Laboratuvar Deneylerinin Gerçekleştirilmesi

Ayrı ayrı kaplara bölüştürülen numuneler 4 farklı teste tabi tutulmak üzere uygun koşullarda laboratuvara ulaştırıldı. Numunelerin tabi tutulduğu testler ve amaçları şöyle idi; Metabolomik değişiklik olup olmadığını tespit etmek amacıyla metabolomiks analizler; tip II, V, IX ve XI kollajen düzeylerinde değişiklik olup olmadığını tespit etmek amacıyla ELİSA incelemeler; viskozite değişikliği olup olmadığını tespit etmek amacıyla viskometrik incelemeler; kollajen ultra-strüktüründe değişiklik olup olmadığını tespit etmek amacıyla transmisyon elektron mikroskopik incelemeler.

Tavşanlar ve dahil edildikleri testlere ait bilgilerin yer aldığı tablo için Bkz. Ek. 3.

3.5.1 Metabolomik Analizler

Numunelerin Hazırlanması

Eppendorf tüplere metabolomik incelemeler için ayrılan vitröz numuneler hemen soğutulmuş ve laboratuvar işlemlerine kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Deneye başlamadan önce vitröz numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra her bir örnekten 100'er μL alınarak 2 mL'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Vitröz numunelerin üzerine sırasıyla -20°C ' de soğutulmuş 1 ppm miristik asit (IS) içeren 900 μL metanol:su (9:1, h/h) eklenmiş ve örnekler 1 dakika vortekslenmiştir. Daha sonra, örnekler 4°C 'de 15000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve 400'er μL 'lik iki kısım alınmış ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ve sıvı kromatografisi- kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (LC-qTOF- MS) ile analizleri gerçekleştirilene kadar -80°C 'de saklanmıştır.

Kütle Spektrometrik analizler:

GC-MS temelli metabolomik profil analizleri

-80°C 'de saklanan numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kurumuş örnekler üzerine 20 μL metoksiamin hidroklorür (piridin içinde, 20 mg/mL) çözeltisi eklenmiş ve etüvde 30°C 'de 90 dakika tutularak metoksillendirilmişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen örnekler üzerine

80 µL N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit+trimetilklorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklenmiş ve örnekler etüvde 37 °C'de 30 dakika bekletilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen örnekler silillenmiş, GC-MS viallerine aktarılmış ve DB5-MS kolon kullanılarak GC-MS (Shimadzu QP2010 Ultra) ile Tablo 3.1'de belirtilen optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1- Metabolomiks analizler için optimize edilmiş GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.

Kolon	DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
Fırın sıcaklık programı	Fırın sıcaklığı artışı 60°C'den (1 dakika tutulur) 325°C'ye 10°C /dakika artışla (10 dakika tutulur)
Analiz süresi	37,5 dakika
Enjeksiyon hacmi	1 µL (splitless)
Taşıyıcı Gaz	Helyum 1 mL/dakika
MSD geçiş sıcaklığı	290°C
Çözücü gecikme süresi	5,90 dakika
Kütle aralığı	50-650 dalton

Elde edilen kompleks kromatogramlar MS-DIAL yazılımı kullanılarak ayrıştırılmış, pik alıkonma zamanları düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Elde edilen veri matrisi toplam pik alanına göre normalize edilmiştir. Verilerdeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur.

Daha sonra alıkonma indeksli Fiehn ve Golm kütüphaneleri kullanılarak metabolitlere ait pikler tanımlanmıştır.

LC-qTOF-MS temelli metabolomik profil analizleri

-80°C'den çıkarılan örnekler buz üzerinde çözündürüldükten sonra 50µL ependorf tüpe transfer edilmiştir. Üzerine 900 µL 9:1 metanol iç standart eklendikten sonra vakumlu santrifüjde tamamen kuruluğa kadar uçurulmuş ve %0.1 formik asit içeren su:asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile tekrar çözülmüştür. Analizler 0.3 mL/dakika akış hızında gradient elüsyon (Tablo 3.2) uygulanarak %0,1 formik asit içeren su (A) ve %0,1 formik asit içeren asetonitril (B) hareketli fazlarıyla 30 dakikada C18 (100 mm x 2.1 mm, 2.7 µm) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LC-qTOF-MS (Agilent 6530) ile hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modunda çalışılmıştır (Tablo 3.3). Oluşan veri matrisindeki piklerin tanımlanması için havuz edilerek oluşturulan kalite kontrol örneklerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak MS/MS spektrumları elde edilmiştir.

Tablo 3.2- Gradient elüsyon programı.

Zaman (dakika)	% Hareketli faz B*
0	10
1	10
14	90
15	90
20	10
25	10

*%0.1 formik asit içeren asetonitril

Tablo 3.3- LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.

	Pozitif iyonizasyon	Negatif iyonizasyon
Kütle aralığı	50-1700 amu	50-1700 amu
Tarama hızı (spektrum/sn)	2	2
Sprey voltajı(kV)	3500	3500

Skimmer voltajı (V)	65	65
Gaz sıcaklığı (°C)	325	325
Gaz akışı (L/dakika)	10	10
Nebulizer (psig)	45	45

MS-DIAL yazılımı kullanılarak elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırılmış, pik alıkonma zamanları MS-DIAL ile düzeltilmiştir. MS-DIAL yazılımında MS1 ve MS2 tolerans değerleri sırasıyla 0.01 ve 0.05 Da olarak kullanılmıştır. Minimum pik yüksekliği 1000 amplitüd ve MS/MS sinyal kesim değeri MS gürültüsünü azaltmak için 10 amplitüde ayarlanmıştır. Elde edilen veri matrisi toplam pik alanına göre normalize edilmiştir. Veri tablosundaki eksik değerler, metabolit grubundaki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur.

Metabolit Tanımlama

GC-MS için metabolit tanımlaması, Fiehn Alıkonma İndeksli Kütüphanesi kullanılarak %70 ve daha yüksek tanımlama kesim değeri ile yapılmıştır. LC-qTOF-MS için metabolit tanımlaması MS/MS verileri kullanılarak yapılmıştır. Metabolitlerin doğru tanımlanması için MS-FINDER (tolerans değerleri MS1 için ± 0.01 Da ve MS2 ± 0.05 Da) kullanılmış ve 6'dan büyük skorlu metabolitler doğru olarak tanımlanmış kabul edilmiştir.

Metabolomiks Verilerin Değerlendirilmesi

Metabolomik analizler için, GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli analizlerden elde edilen sonuçlar topluca değerlendirilmek üzere veri matrisleri birleştirilmiş ve en küçük kareler-farklılaştırma analizi (PLS-DA) ile çok değişkenli analiz yapmak üzere Metaboanalyst 5.0 yazılımı kullanılmıştır. PLS-DA yöntemi ile grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler bulunmuştur. Grupların farklılaştırılması için en önemli metabolitleri ayırt etmek amacıyla projeksiyondaki değişkenin önemi (VIP) değerleri kullanılmıştır.

3.5.2 Elisa Analizleri

Eppendorf tüplere alınan vitröz numuneler buz üzerinde toplandıktan sonra deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Deneye başlamadan önce numunelerin buz içerisinde çözülmesi beklenmiş ve çözülen örnek vortekslenmiştir. Vitröz sıvıdaki Kollajen II, V, IX, XI düzeyleri ELISA ile üretici firma (BT LAB, Çin) yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Özetle, Standart eğri oluşturmak amacıyla sırasıyla kollajen II, V, IX, XI standartları, standart seyreltme tamponu ile seri seyreltme işlemine tabi tutulmuş ve son konsantrasyonları kollajen II için 480, 240, 120, 60, 30, 0 ng/mL, kollajen V için 120, 60, 30, 15, 7.5, 0 ng/mL, kollajen IX için ise 120, 60, 30, 15, 7.5, 0 ng/mL, kollajen XI için ise 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 ng/mL olan standart çözeltileri elde edilmiştir. Kit ile birlikte gelen 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak, kuyucuklara 50 μL standartlar, 40 μL örnekler eklenmiştir. Standartlar haricinde örneklere 10 μL anti-kollajen II, V, IX, XI antikor eklendikten sonra her kuyucuğu 50 μL streptavidin-HRP eklenmiştir. Plakanın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat süreyle 37°C inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde kuyucuklardaki çözelti aspire edilerek, kuyucuklar yıkama çözeltisiyle 4 kez yıkanmıştır. Bütün kuyucuklara sırasıyla 50 μL substrat A ve 50 μL substrat B eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika inkübasyonun ardından kuyucuklara 50 μL durdurma çözeltisi eklenmiş ve mavi rengin sarıya dönmesi izlenmiştir. ELISA okuyucu kullanılarak kuyucukların absorpsanları 450 nm'de okunmuştur. Standart çözeltilerin absorpsanları kullanılarak standart eğri çizilmiş ve vitröz sıvı numunelerindeki kollajen II, V, IX, XI konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.5.3 Viskozite Ölçümleri

Vitrözlerin viskozitesini test edebilmek amacıyla Brookfield DV2T RV viskometresi ve CPA-40 Z koni kullanılarak 25°C 'de ölçümler gerçekleştirilmiş ve 1, 5, 10, 20, 50, 100 rpm' de alınan sonuçlar değerlendirilmiştir.

Vitröz örnekleri viskozite ölçümleri gerçekleştirilene kadar -80°C 'de saklanmış ve ölçümler öncesi numunelerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Ölçüm için koni seçimi örneklerin viskozitesine göre gerçekleştirilmiştir. Numunelerden alınması gereken hacim seçilen koni ve akışkanın viskozitesine göre değişiklik göstermektedir. Seçilen koni

için gerekli örnek miktarı olan 500 µL numune plağın ortasına enjektör yardımıyla uygulanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.5.4 Elektron Mikroskopik İncelemeler

Elektron mikroskopunda yapılacak incelemeler için ayrılan vitroz örnekler cam kaplarda bulunan %3 gluteraldehit içerisine alınmıştır. 4°C sıcaklıkta 48 saat bekletildikten sonra gluteraldehit içerisinden tampon çözelti içerisine transfer edilerek fikse edilmiştir. İncelemeye kadar tampon çözelti içerisinde bekletilmiştir. İnceleme öncesinde doku örnekleri 24 saat boyunca perfüzyon solüsyonunda tutulmuş, 1 saat süreyle %2 OsO₄ fosfat tamponu ile post-fikse edilmiş ve ardından alkol ile seri dehidrate edilmiştir. Araldite gömüldükten sonra, ultratome kullanılarak 1-2 µm yarı-ince kesitler elde edilmiş, toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Işık mikroskopik incelemeler sonucunda ince kesitlerin alınacağı yerler belirlenmiştir. Aynı ultratome kullanılarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrast boyanmış 60-90 nm kalınlığında kesitler elde edilmiştir. Elde edilen bu kesitler (HITACHI HT7800 120KV TEM) transmisyon elektron mikroskobu aracılığı ile görüntülenmiştir. İncelemeler 20.000 büyütme ile yapılmıştır. Örneklerin karşılaştırılmasında vitroz için mevcut olan bir değerlendirme skalası bulunmadığı için kullanılmamıştır.

3.6 İstatistik

Kontrol ve deneysel grupları karşılaştırmak amacıyla metabolomik analizlerde metabolit başına ortalama değişimin saptanması için student's t- test ve wilcoxon pair test, çok değişkenli analizler için en küçük kareler-diskriminant analizi (PLS-DA) kullanılmıştır. ELISA ölçümleri için kontrol ve deneysel grupları karşılaştırmak amacıyla student's t-test, viskozite ölçümleri için ise 2 yönlü ANOVA ve sonrasında Tukey testi kullanılmıştır. P <0.05 değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Haftalık Muayene Bulguları ve Enükleasyon-Vitrektomi Sırasındaki İzlenimler

Radyoterapi genel olarak iyi tolere edilmiştir. Üç aylık radyoterapi sonrası dönemde tavşanların hiçbirisinde sistemik patolojik bulgu izlenmemiş ve hiçbir tavşan ölmüştür.

Yapılan haftalık muayenelerde beklenildiği üzere kontrol (sol) gözlerde inspeksiyon ile pozitif bulgu izlenmemiştir. Deneysel (sağ) gözlerde meydana gelen harici muayene bulguları palpebreal ödem, periorbital alopesi (Şekil 4.1), üçüncü göz kapağında plika ödemidir. Bu bulgular değişik düzeylerde tüm tavşanlarda ilk haftadan itibaren izlenmiştir. İlk haftalarda bulgular giderek şiddetlenmiş ancak ilerleyen haftalarda şiddeti gerilemiş ve ödem minimal düzeyde izlenirken, periorbital yeniden tüylenmelerin başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1- Radyoterapi uygulaması sonrasında izlenen periorbital alopesi.



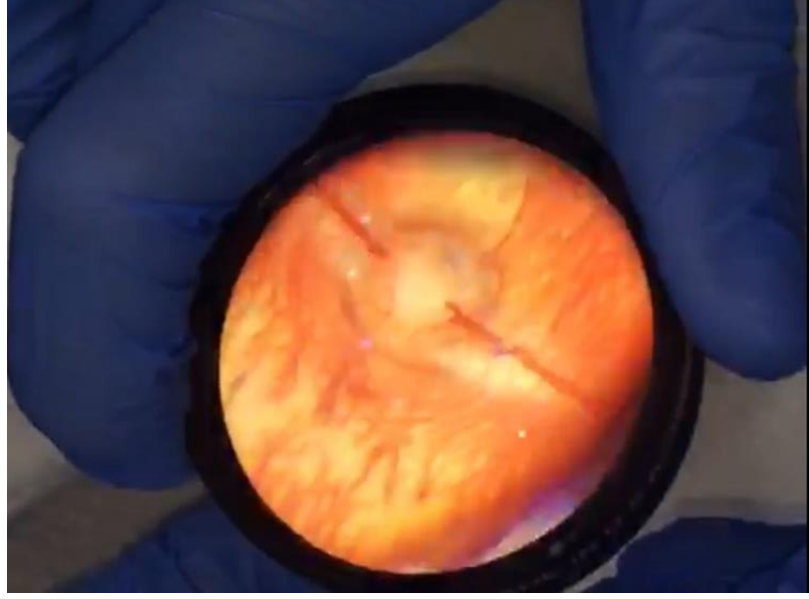
Şekil 4.2- Periorbital alopeside azalma.

Konjonktivada görülen tek klinik değişiklik konjonktivittir ve bu dört tavşanda geçici bir süre ile izlenmiştir. 4. haftaya kadar tüm tavşanların korneaları saydam izlenmekte iken, 4. haftadan sonra 6 tavşanda korneal epitel defekti ile beraber keratit (Şekil 4.3) gelişimi izlenmiştir. Keratokonjonjivit izlenen olgulara geniş spektrumlu antibakteriyal topikal tedavi başlanmıştır (%0,5 moksifloksasin içeren steril oftalmik solüsyon, Vigamox). Tedavi sonrası keratit odağında tedaviyle bir miktar sınırlanma izlenmesine rağmen keratit gelişen tavşanlarda, yeterli fundus aydınlanması sağlanamadığı için keratit geliştikten sonraki haftalarda optimal muayene yapılamamıştır.

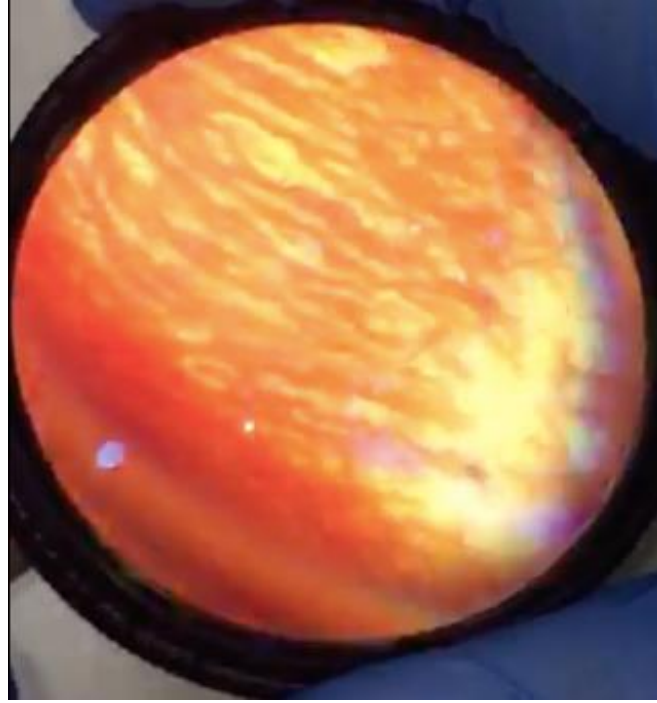


Şekil 4.3- Fizik muayenede izlenen santral keratit odağı.

10. haftaya kadar lenslerde herhangi bir değişiklik izlenmezken, 10. hafta itibariyle iki tavşanda posterior subkapsüler katarakt geliştiği görülmüştür. Bu tavşanların katarakt gelişimi sonrasında optimal fundus muayenesi yapılamamıştır. 12. haftaya kadar vitröz berrak izlenirken son muayenede vitrözü değerlendirilebilen iki tavşanın vitrözünde homojen bulanıklaşma izlenmiştir. Bu tavşanların son fundus muayeneleri optimal yapılamamıştır. Fundus muayenesinin gerçekleştirilemediği yukarıda belirtilen klinik durumlar (keratokonjonktivit, arka subkapsüler katarakt, vitreal haze) hariç olarak, fundusun aydınlatılabildiği tüm muayene ve olgularda direkt fundoskopide optik disk, retinal damarlar, periferik retina doğal olarak izlenmiştir. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ de optik disk ve retinal damalara ait fotoğrafları izlenmektedir.



Şekil 4.4- Haftalık muayene; fundus muayenesi, optik disk ve retinal damarlar.



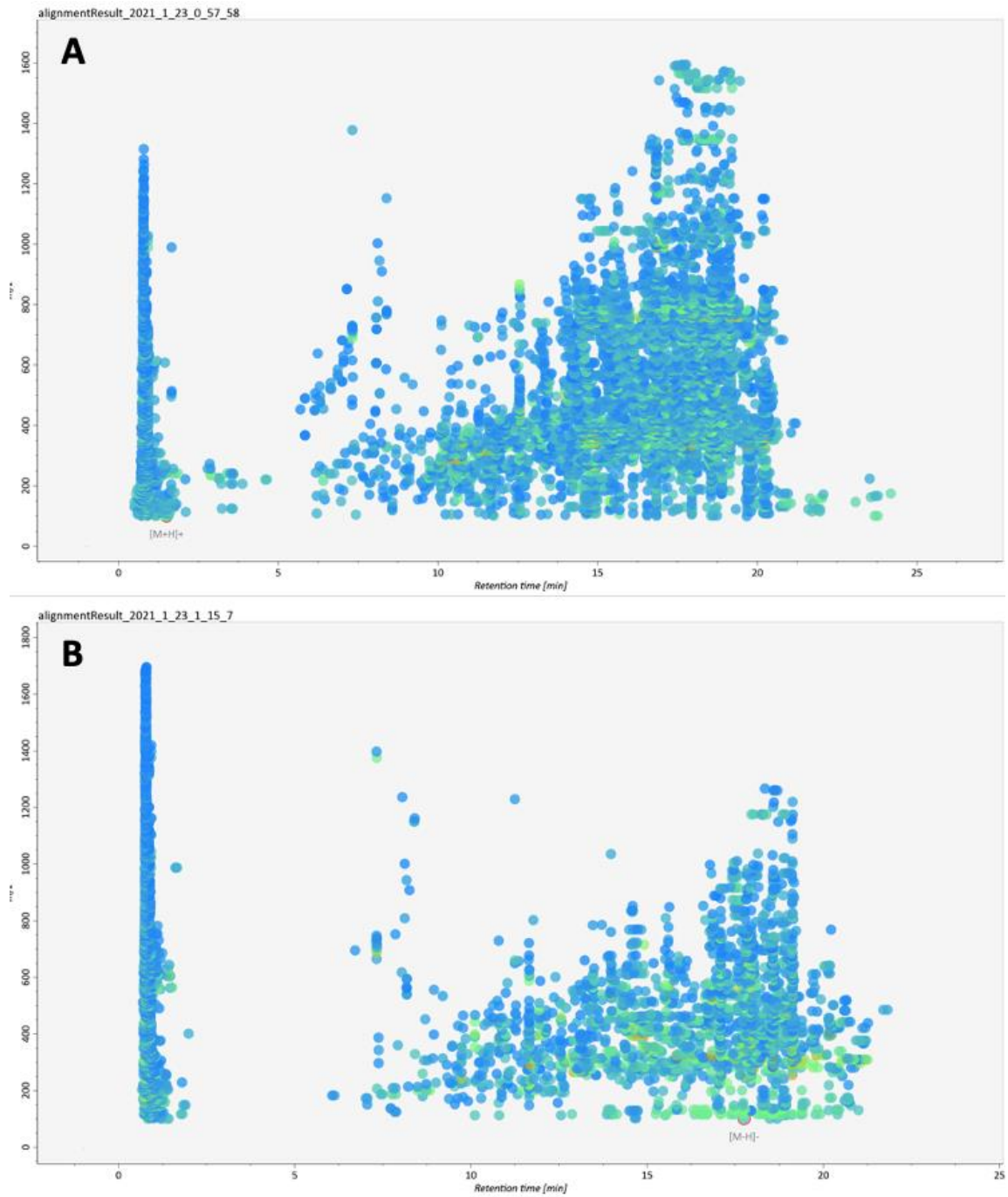
Şekil 4.5- Fundus muayenesinde izlenen periferik retinal damarlar.

Vitrektomi sırasında vitröz negatif basınçla enjektöre aspire edilirken deneysel gözlerden dokuzundaki vitröz kontrol gözlerle göre hissedilecek derecede kolay aspire edilmiştir. Bir tavşanın vitröz sıvısı (8L) teknik aksaklıklar nedeniyle bütünlüğünü kaybetmiştir. Vitröz aspirasyonu sonrası göz diseke edilerek yapılan inspeksiyonda retina veya diğer göz yapılarında gros bir değişiklik izlenmemiştir.

Deneklerde izlenen muayene bulgularının özeti ve elde edilen örneklerin tabii tutulduğu testler Ek. 3.'de yer alan tabloda yer almaktadır.

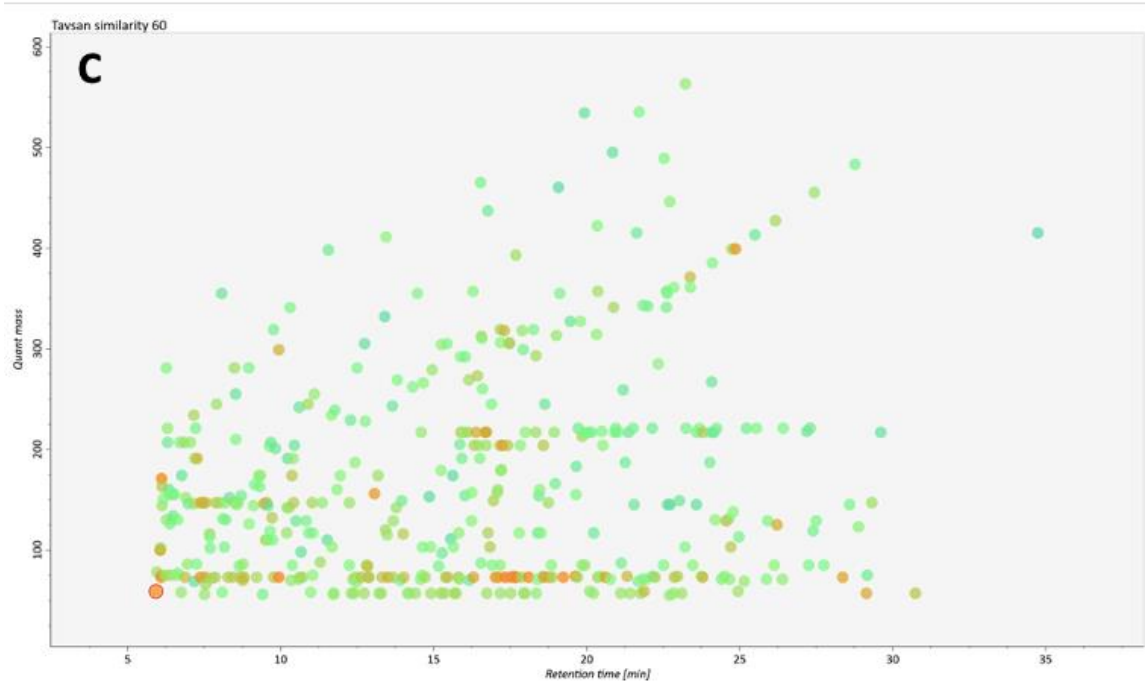
4.2 Metabolomik Analizler

Yeterli miktarda vitröz örnek elde edilebilen 7 tavşana ait vitröz örneklerinin karşılaştırmalı hedeflenmemiş metabolomik analizleri, GC-MS ve LC-qTOF-MS analitik platformlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrofotometrik incelemeler neticesinde elde edilmiş olan tüm metabolitlere ait kromatogramlar Şekil 4.6 ve 4.7'de izlenmektedir. Kromatogramlarda izlenen her bir renkli küre bir metaboliti temsil etmektedir. Tespit edilen metabolitler, veri tabanları ile kıyaslanarak molekül ağırlığı ve iyonizasyonuna göre GC-MS ile 126 ve LC-qTOF-MS ile 149, toplam 275 metabolit tanımlanmıştır. Tanımlanan bütün metabolitler ve bağıl değerleri Ek. 2' de görülmektedir.



Şekil 4.6- Vitröz humor LC-q-TOF metabolomiks analizlerine ait ayrıştırılmış kromatogramlar:

A) LC-qTOF-MS (pozitif iyonizasyon), B) LC-qTOF-MS (negatif iyonizasyon).

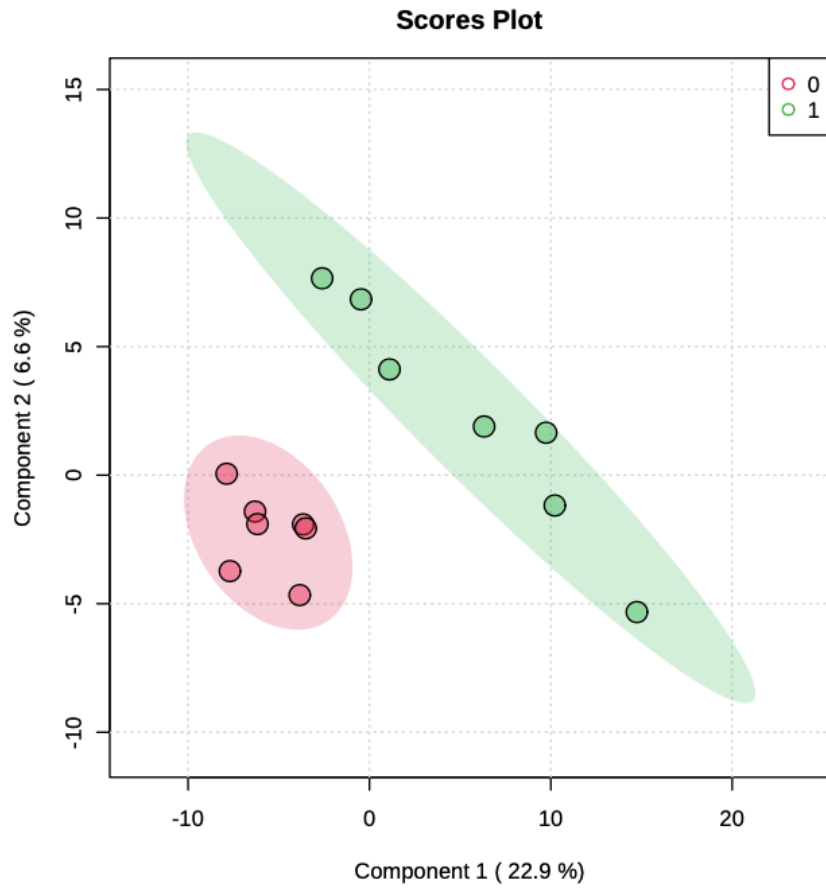


Şekil 4.7- Vitröz humor GC-MS metabolomiks analizlerine ait ayrıştırılmış kromatogram.

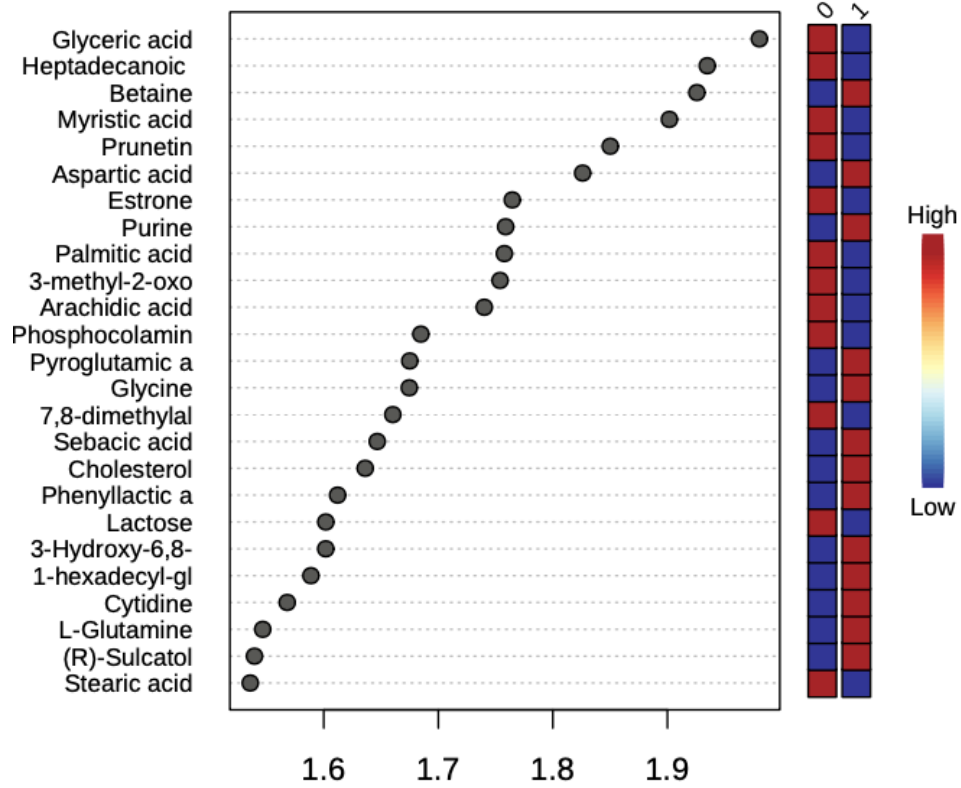
Gruplar arası metabolit düzeylerini karşılaştırmak amacıyla yapılan pair analizlerinde, 34 metabolitin düzeylerinde deneysel vitröz örneklerde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olduğu izlenmiştir ($p < 0.05$). Gruplar arasında ayrımı sağlayan ve ağırlıklı olarak nükleik asit, amino asit ve yağ asidi metabolizmasına ait 34 metabolit şunlardır; (*R*)-*Sulcatol*, *1,8,9-Anthracenetriol*, *2-hydroxybutyric acid*, *2-ketobutyric acid*, *3-methyl-2-oxobutanoic acid*, *4-Dodecylbenzenesulfonic Acid*, *Arachidic acid*, *Betaine*, *Citramalic acid*, *Creatinine*, *Cytidine*, *Glyceric acid*, *Glycine*, *Glycolic acid*, *Heptadecanoic acid*, *Hydroquinone*, *Hypotaurine*, *Lactic acid*, *Lactose*, *L-Glutamine*, *Margaroyl-EA*, *Myristic acid*, *N-acetyl-l-glutamic acid*, *Neohesperidin*, *Oxoglutaric acid*, *Phosphocolamine*, *Purine*, *Pyroglutamic acid*, *Tartronic acid*, *Threose*, *Thymine*, *Tyrosine*, *Urea*, *Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine*.

Deneysel ve kontrol vitröz grubu ile yapılan analizler sonucunda elde edilen verilere ait çok değişkenli analizlerde, kontrol ve ışınlanmış vitröz örnekleri arasında analizlere ait en küçük kareler-diskriminant analizi (PLS-DA) skor grafiğinde görüldüğü

gibi net bir ayırım izlenmiştir (şekil 4.8). Şekil 4.8’ de yer almakta olan PLS-DA grafiğinde kırmızı küreler kontrol örneklere, yeşil küreler ise deneysel örneklere aittir ve izlendiği üzere iki grup birbirinden yeterince ayrılmıştır. PLS-DA analizinde iki grubun birbirinden ayrılmasında en etkili olan 25 metabolitin yer aldığı projeksiyondaki değişkenin önemi (VIP) grafiği Şekil 4.9’ da yer almaktadır. Şekil 4.9’ da izlendiği gibi kontrol ve deneysel örneklerde en iyi ayrımı sağlayan ilk 5 metabolit gliserik asit, heptadekanoik asit ve betain, miristik asit ve prunetin olmuştur.



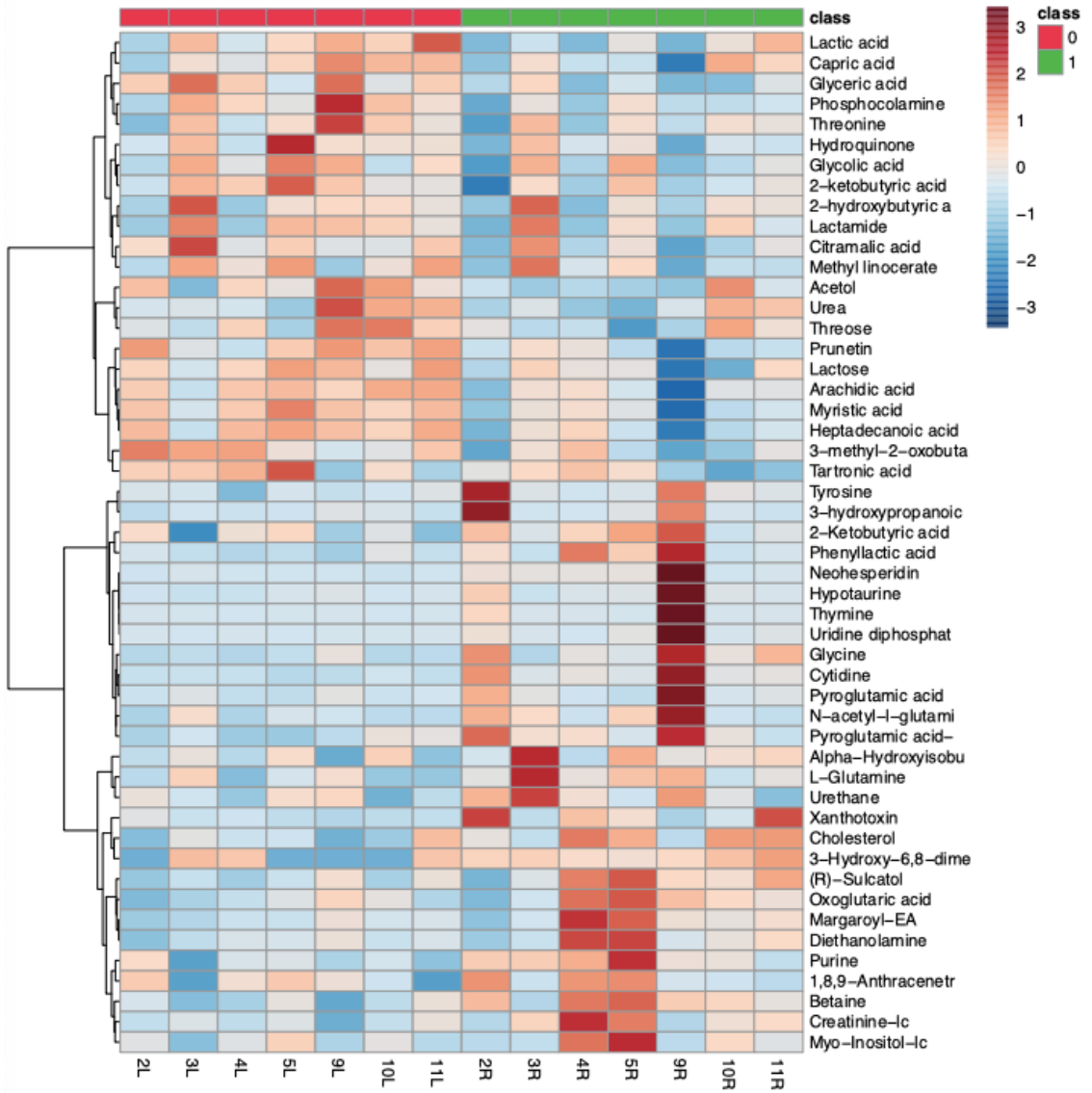
Şekil 4.8- PLS-DA skor grafiği.
(Kırmızı-0-kontrol, Yeşil-1-ışınlanmış)



Şekil 4.9- VIP skorları.

(Sağdaki renkli kutular, çalışılan her grupta ilgili metabolitin rölatif konsantrasyonlarını göstermektedir. Kırmızı-0-kontrol, Mavi-1-ışınlanmış)

Şekil 4.10'da deneysel ve kontrol grubu ile yapılan analizler sonucunda elde edilen tavşanlara ait, bireysel ölçümlerin yer aldığı ısı haritası olarak gösterilen kümeleme sonucu yer almaktadır. Bu haritanın üst kısmında yer alan kırmızı renk kontrol grubunu, yeşil renk ise deneysel grubu temsil etmektedir. Alt kısımda örneklerin isimleri sağda ise metabolitlerin isimleri yer almaktadır. Bireysel metabolit miktarları en sağda gösterilen skalaya uygun şekilde renklendirilmiştir. Örneğin birinci sırada yer alan laktik asite bakıldığında kırmızı kısımda daha çok pembe-kırmızı renkler hâkim iken yeşil kısımda daha çok açık mavi- mavi renkler hâkim olarak görülmektedir.



Şekil 4.10- Vitroz humor örneklerinde tedavi ve kontrol grubu ile yapılan analizler sonucunda elde edilen ısı haritası olarak gösterilen kümeleme sonucu.

Farklılık izlenen metabolitlerin yer aldığı yolların, yani radyasyon maruziyeti ile değişime uğrayan yolların tespit edilebilmesi amacıyla veriler KEGG pathway maps'e yüklendi. Arjinin biyosentezi, glisin, serin ve treonin metabolizması, D-glutamin ve D- glutamat metabolizması, valiz, lösin ve izolözin biyosentezi, glikosilat ve dikarboksilat metabolizması, primidin metabolizması, aminoaçil tRNA biyosentezi,

fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi ve proponat metabolizmasına ait yolların farklı düzeylerde etkilenmiş olduğu sonucuna ulaşıldı. Tablo 4.1’ de önem sırasında göre etkilenen yolak isimleri, eşleşme durumu ve p değerleri izlenmektedir. Eşleşme durumunda belirtilen değerlerde kast edilen; örneğin birinci yolakta yer alan arjinin biyosentezinde bulunan 14 ara basamağın 4’ünü ilgilendiren bir etkilenme olduğu görülmüş ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.

Tablo 4.1- Metabolomik analizler sonucunda etkilendiği tespit edilen yollar.

Yolak İsmi	Eşleşme durumu	p değeri
Arjinin biyo-sentezi	4/14	0.0001439
Glisin, serin ve treonin metabolizması	4/34	0.0049457
D-Glutamin ve D-Glutamat metabolizması	2/6	0.0061993
Valin, lösin ve isolösin biyo-sentezi	2/8	0.011269
Gliksalat ve dikarboksilat metabolizması	3/32	0.028312
Pirimidin metabolizması	3/39	0.047198
Aminoasit-tRNA biyo-sentezi	3/48	0.078592
Fenilalanin, tirozin and triptofan biyo-sentezi	1/4	0.082243
Propanoat metabolizması	2/23	0.083601

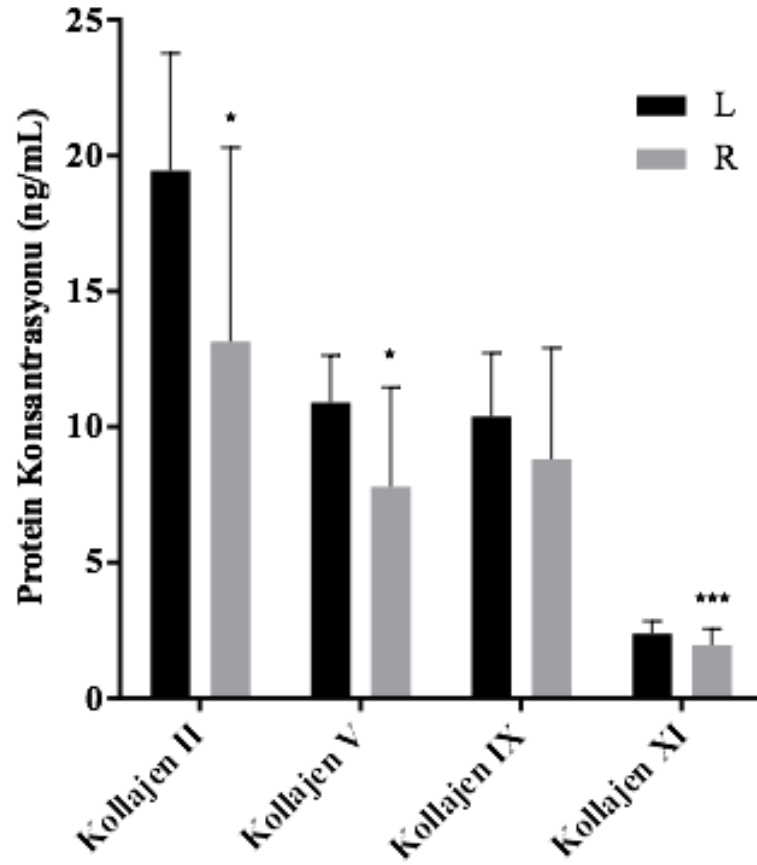
4.3 Elisa Analizleri

ELISA ölçümlerinde hacimce yeterli örnek bulunan 7 tavşana ait örnekler değerlendirilmiştir. Bu örneklerde yapılan analizler neticesinde, tip II kollajen için ortalama±SD değerleri kontrol vitröz için 19.44±4.33 ng/mL, deneysel vitröz için 13.15±7.14 ng/mL olarak ölçülmüş, deneysel grupta kontrol gruba göre anlamlı düzeyde azalma olduğu izlenmiştir (p=0.0179). Tip V ve XI kollajen ölçümlerinde ortalama± SD kontrol vitröz için sırasıyla 10.89±1.74 ng/mL ve 2.38±0.45 ng/mL iken deneysel vitröz için sırasıyla 7.80±1.74 ng/mL ve 1.96±0.60 ng/mL olarak ölçülmüş, deneysel grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma olduğu izlenmiştir (sırasıyla p=0.0394 ve p=0.0003). Tip IX kollajen ölçümlerinde ortalama±SD değerleri kontrol vitröz için

10.38±2.34 ng/mL, deneysel vitröz için 8.80±4.10 ng/mL olarak ölçülmüştür. Deneysel grupta kontrol gruba göre ortalama kollajen tip IX miktarında azalma olduğu izlenmiş olmakla beraber bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir (p=0.13). Vitröz örneklerle ait kollajen konsantrasyonlar Tablo 4.2’de, kollajen miktarındaki değişime ait grafik Şekil 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.2- Kollajen konsantrasyonları.

Nu.	Kollajen tip II		Kollajen tip V		Kollajen tip IX		Kollajen tip XI	
	L (ng/mL)	R (ng/mL)	L (ng/mL)	R (ng/mL)	L (ng/mL)	R (ng/mL)	L (ng/mL)	R (ng/mL)
2	20.95	7.33	11.63	4.72	7.99	4.21	2.10	1.55
3	14.58	1.37	8.90	6.59	8.47	8.78	1.75	1.09
4	24.49	19.24	13.61	9.14	13.76	13.47	2.79	2.44
5	17.24	15.62	10.10	8.70	10.12	10.95	2.58	2.17
7	21.16	20.24	12.30	12.16	12.88	12.20	2.89	2.62
9	13.70	9.74	8.99	1.90	8.15	2.39	1.93	1.43
11	23.95	18.49	10.72	11.36	11.31	9.61	2.65	2.44
sd	19.44±4.33	13.15±7.14*	10.89±1.74	7.80±3.65*	10.38±2.34	8.80±4.10	2.38±0.45	1.96±0.60***
*** P<0.001, * P<0.05 L’e (sol göze) karşı Nu.= Numara								



Şekil 4.11- Kollajen konsantrasyonları.

*** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ L'e (sol göze) karşı

4.4 Viskozite Ölçümleri

Viskozite ölçümlerinde hacimce yeterli bulunan 11 tavşana ait örnekler değerlendirilmiştir. 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 rpm hızlarda örneklerin viskozitesi ölçülmüştür. Ölçümlerde spindle dönüş hızı arttıkça viskozitede azalma izlenmiş, akışkan özelliği dikkate alınarak, 10 ve 20 rpm hızda ölçülen viskoziteler analizlere dahil edilmiştir. Ölçüm sonrası örnekte yapısal bozulma olması nedeniyle tekrar ölçümler gerçekleştirilememiştir. Gerçekleştirilen ölçüme ait viskozite ölçüm değerleri tablo 4.3'de centipoise (cP) cinsinden verilmiştir.

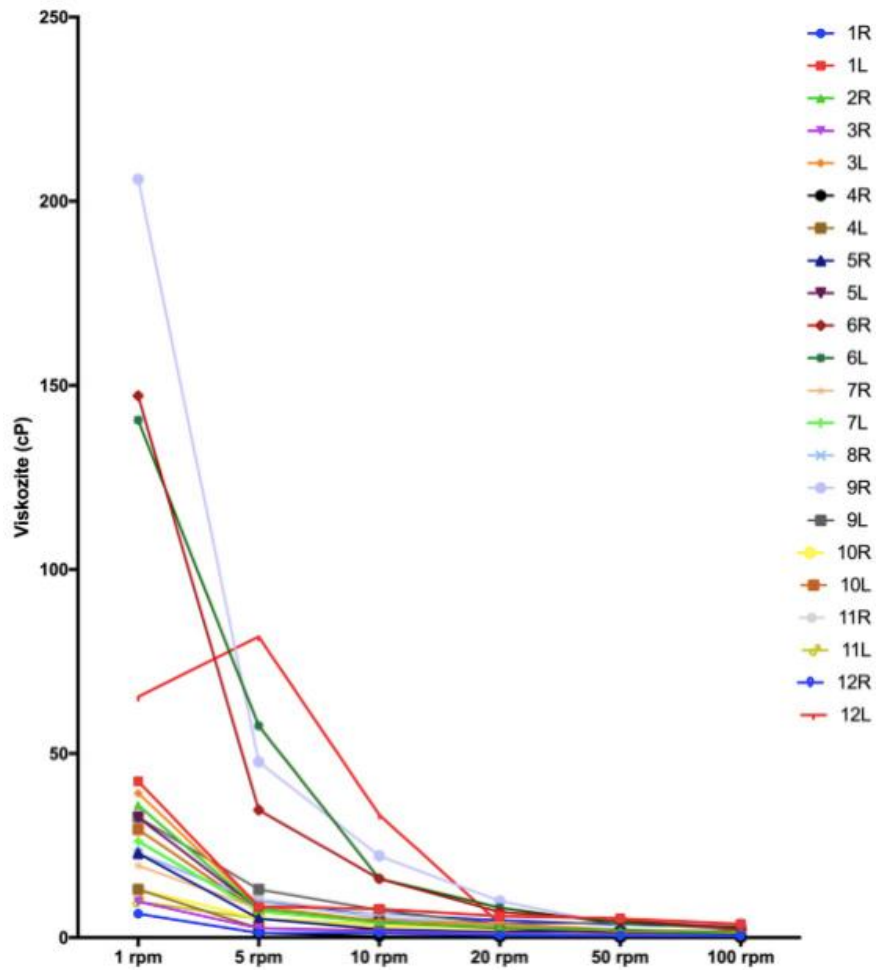
Tablo 4.3- Farklı rpm’lerde yapılan viskozite ölçüm değerleri.

Örnek adı \ rpm	1 rpm	5 rpm	10 rpm	20 rpm	50 rpm	100 rpm
1R- Viskozite (cP)	6,54	1,31	1,31	0,65	0,52	0,46
1L- Viskozite (cP)	42,51	8,5	7,85	5,89	5,3	3,76
2R- Viskozite (cP)	35,97	7,85	4,25	2,78	1,9	1,24
2L- Viskozite (cP) (örnek yok)	-	-	-	-	-	-
3R- Viskozite (cP)	9,81	2,62	1,64	1,14	0,85	0,56
3L- Viskozite (cP)	39,24	8,5	4,58	3,76	1,7	1,37
4R- Viskozite (cP)	1,47	1,31	0,33	0,16	0,07	0,07
4L- Viskozite (cP)	13,08	2,62	1,96	0,65	0,46	0,33
5R- Viskozite (cP)	22,89	5,23	2,29	1,47	2,09	0,92
5L- Viskozite (cP)	32,7	7,85	4,25	2,62	1,44	1,18
6R- Viskozite (cP)	147,2	34,66	16,02	7,03	4,77	2,62
6L- Viskozite (cP)	140,6	57,55	16,02	8,18	3,79	3,04
7R- Viskozite (cP)	19,62	7,85	4,58	2,94	2,09	1,14
7L- Viskozite (cP)	26,16	7,19	4,25	2,78	1,64	1,24
8R- Viskozite (cP)	22,89	9,81	5,56	3,43	1,7	1,28
8L- Viskozite (cP) (örnek yok)	-	-	-	-	-	-
9R- Viskozite (cP)	206	47,74	22,24	9,97	3,47	3,96
9L- Viskozite (cP)	32,7	13,08	7,52	3,76	4,12	2,16
10R- Viskozite (cP)	13,08	5,23	3,27	2,29	1,64	1,28
10L- Viskozite (cP)	29,43	7,19	4,9	3,6	2,16	1,54
11R- Viskozite (cP)	22,89	10,46	6,54	3,6	2,09	1,41
11L- Viskozite (cP)	9,81	5,23	3,6	2,29	1,31	0,98
12R- Viskozite (cP)	22,89	9,81	6,54	4,74	3,6	2,84
12L- Viskozite (cP)	65,4	81,75	33,35	3,92	0,92	1,96

10 rpm hızda yapılan ölçümler, deneysel ve kontrol vitröz bağımsız değişkenler olarak değerlendirilerek yapılan analizlerde, kontrol örneklerde ölçülen viskozite değeri

ortanca 4.74 cP (aralık; 1,96-33,35 cP) iken deneysel örneklerde ölçülen viskozite değeri ortanca 3.92 (aralık; 0.33-22,24 cP) olarak belirlenmiştir. Bu bulgulara göre deneysel örneklerde viskozitenin azaldığı tespit edilmesine rağmen, izlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.47$). 20 rpm hızda yapılan ölçümler, deneysel ve kontrol vitröz bağımsız değişkenler olarak değerlendirilerek yapılan analizlerde, kontrol örneklerde ölçülen viskozite değeri ortanca 3.68 cP (aralık; 0.65-8.18 cP) iken deneysel örneklerde ölçülen viskozite değeri ortanca 2.61 cP (aralık;0.16-9.97 cP) olarak saptanmıştır. 10 rpm hızda yapılan ölçümlerle benzer şekilde deneysel örneklerde viskozite azalmış olarak izlenmesine rağmen, izlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.26$).

10 ve 20 rpm hızda yapılan ölçümler bireysel bazal vitreal özellikler göz önünde bulunarak deneysel ve kontrol vitrözler bağımlı olarak değerlendirildiğinde, 6 tavşanın deneysel vitröz viskozitesinde azalma, 3 tavşanın deneysel vitröz viskozitesinde artış olduğu saptanırken, 1 tavşanın ise deneysel vitrözünde değişiklik olmadığı görülmüştür. Kontrol ve deneysel vitröz örnekler arasındaki viskozite değişiminün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Şekil 4.12' de tüm örneklerde yapılan viskozite ölçümlerine ait grafik yer almaktadır.



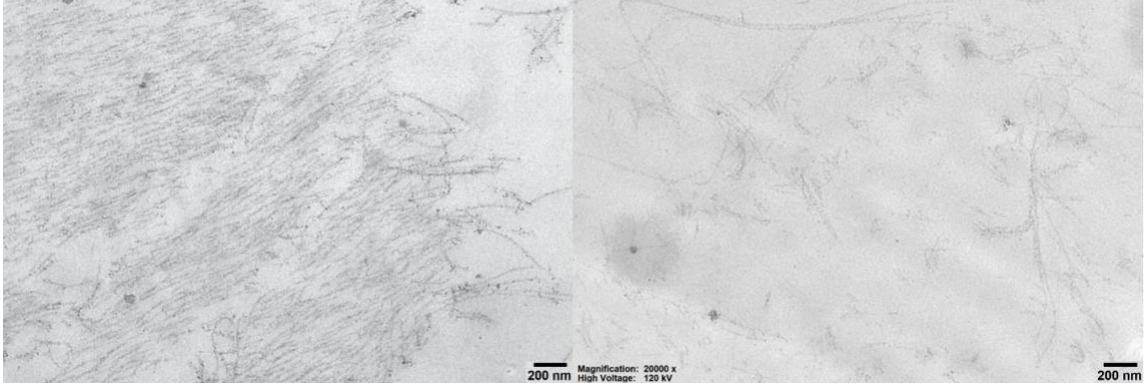
Şekil 4.12- Tüm tavşanlara ait VH'lerde yapılan viskozite ölçümlerine ait grafik.

(R-sağ, L- sol)

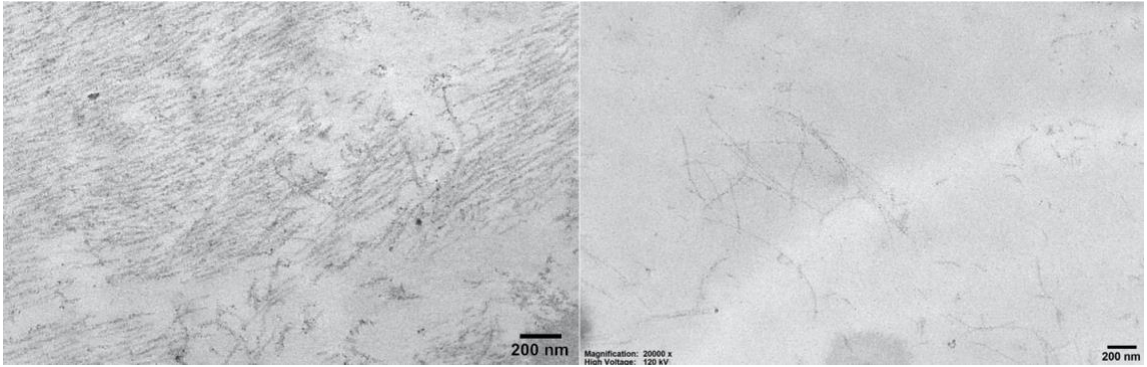
4.5 Elektron Mikroskopik İncelemeler

Elektron mikroskopik incelemelerde 3 tavşana ait örnekler değerlendirilmiştir. Kontrol ve deneysel vitrözlerde yapılan elektron mikroskopik incelemelerde kontrol vitrözlerde uzun kollajen fibrilleri ultra-strüktürel iskelet ve yoğun kollajen fibrilleri izlenmekte iken deneysel vitrözlerde kollajen fibriller ultra-strüktürünün bozulduğu ve vitröz içerisinde dağılmış halde kollajen lif fragmanları olduğu izlendi. İncelemelere dahil edilen tavşanların kontrol ve deneysel vitrözlerine ait mikroskopik görüntüler şekil 4.13,

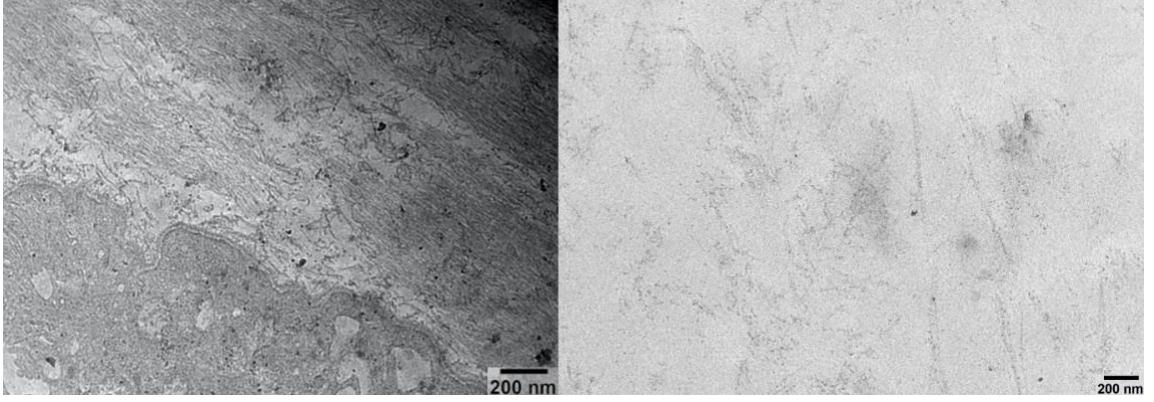
4.14 ve 4.15’de görülmektedir. Vitröz humor için değişikliği ve değişiklik oranını ölçebilecek bir skala bulunmadığı için derecelendirme yapılamamıştır.



Şekil 4.13- Tavşan 1-Sol: Uzun kollajen fibrillerinin ultra-strüktürel ağ yapısı; Sağ: Kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulması, dağılmış kollajen lif fragmanları.



Şekil 4.14- Tavşan 6-Sol: Uzun kollajen fibrillerinin ultra-strüktürel ağ yapısı; Sağ: Kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulması, dağılmış kollajen lif fragmanları.



Şekil 4.15- Tavşan 12-Sol: Uzun kollajen fibrillerinin ultra-strüktürel ağ yapısı, retinaya ait örneklerle beraber; Sağ: Kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulması, dağılmış kollajen lif fragmanları.

5. TARTIŞMA

Vitröz çıkarıldığı takdirde gözde bir fonksiyon kaybı olmaması nedeniyle, okülogenez sonrası vitröz humorun anlamlı bir işlevi olmadığı düşünülmekteyken, 2000’li yıllardan itibaren vitröz humorun göz sağlığındaki önemli işlevlerini gösteren kanıtlar giderek artmıştır. İyonizan radyasyonun bu önemli yapı ile etkileşimini incelemek amacıyla tasarlanan bu çalışmada, iyonizan radyasyon maruziyetinin vitröz humorun metabolomik içeriğinde anlamlı değişikliklere, tip II, V ve XI kollajen düzeylerinde anlamlı düzeyde azalmaya ve kollajen fibriler ultra-strüktüründe bozulmaya neden olduğu görülmüştür. Deneysel vitrözlerde kontrol vitrözlere göre tip IX kollajen düzeylerinde ve viskozitede azalma izlenmekle beraber bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir.

İyonizan radyasyon maruziyeti, metabolik süreçleri etkileyen ve metabolitlerin seviyelerini değiştiren bir dizi moleküler olayı ve hücre sel yanıtı tetiklemektedir. Metabolomik araştırmalar, radyasyon maruziyetinin dokuya özgü metabolik yanıtlara yol açtığını göstermiştir¹⁶¹⁻¹⁶³. Bugüne kadar, normal vitrözde ve diyabetik retinopati, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, regmatojen retina dekolmanı, makular telejektazi, glokom, inflamasyon, iskemi gibi oftalmolojik patolojik durumlarda vitrözün metabolomik profiline bakılmış ve diyabetik retinopati gibi bazı patolojik durumlarda önemli değişiklikler olduğu gözlenmiştir¹⁶⁷⁻¹⁷⁷. Radyoterapi maruziyeti sonrası vitrözün metabolomik profilinin değerlendirdiği bir çalışma ise literatürde yer almamaktadır. Araştırmamızda vitrözün iyonizan radyasyona maruz kalması neticesinde meydana gelen metabolomik değişiklikleri tanımlamak için yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi tabanlı hedeflenmemiş metabolomik analizler kullanılmıştır. Metabolomik analizler tanımlanabilen metabolit sayısını artırmak amacıyla iki farklı analitik teknik (GC-MS ve LC-qTOF-MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler neticesinde, toplam 275 metabolit tanımlanmış, bunlarında 34’ünün deneysel ve kontrol gruplar arasında anlamlı olarak farklı düzeylerde olduğu gözlenmiştir. Meydana gelen değişikliklerin ağırlıklı olarak aminoasit metabolizmasına ait yollarda etkilenmeyi temsil ettiği görülmüş bu durumun radyasyonun vitrözün protein içeriğinde oluşturduğu değişimin/hasarın ürünleri olduğu düşünülmüştür. Ayrıca primidin ve t-RNA biyosentezinin etkilenmiş olması

hücrel patolojik bir durumu, hücre bölünmesini etkileyen bir değişim olduğunu işaret etmektedir. Bu durum bulgularımızın radyasyonun komşu hücrel yapılarda meydana getirdiği hasara sekonder olabileceğini düşündürmüştür.

Araştırmamızda ışınlanmış vitrözde metabolomik değişim gözleendiği ilk kez rapor edilmiştir. Radyasyon hasarına benzer patolojik hadiselerin eşlik ettiği diyabet ve inflamasyona bağlı patolojik durumlarda vitrözün metabolomik içeriğinde önemli değişiklikler olduğu rapor edilmişti^{168,169}. Bu raporlarda kontrol gruba göre değişim izlendiği belirtilen metabolitler ve araştırmamızda değişim izlediğimiz metabolitlerden ortak metabolitler (örn, creatinine, glycine, myo-inositol, urea, tyrosine) olduğu görülmüştür^{167,168,170,173}. Ancak değişime sebep olan etken birebir aynı olmadığı için, bulgularımızın benzer özellikte başka çalışmalar ile valide edilmesi ihtiyacı bulunmaktadır. Bu araştırmadan elde edilen metabolomiks veriler, metabolomik analizlerin vitrözde radyasyonun etkisini izlemede elverişli bir yöntem olduğunu işaret etmektedir. Böylece, bu araştırmadan elde edilen radyasyona bağlı vitrözde anlamlı metabolomik değişiklik izlendiği verisi temel alınarak, ileride tasarlanacak vitrözde radyasyon doz-yanıt ilişkisinin incelendiği araştırmalarda vitrözdeki değişiklikleri tespit etmek, değişiklik düzeyini belirlemek için metabolomik analizler kullanılması makul bir araştırma yöntemi olacaktır.

Elisa analizlerinde vitrözün heterotipik kollajen fibrillerini oluşturan temel kollajen moleküllerinin düzeyine bakılmıştır. Beklendiği üzere en fazla miktarda tip II, daha sonra V ve XI, en az ise tip IX kollajen izlenmiştir. Işınlanmış vitröz örneklerde, vitrözün temel heterojen fibrillerinin çekirdek kısmını oluşturan tip II ve tip V, XI kollajen düzeylerinde anlamlı azalma olduğu izlenmesine rağmen tip IX kollajen düzeylerinde kontrol vitrözlere göre anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. İyonizan radyasyon maruziyetinin, vitröz ile benzer şekilde yüksek tip II kollajen bulunduran ve heterotipik kollajen fibrillerinde tip II, V/XI ve IX kollajen bulunan hyalen kıkırdakta tip II kollajen düzeyinde azalmaya ve kollajen fibriler organizasyonunda bozulmaya neden olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur¹⁷⁸⁻¹⁸². Benzer şekilde iyonizan olmayan elektromanyetik dalga maruziyetinin kıkırdak dokuda yaptığı değişikliklerin incelendiği bir prelinik araştırmada, deney kolunda tip II kollajen düzeyinde azalmaya ek olarak, özellikle tip II

kollajenin yıkımını sağlayan matriks metalloproteinaz- 13 düzeyinde artma olduğu gözlenmiştir¹⁸³. Bir başka prelinik araştırmada ise kıkırdak dokuya uygulanan radyofrekans enerjinin kollajen yapıda denaturasyona neden olduğu rapor edilmiştir¹⁸⁴. İyonizan radyasyonun temel çıktılarında biri olan ROT düzeylerindeki artışın kıkırdak doku kültüründe kollajen tip II sentezini azalttığı, aynı zamanda mevcut olan kollajen düzeylerini azalttığı gösterilmiştir¹⁸⁵. Bu bulgu ROT'un ekstraselüler matriks üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda izlenen kollajende bozulma ve amino asit bileşiminde değişiklik verisi ile uyumludur^{186,187}.

Mevcut araştırmada, Elisa ölçümlerinde, fibriller arası boşluklu yapının sürdürülmesinde önemli bir rolü olan tip IX kollajen düzeylerinde azalma izlenmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilememiştir. Literatürde, tip V, IX ve XI kollajen ile radyasyon veya oksidatif stres ilişkisini konu edinmiş olan bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bishop ve ark.'nın vitröz kollajen fibrillerin yüzey moleküllerinde yaşla ilişkili değişiklikleri inceledikleri araştırmada insan ve sığır gözlerinde elde ettikleri kollajen fibrilleri elektron mikroskobu ile görüntülediler. Yaşlanma ile insan vitröz kollajen fibrillerinin yüzeyinde belirgin değişiklikler gözlendiğini ve kondroitin sülfat yan zincirleriyle beraber tip IX kollajen kaybı rapor etmişler ve yaşla ilişkili vitröz sıvılaşma ve vitreo-retinal adezyonun zayıflamasında bu değişikliğin rolü olduğunu öne sürmüşlerdir⁸¹.

Viskozite ölçümlerinde deneysel vitrözlerde kontrol vitrözlere göre azalma izlenmiş olmakla beraber bu bulgu istatistiksel anlamlılık düzeyinde izlenmemiştir. Bu sonuç, tekrarlayan ölçümler için yeterli örnek olmadığı için optimal ölçüm ve optimal istatistiksel analiz yapılamamış olmasına bağlı olabilir. Vitrözdeki viskozite değişimini konu edinen diğer çalışmalarda, yaşlanma ile birlikte vitrözün reolojik özelliklerde değişim, viskozitede azalma rapor edilmiştir¹⁸⁸. Benzer şekilde diyabetiklerde erken yaşlarda viskozitede azalma olduğu bildirilmiştir¹⁸⁹. Vitröz ile benzer şekilde yüksek hyaluronan bulunduran sinovyal sıvıda radyoterapinin etkilerinin incelendiği prelinik çalışmalarda radyoterapinin sıvı içeriğindeki hyaluronana yapısal hasar verdiği, sıvının reolojik özelliklerini bozduğu, viskozitesini azalttığı bildirilmiştir^{190,191,192}. Benzer şekilde inflamatuvar durumlarda sinovyal sıvıda artan ROT'un hyaluronanın fiziksel ve kimyasal

yapısında değişikliklere neden olarak, hyaluronan seviyelerinde ve sinovyal sıvı viskozitesinde azalmaya neden olduğunu gösteren araştırmalar literatürde mevcuttur¹⁹³⁻¹⁹⁷.

Vitröz örneklerde yapılan elektron mikroskopik incelemelerde ise deneysel gözlerden alınan vitrözlerde kollajen fibriler ultra-strüktürünün bozulduğu ve vitröz içerisinde dağılmış halde kollajen lif fragmanları olduğu izlenmiştir. Elde edilen mikroskopik görüntüler vitröze özgü bir skala mevcut olmadığı için derecelendirilememiştir. Los ve ark.'nın yaşla ilişkili vitröz sıvılaşmada izlenen morfolojik değişiklikleri ışık ve elektron mikroskobu ile değerlendirdikleri araştırmada yaşlı donörlerin vitrözlerinde kollajen fibrillerde artmış fragmantasyon gözlemlemiş ve bu durumun yaşa bağlı vitröz sıvılaşmanın patogeneğinde önemli rol oynadığı öne sürülmüştür¹⁰¹. Faulborn ve ark.'nın diyabetik vitreopati bulgularını elektron mikroskopu ile değerlendirdikleri araştırmada, diyabetik hastalardaki vitrözün morfolojik olarak normal vitrözden farklı izlendiğini rapor etmişler ve izlenen farklılığın diyabetik gözlerdeki kollajen moleküllerinin değişmesinin bir sonucu olabileceğini öne sürmüşlerdir¹⁹⁸.

Radyasyonun vitröz kontraksiyona ve traksiyona neden olduğu, buna bağlı olarak vitröz ve retinal dekolmana neden olabileceğini öne süren veriler mevcut olmakla beraber bu veriler vaka raporları şeklinde kanıt düzeyi tartışmalı çalışmalardan elde edilmiştir^{129,130}. Bildiğimiz kadarıyla, bu araştırma iyonizan radyasyonun vitrözde değişiklik yapıp yapmadığının incelendiği ilk araştırmadır ve iyonizan radyasyonun vitrözde klinik anlamlı olabilecek değişiklikler meydana getirdiği görülmüştür.

Etkisini iyonizan radyasyon gibi enerji aktarımı yoluyla gösterdiği için iyonizan olmayan radyasyon türlerinin vitrözdeki etkilerinin incelendiği araştırmalar gözden geçirildiğinde birden fazla bu konuda çalışma olduğu görülmüştür. Ueno N. ve ark.'nın, fotosensitizer varlığında vitrözün görünür ışıkla ışınlanmasının etkilerini incelediği araştırmada foto-induced vitröz yapısal değişiklikler in vivo ve in vitro modellerde değerlendirilerek, ışınlama sonrası oluşan hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin vitrözde belirgin sıvılaşmaya neden olduğu gösterilmiştir¹¹². Bir başka çalışmada ise lensi çıkarılmış genç bir kadının vitrözünün 300 nm UV ışıkla ışınlanması sonrasında vitröz

sıvılaşmada belirgin artış rapor edilmiştir¹⁹⁹. Foto-induced vitröz sıvılaşmanın mekanizmasını anlamak üzere dizayn edilen bir diğer çalışmada ise reaktif oksijen türlerinin kollajen ve HA üzerindeki etkileri incelenmiş, vitröz kollajenin yüksek moleküler ağırlıklı komponentinde artış ve çözünürlüğünde azalma, HA'nın ise moleküler ağırlığında azalma olduğu izlenmiştir^{111,200}. Yttrium-aluminium garnet (YAG) lazer ile tavşan ve maymun gözlerinin ışınlandığı bir araştırmada, iki hayvan türü için de ışınlanmamış göz ile karşılaştırıldığında radyasyona maruz kalan gözün vitrözünde belirgin moleküler değişiklikler olduğu, viskozitesinde azalma ve sıvılaşma geliştiği rapor edilmiştir²⁰¹. Bir diğer çalışmada ise YAG lazer ile vitröz ışınlandığında, vitröz içerisinde küçük kaviter alanlar oluştuğu ve kollajen düzeylerinde azalma olduğu²⁰², YAG lazerin oluşturduğu hidroksil radikalleri neticesinde vitrözde HA hasarına neden olduğu gösterilmiştir²⁰³. Yeni çıkarılmış sığır ve domuz gözlerinde kızılötesi ışınların kullanıldığı gaz CO₂ lazer ile ışınlama sonrası vitröz değişikliklerin incelendiği bir araştırmada ışınlama nedeniyle oluşan yüksek ısının kollajen molekülerinde denatürasyon meydana geldiği elektron mikroskopik incelemeler ile gösterilmiştir²⁰⁴. Her ne kadar iyonizan olmayan radyasyon türleri daha düşük enerjili olsalar da, iyonizan radyasyona benzer şekilde etkilerini enerji aktarımı aracılığıyla yapıyor olmaları nedeniyle, iyonizan radyasyon maruziyetinin de önemli değişikliklere neden olacağı düşünülebilir. Yüksek enerjili X ışınları maruziyeti ile elde ettiğimiz değişiklikler bu düşüncüyü desteklemektedir.

İyonizan olmayan radyasyon maruziyeti sonrası izlenen bulgular ve kendi sonuçlarımızdan yola çıkarak radyasyonun vitrözün fizyolojik fonksiyonlarını bozmuş olabileceği varsayımına dayanarak, bu durumun klinik sonuçlarını ön görebilmek adına literatür incelenmiştir. Vitrözün yapısal bütünlüğünün etkilendiği vitrektomi, farmakolojik vitreoliz gibi patolojik durumlarda ve yaşlanma sürecinde izlenen sıvılaşma durumunda, vitrözün oksijen regülasyon fonksiyonunun bozulduğu, bu durumun göz içinde oksidatif stres artışına neden olduğu izlenmiştir. Cerrahi olarak vitröz çıkarıldığı takdirde vitrözün antioksidan ve gradient etkisinin ortadan kalkmasına bağlı gözün oksijen regülasyonunun bozulduğu ve artmış oksidatif stresin nükleer sklerotik katarakt ve açık açılı glokom gelişim riskini artırdığı gösterilmiştir^{49,67,68,131}. Radyasyonla ilişkili

kataraktogenezin incelendiği güncel bir araştırmada sinoviyal sıvı modellerinden elde edilen veriler kullanılarak, radyasyon maruziyetinin, vitrözde oksijen difüzyonunu artıracığı ve düşük LET 1 Gy'lik ışınlama sonrası lens arkasındaki oksijen miktarında %20'den fazla artış olacağı tahmin edilmiştir. Bu durumun lenste yüksek oksijen basıncı düzeyleri ile sonuçlanması ve lensin hipoksik koşullarını bozacağı düşünülerek radyasyonun vitröz üzerindeki etkilerinin lens metabolizmasını etkileyeceği ve sonuç olarak katarakt oluşum riskini artıracığı öne sürülmüştür¹³⁸. Araştırmamızda vitrözde göstermiş olduğumuz kollajen düzeylerinde azalma ve kollajen ultrastrüktüründe bozulma gibi yapısal değişiklikler de vitrözde fonksiyonel kayba neden olarak, benzer şekilde görmeyi tehdit edebilecek patolojilerin gelişimine katkı sağlıyor olabilir.

5.1 Kısıtlılıklar

Başlangıç hipotezimize uygun şekilde iyonizan radyasyon maruziyetinin vitrözde belirgin değişikliklere yol açtığını kanıtlamış olsak da araştırmamızın birtakım kısıtlılıkları mevcuttur. Öncelikle deneylerimizde vitrözün temel moleküllerden biri olan hyaluronan miktarına bakılmamış olması önemli bir kısıtlılık olarak düşünülebilir. Radyasyonun HA moleküllerinde depolimerizasyon etkisinin iyi dökümante edilmiş olması ve viskozite ölçümleri ile, HA miktarındaki değişikliğin indirekt olarak değerlendirilebileceğini düşünerek az miktarda numuneden daha fazla veri sağlayabilmek adına HA çalışmak yerine başka yönlere ışık tutabileceğini düşünerek VH'nin metabolik içeriğinin değerlendirilmesini tercih edilmiştir. Fakat suboptimal viskozite ölçüm sonuçları beklenildiği gibi azalma ile sonuçlanmadığı için bu eksikliğin önemi artmıştır. Ayrıca vitrözün supramoleküler yapısal bütünlüğünü sağlamada rolü olabileceği öne sürülmüş olan versikan, optisin, kondroitin sülfat, tip VI kollajen, fibulin, fibrillin gibi diğer moleküllerin değişimine de bakılmamıştır. Numune miktarının yetersiz kalacağı düşünülerek öncelikli kollajen düzeylerine bakılmasının ilk aşamada daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Araştırmanın bir diğer kısıtlı yönü ise, metabolomik içerikte izlenen değişikliklerin retina ve diğer komşu yapılarda meydana gelen değişikliklere bağlı meydana gelmiş olma olasılığıdır. Özellikle nükleik asit metabolizması ile ilgili

yolaklarda meydana gelmiş olan etkilenme bu durumu işaret etmektedir. Araştırmamızda bunu ayırt edebilecek ileri bir araştırma yapılmamıştır.

Ayrıca heterojen bir dokudan bahsederken deneylerin homojen numunelerde yapılması da bir kısıtlılık olarak değerlendirilebilir²⁰⁵. Keçi gözünde metabolomik analizler yapan Locci ve arkadaşları, vitrözün dört ayrı alanını (korteks, santral, superior ve inferior bazal) incelediklerinde her alan için farklı sonuçlar elde etmişlerdir²⁰⁶. Bu konudaki literatür incelendiğinde, vitrözde gerçekleştirilen metabolomik incelemelerde de hep santrifüj ile numunelerin homojen hale getirildiği görülmektedir. Elbette ideal olan vitrözün alt bölgelerinin ayrı ayrı değerlendirilmesidir ancak bu çalışmanın öncü bir araştırma olduğu unutulmamalıdır. Çalışmamızdan elde etmiş olduğumuz pozitif veriler ışığında teknik olarak daha uygun tasarlanmış çalışmalar yürütülebilecektir.

Bir diğer önemli kısıtlılık ise numunelerin tümünün deneyler için yeterli miktarda olmamasıdır. Bunun olmaması için göz vücut oranı görece büyük olan tavşan tercih edilmişti ancak yine de ihtiyaç duyulandan az miktarda toplam numune elde edilebilmiştir. Bu nedenle her deneyde tüm tavşanlara ait numuneler incelenememiştir. Dahası, bu eksiklik viskozite ölçümlerinde istatistik analiz gücünü azaltacak bir etken olarak negatif etki etmiştir. Bu durumda birden fazla test yapmak hatalı bir çalışma tasarımı olarak düşünülebilir ancak bu durumu iki farklı şekilde izah edilebilir. Öncelikle, deney protokolümüzü gerçekleştirmeden önce tüm testler için uygun miktarda örnek elde edebileceğimizi görmek ve teknik olarak işlemin uygulanabilirliğini test etmek amacıyla deneylerde kullanılmamış olan nispeten yaşlı bir tavşanda enükleasyon ve vitrektomi uygulamıştık. Bu tavşandan elde edilen numune 2mL civarındaydı. Bir miktar bizim örneklerimizden fazla olması ilerleyen yaşa bağlı VH hacminde izlenebilecek artışa bağlı olabilir. Ayrıca, birden fazla test yapma isteğimiz çalışma hedefine uygun şekilde iyonizan radyasyonun VH'de değişikliklere neden olduğunu azami farklı yöntemle göstermek arzusudur. Beklenenden az örnek elde edilebilmiş ve viskozite ölçümlerinde vitrözün non-newtonian akışkan özellikler sergilemesi nedeniyle aynı numuneden tek ölçüm yapılabilmektedir.

Önemli bir diğerk kısıtlılık ise ışınlamada kullanılan doz fraksiyonasyon şeması stereotaktik teknikler ile uyumludur, bu nedenle, bulgularımız konvansiyonel tedaviler söz konusu olduğunda dikkatli yorumlanmalıdır.

Son olarak, en başta da belirtildiği üzere mevcut araştırmanın temel amacı iyonizan radyasyon ile vitrözde anlamlı bir değişiklik meydana geliyor mu sorusuna yanıt bulmaktı. Bu nedenle meydana gelen değişikliklerin mekanizması, doz-yanıt ilişkisi konusunda bir deney gerçekleştirilmemiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Sağlıklı bir göz için yapı ve fonksiyon bakımından intakt bir vitröz esansiyel olmasına rağmen, radyasyon tedavi sürecinde VH dikkate alınmamaktadır.
- Radyasyon maruziyeti VH’de biyofiziksel değişikliklere neden olabilir. Bu araştırmada, radyasyonun, vitröz üzerinde geç dönem klinik sonuçlara neden olabilecek etkileri olduğu gösterilmiştir.
- Radyasyon maruziyeti VH’nin fonksiyonlarını bozabilir ve tüm göz sağlığını tehlikeye atabilir. Katarakt, glokom gibi radyasyona bağlı diğer oküler komplikasyonların gelişimine katkı sağlayabilir.
- Her ne kadar bu araştırmada doz etkisi bakılmamış olsa da bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda, vitröz humorun alacağı radyasyon dozunu düşürmenin oküler radyoterapi komplikasyonlarını azaltabileceği söylenebilir. Aldığı radyasyon dozuna dikkat etmek şimdilik erken bir yaklaşım olsa da en azından aldığı dozu göz ardı etmemeli, dozun mümkün mertebe düşük seviyede tutulmasına gayret edilmelidir. Özellikle ileri yaş, diyabet gibi potansiyel vitröz komplikasyonları artırıcı durumlarda vitröz dozuna dikkat etmek ilk aşamada uygun yaklaşım olacaktır.
- VH’de meydana gelen yaşlanma sürecinde, VH’nin bir kısmında meydana gelen değişiklikler erken dönemde fonksiyonunu idame ettirmesine engel olmuyorken, büyük oranda etkilenme olduğunda fonksiyon kaybı ve vitrözle ilişkili komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu durum VH’nin paralel bir organizasyona sahip olduğunu düşündürmektedir. Radyasyon tedavisi sürecinde tümüyle korunamıyor olsa bile bir kısmını korumak makul bir yaklaşım olabilir.
- Radyoterapinin vitröz humorde neden olduğu değişikliklerin kesin mekanizmasının, klinik öneminin ve radyasyon doz yanıt ilişkisinin incelendiği ileri araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Böylece belki de yakın gelecekte yeni bir kritik yapı tanımlanabilecektir.
- Bu yazının gelecekteki araştırmalara temel veri sağlamasını ve metabolomiklerin oftalmoloji ve özellikle vitreo-retinal hastalıklar konusunda nasıl yararlı olabileceğinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacağını umuyoruz.

- Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında gelecek araştırmacıların araştırma konuları şunlar olabilir; benzer çalışma tasarımı konvansiyonel dozlarda gerçekleştirilebilir, iyonizan radyasyonun VH'deki değişiklik meydana getirip getirmediğini, ne oranda değişiklik meydana getirdiğini tespit edebilmek amacıyla manyetik rezonans gibi non invaziv görüntüleme teknikleri ile VH görüntülenerek ölçümler yapılabilir, henüz patofizyolojisi net aydınlatılmamış olan radyasyon kataraktogenezinin altında yatan mekanizmada VH'nin rolü olabileceği için, bu araştırmadaki benzer testler lensin korunarak sadece VH'nin ışınlandığı deneklerde gerçekleştirilebilir, daha fazla örnek ile testler yapabilmek adına bir deney popülasyonu sadece bir teste tabi tutularak aynı deney tekrarlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Balazs EA: [The biological function of the vitreous body]. *Bibl Ophthalmol* 79:1-4, 1969
2. Shui YB, Holekamp NM, Kramer BC, et al: The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption: relationship to the etiology of nuclear cataracts. *Arch Ophthalmol* 127:475-82, 2009
3. Bishop PN: Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 19:323-44, 2000
4. Cunha-Vaz JG: The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* 78:715-21, 2004
5. Lee B, Litt M, Buchsbaum G: Rheology of the vitreous body. Part I: Viscoelasticity of human vitreous. *Biorheology* 29:521-33, 1992
6. Walker F, Patrick RS: Constituent monosaccharides and hexosamine concentration of normal human vitreous humour. *Exp Eye Res* 6:227-32, 1967
7. Foulds WS: Is your vitreous really necessary? The role of the vitreous in the eye with particular reference to retinal attachment, detachment and the mode of action of vitreous substitutes. *Eye (Lond)* 1 (Pt 6):641-64, 1987
8. Fatt I: Hydraulic flow conductivity of the vitreous gel. *Investigative ophthalmology & visual science* 16:565-568, 1977
9. Arciniegas A, Amaya LE: Bio-structural model of the human eye. *Ophthalmologica* 180:207-11, 1980
10. Coulombre AJ, Coulombre JL: The role of intraocular pressure in the development of the chick eye: III. Ciliary body. *Am J Ophthalmol* 44:85-93, 1957
11. Jacobson B, Dorfman T, Basu PK, et al: Inhibition of vascular endothelial cell growth and trypsin activity by vitreous. *Experimental Eye Research* 41:581-595, 1985

12. Balazs EA: Fine structure of the developing vitreous. *International ophthalmology clinics* 15:53-63, 1975
13. Sebag J: Age-related changes in human vitreous structure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 225:89-93, 1987
14. Teng CC, Chi HH: Vitreous changes and the mechanism of retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 44:335-56, 1957
15. Foos RY: Vitreoretinal juncture; topographical variations. *Invest Ophthalmol* 11:801-8, 1972
16. Matsumoto B, Blanks JC, Ryan SJ: Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:71-82, 1984
17. Le Goff MM, Bishop PN: Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye* 22:1214-1222, 2008
18. Bos KJ, Holmes DF, Meadows RS, et al: Collagen fibril organisation in mammalian vitreous by freeze etch/rotary shadowing electron microscopy. *Micron (Oxford, England : 1993)* 32:301-306, 2001
19. Ponsioen TL, Hooymans JM, Los LI: Remodelling of the human vitreous and vitreoretinal interface--a dynamic process. *Prog Retin Eye Res* 29:580-95, 2010
20. Sebag J, Balazs EA: Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:1867-71, 1989
21. Vagaja NN, Chinnery HR, Binz N, et al: Changes in murine hyalocytes are valuable early indicators of ocular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:1445-51, 2012
22. Osterlin SE, Jacobson B: The synthesis of hyaluronic acid in vitreous. I. Soluble and particulate transferases in hyalocytes. *Exp Eye Res* 7:497-510, 1968
23. Newsome DA, Linsenmayer TF, Trelstad RL: Vitreous body collagen. Evidence for a dual origin from the neural retina and hyalocytes. *J Cell Biol* 71:59-67, 1976

24. Rittig M, Flügel C, Prehm P, et al: Hyaluronan synthase immunoreactivity in the anterior segment of the primate eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231:313-7, 1993
25. Sakamoto T: [Cell biology of hyalocytes]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 107:866-82; discussion 883, 2003
26. Grabner G, Boltz G, Förster O: Macrophage-like properties of human hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19:333-40, 1980
27. Stein-Streilein J: Immune regulation and the eye. *Trends Immunol* 29:548-54, 2008
28. Noda Y, Hata Y, Hisatomi T, et al: Functional properties of hyalocytes under PDGF-rich conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2107-14, 2004
29. Jiang LQ, Streilein JW: Immune privilege extended to allogeneic tumor cells in the vitreous cavity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:224-8, 1991
30. Sonoda KH, Sakamoto T, Qiao H, et al: The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation. *Immunology* 116:390-9, 2005
31. Smith GN, Jr., Newsome DA: The nature and origin of the glycosaminoglycans of the embryonic chick vitreous body. *Dev Biol* 62:65-77, 1978
32. Linsenmayer TF, Little CD: Embryonic neural retina collagen: in vitro synthesis of high molecular weight forms of type II plus a new genetic type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:3235-9, 1978
33. Smith GN, Jr., Linsenmayer TF, Newsome DA: Synthesis of type II collagen in vitro by embryonic chick neural retina tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4420-3, 1976
34. Azuma N, Tajima S, Konomi H, et al: Glycosaminoglycan and collagen distribution in the developing human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236:679-87, 1998

35. Halfter W, Dong S, Dong A, et al: Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. *Eye (Lond)* 22:1207-13, 2008
36. Halfter W, Dong S, Schurer B, et al: Embryonic synthesis of the inner limiting membrane and vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2202-9, 2005
37. Azuma N, Hida T, Akiya S, et al: Histochemical studies on hyaluronic acid in the developing human retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228:158-60, 1990
38. Balazs EA, Laurent TC, Laurent UB: Studies on the structure of the vitreous body. VI. Biochemical changes during development. *J Biol Chem* 234:422-30, 1959
39. Balazs, E. A. and Denlinger, J. L. (1982) Aging changes in the vitreous. In *Aging and Human Visual Function* (eds. N. Dismukes and R. Sekular) pp. 45-57. Alan R. Liss, New York.
40. Bishop PN, Reardon AJ, McLeod D, et al: Identification of Alternatively Spliced Variants of Type II Procollagen in Vitreous. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203:289-295, 1994
41. Snowden JM, Eyre DR, Swann DA: Vitreous structure. VI. Age-related changes in the thermal stability and crosslinks of vitreous, articular cartilage and tendon collagens. *Biochim Biophys Acta* 706:153-7, 1982
42. Wang J, McLeod D, Henson DB, et al: Age-dependent changes in the basal retinovitreal adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1793-800, 2003
43. Gisladottir S, Loftsson T, Stefansson E: Diffusion characteristics of vitreous humour and saline solution follow the Stokes Einstein equation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247:1677-84, 2009
44. Sebag J, Ansari RR, Suh KI: Pharmacologic vitreolysis with microplasmin increases vitreous diffusion coefficients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245:576-80, 2007

45. Sim D, Fruttiger M: Keeping blood vessels out of sight. *Elife* 2:e00948, 2013
46. Saccà SC, Roszkowska AM, Izzotti A: Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutat Res* 752:153-171, 2013
47. Géhl Z, Bakondi E, Resch MD, et al: Diabetes-induced oxidative stress in the vitreous humor. *Redox Biol* 9:100-103, 2016
48. Helbig H, Hinz JP, Kellner U, et al: Oxygen in the anterior chamber of the human eye. *Ger J Ophthalmol* 2:161-4, 1993
49. Holekamp NM, Shui YB, Beebe DC: Vitrectomy surgery increases oxygen exposure to the lens: a possible mechanism for nuclear cataract formation. *Am J Ophthalmol* 139:302-10, 2005
50. Wilson CA, Berkowitz BA, McCuen BW, 2nd, et al: Measurement of preretinal oxygen tension in the vitrectomized human eye using fluorine-19 magnetic resonance spectroscopy. *Arch Ophthalmol* 110:1098-100, 1992
51. Linsenmeier RA, Goldstick TK, Blum RS, et al: Estimation of retinal oxygen transients from measurements made in the vitreous humor. *Exp Eye Res* 32:369-79, 1981
52. Alder VA, Niemeyer G, Cringle SJ, et al: Vitreal oxygen tension gradients in the isolated perfused cat eye. *Curr Eye Res* 5:249-56, 1986
53. Shui YB, Fu JJ, Garcia C, et al: Oxygen distribution in the rabbit eye and oxygen consumption by the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1571-80, 2006
54. Ohia SE, Opere CA, Leday AM: Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. *Mutat Res* 579:22-36, 2005
55. Ankamah E, Sebag J, Ng E, et al: Vitreous Antioxidants, Degeneration, and Vitreo-Retinopathy: Exploring the Links. *Antioxidants (Basel)* 9, 2019

56. Deguine V, Menasche M, Ferrari P, et al: Free radical depolymerization of hyaluronan by maillard reaction products: Role in liquefaction of aging vitreous. *International Journal of Biological Macromolecules* 22:17-22, 1998
57. Crouch R, Priest DG, Duke EJ: Superoxide dismutase activities of bovine ocular tissues. *Experimental Eye Research* 27:503-509, 1978
58. de Smet MD, Gad Elkareem AM, Zwinderman AH: The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease. *Ophthalmologica* 230:165-78, 2013
59. Filas BA, Shui YB, Beebe DC: Computational model for oxygen transport and consumption in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:6549-59, 2013
60. Petropoulos IK, Pournaras JA, Stangos AN, et al: Preretinal partial pressure of oxygen gradients before and after experimental pars plana vitrectomy. *Retina* 33:170-8, 2013
61. Duarte TL, Lunec J: Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free radical research* 39:671-686, 2005
62. Duarte TL, Lunec J: Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 39:671-86, 2005
63. Park SW, Ghim W, Oh S, et al: Association of vitreous vitamin C depletion with diabetic macular ischemia in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 14:e0218433, 2019
64. Barbazetto IA, Liang J, Chang S, et al: Oxygen tension in the rabbit lens and vitreous before and after vitrectomy. *Exp Eye Res* 78:917-24, 2004
65. Truscott RJ: Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp Eye Res* 80:709-25, 2005
66. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC: The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 612:105-14, 2006
67. Chang S: LXII Edward Jackson lecture: open angle glaucoma after vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 141:1033-1043, 2006

68. Siegfried CJ, Shui YB, Holekamp NM, et al: Oxygen distribution in the human eye: relevance to the etiology of open-angle glaucoma after vitrectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5731-8, 2010
69. Aretz S, Krohne TU, Kammerer K, et al: In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome. *Proteome Sci* 11:22, 2013
70. Angi M, Kalirai H, Coupland SE, et al: Proteomic Analyses of the Vitreous Humour. *Mediators of Inflammation* 2012:148039, 2012
71. Balazs EA. Functional anatomy of the vitreous. In: Duane TD, Jaeger EA (eds). *Biomedical Foundations of Ophthalmology*, vol 1, Ch 17 Harper and Row: Philadelphia, 1984, pp 1–16.
72. Balazs, E. A. (1960) Physiology of the vitreous body. In *Importance of the Vitreous Body in Retinal Surgery with Special Emphasis on Re-operation* (ed. C. L. Schepens) pp. 29±57. C.V. Mosby, St Louis.
73. Hultsch E: The vitreous of the baby owl monkey. A model for rapid and complete gel-liquefaction. *Dev Ophthalmol* 2:1-7, 1981
74. Poole AR. Cartilage in health and disease. In: Koopman W, ed. *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*. 14th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001:226–84.
75. Bishop PN, Crossman MV, McLeod D, et al: Extraction and characterization of the tissue forms of collagen types II and IX from bovine vitreous. *Biochem J* 299 (Pt 2):497-505, 1994
76. Sebag J., Yee K.M.P. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2007. Vitreous: From biochemistry to clinical relevance; pp. 1–67.
77. Mayne R, Brewton RG, Mayne PM, et al: Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. *J Biol Chem* 268:9381-6, 1993

78. Bos KJ, Holmes DF, Kadler KE, et al: Axial structure of the heterotypic collagen fibrils of vitreous humour and cartilage. Edited by W. Baumeister. *Journal of Molecular Biology* 306:1011-1022, 2001
79. Bishop, P. N., Crossman, M. V., McLeod, D. and Ayad, S. (1994) Extraction and characterization of the tissue forms of collagen types II and IX from bovine vitreous. *Biochem. J.* 299, 497-505.
80. Góes RM, Nader HB, Porcionatto MA, et al: Chondroitin sulfate proteoglycans are structural renewable constituents of the rabbit vitreous body. *Curr Eye Res* 30:405-13, 2005
81. Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, et al: Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1041-6, 2004
82. Bishop P, Ayad S, Reardon A, et al: Type VI collagen is present in human and bovine vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:710-3, 1996
83. Balazs EA and J. L.: Aging changes in the vitreous, in Sekular ND (ed): *In Aging and Human Visual Function*, pp 45-57. Alan R, Liss, New York., 1982
84. Balazs, E. A. and Denlinger, J. L. (1982) Aging changes in the vitreous. *In Aging and Human Visual Function* (eds. N. Dismukes and R. Sekular) pp. 45-57. Alan R. Liss, New York.
85. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al: Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352:337-9, 1991
86. Reardon A, Heinegard D, McLeod D, et al: The large chondroitin sulphate proteoglycan versican in mammalian vitreous. *Matrix Biol* 17:325-33, 1998
87. Miyamoto T, Inoue H, Sakamoto Y, et al: Identification of a novel splice site mutation of the CSPG2 gene in a Japanese family with Wagner syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2726-35, 2005

88. Allen WS, Otterbein EC, Wardi AH: Isolation and characterization of the sulfated glycosaminoglycans of the vitreous body. *Biochim Biophys Acta* 498:167-75, 1977
89. Reardon A, Heinegård D, McLeod D, et al: The large chondroitin sulphate proteoglycan versican in mammalian vitreous. *Matrix Biol* 17:325-33, 1998
90. Balazs EA: Therapeutic use of hyaluronan. *Structural Chemistry* 20:341-349, 2009
91. Filas BA, Zhang Q, Okamoto RJ, et al: Enzymatic degradation identifies components responsible for the structural properties of the vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:55-63, 2014
92. Pirie A, Schmidt G, Waters JW: OX VITREOUS HUMOUR. 1.-THE RESIDUAL PROTEIN. *Br J Ophthalmol* 32:321-39, 1948
93. Scott JE: The chemical morphology of the vitreous. *Eye* 6:553-555, 1992
94. SCOTT JE, CHEN Y, BRASS A: Secondary and tertiary structures involving chondroitin and chondroitin sulphates in solution, investigated by rotary shadowing/electron microscopy and computer simulation. *European Journal of Biochemistry* 209:675-680, 1992
95. Bishop PN, McLeod D, Reardon A: Effects of hyaluronan lyase, hyaluronidase, and chondroitin ABC lyase on mammalian vitreous gel. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2173-8, 1999
96. Tozer K., Johnson M.W., Sebag J., II . *Vitreous*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2014. C. Vitreous aging and posterior vitreous detachment; pp. 131–150.
97. Foos RY, Wheeler NC: Vitreoretinal juncture. Synchrony senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* 89:1502-12, 1982
98. Worst JG: Cisternal systems of the fully developed vitreous body in the young adult. *Trans Ophthalmol Soc U K* 97:550-4, 1977

99. Sebag J. The vitreous. In: Adler FH, Hart WM, eds. Adler's physiology of the eye. 9th ed. St. Louis: Mosby; 1992:268-347.
100. Bos KJ, Holmes DF, Meadows RS, et al: Collagen fibril organisation in mammalian vitreous by freeze etch/rotary shadowing electron microscopy. *Micron* 32:301-306, 2001
101. Los LI, van der Worp RJ, van Luyn MJ, et al: Age-related liquefaction of the human vitreous body: LM and TEM evaluation of the role of proteoglycans and collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2828-33, 2003
102. Nuzzi R, Marchese A, Gulino GR, et al: Influence of posterior vitreous detachment and type of intraocular lens on lipid peroxidation in the human vitreous. *Mol Vis* 21:1106-12, 2015
103. Vaughan-Thomas A, Gilbert SJ, Duance VC: Elevated levels of proteolytic enzymes in the aging human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3299-304, 2000
104. Harocopos GJ, Shui YB, McKinnon M, et al: Importance of vitreous liquefaction in age-related cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:77-85, 2004
105. McCord JM: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185:529-31, 1974
106. Andley UP, Chakrabarti B: Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 115:894-901, 1983
107. Rose RC, Gogia R, Richer SP: Properties of electrochemically active components in mammalian vitreous humor. *Exp Eye Res* 64:807-12, 1997
108. Ueno N: [Changes in vitreous structure caused by oxygen free radicals]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 99:1342-60, 1995
109. Matsumura G, Herp A, Pigman W: Depolymerization of hyaluronic acid by autoxidants and radiations. *Radiat Res* 28:735-52, 1966

110. Deguine V, Menasche M, Ferrari P, et al: Free radical depolymerization of hyaluronan by Maillard reaction products: role in liquefaction of aging vitreous. *Int J Biol Macromol* 22:17-22, 1998
111. Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Res* 13:505-12, 1994
112. Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, et al: Effects of visible-light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Exp Eye Res* 44:863-70, 1987
113. Akiba J: [Photodynamically induced vitreous liquefaction in vivo]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 96:731-6, 1992
114. Armand G, Chakrabarti B: Conformational differences between hyaluronates of gel and liquid human vitreous: fractionation and circular dichroism studies. *Curr Eye Res* 6:445-50, 1987
115. Akiba J, Ueno N, Chakrabarti B: Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Current Eye Research* 13:505-512, 1994
116. Francisco BM, Salvador M, Amparo N: Oxidative stress in myopia. *Oxid Med Cell Longev* 2015:750637, 2015
117. Le Goff MM, Bishop PN: Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)* 22:1214-22, 2008
118. Johnson MW: Perifoveal vitreous detachment and its macular complications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 103:537-67, 2005
119. Sebag J: Posterior Vitreous Detachment. *Ophthalmology* 125:1384-1385, 2018
120. Tozer, K.; Johnson, M.W.; Sebag, J., II. C. Vitreous aging and posterior vitreous detachment. In *Vitreous*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 131–150.
121. McLeod D, Leaver PK: Trampolines and triangles. The surgical pathology of the vitreous. *Trans Ophthalmol Soc U K* 97:225-31, 1977

122. Wong HC, Sehmi KS, McLeod D: Abortive neovascular outgrowths discovered during vitrectomy for diabetic vitreous haemorrhage. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227:237-40, 1989
123. Chuo JY, Lee TY, Hollands H, et al: Risk factors for posterior vitreous detachment: a case-control study. *Am J Ophthalmol* 142:931-7, 2006
124. Napolitano F, Di Iorio V, Di Iorio G, et al: Early posterior vitreous detachment is associated with LAMA5 dominant mutation. *Ophthalmic Genet* 40:39-42, 2019
125. Akiba J: Prevalence of posterior vitreous detachment in high myopia. *Ophthalmology* 100:1384-8, 1993
126. Morita H, Funata M, Tokoro T: A clinical study of the development of posterior vitreous detachment in high myopia. *Retina* 15:117-24, 1995
127. Sebag J: Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242:690-8, 2004
128. Holekamp NM: The vitreous gel: more than meets the eye. *Am J Ophthalmol* 149:32-6, 2010
129. Kodjikian L, Garweg JG, Fleury J, et al: Bilateral rhegmatogenous retinal detachment after external-beam radiotherapy: just a coincidence? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242:523-6, 2004
130. Hidaka T, Chuman H, Nao IN: Bilateral Rhegmatogenous Retinal Detachment during External Beam Radiotherapy. *Case Rep Ophthalmol* 7:315-20, 2016
131. Holekamp NM, Shui YB, Beebe D: Lower intraocular oxygen tension in diabetic patients: possible contribution to decreased incidence of nuclear sclerotic cataract. *Am J Ophthalmol* 141:1027-32, 2006
132. Palmquist BM, Philipson B, Barr PO: Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy. *Br J Ophthalmol* 68:113-7, 1984

133. Do DV, Gichuhi S, Vedula SS, et al: Surgery for post-vitrectomy cataract. *Cochrane Database Syst Rev* 12:Cd006366, 2013
134. Feng H, Adelman RA: Cataract formation following vitreoretinal procedures. *Clin Ophthalmol* 8:1957-65, 2014
135. Ogura Y, Kitagawa K, Ogino N: [Prospective longitudinal studies on lens changes after vitrectomy--quantitative assessment by fluorophotometry and refractometry]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 97:627-631, 1993
136. Van Effenterre G, Ameline B, Campinchi F, et al: [Is vitrectomy cataractogenic? Study of changes of the crystalline lens after surgery of retinal detachment]. *J Fr Ophtalmol* 15:449-54, 1992
137. Melberg NS, Thomas MA: Nuclear sclerotic cataract after vitrectomy in patients younger than 50 years of age. *Ophthalmology* 102:1466-71, 1995
138. Richardson RB, Ainsbury EA, Prescott CR, et al: Etiology of posterior subcapsular cataracts based on a review of risk factors including aging, diabetes, and ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 96:1339-1361, 2020
139. Goosey JD, Tuan WM, Garcia CA: A lipid peroxidative mechanism for posterior subcapsular cataract formation in the rabbit: a possible model for cataract formation in tapetoretinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:608-12, 1984
140. Al-ghoul KJ, Novak LA, Kuszak JR: The structure of posterior subcapsular cataracts in the Royal College of Surgeons (RCS) rats. *Exp Eye Res* 67:163-77, 1998
141. Ettl A, Fischer-Klein C, Chemelli A, et al: Proton relaxation times of the vitreous body in hereditary vitreoretinal dystrophy. *Ophthalmologica* 208:195-7, 1994
142. Seery CM, Pruett RC, Liberfarb RM, et al: Distinctive cataract in the Stickler syndrome. *Am J Ophthalmol* 110:143-8, 1990
143. Kubo E, Kumamoto Y, Tsuzuki S, et al: Axial length, myopia, and the severity of lens opacity at the time of cataract surgery. *Arch Ophthalmol* 124:1586-90, 2006

144. Rosenblatt E, Brook OR, Erlich N, et al: Late visual and auditory toxicity of radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Tumori* 89:68-74, 2003
145. Nakissa N, Rubin P, Strohl R, et al: Ocular and orbital complications following radiation therapy of paranasal sinus malignancies and review of literature. *Cancer* 51:980-6, 1983
146. Boozalis GT, Schachat AP, Green WR: Subretinal neovascularization from the retina in radiation retinopathy. *Retina* 7:156-61, 1987
147. Takeda A, Shigematsu N, Suzuki S, et al: Late retinal complications of radiation therapy for nasal and paranasal malignancies: relationship between irradiated-dose area and severity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44:599-605, 1999
148. Dinca EB, Yianni J, Rowe J, et al: Survival and complications following γ knife radiosurgery or enucleation for ocular melanoma: a 20-year experience. *Acta Neurochir (Wien)* 154:605-10, 2012
149. Haimovici R, Mukai S, Schachat AP, et al: Rhegmatogenous retinal detachment in eyes with uveal melanoma. *Retina* 16:488-96, 1996
150. Saumya Pal S, Gopal L, Khetan V, et al: Rhegmatogenous retinal detachment following treatment for retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 47:349-55, 2010
151. Shields CL, Cater J, Shields JA, et al: Combined plaque radiotherapy and transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma: tumor control and treatment complications in 270 consecutive patients. *Arch Ophthalmol* 120:933-40, 2002
152. Lim TH, Robertson DM: Presumed rhegmatogenous retinal detachment in patients with retinoblastoma. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 20:22-27, 2000
153. Kell DB, Oliver SG: The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 12:148, 2016
154. Fiehn O: Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48:155-71, 2002

155. Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, et al: Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 491:384-92, 2012
156. Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, et al: Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:640-57, 2014
157. Kohler I, Verhoeven A, Derks RJ, et al: Analytical pitfalls and challenges in clinical metabolomics. *Bioanalysis* 8:1509-32, 2016
158. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G: Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:263-9, 2012
159. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al: Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 348:2304-12, 2003
160. Suhre K, Gieger C: Genetic variation in metabolic phenotypes: study designs and applications. *Nat Rev Genet* 13:759-69, 2012
161. Maan K, Tyagi R, Dutta A, et al: Comparative metabolic profiles of total and partial body radiation exposure in mice using an untargeted metabolomics approach. *Metabolomics* 16:124, 2020
162. Gramatyka M, Skorupa A, Sokół M: Nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals metabolic changes in living cardiomyocytes after low doses of ionizing radiation. *Acta Biochim Pol* 65:309-318, 2018
163. Wu H, Xu C, Gu Y, et al: An improved pseudotargeted GC-MS/MS-based metabolomics method and its application in radiation-induced hepatic injury in a rat model. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1152:122250, 2020
164. Los LI: The rabbit as an animal model for post-natal vitreous matrix differentiation and degeneration. *Eye (Lond)* 22:1223-32, 2008
165. Hou H, Nudleman E, Weinreb RN: Animal Models of Proliferative Vitreoretinopathy and Their Use in Pharmaceutical Investigations. *Ophthalmic Res* 60:195-204, 2018

166. Los LI: The rabbit as an animal model for post-natal vitreous matrix differentiation and degeneration. *Eye* 22:1223-1232, 2008
167. Haines NR, Manoharan N, Olson JL, et al: Metabolomics Analysis of Human Vitreous in Diabetic Retinopathy and Rhegmatogenous Retinal Detachment. *J Proteome Res* 17:2421-2427, 2018
168. Tomita Y, Cagnone G, Fu Z, et al: Vitreous metabolomics profiling of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 64:70-82, 2021
169. Barba I, Garcia-Ramírez M, Hernández C, et al: Metabolic Fingerprints of Proliferative Diabetic Retinopathy: An 1H-NMR–Based Metabonomic Approach Using Vitreous Humor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51:4416-4421, 2010
170. Wang H, Fang J, Chen F, et al: Metabolomic profile of diabetic retinopathy: a GC-TOFMS-based approach using vitreous and aqueous humor. *Acta Diabetol* 57:41-51, 2020
171. Laíns I, Gantner M, Murinello S, et al: Metabolomics in the study of retinal health and disease. *Prog Retin Eye Res* 69:57-79, 2019
172. Paris LP, Johnson CH, Aguilar E, et al: Global metabolomics reveals metabolic dysregulation in ischemic retinopathy. *Metabolomics* 12:15, 2016
173. Li M, Li H, Jiang P, et al: Investigating the pathological processes of rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy with metabolomics analysis. *Mol Biosyst* 10:1055-62, 2014
174. Yu M, Wu Z, Zhang Z, et al: Metabolomic Analysis of Human Vitreous in Rhegmatogenous Retinal Detachment Associated With Choroidal Detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:5706-13, 2015
175. Nawaz IM, Rezzola S, Cancarini A, et al: Human vitreous in proliferative diabetic retinopathy: Characterization and translational implications. *Progress in Retinal and Eye Research* 72:100756, 2019

176. Sahajpal NS, Vig VK, Singh R, et al: Deranged Metabolic Profile and Identification of Biomarkers in the Vitreous Humour of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Protein Pept Lett* 25:791-798, 2018
177. Barbosa-Breda J, Himmelreich U, Ghesquière B, et al: Clinical Metabolomics and Glaucoma. *Ophthalmic Res* 59:1-6, 2018
178. Willey JS, Long DL, Vanderman KS, et al: Ionizing radiation causes active degradation and reduces matrix synthesis in articular cartilage. *Int J Radiat Biol* 89:268-77, 2013
179. Garrison JC, Uyeki EM: The effects of gamma radiation on chondrogenic development in vitro. *Radiat Res* 116:356-63, 1988
180. Hugenberg ST, Myers SL, Brandt KD: Suppression of glycosaminoglycan synthesis by articular cartilage, but not of hyaluronic acid synthesis by synovium, after exposure to radiation. *Arthritis Rheum* 32:468-74, 1989
181. Muhonen A, Säämänen AM, Peltomäki T, et al: The effect of irradiation and hyperbaric oxygenation (HBO) on extracellular matrix of the condylar cartilage after mandibular distraction osteogenesis in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35:79-87, 2006
182. Saintigny Y, Cruet-Hennequart S, Hamdi DH, et al: Impact of therapeutic irradiation on healthy articular cartilage. *Radiat Res* 183:135-46, 2015
183. Cook JL, Marberry KM, Kuroki K, et al: Assessment of cellular, biochemical, and histologic effects of bipolar radiofrequency treatment of canine articular cartilage. *Am J Vet Res* 65:604-9, 2004
184. Yasura K, Nakagawa Y, Kobayashi M, et al: Mechanical and biochemical effect of monopolar radiofrequency energy on human articular cartilage: an in vitro study. *Am J Sports Med* 34:1322-7, 2006

185. Rieder B, Weihs AM, Weidinger A, et al: Hydrostatic pressure-generated reactive oxygen species induce osteoarthritic conditions in cartilage pellet cultures. *Sci Rep* 8:17010, 2018
186. Monboisse JC, Braquet P, Randoux A, et al: Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective effect of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 32:53-8, 1983
187. Monboisse JC, Borel JP: Oxidative damage to collagen. *Exs* 62:323-7, 1992
188. Tram NK, Swindle-Reilly KE: Rheological Properties and Age-Related Changes of the Human Vitreous Humor. *Front Bioeng Biotechnol* 6:199, 2018
189. Sebag J: Abnormalities of human vitreous structure in diabetes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231:257-60, 1993
190. Mohamed F, Bradley DA, Winlove CP: Effects of ionizing radiation on extracellular matrix. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 580:566-569, 2007
191. Daar E, King L, Nisbet A, et al: Viscosity changes in hyaluronic acid: irradiation and rheological studies. *Appl Radiat Isot* 68:746-50, 2010
192. Lamberts HB, Alexander P: POST-IRRADIATION CHANGES IN SOLUTIONS OF HYALURONIC ACID EXPOSED TO X-RAYS. *Biochimica et biophysica acta* 88:642-644, 1964
193. Green SP, Baker MS, Lowther DA: Depolymerization of synovial fluid hyaluronic acid (HA) by the complete myeloperoxidase (MPO) system may involve the formation of a HA-MPO ionic complex. *J Rheumatol* 17:1670-5, 1990
194. Saari H, Kontinen YT, Friman C, et al: Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation* 17:403-15, 1993

195. Hawkins CL, Davies MJ: Degradation of hyaluronic acid, poly- and monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radic Biol Med* 24:1396-410, 1998
196. Soltes L, Lath D, Mendichi R, et al: Radical degradation of high molecular weight hyaluronan: inhibition of the reaction by ibuprofen enantiomers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 23:65-71, 2001
197. Rees MD, Hawkins CL, Davies MJ: Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *Biochem J* 381:175-84, 2004
198. Faulborn J, Dunker S, Bowald S: Diabetic vitreopathy--findings using the celloidin embedding technique. *Ophthalmologica* 212:369-76, 1998
199. Ueno N, Chakrabarti B: Liquefaction of human vitreous in model aphakic eyes by 300-nm UV photolysis: monitoring liquefaction by fluorescence. *Curr Eye Res* 9:487-92, 1990
200. Hikichi T, Akiba J, Ueno N, et al: Cross-linking of vitreous collagen and degradation of hyaluronic acid induced by bilirubin-sensitized photochemical reaction. *Jpn J Ophthalmol* 41:154-9, 1997
201. Lerman S, Thrasher B, Moran M: Vitreous changes after neodymium-YAG laser irradiation of the posterior lens capsule or mid-vitreous. *Am J Ophthalmol* 97:470-5, 1984
202. Stepanov AV, Babizhaev MA, Ivanov AN, et al: [Photo damage to the eye in exposure to the radiation from a Nd:YAG Q-switching laser: the physicochemical structural changes to the crystalline lens and the vitreous body]. *Vestn Oftalmol* 106:31-5, 1990
203. Timberlake GT, Gemperli AW, Larive CK, et al: Free radical production by Nd:YAG laser photodisruption. *Ophthalmic Surg Lasers* 28:582-9, 1997

204. Yoshimoto H, Kampik A, Birngruber R, et al: Vitreous morphology after carbon dioxide laser irradiation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221:276-81, 1984
205. Swindle KE, Ravi N: Recent advances in polymeric vitreous substitutes. *Expert Review of Ophthalmology* 2:255-265, 2007
206. Locci E, Scano P, Rosa MF, et al: A metabolomic approach to animal vitreous humor topographical composition: a pilot study. *PLoS One* 9:e97773, 2014

EKLER**Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi**

KOBAY
Genij Hayvanları Laboratuvarı

Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Osım ODTU Teknokent
Uzay Çağı Caddesi, 1308. Sokak, No: 6 D: 17
Yenimahalle / ANKARA
(0312) 394 70 94
bilgi@kobay.com.tr
www.kobay.com.tr

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	400
	Protokol Adı	Vitröz Humorde radyoterapi ile indüklenen değişiklikler
	Başvuru Tarihi	29.08.2019
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Ünvanı	Doç.Dr. Gözde YAZICI
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Ayşenur ELMALI Samiye YABANOĞLU Emirhan NEMUTLU
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	400
	Onay Tarihi	23.9.2019
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	New Zealand White Rabbit- 12 adet
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gereke , yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş , çalışmanın gerçekleşmesinde etik sakinca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	
	Etik Kurul Üyesi Sorumlu Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi Kürşat DERİCİ	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Kaan YAVUZİYİT	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem Yöyen ERMIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	

Ek 2. Vitröz numunelerdeki metabolomiks analizler sonucunda tanımlanan metabolitler ve bağıl değerleri

<i>Metabolit İsmi</i>	<i>Araç</i>	<i>Kontrol (Sol) (Ort. ± SD)</i>	<i>Deney (Sağ) (Ort. ± SD)</i>	<i>Wilcoxon pair test p değerleri</i>
(3beta,22E)-26,27-Dinoregosta-5,22-dien-3-ol	LC-MS/MS (+)	0.956 ± 0.183	1.088 ± 0.081	0.578
(E,E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl nonanoate	LC-MS/MS (+)	0.958 ± 0.093	1.046 ± 0.145	1.000
(R)-Sulcatol	LC-MS (+)	0.824 ± 0.061	1.186 ± 0.139	0.047
(Z)-9,12,13-trihydroxyoctadec-15-enoic acid	LC-MS (-)	1.095 ± 0.17	0.967 ± 0.049	1.000
1,11-Undecanedicarboxylic acid	LC-MS/MS (-)	0.988 ± 0.032	1.015 ± 0.021	0.469
1,2-Cyclohexanedione	LC-MS (+)	0.885 ± 0.071	1.08 ± 0.125	0.375
1,7-Dimethyluric acid	LC-MS (-)	1.259 ± 0.44	0.889 ± 0.062	0.469
1,8,9-Anthracetriol	LC-MS (-)	0.961 ± 0.075	1.101 ± 0.073	0.047
10-Hydroxydecanoic acid	LC-MS (-)	0.963 ± 0.022	1.015 ± 0.03	0.375
16-Hydroxyhexadecanoic acid	LC-MS (-)	1.091 ± 0.185	0.943 ± 0.037	0.938
17-HDoHE	LC-MS (-)	1.131 ± 0.035	0.929 ± 0.117	0.688
17-Hydroxyprogesterone	LC-MS (-)	0.724 ± 0.164	1.364 ± 0.446	0.297
1-hexadecanol	GC-MS	0.572 ± 0.034	0.572 ± 0.067	0.938
1-hexadecyl-glycero-3-phosphate	LC-MS/MS (+)	0.77 ± 0.182	1.332 ± 0.134	0.156
1-Monostearin	LC-MS (+)	0.969 ± 0.159	1.063 ± 0.182	0.688
1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)	LC-MS/MS (+)	0.884 ± 0.037	1.095 ± 0.15	0.688
2,3-dihydroxypropyl hexadecanoate	LC-MS (+)	0.855 ± 0.052	1.09 ± 0.153	0.469
2,3-dihydroxypropyl palmitate	LC-MS (+)	0.879 ± 0.05	1.084 ± 0.15	0.469
2,3-dihydroxypropyl stearate	LC-MS (+)	0.92 ± 0.072	1.123 ± 0.164	0.578
2,4-Dihydroxybenzophenone	LC-MS (-)	0.979 ± 0.093	1.007 ± 0.051	0.813
2-[4-(sulfoxy)phenyl]acetic acid	LC-MS/MS (-)	0.952 ± 0.031	1.032 ± 0.033	0.109
25-hydroxy-16,17,23,23,24,24-hexadehydrovitamin D3	LC-MS/MS (-)	0.875 ± 0.288	1.015 ± 0.278	0.813
2-Carboxybenzaldehyde	LC-MS (-)	0.953 ± 0.153	1.133 ± 0.122	0.578
2-Furoic acid	LC-MS (-)	0.836 ± 0.092	1.011 ± 0.163	0.688
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	LC-MS (-)	0.951 ± 0.129	1.244 ± 0.142	0.219
2-hydroxybutyric acid	GC-MS	1.28 ± 0.189	1.124 ± 0.202	0.031
2-hydroxyethinylestradiol	LC-MS/MS (-)	1.102 ± 0.071	0.897 ± 0.123	0.156
2-ketobutyric acid	GC-MS	0.341 ± 0.025	0.25 ± 0.032	0.031
2-keto-L-gulonic acid	GC-MS	1.25 ± 0.063	1.066 ± 0.17	0.688
3 beta-Hydroxy-5-cholestenoate	LC-MS/MS (-)	1.013 ± 0.174	1.063 ± 0.06	0.813
3-(5-phenylthiophen-2-yl) prop-2-ynyl Acetate	LC-MS (-)	0.864 ± 0.143	1.07 ± 0.028	0.219
3,4-Dimethyl-5-pentyl-2-furanpentadecanoic acid	LC-MS/MS (+)	0.988 ± 0.111	1.028 ± 0.133	0.938

3-aminoisobutyric acid	GC-MS	0.698 ± 0.039	0.697 ± 0.02	0.578
3-hexenedioic acid	GC-MS	0.666 ± 0.061	0.681 ± 0.092	0.813
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	LC-MS (-)	0.924 ± 0.124	1.067 ± 0.187	0.375
3-Hydroxy-6,8-dimethoxy-7(11)- eremophilin-12,8-olide	LC-MS/MS (-)	0.787 ± 0.344	1.714 ± 0.085	0.078
3-hydroxypropanoic acid	GC-MS	0.666 ± 0.046	1.347 ± 0.401	0.078
3-Indolebutyric acid	LC-MS (+)	0.412 ± 0.101	0.978 ± 0.268	0.156
3-methyl-2-oxobutanoic acid	GC-MS	1.17 ± 0.066	0.864 ± 0.082	0.016
3-Methyl-2-oxovaleric acid	LC-MS (-)	0.976 ± 0.031	1.024 ± 0.04	0.578
3-Methylxanthine	LC-MS (-)	1.049 ± 0.117	1.011 ± 0.052	0.938
3-phosphoglyceric acid	GC-MS	0.13 ± 0.022	1.255 ± 0.659	0.109
4-acetylbutyric acid	GC-MS	0.929 ± 0.043	0.925 ± 0.074	1.000
4-Dodecylbenzenesulfonic Acid	LC-MS/MS (-)	1.057 ± 0.173	1.207 ± 0.092	0.813
4-guanidinobutyric acid	GC-MS	0.75 ± 0.037	0.62 ± 0.04	0.109
4-hydroxycinnamic acid	GC-MS	1.142 ± 0.062	0.997 ± 0.03	0.109
4-hydroxy-L-proline	GC-MS	0.624 ± 0.146	0.876 ± 0.169	0.219
4-Hydroxyphenyllactic acid	LC-MS (-)	0.298 ± 0.024	1.201 ± 0.589	0.156
4-O-Methylphloracetophenone	LC-MS (-)	0.963 ± 0.045	1.034 ± 0.037	0.375
4-oxo-Retinoic acid	LC-MS/MS (-)	0.792 ± 0.13	0.938 ± 0.032	0.469
5alpha-Cholesterol	LC-MS (+)	0.895 ± 0.045	1.099 ± 0.163	0.578
5-Methyl-2- thiophenecarboxaldehyde	LC-MS/MS (+)	0.859 ± 0.079	1.164 ± 0.204	0.375
6-deoxy-d-glucose	GC-MS	0.605 ± 0.041	0.678 ± 0.056	0.688
7,8-Dehydro-beta- micropteroxanthin	LC-MS/MS (-)	0.999 ± 0.051	1.04 ± 0.03	0.813
7,8-dimethylalloxazine	GC-MS	0.789 ± 0.017	0.691 ± 0.033	0.156
8alpha-Hydroxy-gama-tocopherone	LC-MS/MS (+)	0.86 ± 0.103	1.023 ± 0.136	0.297
Acetoacetate	GC-MS	1.045 ± 0.043	0.906 ± 0.056	0.219
Acetol	GC-MS	1.548 ± 0.258	0.905 ± 0.223	0.078
Adenine	LC-MS (+)	0.915 ± 0.048	1.082 ± 0.153	1.000
Adipamide	GC-MS	1.196 ± 0.147	1.154 ± 0.224	0.813
Adrenosterone	LC-MS (+)	0.811 ± 0.239	1.159 ± 0.329	0.469
Alanine	GC-MS	1.044 ± 0.046	0.913 ± 0.08	0.219
Allo-inositol	GC-MS	0.767 ± 0.065	0.728 ± 0.051	0.469
Allose	GC-MS	0.81 ± 0.073	0.719 ± 0.051	0.297
Alpha ketoglutaric acid	GC-MS	0.672 ± 0.039	1.195 ± 0.295	0.578
alpha-Carboxy-delta-decalactone	LC-MS/MS (+)	0.85 ± 0.184	1.136 ± 0.302	0.578
Alpha-CEHC	LC-MS (+)	0.859 ± 0.032	1.105 ± 0.149	0.375
Alpha-Hydroxyisobutyric acid	LC-MS (-)	0.911 ± 0.063	1.125 ± 0.089	0.078
Altrose	GC-MS	1.014 ± 0.043	0.853 ± 0.165	0.688
Arachidic acid	GC-MS	1.079 ± 0.025	0.924 ± 0.048	0.047
Arachidonic acid	LC-MS (-)	0.679 ± 0.214	1.427 ± 0.353	0.219

Arbutin	GC-MS	0.731 ± 0.041	0.675 ± 0.078	0.297
Aspartic acid	GC-MS	0.462 ± 0.128	1.333 ± 0.251	0.109
Azelaic acid	LC-MS/MS (-)	0.977 ± 0.02	1.018 ± 0.024	0.297
Behenic acid	LC-MS (+)	0.968 ± 0.086	1.037 ± 0.134	0.938
Beta- alanine	GC-MS	0.615 ± 0.033	0.669 ± 0.144	0.938
Beta-glycerolphosphate	GC-MS	1.229 ± 0.132	0.94 ± 0.201	0.109
beta-Hydroxymyristic acid	LC-MS (-)	0.989 ± 0.023	1.064 ± 0.034	0.297
Betaine	LC-MS (+)	0.79 ± 0.09	1.329 ± 0.13	0.031
Capric acid	GC-MS	1.12 ± 0.054	0.967 ± 0.077	0.078
Ceramide (d18:1/16:0)	LC-MS (+)	0.997 ± 0.131	0.985 ± 0.09	0.578
Ceriporic acid C	LC-MS/MS (+)	0.926 ± 0.118	0.927 ± 0.39	0.688
Cholesterol	GC-MS	0.713 ± 0.079	1.036 ± 0.096	0.047
Cholic acid	GC-MS	1.036 ± 0.169	0.883 ± 0.13	0.469
Choline	LC-MS (+)	0.91 ± 0.117	1.083 ± 0.273	0.813
cis-Aconitic acid	LC-MS/MS (+)	0.891 ± 0.048	1.126 ± 0.171	0.813
Citraconic acid	LC-MS (-)	0.942 ± 0.162	1.127 ± 0.203	0.688
Citramalic acid	GC-MS	1.088 ± 0.064	0.888 ± 0.079	0.016
Citric acid	GC-MS	1.197 ± 0.161	0.962 ± 0.153	0.219
Citric acid-lc	LC-MS (-)	0.94 ± 0.126	1.019 ± 0.164	0.938
Clionasterol	LC-MS (+)	0.786 ± 0.271	1.034 ± 0.413	0.688
Creatine	LC-MS (+)	0.536 ± 0.068	1.366 ± 0.494	0.297
Creatinine	LC-MS (+)	0.771 ± 0.071	1.182 ± 0.167	0.031
Cytidine	GC-MS	0.443 ± 0.032	1.447 ± 0.409	0.016
Cytidine-5-monophosphate	GC-MS	0.919 ± 0.188	0.897 ± 0.168	0.938
D-Alanyl-D-alanine	LC-MS (+)	0.664 ± 0.044	1.232 ± 0.371	0.578
Deferoxamine	LC-MS (+)	0.937 ± 0.075	1.074 ± 0.171	0.688
Dehydroascorbic acid	GC-MS	0.722 ± 0.026	0.612 ± 0.042	0.219
Dehydrophytosphingosine	LC-MS (+)	0.924 ± 0.051	1.084 ± 0.085	0.156
Deoxycholic acid	LC-MS (+)	0.912 ± 0.048	1.109 ± 0.178	0.578
Diethanolamine	LC-MS (+)	0.86 ± 0.035	1.077 ± 0.113	0.078
Dihydrotachysterol	LC-MS/MS (+)	0.852 ± 0.145	1.225 ± 0.09	0.156
Dimethyldithiophosphate	LC-MS/MS (+)	0.873 ± 0.039	1.129 ± 0.165	0.375
Dithiothreitol	GC-MS	0.002 ± 0	0.003 ± 0	0.271
Docosapentaenoic acid	LC-MS (+)	0.885 ± 0.05	1.098 ± 0.161	0.578
E-10-	LC-MS/MS (+)	1.184 ± 0.196	0.83 ± 0.091	0.219
Hydroxydesmethylnortriptyline				
Erythronolactone	LC-MS (-)	0.844 ± 0.103	0.986 ± 0.103	0.578
Estrone	GC-MS	0.441 ± 0.019	0.369 ± 0.015	0.109
Ethyl aconitate	LC-MS/MS (-)	1.185 ± 0.184	0.81 ± 0.266	0.529
Ethyl dodecanoate	LC-MS (-)	1.085 ± 0.137	0.967 ± 0.026	0.813
Folic acid	LC-MS (+)	0.787 ± 0.261	0.878 ± 0.536	1.000

Fructose	GC-MS	0.195 ± 0.02	0.359 ± 0.175	0.813
Fumaric acid	GC-MS	0.767 ± 0.037	1.065 ± 0.263	0.578
Glucoheptonic acid	GC-MS	1.078 ± 0.155	1.219 ± 0.263	0.813
Gluconic acid	GC-MS	1.153 ± 0.14	1.074 ± 0.161	0.469
Gluconic acid lactone	GC-MS	1.393 ± 0.266	1.047 ± 0.195	0.375
Glucosamine phosphate	GC-MS	1.245 ± 0.103	1.104 ± 0.194	0.688
Glucosaminic acid	GC-MS	0.564 ± 0.077	0.902 ± 0.342	0.219
Glucose	GC-MS	0.411 ± 0.132	0.636 ± 0.058	0.297
Glucose-6-phosphate	GC-MS	1.062 ± 0.229	0.669 ± 0.064	0.297
Glutamic acid	GC-MS	0.606 ± 0.235	1.446 ± 0.335	0.156
Glutathione reduced	GC-MS	0.04 ± 0.005	0.451 ± 0.351	0.375
Glyceraldehyde	GC-MS	0.607 ± 0.059	0.556 ± 0.047	0.469
Glyceric acid	GC-MS	1.17 ± 0.078	0.806 ± 0.064	0.031
Glycerol	GC-MS	0.693 ± 0.034	0.596 ± 0.035	0.219
Glycerol-phosphate	GC-MS	0.424 ± 0.25	0.984 ± 0.456	0.297
Glycine	GC-MS	0.469 ± 0.076	1.408 ± 0.34	0.031
Glycolic acid	GC-MS	0.568 ± 0.035	0.482 ± 0.044	0.016
Heptadecanoic acid	GC-MS	1.074 ± 0.028	0.885 ± 0.048	0.047
Hydroquinone	GC-MS	1.255 ± 0.097	1.023 ± 0.075	0.047
Hypotaurine	GC-MS	0.394 ± 0.015	0.681 ± 0.189	0.016
Hypoxanthine	LC-MS (-)	0.848 ± 0.127	1.103 ± 0.23	0.297
Inosine	GC-MS	0.759 ± 0.067	0.651 ± 0.052	0.578
Isoacitretin	LC-MS/MS (-)	0.686 ± 0.635	0.967 ± 0.581	1.000
Isoleucine	GC-MS	0.601 ± 0.059	1.202 ± 0.318	0.109
Isopalmitic acid	LC-MS (-)	0.975 ± 0.033	1.016 ± 0.016	0.375
Isopersin	LC-MS/MS (+)	0.945 ± 0.66	1.647 ± 0.688	0.590
L-1,2,3,4-Tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid	LC-MS/MS (+)	0.838 ± 0.074	0.942 ± 0.129	0.688
Lactamide	GC-MS	0.9 ± 0.076	0.792 ± 0.089	0.078
Lactic acid	GC-MS	0.907 ± 0.061	0.714 ± 0.059	0.016
Lactose	GC-MS	0.725 ± 0.027	0.587 ± 0.048	0.047
Lactulose	GC-MS	0.464 ± 0.028	1.515 ± 1.079	0.578
Lauric acid	GC-MS	1.047 ± 0.038	0.917 ± 0.047	0.219
Lauric acid-lc	LC-MS (-)	1.06 ± 0.063	0.99 ± 0.051	0.688
Lauroyl diethanolamide	LC-MS (+)	0.874 ± 0.024	1.091 ± 0.104	0.219
L-Carnitine	LC-MS (+)	0.277 ± 0.052	1.103 ± 0.397	0.109
Leukotriene B4	LC-MS/MS (-)	2.099 ± 1.454	0.666 ± 0.617	0.789
Levonorgestrel	LC-MS/MS (-)	0.967 ± 0.026	1.018 ± 0.027	0.297
L-Glutamine	LC-MS (-)	0.882 ± 0.045	1.075 ± 0.067	0.016
Linoleic acid	LC-MS (-)	1.252 ± 0.482	0.955 ± 0.124	0.375
L-Isoleucine	LC-MS (+)	0.644 ± 0.089	1.489 ± 0.394	0.219

L-Lysine	LC-MS (+)	0.804 ± 0.073	1.159 ± 0.17	0.219
L-Malic acid	LC-MS (-)	0.851 ± 0.156	1.236 ± 0.206	0.297
L-Methionine	LC-MS (+)	0.697 ± 0.087	1.325 ± 0.271	0.219
L-Palmitoylcarnitine	LC-MS (+)	1.199 ± 0.339	0.859 ± 0.131	0.578
LPC 18:2	LC-MS (+)	0.891 ± 0.101	1.031 ± 0.111	0.375
L-Serine	LC-MS (+)	0.899 ± 0.073	1.085 ± 0.165	0.688
Lyxose	GC-MS	0.71 ± 0.055	0.709 ± 0.055	0.938
Lyxosylamine	GC-MS	0.751 ± 0.131	0.973 ± 0.166	0.219
Maleamic acid	LC-MS (-)	0.849 ± 0.151	1.238 ± 0.193	0.578
Malic acid	GC-MS	0.751 ± 0.08	1.077 ± 0.157	0.219
Malonic acid	GC-MS	0.276 ± 0.05	0.243 ± 0.042	0.688
Mannitol	GC-MS	0.472 ± 0.038	1.084 ± 0.491	0.938
Mannose	GC-MS	0.729 ± 0.042	0.635 ± 0.033	0.219
Margaroyl-EA	LC-MS/MS (+)	0.875 ± 0.029	1.085 ± 0.105	0.047
Methionine	GC-MS	0.755 ± 0.06	0.756 ± 0.062	0.938
Methoxytyrosine	LC-MS (-)	0.972 ± 0.023	1.01 ± 0.031	0.469
Methyl 2-(10-heptadecenyl)-6-hydroxybenzoate	LC-MS/MS (-)	1.083 ± 0.154	0.981 ± 0.067	0.578
Methyl docosanoate	GC-MS	0.661 ± 0.03	0.655 ± 0.077	0.469
Methyl eicosanoate	GC-MS	0.712 ± 0.032	0.628 ± 0.04	0.109
Methyl heptadecanoate	GC-MS	0.715 ± 0.022	0.77 ± 0.09	0.688
Methyl Heptadecanoic acid	LC-MS (-)	0.962 ± 0.026	0.993 ± 0.023	0.219
Methyl linocerate	GC-MS	0.64 ± 0.036	0.575 ± 0.042	0.078
Methyl oleate	GC-MS	0.774 ± 0.035	0.675 ± 0.04	0.297
Methyl palmitate	GC-MS	0.79 ± 0.035	0.708 ± 0.049	0.156
Methyl palmitoleate	LC-MS (-)	1.319 ± 0.42	0.72 ± 0.081	0.578
Methyl stearate	GC-MS	0.736 ± 0.035	0.642 ± 0.039	0.219
Methyl-beta-d-galactopyranoside	GC-MS	1.202 ± 0.083	1.033 ± 0.171	0.813
MG(0:0/16:0/0:0)	LC-MS/MS (+)	0.86 ± 0.04	1.096 ± 0.157	0.469
MG(18:0/0:0/0:0)	LC-MS/MS (+)	0.85 ± 0.149	1.179 ± 0.239	0.297
MG(18:1(9Z)/0:0/0:0)	LC-MS (+)	0.953 ± 0.162	0.964 ± 0.172	0.938
MG(18:2(9Z,12Z)/0:0/0:0)	LC-MS (+)	0.874 ± 0.11	1.029 ± 0.134	0.297
MG(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0/0:0)	LC-MS/MS (+)	0.867 ± 0.041	1.096 ± 0.159	0.469
Myo-inositol	GC-MS	0.621 ± 0.029	0.769 ± 0.109	0.156
Myristic acid	GC-MS	1.124 ± 0.029	0.926 ± 0.052	0.031
N,n-dimethylglycine	GC-MS	0.913 ± 0.099	0.818 ± 0.063	0.688
N,N-dimethyl-Safingol	LC-MS/MS (+)	1.009 ± 0.102	1.063 ± 0.182	0.938
N-Acetylaspartic acid	LC-MS (-)	0.781 ± 0.067	1.111 ± 0.247	0.469
N-acetyl-l-aspartic acid	GC-MS	0.766 ± 0.092	0.718 ± 0.046	0.938
N-acetyl-l-cysteine	GC-MS	1.473 ± 0.247	1.104 ± 0.172	0.297
N-acetyl-l-glutamic acid	GC-MS	0.588 ± 0.068	1.071 ± 0.219	0.016

N-Cyclohexylformamide	LC-MS (+)	0.955 ± 0.048	1.02 ± 0.108	0.938
Neohesperidin	GC-MS	0.312 ± 0.018	1.122 ± 0.49	0.016
N-ethylglycine	GC-MS	1.022 ± 0.046	1.216 ± 0.09	0.156
N-methylantranilic acid	GC-MS	1.137 ± 0.158	0.921 ± 0.116	0.156
N-Methylcytosine	LC-MS (+)	0.848 ± 0.094	1.05 ± 0.098	0.297
N-Methyltyrosine	LC-MS (-)	0.978 ± 0.028	1.019 ± 0.032	0.375
N-nornuciferine	LC-MS (+)	1.077 ± 0.26	0.853 ± 0.072	0.813
Norvaline	GC-MS	0.761 ± 0.077	1.176 ± 0.226	0.219
N-propyl-16,16-dimethyl-5Z,8Z,11Z,14Z-docosatetraenoyl amine	LC-MS/MS (+)	1.139 ± 0.205	0.845 ± 0.103	0.375
N-Undecanoylglycine	LC-MS/MS (-)	1.144 ± 0.239	0.805 ± 0.013	0.219
Oleic acid	GC-MS	0.627 ± 0.016	0.527 ± 0.046	0.156
Oleic acid-lc	LC-MS (-)	1.012 ± 0.508	1.136 ± 0.138	0.297
Oleoyl sarcosine	LC-MS (-)	0.98 ± 0.056	1.019 ± 0.062	0.688
Oxalic acid	GC-MS	1.03 ± 0.167	0.95 ± 0.126	0.469
Oxoglutaric acid	LC-MS/MS (+)	0.87 ± 0.048	1.08 ± 0.092	0.016
Palmitic acid	GC-MS	1.138 ± 0.036	0.951 ± 0.053	0.109
Palmitoleic acid	GC-MS	1.017 ± 0.054	0.868 ± 0.216	0.375
Palmitoylcarnitine	LC-MS (-)	1.429 ± 0.525	0.677 ± 0.041	0.156
Pentadecanoic acid	LC-MS (-)	1.155 ± 0.193	0.87 ± 0.043	0.578
Phenylalanine	GC-MS	0.66 ± 0.083	1.157 ± 0.333	0.469
Phenyl-beta-glucopyranoside	GC-MS	1.024 ± 0.187	1.052 ± 0.118	0.578
Phenyllactic acid	LC-MS (+)	0.395 ± 0.062	1.113 ± 0.275	0.078
Phosphatidylethanolamine 16	LC-MS (-)	0.943 ± 0.101	1.019 ± 0.136	0.469
Phosphatidylethanolamine lyso 16	LC-MS (-)	0.844 ± 0.159	1.228 ± 0.407	0.469
Phosphatidylethanolamine lyso 20	LC-MS (-)	0.805 ± 0.197	1.223 ± 0.361	0.469
Phosphatidylethanolamine lyso 22	LC-MS (-)	1.185 ± 0.054	0.904 ± 0.209	0.688
Phosphatidylinositol lyso 16	LC-MS (-)	0.969 ± 0.042	1.028 ± 0.026	0.297
Phosphocolamine	GC-MS	1.182 ± 0.073	0.952 ± 0.042	0.031
Phosphoric acid	GC-MS	0.493 ± 0.163	1.062 ± 0.37	0.375
Phytosphingosine	LC-MS (+)	0.801 ± 0.058	0.917 ± 0.147	0.813
Porphine	GC-MS	0.626 ± 0.04	0.542 ± 0.029	0.375
Proline	GC-MS	0.392 ± 0.047	1.031 ± 0.408	0.219
Proline betaine	LC-MS (+)	0.912 ± 0.12	1.261 ± 0.133	0.156
Protocatechuic acid	LC-MS (+)	1.114 ± 0.102	1.029 ± 0.128	0.813
Prunetin	GC-MS	1.014 ± 0.027	0.876 ± 0.034	0.078
Purine	LC-MS (-)	0.907 ± 0.048	1.144 ± 0.066	0.016
Pyroglutamic acid	GC-MS	0.557 ± 0.058	1.244 ± 0.431	0.031
Pyruvic acid	GC-MS	0.791 ± 0.052	0.698 ± 0.037	0.375
Ribitol	GC-MS	0.687 ± 0.033	0.581 ± 0.061	0.297
Sarcosine	GC-MS	0.711 ± 0.047	0.614 ± 0.063	0.219

Sebacic acid	LC-MS (-)	0.962 ± 0.024	1.039 ± 0.017	0.109
Sedoheptulose	GC-MS	1.14 ± 0.065	1.025 ± 0.225	0.813
Serine	GC-MS	0.69 ± 0.06	1.206 ± 0.282	0.297
Shikimic acid	GC-MS	1.285 ± 0.161	1.156 ± 0.225	0.469
Sphinganine	LC-MS (+)	0.939 ± 0.097	1.035 ± 0.177	1.000
Squalene	GC-MS	0.953 ± 0.199	0.709 ± 0.245	0.297
Stearic acid	GC-MS	1.122 ± 0.045	0.965 ± 0.048	0.156
Succinic acid	GC-MS	0.931 ± 0.054	0.875 ± 0.065	0.469
Sucrose	GC-MS	0.596 ± 0.037	1.464 ± 0.92	0.578
Tagatose	GC-MS	0.798 ± 0.063	0.724 ± 0.056	0.375
Tartronic acid	GC-MS	1.068 ± 0.106	0.868 ± 0.089	0.031
Taurine	LC-MS (+)	0.415 ± 0.072	1.632 ± 0.751	0.297
Tetracosanoic acid	LC-MS/MS (+)	0.623 ± 0.13	0.682 ± 0.032	0.688
Tetradecane	LC-MS (+)	0.854 ± 0.046	1.098 ± 0.157	0.578
Threitol	GC-MS	0.675 ± 0.033	0.628 ± 0.071	0.297
Threonine	GC-MS	1.093 ± 0.094	0.941 ± 0.076	0.078
Threose	GC-MS	1.235 ± 0.142	0.932 ± 0.128	0.047
Thymine	GC-MS	0.13 ± 0.009	0.94 ± 0.588	0.031
Triacetin	LC-MS (+)	0.881 ± 0.113	1.046 ± 0.235	0.688
Tryptmanine	LC-MS (+)	1.344 ± 0.383	1.006 ± 0.31	0.688
Tryptophan	GC-MS	1.251 ± 0.117	0.985 ± 0.174	0.109
Tyrosine	GC-MS	0.558 ± 0.079	1.111 ± 0.255	0.031
Urea	GC-MS	1.163 ± 0.131	0.95 ± 0.107	0.031
Urethane	GC-MS	0.27 ± 0.048	0.428 ± 0.08	0.078
Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine	LC-MS/MS (-)	0.025 ± 0.01	1.018 ± 0.716	0.047
Valine	GC-MS	0.868 ± 0.047	1.284 ± 0.279	0.375
Ventonic acid	LC-MS/MS (-)	1.715 ± 1.026	0.769 ± 0.712	0.371
Xanthine	LC-MS (+)	0.813 ± 0.067	1.167 ± 0.23	0.469
Xanthotoxin	GC-MS	0.592 ± 0.102	2.046 ± 0.64	0.078
Xylitol	GC-MS	0.826 ± 0.048	0.811 ± 0.076	0.469

Ek 3. Deneklerde izlenen muayene bulguları özeti ve elde edilen örneklerin tabii tutulduğu testler

Tavşan No.	Muayene Bulguları	Metabolomik İncelemeler	ELISA testi	Viskometrik Ölçüm	TEM İncelemeler
1L	Normal	(-)	(-)	(+)	(+)
1R	Alopesi, ödem, konjunktivit, keratit	(-)	(-)	(+)	(+)
2L	Normal	(+)	(+)	(+)	(-)
2R	Alopesi, ödem, konjunktivit, subkapsüler katarakt	(+)	(+)	(+)	(-)
3L	Normal	(+)	(+)	(+)	(-)
3R	Alopesi, ödem	(+)	(+)	(+)	(-)
4L	Normal	(+)	(+)	(+)	(-)
4R	Alopesi, ödem, keratit	(+)	(+)	(+)	(-)
5L	İnsidental temporalde koroid avasküler	(+)	(+)	(+)	(-)
5R	Alopesi, ödem	(+)	(+)	(+)	(-)
6L	Normal	(-)	(-)	(+)	(+)
6R	Alopesi, ödem, keratit, konjunktivit	(-)	(-)	(+)	(+)
7L	Normal	(-)	(+)	(+)	(-)
7R	Alopesi, ödem	(-)	(+)	(+)	(-)
8L	Normal	Örnek yok	Örnek yok	Örnek yok	Örnek yok
8R	Alopesi, ödem, vitreal haze	(-)	(-)	(-)	(-)
9L	Normal	(+)	(+)	(+)	(-)
9R	Alopesi, ödem, keratit	(+)	(+)	(+)	(-)
10L	Normal	(+)	(-)	(+)	(-)
10R	Alopesi, ödem, keratit	(+)	(-)	(+)	(-)
11L	Normal	(+)	(+)	(+)	(-)
11R	Alopesi, ödem, katarakt	(+)	(+)	(+)	(-)
12L	Normal	(-)	(-)	(+)	(+)
12R	Alopesi, ödem, konjunktivit, keratit, vitreal haze	(-)	(-)	(+)	(+)

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; No: Numara; TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu

Normal: göz kapağı ve ekleri doğal, konjunktiva normal, kornea saydam, lens saydam, vitröz saydam, optik disk normal, retina ve retinal damarlar normal.